

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO**  
**ESCUELA DE POSTGRADO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**



**Genotipificación de *Plasmodium vivax* de pacientes  
con malaria, de Bellavista, Sullana, Perú, usando el  
gen *MSP3α***

**Tesis para optar el grado de  
Doctor en Ciencias Biomédicas**

**Autora: *Santos Nélica Murga Gutiérrez***

**Asesor: Dr. José Llanos Quevedo**

**Coasesor: Dr. Robert Gilman**

**Trujillo – Perú  
2010**

**N° de Registro: .....**

*A la memoria de mi padre, Miguel*

*A mi madre, María*

*A mi hijo, Carlos Manuel*

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Nacional de Trujillo, por el apoyo económico brindado para la realización de mis estudios de doctorado.

Al Laboratorio de Enfermedades Infecciosas, de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, por el apoyo otorgado para el procesamiento de las muestras del estudio.

Al Dr. José Llanos Quevedo, Profesor Principal de la Universidad Nacional de Trujillo, por su apoyo como asesor en el desarrollo de esta tesis doctoral.

Al Dr. Robert Gilman, Profesor del Departamento de Salud Pública de la Universidad Johns Hopkins, Baltimore, y Profesor Investigador de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, por su invaluable apoyo para desarrollar esta investigación.

A la Dra. Maritza Calderón Sánchez, Coordinadora del Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por su valiosa colaboración.

Al Dr. Edward Pozo Suclupe, Director de la Sub Región de Salud “Luciano Castillo Colonna”, Sullana, por las facilidades brindadas para la captación de los pacientes con malaria, en el Centro de Salud Bellavista, Sullana, Piura.

A todas las personas, quienes desinteresadamente colaboraron de alguna manera en el desarrollo y culminación de esta tesis.

## PRESENTACIÓN

Señores miembros del jurado:

En cumplimiento con las disposiciones establecidas en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Nacional de Trujillo, presento a vuestra consideración el trabajo de tesis titulado: **Genotipificación de *Plasmodium vivax* de pacientes con malaria, de Bellavista, Sullana, Perú, usando el gen *MSP3α***, con el propósito de obtener el grado de Doctor en Ciencias Biomédicas.

Trujillo, agosto de 2010.

---

Santos Nélica Murga Gutiérrez

## **JURADO EVALUADOR**

Los que subscriben, miembros del Jurado Evaluador, declaran que la presente tesis ha sido ejecutada en concordancia con las normas vigentes de la Escuela de Post Grado de la Universidad Nacional de Trujillo.

---

Dr. Alberto Gil Henríquez  
Presidente

---

Dr. Sebastián Bustamante Edquén  
Miembro

---

Dr. José Llanos Quevedo  
Asesor

# ÍNDICE

	<b>Pág.</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	ii
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	iii
<b>PRESENTACIÓN</b> .....	iv
<b>JURADO EVALUADOR</b> .....	v
<b>ÍNDICE</b> .....	vi
<b>RESUMEN</b> .....	vii
<b>ABSTRACT</b> .....	viii
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	9
<b>II. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	22
<b>III. RESULTADOS</b> .....	32
<b>IV. DISCUSIÓN</b> .....	39
<b>V. CONCLUSIONES</b> .....	45
<b>VII. PROPUESTA</b> .....	46
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLOGRÁFICAS</b> .....	48
<b>ANEXOS</b> .....	58

## RESUMEN

Murga Gutiérrez SN. Genotipificación de *Plasmodium vivax* de pacientes con malaria, de Bellavista, Sullana, Perú, usando el gen *MSP3 $\alpha$*  (tesis doctoral). Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2010.

El objetivo del estudio fue genotipificar los aislamientos de *Plasmodium vivax* de pacientes con malaria, del distrito Bellavista, Sullana, Perú, usando el gen de la proteína-3 $\alpha$  de la superficie del merozoíto (*MSP3 $\alpha$* ), y las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa y de polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP). Se trabajó con 57 muestras de sangre, obtenidas entre julio de 2009 y enero de 2010, de pacientes con malaria por *P. vivax*, diagnosticada por examen de gota gruesa; de las cuales también se determinaron la densidad parasitaria y el hematocrito indicador de anemia. Este diagnóstico fue confirmado por nested PCR, y en el 96,5% (55/57) de ellas se reconfirmó la especie, no encontrando paciente alguno con *P. falciparum*. Con estas muestras reconfirmadas para *P. vivax* se inició la genotipificación, aunque sólo en el 96,4% (53/55) amplificó el fragmento de *MSP3 $\alpha$*  y se analizó por PCR-RFLP usando las enzimas *Hha* I y *Alu* I para obtener los patrones de restricción. Se encontró que los fragmentos amplificados del gen *MSP3 $\alpha$*  de *P. vivax* en el 100% (53/53) mostraron tamaños de 1500 pb. Las digestiones con *Hha* I y *Alu* I produjeron cada una un solo patrón, y los tamaños de las bandas producidas fueron similares en todas las muestras. El 49,1% (26/53) de los pacientes presentó una densidad parasitaria alta (1 485 a 20 225 parásitos por  $\mu$ l de sangre) y anemia; ambas en el 53,8% (14/26) de ellos. Se concluye que entre los pacientes con malaria por *P. vivax*, del distrito Bellavista, está circulando un solo genotipo según el gen *MSP3 $\alpha$* , y está asociado con una alta densidad parasitaria y anemia.

**Palabras clave:** Malaria vivax, *Plasmodium vivax*, *MSP3 $\alpha$* , genotipificación

## ABSTRACT

Murga Gutiérrez SN. Genotyping of *Plasmodium vivax* from patients with malaria, in Bellavista, Sullana, Peru, using the *MSP3 $\alpha$*  gene (doctoral thesis). Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2010.

The aim of the study was to genotype isolates of *P. vivax* from patients with malaria, in the Bellavista District, Sullana, Peru, using the gene encoding the merozoite surface protein-3 $\alpha$  (*MSP3 $\alpha$* ), and a combined polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) protocol. Fifty seven blood samples were obtained between July 2009 and January 2010, from patients with malaria caused by *P. vivax* diagnosed by thick smear examination, which also identified the parasite density and hematocrit indicator of anemia. This diagnosis was confirmed by nested PCR, and in 96.5% (55/57) of them the species was reconfirmed. Not one patient was found with *P. falciparum*. With these reconfirmed *P. vivax* samples the genotyping was begun, although only in 96.4% (53/55) was the fragment of *MSP3 $\alpha$*  amplified and analyzed by PCR-RFLP using the enzymes *Hha* I and *Alu* I to obtain restriction patterns. It was found that amplified fragments of *MSP3 $\alpha$*  gene in 100% (53/53) showed sizes of 1500 bp. Digestion with *Hha* I and *Alu* I each yielded a single pattern, and band sizes were similar in all samples. In 49.1% (26/53) of patients a high parasite density (1,485 to 20,225 parasites per  $\mu$ l of blood) and anemia were found, both in 53.8% (14/26) of them. It is concluded that among patients with *P. vivax* malaria from Bellavista District a single genotype of *MSP3 $\alpha$*  gene is circulating, and it is associated with a high parasite density and anemia.

**Key words:** Malaria vivax, *Plasmodium vivax*, *MSP3 $\alpha$* , Vivax Genotyping



## I. INTRODUCCIÓN

La malaria humana, también conocida como paludismo, es una de las causas principales de morbilidad y mortalidad en los países subdesarrollados (CDC, 2005). En el mundo, es endémica en 109 países, incluido el Perú, en los cuales habita un 40% de la población con el riesgo de adquirir esta enfermedad (WHO, 2009; Vargas, 2003); cada año enferman entre 300 y 500 millones de personas, más de un millón fallecen, y la mayoría, son niños menores de cinco años de edad (Sachs y Malaney, 2002; Guerin *et al.*, 2002; WHO, 2009). En América Latina, esta enfermedad es endémica en 21 de los 35 países que la conforman (OPS, 2005).

Las especies causantes de malaria son, *Plasmodium vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* y *P. ovale*. La malaria debida a *P. falciparum*, es la más grave y temible, y responsable de la alta mortalidad ocasionada por esta enfermedad en Africa subsahariana (Guerin *et al.*, 2002; Price *et al.*, 2007); por lo que comúnmente se le brinda mayor atención. La malaria por *P. vivax* es la que ocasiona las tasas de morbilidad más altas, puede ser muy debilitante y ocasionar enfermedad grave, e incluso la muerte; su distribución mundial es la más amplia y afecta casi al 40% de la población global, con una ocurrencia estimada de 80 a 300 millones de casos por año (Price *et al.*, 2007; Mueller *et al.*, 2009), de los cuales, 10 a 15% ocurren en América del Sur (Mendis *et al.*, 2001), donde es responsable del 73% de casos de malaria (Carter, 2008).

La infección malárica, comúnmente, es transmitida por la picadura de la hembra infectada de varias especies de *Anopheles*. Este zancudo vector introduce a través de la piel los esporozoítos de *Plasmodium*, los que en pocos minutos migran al hígado, infectan los hepatocitos y desarrollan en esquizontes con división activa y en hipnozoítos responsables de las recaídas; los esquizontes liberan merozoítos, los cuales van a la sangre e infectan a glóbulos rojos, específicamente los reticulocitos, en los cuales se multiplican asexualmente, los rompen y salen a infectar otros reticulocitos (Anexo 1), siendo común la hemólisis y otros hechos asociados a la relación huésped-parásito que podrían causar anemia (Londoño, 1993; Mueller *et al.*, 2009). En la mayoría de casos, la malaria ocasiona escalofríos, fiebre y sudoración, cefalea, mialgia, malestar general, también puede causar vómitos, diarrea y otros síntomas similares a los del resfrío; estas manifestaciones clínicas pueden ser muy incapacitantes (CDC, 2005).

En el Perú, la malaria es ocasionada principalmente por *P. vivax* y *P. falciparum*, y ocasionalmente por *P. malariae* (Beingolea *et al.*, 2005). Aquella debida a *P. vivax* es la más frecuente y expandida en el país; siendo endémica en algunas zonas de la costa norte y la selva (OGE-MINSA, 2004; DGE-MINSA, 2009<sup>a</sup>). En los dos últimos años esta enfermedad ha reemergido en los departamentos Piura y Tumbes con incremento de casos principalmente en las provincias Sullana y Zarumilla, donde los principales vectores son *An. albimanus* y *An. pseudopunctipennis* (DGE-MINSA, 2008<sup>b</sup>). En el 2008, el 88% del total de casos de malaria fueron por *P. vivax*, y la tasa de incidencia fue de 1,6 casos por cada mil habitantes (DGE-MINSA, 2008<sup>b</sup>) y en el 2009, de 1,16 (DGE-MINSA, 2009<sup>c</sup>). Debido a su magnitud es una de las principales enfermedades

reemergentes y esta bajo vigilancia epidemiológica por el Ministerio de Salud. El registro sostenido de casos de malaria por *P.vivax* es preocupante. Además, cada vez es más resistente a algunos tratamientos antimaláricos (Ruebush *et al.*, 2003; Baird, 2004). La malaria estuvo por resolverse en la década de los años 60; aunque, en la década siguiente nuevamente aumentó, ubicándose entre las primeras causas de morbilidad en el Perú (Cantella, 1982; Legua, 1994), hasta la fecha. El 75 % del territorio nacional es considerado como zona de riesgo en la cual vive el 35% de la población (DGE-MINSA, 2009<sup>a</sup>).

Los estudios sobre la biología y la patogenicidad de las especies de *Plasmodium* causantes de malaria humana no ha sido fácil; por la dificultad en el mantenimiento de sus diversas formas de desarrollo en condiciones de laboratorio. Sólo los estadios eritrocíticos de *P. falciparum*, y recientemente de *P. vivax*, pueden mantenerse en cultivo *in vitro*; éstos son parásitos intracelulares obligados y viven dentro de una vacuola parasitófora formada durante la invasión del eritrocito (Feagin y Lanzer, 1996). Estas características han limitado los avances en el estudio de las características funcionales de los genes. Aunque, se tienen estudios de la dinámica y la organización de sus cromosomas, los que han revelado características particulares e interesantes del genoma de *Plasmodium*, tales como una alta variabilidad genética que va desde la variación alélica de un simple gen hasta polimorfismos de cromosomas enteros (Feagin y Lanzer, 1996; Cui *et al.*, 2003<sup>a</sup>; Leclerc *et al.*, 2004); útiles para analizar la estructura poblacional de los parásitos de la malaria.

Conocer la estructura genética de las poblaciones del parásito de la malaria es muy relevante para desarrollar medidas de control dirigidas a detener la enfermedad; así por ejemplo, predecir el flujo de mutaciones de la resistencia a drogas a través de poblaciones del parásito tiene consecuencias en el tipo y variación de las terapias medicamentosas disponibles en los países endémicos. La estructura genética de *P. falciparum* ha sido más estudiada que la de *P. vivax*, principalmente por falta de datos del genoma de *P. vivax*. En estudios de *P. falciparum* se han descrito y usado numerosos marcadores genéticos: de microsatélites, de polimorfismo del tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP), de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) (Volkman *et al.* 2002; Carlton, 2003). De ellos, unos pocos marcadores de genoma, mayormente ortólogos de genes de antígenos de *P. falciparum* identificados previamente, se han usado en estudios de poblaciones de *P. vivax* (Kain *et al.*, 1992; Bruce *et al.*, 2000; Cui *et al.*, 2003<sup>a</sup>). La falta de marcadores de genoma de *P. vivax* ha limitado el análisis de la estructura de su población y su evolución histórica, y ha obstaculizado los esfuerzos para mapear determinantes asociadas a fenotipos importantes; como, la resistencia a drogas antimaláricas (Collins y Jeffery, 1996; Baird, 2004) y los patrones de recaídas (Krotoski, 1989).

La longitud y la secuencia de regiones de ADN específicas (genes, microsatélites) difieren notablemente entre y dentro de las especies causantes de malaria. En la última década, en el ámbito mundial se han desarrollado numerosos estudios sobre variabilidad genética, mayormente en poblaciones de *P. falciparum* usando marcadores moleculares polimórficos, como el gen que codifica la proteína circunsporozoítica (*CSP*) (Kain y Lanar, 1991), el gen que codifica la proteína rica en glutamato (*GLURP*) (Viriyakosol *et*

*al.*, 1995; De Striker *et al.*, 2000; Arie *et al.*, 2001), el gen del antígeno apical de membrana (*AMA1*) (Polley y Conway, 2001), los genes que codifican las proteínas 1 y 2 de la superficie del merozoito (*MSP1*, *MSP2*) (Viriyakosol *et al.*, 1995; Ferreira *et al.*, 1998; Snounou *et al.*, 1999; Felger *et al.*, 1999; Cui *et al.*, 2003<sup>b</sup>). En el ámbito peruano, también se han realizado algunos estudios con *P. falciparum*; uno usando los genes *MSP1* y *MSP2* (Hijar *et al.*, 2003), y otro usando el gen *GLURP* (Hijar *et al.*, 2002), en los cuales se mostró la existencia de variabilidad genética intraespecífica en las poblaciones parásitas.

En relación a la variabilidad genética y la estructura poblacional de *P. vivax* existen pocos estudios; no obstante la alta prevalencia de casos y su amplia distribución. Estos estudios han mostrado diversidad genética en las poblaciones, expresado en la existencia de diferencias moleculares y/o morfológicas dentro de la especie. Los marcadores moleculares utilizados para genotipificar aislamientos de *P. vivax* son, el gen dimórfico de la proteína circunsporozoítica (*CSP*) (Rosenberg *et al.*, 1989; Kain *et al.*, 1992; Kho *et al.*, 1999; González *et al.*, 2001), el gen del antígeno apical de membrana (*AMA1*) (Figtree *et al.*, 2000), el gen *MSP1* (Kirchgatter y del Portillo, 1998; Cui *et al.*, 2003<sup>b</sup>), los genes de la proteína-3 $\alpha$ , y 3 $\beta$ , de la superficie del merozoito (*MSP3 $\alpha$* , *MSP3 $\beta$* ) (Bruce *et al.*, 1999; Han *et al.*, 2004; Rayner *et al.*, 2004; Zakeri *et al.*, 2006) y el gen que codifica el antígeno candidato a bloquear la transmisión de *P. vivax* (*GAMI*) (MRC, 2005). El gen *MSP3 $\alpha$*  es altamente polimórfico y de gran interés para genotipificar aislamientos de *P. vivax* de campo (Bruce *et al.*, 1999; Bruce *et al.*, 2000; Cui *et al.*, 2003<sup>a</sup> Mascorro *et al.*, 2005).

El gen de la proteína-3 $\alpha$  de la superficie del merozoíto de *P. vivax* (*PvMSP3 $\alpha$* ) es un miembro de la familia de genes *MSP3*, y está genéticamente relacionado con la proteína-3 de la superficie del merozoíto de *P. falciparum* (*PfMSP3*); este gen sinténico está localizado en el cromosoma 3 de ambas especies, y es de gran interés, por codificar una molécula muy antigénica y candidato promisorio para una vacuna contra la malaria (Bruce *et al.*, 1999; Rayner *et al.*, 2002; Mascorro *et al.*, 2005). La proteína *MSP3 $\alpha$*  es un miembro de la familia de proteínas del merozoíto; las cuales contienen un dominio central rico en alanina que forma una estructura terciaria de hélice superenrollada (Mascorro *et al.*, 2005) y su tamaño es variado debido a las deleciones e inserciones que en ella ocurren, y, por encontrarse en la cubierta superficial del merozoíto de *Plasmodium* son blancos de la inmunidad adquirida naturalmente e inducida por vacuna antimalárica (Taylor, 1998; Bruce *et al.*, 1999). Los antígenos de superficie de la fase hemática de los parásitos de la malaria son candidatos principales para una vacuna antimalárica, aunque, su alta naturaleza polimórfica requiere investigaciones extensas de poblaciones del parásito para validar el diseño de una vacuna (Mascorro *et al.*, 2005).

El estudio de los genotipos o variantes genéticas, se conoce como genotipificación o caracterización genética de aislamientos de una especie. Actualmente, entre las técnicas usadas para genotipificar aislamientos de *Plasmodium*, se tienen los perfiles de amplificación génica basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Reeder y Marshall, 1994) los perfiles de restricción del ADN cromosómico (RFLP) (Bruce *et al.*, 1999; Olive y Bean, 1999), los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) (Feng *et al.*, 2003) y los secuenciamientos de genes (Figtree *et al.*, 2000). Inicialmente, la caracterización

de aislamientos de *Plasmodium* obtenidos de pacientes y del vector, se realizaron en base a las características fenotípicas; algunas de las pruebas usadas son buenas, así la de isoenzimas y de anticuerpos monoclonales que permitieron detectar alto polimorfismo en aislamientos de *P. vivax* (Cui *et al.*, 2003<sup>a</sup>). Sin embargo, la caracterización genotípica es más precisa; porque se estudia una secuencia de ADN del organismo de interés. La genotipificación de estos aislamientos conduce a su caracterización fidedigna y apoya a los datos epidemiológicos. Las investigaciones de biología molecular incorporadas a la investigación epidemiológica tradicional han dado origen a la moderna epidemiología molecular.

Las técnicas PCR y RFLP son muy sensibles para realizar tipificaciones moleculares o genotipificaciones. En los estudios de diversidad genética de *P. vivax*, así como de otros patógenos, usando marcadores moleculares polimórficos puede usarse sólo la técnica de PCR, o ésta con la técnica de RFLP (Bruce *et al.*, 1999; Bruce *et al.*, 2000; Cui *et al.*, 2003<sup>a</sup>; Mascorro *et al.*, 2005), o con la técnica de SNP (Feng *et al.*, 2003). La técnica de RFLP incluye la amplificación del fragmento de interés por la técnica de PCR y la subsecuente digestión con una enzima de restricción (Bruce *et al.*, 1999); debido a la simplicidad y confiabilidad del método ha sido usado extensamente (Nedelcheva *et al.*, 2001). En el estudio del polimorfismo del gen *MSP3α* de *P. vivax*, se ha mostrado la importancia del uso de las enzimas *Hha* I y *Alu* I para producir patrones de restricción (Bruce *et al.*, 1999; Cui *et al.*, 2003<sup>b</sup>).

El estudio de los genotipos intraespecíficos de *P. vivax* y de *P. falciparum* en las diversas áreas geográficas del Perú es de gran importancia. La diversidad parasitaria suele ser común dentro de un área endémica, donde diferentes cepas del parásito podrían estar circulando en el hospedero humano (Mendizabal-Cabrera y Barnwell, 2005). Los resultados que se obtengan permitirán conocer los genotipos existentes en una zona y su distribución geográfica. También permitirán conocer secuencias específicas de especie, para proponer candidatos para vacunas basadas en antígenos altamente polimórficos (Cui *et al.*, 2003<sup>a</sup>), o para desarrollar nuevas técnicas diagnósticas, o diseñar nuevas drogas antimaláricas. Además, según los genotipos existentes, se podrán ampliar los estudios, y determinar su asociación con el cuadro clínico, con la intensidad de la enfermedad, con la parasitemia, con la respuesta inmune, con los casos sintomáticos y asintomáticos, con la respuesta a las drogas antimaláricas. El estudio de la diversidad genética de los parásitos causantes de malaria humana tiene una gran importancia práctica en el desarrollo de estrategias de prevención y de control de esta enfermedad (Feng *et al.*, 2003).

*P. vivax*, por ocasionar la malaria más frecuente en el ámbito mundial, nacional y local; por sus efectos patogénicos debilitantes, que pueden ser severos e incluso fatales (Jayavanth, 2004; CDC, 2005; Price *et al.*, 2007); por ocasionar recaídas (Krotoski, 1989); y por su reciente emergencia de resistencia a cloroquina (Baird, 2004), incluso en el Perú (Ruebush *et al.*, 2003), requiere de más investigaciones que provean los conocimientos necesarios para desarrollar estrategias nuevas y adecuadas para luchar contra este parásito. En el Perú, se tiene un programa nacional para el control de la malaria; aunque no obstante los esfuerzos por prevenir y controlar esta enfermedad, no se cuenta con estrategias que



ayuden efectivamente a disminuir la frecuencia de casos. Entre los estudios que son necesarios desarrollar y que se están iniciando en el país, están los de variabilidad genética de *P. vivax* utilizando genes que codifican por las proteínas de superficie del merozoíto.

En el distrito Bellavista, perteneciente a la provincia Sullana, del departamento Piura, en el Perú, los casos de malaria autóctonos son causados por *P. vivax*, especie dominante y altamente localizada en la costa norte (Aramburu *et al.*, 1999; Chowell *et al.*, 2009; DGE-MINSA, 2008<sup>b</sup>). Según información de la SubRegión de Salud Luciano Castillo (Piura II), desde 1969 se registran casos de malaria por *P. vivax* en Sullana, los cuales incrementaron en los dos últimos años. En el 2008, del acumulado de casos notificados por esta SubRegión, la mayoría fue del distrito Bellavista, y la tasa de incidencia fue de 5,32 casos por cada mil habitantes (DGE-MINSA, 2008<sup>a</sup>). En el 2009, la ocurrencia de casos continuó (DGE-MINSA, 2009<sup>b</sup>). Esta situación reemergente es preocupante, y a ello se aúna la alta probabilidad de recaídas, que son típicas de *P. vivax* (Krotoski, 1989; Price *et al.*, 2007; Mueller *et al.*, 2009).

La frecuencia significativa de casos de malaria en Bellavista, sugiere que esta enfermedad metaxénica está perjudicando a la población, a la cual afecta no sólo su salud sino también su economía, por los gastos en el tratamiento y en el desplazamiento a los centros de salud, así como por generar incapacidad para el trabajo. Lamentablemente, la malaria afecta principalmente a las poblaciones pobres, de zonas rurales; donde al ser afectada la población económicamente activa también es afectada seriamente la economía de las familias y de la comunidad. Por lo que, deben implementarse estudios epidemiológicos

utilizando la biología molecular; como es el estudio de genotipificación de *P. vivax* para determinar las variantes genéticas o los genotipos que están infectando a los pacientes.

La genotipificación de aislamientos de *P. vivax* de pacientes con malaria del distrito Bellavista; proveería conocimientos útiles para la lucha antimalárica en general. Los genotipos de *Plasmodium vivax* de pacientes, así como la densidad parasitaria y las manifestaciones clínicas de la malaria podrían estar relacionados con la virulencia del parásito. Los conocimientos sobre ello contribuirían a una mejor comprensión de la genética de las poblaciones del parásito, y de la enfermedad, y, sustentarían el desarrollo de otros estudios epidemiológicos, de valor pronóstico, preventivo y de control, así como el diseño de vacunas potenciales, de nuevas técnicas de diagnóstico molecular, y de nuevas drogas antimaláricas.

La variabilidad genética de *P. vivax*, ha sido mostrada en estudios en diversas áreas geográficas del mundo (Kain *et al.*, 1992; Bruce *et al.*, 1999; Bruce *et al.*, 2000; Cui *et al.*, 2003<sup>a</sup>; Leclerc *et al.*, 2004; Mascorro *et al.*, 2005; Manamperi *et al.*, 2008), y también se ha mostrado en un estudio en pacientes de la amazonía peruana (Calderón, 2006). La existencia de variantes genéticas o genotipos de *P. vivax* podría estar asociado a las manifestaciones clínicas de la enfermedad, a la densidad parasitaria, a la respuesta a las drogas antimaláricas y quizá a las posibles reinfecciones de algunos pobladores en las diversas localidades endémicas de malaria. La ocurrencia de diversidad genética en las poblaciones de *P. vivax*, y la necesidad de conocer la estructura genética de estas poblaciones, así como la distribución geográfica de las variantes genéticas, motivo a

genotipificar los aislamientos de *P. vivax* de pacientes con malaria del distrito Bellavista, usando el gen *MSP3α*.

Según la información obtenida de algunos pobladores de Bellavista y de personal de salud del lugar; así como, aquella obtenida de los registros de los casos de malaria, esta enfermedad puede afectar a una misma persona hasta con cuatro episodios por año. Esta situación podría deberse a un tratamiento incompleto o inadecuado, a posibles recaídas, quizá a resistencia al medicamento, o infecciones nuevas que bien podrían ser causadas por genotipos particulares de *P. vivax*. Es posible que determinados genotipos sean más patogénicos que otros. Se ha mostrado una alta prevalencia (60%) del alelo *MSP2* en pacientes con malaria severa (Robert *et al.*, 1996).

La genotipificación de *P. vivax* usando el gen *MSP3α* como marcador molecular polimórfico, implica un análisis crítico e integracionista, considerando el agente causal, el huésped humano, el vector y el ambiente en el cual desarrollan. Este estudio, conjuntamente con otros estudios, permitirá obtener resultados a usarse en provecho del bienestar de la humanidad. Karl Popper, defensor del realismo de la ciencia, sostiene que las teorías y conceptos científicos proporcionan conocimiento sobre la realidad porque existe alguna relación de correspondencia entre las teorías científicas y la naturaleza (Popper, 1997), y coincide con Einstein en que el resultado final de la ciencia estará más cercano a la verdad, sin ser la verdad absoluta (Sanguinetti, 1995); por lo que la investigación en busca de la verdad debe ser continua.

Los organismos, como el protozoo patógeno *P. vivax*, no se adaptan a un nicho exterior autónomo, sino “lo construyen” mediante sus propias actividades biológicas y de múltiples interrelaciones. En consecuencia, los organismos vivos y el ecosistema en el cual habitan se encuentran en un estado de fluidez, en donde se modifican continuamente al interactuar entre sí, “acoplándose estructuralmente” de forma mutua y recíproca (Moriello, 2005), para poder sobrevivir. Por lo que, podrían surgir variantes genéticas de una especie para adaptarse mejor en su ambiente, las cuales pueden tener manifestaciones fenotípicas diversas, tales como, genotipos muy patógenos para su huésped. Por ello, es conveniente conocer las variantes genéticas de las especies patógenas, para tener información precisa y útil para implementar estrategias efectivas en la lucha contra ellas y en beneficio de la humanidad; abordando el problema bajo el paradigma de la complejidad, lo cual implica un pensamiento múltiple, diversificado y prudente.

Edgar Morin, propulsor del “nuevo paradigma de la complejidad”, propone integrar contextos diversos que posibiliten la integración de los conocimientos dispersos (Morin, 1998). Los estudios científicos deben abordarse desde un enfoque sistémico, holístico, complejo y transdisciplinario, porque el mundo exterior, el de la vida cotidiana, con “objetos” y “partes”, no es algo que exista objetivamente ahí afuera y que luego el hombre lo representa en su mente, sino que es algo que se “crea” en el proceso del conocimiento (Moriello, 2005). Las múltiples redes de interacción existentes entre *P. vivax*, su huésped humano y su vector, y el ambiente en el que habitan, sugieren la articulación multidisciplinaria y la complejidad que implican los estudios orientados a luchar contra los agentes biológicos que afectan la salud.

Los objetivos del presente estudio fueron:

**Objetivo general:**

- Genotipificar los aislamientos de *Plasmodium vivax* de pacientes con malaria del distrito Bellavista, Sullana, Perú, usando el gen de la proteína-3 $\alpha$  de la superficie del merozoíto (*MSP3 $\alpha$* ).

**Objetivos específicos:**

- Determinar el tamaño de los fragmentos del gen *MSP3 $\alpha$*  amplificados por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa anidada (nested PCR).
- Determinar los patrones de restricción de los fragmentos del gen *MSP3 $\alpha$* , obtenidos por digestión con las enzimas *Hha* I y *Alu* I, utilizando la técnica de polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).
- Determinar la frecuencia de pacientes con malaria por *P. vivax*, según la densidad parasitaria y la condición de anemia.

## **II. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **1. Material**

#### **1.1. Población**

La población estuvo conformada por todos los pacientes con malaria por *P. vivax*, residentes en el distrito Bellavista (Anexo 2), entre julio de 2009 y enero de 2010.

#### **1.2. Muestra**

Se trabajó con 57 pacientes con malaria por *P. vivax* confirmada mediante examen de gota gruesa y frotis (OMS, 1982), residentes en los sectores Bellavista, El Cucho, Cieneguillo Norte, Chalacalá, del distrito Bellavista (Anexo 3); de quienes se obtuvo una muestra de sangre, previo al inicio del tratamiento con las drogas antimaláricas.

#### **1.3. Descripción del lugar de estudio**

El distrito Bellavista pertenece a la provincia Sullana, departamento Piura. Está ubicado en la costa norte del Perú, y al sub-oeste de la ciudad de Sullana, en la margen izquierda del Río Chira, a 80°40'48" longitud oeste y 04°53'57" latitud sur, y a 58 msnm. En verano su temperatura varía entre 35 y 38°C; bajo sombra y en invierno, entre 18 y 20°C. La humedad relativa varía entre 65 y 70%. La población total según el censo de 2007 es de 36 072 habitantes (INEI, 2007; MDB, 2008); las actividades económicas principales en este lugar son la agricultura y el comercio.

## **2. Métodos y técnicas**

### **2.1. Selección de la muestra de estudio**

Los 57 pacientes que conformaron la muestra se seleccionaron entre aquellas personas con síntomas sospechosos de malaria y que reunían los criterios de inclusión preestablecidos; quienes luego de ser informados sobre el estudio, aceptaron voluntariamente participar en éste.

Las edades de los participantes en el estudio estuvieron entre 2 y 62 años; de ellos, 33 fueron varones. Estos pacientes fueron captados en el Centro de Salud Bellavista, y algunos, en sus viviendas, entre julio de 2009 y enero de 2010.

#### **a) Criterios de inclusión**

- Pacientes varones y mujeres, de 2 a 64 años de edad, residentes en el distrito Bellavista, con fiebre igual o mayor a 37,5°C, o con antecedentes de fiebre en las últimas 48 horas y examen de gota gruesa positiva a la presencia de *P. vivax*.

#### **b) Criterios de exclusión**

- Gestantes.
- Pacientes muy enfermos o muy debilitados.
- Pacientes que estaban recibiendo drogas antimaláricas.
- Pacientes con infección mixta por *P. vivax* y *P. falciparum*, u otras especies de *Plasmodium*.

### **c) Criterios éticos**

La autora informó a los pacientes adultos, y a los padres o apoderados de los pacientes menores de 18 años de edad, sobre el estudio, los procedimientos necesarios, los beneficios y riesgos posibles. Una vez informados se les solicitó su consentimiento voluntario (Anexo 4).

### **2.2. Obtención y conservación de las muestras de sangre**

A cada paciente se le realizó una punción del dedo anular con una lanceta estéril, y en dos láminas portaobjetos se colocaron una gota de sangre para preparar una gota gruesa, y otra, para realizar un frotis, y determinar la presencia del parásito y la densidad parasitaria. Además, en un tubo capilar heparinizado se tomó sangre para medir el hematocrito y determinar una posible anemia.

De aquellos que aceptaron participar en el estudio, se obtuvo 3 ml de sangre por punción venosa, en un tubo “BD Vacutainer<sup>®</sup>” conteniendo EDTA. Cada muestra se codificó y se colocó de inmediato en una caja refrigerante; posteriormente, el paquete globular se separó en microtubos y se guardó en refrigeración. De los menores de 5 años de edad, la muestra de sangre se obtuvo por punción del dedo y se colectó en papel de filtro Whatman<sup>®</sup> (Schleicher & Schuell) de grado 1 y 3 cm de diámetro; se dejó secar, y se guardó en bolsa de plástico de primer uso y codificada. Estas muestras, se transportaron al Laboratorio de Enfermedades Infecciosas (LEI), en la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), y se almacenaron a -20°C; después se procesaron mediante las técnicas: reacción en cadena de la polimerasa anidada y polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP).



De cada paciente participante del estudio, también se obtuvo la información clínica y epidemiológica necesaria, que se registró en un formato de encuesta (Anexo 5).

### **2.3. Diagnóstico microscópico de malaria en gota gruesa y frotis, y determinación de la densidad parasitaria y del hematocrito**

Las gotas gruesas y los frotis obtenidos de los pacientes, se colorearon con Giemsa y se observaron con un microscopio óptico común a 1000X, para determinar la presencia de *P. vivax*, y, la densidad parasitaria, según el sistema de cruces y el cálculo del número de parásitos por microlitro de sangre (INS, 2003).

El hematocrito se determinó mediante la técnica del microhematocrito (OMS, 1982); su valor se obtuvo por lectura de la concentración de glóbulos rojos en los tubos capilares y se expresó como un porcentaje de la sangre total. Según el valor del hematocrito se dedujo una probable anemia. Se estableció anemia por tener hematocrito < 34% para individuos de 2 a 5 años de edad, < 35% para los de 6 a 11 años de edad, < 36% para los de 12 a 17 años de edad, < 41% para los varones  $\geq$  18 años de edad, y < 36% para las mujeres  $\geq$  18 años de edad (Jonson, 1993).

### **2.4. Extracción del ADN**

#### **Extracción de ADN del paquete globular sanguíneo**

La extracción del ADN parasitario se realizó a partir de 200  $\mu$ l de paquete globular sanguíneo, utilizando el kit comercial de purificación de ADN “QIAmp DNA Blood” (QIAGEN Sciences, Maryland 20874, USA). Con este fin, los eritrocitos previamente

fueron lisados para liberar el ADN, las proteínas y otros componentes celulares. El ADN extraído y purificado se almacenó a -20°C, hasta su procesamiento posterior.

### **Extracción de ADN de sangre en papel de filtro**

Se recortó el papel filtro con la muestra de sangre y se colocó en un microtubo con 300 µl de buffer TE conteniendo 5% de chelex-100 (Sigma<sup>®</sup>), se “vortexeo” por 30 seg y se hirvió por 10 min. Enseguida, se centrifugó a 12 000 rpm por 3 min, se recuperó el sobrenadante en otro microtubo y se centrifugó, se repitió este paso último y se transfirió el sobrenadante a otro microtubo (Plowe *et al.*, 1995), y se guardó a -20°C, hasta su uso.

### **2.5. Diagnóstico molecular específico de malaria, mediante nested PCR**

El ADN guardado a -20°C, se utilizó para el diagnóstico molecular específico mediante la técnica nested PCR, en la cual se realiza dos PCR consecutivas. En la primera PCR se amplificó un segmento del gen de la subunidad 18S del ARN ribosomal (srRNA) específico del género *Plasmodium*, y del segmento amplificado se realizaron una PCR específica para *P. vivax* y otra específica para *P. falciparum*. Los “primers” utilizados y las condiciones dadas, estuvieron basadas en aquellas descritas por Snounou *et al.*, 1993 y Roshanravan *et al.*, 2003.

Los “primers” para el género *Plasmodium* amplifican un segmento de 1200 pares de bases (pb), y fueron:

Plagen1 = 5' CTTGTTGTTGCCTTAAACTTC 3'

Plagen2 = 5' TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG 3'

Las mezclas para la amplificación por PCR contenían: 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 μM de dNTPs, 0,25 μM de cada “primer”, 0,03 unidades de *Taq* polimerasa (INVITROGEN, life technologies), y 3 μl de ADN. Cada reacción tuvo un volumen final de 15 μl.

Las condiciones de la amplificación fueron: inicialización a 95°C por 3 min; 20 ciclos a 94°C por 30 seg, 58°C por 90 seg, 72°C por 90 seg; y una etapa a 72°C por 7 min.

Los “primers” para la especie *P. vivax* amplifican un segmento de 120 pb, y fueron:

Vivax1 = 5' CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC 3'

Vivax2 = 5' ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA 3'

Los “primers” para la especie *P. falciparum* amplifican un segmento de 205 pb, y fueron:

Falciparum1 = 5' TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT 3'

Falciparum2 = 5' ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC 3'

Las mezclas para la amplificación por PCR, para detectar a *P. vivax* y a *P. falciparum* contenían: 10 mM de Tris HCl, 50 mM de KCl, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 μM de dNTPs, 0,5 μM de cada primer, 0,03 unidades de *Taq* polimerasa (INVITROGEN, life technologies), y 1 μl de ADN de la amplificación anterior. El volumen final fue de 15 μl.

Las condiciones de la amplificación fueron: 95°C por 2 min; 35 ciclos a 94°C por 30 seg, 60°C por 90 seg, 72°C por 90 seg; y la etapa final a 72°C por 7 min.

Cada reacción de amplificación se realizó con un control positivo conformado por cepas referenciales de *P. vivax* y *P. falciparum*, un control negativo, provistos por el LEI-UPCH, y un control de la mezcla. Para todas las amplificaciones, se utilizó un termociclador PT-100 MJReserch.

Las electroforesis de los productos de amplificación se realizaron en geles de agarosa ultrapura al 2% y se utilizó un marcador de peso molecular de 100 bp DNA ladder (INVITROGEN, life technologies).

## **2.6. Genotipificación de los aislamientos de *P. vivax* usando el gen *MSP3α***

### **Amplificación del gen *MSP3α* de *P. vivax* por nested PCR**

El gen *MSP3α* se amplificó mediante nested PCR con los “primers” y las condiciones establecidas por Bruce *et al.*, 1999 y Cui *et al.*, 2003<sup>b</sup>.

Los “primers” utilizados para la primera PCR fueron:

P1 = 5' CAG CAG ACA CCA TTT AAG G 3'

P2 = 5' CCG TTT GTT GAT TAG TTG C 3'

Las mezclas para la PCR contenían: 10 mM de Tris HCl, 50 mM de KCl, 150 μM de dNTPs, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,25 μM de cada primer, 0,013 unidades de *Taq* Polimerasa (INVITROGEN, life Technologies), y 3 μl de ADN total, en un volumen de 15 μl.

Las condiciones de amplificación fueron: 94°C por 3 min; 35 ciclos de amplificación, cada uno a 94°C por 30 seg, 50°C por 30 seg, 68°C por 2,5 min; y una extensión final a

68°C por 4 min. Se utilizó un termociclador PT-100 MJReserch.

Los “primers” utilizados para la segunda PCR fueron:

N1 = 5' GAC CAG TGT GAT ACC ATT AAC C 3'

N2 = 5' ATA CTG GTT CTT CGT CTT CAG G 3'

Las mezclas para esta segunda PCR contenían lo mismo que aquellas usadas en el PCR anterior, y se utilizó 1 µl del ADN amplificado.

Las condiciones de amplificación fueron: 94°C por 3 min; 30 ciclos de amplificación, cada uno a 94°C por 30 seg, 50°C por 30 seg, 68°C por 2,5 min; y la extensión final a 68°C por 4 min. Se utilizó un termociclador PT-100 MJReserch.

Las electroforesis de los productos amplificados del *MSP3α* se realizaron en geles de agarosa ultrapura al 1%, y se utilizó un marcador de 100 pb DNA ladder (ambos de INVITROGEN life technologies).

### **Análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de los productos amplificados del gen *MSP3α***

Se utilizó 8 µl del producto amplificado de cada muestra (PCR anterior), para ser digerido por separado, con 2 unidades/µl de las enzimas de restricción *Hha* I y *Alu* I (INVITROGEN, life technologies), e incubado a 37°C durante una noche. Según cada muestra, los productos de esta digestión se sometieron a electroforesis en gel de agarosa ultrapura de alta resolución al 2%, y se utilizó el marcador de 100 pb DNA ladder (ambos

de INVITROGEN, life technologies).

### **Determinación de genotipos del gen *MSP3α***

Los genotipos del gen *MSP3α* de *P. vivax*, se determinaron por el tamaño de sus fragmentos amplificados por nested PCR, y por los patrones de restricción generados por las enzimas *Hha* I y *Alu* I. El tamaño de los fragmentos de restricción se midió en base al marcador de 100 pb DNA ladder y utilizando el software DNA Pro Scan's v 2.39 (1997).

Los procedimientos moleculares antes descritos se desarrollaron en tres ambientes especiales, distantes uno del otro; el primero se utiliza para la recepción y procesamiento de muestras (extracción de ADN), el segundo para la preparación de reactivos y la PCR (ciclamiento), y el tercero para las electroforesis. Se trabajó en esta secuencia, primero se extrajo el ADN, luego se realizó las PCR y al final las electroforesis en geles de agarosa. En cada ambiente se utilizaron materiales sólo del área.

Inicialmente, 10 muestras de estudio fueron procesadas por dos veces para evaluar la reproducibilidad de los resultados. Además, la amplificación por PCR fue repetida una segunda vez, a aquellas muestras que fueron negativas en el primer procesamiento, para confirmar su negatividad.

### **2.7. Visualización de los productos amplificados por PCR**

Cada uno de los productos amplificados por PCR, se mezclaron con rojo de cresol (1 ng/μl) en la proporción 1:1, antes de colocarlos en los geles de agarosa conteniendo 0,05

mg de bromuro de etidio (Sigma Chemical Co). Luego de las electroforesis, los fragmentos corridos se visualizaron utilizando iluminación UV, y se fotografiaron.

## **2.8. Características de los “primers”**

Los “primers” utilizados en este trabajo, han sido utilizados en estudios previos. Sin embargo, con la finalidad de dar mayor confiabilidad a los resultados obtenidos y analizados, éstos se evaluaron con los programas: BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), CLUSTAL X (Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1994), PRIMER PREMIER (<http://www.premierbiosoft.com/primerdesign/index.html>).

## **2.9. Análisis estadístico de los resultados**

Los datos obtenidos del estudio, se ingresaron en una base de datos y se analizaron usando el programa estadístico SPSS versión 15.0. Se calcularon las frecuencias correspondientes y se utilizó la prueba chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) para determinar la relación entre variables. Se consideró un nivel de significancia  $p < 0,05$  (Steel y Torrie, 1985).

### III. RESULTADOS

Los resultados obtenidos, mostraron que de las 57 muestras de los pacientes con malaria por *P. vivax* diagnosticada por examen de gota gruesa y frotis, 96,5% (55/57) presentaron sólo *P. vivax*, por la prueba nested PCR; no encontrando paciente alguno con *P. falciparum* (Fig. 1). De estas 55 muestras, en el 96,4% (53/55) amplificó el fragmento del gen *MSP3α*.

Los pacientes incluidos en el estudio de genotipificación de *P. vivax* usando el marcador polimórfico *MSP3α* fueron 53; de ellos, 31 varones, de edades comprendidas entre 4 y 62 años, y residentes en el distrito Bellavista, Sullana (Anexo 6); luego de confirmar por PCR que eran positivos sólo a *P. vivax* y que amplificaron a *MSP3α*.

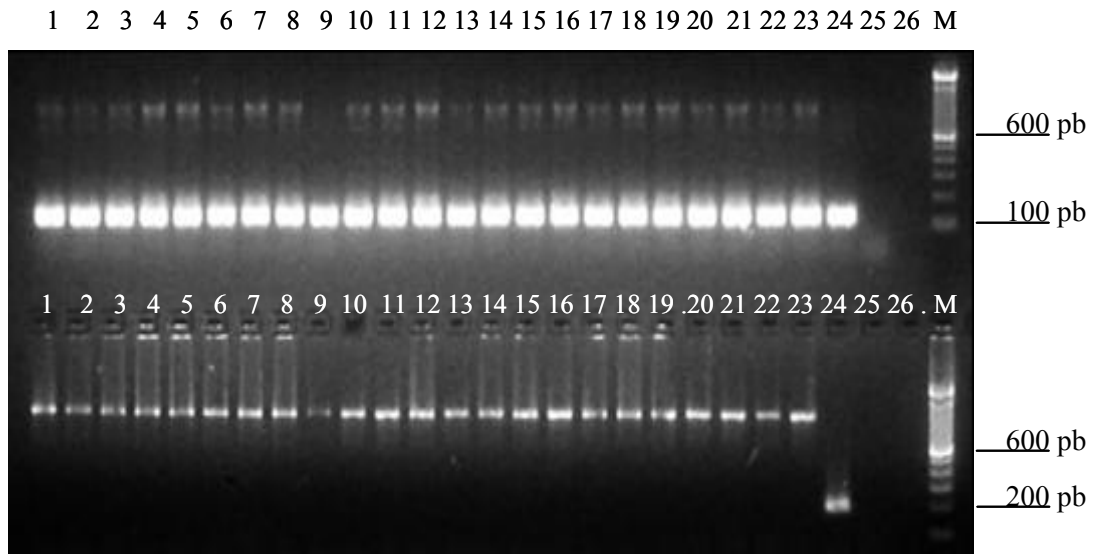
Se encontró que los fragmentos amplificados del gen *MSP3α* de *P. vivax*, en el 100% (53/53) de las muestras, mostraron tamaños de 1500 pb (Fig. 2). Las digestiones con *Hha* I y *Alu* I produjeron cada una un solo patrón de restricción, y los tamaños de las bandas producidas fueron similares en todas las muestras. Con la enzima *Hha* I se produjeron dos bandas cuyos tamaños promedio fueron de 1070 y 220 pb, y con la enzima *Alu* I, se produjeron seis bandas de tamaños entre 130 y 530 pb (Fig. 3). Las sumas de los tamaños de las bandas generadas de la digestión con estas enzimas fueron aproximadamente del tamaño de los fragmentos amplificados sin cortar.



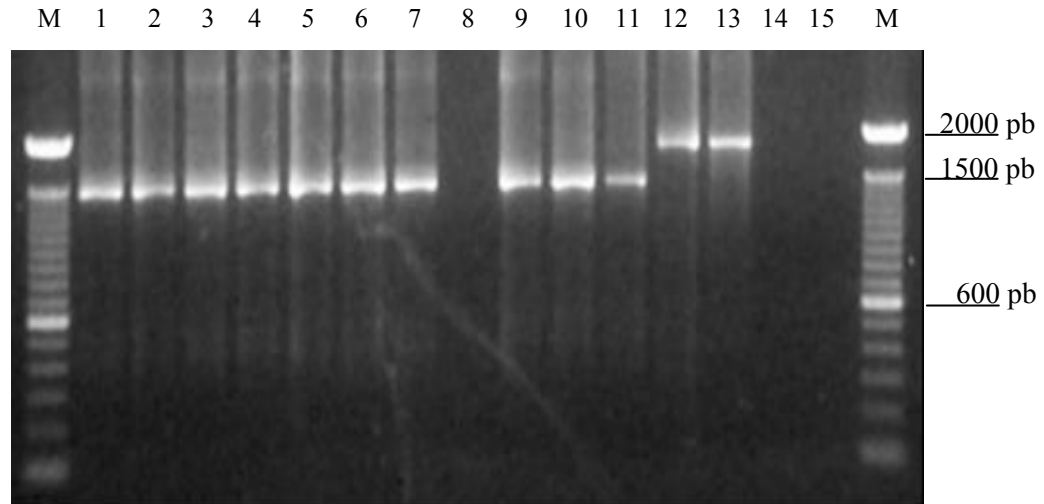
La determinación de la densidad parasitaria por *P. vivax* en las muestras estudiadas, mostró que el 49,1% (26/53) de los pacientes presentaron una alta densidad de parásitos, de 1 485 a 20 255 parásitos por  $\mu\text{l}$  de sangre, correspondientes a dos y tres cruces según el sistema de cruces o método semicuantitativo (INS, 2003). El 39,6% (21/53) de los pacientes tuvieron de 1 485 a 4 242 parásitos por  $\mu\text{l}$  de sangre (dos cruces) y el 9,4% (5/53), de 7 171 a 20 255 (tres cruces) (Tabla 1).

La determinación de anemia según los valores de hematocrito, mostró que el 49,1% (26/53) de los pacientes con malaria presentaban esta patología (Tabla 2); y ésta se encontró en el 53,8% (14/26) de los pacientes con alta densidad parasitaria. El análisis estadístico mediante la prueba chi-cuadrado, mostró que no existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre las frecuencias de pacientes varones y mujeres con anemia.

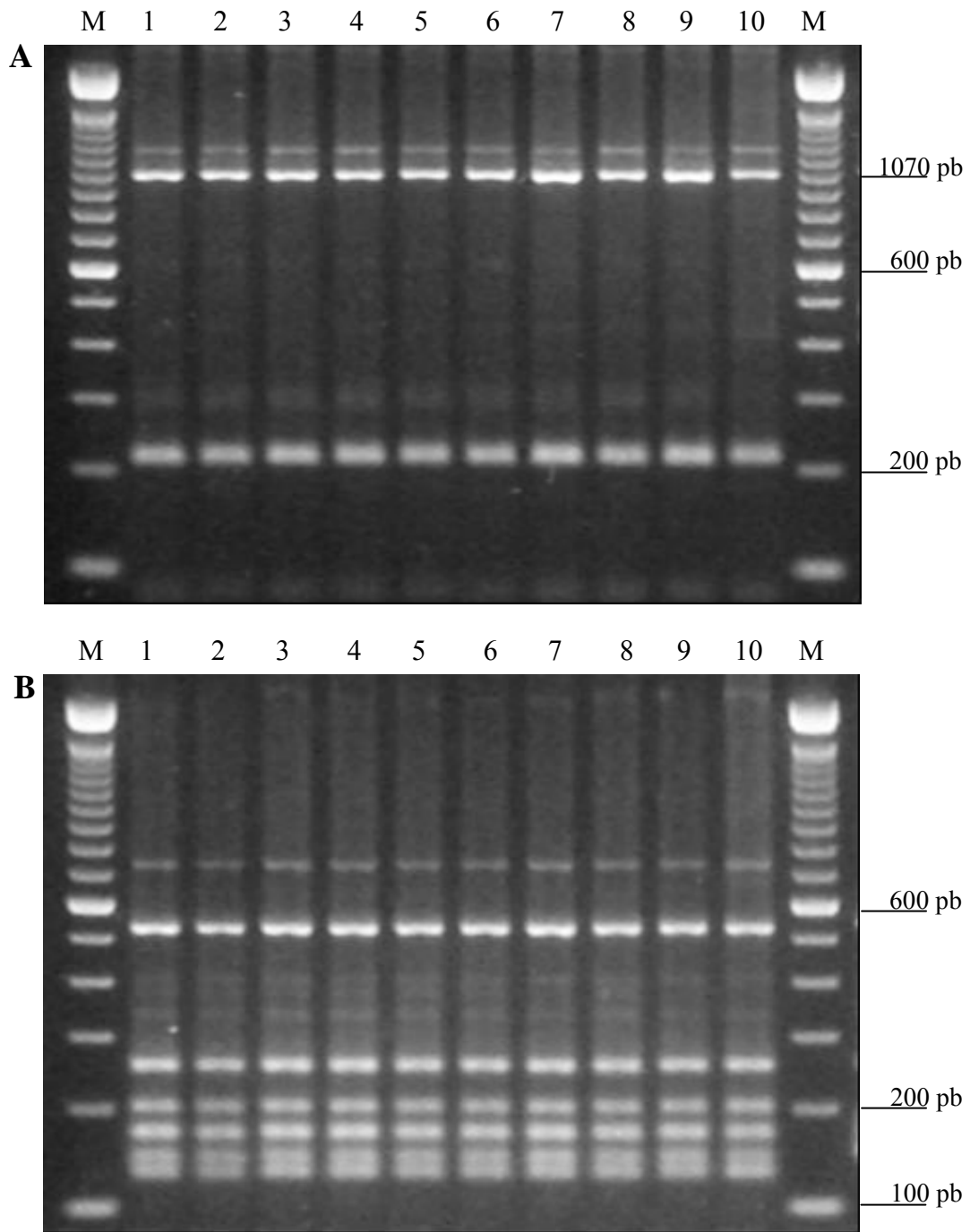
Según la información obtenida de los 53 pacientes participantes, el 77,4% (41/53) presentaron las manifestaciones clínicas, fiebre, escalofrío, sudoración, cefalea, mialgia, artralgia. Estas manifestaciones se presentaron exclusivamente en el 32,1% (17/53) del total de pacientes, y en el 45,3% (24/53), con otros síntomas adicionales como fueron principalmente la náusea y el vómito (Tabla 3). Además, el 32,1% de ellos expresaron haber tenido entre 1 a 3 episodios de malaria, anteriores al episodio actual.



**Fig. 1.** Tamaño de bandas amplificadas por nested PCR para el diagnóstico de *Plasmodium* spp. M: Marcador 100 pb DNA ladder; líneas 1-23, pacientes positivos a *P. vivax* (120 pb) y negativos a *P. falciparum* (205 pb); línea 24, control positivo (*P. vivax/P.falciparum*); línea 25 control negativo de extracción de ADN; línea 26, control negativo de la mezcla para PCR.



**Fig. 2.** Tamaño de bandas del gen *MSP3α* de *Plasmodium vivax* amplificados por nested PCR. M: Marcador 100 pb DNA ladder; líneas 1-7 y 9-11, patrón B (1500 pb); línea 8, negativo; líneas 12 y 13, patrón A (1950 pb), controles otorgados por el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas - UPCH; líneas 14 y 15, controles negativos.



**Fig. 3.** Patrones de restricción generados por digestión del fragmento del gen *MSP3α* de *Plasmodium vivax* con las enzimas *Hha* I y *Alu* I. **A:** Bandas obtenidas con *Hha* I; M: Marcador 100 pb DNA ladder, líneas 1-10, pacientes con un solo patrón. **B:** Bandas obtenidas con *Alu* I; M: Marcador 100 pb DNA ladder, líneas 1-10, pacientes con un solo patrón.

**Tabla 1.** Frecuencia de pacientes con malaria por *Plasmodium vivax* según densidad parasitaria, del distrito Bellavista, Sullana, julio 2009 - enero 2010.

N° parásitos/ $\mu$ l sangre	Densidad parasitaria		Pacientes con malaria por <i>P. vivax</i>	
	Sistema de cruces (semicuantitativo)		N°	%
201 - 632	1-39	Parásitos en 100 campos microscópicos	12	22,6
728 - 968	+/2	De 40 a 60 parásitos en 100 campos)	8	15,1
1 064 - 1 298	+	Un parásito/campo en 100 campos	7	13,2
1 485 - 4 242	++	De 2 a 20 parásitos/campo en 100 campos	21	39,6
7 171 - 20 255	+++	De 21 a 200 parásitos/campo en 100 campos	5	9,4
<b>Total</b>			<b>53</b>	<b>100,0</b>

**Tabla 2.** Frecuencia de pacientes con malaria por *Plasmodium vivax* según condición de anemia, del distrito Bellavista, Sullana, julio 2009 - enero 2010.

Sexo	Anemia		Total
	Si	No	
<b>Masculino</b>	15	16	31
<b>Femenino</b>	11	11	22
<b>Total</b>	<b>26</b> <b>(49,1%)</b>	<b>27</b> <b>(50,9%)</b>	<b>53</b> <b>(100,0%)</b>

$p = 0,908 > 0,05$

**Tabla 3.** Frecuencia de pacientes con malaria por *Plasmodium vivax* según manifestaciones clínicas, del distrito Bellavista, Sullana, julio 2009 - enero 2010.

<b>Manifestaciones clínicas</b>	<b>N°</b>	<b>%</b>
Fiebre, escalofrío, sudoración, cefalea, mialgia, artralgia, náusea, vómito, diarrea, ictericia	1	1,9
Fiebre, escalofrío, sudoración, cefalea, mialgia, artralgia, náusea, vómito, ictericia	1	1,9
Fiebre, escalofrío, sudoración, cefalea, mialgia, artralgia, náusea, vómito, diarrea	1	1,9
Fiebre, escalofrío, sudoración, cefalea, mialgia, artralgia, náusea, vómito	10	18,9
Fiebre, escalofrío, sudoración, cefalea, mialgia, artralgia, náusea, diarrea	1	1,9
Fiebre, escalofrío, sudoración, cefalea, mialgia, artralgia, náusea	6	11,3
Fiebre, escalofrío, sudoración, cefalea, mialgia, artralgia, diarrea	1	1,9
Fiebre, escalofrío, sudoración, cefalea, mialgia, artralgia, ictericia	1	1,9
Fiebre, escalofrío, sudoración, cefalea, mialgia, artralgia, vómito	2	3,8
Fiebre, escalofrío, sudoración, cefalea, mialgia, artralgia	17	32,1
Fiebre, escalofrío, sudoración, mialgia, artralgia, náusea, vómito	1	1,9
Fiebre, escalofrío, sudoración, cefalea, mialgia, náusea	1	1,9
Fiebre, escalofrío, sudoración, mialgia, artralgia, ictericia	1	1,9
Fiebre, escalofrío, sudoración, artralgia, náusea, vómito	1	1,9
Fiebre, escalofrío, sudoración, cefalea, náusea, vómito	1	1,9
Fiebre, escalofrío, sudoración, cefalea, mialgia	2	3,8
Fiebre, escalofrío, sudoración, cefalea, artralgia	1	1,9
Fiebre escalofrío, sudoración, cefalea	1	1,9
Fiebre, escalofrío, cefalea, mialgia, artralgia, náusea	1	1,9
Fiebre, escalofrío, cefalea, artralgia	1	1,9
Fiebre, escalofrío, cefalea	1	1,9
<b>Total</b>	<b>53</b>	<b>100,0</b>

## IV. DISCUSIÓN

La menor cantidad (53) de muestras utilizadas para la genotipificación de *P. vivax* de pacientes con este parásito, usando el marcador polimórfico *MSP3 $\alpha$* , en relación a las 57 muestras de aquellos incluidos en el estudio por tener malaria por *P. vivax* confirmada por examen de gota gruesa y haber brindado su consentimiento informado, fue debido a la exclusión de dos muestras que resultaron negativas a *P. vivax* por nested PCR, y a otras dos, de las cuales no amplificó el fragmento del gen *MSP3 $\alpha$* . Para el estudio eran necesarios aislamientos de *P. vivax* de pacientes, y que del ADN de este parásito se amplifique la secuencia de interés para realizar la genotipificación.

El 96,5% (55/57) de los pacientes con malaria por *P. vivax*, confirmada por examen microscópico de gota gruesa y verificados por nested PCR, también ha sido obtenido en estudios similares (Calderón *et al.*, 2006); no obstante su alta sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de especies de *Plasmodium* (Snounou, 1993; Singh *et al.*, 1996). Esto podría haber ocurrido por deterioro de los parásitos, más aún si la densidad parasitaria es baja, y aunque poco probable, por alguna alteración de las condiciones óptimas en su conservación. Las dos muestras negativas a *P. vivax* por PCR tenían una densidad parasitaria baja; una, era de una paciente con un parásito por campo en cien campos microscópicos, y la otra, de un varón con 30 parásitos en cien campos, a ello se suma que los pacientes suelen automedicarse con antipiréticos en cuanto inician con los síntomas como fue el caso del segundo paciente. Además las muestras se colectaron en

Bellavista, ubicado en la costa norte del Perú, de donde se transportaron a Trujillo, y posteriormente a Lima, para el estudio de genotipificación.

La ausencia de amplificación del gen *MSP3α* de *P. vivax* por PCR, en el 96,4% (53/55) de las muestras con *P. vivax* confirmadas por microscopía y PCR en sus dos repeticiones, no es raro; esto también ha sido hallado en otros estudios (Bruce *et al.*, 1999; Bruce *et al.*, 2000; Cui *et al.*, 2003<sup>b</sup>). La amplificación del fragmento de *MSP3α* no siempre es exitosa en el 100% de las muestras. La ausencia de esta amplificación podría deberse a una concentración alta de ADN, que podría inhibir la actividad enzimática de la polimerasa; las muestras de las que no ocurrió la amplificación *MSP3α* de *P. vivax* correspondieron a dos pacientes con densidad parasitaria alta. Se ha descrito que concentraciones de ADN mayores de 30 ng no amplificaron el fragmento de este gen (Calderón, 2006). La ausencia de esta amplificación también podría deberse a la presencia de sustancias inhibitoras en el ADN total extraído; uno de los pacientes, de cuya muestra no amplificó el segmento de *MSP3α* estaba utilizando Paracetamol. Se añade, que los “primers” utilizados para amplificar *MSP3α*, se evaluaron con programas de bioinformática, resultando específicos para *P. vivax*, y no reaccionaron con otra especie de *Plasmodium*.

Se ha demostrado que el gen *MSP3α* es un marcador genético confiable para estudios de poblaciones de *P. vivax* (Zakeri *et al.*, 2006, Veron *et al.*, 2009) siendo un elemento valioso para el estudio de la epidemiología molecular de poblaciones de *P. vivax*. Así también, la combinación de las técnicas PCR-RFLP en estudios de genotipificación con



el gen *MSP3 $\alpha$*  es una técnica adecuada, aplicable y fácil de usar para estudio de epidemiología molecular de aislamientos de *P. vivax*, generalmente sin la necesidad de ulterior análisis de secuenciamiento (Bruce *et al.*, 1999; Zakeri *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006). La necesidad de usar el RFLP combinada con la PCR en estudios de genotipificación usando el marcador *MSP3 $\alpha$* ; es muy importante, ya que la variación alélica no puede ser resuelta sólo con el tamaño de los productos amplificados sin cortar; el empleo de más de una enzima de restricción es también necesario. Por ello, en este estudio se usaron *Hha* I que produce patrones de restricción muy evidentes (Cui *et al.*, 2003<sup>b</sup>) y *Alu* I. Con el uso de estas dos enzimas, se ha demostrado una alta diversidad genética de *P. vivax* en diversas áreas geográficas. Ambas enzimas han mostrado una mayor sensibilidad para producir patrones de RFLP (Bruce *et al.*, 2000).

En este estudio, el único genotipo de *P. vivax*, encontrado utilizando como marcador polimórfico el gen de la proteína-3 $\alpha$  de la superficie del merozoíto (*MSP3 $\alpha$* ) de este parásito, mostró que en el distrito de Bellavista estaría circulando un sólo un alelo de este gen. Este genotipo único fue mostrado por el tamaño igual de todos los fragmentos de *MSP3 $\alpha$*  amplificados de las 53 muestras incluidas en la genotipificación, el cual fue de 1500 pb, así como por el tamaño de los fragmentos de restricción generados de la digestión de los fragmentos de *MSP3 $\alpha$*  con las enzimas *Hha* I y *Alu* I, cada una de las cuales produjeron un sólo patrón.

El tamaño de los fragmentos amplificados del gen *MSP3α* obtenido en este estudio, de 1500 pb (Fig. 3), también ha sido obtenido por otros investigadores (Bruce *et al.*, 1999; Cui *et al.*, 2003<sup>b</sup>; Zakeri *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006), quienes han descrito la amplificación de fragmentos de tres tamaños; de unos 1950 pb, 1500 pb y 1200 pb, a los cuales han denominado respectivamente patrón A, patrón B y patrón C (Anexo 6). Los fragmentos amplificados del gen *MSP3α* en este estudio, por el tamaño del fragmento amplificado corresponderían al patrón B, el cual fue previamente hallado en aislamientos de *P. vivax* de pacientes de la amazonía peruana en un 20% de las muestras (Calderón, 2006).

El único patrón generado por digestión del fragmento *MSP3α* con la enzima *Hha* I, con dos bandas, de unos 1070 pb y 220 pb, concuerda con uno de los patrones obtenidos en el 15,8% de las muestras analizadas por Calderón (2006), quien lo denominó patrón 1. Por lo que, este mismo patrón hallado en la amazonía peruana, está circulando en el distrito Bellavista, y probablemente en la costa norte. En un estudio de genotipificación con muestras de pacientes con malaria por *P. vivax* de Guyana Francesa, ubicada en la zona ecuatorial de Sud América, la digestión con *Hha* I mostró el patrón B en el 9,6% de 94 muestras mono-infectadas (Veron *et al.*, 2009). El único patrón generado por digestión del fragmento *MSP3α* con *Alu* I, con seis bandas de tamaños entre 130 y 530 pb (Fig. 3) aún no ha sido descrito en estudio alguno en el Perú, ni en Sud América.

El hallazgo de un genotipo único según el gen *MSP3α* de *P. vivax* circulando entre los pobladores de Bellavista, captados entre julio de 2009 y enero de 2010, comparado con el alto polimorfismo encontrado por otros investigadores (Bruce *et al.*, 1999; Bruce *et al.*, 1999; Cui *et al.*, 2003<sup>b</sup>; Zakeri *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006), sugiere que en esta población sería homogénea, al presentarse monomorfismo de este gen; no obstante existir presión para el cambio genético, como son la migración constante de los pobladores incluso a países vecinos, la automedicación por parte de los pacientes, la ocurrencia de casos en la zona desde hace más de 50 años. Este monomorfismo podría estar asociado con los vectores, los cuales principalmente corresponden a las especies *An. albimanus* y *An. pseudopunctipennis* (DGE-MINSA, 2008<sup>b</sup>), o a características particulares de los pobladores en esta zona. Es posible que usando otros marcadores moleculares, y secuenciamiento de genes existan variantes genéticas u otros genotipos de *P. vivax* en la zona.

En otros estudios también se ha encontrado baja diversidad genética de *P. vivax* usando el marcador epidemiológico molecular *MSP3α*. (Leclerc *et al.*, 2004). Asimismo, Calderón (2006) también en sus muestras de Jaén (Perú) encontró solo dos alelos usando el mismo marcador y predominó el genotipo o patrón 1. Las infecciones simples, es decir, la presencia de un solo alelo en cada uno de los genes es posible, como también se ha demostrado en poblaciones de parásitos analizadas, las que fueron muy homogéneas en su composición genética (Guerra *et al.*, 2006). Esto tendría ventajas para un manejo más eficaz de la prevención y el control de los casos de malaria.

La alta densidad parasitaria por *P. vivax* en casi la mitad de las muestras usadas en esta genotipificación (49,1%) y la alta frecuencia de estos paciente con anemia (49,1%), estarían asociadas al genotipo de *P. vivax* encontrado entre los pacientes maláricos de Bellavista. Se han encontrado valores altos de parásitos por  $\mu\text{l}$  de sangre, los cuales en la mitad de los pacientes fueron de 1 485 a 20 225. Aunque se ha descrito que la densidad parasitaria por *P. vivax* es alta si es mayor de 2 400 parásitos por  $\mu\text{l}$  de sangre (Alger, 2001), en este estudio se propone que una densidad parasitaria sería alta cuando se tienen cantidades mayores a 1 400 parásitos por  $\mu\text{l}$ , pues con estos valores los pacientes se observan muy afectados físicamente. Además, se asocia con una alta frecuencia de signos y síntomas muy debilitantes como lo expresaron los pacientes; los cuales en el 77,4% presentaron fiebre, escalofrío, sudoración, cefalea, mialgia, artralgia; sea en forma exclusiva o asociada con otras manifestaciones clínicas.

## V. CONCLUSIONES

- En el distrito Bellavista se tiene un solo genotipo de *Plasmodium vivax* que está circulando entre los pacientes con malaria por esta especie, según el gen de la proteína-3 $\alpha$  de la superficie del merozoíto (*MSP3 $\alpha$* ), y está asociado con una alta densidad parasitaria y anemia.
- Los fragmentos del gen *MSP3 $\alpha$*  de *P. vivax*, amplificados por nested PCR fueron de 1500 pb en el 100% de los aislamientos de los pacientes con malaria por esta especie.
- Las digestiones con las enzimas *Alu* I y *Hha* I, de los fragmentos del gen *MSP3 $\alpha$*  de *P. vivax* amplificados por nested PCR, generaron cada una sólo un patrón de restricción.

## VI. PROPUESTA

El conocimiento de la estructura genética de las poblaciones de parásitos de la especie *Plasmodium vivax*, causante de malaria humana, es muy importante para pronosticar, prevenir y controlar con más eficacia y precisión esta enfermedad. Los genotipos o variantes genéticas que circulan dentro de una zona endémica tendrían que ser caracterizados en su comportamiento fenotípico, para conocer su relación con la severidad de los casos, su respuesta a los tratamientos con drogas antimaláricas, así como su potencialidad inmunogénica, que orienten el control efectivo de la malaria.

Los resultados del estudio de genotipificación han permitido determinar que existe un sólo genotipo de *P. vivax* usando el marcador epidemiológico *MSP3α*, que está circulando entre los pacientes con malaria del distrito Bellavista, el cual estaría ocasionando los cuadros clínicos característicos del mismo, así como su asociación con alta densidad parasitaria y anemia, que tendrían que ser manejados integralmente. La información obtenida, será útil para implementar estudios posteriores que contribuyan a disminuir el impacto de la malaria por *P. vivax* en esta zona y áreas vecinas.

El inicio de una línea de investigación sobre la genotipificación de *P. vivax* obtenido de pacientes maláricos del norte peruano, así como del vector, conducida desde la Universidad Nacional de Trujillo, e integrada a investigaciones similares en el ámbito nacional y global, es muy necesaria. Los resultados serán útiles para avanzar

eficazmente en la lucha contra la malaria, la enfermedad de mayor incidencia en los países más pobres del planeta. Las investigaciones sostenidas, multidisciplinarias, e integracionistas, son las que de forma efectiva benefician a la humanidad, y sobretodo, aquellas basadas en una práctica científica ética y confiable.

Los resultados de la genotipificación de *P. vivax*, de pacientes del distrito Bellavista, motivan a proponer la continuación de estos estudios de epidemiología molecular de la malaria, la cual ligada a la epidemiología tradicional, sería de gran relevancia para orientar la lucha efectiva contra la malaria, y así contribuir a mejorar la salud de la población y lograr uno de los objetivos de desarrollo del milenio; el de combatir la malaria.

Se propone:

- Ampliar estos estudios a zonas vecinas para determinar los genotipos, según el gen *MSP3α* de *P.vivax*, e investigar cómo se están expresando en la salud de las poblaciones en riesgo de infección, valorando su potencialidad como candidatos para diseñar vacunas. Además, se tendría que utilizar otros marcadores moleculares.
- Monitorear los genotipos de *MSP3α* de *P. vivax* aislados de pacientes residentes en el la misma zona de estudio, para conocer en que momento podrían aparecer otros genotipos, y qué efectos patogénicos podrían tener, asimismo, si están asociados con la frecuencia de recurrencias de la malaria, o posible resistencia a las drogas antimaláricas.
- Coordinar con las autoridades locales y de salud correspondientes, para trabajar coordinadamente y contar con el apoyo necesario para desarrollar estos estudios sobre malaria, que brindarán beneficios a la salud de la población.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alger J. Densidad Parasitaria en Malaria: Métodos de determinación y su interpretación. Rev Med Hond 2001; 69: 118-120.
- Aramburu J, Ramal C, Witzig R. Malaria reemergence in the Peruvian Amazon region. Emerg Infect Dis 1999; 5: 209-215.
- Ariey F, Hommel D, Le Scanf C, Duchemin JB, Peneau C, Hulin A, *et al.* Association of Severe Malaria with a Specific *Plasmodium falciparum* Genotype in French Guyana. J Infect Dis 2001; 184: 237-241.
- Ayala E, Lescano AG, Gilman RH, Calderón M, Pinedo VV, Terry H, *et al.* Polymerase chain reaction and molecular genotyping to monitor parasitological response to anti-malarial chemotherapy in the Peruvian Amazon. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2006; 74(4): 546-553.
- Baird JK. Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*. Antimicrob. Agents Chemother. 2004; 48(11): 4075-4083.
- Beingolea L, Chapilliquén F, Cabrera R, Mariños C. Malaria. En: MINSA. Protocolos de vigilancia epidemiológica. Parte I. Lima; 2005. p. 3-13.
- Bruce MC, Galinski MR, Barnwell JW, Snounou G, Day KP. Polymorphism at the merozoite surface protein-3 $\alpha$  locus of *Plasmodium vivax*: Global and local diversity. Am J Trop Med Hyg 1999; 68(2): 518-523.
- Bruce MC, Galinski MR, Barnwell JW, Donnelly CA, Walmsley M, Alpers MP, *et al.* Genetic diversity and dynamics of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*



- populations in multiply infected children with asymptomatic malaria infections in Papua New Guinea. *Parasitology* 2000; 121: 257-272.
- Calderón MM. Genotipia de *Plasmodium Vivax* y su importancia en el manejo y control de la malaria de la amazonía peruana (tesis doctoral). Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2006.
- Calderón JC, Ayala E, Cabrera L, Ferry H, Gilman R, Achón G. Comparación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y microscopía en la detección de malaria después del tratamiento para infecciones con *P. vivax* y *P. falciparum*. *Mosaico Cient.* 2006; 3(1): 43-38.
- Cantella R. Consideraciones Generales de Malaria en el Perú. *Diagnóstico* 1982; 10(4): 169.
- Carlton J. The *Plasmodium vivax* genome sequencing project. *Trends Parasitol* 2003; 19(5): 227-231.
- Carter KH. Situación de la malaria en la Región de las Américas (en línea). Consultado: 29 de diciembre de 2009. Disponible en: [http://www.mex.ops-oms.org/documentos/malaria/reunion/dia\\_1/1150 Situacion de la malaria en la region de las americas.pdf](http://www.mex.ops-oms.org/documentos/malaria/reunion/dia_1/1150_Situacion_de_la_malaria_en_la_region_de_las_americas.pdf)
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). The Impact of Malaria, a Leading Cause of Death Worldwide (en línea). Consultado: 20 de marzo 2005. Disponible en: <http://www.cdc.gov/malaria/impact/index.htm>
- Chowell G, Munayco CV, Escalante AA, McKenzie FE. The spatial and temporal patterns of falciparum and vivax malaria in Perú: 1994–2006. *Malaria Journal* 2009, 8: 142. Disponible en: <http://www.malariajournal.com/content/8/1/142>

- Collins WE, Jeffery GM. Primaquine resistance in *Plasmodium vivax*. Am J Trop Med Hyg 1996; 55: 243-249.
- Cui L, Escalante AA, Imwong M, Snounou G. The genetic diversity of *Plasmodium vivax* populations. Trends Parasitol 2003<sup>a</sup>; 19(5): 220-226.
- Cui L, Mascorro CN, Fan Q, Rzomp KA, Khuntirat B, Zhou G, *et al.* Genetic diversity and multiple infections of *Plasmodium vivax* malaria in Western Thailand. Am J Trop Med Hyg 2003<sup>b</sup>; 68(5): 613-619.
- De Striker K, Vuust J, Jepsen S, Oeuvray C, Theisen M. Conservation and heterogeneity of the glutamate-rich protein (GLURP) among field isolates and laboratory lines of *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol 2000; 111: 123-130.
- Dirección General de Epidemiología (DGE), Ministerio de Salud (MINSA). Malaria. Bol. Epidemiol. (Lima) 2008<sup>a</sup>; 17(27): 406-407.
- Dirección General de Epidemiología (DGE), Ministerio de Salud (MINSA). Malaria. Bol. Epidemiol. (Lima) 2008<sup>b</sup>; 17(53): 996-998.
- Dirección General de Epidemiología (DGE), Ministerio de Salud (MINSA). Situación de la malaria en el Perú - 2009 (en línea). Consultado: 20 de diciembre de 2009<sup>a</sup>. Disponible en: [http://www.orasconhu.org/documentos/2 Iquitos junio - Situacion de la malaria 2009.pdf](http://www.orasconhu.org/documentos/2%20Iquitos%20junio%20-%20Situacion%20de%20la%20malaria%202009.pdf)
- Dirección General de Epidemiología (DGE), Ministerio de Salud (MINSA). Malaria. Bol. Epidemiol. (Lima) 2009<sup>b</sup>; 18(07): 118.
- Dirección General de Epidemiología (DGE), Ministerio de Salud (MINSA). Situación de la malaria en el Perú. Bol. Epidemiol. (Lima) 2009<sup>c</sup>; 18(52): 987-989.

- Feagin JE, Lanzer M. The three genomes of *Plasmodium*. In: Smith FD, Parsons M, editors. Molecular Biology of Parasitic Protozoa. Oxford, England: IRL Press at Oxford University Press; 1996. p: 35-54.
- Felger I, Irion A, Steiger S, Beck HP. Genotypes of merozoites surface protein 2 of *Plasmodium falciparum* in Tanzania. Trans R Soc Trop Med Hyg 1999; 93(Suppl 1): 3-9.
- Feng X, Carlton JM, Joy DA, Mu J, Furuya T, Suht BB, *et al.* Single-nucleotide polymorphisms and genome diversity in *Plasmodium vivax*. PNAS 2003; 100(14): 8502-8507.
- Ferreira MU, Kanebo O, Kimura M, Liu Q, Kawamoto F, Tanabe K. Allelic Diversity at the Merozoite Surface Protein-1 (MSP-1) Locus in Natural *Plasmodium falciparum* Populations: A Brief Overview. Mem Inst Oswaldo Cruz 1998; 93(5): 631-638.
- Figtree M, Pasay CJ, Slade R, Cheng Q, Cloonan N, Walker J, *et al.* *Plasmodium vivax* synonymous substitution frequencies, evolution and population structure deduced from diversity in AMA 1 and MSP 1 genes. Mol Biochem Parasitol 2000; 108(1): 53-66.
- González JM, Hurtado S, Arevalo-Herrera M, Herrera S. Variants of the *Plasmodium vivax* Circumsporozoite Protein (VK210 and VK247) in Colombian Isolates. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001; 96(5): 709-712.
- Guerin PJ, Olliaro P, Nosten F, Druilhe P, Laxminarayan R, Binza F, *et al.* Malaria: Current status of control, diagnosis, treatment, and a proposed agenda for research and development. Lancet Infect Dis 2002; 2: 564-573.

- Guerra AP, Knudson A, Nicholls RS, Galindo JA, Ravid Z, Rahirant S. *et al.* Genotipificación de los genes *mssl* (bloque 2) y *dhfr* (codón108) de *Plasmodium falciparum* en muestras de campo recolectadas en cuatro localidades endémicas de Colombia. *Biomedica* 2006; 26(1): 101-112.
- Han ET, Song TE, Park JH, Shin EH, Guk SM, Kim TY, *et al.* Allelic dimorphism in the merozoite surface protein-3alpha in Korean isolates of *Plasmodium vivax*. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 71(6): 745-749.
- Hijar G, Castro M, Holguin C. Tipificación molecular de *Plasmodium falciparum* a partir de frotis sanguíneo de pacientes infectados procedentes de la costa norte del Perú - Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 2003; Suppl 20: 22.
- Hijar G, Quino H, Padilla C, Montoya Y. Variabilidad genética de *Plasmodium falciparum* en pacientes con malaria grave y malaria no complicada en Iquitos - Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 2002; 19(3): 131-135.
- Instituto Nacional de Salud (INS). Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de malaria. Serie de Normas Técnicas 39. Lima, Perú: Artes & Diseños Laser S.R.Ltda.; 2003.
- Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). Censos Nacionales 2007. Banco de Información Distrital (en línea). Consultado: 15 de julio de 2009. Disponible en: <http://desa.inei.gob.pe/mapas/bid/>
- Jayavanth S, Jagadeesan K, Singh M. Influence of *P. vivax* malaria on erythrocyte aggregation and deformability. *Clin Hemorheol Microcirc* 2004; 31(4): 257-266.
- Johnson JB. *The Harriet Lane Handbook*. 13a. ed. St. Louis: Mosby-Year Book, Inc.; 1993.

- Kain KC, Wirtz RA, Fernández I, Franke ED, Rodriguez MH, Lanar DE. Serologic and genetic characterization of *Plasmodium vivax* from whole blood-impregnated filter papers discs. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 46(4): 473-479.
- Kain KC, Lanar DE. Determination of genetic variation within *Plasmodium falciparum* by enzymatically amplified DNA from filter paper disks impregnated with whole blood. *J Clin Microbiol* 1991; 29(6): 1171-1124.
- Kho WG, Park YH, Chung JY, Kim JP, Hong ST, Lee WJ, *et al.* Two new genotypes of *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein found in the Republic of Korea. *Korean J Parasitol* 1999; 37(4): 265-270.
- Kirchgatter K, del Portillo HA. Molecular análisis of *Plasmodium vivax* relapsis using the MSP1 molecule as a genetic marker. *J Infect Dis* 1998; 177: 511-515.
- Krotoski WA. The hypnozoite and malarial relapse. *Prog Clin Parasitol* 1989; 1: 1-19.
- Leclerc MC; Durand P, Gauthier C, Patot S, Billotte N, Menegon M, *et al.* Meager genetic variability of the human malaria agent *Plasmodium vivax*. *PNAS* 2004; 101(40): 14455-14460.
- Legua P. Malaria en el Perú. *Rev Med Hered* 1994; 5(3): 115-117.
- Londoño I. Clínica y complicaciones de las parasitosis. Antioquia: Edit. Universidad de Antioquia; 1993.
- Malaria Research Centre (MRC). Genetic Diversity Studies. In: MRC. A Profile of Malaria Research Centre. Delhi, India; 2005. p. 63-68.
- Manamperi A, Mahawithanage S, Fernando D, Wickremasinghe R, Bandara A, Hapuarachchi C, *et al.* Genotyping of *Plasmodium vivax* infections in Sri Lanka

- using *Pvmsp-3α* and *Pvcs* genes as markers: A preliminary report. *Tropical Biomedicine* 2008; 25(2): 100–106.
- Mascorro CN, Zhao K, Khuntirat B, Sattabongkot J, Yan G, Escalante AA, *et al.* Molecular evolution and intragenic recombination of the merozoite surface protein MSP-3alpha from the malaria parasite *Plasmodium vivax* in Thailand. *Parasitology* 2005; 131(Pt 1): 25-35.
- Mendis K, Sina BJ, Marchesini P, Carter R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 64(1, 2): 97-106.
- Mendizabal-Cabrera R, Barnwell NP. Genetic Diversity of *Plasmodium vivax* in Malaria High Risk Areas of Guatemala, Central América. *Abstrat Book. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 54th Annual Meeting* 2005; 73(6).
- Moriello S. Los nuevos caminos del conocimiento (en línea). Consultado 30 noviembre 2005. Disponible en: [http://conedsup.unsl.edu.ar/Download\\_trabajos/Trabajos/Eje\\_5\\_Investigacion\\_y\\_Produccion\\_Conocimiento/Gallegos\\_Miguel.PDF](http://conedsup.unsl.edu.ar/Download_trabajos/Trabajos/Eje_5_Investigacion_y_Produccion_Conocimiento/Gallegos_Miguel.PDF)
- Morin E. *Introducción al pensamiento complejo*. Barcelona: Gedisa; 1998.
- Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Mochar DK, Alonso PL, *et al.* Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *The Lancet Infectious Diseases* 2009; 9(9): 555-556.
- Municipalidad Distrital de Bellavista (MDB). 2008. *Historia de Bellavista* (en línea). Consultado: 30 diciembre 2010. Disponible en: <http://www.munibellavista-sullana.gob.pe/Historia.html>
- Nedelcheva V, Kelefiotis D, Kristensen T, Borresen AL. High-Throughput Methods for Detection of Genetic Variation. *BioTechniques* 2001; 30: 318-332.

- Oficina General de Epidemiología (OGE), Ministerio de Salud (MINSA). Casos de malaria, Perú: 2001-2003. Lima, Perú; 2004.
- Olive DM, Bean P. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. *J Clin Microbiol* 1999; 37(6): 1661-1669.
- Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Manuel des techniques de base pour le laboratoire médical. Genève; 1982.
- Organización Panamericana para la Salud (OPS). 2005. El derecho a la salud y los objetivos de desarrollo del Milenio (en línea): Consultado 12 mayo de 2009. Disponible en: <http://www.paho.org/Spanish/DD/PUB/capitulo5.pdf>
- Plowe CV, Djimde A, Bouare M, Doumbo O, Wellems TE. Pyrimethamine and proguanil resistance-conferring mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase: polymerase chain reaction methods for surveillance in Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1995; 52(6): 52: 565-568.
- Polley SD, Conway DJ. Strong diversifying selection on domains of the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 gene. *Genetics* 2001; 158: 1505-1512.
- Popper K. El mito del marco común. En defensa de la ciencia y la racionalidad. Barcelona, España: Ediciones Paidós Ibérica SA; 1997.
- Price RN, Tjitra E, Guerra CA, Yeung S, White NJ, Anstey NM. Vivax Malaria: Neglected and Not Benign. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2007; 77(Suppl 6): 79-87.
- Rayner JC, Huber CS, Feldman D, Ingravallo P, Galinski MR, Barnwell JW. *Plasmodium vivax* merozoite surface protein PvMSP-3 $\beta$  is radically polymorphic through mutation and large insertions and deletions. *Infect Genet Evol* 2004; 4(4): 309-319.

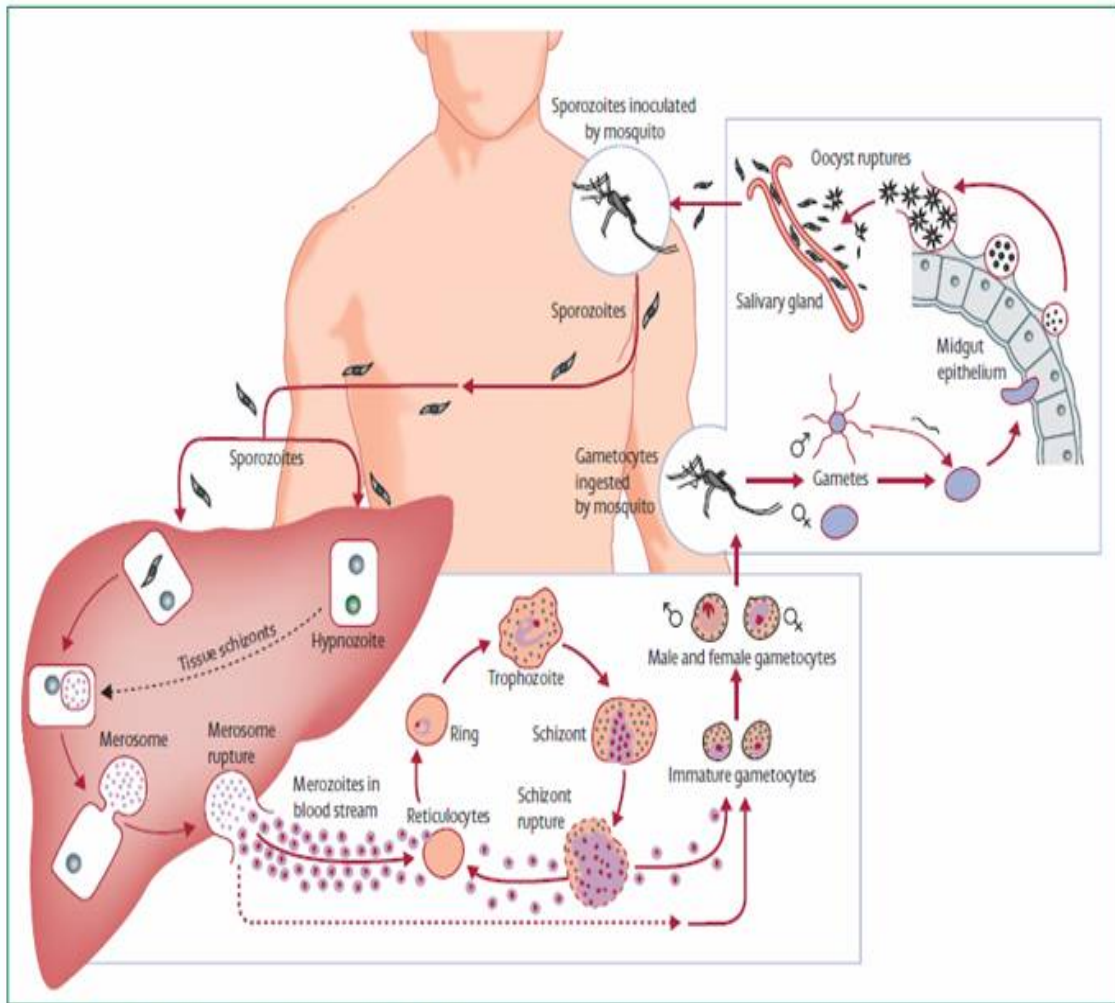
- Rayner JC, Corredor V, Feldman D, Ingravallo P, Iderabdullah F, Galinski MR, *et al.*  
 Extensive polymorphism in the *Plasmodium vivax* merozoite surface coat protein  
 MSP-3alpha is limited to specific domains. *Parasitology* 2002; 125(5 Pt): 393-405.
- Reeder JC, Marshall VM. A simple method for typing *Plasmodium falciparum*  
 merozoite surface antigens 1 and 2 (MSA-1 and MSA-2) using a dimorphic-form  
 specific polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 1994; 68: 329-332.
- Robert F, Ntoumi F, Angel G, Candito D, Rogier C, Fandeur T, *et al.* Extensive genetic  
 diversity of *Plasmodium* isolates collected from patients with severe malaria in  
 Dakar, Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996; 90(6): 704-711.
- Roshanravan B, Kari E, Gilman RH, Cabrera L, Lee E, Metcalfe J, Calderón M, Lescano  
 AG, Montenegro SH, Calampa C, Vinetz J. Endemic malaria in the Peruvian  
 Amazon Region of Iquitos. *Am.J. Trop. Med. Hyg* 2003; 69(1): 45-51.
- Rosenberg R, Wirtz RA, Lanar DE, Sattbongkot J, Hall T, Waters AP, *et al.*  
 Circumsporozoite protein heterogeneity in the human malaria parasite *Plasmodium*  
*vivax*. *Science* 1989; 245: 973-976.
- Ruebush TK, Zegarra J, Cairo J, Andersen EM, Green M, Pillai DR, *et al.* 2003.  
 Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* malaria in Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*  
 2003; 69(5): 548–552.
- Sachs J, Malaney P. The economic and social burden of malaria. *Nature* 2002; 415: 680-685.
- Sanguineti JJ. Confrontación entre Einstein y Popper. *La Prensa* 1995 Dic 3; 2-3.
- Snounou G, Zhu X, Siripoon N, Jarra W, Thaithong S, Brown KN, *et al.* Biased  
 distribution of msp1 and msp2 allelic variants in *Plasmodium falciparum*  
 populations in Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; 93: 369-374.



- Snounou G, Viriyakosol S, Zhu X, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, *et al.* High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Molecular Biochemical Parasitology* 1993; 61: 315-320.
- Steel RGD, Torrie JH. *Bioestadística: Principios y Procedimientos*. 2a ed. Bogotá: Edit. McGraw-Hill; 1985.
- Taylor RR, Allen SJ, Greenwood BM, Riley EM. IgG3 antibodies to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 (MSP2): increasing prevalence with age and association with clinical immunity to malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1998; 58(4): 406-413.
- Vargas J. Prevención y control de la Malaria y otras enfermedades. *Revista Peruana de Epidemiología* 2003; 11(1).
- Véron V, Legrand E, Yrinesi J, Volney B, Simon S, Carne B. Genetic diversity of *mSP3* and *mSP1\_b5* markers of *Plasmodium vivax* in French Guiana. *Malaria Journal* 2009, 8: 40.
- Viriyakosol S, Siripoon N, Petcharapirat C, Petcharapirat P, Jarra W, Thaithong KN, *et al.* Genotyping of *Plasmodium falciparum* isolates by the polymerase chain reaction and potential uses in epidemiological studies. *Bull World Health Organ* 1995; 73: 85-95.
- Volkman SK, Hart DL, Wirth DF, Nielsen KM, Choi M, Batalov S, *et al.* Excess Polymorphisms in Genes for Membrane Proteins in *Plasmodium falciparum*. *Science* 2002; 298: 216-218.
- World Health Organization. *World Malaria Report 2008*. Consultado: 20 de febrero de 2009. Disponible en: <http://malaria.who.int/wmr2008/malaria2008.pdf>
- Zakeri S, Barjesteh H, Djadid N. Merozoite surface protein-3 $\alpha$  is a reliable marker for population genetic analysis of *Plasmodium vivax*. *Malaria Journal* 2006, 5: 53.

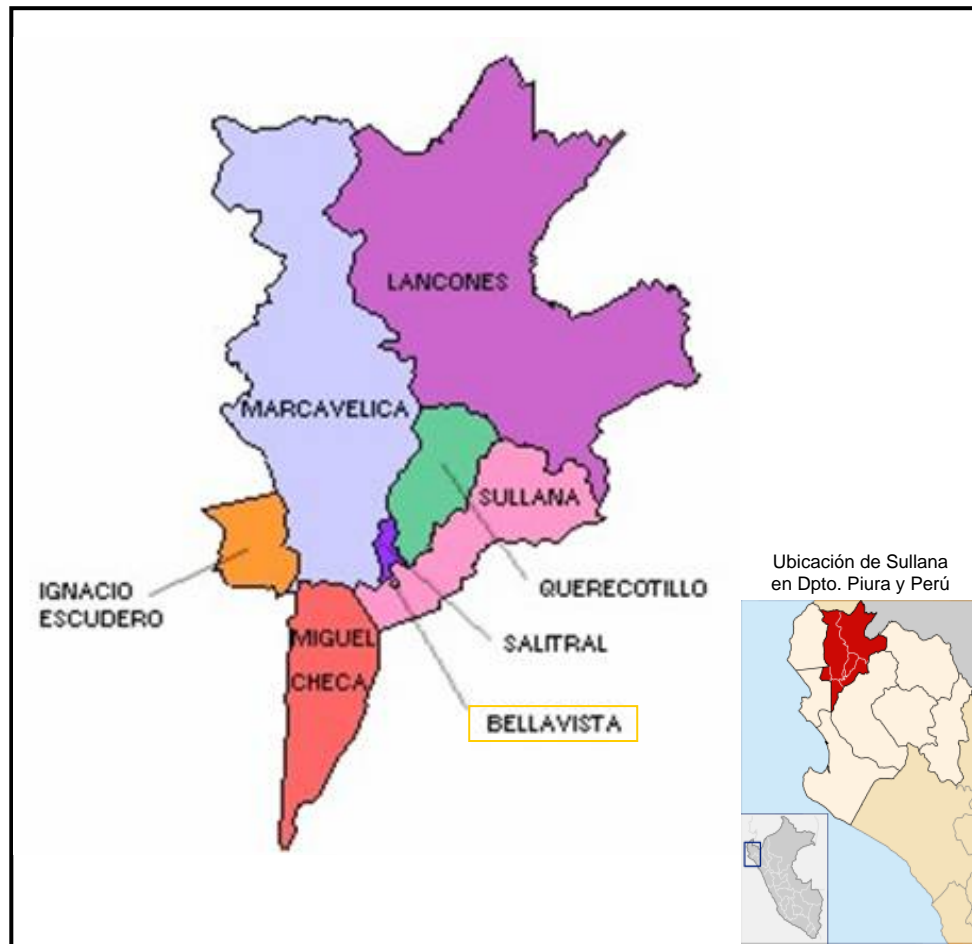
# **ANEXOS**

## Anexo 1



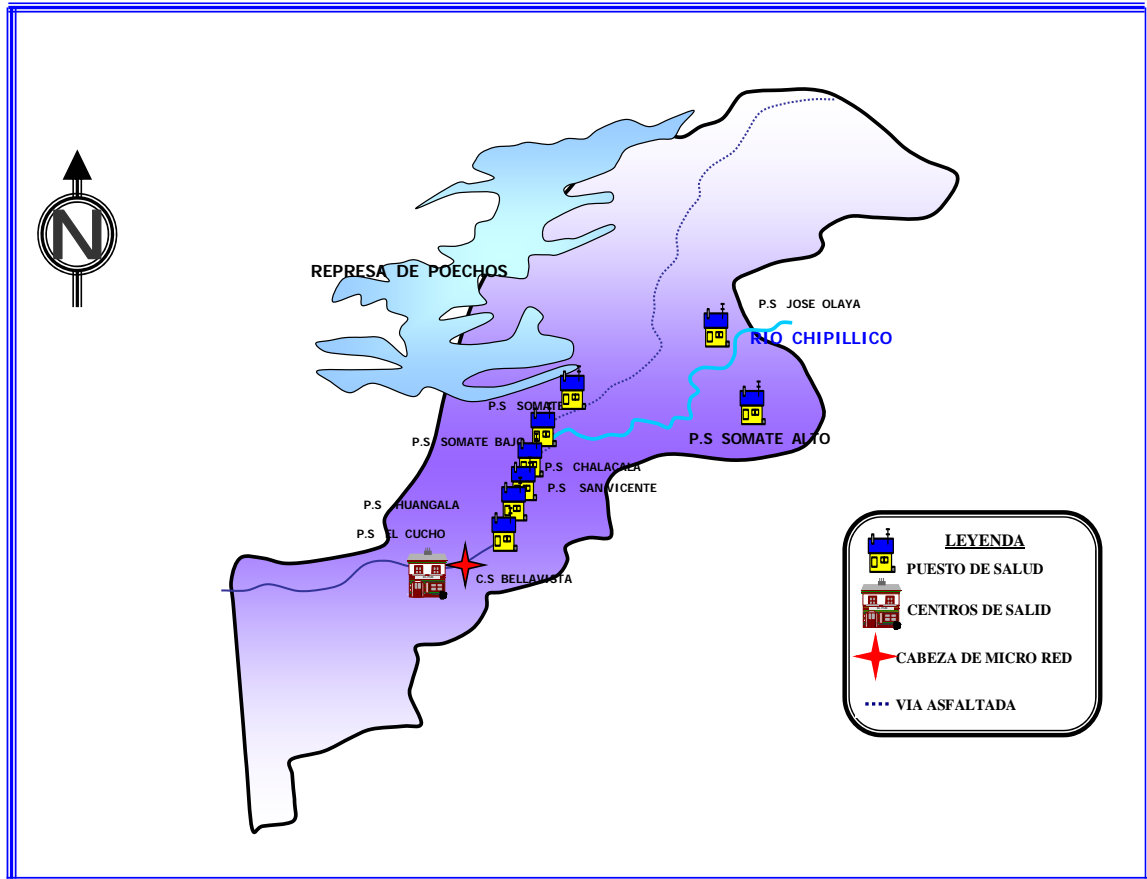
**Fig. 1-A.** Ciclo vital de *Plasmodium vivax* causante de malaria humana. Fuente: Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Mochar DK, Alonso PL, *et al.* Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. The Lancet Infectious Diseases 2009; 9(9): 555-556.

## Anexo 2



**Fig. 2-A.** Mapa de la provincia Sullana, del Dpto. Piura, Perú, en el que se muestra la ubicación del distrito Bellavista, lugar donde se realizó el estudio de genotipificación de *Plasmodium vivax*.

### Anexo 3



**Fig. 3-A.** Mapa de ubicación del Centro de Salud Bellavista y Puestos en los diferentes sectores del distrito Bellavista, Sullana.

## Anexo 4

### Consentimiento informado

#### **Genotipificación de *Plasmodium vivax* de pacientes con malaria, del distrito Bellavista**

La malaria es una enfermedad de gran importancia en el Perú; por el alto número de personas que enferman. En el distrito Bellavista, también sus pobladores enferman de malaria, la cual puede ser muy debilitante. La enfermedad es causada por un parásito de la sangre que se transmite a las personas por la picadura de un zancudo que se infectó al picar a una persona con malaria. El diagnóstico de la enfermedad a partir de una muestra de sangre del paciente, permite iniciar el tratamiento. Un mayor estudio del parásito causal, como sus características genéticas, brindará conocimientos útiles para la prevención y el mejor tratamiento de la malaria. Por ello, en la Universidad Nacional de Trujillo y con el apoyo del Laboratorio de Investigación y Desarrollo en la Universidad Peruana Cayetano Heredia, en Lima se estudiará la malaria para luchar más eficazmente contra ella.

#### **Procedimiento**

Usted ha sido diagnosticado con malaria y se le invita a participar en este estudio, por residir en una zona donde ocurre la enfermedad. Si usted decide participar en el estudio se le preguntará: su nombre, edad, ocupación, dirección, episodios de malaria anteriores, síntomas. De los menores de 5 años de edad, se sacará muestras de sangre por punción de la yema del dedo (menos de una cucharita de sangre), de las otras personas se sacará muestras de sangre del brazo con una aguja pequeña (menos de una cuchara de sangre). Después de sacar la muestra de sangre, se le dará el tratamiento contra la malaria. El medicamento y la dosis serán dados por un médico del Centro de Salud Bellavista.

#### **Riesgos y beneficios**

Su participación tiene riesgos mínimos. La toma de muestra de sangre podría causarle un dolor leve y existe un riesgo pequeño de infección o moretón. Se tratará de mantener este riesgo tan bajo como sea posible, desinfectando y presionando la zona donde se toma la muestra.

Los participantes se beneficiarán con el diagnóstico oportuno de la malaria y su tratamiento inmediato. El estudio beneficiará a la comunidad en general; los resultados permitirán conocer más sobre el parásito y servirán para su prevención y control. Su participación en el estudio no le ocasionara gasto alguno.

#### **Confidenciabilidad**

Todas sus respuestas y los resultados de sus pruebas de sangre serán guardados con un código en lugar de su nombre. Su nombre y otros datos que podrían identificarlo a usted no saldrán cuando los resultados sean publicados.

#### **Contacto**

Si usted desea preguntar a alguien sobre este estudio o su participación, podrá contactarse con la Sra. Malena Cornejo al teléfono 493488, o con la Dra. Maritza Calderón al teléfono 01-4832942.

#### **Consentimiento**

Si usted está de acuerdo con su participación o la participación de su hijo(a) en este estudio, por favor firme a continuación.

\_\_\_\_\_  
Nombre del participante

\_\_\_\_\_  
Firma o huella digital del  
participante/padre o apoderado

\_\_\_\_\_  
Testigo

\_\_\_\_\_  
Fecha

## Anexo 5

### Genotipificación de *Plasmodium vivax* de pacientes con malaria del distrito Bellavista, Sullana, Perú, usando el gen MSP3α

Fecha:

Código:

#### 1. Datos del paciente

Apellidos y nombres:			
Edad:	años	Sexo:	Femenino ( ) Masculino ( )
Talla:	cm	Peso:	kg Ocupación:
Dirección domicilio:		Localidad:	
Tiempo residencia:			

#### 2. Datos epidemiológicos

Desplazamientos en últimos 90 días				Tiempo de permanencia
Fecha	Localidad	Distrito	Provincia	

Antecedentes de malaria:

Tuvo malaria antes	Si: ( ) No ( )	N° veces:	Fecha episodio(s)

Medicamentos tomados:

Cloroquina	Primaquina	Sulfadoxina/Pirimet.	Otro(s):
Si: ( ) No ( )	Si: ( ) No ( )	Si: ( ) No ( )	

Lugar probable de infección:

#### 3. Manifestaciones clínicas

Fecha inicio de síntomas:

Fiebre	Si: ( ) No ( )	°C	Náuseas	Si: ( ) No ( )
Escalofríos	Si: ( ) No ( )		Vómitos	Si: ( ) No ( )
Sudoración	Si: ( ) No ( )		Ictericia	Si: ( ) No ( )
Cefalea	Si: ( ) No ( )		Diarrea	Si: ( ) No ( )
Dolor muscular	Si: ( ) No ( )		Esplenomegalia	Si: ( ) No ( )
Dolor articular	Si: ( ) No ( )		Hepatomegalia	Si: ( ) No ( )

#### 4. Resultados de análisis de laboratorio

Gota gruesa	Frotis	Densidad parasitaria (N° parásitos/μl sangre)	Hematocrito (%)

<b>Genotipo(s)</b>	Fecha de estudio:
Infección única ( )	Infección mixta ( )

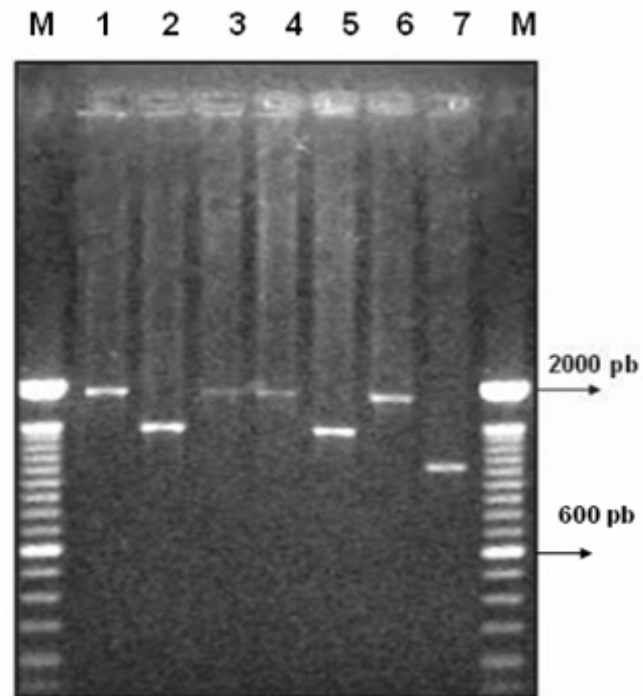
## Anexo 6

**Tabla 1-A:** Distribución de pacientes con malaria por *Plasmodium vivax*, del distrito Bellavista, incluidos en el estudio de genotipificación, según el sexo y sus edades.

Grupo etario (años)	Sexo del paciente		Total de casos	
	Masculino	Femenino	N°	%
	N°	N°		
4 a 9	1	1	2	3,8
10 a 19	11	4	15	28,3
20 a 29	9	7	16	30,2
30 a 39	4	4	8	15,1
40 a 49	5	2	7	13,2
50 a 59	1	3	4	7,5
60 a 62	0	1	1	1,9
<b>Total</b>	<b>31</b>	<b>22</b>	<b>53</b>	<b>100,0</b>



## Anexo 7



**Fig. 3-A.** Tamaños obtenidos de los fragmentos amplificados del gen de la proteína-3 $\alpha$  de la superficie del merozoíto de *Plasmodium vivax* (*MSP3 $\alpha$* ); M: Marcador 100 pb DNA ladder; líneas 1, 3, 4, y 6 patrón A (1950 pb); líneas 2 y 5 patrón B (1500 pb) y línea 7 patrón C (1200 pb). Fuente: Calderón MM. Genotipia de *Plasmodium vivax* y su importancia en el manejo y control de la malaria de la amazonía peruana (tesis doctoral). Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2006.