

## Diagnóstico

### MALARIA

#### Aplicabilidad de la PCR en la detección de infecciones por *Plasmodium* spp.

Albina Wide<sup>1,2,3</sup>, Rosalba Pabón<sup>3</sup>, Jacinta Capaldo<sup>3</sup>, Sergia Blondel<sup>1</sup>, Joseph González<sup>2</sup>, Joymar Mendoza<sup>2</sup>, Carlos Correa<sup>2</sup>, Darío González<sup>3</sup>, Anny Rondón<sup>2</sup>, María Vásquez<sup>2</sup>, Rosa Contreras<sup>1</sup>, Marilyn Toledo<sup>1</sup>, Óscar Noya A.<sup>1</sup>, Tatiana Giusti<sup>1\*</sup>, Óscar Noya G.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Cátedra de Parasitología, Escuela "Luis Razetti"

<sup>2</sup> Laboratorio de Biotecnología-IMT, Universidad Central de Venezuela

<sup>3</sup> Centro para Estudios sobre Malaria, Instituto de Altos Estudios "Dr. Arnoldo Gabaldón", MPPS, Caracas, Venezuela

**Introducción.** El diagnóstico oportuno y preciso de la malaria es un requisito indispensable para el tratamiento y control adecuado de esta parasitosis. La detección e identificación de las especies de *Plasmodium* spp. por gota gruesa y extendido han sido los métodos de referencia. Entre los métodos alternativos para corroborar la infección a partir de muestras de sangre, se destacan las pruebas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con gran sensibilidad y especificidad.

**Objetivo.** Evaluar la aplicabilidad del método de PCR en personas con infecciones asintomáticas, sintomáticas con bajas parasitemias, con infecciones mixtas y los casos dudosos.

**Materiales y métodos.** Se evaluaron 423 muestras de sangre total mediante la PCR anidada: 102 de personas con sintomatología indicativa de malaria y 321 asintomáticos procedentes de áreas endémicas de Venezuela.

**Resultados.** En el grupo de sintomáticos, la PCR identificó un caso positivo similar al observado mediante gota gruesa/extendido, arrojando sólo dos falsos negativos, mientras que, en el de asintomáticos, los casos positivos fueron significativamente más numerosos que los detectados por gota y microscopía, alcanzando una sensibilidad de 100 %. Es en este grupo donde es oportuna la utilidad de la PCR en la detección de la infección palúdica, en el caso de existir bajas parasitemias, difícilmente observables al examen parasitológico. La PCR resultó más sensible y específica en individuos asintomáticos; además, se corroboró la utilidad de la gota gruesa/extendido en el diagnóstico de la malaria en personas

sintomáticas, no así con parasitemias bajas.

**Conclusiones.** La PCR anidada, si bien no sustituye al diagnóstico parasitológico, tiene valor confirmatorio y adquiere relevancia en la detección de infecciones inaparentes en asintomáticos, con parasitemias bajas, en pacientes que han tomado compuestos con actividad antipalúdica, con infecciones mixtas y en casos dudosos. La identificación de infecciones asintomáticas podría contribuir al diseño de estrategias de control epidemiológico.



#### Prevalencia de cloroquina en orina antes del diagnóstico parasitológico en pacientes con sospecha clínica de malaria en Tumaco, Nariño

Álvaro Lasso<sup>2</sup>, Gustavo Díaz<sup>1</sup>, Claribel Murillo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas, Cali, Colombia

<sup>2</sup> Escuela de Bacteriología, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia

**Introducción.** Una de las principales causas para la aparición y diseminación de microorganismos resistentes ha sido la presión de la selección por medicamentos. La disponibilidad de cloroquina en regiones endémicas favorece el uso inapropiado de este medicamento, lo que acrecienta la selección de parásitos resistentes.

Nuestro objetivo fue explorar la prevalencia de cloroquina en orina en pacientes con sospecha clínica de malaria en Tumaco, Nariño, como un indicador del consumo de antipalúdicos antes del diagnóstico, estimando de esta manera la presión de selección a la cual se encuentra expuesto el agente causal.

**Materiales y métodos.** Entre mayo y julio de 2011, se recolectó orina de pacientes con sospecha clínica de malaria que consultaron los hospitales San Andrés y Divino niño. Las muestras se obtuvieron previo consentimiento informado. Se recolectó información sobre: sexo, edad, procedencia, diagnóstico de malaria, régimen de salud e inicio de síntomas. Para la detección de cloroquina se utilizó el método de Saker-Solomons. Las asociaciones entre variables sociodemográficas fueron evaluadas con la prueba exacta de Fisher, considerando un nivel de confianza de 95 %.

**Resultados.** Se incluyeron 200 pacientes, de los cuales 36 % (72/200) presentaron cloroquina en orina. No hubo asociación significativa entre ninguna de las variables observadas y el resultado positivo del método de Saker-Solomons. De 30 mujeres embarazadas, 43 % (13/30) tenían cloroquina en orina; el 71,5 % (143/200) de los pacientes consultaron dentro de los tres primeros días después de la aparición de los síntomas. De los pacientes tamizados, cuatro tenían malaria y, de estos, uno estaba infectado con *Plasmodium falciparum* y había consumido cloroquina previamente.

**Conclusiones.** Se observó una alta prevalencia de pacientes con cloroquina en orina, lo cual puede estar favoreciendo la selección de parásitos resistentes a este medicamento en la zona.

• • •

### **SYBR-green como alternativa a ELISA-HRP2 para determinar la sensibilidad a los antipalúdicos en aislamientos de *Plasmodium falciparum* adaptados a cultivo en Colombia**

Madeline Montenegro, Claribel Murillo  
Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas, Cali, Colombia

**Introducción.** Actualmente, el ELISA-HRP2 es el método de evaluación de sensibilidad *in vitro* para *Plasmodium falciparum* más ampliamente usado en el mundo. Sin embargo, la reciente descripción de aislamientos con ausencia de esta proteína conduce a la búsqueda de métodos alternativos para esta población de parásitos. Recientemente, el método de detección de ácidos nucleicos basado en SYBR-green I, se ha presentado como una alternativa con menor costo y tiempo de ejecución.

El objetivo de este trabajo fue explorar el desempeño del método basado en SYBR-green I comparado con el ELISA-HRP2, en aislamientos de *P. falciparum* adaptados a cultivo en Colombia.

**Materiales y métodos.** Tres cepas de referencia y seis aislamientos adaptados a cultivo se evaluaron por triplicado para determinar su sensibilidad a seis antipalúdicos: cloroquina, amodiaquina, monodesetilamodiaquina, mefloquina, dihidroartemisinina y lumefantrina. Las condiciones de cultivo, la determinación de la producción de la proteína HRP2 y la evaluación basada en SYBR-green I, se hicieron siguiendo protocolos descritos previamente. La correlación entre los métodos se evaluó determinando coeficientes

de correlación no paramétricos de los resultados de concentración inhibitoria 50 (IC50) usando el programa **GraphPad-Prism 5**.

**Resultados.** El coeficiente de correlación de Spearman de los IC<sub>50</sub> entre el ELISA-HRP2 y SYBR-green I fue de 0,89 (p<0,0001). Este coeficiente presentó variación dependiendo del antipalúdico evaluado (0,35 a 0,89).

**Conclusiones.** SYBR-green I puede ser usado como una prueba alterna al ELISA-HRP2 para determinar la sensibilidad *in vitro* a los antipalúdicos de *P. falciparum* adaptado a cultivo. Sin embargo, la correlación puede estar influenciada por el mecanismo de acción del medicamento y por el blanco de detección de cada metodología.

• • •

### **Evaluación de los criterios para el diagnóstico microscópico de la malaria**

María Isabel Arroyo, Gloria Patricia Morales, Paula Andrea Sosa, Jaiberth Antonio Cardona, Olga María Agudelo, Adriana María Correa, Jaime Carmona-Fonseca  
Grupo de Investigación Salud y Comunidad, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

**Introducción.** El diagnóstico microscópico de la malaria puede hacerse a partir del extendido y la gota gruesa. La gota gruesa es la prueba estándar para el diagnóstico de la malaria. Tiene sensibilidad de 90 % y especificidad de 100 %, es de bajo costo y se puede practicar en condiciones de campo en zonas palúdicas.

No hay acuerdo general sobre el mejor procedimiento para la elaboración, lectura y conteo de parásitos en la gota gruesa. Además de establecer el diagnóstico de especie, es útil conocer la densidad de la parasitemia, porque sirve como guía para estimar la gravedad de la infección y la posible evolución, así como para hacer el seguimiento a la respuesta terapéutica.

**Materiales y métodos.** Se hará lectura de 50 placas de gota gruesa: 40 positivas y 10 negativas, seleccionadas por un investigador del grupo que no hará parte de quienes realizarán la lectura. Cada placa será leída por al menos dos personas en forma independiente y sin conocer previamente si es positiva o negativa.

Se harán dos lecturas (continua y discontinua) a cada placa. En cada lectura, se leerán 100 y 200 campos, sin tener en cuenta el número de leucocitos por campo. Se contará el número de parásitos y leucocitos presentes en cada uno de los campos hasta que el número de leucocitos contados sea

100 y 200, luego se contará solamente el número de parásitos por campo hasta leer 200 campos.

**Resultados y conclusiones.** Se han leído 30 placas. Se está comparando la variación de: a) la parasitemia obtenida en función de la lectura de campos continuos Vs. discontinuos, b) la lectura de 100 Vs.200 campos; c) la lectura sobre 100 Vs.200 leucocitos. Se aplicará la prueba de U-Mann-Whitney para muestras independientes. Hasta el momento no se han encontrado diferencias significativas en las lecturas.

• • •

### **Análise serológica e imunoquímica de potenciais antigénios para a pesquisa de anticorpos anti *Plasmodium falciparum* em pacientes com malária importada**

Rita Medina Costa<sup>1</sup>, Fátima Nogueira<sup>2</sup>, Karina Pires de Sousa<sup>1</sup>, Marcelo Sousa Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unidade de Ensino e Investigação de Clínica Tropical, Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Portugal

<sup>2</sup> Parasitologia Médica, Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Portugal

**Introdução.** Malária é uma doença infecciosa causada por um protozoário parasita do género *Plasmodium* e é transmitida pela fêmea do mosquito do género *Anopheles*. A mais importante das cinco espécies de *Plasmodium*, responsáveis pela malária humana, é o *Plasmodium falciparum*. Cerca de 300 milhões de casos clínicos ocorrem todos os anos, resultando em aproximadamente dois milhões de mortes, na sua maioria na África subsariana. Cerca de 40% da população mundial está em risco.

Assim sendo, o principal objectivo do presente estudo é avaliar a reactividade serológica de amostras de soros de indivíduos potencialmente expostos a *P. falciparum* oriundos de países africanos, frente a antigénios nativos do parasita e posterior identificação das principais proteínas imunogénicas.

**Material e métodos.** As proteínas nativas do parasita foram produzidas num sistema de cultura *in vitro* de RBCs, e quantificadas pelo método de Bradford. Analisaram-se 422 soros de pacientes potencialmente expostos a *P. falciparum*, provenientes de países africanos. Através de ensaios imunoenzimáticos (ELISA) distinguiu-se a população negativa da positiva, frente a um grupo controlo

(soros de pacientes (n=23) que nunca estiveram em zonas endémicas). Utilizou-se 100 ng/poço de proteínas nativas do parasita para cobrir as placas. Foi testada a presença de IgG totais (1:40.000) e de IgM (1:4.000). Os soros que apresentaram maior reactividade por ELISA, foram analisados por Western blot.

**Resultados.** Dos 422 soros analisados por ELISA, resultaram 124 positivos para IgG totais e 117 para IgM. A análise dos perfis de Western blot demonstrou um padrão consistente no que diz respeito à imunoreactividade de antigénios com massas moleculares na faixa 30 a 60 kDa.

**Conclusões.** A imunoreactividade dos soros dos pacientes potencialmente expostos a *P. falciparum* corresponde à imunogenicidade de alguns antigénios predominantes em extractos de proteínas totais dos parasitas.

• • •

### **Desarrollo, optimización y evaluación de la técnica ELISA como método inmunológico para la detección de anticuerpos específicos contra *Plasmodium falciparum***

Sandra Barrera<sup>1</sup>, Adriana Cepeda<sup>1</sup>, Hernando Curtidor<sup>2</sup>, Yolanda Silva<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Bioquímica y Biología Celular, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

<sup>2</sup> Fundación Instituto de Inmunología de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

**Introducción.** La malaria continúa siendo una de las enfermedades que causa mayor morbimortalidad a nivel mundial, debido a esto es la importancia de emplear estrategias de control e implementar herramientas diagnósticas eficaces que faciliten su estudio.

La malaria induce una respuesta inmunitaria compleja e insuficientemente comprendida, con aumento en la producción de IgE e IgG. Nuestra estandarización del ensayo inmunoenzimático estaba encaminada a confirmar la presencia de anticuerpos específicos contra *Plasmodium falciparum*, que reconozcan un extracto proteico del parásito y un péptido sintético derivado de una proteína de superficie del mismo denominada (*glurp*), permitiendo realizar un diagnóstico más certero de malaria.

Nuestro objetivo fue estandarizar la técnica ELISA, para determinar la respuesta inmunitaria humoral mediante la detección de IgG específica contra *Plasmodium* spp. en pacientes con diagnóstico de malaria no complicada por *P. falciparum*.

**Materiales y métodos.** Para la estandarización, se utilizaron 251 sueros de pacientes positivos para malaria por *P. falciparum* y 44 muestras de pacientes negativos para malaria, y como controles, muestras suministradas por la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia, previamente probadas.

Se practicó el ELISA usando dos antígenos (extracto de proteínas del parásito, péptido sintético IMT 94). Se establecieron las concentraciones y diluciones óptimas de cada componente del sistema.

**Resultados.** Para los controles negativos, se obtuvo un rango de los valores entre 0,097 y 0,078, y para los controles positivos, un rango entre 0,274 y 0,649. De las 251 analizadas, se encontraron 160 aumentadas con el péptido y 81 muestras con el extracto.

**Conclusión.** La estandarización nos permite identificar la respuesta inmunitaria dirigida específicamente contra *P. falciparum*, permitiendo su diferenciación de *P. vivax*.

