

Curso 2011/12
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/38
I.S.B.N.: 978-84-15910-39-8

MARÍA ÁNGELES SANTANA MORALES

**Comparación de diferentes técnicas
en el diagnóstico del paludismo y elaboración
de protocolos de actuación para laboratorios
de parasitología en zonas rurales de África**

Directores

**ENRIQUE MARTÍNEZ CARRETERO
BASILIO VALLADARES HERNÁNDEZ**



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial a Enrique Martínez Carretero y Basilio Valladares Hernández por aceptarme para realizar esta tesis doctoral bajo sus direcciones. El apoyo y confianza en mi trabajo y la capacidad para guiar mis ideas han sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigadora. Les agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis. Muchas gracias por permitirme vivir una experiencia tan importante para mi formación como investigador.

Debo un especial reconocimiento a la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional por la confianza que mostraron en mí al concederme una beca Estebe con la cual fue posible aventurarme en esta travesía.

Agradezco al laboratorio de Medicina Tropical del Carlos III de Madrid por su amabilidad y disponibilidad durante mi estancia en su grupo, durante las cuales tuve todo el soporte profesional y logístico para alcanzar los objetivos perseguidos. Al igual que al Hospital Rural de Gambo que gracias a su confianza y buena voluntad la estancia en Etiopía solo me trae muy buenos recuerdos.

Gracias también a mis compañeros Aarón, Ana C., Ana R., Ángela, Ateneri, Carmen, Celia, Cris G., Cris P., Dani, Emma, Haridian, Jacob, Javi, Lea, María, Mariano, Mercedes, Nieves, Tilman, Titi, Vero, por todos estos años de convivencia dentro y fuera del trabajo, por el apoyo en los malos tiempos y el compartir tan buenos y divertidos momentos. En particular quiero agradecer a Merche, Raquel, Toña por el apoyo que he encontrado en ellas durante esta larga aventura, por su comprensión y por escucharme cuando los ánimos decaían, a Pili con quien comencé la aventura investigadora y tan buenos recuerdos guardo de los viajes a La Gomera. Y en especial quiero agradecer a Elena por los consejos, el apoyo y el ánimo que siempre me ha brindado tanto en lo profesional como en lo personal.

Durante estos años no solo mis compañeros de trabajo han vivido lo que significa realizar una tesis, por esto también quiero tener unas palabras de agradecimiento a mis amigos. Al grupo Kilikolo (Ana, Cori, Ina, Miguel, Nuria, Silvia y Tania), muchísimas gracias por soportar las épocas de más estrés, que siempre lograron disiparlas con unas CCC bien frías y

unas buenas fabadas. Al grupo de biólogas (Anabel, Milagros, Nely, Yurena) porque nuestros encuentros siempre eran muy reconfortantes y lograban que por unas horas mi mente sólo pensara en lo guapísimos que estaban los sobrinos.

A todos los que durante estos años han influido algo en mi vida Tropical, desde los comienzos en Barcelona hasta el final en Etiopía (por ahora), muchas gracias por los ánimos, los consejos y las aventuras que hemos vivido descubriendo lo fantástico que es el gran continente Africano.

Para el final he querido dejar a mi familia, por ser el pilar en el que siempre me he sustentado durante estos largos años. Mamá, Papá muchísimas gracias por haber siempre confiado en mí, por ese gran apoyo que siempre he tenido y que gracias a él he logrado terminar esta Tesis Doctoral. A mis hermanos les agradezco mucho los buenos momentos que pasamos juntos que logran recargar las energías para afrontar esta aventura con más fuerza. Y por último muchísimas gracias a mis tías, tíos y primos que siempre sus ánimos han venido bien en todo momento.

*No importa lo negra que parezcan o sean las cosas.
Levanta la mirada y mira las posibilidades:
no dejes de verlas porque siempre están ahí.*

Norman Vincent Peale

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

- ADN: ácido desoxirribonucleico
ANA: anticuerpo antinucleares
AO: naranja de acridina
ARN: ácido ribonucleico
BCP: benzotiocarboxy purina
CDC: centro para el control y prevención de las enfermedades
CI: intervalo de confianza
CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*
dNTP: desoxirribonucleótidos trifosfato
EDTA: ácido etilendiaminotetracético
Hb: hemoglobina
HRP-2: proteína rica en histidina
ICT *Pf/Pv*: inmunocromatografía *Pf/Pv*
n-PCR: nested-PCR
OMS: organización mundial de la salud
OR: riesgo probabilístico
Pb: pares de bases
PBS: tampón fosfato salino
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
pLDH: *Plasmodium* lactato deshidrogenasa
pPCR: PCR a tiempo real cuantitativa
RDT: test de diagnóstico rápido
SnM-PCR: *semi-nested multiplex* malaria PCR
Tm: temperatura de hibridación
WBC: glóbulos blancos

ÍNDICE

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	19
1.1. La Malaria.....	19
1.2. Características morfológicas de <i>Plasmodium</i>.....	20
1.3. Ciclo Biológico de la Malaria.....	23
1.4. Diagnóstico de la Malaria	26
1.4.1. Métodos Directos	27
1.4.1.1. Microscopía óptica.....	27
1.4.1.2. Microscopia de fluorescencia	30
1.4.1.2. Diagnóstico Molecular.....	32
1.4.1.3. Detección de proteínas y enzimas de <i>Plasmodium</i> en sangre	35
1.4.2. Métodos Indirectos.....	38
1.4.2.1. Detección del título de anticuerpos mediante reacciones serológicas	38
1.5. Manifestaciones Clínicas.....	39
1.5.1. Malaria no complicada.....	39
1.5.2. Malaria complicada.....	40
1.5.3. Diagnóstico diferencial	41
1.6. Concepto Básico de Valores de referencia	41
1.7. Grupos especiales.....	44
1.7. 1. Mujeres embarazadas	44
1.7.2. Niños	45
1.8. Tratamiento.....	46
1.8.1. Mecanismos de acción	46

1.9. Distribución Geográfica	48
1.9.1. La Malaria en Etiopía	49
1.9.2. Hospital Rural de Gambo (Etiopía)	50
2. OBJETIVOS	55
3. MATERIALES Y MÉTODOS	59
3.1. Cepa bacteriana	59
3.2. Medios de cultivo de cepas bacterianas	59
3.2.1. Condiciones para el cultivo de <i>Escherichia coli</i>	59
3.3. Recolección de las muestras de sangre	60
3.3.1. Análisis de la Hemoglobina	60
3.3.2. Gota gruesa y Frotis Sanguíneo	60
3.3.3. Muestra de sangre en papel de filtro	61
3.4. Aislamiento de ADN genómico	61
3.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	63
3.5.1. Nested-PCR	63
3.5.2. PCR a tiempo real	64
3.5.2.1. PCR a tiempo real (<i>Ingene PrimerDesign TMLtd</i>)	64
3.5.2.2. PCR a tiempo real (Rosanas-Urgell <i>et al.</i> 2010)	64
3.5.3. PCR colonia	65
3.5.4. Secuencia de cebadores empleados en las distintas PCR	65
3.6. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa	66
3.7. Elución del ADN obtenido por PCR	66
3.8. Ligación de fragmentos de ADN	67
3.9. Transformación de ADN en <i>E. coli</i>	68
3.9.1. Preparación de células <i>E. coli</i> competentes	68

3.9.2. Transformación de células bacterianas competentes	69
3.9.3. Selección de colonias recombinantes de <i>E. coli</i>	69
3.10. Aislamiento de ADN plasmídico.....	70
3.11. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción.....	70
3.12. Tratamiento con fosfatasa alcalina	71
3.13. Valores de Referencia.....	71
3.14. Análisis Estadísticos	72
4. RESULTADOS	77
4.1. Diagnóstico de la malaria.....	77
4.1.1. Diagnóstico por Microscopía	78
4.1.2. Diagnóstico por nested-PCR.....	82
4.1.3. Detección de <i>Plasmodium</i> a distintas altitudes	88
4.1.4. Diagnóstico por PCR a tiempo real.....	90
4.1.4.1. Diagnóstico por qPCR mediante Kits comerciales.....	90
4.1.4.2. Diagnóstico por qPCR mediante el diseño de <i>primer</i> y sondas específicas	92
4.1.5. Comparación de diagnóstico de <i>Plasmodium</i> mediante microscopía, n- PCR y qPCR.....	96
4.1.6. Comparación de la cuantificación de <i>Plasmodium</i> mediante microscopía, qPCR ¹ y qPCR ²	98
4.2. Valores de referencia de la hemoglobina	101
4.2.1. Valores de Referencia	102
4.2.1.1. Fase Preanalítica	102
4.2.1.2. Fase Analítica	103
4.2.1.3. Fase Postanalítica.....	104
4.2.1.3.1. Análisis de los datos de hemoglobina según la altitud	105

4.2.1.3.2. Valores de Referencia en la hemoglobina del grupo de las Mujeres.....	106
4.2.1.3.3. Valores de Referencia en la hemoglobina del grupo de los Hombres	109
4.2.1.3.4. Valores de Referencia en la hemoglobina del grupo de niños	111
4.2.2. Asociación entre Malaria y Hemoglobina	113
5. DISCUSIÓN	123
6. CONCLUSIONES	135
7. BIBLIOGRAFÍA	139
ANEXO 1.....	165
1. Datos del grupo de las mujeres que se incluyeron en el estudio.	165
2. Datos del grupo de los hombres que se incluyeron en el estudio.	166
3. Datos del grupo de los niños que se incluyeron en el estudio.	167
4. Datos de las muestras positivas para <i>Plasmodium</i> detectadas por microscopía.....	168
5. Datos de las muestras positivas para <i>P. vivax</i> detectadas por n-PCR.	168
6. Datos de las muestras positivas para <i>P. falciparum</i> detectadas por n-PCR.	169
7. Datos de las muestras positivas para <i>Plasmodium</i> detectadas por qPCR (PrimerDesignTMLtd).	169
8. Datos de las muestras positivas para <i>Plasmodium</i> detectadas por qPCR (Rosanas-Urgell <i>et al.</i> 2010).	170
ANEXO 2.....	171

1. Datos de Hemoglobina de la población sana, que fue sometida a nuestro estudio.	171
2. Datos de Hemoglobina de la población enferma (infectada con <i>Plasmodium</i>) que fue sometida a nuestro estudio.	172
ANEXO 3.....	173
1. Mapa de la región de West Arsi, donde se encuentran las principales Woredas a la que pertenecen los pacientes que visitan el Hospital Rural de Gambo.....	173

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La Malaria

La malaria es una enfermedad sistémica aguda causada por protozoos del género *Plasmodium*, que se transmiten a los humanos a través de mosquitos hembras de especies del género *Anopheles*. Se estima que hay entre 300 y 800 millones de casos clínicos de malaria al año y entre 1 a 3 millones de muertes por malaria cada año en los trópicos y subtropicos (Berman *et al.* 2001). La mayoría de las infecciones y muertes en África Sub-Sahariana son causadas por *Plasmodium falciparum* afectando principalmente a niños menores de 5 años de edad y mujeres embarazadas, debido a inmadurez inmunológica y baja inmunidad respectivamente. En África, la malaria se calcula que causa una pérdida económica mínima de 12 mil millones de dólares al año (Sachs y Malaney 2002), produciendo un gran daño en el desarrollo económico y social del planeta (Guinovart *et al.* 2006). Controlar la malaria en las regiones endémicas, ha sido un importante objetivo para la Organización Mundial de la Salud desde que fue fundada en 1948 (Russell 1955).

La malaria ha tenido un enorme impacto en el mundo durante milenios. Hipócrates describió las manifestaciones clínicas y las complicaciones de la malaria en el siglo quinto antes de Cristo. Casi medio milenio más tarde, Celso (25 aC al 54 dC) proporcionó una descripción detallada de las diferencias entre la manifestaciones clínicas de la enfermedad causada por *P. falciparum*, *P. vivax* y *P. malariae* (Gilles 2002). En el siglo XVIII, estas fiebres recibieron el nombre italiano de malaria (mal aria = aire malo) o de fiebres palustres de los pantanos porque se creía que la enfermedad era transmitida a través del aire viciado de las zonas pantanosa.

En 1880 Alphonse Laveran, un médico militar francés que trabajaba en Argelia, hizo la primera descripción de los parásitos causantes de la malaria en la sangre de los pacientes (Laveran 1880). La transmisión de la malaria, por los mosquitos *Anopheles* fue descubierta en 1897 por Ronald Ross, un médico

militar británico que trabajaba en la India (Ross 1897). Ross encontró un parásito de la malaria en un mosquito que previamente se había alimentado de un paciente con parásitos en su torrente sanguíneo. Laveran (1907) y Ross (1902) recibieron un Premio Nobel por sus descubrimientos. El ciclo de vida de la malaria en humanos fue descrito en 1898-1899 por los científicos italianos Amico Bignami, Giuseppe Bastianelli y Battista Grassi (Gilles 2002).

1.2. Características morfológicas de *Plasmodium*

La Malaria está causada por protozoos del género *Plasmodium*, familia Plasmodiidae, suborden Haemosporidiidae y orden Coccidiida. Hay más de 120 especies de *Plasmodium* que infectan a mamíferos, aves y reptiles. Sólo se conocen 4 especies que infecten a los seres humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*. Una especie de *Plasmodium*, causante de la malaria en los simios (*P. knowlesi*), ha sido referenciada de forma intermitente, como causante de la enfermedad en humanos (Singh *et al.* 2004). Recientemente numerosos autores la han descrito como la quinta especie de *Plasmodium* capaz de causar la malaria en humanos. Suele confundirse con *P. malariae* en el diagnóstico por microscopía pero produce casos graves e incluso mortales similar a *P. falciparum* (Kantele y Jokiranta 2011).

Las cuatro especies presentan diferencias morfológicas que son empleadas para el diagnóstico por microscopía.

-*P. falciparum* no produce un aumento en el tamaño de los hematíes parasitados, presenta, de forma ocasional, granulaciones en el citoplasma denominados puntos de Maurer, puede verse desde 1 a 4 plasmodios por hematíe y presentar de 1 a 2 puntos de cromatina en el trofozoito. Los trofozoitos jóvenes son en forma de anillo pequeño y los maduros, son anillos agrandados y ligeramente irregulares. Los schizontes, aunque son raros de ver en sangre periférica, presentan de 8 a 32 merozoítos y los gametocitos presentan forma falciforme (figura 1).

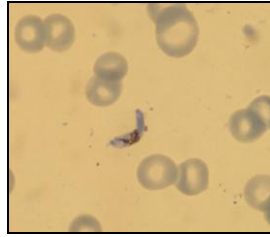


Figura 1: Gametocito en forma falciforme de la especie *P. falciparum*.

-*P. vivax* produce un aumento en el tamaño de los hematíes parasitados, presenta granulaciones azuladas de Schuffner en el citoplasma (figura 2), puede verse de 1 a 2 plasmodios por hematíe, este último con menor frecuencia y presentar de 1 a 2 puntos de cromatina en el trofozoito. Los trofozoitos jóvenes son en forma de anillo grueso y a menudo de forma irregular y los maduros, son anillos en forma ameboide. Los schizontes presentan de 12 a 24 merozoítos dispuestos irregularmente y los gametocitos presentan forma redondeada.

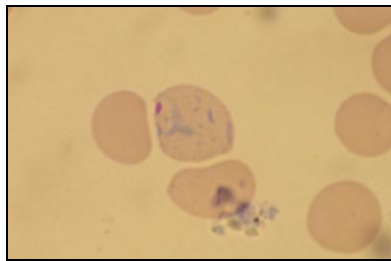


Figura 2: Hematíe parasitado con granulaciones azuladas de Schuffner de la especie *P. vivax*.

-*P. malariae* no produce un aumento en el tamaño de los hematíes parasitados, presenta, algunas veces, granulaciones en el citoplasma denominados puntos de Ziemann. Sólo se observa un plasmodio por hematíe y presentan un solo punto de cromatina en el trofozoito. Los trofozoitos jóvenes son en forma de anillo grueso y los maduros son anillos redondeados con cromatina central y en forma de banda. Los schizontes presentan de 8 a 10 merozoítos dispuestos en forma de roseta y los gametocitos presentan forma redondeada (figura 3).

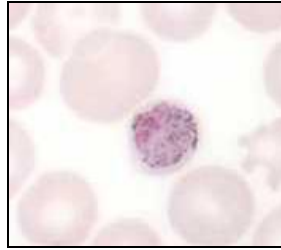


Figura 3: Gametocito de *P. malariae*. Fuente WHO (2000).

-*P. ovale* produce un aumento en el tamaño de los hematíes parasitados y les confiere una forma ovalada (figura 4) y desflecada. Presentan en el citoplasma granulaciones de Schuffner de color azuladas. Sólo se observa un plasmodio por hematíe y muestran un solo punto de cromatina en el trofozoito. Los trofozoitos jóvenes son en forma de anillo grueso y deforme y los maduros son anillos grandes, redondos y compactos. Los schizontes presentan de 6 a 12 merozoítos dispuestos de forma irregular y los gametocitos presentan forma redondeada.



Figura 4: Hematíe parasitado en forma ovalada de *P. ovale*. Fuente WHO (2000).

En la tabla 1 se muestran, de forma esquematizada, las diferentes características morfológicas de las distintas especies de *Plasmodium* que infectan a humanos.

Hematíes Parasitados	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>Plasmodium vivax</i>	<i>Plasmodium malariae</i>	<i>Plasmodium ovale</i>
Tamaño	Normal	Aumentado	Normal	Aumentado, tendencia oval y desflecado
Granulación del citoplasma	Puntos de Maurer (ocasional)	Granulaciones azuladas de Schuffner	Puntos de Zieman (Raramente)	Granulaciones azuladas de Schuffner
Nº de plasmodios	1-2-3-4	1-(2 muy raro)	1	1
Puntos de cromatina del trofozoito	1-2	1-(2 muy raro)	1	1
Trofozoito joven	Anillo fino y pequeño	Anillo grueso a menudo irregular	Anillo Grueso	Anillo grueso y deforme
Trofozoito maduro	Anillo agrandado y ligeramente irregular	Anillo irregular y ameboide	Anillo redondo con cromatina central y forma en banda	Anillo grande, redondo y compacto.
Esquizonte	Raro en sangre periférica 8-32 merozoítos	12-24 merozoítos dispuestos irregularmente	8-10 merozoítos a menudo dispuestos en forma de roseta	6-12 merozoítos dispuestos irregularmente
Gametocito	Falciforme	Redondeado	Redondeado	Redondeado

Tabla 1: Características morfológicas de las distintas especies de *Plasmodium* que causan la enfermedad en humanos.

1.3. Ciclo Biológico de la Malaria

El ciclo biológico de la malaria requiere la implicación de dos tipos de hospedadores, un hospedador definitivo -el mosquito-, donde se desarrolla el ciclo sexual del parásito y un hospedador intermediario -el humano-, donde se produce el ciclo asexual del *Plasmodium* (Guerrant *et al.* 2006).

La transmisión se produce cuando la hembra del mosquito del género *Anopheles* se alimenta de sangre de una persona infectada e ingiere los

gametocitos. En una o dos semanas los gametocitos, dentro del mosquito, se transforman en gametos formando un cigoto móvil que atraviesa la pared intestinal y en el exterior de la pared genera un ooquiste que produce numerosos esporozoitos infectivos, que avanzan hasta las glándulas salivares. Cuando el mosquito *Anopheles* infectado vuelve a picar al hospedador vertebrado inocula saliva, que ayudado por sus funciones analgésicas y antihemostásicas, obtiene la sangre del hospedador. En el momento de inocular la saliva, también inocula los esporozoitos infectivos del parásito, que rápidamente alcanzan el hígado e infectan a los hepatocitos. Los esporozoitos se unen a hepatocitos por procesos mediados por receptores, en el que participan moléculas de superficie del parásito, moléculas secretadas por el aparato apical del mismo y moléculas de superficie de los hepatocitos.

Una vez en el interior del hepatocito maduran transformándose en forma de esquizontes tisulares. Cada esquizonte es capaz de dividirse de forma asexual y producir miles de merozoitos que rompen el hepatocito y son liberados al torrente sanguíneo. En el caso de *P. vivax* y *P. ovale* puede ocurrir que algunos parásitos permanezcan durante un tiempo (hasta 3 años) en el hígado en la forma denominada hipnozoítos. Estos pueden reactivarse después de tiempos variables (de semanas a varios años), e iniciar nuevos cuadros clínicos de la enfermedad conocidos como recidivas.

Una vez en la sangre, los merozoitos invaden a los eritrocitos, en cuyo interior se transforman en trofozoitos y se multiplican. En 48-72 horas se rompen los eritrocitos y quedan libres en la sangre, pudiendo infectar a nuevos eritrocitos y por lo tanto, repitiéndose el ciclo eritrocitario. En esta fase del ciclo, los merozoitos adoptan una forma de anillo típica, mientras que los esquizontes son multinucleados.

Puede ocurrir que algunos de estos merozoitos en el interior del hematíe se diferencien dando lugar a gametos masculinos y femeninos denominados microgametocitos y macrogametocitos respectivamente, que son la forma infectiva para el mosquito, completándose así el ciclo biológico del *Plasmodium* (Figura 6).

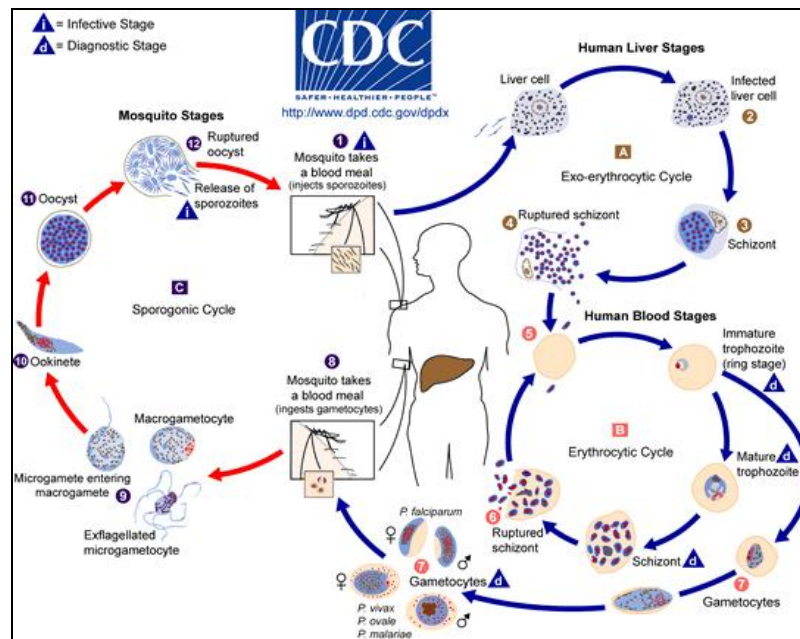


Figura 6: Ciclo biológico de la malaria. Fuente: www.dpd.cdc.gov/dpdx.

En todo el mundo existen unas 40 especies de anopheles capaces de transmitir la malaria al ser humano. Las especies de *Anopheles* con mayor capacidad para transmitir *Plasmodium* son *Anopheles darlingi* que se encuentran en el Amazona y *A. gambiae* en África (figura 5) (Guerrant *et al.* 2006).



Figura 5: Adulto de *A. gambiae*. Fuente www.dpd.cdc.gov/dpdx.

Las características ecológicas del medio son básicas para el vector y para el desarrollo de la enfermedad. La mayoría de *Anopheles* son crepusculares o nocturnos. Algunos se alimentan dentro de los hogares (endofagia), mientras que otros prefieren alimentarse fuera de ellos (exofagia) y tras la ingesta de sangre,

algunos mosquitos prefieren reposar dentro (endofilia) y otros fuera (exofilia) de los hogares. No obstante, este patrón de comportamiento cambia según la localización geográfica, las características del hogar y las condiciones microclimáticas.

Factores meteorológicos interfieren en la transmisión de la malaria, ya que afectan al parásito y a los vectores de forma directa o indirecta. La temperatura, las precipitaciones y la humedad han estado asociadas a la dinámica de las poblaciones de *Anopheles* y de esta forma, con la propagación de la malaria (Alemu *et al.* 2011). Especialmente, la temperatura ambiental juega un gran papel en el ciclo de vida del vector de la malaria e influye en el desarrollo del parásito en el mosquito. Este desarrollo tiene lugar entre 9 ó 10 días a 28°C, pero se detiene a temperaturas menores de 16°C. En el caso de *P. falciparum* y *P. vivax* la temperatura mínima para su desarrollo es aproximadamente de 18°C y 15°C, respectivamente (Jonathan *et al.* 2006).

1.4. Diagnóstico de la Malaria

En muchas áreas endémicas, el 95% de los niños y el 50% de los adultos tienen baja densidad de *P. falciparum* en su sangre durante el periodo de transmisión. La presencia de parásitos no asegura que los síntomas y signos clínicos característicos, como temperatura elevada, sean debidos a la malaria. Además, con altas prevalencia de malaria y parasitemias de más de 10.000 parásitos por micro litro de sangre, los parásitos podrían ser tolerados sin síntomas ni signos en individuos parcialmente inmunes. En estos casos, la densidad absoluta de parásitos en sangre, que es aproximadamente de 5.000 a 20.000 parásitos/ μ L de sangre, es usada para hacer el diagnóstico clínico de la malaria. Pacientes con bajos niveles de parasitemias deberían hacer sospechar que los síntomas y signos podrían ser debido a otras patologías. No obstante, pocos médicos negarían tratamientos antimaláricos a pacientes con síntomas y signos clínicos y sin ningún nivel de parasitemia (Guerrant *et al.* 2006).

Un diagnóstico de la malaria rápido y certero es la clave para un manejo de la enfermedad de forma efectiva. Cuando la malaria no puede ser diagnosticada clínicamente, la sangre debe ser examinada a través de métodos directos o indirectos. En los métodos directos se observa directamente el parásito al microscopio o se detecta su ADN. Y en los métodos indirectos se basan en la detección de la respuesta inmune del hospedador.

1.4.1. Métodos Directos

Los métodos directos consisten en la observación directa del parásito o componentes del parásito. Estos métodos se dividen en diagnósticos parasitológicos, cuando se observa el parásito a través del microscopio y diagnósticos moleculares cuando se detectan componentes del parásito como el ADN empleando técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), considerándose esta técnica el método de diagnóstico más sensible (Schneider *et al.* 2005).

1.4.1.1. Microscopía óptica

El diagnóstico parasitológico es el diagnóstico estándar para determinar la presencia de parásitos en sangre periférica. Se lleva a cabo mediante la realización de una Gota Gruesa o un Frotis sanguíneos, los cuales se observan al microscopio con un límite previsto de detección de 5-20 parásitos por microlitro de sangre (Phillips 2001). La sangre que proviene del dedo anular o del lóbulo de la oreja es la más adecuada, debido a que la densidad de trofozoitos o esquizontes desarrollados, será más grande por ser una sangre que proviene de una zona rica en capilares (Gilles 1993). La sangre obtenida desde punción venosa y que es conservada en tubos con anticoagulantes, como son la heparina o el EDTA, se puede emplear para el estudio de la malaria si, la sangre es utilizada poco después de su recolección, de forma que se eviten las alteraciones que se producen en la morfología de las células blancas y del parásito (Moody 2002).

La Gota Gruesa es óptima para diagnosticar bajas parasitemias, ya que es una técnica que concentra de 20 a 40 veces la sangre examinada, permitiendo ver el contenido de un gran número de células rojas en poco espacio (Bejon *et al.* 2006). Los parásitos aparecen como microorganismos extracelulares sobre un fondo formado por los estromas de los eritrocitos y las plaquetas (figura 7). La estimación de la parasitemia se realiza a través de la gota gruesa y la determinación de la especie infectante podría ser realizada por un experto, ya que esta no es la técnica más adecuada para ello.

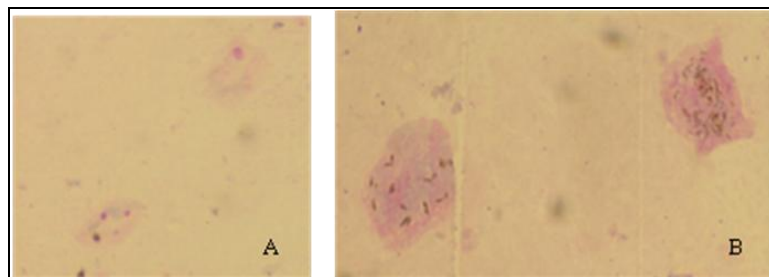


Figura 7: Gota gruesa teñida con Giemsa. A: forma trofozoita. B: forma esquizonte.

En el frotis sanguíneos los eritrocitos se fijan en una monocapa, por lo que la identificación morfológica de los parásitos a nivel de especie es mucho más sencilla y proporciona más especificidad que la exanimación por gota gruesa. Mediante el frotis sanguíneo se puede observar las características morfológicas típicas de cada especie de *Plasmodium*, los trofozoitos jóvenes con forma de anillo, trofozoitos maduros, esquizontes con merozoitos en su interior, macro y microgametocitos etcétera (Figura 8).

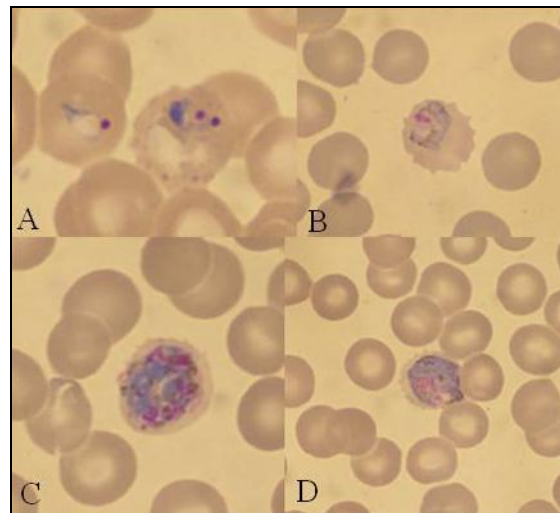


Figura 8: Diferencias morfológicas de *Plasmodium* en un frotis sanguíneo. A y B: trofozoito, C: esquizonte y D: gametocito.

Saber la especie de *Plasmodium* que está causando la enfermedad es importante para establecer el tratamiento y el pronóstico del individuo en particular (Warhurst y Williams 1996).

El diagnóstico por microscopía tiene algunas limitaciones, como el tiempo empleado y la pérdida de muestras positivas. Esta última limitación es común si el microscopista no tiene suficiente experiencia y/o cuando la parasitemia es baja (Kain *et al.* 1998). Aunque la gota gruesa es más sensible que el frotis sanguíneo, leer durante 10 minutos un frotis sanguíneo equivale a 3 minutos de lectura de la gota gruesa (Dowling y Shute 1966), pero estos métodos de diagnóstico subestiman la densidad parasitaria (Greenwood y Armstrong 1991). Además, pacientes con *P. falciparum* podrían tener parásitos secuestrados en los capilares del hígado, bazo, o médula ósea y los organismos no serían vistos en sangre periférica capilar ni venosa. Por lo tanto, una infección por *P. falciparum* podría perderse debido a que no hay suficiente número de parásitos para poder ser detectados (Srinivasan *et al.* 2000).

A pesar de lo anteriormente dicho, el examen por microscopía de las muestras de sangre permanece como el método estándar de diagnóstico de la malaria, porque puede detectar todas las especies de *Plasmodium* y permite saber

en qué etapa del ciclo biológico se encuentra, lo cual es esencial para tomar decisiones terapéuticas.

1.4.1.2. Microscopia de fluorescencia

Para mejorar la detección del *Plasmodium* en sangre se han desarrollado métodos alternativos. Ciertos colorantes fluorescentes tienen afinidad por los ácidos nucleicos del núcleo del parásito. Cuando son excitados por la luz UV, a una apropiada longitud de onda, el núcleo emitirá fluorescencia de forma intensa. Existen dos fluorocromos que se han usado con este propósito, naranja de acridina (AO) (figura 9) y benzotiocarboxy purina (BCP), los cuales se excitan a 490 nm y producen fluorescencia de color verde manzana y amarillo respectivamente. La rodamina-123 es útil para asegurar el estado viable del parásito, ya que la absorción se produce cuando la membrana del parásito está intacta (Gay *et al.* 1996).

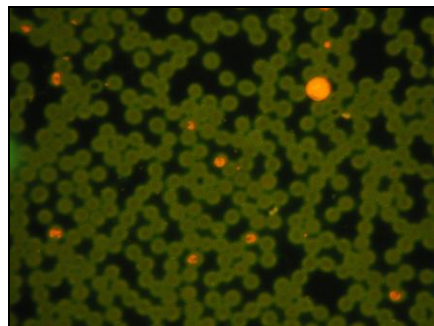


Figura 9: *Plasmodium* sp teñido con naranja de acridamida. El parásito se observa como pequeñas estructuras de color naranja dentro de los glóbulos rojo que se ven de color verde. Las células blancas también se tiñen de naranja.

El método cuantitativo *buffy coat* en tubos capilares (QBC®) combina tubos de capilares cubiertos con AO, que mediante centrifugación permiten la separación en dos capas, una formada por las células blancas y las plaquetas y otra capa donde se encuentran los glóbulos rojos (Levine *et al.* 1989). Los parásitos se van a localizar por encima de la capa de los glóbulos rojos, pero a veces aparecen en las capas de las células blancas y las plaquetas (figura 10). Los

parásitos pueden verse en el tubo capilar a través de un microscopio de fluorescencia usando un objetivo confocal (Gaye *et al.* 1999).

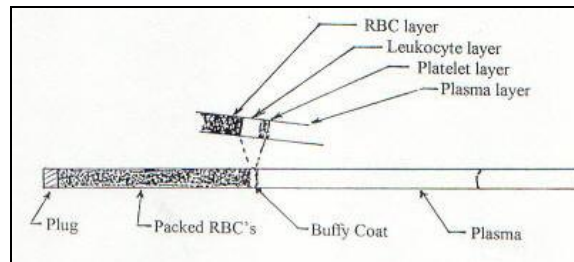


Figura 10: Capas formadas mediante el método cuantitativo *buffy coat*.

El método de fluorescencia QBC es el que demanda más tecnología y requiere, por un lado un equipamiento especializado para separar en capas las distintas células y por otro lado necesita un buen microscopio de fluorescencia con vapor de mercurio de alta intensidad y lámpara halógena de cuarzo, para producir la excitación de la luz de longitud de onda necesaria. Los ensayos clínicos usando técnicas AO se han realizado en condiciones de laboratorio y de campo (Benito *et al.* 1994 y Lowe *et al.* 1996).

Aunque AO es una tinción de fluorescencia muy intensa, no es específica ya que tiñe los ácidos nucleicos de todos los tipos de células. Por consiguiente, el microscopista que use AO debe aprender a distinguir parásitos teñidos con fluorescencia de otras células y restos celulares que contengan ácidos nucleicos (Delacollett y Van der Stuyft 1994). La sensibilidad de la tinción con AO para detectar *Plasmodium* con niveles de parasitemia menores a 100 parásitos/ μ L es del rango de 41 al 93% (Wongsrichanalai *et al.* 1991). La especificidad para infecciones con *P. falciparum* es mayor del 93%, teniendo gran capacidad para reconocer la forma de anillo. El diagnóstico de las otras especies de *Plasmodium* podría perderse especialmente en la fase temprana del ciclo asexual bajando la especificidad para estas especies hasta el 52% (Gaye *et al.* 1999).

Una alternativa al fluorocromo es usar una solución con benzotiocarboxy purina (BCP). El BCP puede ser aplicado directamente a la solución de sangre lisada o a una gota gruesa, tiñendo intensamente los ácidos nucleicos de *P. falciparum* viables (Cooke *et al.* 1993). Las células rojas y los núcleos de los

leucocitos se tiñen débilmente. Este método supera alguno de los problemas inherentes a los sistemas que emplean fluorescencia, como la necesidad de un examen rápido para la disminución o la precipitación del colorante. El BCP puede ser un método rápido y sensible comparándolo con la tinción de Giemsa, con una sensibilidad y especificidad mayor de 95% para *P. falciparum* (Cooke *et al.* 1992).

Con experiencia, los técnicos de laboratorio que usen métodos de diagnóstico con fluorescencia son capaces de detectar parásitos de forma rápida y con precisión. Pero las limitaciones que poseen estos métodos son la incapacidad para diferenciar las especies de *Plasmodium* y la necesidad de equipamientos caros que no son viables en algunas áreas del mundo (Makler *et al.* 1992).

1.4.1.3. Diagnóstico Molecular

Para la detección específica de secuencia de ácidos nucleicos se emplea la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). El éxito de la técnica de la PCR depende de varios factores, como la calidad del ADN obtenido desde muestras de sangre, reactivos bien seleccionados y adecuadas condiciones de amplificación (Scopel *et al.* 2004)^b.

Debido a que la calidad del ADN es uno de los factores que influyen en la PCR, el empleo de la sangre seca en papel de filtro es un método factible para el traslado de las muestras de sangre, ya que no está sujeto a parámetros que influyen en su calidad. La temperatura es también factor importante en la conservación de las muestras. En zonas endémicas de malaria, la ausencia de fluido eléctrico condiciona de forma clara la cadena de frío.

Las muestras en papel de filtro han sido usadas como fuente de ADN en estudios moleculares y epidemiológicos (Singh *et al.* 1996). Este método tiene más aceptación que las extracciones convencionales de sangre, ya que se facilita su conservación por largos períodos de tiempo (Kimura *et al.* 1995). Sin embargo, parámetros como el calor y la humedad pueden afectar a los resultados de la prueba.

Dentro de los factores que influyen en el éxito de la técnica de PCR se encuentran los diferentes cebadores, las condiciones de amplificación y el análisis de los productos de la amplificación (Warhurst y Williams 1996).

La gran ventaja de usar la técnica de PCR es la capacidad que posee para detectar *Plasmodium* en pacientes con bajos niveles de parasitemia, el identificar la malaria a nivel de especies y la detección de infecciones mixtas (Scopel *et al.* 2004)^a. La PCR es efectiva empleando pocos μL de sangre y con la presencia de 5 ó menos parásitos por μL (Moody 2002), y en función de los cebadores empleados se puede llegar al 100% de sensibilidad y especificidad (Snounou *et al.* 1993^b y Kawamoto *et al.* 1996). Cada reacción de PCR amplifica ADN del parásito desde 50 μL de sangre, un volumen mayor que el examinado por microscopía que no supera los 2 μL (Andrews *et al.* 2005).

La alta sensibilidad que presenta la PCR permite detectar ADN de parásitos inviables en sangre después del tratamiento. Kain *et al.* en 1994, investigaron la desaparición de *P. falciparum* durante el tratamiento y encontraron que la PCR permanece positiva una media de 144 horas después de su finalización, comparado con las 66 horas de la microscopía. También demostraron, que si la PCR permanece positiva de 5 a 8 días después del tratamiento, esto debía interpretarse como un fracaso de la terapia probablemente debido a resistencia a los medicamentos.

Existen varios métodos moleculares basados en la amplificación del ADN para diagnosticar la malaria, pero por ahora, sólo uno de ellos es capaz de identificar la especie de forma simultánea (Snounou *et al.* 1993^b). El laboratorio de malaria del Centro Nacional de Medicina Tropical y Salud Internacional en España emplea dicha técnica, la cual consiste en una *semi-nested multiplex malaria PCR* (SnM-PCR), empleando dos PCR capaces de detectar y diferenciar entre las cuatro especies de malaria en muestras de sangre (Rubio *et al.* 1999)^b. La SnM-PCR amplifica con cebadores específicos del gen 18S de la subunidad pequeña ribosomal que van a codificar ARN ribosomal (Kawamoto *et al.* 1996). Esta PCR es una *seminested multiplex PCR* que emplea una simple reacción para la segunda amplificación con una mezcla de cuatro cebadores específicos para

cada especie de *Plasmodium* y un cebador universal de *Plasmodium*. Es una buena herramienta para determinar infecciones mixtas (figura 11), que son pasadas por alto en los métodos convencionales (Rubio *et al.* 1999)^a.



Figura 11: Detección de *Plasmodium* mediante SnM-PCR (F: *P. falciparum*, V: *P. vivax*, O: *P. ovale*, M: *P. malariae*).

Los diagnósticos realizados por PCR requieren la realización de geles de agarosa para la visualización y análisis de los diferentes productos de la PCR, y además es una técnica incapaz de cuantificar la parasitemia en las muestras estudiadas (Perandin *et al.* 2004). Para resolver estos problemas se ha desarrollado la llamada PCR a tiempo real, que emplea marcadores fluorescentes para monitorizar continuamente la formación del amplificado en toda la reacción. Esta ha sido adaptada para detectar las cuatro especies de malaria que afectan al ser humano y analizar un gran número de muestras (Lee *et al.* 2002). La PCR a tiempo real se ha revelado como un sistema automatizado, cuantitativo, y cerrado que reduce el riesgo de contaminación inherente a la SnM-PCR (Hermsen *et al.* 2001 y Shokoples *et al.* 2009).

Aunque la PCR a tiempo real tiene buena sensibilidad y especificidad, en sus comienzos presentó algunas limitaciones que impidieron la plena aplicación en laboratorios de diagnóstico. Elsayed *et al.* 2006 y Farcas *et al.* 2004 desarrollaron la capacidad de identificar *P. falciparum*, pero no eran capaces de distinguir el resto de las especies de malaria. Esta limitación fue solventada por Rougemont *et al.* en 2004 al desarrollar una PCR a tiempo real cuantitativa (qPCR) más sensible y específica para la detección de infecciones simples, donde incorpora cebadores conservados y sondas específicas de especies. Este es un

ensayo que ha sido validado para las cuatro especies de *Plasmodium* teniendo limitación en la baja sensibilidad a infecciones mixtas. Esta baja sensibilidad es atribuida a la competición de los cebadores por múltiples copias en las muestras (Bialasiewicz *et al.* 2007 y McNabb *et al.* 2008).

Shokoples *et al.* en 2009, modificaron el método de Rougemont, introduciendo cebadores *forwards* específicos de especies en combinación con un cebador *reverse* y sondas *multiplexed* específicas de especies en una simple reacción. Cnops *et al.* en 2010, desarrollaron una nueva qPCR basada en la descrita por Rougemont, donde incrementaron la sensibilidad de la técnica y disminuyeron el límite de detección para las cuatro especies detectando más infecciones mixtas.

Las infecciones mixtas son del 3 al 5% de las infecciones observadas de malaria en áreas donde la enfermedad no es endémica. Esto presenta un reto para los microscopistas y representa un aspecto del diagnóstico de la malaria donde los métodos moleculares pueden apoyar a la microscopía convencional (Morassin *et al.* 2002).

La principal ventaja de la qPCR con respecto a la SnM-PCR es que la qPCR es menos laboriosa porque sólo es necesario un paso, comparado a las dos PCR que se requieren para realizar la SnM-PCR. Por otro lado no se realizan procedimiento post-PCR, como electroforesis en gel de agarosa, con lo que se evitan posibles contaminaciones. Por último, los resultados se pueden obtener en 2 horas, comparado a un mínimo de 8 horas en la SnM-PCR. La PCR a tiempo real ofrece una buena alternativa aceptable clínicamente para un diagnóstico rápido y certero de pacientes que presentan síntomas de infección por *Plasmodium* (Perandin *et al.* 2004).

1.4.1.4. Detección de proteínas y enzimas de *Plasmodium* en sangre

En los últimos años se han desarrollado kits para la detección específica de proteínas del *Plasmodium*, empleándose como una técnica auxiliar del diagnóstico microscópico (Kano 2006).

En la actualidad son tres los antígenos que se emplean en los test de diagnóstico rápido (RDT). La HRP-2, la pLDH y la aldolasa de *Plasmodium* sp.

La HRP-2 es una proteína rica en histidina, que es soluble y está producida por las etapas asexuales y los gametocitos jóvenes de *P. falciparum* (Rock *et al.* 1987). Se expresa en la superficie de la membrana de los glóbulos rojos y como su expresión es muy abundante en *P. falciparum*, fue el primer antígeno empleado en la detección del parásito. Hay evidencias que algunos individuos han eliminado el gen que expresa HRP-2, por lo que nunca darían positivos para este antígeno (Tjitra *et al.* 1999).

Los RDT Paracheck Pf® y Now Malaria ® se basan en la utilización de anticuerpos monoclonales para la detección de HRP-2 de *P. falciparum* (Shiff *et al.* 1994 y Beadle *et al.* 1994). Ambos test son rápidos y tienen una sensibilidad del 100% y una especificidad del 95%. Precisan de 5 y 15 µL de sangre respectivamente. El Paracheck Pf solo detecta *P. falciparum*, mientras que el Now Malaria detecta también otras especies. Los test se mantienen positivos durante meses después del tratamiento.

La pLDH es una enzima soluble que se encuentra en la vía de la glicólisis de *Plasmodium* y está expresada a altos niveles en las etapas sexuales y asexuales del parásito (Makler *et al.* 1998 y Piper *et al.* 1996). Existen diferentes isómeros de pLDH para cada una de las especies de *Plasmodium* que infectan al ser humano (Piper *et al.* 1999)^a. Un grupo de anticuerpos monoclonales que pueden unirse a activos de pLDH fue desarrollado a partir de eritrocitos infectados con *P. falciparum*. OptiMAL, emplea 3 de estos anticuerpos monoclonales para test de inmunocromatografía como un RDT. Dos de los anticuerpos son específicos y reconocen a las cuatro especie de *Plasmodium*, el tercer anticuerpo reconoce sólo a *P. falciparum*. Los anticuerpos monoclonales empleados en el test de OptiMAL han sido exhaustivamente testados para posibles reacciones cruzada con LDH de otros protozoos sanguíneos como la *Leishmania*, *Babesia* y bacterias patógenas u hongos, sin encontrarse tales reacciones (Makler *et al.* 1993). Palmer *et al.* en 1998 compararon los resultados obtenidos con el test de OptiMAL con los obtenidos en gota gruesa con tinciones de Giemsa de las mismas muestras.

Obtuvieron de 202 muestras analizadas, 96 (48%) positivas para microscopía y 91 (45%) positivas para el test OptiMAL. Las muestras positivas para microscopía y negativas para el test muestran una parasitemia de menos de 100 parásitos/ μ L de sangre, por lo que es menos sensible que la microscopía.

Basándose en la especificidad y sensibilidad de los test que emplean HRP-2 y pLDH, Jelinek *et al.* (1999) concluyeron que los test tienen el potencial de aumentar la especificidad del diagnóstico de *P. falciparum* en los laboratorios no especializados en el diagnóstico de la malaria.

Muchas otras enzimas de *Plasmodium*, en particular aldolasas, han sido sugeridas como antígenos en RDT para el resto de las especies de *Plasmodium* (Meier *et al.* 1992). Anticuerpos monoclonales producidos contra la aldolasas de *Plasmodium* son específicos en su reacción y se han usado en combinación con los test que emplean HRP-2 para detectar *P. vivax* así como *P. falciparum* en la sangre. Tjitra *et al.* en 1999, evaluaron la combinación de los test de inmunocromatografía *Pf/Pv* (ICT *Pf/Pv*) con formato de captura de bandas de HRP-2 y aldolasas. La sensibilidad obtenida para parasitemias de más de 500 parásitos/ μ L fue del 96%, pero para valores por debajo de este nivel fue solo del 29%. Una de las aplicaciones que se le ha atribuido a la prueba ICT *Pf/Pv* es la detección de antígenos del parásito cuando hay un secuestro del mismo, lo cual dificulta su diagnóstico en sangre periférica; por ejemplo, en el caso de secuestro de parásitos en la placenta de mujeres embarazadas (Pabon *et al.* 2007).

Entre las desventajas de la prueba ICT *Pf/Pv* está la incapacidad para identificar infecciones mixtas y diagnosticar paludismo por especies. Tampoco puede ser utilizada para el seguimiento de la respuesta al tratamiento, debido a que sigue siendo positiva por la persistencia de los antígenos en la sangre, aun después de la desaparición de los parásitos. Y por último, detecta reacciones cruzadas en procesos de autoinmunidad con otras técnicas como la detección del factor reumatoideo o ANA, (26%) (Iqbal *et al.* 2000). Por tanto, estos dos aspectos deben considerarse en la interpretación de resultados positivos con la prueba ICT *Pf/Pv*.

En otros casos se han empleado anticuerpos frente al antígeno lactato deshidrogenasa (Piper *et al.* 1999)^b. Algunos de estos test incorporan un segundo anticuerpo, el cual permite distinguir *P. falciparum* de las otras 3 especies por ser esta la más peligrosa.

La ventaja que ofrecen los RDT es la obtención del resultado en media hora y que pueden ser realizados por técnicos no expertos (Moody 2002). Los métodos RDT no tienen mayor sensibilidad que la microscopía. Su sensibilidad disminuye cuando la parasitemia cae por debajo de 100 parásitos/ μ L. Falsos positivos son observados particularmente después del tratamiento, ya que los antígenos de los parásitos detectados pueden permanecer en la circulación tras la eliminación del parásito (Mills *et al.* 1999).

1.4.2. Métodos Indirectos

Los métodos indirectos se basan en la detección de la respuesta inmune del paciente. Por un lado, se detectan los anticuerpos específicos desarrollados como consecuencia de la infección por *Plasmodium* y por otro lado se detectan proteínas y enzimas específicas excretadas por *Plasmodium* en la sangre.

1.4.2.1. Detección del título de anticuerpos mediante reacciones serológicas

Se han utilizado diversas reacciones para demostrar la presencia de anticuerpos entre las que se citan la fijación de complemento, hemaglutinación indirecta, inmunofluorescencia indirecta y procedimientos inmunoenzimáticos.

La fuente de obtención del material antigénico es proporcionada por los cultivos *in vitro*, fundamentalmente parásitos circulantes mantenidos en animales de experimentación y además, por parásitos de sangre de enfermos con altas parasitemias (LLop *et al.* 2001). Hay productos para inmunofluorescencia que incorporan antígenos de las cuatro especies, pero no permiten precisar la especie causal ni diferenciar entre infecciones pasadas y actuales (Prats 2006).

1.5. Manifestaciones Clínicas

La malaria es una causa común de fiebre en los países tropicales. Los primeros síntomas de la malaria son la sensación de malestar, dolor de cabeza, fatiga, molestias abdominales y dolor muscular que van seguidos de fiebre. Estos síntomas no son específicos de la malaria ya que son similares en muchas enfermedades víricas (Guerrant *et al.* 2006).

1.5.1. Malaria no complicada

La malaria no complicada es típica de las especies *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*. El inicio de los síntomas es gradual y durante los primeros días aparece un cuadro de cefaleas, malestar general y mialgias. A continuación aparece la fiebre que en ocasiones se acompaña de otros síntomas como dolor abdominal o tos.

Después de un tiempo variable, dependiendo de la especie de *Plasmodium* y del sistema inmune del hospedador en 1 a 3 semanas aparece el patrón clásico de fiebre paroxística periódica, que en las especies *P. vivax* y *P. ovale* es cada 48 horas, denominada fiebre terciana y en *P. malariae* es cada 72 horas, denominada cuartana. El paroxismo típico pasa por varias etapas, la primera es fría con escalofríos y tiritona, la segunda es caliente con fiebre alta (39-41°C) y la tercera es mojada con sudoración profunda.

La fiebre es el síntoma principal apareciendo en el 96-98% de los casos, seguido de escalofríos en el 76-81% de los casos y a continuación con cefaleas (67-73%), sudoración (60-67%), mialgias (32-39%), náuseas (24-30%), vómitos (23-30%), diarreas (14-18%), tos (10-16%) y dolor abdominal (10-14%).

En la exploración física el signo más frecuente es la aparición de esplenomegalia en el 23-29% de los casos, seguido de hepatomegalia (12-17%), palidez de mucosa (10-16%) e ictericia (6-9%).

1.5.2. Malaria complicada

La especie *P. falciparum* es la que con más frecuencia desarrolla malaria complicada, aunque también puede hacerlo *P. vivax*. Los factores que clásicamente se han asociado a una mayor gravedad y muerte son embarazo, enfermedades crónicas debilitantes, el no haber tomado quimiopprofilaxis y el retraso en el diagnóstico y tratamiento.

Los criterios de gravedad universalmente aplicados a propuesta de la OMS (2000) son los siguientes:

- Postración, alteración de consciencia, convulsiones repetidas y coma. Las alteraciones en el estado de la consciencia es un hecho muy frecuente y la aparición de convulsiones puede llegar hasta el 60-80% en los casos de malaria severa. La OMS califica la malaria como cerebral, sólo cuando el paciente se encuentra en coma profundo. En ausencia de tratamiento la malaria cerebral está asociada con una tasa de muerte entre el 20% en adultos y el 15% en niños (WHO 1990).

- Anemia severa: En áreas holoendémicas suele ser la complicación más frecuente en niños, en quienes alcanza una mortalidad del 6-18%. Se define como severa cuando el hematocrito es menor de 15% o la hemoglobina menor de 5gr/L.

- Fracaso renal: Es una complicación frecuente que suele ir acompañada de otras como acidosis, insuficiencia hepática o edema de pulmón. La gravedad es evidente cuando los niveles séricos de creatinina son mayores de 3 mg/dL. A veces el fracaso renal aparece en la fase de mejoría de la malaria y conlleva un mejor pronóstico.

- Distress respiratorio: Se debe a un aumento de permeabilidad vascular pulmonar. Se manifiesta inicialmente con hiperventilación, disnea y tos, pudiendo pasar desapercibido. Puede aparecer en cualquier momento del curso de la enfermedad.

- Hipoglucemia: Se debe al consumo metabólico excesivo de la glucosa circulante por el parásito y a la disminución de la glucogenolisis durante la

enfermedad. Se define como severa cuando los niveles de glucemia son menores de 40mg/dL.

- Shock: Se define cuando la tensión arterial sistólica es menor de 70mm de Hg. Es de origen multifactorial debido a la disminución de la osmolaridad, a la deshidratación o a las hemorragias gastrointestinales.

- Trastornos de la coagulación: La trombopenia es una manifestación frecuentísima de la enfermedad y se define al manifestarse un sangrado espontáneo, siendo el más frecuente del tubo digestivo.

- Acidosis metabólica severa: Se manifiesta con un aumento del lactato en sangre y en líquido cefalorraquídeo. Se define como grave cuando el pH es menos de 7,25.

- Parasitemia: Una parasitemia mayor del 4% es un factor de mal pronóstico, sobre todo si se asocia a la presencia de trofozoitos maduros o esquizontes o pigmento palúdico en los monocitos en el frotis de sangre periférica.

1.5.3. Diagnóstico diferencial

La presencia de fiebre mayor de 38°C, esplenomegalia y trombopenia en un paciente procedente de una zona palúdica nos sugiere el diagnóstico de malaria y más si se asocia a anemia y a una cifra de leucocitos normales o bajos. La trombopenia es el mejor indicador de malaria, pero puede confundirse con dengue, otra enfermedad manifestada mediante fiebre (López-Vélez 2002). Hay un síndrome denominado esplenomegalia malárica reactiva que es típica de personas adultas autóctonas de áreas endémica, pero también se ha descrito en expatriados (Puente *et al.* 2001).

1.6. Concepto Básico de Valores de referencia

Los conceptos que se definen a continuación son básicos para entender los estudios estadísticos que se utilizarán en el trabajo. Los valores de referencia son un conjunto de valores de una magnitud bioquímica determinada, definido en su

totalidad y obtenidos en un solo individuo o en un grupo de individuos que cumplen unos requisitos determinados. En el primero de los casos los valores de referencia reciben el nombre de “individuales”, mientras que en el segundo se denominan “poblacionales”.

Desde el punto de vista diagnóstico los valores de referencia poblacionales no son los ideales pero son prácticamente los únicos que se usan debido a la relativa facilidad de su obtención.

Los conceptos fundamentales propios de los valores de referencia poblacionales son los siguientes (Queraltó *et al.* 1982):

- **Individuo de Referencia:** Es un individuo seleccionado con fines comparativos mediante unos criterios definidos.

- **Población de Referencia:** Es el conjunto de todos los posibles individuos de referencia.

- **Muestra de Referencia:** Es un subconjunto de la población de referencia constituido por un número adecuado de individuos para que sea representativo de dicha población.

- **Valor de Referencia poblacional:** Es el valor de una magnitud obtenido en un individuo perteneciente a la muestra de referencia.

- **Distribución de Referencia poblacional:** Es la distribución de probabilidad de los valores de referencia.

- **Límite de Referencia poblacional:** Es aquel valor de la distribución de referencia que excluye, con una probabilidad determinada, una fracción de dicha distribución, usualmente el 2,5% de individuos a cada uno de los lados de la distribución.

- **Intervalo de Referencia poblacional:** Es el intervalo de la distribución de referencia que queda comprendido entre los límites de referencia. Usualmente este intervalo contiene el 95% central de los valores de referencia.

El desarrollo de valores de referencia específicos es fundamental para el correcto desarrollo de la investigación clínica. Esto es especialmente crítico en los ensayos clínicos que se llevan a cabo en África para reducir la carga de

enfermedades como la malaria, la tuberculosis y el VIH en esta región del planeta (Zeh *et al.* 2011).

Los datos relativos a valores de referencia inmunológicos y hematológicos de poblaciones sanas de África son escasos, especialmente para lactantes, niños y adolescentes. Actualmente los valores empleados se basan en los resultados generados a partir de poblaciones de raza blanca que viven en los países industrializados (Karita *et al.* 2009), sin embargo se sabe que ocurren diferencias entre los valores normales de los africanos con los valores normales de los norteamericanos y europeos (Kibaya *et al.* 2008). En los estudios realizados en lactantes y niños en África, los investigadores han demostrado diferencias significativas en varios parámetros hematológicos, incluidos los valores de hemoglobina (Hb) y glóbulos blancos (WBC) (Adetifa *et al.* 2009).

Estudios previos en poblaciones de África del este y del sur demuestran que se produce una reducción de los valores de la hemoglobina, del hematocrito, del recuento de los glóbulos rojos, de las plaquetas, del volumen corpuscular medio y de los neutrófilos y que también se producen aumentos de los valores de los monocitos y eosinófilos (Badenhorst *et al.* 1995 y Lugada *et al.* 2004).

Además, existen diferencias en los valores hematológicos e inmunológicos entre los distintos grupos étnicos africanos, debido a que factores como la genética, los hábitos alimentarios, el sexo, la edad y los patógenos ambientales influyen en dichos valores (Choong *et al.* 1995, Tugume *et al.* 1995 y Ngowi *et al.* 2009).

Algunos autores han intentado establecer los valores hematológicos de referencia para algunas poblaciones etíopes, determinando que los niveles de hemoglobina y hematocritos son más altos que las de otros países subsaharianos debido al hecho, de que las poblaciones estudiadas viven en las zonas altas de Etiopía con altitudes mayores a los 2.000 m sobre el nivel del mar (Peter 1984 y Tsegaye *et al.* 1999).

Es esencial establecer y publicar valores de referencia de las poblaciones locales de África para mejorar la calidad en el cuidado de la salud y la investigación clínica (Humberg *et al.* 2011).

En la producción de los valores de referencia debería tenerse en cuenta los criterios de salud que caracterizan a los individuos de referencia, debido a que en base a ellos se constituirán los criterios de inclusión y exclusión en la muestra de referencia. Valores de referencia hematológicos e inmunológicos son importantes en la práctica clínica para la evaluación de la salud y la enfermedad, lo que acentúa la importancia de establecer adecuados valores en las poblaciones. Estos parámetros también son importantes para medir la progresión de las enfermedades, la respuesta al tratamiento y la evaluación de las reacciones adversas a la terapia (Buchanan *et al.* 2010).

1.7. Grupos especiales

1.7. 1. Mujeres embarazadas

Las embarazadas suponen un grupo de alto riesgo, ya que sufren más complicaciones en caso de infección por *Plasmodium*, tanto de la madre como el feto (Lindsay *et al.* 2000).

Las mujeres embarazadas de áreas con mucha prevalencia de *P. falciparum* y *P. vivax*, están asociadas a tener niños con bajo peso al nacer y como consecuencia aumenta la mortalidad del neonato. Por lo general, mujeres embarazadas infectadas en áreas estables de transmisión, permanecen asintomáticas a pesar de la gran acumulación de eritrocitos parasitados en la microcirculación de la placenta. En áreas con inestable transmisión, las mujeres embarazadas son propensas a adquirir infecciones severas y son particularmente vulnerables a desarrollar malaria severa con alta densidad de parasitemia, anemia, hipoglucemia y edema agudo de pulmón.

En el feto puede producirse distress fetal, partos prematuros, muerte fetal o bajo peso al nacer. Las infecciones congénitas ocurren en menos de un 5% de los recién nacidos, cuyas madres están infectadas y está directamente relacionada con la densidad parasitaria de la sangre de la madre y la placenta.

La malaria infantil, que suele ser muy grave, no suele aparecer antes de los 6 meses de vida por la presencia de hemoglobina fetal y la protección adquirida.

1.7.2. Niños

La malaria ocasiona una de cada cinco muertes infantiles en África. Todas las manifestaciones clínicas de la malaria, como la anemia, problemas de bajo peso al nacer y problemas neurológicas, ponen en peligro la salud y el desarrollo de millones de niños en zonas tropicales y subtropicales del planeta. Más del 40% de los niños viven en países endémicos de malaria. Cada año, más del 75% de muertes debidas a la malaria ocurren en niños africanos menores de 5 años infectados con *P. falciparum* (Snow *et al.* 1999).

En las infecciones por *P. falciparum*, las manifestaciones clínicas son bastante irregulares. La fiebre es casi continua y en algunos casos existen vómitos, ictericia y diarrea. La anemia aparece pronto y existe una parasitemia marcada. Son más susceptibles a las complicaciones severas, como la forma cerebral con delirio, convulsiones y estado comatoso. La mortalidad de la malaria cerebral en los niños puede variar entre 10 y 40 %. La mayoría de los que sobreviven no presentan secuelas neurológicas.

Los niños que nacen y viven en zonas endémicas están sometidos a infecciones constantes desde su nacimiento (Gupta *et al.* 1999). En zonas de alta transmisión de la malaria los niños menores de 5 años tienen una carga de morbilidad muy alta (Kitua *et al.* 1996), que les permite desarrollar un estado de semi-inmunidad. En estas zonas los adultos y adolescentes son capaces de controlar la parasitemia y por lo tanto, rara vez sufren síntomas de malaria (Baird 1995). En áreas de baja transmisión de malaria, la inmunidad se desarrolla lentamente y la malaria afecta a todos los grupos de edad (Giha *et al.* 2000).

Los niños de inmigrantes que visitan sus países, están en situación de alto riesgo, sujetos a complicaciones que pueden producirse a cualquier edad (Huerga y Lopez-Velez 2002).

1.8. Tratamiento

En el año 1630 se descubrió que la corteza del árbol de la quina del Perú podría tratar la malaria. Dicha corteza fue importada a Europa y llegó a ser ampliamente utilizada en el tratamiento (Rocco 2003). En 1820, Pelletier y Caventou en Francia determinaron que la quinina era el componente activo de la corteza. Morton y Sydenham en Inglaterra y Torti en Italia distinguieron entre las fiebres que respondían a la corteza y las que no lo hicieron (Gilles 2002).

El tratamiento de la malaria ha cambiado en las últimas 2 décadas en respuesta a la disminución de la sensibilidad a las drogas por el *P. falciparum* y al resurgimiento de la enfermedad en áreas tropicales. La estrategia del tratamiento consiste en la combinación de fármacos potentes y rápidos con otros de vida media larga o sinérgicos. En la actualidad son muchas las combinaciones empleadas.

1.8.1. Mecanismos de acción

La actividad antipalúdica de cada uno de los fármacos no es del todo conocida, pudiendo actuar a varios niveles de forma simultánea. Según Schlesinger *et al.* en 1988, los fármacos antipalúdicos los podemos clasificar en:

- **Esquizonticidas hemáticos:** Actúan durante la fase de digestión de la hemoglobina intraeritrocitaria. Pertenecen a este grupo la cloroquina, amodiaquina, quinina, mefloquina, halofantrina, lumefantrina y artemisininas. Actúan a nivel del parásito intraeritrocitario, uniéndose a la hemina y evitando la transformación de ésta a hemozoína, que es un pigmento atóxico para el parásito, generándose radicales libres procedentes del hierro de la hemina que terminarán dañando el sistema enzimático y la membrana del lisosoma parasitario.

- **Antifolatos:** Pertenecen a este grupo la sulfadoxina, sulfametoxazol, pirimetamina, trimetoprim, proguanil y clorproguanil. Alteran la vía de síntesis del tetrahidrofolato, que es esencial para la síntesis del ADN. Son activos frente a todas las fases de crecimiento parasitario, en los esquizontes pre-eritrocíticos en

el hígado, en los esquizontes eritrocíticos y en los ooquistes del mosquito al ser ingerido el fármaco circulante en la sangre del hombre con la picadura.

- **Antimitocondriales:** Pertenecen a este grupo atovacuona, proguanil, tetraciclinas, doxiciclina, azitromicina y clindamicina. El mecanismo de acción específico de la atovacuona es la mitocondria de los protozoos apicomplejos, inhibiendo la función de esta organela. Se usa en combinación con proguanil, con quien muestra un efecto sinérgico potente en casos de malaria resistente a cloroquina y a antifenoles. También tiene efectos de profilaxis causal y esporontizada, presentando poca actividad frente a los hipnozoítos hepáticos ya instaurados de *P. vivax* y a los gametocitos maduros de *P. falciparum*.

Las tetraciclinas poseen una marcada pero lenta actividad antipalúdica, muy probablemente debido a la inhibición de la síntesis proteica en los ribosomas de tipo bacteriano de la mitocondria.

- **8-Aminoquinolinas:** Pertenecen a este grupo primaquina y etaquina. Interfieren con el proceso general de óxido/reducción y dañan colateralmente la mitocondria. Actúan en las fases preeritrocíticas del hígado. Son las únicas drogas capaces de eliminar los hipnozoítos, de eliminar los gametocitos maduros de *P. falciparum* y tienen leve o moderada actividad contra los esquizontes eritrocíticos.

Muchos medicamentos antibacterianos también tienen actividad antimalárica, aunque en general su rango de acción es bajo y sólo son usados en combinación con un medicamento antimalárico. Los antibacterianos empleados son las sulfonamidas, tetraciclinas, lincosamides, macrólidos y cloranfenicol.

La OMS recomienda las siguientes combinaciones terapéuticas:

Cloroquina con sulfadoxine o pirimetamine, amodiaquine con sulfadoxine o pirimetamine, quinina con antibiótico, artesunato con mefloquina, artesunate con atovacuona y proguanil y artesunato con pirimetamine y sulfadoxina.

Las artemisininas son drogas de acción muy rápidas pero no terminan de erradicar la parasitación, lo que originan con frecuencia recrudescencia, aconsejándose su administración siempre en combinación con otro fármaco.

Muchos países han adoptado la combinación de medicamentos recomendados por la OMS como primera o segunda línea en el tratamiento contra la malaria.

1.9. Distribución Geográfica

El paludismo es endémico de África, gran parte del sur y sudeste Asiático, América central y norte de Sudamérica (Figura 12). Sin embargo, el riesgo de morbilidad y mortalidad asociados con la malaria varían espacial y temporalmente (Snow y Marsh 2002, WHO 2003).

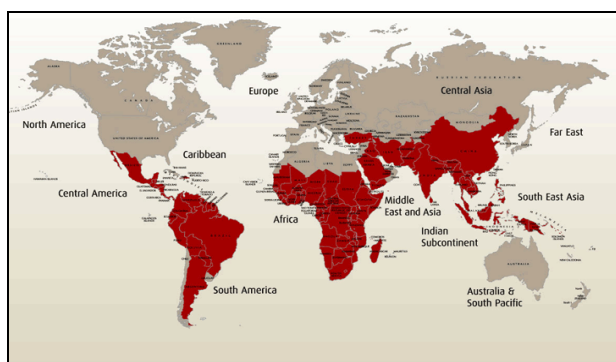


Figura 12: Distribución geográfica de la malaria. Fuente: <http://www.malariahotspots.co.uk>.

El rango de las zonas habitadas por los mosquitos vectores de la malaria, en la actualidad, se está expandiendo debido al cambio climático global (Patz y Olson 2006). Por lo tanto, el riesgo de resurgimiento de la malaria no sólo es como consecuencia del incremento del número de casos importados por los viajeros, sino también, como resultado del aumento del hábitad adecuado para los mosquitos vectores de la malaria. Consecuentemente, el diagnóstico rápido de la enfermedad es extremadamente importante (Yamamura *et al.* 2009). El riesgo de epidemia de paludismo está ligado inversamente a la duración de la transmisión del mismo, mientras más corto sea el periodo de transmisión mayor es el riesgo. En África, las áreas donde se encuentran los periodos más cortos de transmisión de la malaria, están localizadas en la franja Subsahariana hasta el cuerno del continente (África del este) y en el Sur de África (Worrall *et al.* 2004).

Los viajeros procedentes de zonas libres de malaria que acuden a zonas endémicas son especialmente vulnerables debido a la baja o nula inmunidad que presentan. Esto unido a que el diagnóstico al retornar a sus lugares de origen se suele hacer con retraso o de forma errónea, causa una mala combinación que puede desembocar en el desarrollo de la enfermedad.

1.9.1. La Malaria en Etiopía

La malaria en Etiopía es líder en la causa de morbilidad y mortalidad. Aproximadamente el 75% de la extensión de Etiopía es endémica para malaria, principalmente asociada a los periodos de lluvias y la altitud (figura 13) (Adhanom *et al.* 2006, Peterson *et al.* 2009).

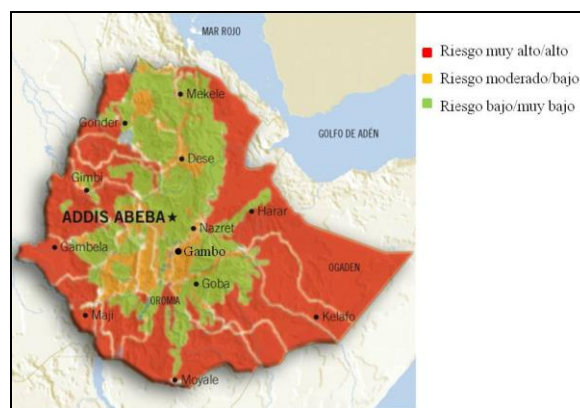


Figura 13: Riesgo de malaria en Etiopía. Fuente: Atlas geográfico de la malaria.

El sistema de salud del país reporta sobre los 5 millones de casos de malaria y miles de muertes en todos los grupos de edad (Ghebreyesus *et al.* 2006). La especie de *Plasmodium* más abundantes es *P. falciparum* con el 60% de los casos, seguida de *P. vivax* con el 40% de los casos (Tula AN 1993 y Abeku *et al.* 2003).

Las tasas de morbilidad y mortalidad aumentan dramáticamente durante los años de epidemias que se repiten en intervalos irregulares de 5 a 7 años (Kiszewski y Tekelehaimanot 2004, Negash *et al.* 2005). El pico de incidencia de la malaria es de uno o dos meses después de la estación de lluvia, entre julio y

septiembre (Ashton *et al.* 2011). Sin embargo, en muchas áreas del sur y del oeste del país tienen una estación de lluvia que empieza en abril o mayo, o no tienen estaciones de lluvia definidas (Graves *et al.* 2009 y Jima *et al.* 2010).

En Etiopía, el modelo epidemiológico de la transmisión de la malaria es generalmente inestable y estacional, variando el nivel de transmisión de un lugar a otro como consecuencia de las diferentes altitudes y precipitaciones del país. Se han observado cambios en la epidemiología de la malaria a través del tiempo. Hace años la transmisión de la malaria ocurría en áreas por debajo de los 2000 m de altitud, pero en la actualidad, se han documentado casos autóctonos de malaria en áreas por encima de los 2400 m (Weyessa *et al.* 2004).

La transmisión de la malaria de forma inestable, ocurre en muchas partes del país, particularmente en la franja de la alta montaña donde las condiciones climáticas son propicias para la transmisión (Gebremariam 1988 y Tekelehaimanot *et al.* 2004). Las epidemias de malaria que se producen en las altas montañas causan significativos índices de mortalidad tanto en niños (Hay *et al.* 2002), como en adultos (Fontaine *et al.* 1961). Esto se produce como consecuencia de la falta de exposición de forma regular a infecciones de malaria y a carecer inmunidad frente a la misma (Zhou *et al.* 2004).

1.9.2. Hospital Rural de Gambo (Etiopía)

El hospital rural de Gambo está situado en la región administrativa de Oromia (Etiopía), concretamente en la provincia de Arsi a 245 km al sudeste de la capital del país, Addis Abeba (figura 14). La provincia de Oromia se divide en Woredas (distritos), seguido de Kebeles (municipios) (Federal Democratic Republic of Ethiopia CSA 2007).

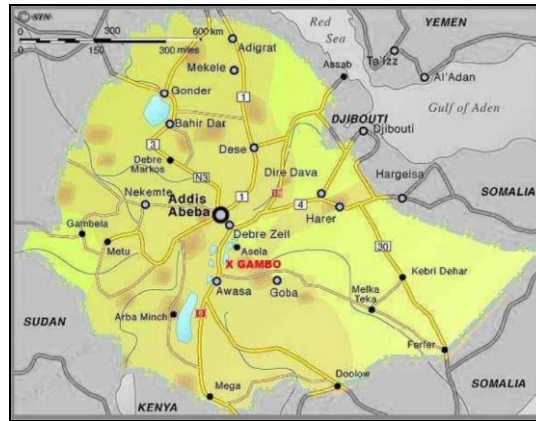


Figura 14: Localización de Gambo en el mapa de Etiopía.

La comarca, donde se encuentra ubicado el hospital, se localiza entre dos grandes lagos, al norte el Lago Shala y al sur el Lago Awasa. Al este se encuentra resguardada por los valles de la cordillera de los Montes de Ahmar en cuyas llanuras se ubica el Parque Natural de los Lagos del Valle del Rift. El hospital se localiza en el pueblo de Shashemane a unos 2250 m de altitud sobre el nivel del mar. Aunque la comarca donde se ubica Shashemane comprende una población de casi 100.000 habitantes censados, la cobertura sanitaria del hospital alcanza el millón de personas, ya que los pacientes vienen de áreas cercanas que se localizan a diferentes altitudes.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

En Etiopía la malaria es líder en la causa de morbilidad y mortalidad, donde aproximadamente, el 75% de la extensión de Etiopía es endémica para malaria. La transmisión de la malaria en muchas partes del país ocurre de forma inestable, particularmente en la franja de la alta montaña donde las condiciones climáticas son propicias para la transmisión. Las epidemias de malaria que se producen en las altas montañas, causan significativos índices de mortalidad tanto en niños como en adultos.

El estudio de la malaria en el Hospital Rural de Gambo (Etiopía) en cooperación con el Instituto de Salud Carlos III y el Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias va a permitir ampliar los conocimientos de malaria en esa zona y para ello los objetivos de la presente Tesis Doctoral se plantean de la siguiente manera:

1. Comparar la especificidad y sensibilidad de diferentes métodos de diagnóstico parasitológico, incluyendo técnicas moleculares.
2. Elaborar protocolos de diagnóstico de malaria mediante PCR a tiempo real.
3. Determinar valores de referencia de la hemoglobina en la población de la zona de Gambo (Etiopía) libre de malaria e infectada con malaria.
4. Determinar el grado de asociación entre la malaria y la anemia en la zona de estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ceba bacteriana

- *Escherichia coli*, cepa XL2-Blue MRF (Stratagene) genotipo: *mcr* A-183, (*mcr* CB-, *mrr*-, *hsd* SMR-) 173, *end* AI, *sup* E44, *thi*-1, *rec* A1, *gyr* A96, *rel* A1, *lac* (F' *pro* AB, *lacIq* ZΔM15, Tn 10, *Amyr*, *Camr*). Empleada para el mantenimiento de los plásmidos de clonaje.

3.2. Medios de cultivo de cepas bacterianas

- Medio SOC: Triptona 2% (p/v), Extracto de levadura 0.5% (p/v), NaCl 0,05% (p/v) y KCl 250 mM. Se autoclava 20 minutos a 120°C. Tras el autoclavado se le añade MgCl 2M y glucosa 1M. Debido a que los dos últimos componentes no pueden ser autoclavados por su sensibilidad al calor, el medio se esteriliza a través de filtros de 0,22 μm. Finalmente se ajusta el pH a 7 con NaOH 5N.

- Medio LB (Luria-Bertani) líquido: Triptona 1% (p/v), Extracto de levadura 0.5% (p/v) y NaCl 1% (p/v). Este medio se emplea para el crecimiento de las cepas de *E. coli* XL2-Blue (Stratagene). Para el cultivo en placas de estas cepas, se emplea medio LB-agar que se obtiene añadiendo agar al 2% al medio LB líquido.

3.2.1. Condiciones para el cultivo de *Escherichia coli*

La cepa de *E. coli* se cultivan en medio LB a 37°C durante 12-16 horas en agitación moderada, empleando matraces Erlenmeyer. Los cultivos se obtienen a partir de colonias aisladas de placas o bien de cultivos criopreservados en glicerol al 30%. La selección de clones resistentes al antibiótico se realiza añadiendo Ampicilina a una concentración final de 100 μg/mL para todas las cepas de *E.*

coli empleadas. Para mantener las cepas viables durante largos períodos de tiempo se conservan a -80°C en glicerol al 30% (v/v).

3.3. Recolección de las muestras de sangre

Las muestras de sangre fueron recolectadas de los pacientes que eran sometidos a estudios hematológicos y parasitológicos en el laboratorio de análisis clínico del hospital rural de Gambo (Etiopía).

La sangre era recolectada mediante extracción venosa o mediante extracción capilar. Para el paludismo se practica la extracción de sangre capilar pinchando ligeramente la yema del tercer dedo, durante la subida de fiebre, debido a que se encuentran las parasitemias más importantes.

La sangre recolectada fue empleada para el análisis de la hemoglobina, la realización de gota gruesa y frotis sanguíneos para su posterior observación al microscopio como se explica en el apartado 3.3.2. También se depositó una pequeña cantidad de sangre sobre papel de filtro para su conservación y posterior análisis por biología molecular como se indica en el apartado 3.3.3.

3.3.1. Análisis de la Hemoglobina

La hemoglobina era analizada en el equipo *Hemo-Control EKF Diagnostic*. El sistema Hemo-Control consiste en un fotómetro de mano y micro cubetas, mediante reactivos de química seca. Se absorbe 10 µL de sangre en la micro cubeta y la cubeta se inserta en el fotómetro. El color que resulta de la reacción química dentro de la cubeta se mide de forma automática y se obtiene el valor de la hemoglobina de la muestra analizada. En cada encendido el Hemo-Control realiza un auto-control de calidad de forma automática y además se dispone de cubetas control con medidas conocidas de hemoglobina.

3.3.2. Gota gruesa y Frotis Sanguíneo

La gota gruesa es una técnica de concentración de parásitos para la búsqueda de paludismo en la sangre, mientras que el frotis sanguíneo es una

técnica que se emplea para la identificación de especies. El procedimiento de ambas técnicas consiste en depositar una pequeña gota de sangre en un portaobjeto, en el caso del frotis se fija con metanol y en ambos casos se tiñeron con Giemsa al 10% (Warhurst & Williams 1996). La preparación se deja secar al aire y se observa al microscopio con el objetivo de 100X y aceite de inmersión.

En la gota gruesa se observa un mínimo de 200 campos antes de proporcionar un resultado negativo para *Plasmodium*. Las gotas gruesas positivas para malaria fueron cuantificadas, cuyo procedimiento consistía en contar el número de parásitos sobre 200 leucocitos observados. La conversión del número de parásitos en parásitos/ μ L se realizó asumiendo un valor estándar de 8000 leucocitos/ μ L de sangre (Prybylski *et al.* 1999). Rutinariamente las gotas gruesas eran leídas 2 veces, si se observaba discordancia la muestra era leída una tercera vez (Rosanas-Urgell *et al.* 2010). Se determinaron tres categorías de parasitemias, baja con densidad menor de 1000 parásitos/ μ L, intermedia con densidad entre 1000-2999 parásitos/ μ L y alta con densidad mayor de 3000 parásitos/ μ L (Agan *et al.* 2010).

3.3.3. Muestra de sangre en papel de filtro

Para biología molecular se recolecta la sangre en papel de filtro, siendo recomendable el Whatman[®] 3MM, poniendo sobre el mismo gotas de sangre extraída del dedo, colocándola en forma de manchas circulares de 1 cm de diámetro, tomando dos muestras por individuo. Dichas manchas se secan a la temperatura del laboratorio (20-25°C) por espacio de 2 horas y se conservan en sobres individuales a -20°C o a temperatura ambiente hasta la realización de la prueba. Para realizar la prueba se utiliza un disco de 5 mm de diámetro del centro de la mancha.

3.4. Aislamiento de ADN genómico

Para obtener ADN genómico de manchas de sangre seca con un elevado grado de pureza se utiliza el *kit* comercial *SpeedTools Tissue DNA Extration*

(Biotools). El procedimiento, siguiendo las indicaciones del fabricante, consiste en ocho pasos:

1. Preparación de la muestra. Se corta una o dos manchas de sangre de un área de 2-5 mm de diámetro. Se divide la muestra en pequeños trozos y se introducen en tubos de centrífuga de 1,5 mL.
2. Pre-lisis. Se añade al tubo con la muestra, 180 μ L del Buffer BT1 y se mezcla con el vortex. Se incuba en un baño o bloque calentador a 94°C durante 10 minutos. Se deja enfriar la muestra y se añade 25 μ L de Proteinasa K. Se mezcla con el vortex y se incuba a 56°C durante 1 hora. Se debe asegurar que la muestra está cubierta con la solución de lisis. Ocasionalmente se mezcla mediante vortex durante el periodo de incubación.
3. Lisis. Se añade 200 μ L del Buffer BB3, se mezcla mediante vortex de forma vigorosa y se incuba a 56°C durante 10 minutos.
4. Establecimiento de las condiciones para la unión del ADN a la Columna. Se añade 210 μ L de etanol (96-100%) al lisado y se mezcla bien usando el vortex. El lisado adquiere un aspecto filamentoso que no interferirá en el proceso de purificación.
5. Unión del ADN. Por cada muestra se utiliza una columna. Se coloca la columna en un tubo de centrífuga de 2 mL y se carga el lisado. Se centrifuga 1 minuto a 11000 x g y se descarta el tubo con el filtrado. Si la muestra no pasa en su totalidad por la columna, se repite el paso de centrifugación.
6. Lavados de la Membrana de Sílica. Se realiza un primer lavado colocando la columna en un tubo de centrífuga de 2 mL y se añade 500 μ L del Buffer BBW. Se centrifuga 1 minuto a 11000 x g y se descarta el tubo con el filtrado. En el 2^a lavado se vuelve a colocar un nuevo tubo colector y se añade 600 μ L del Buffer BB5. Se centrifuga 1 minuto a 11000 x g y se descarta el tubo con el filtrado.

7. Secado de la membrana con Sílice. Este paso es para eliminar el etanol residual. Se coloca la columna en un tubo de 1,5 mL y se centrifuga 1 minuto a 11000 x g.
8. Elución de ADN Puro. Se transfiere la columna a un microtubo de 1,5 mL y se añade 50 µL de Buffer BBE precalentado a 70°C directamente en la membrana. Se incuba a temperatura ambiente durante 3 minutos y se centrifuga 1 minuto a 11000 x g. Se repite esta operación con el mismo volumen del Buffer BBE. El eluido contiene el ADN puro extraído de la muestra.

3.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

3.5.1. Nested-PCR

Las reacciones de amplificación por PCR se realizan en un termociclador *MyCycler™ thermal cycler* (Bio-Rad). Las condiciones de reacción se optimizan de acuerdo a lo descrito por Rubio *et. al.* 1999. El volumen final de la mezcla para la 1ª reacción es de 50 µl y en ella se incluye 2.5 U de la enzima Taq ADN polimerasa del sistema *KapaTaq® DNA polymerase* (KAPABIOSYSTEMS), 125 µM de cada cebador, tampón de reacción 1x (KAPABIOSYSTEMS) y una concentración de 200 µM de cada nucleótido (Roche). El volumen final de la mezcla para la 2ª reacción es de 25 µL y en ella se incluye 1,25 U de la enzima Taq ADN polimerasa del sistema *KapaTaq® DNA polymerase* (KAPABIOSYSTEMS), 125 µM de cada cebador, tampón de reacción 1x (KAPABIOSYSTEMS) y una concentración de 200 µM de cada nucleótido (Roche). La mezcla de la 2ª PCR se carga a 85°C.

La cantidad de ADN molde es de 2 µL. La mezcla de reacción para la 1ª reacción se somete a una desnaturalización de 7 minutos a 94°C, seguida de 40 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a la temperatura de hibridación del

cebador (62°C) y 1 minutos a 72°C y se finaliza con una elongación de 72°C durante 10 minutos. En la segunda reacción se realizan 35 ciclos de 20 segundos a 94°C, 20 segundos a la temperatura de hibridación del cebador (52°C) y 30 segundos a 72°C y se finaliza con una elongación de 72°C durante 10 minutos.

La temperatura de hibridación del cebador se calcula según la fórmula:

$$T_m (\text{°C}) = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T)$$

3.5.2. PCR a tiempo real

Las reacciones de amplificación por PCR a tiempo real se realizan en un termociclador *StepOne Real Time System* (Applied Biosystems). Se realizaron dos tipos de PCR a tiempo real, la descrita por Rosanas-Urgell *et al.* 2010 y la establecida en el kit comercial *Ingene PrimerDesign TMLtd.*

3.5.2.1. PCR a tiempo real (*Ingene PrimerDesign TMLtd*)

Las condiciones de reacción se optimizan de acuerdo a lo descrito por el kit comercial *Ingene PrimerDesign TMLtd.* La cuantificación de *P. falciparum* se realiza a través de la amplificación del gen *plasmepsin 4* y la cuantificación de *P. vivax* a través de la amplificación del gen *aspartic protease PM4*. El volumen final de la mezcla para la reacción es de 20 µl y en ella se incluye 10 µl de 2X *PrecisionTM Master Mix* (PrimerDesign), 1 µl de la mezcla de cebadores y sondas del patógeno, 1 µl de la mezcla de cebadores y sondas del control interno y 3 µl de agua destilada.

La cantidad de ADN molde es de 5 µl. La reacción se somete a una desnaturalización de 15 minutos a 37°C y de 10 minutos a 95°C, seguida de 50 ciclos de 10 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C.

3.5.2.2. PCR a tiempo real (Rosanas-Urgell *et al.* 2010)

Las condiciones de reacción se optimizan de acuerdo a lo descrito por Rosanas-Urgell *et al.* 2010. El volumen final de la mezcla para la reacción es de

25 µL y en ella se incluye 12,5 µL de *Master Mix* (PrimerDesign), 0,35 µL de los cebadores para *P. falciparum* (100 µM) y 0,35 µL de los cebadores para *P. vivax* (100 µM), 0,075 µL de la sonda para *P. falciparum* (100 µM) y 0,075 µL de la sonda para *P. vivax* (100 µM) y 6,65 µL de agua destilada.

La cantidad de ADN molde es de 5 µL. La mezcla de reacción se somete a una desnaturalización de 2 minutos a 50°C y de 10 minutos a 94°C seguida, de 45 ciclos de 15 segundos a 94°C y 1 minuto a 58°C.

3.5.3. PCR colonia

Para seleccionar el clon en el que el plásmido porta el inserto en posición correcta se realiza la PCR colonia. El volumen final de la mezcla para la reacción es de 20 µL y en ella se incluye 1 U de la enzima Taq ADN polimerasa del sistema *KapaTaq® DNA polymerase* (KAPABIOSYSTEMS), 10 µM de cada cebador, tampón de reacción 1x (KAPABIOSYSTEMS) y una concentración de 10 mM de cada nucleótido (Roche).

La cantidad de muestra es de 2 µL. La mezcla de reacción se somete a una desnaturalización de 2 minutos a 95°C seguida de 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a la temperatura de hibridación del cebador (54°C) y 30 segundos a 72°C y se finaliza con una elongación de 72°C durante 5 minutos.

3.5.4. Secuencia de cebadores empleados en las distintas PCR

- HUF (humano): 5'-GAGCCGCCTGGATACCGC-3'
- PLF (*Plasmodium* sp.): 5'-AGTGTGTATCAATCGAGTTTC-3'
- REV (*reverse*): 5'-GACGGTATCTGATCGTCTTC-3'
- New PLF *short*: 5'-CTATCAGCTTTTGATGTTAG-3'
- F-*short* (*P. falciparum*): 5'-GTTCCCCTAGAATAGTTACA-3'
- V-*short* (*P. vivax*): 5'-AAGGACTTCCAAGCC-3'
- O-*short* (*P. ovale*): 5'-AGGAATGCAAAGAACAG-3'
- M-*short* (*P. malariae*): 5'-TCCAATTGCCTTCTG-3'
- Fal-F (*P.falciparum-forward*): 5'-TATTGCTTTTGAGAGGTTTTGTTACTTTG-3'

- Fal-R (*P.falciparum*-reverse): 5'-ACCTCTGACATCTGAATACGAATGC-3'
- Fal-P (*P.falciparum*-sonda): 5'-ACGGGTAGTCATGATTGAGTT-3'
- Viv-F (*P.vivax*-forward): 5'-GCTTTGTAATTGGAATGATGGGAAT-3'
- Viv-R (*P.vivax*-reverse): 5'-ATGCGCACAAAGTCGATACGAAG-3'
- Viv-P (*P.vivax*-sonda): 5'-AGCAACGCTTCTAGCTTA-3'
- T7 (vector pGEM-T): 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
- SP6 (vector pGEM-T): 5'-ATTTAGGTGACACTATAGAA-3'

3.6. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa

La separación de los fragmentos de ADN de doble cadena se realiza en geles de agarosa al 1.5% en tampón TAE 1x. Las electroforesis se llevan a cabo en cubetas submarinas de desarrollo horizontal (Bio-Rad) bajo una diferencia de potencial de 5 V/cm. Las muestras se preparan en tampón de carga de alta densidad tipo III descrito por Sambrook *et. al.* 1989.

Para la visualización del ADN se añade al gel de agarosa 0.2 µg/mL de bromuro de etidio y se le hace incidir luz ultravioleta de longitud de onda de 340 nm a través del *Chemi Doc* (Bio-Rad). El análisis del gel se realiza a través del *Quantity One analysis Software* (Bio-Rad).

Como marcadores de peso molecular se utilizan:

- Marcador de peso molecular 100 pb *DNA Ladder* (Promega). Los tamaños que presentan van de 100 en 100 desde los 1000 a los 100 pb.
- ADN del fago λ digerido con Hind III (Roche). Los fragmentos obtenidos tienen un tamaño de: 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 y 120 pb.

3.7. Elución del ADN obtenido por PCR

Para la purificación de fragmentos de ADN de tamaño específico obtenidos por PCR se separan las muestras mediante el *kit* comercial *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante que constan de los siguientes pasos:

1. Pesar eppendorf de 1.5ml vacío.

2. Cortar la banda de producto de PCR del gel y guardarla en eppendorf (a 4°C o -20°C hasta 1 semana).
3. Pesar nuevamente el eppendorf y añadir *Membrane Binding Solution* en una cantidad de 1 µL de solución por cada mg de gel de agarosa (máximo 350 mg agarosa).
4. Vortex e incubar a 50-65°C durante 10 minutos hasta que la agarosa se funda.
 - i) En caso de partir de productos de PCR amplificado se añade un volumen de *Membrane Binding Solution* igual a la cantidad de producto PCR (máximo 1 mL).
5. Transferir la mezcla a una minicolumna e incubar 1 minuto a temperatura ambiente.
6. Centrifugar a 14.000 rpm / 1 min y descartar el líquido del tubo colector.
7. Lavar la columna añadiendo 700 µl de *Membrane Wash Solution* a la columna.
8. Centrifugar a 14.000 rpm / 1 min.
9. Añadir 500 µl de *Membrane Wash Solution*.
10. Centrifugar a 14.000 rpm / 5 min.
11. Vaciar tubo colector y centrifugar 1 min con centrífuga sin tapa para evaporar etanol y transferir con cuidado la minicolumna a un eppendorf de 1.5 mL.
12. Añadir 15-50 µL de *Nuclease-free water* e incubar 1min.
13. Centrifugar a 14.000 rpm / 1 min y guardar ADN a 4°C o -20°C.

3.8. Ligación de fragmentos de ADN

La ligación se llevó a cabo con el vector pGEM®-T para clonar el producto de PCR. Este vector (3015 pb) se encuentra linealizado por medio de la enzima EcoRV y no se recirculariza por la presencia de timidina en ambos extremos 3'. La presencia de estos residuos, además de impedir la recircularización, favorece la inserción de los productos de amplificados que llevan en el extremo 3' adeninas incorporadas por alguna polimerasas

termoestables. El vector contiene los promotores T7 y SP6 de la ARN polimerasa flanqueando una región de clonamiento múltiple dentro de la región codificante α -peptido de la enzima β -galactosidasa.

Una vez listo el inserto y el vector, se realiza la ligación del fragmento en la región de policlonamiento del vector mediante enlaces fosfodiéster entre extremo 3'-OH y 5'-P de ADN adyacentes, catalizada por la ligasa de ADN del fago T4.

En las reacciones de ligación se emplea 1U de enzima en un volumen final de 10 μ l en el tampón de reacción suministrado por la casa comercial. La concentración de vector que se utiliza es de 50 ng, mientras que la del inserto se ajusta a una proporción molar de 1:1 y 3:1 (inserto:vector). La mezcla se incuba primero durante 2 horas a 16°C y luego toda la noche a 4°C. Trascurrido este tiempo, la mezcla de ligación se emplea para transformar células *E. coli* competentes.

3.9. Transformación de ADN en *E. coli*

3.9.1. Preparación de células *E. coli* competentes

Las cepas de *E. coli* que se utilizan en este trabajo para la transformación con ADN plasmídico son XL2-Blue. Para la preparación de las células competentes se inoculó una colonia bacteriana en 5 mL de medio de cultivo LB líquido. Tras 12 horas de incubación a 37°C, el cultivo se utilizó para inocularlo en 100 mL de medio LB líquido precalentado a 37°C, el cual es incubado a la misma temperatura con agitación vigorosa hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 a 600 nm. A continuación el cultivo se mantiene en hielo durante 5 minutos, se centrifuga a 2000 x g durante 15 minutos a 4°C y se recogen las células. Estas células se resuspenden en 20 mL de MgCl₂ 100 mM enfriado en hielo y se incuban durante 20 minutos en hielo. Se recogen nuevamente por centrifugación a 1000 x g durante 15 minutos a 4°C, se resuspenden en 2 mL de CaCl₂ 100 mM y se incuban 1 hora en hielo. Finalmente a la suspensión de células competentes

se le añade glicerol estéril a una concentración final del 20% (v/v), se fraccionan en alícuotas y se guarda a -80°C un mínimo de 24 horas y un máximo de 6 meses antes de ser utilizadas.

3.9.2. Transformación de células bacterianas competentes

El proceso de transformación de células *E. coli* competentes se realiza mediante choque térmico. En primer lugar, 50 µL de las células competentes extraídas de la -80°C y mantenidas en hielo durante 5-10 minutos, se mezclan con 2 µL de la mezcla de la ligación. Esta mezcla se somete a un choque térmico que consiste en ponerlo en hielo durante 20 minutos, seguido de un baño a 42°C durante 50 segundos y enfriarlo rápidamente en hielo durante 2 minutos. Pasado este tiempo, se añade a la mezcla 950 µL de medio SOC a temperatura ambiente y se incuba 2 horas a 37°C a 200 rpm para permitir que las bacterias se recuperen. Por último, se siembran 100 µL de bacterias en placas de Petri con medio LB-agar suplementado con ampicilina y se incuban durante 12 a 16 horas a 37°C.

3.9.3. Selección de colonias recombinantes de *E. coli*

El vector pGEM®-T porta el gen de resistencia a la ampicilina, por lo que la selección de los transformantes se basa en el hecho de que sólo las bacterias que contienen en su interior el plásmido pueden crecer en medio LB con ampicilina.

Para chequear los clones que contienen el plásmido recombinante, se inoculan colonias aisladas en medio LB líquido con ampicilina y se dejan crecer durante 6-8 horas. Transcurrido este tiempo se realiza una PCR colonia (Comes *et al.* 1997) que consiste en tomar 100 µl del cultivo crecido y calentarlo a 100°C durante 5 minutos, a continuación se centrifuga a 10000 x g durante 5 minutos y se recoge el sobrenadante en un tubo limpio. Finalmente se realiza una reacción de PCR empleando como ADN molde 2 µl del sobrenadante recogido y como cebadores los que porta el plásmido, en este caso, el T7 *Forward* – SP6 *Reverse*.

3.10. Aislamiento de ADN plasmídico

Para obtener ADN plasmídico con un elevado grado de pureza se utiliza el kit comercial *PureYield Plasmid Miniprep System* (Promega), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El procedimiento consta de los siguientes pasos:

1. Separar el ADN plasmídico del ADN de la bacteria mediante una lisis alcalina, descrita originalmente por Birnboim y Doly (1979) y modificada posteriormente por Birnboim (1983).
2. Se neutraliza el lisado bacteriano y se ajusta a unas condiciones de alta salinidad en las que el ADN plasmídico se absorbe en una matriz de sílice.
3. El ADN plasmídico fijado se lava y se eluye en agua bidestilada estéril o en Tris-HCL 10 mM pH 8.5.

3.11. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción

La digestión del ADN se realizó con la enzima de restricción NdeI (Roche) y se llevó a cabo con 10 U de enzima por reacción en un volumen de 25 μ L. Se incubó durante 1 hora a 37°C, tiempo suficiente para cortar el fragmento a partir de 1000 nG de plásmido. La actividad de la enzima fue anulada por calor a 65°C durante 15 minutos. La purificación del ADN, procedente de la digestión, se realiza empleando el kit comercial *PureYield Plasmid Miniprep System* (Promega), cuyo procedimiento, siguiendo las recomendaciones del fabricante, se lleva a cabo en 7 pasos:

1. Centrifugar 1.5 mL de cultivo bacteriano 13.000 rpm / 30 segundos. Desechar sobrenadante y centrifugar el resto de cultivo.
2. Resuspender pellet en 600 μ L de agua o buffer TE y añadir 100 μ L de *Cell Lysis Buffer*. Mezclar por inversión 6 veces. El medio pasa de azul oscuro a azul claro.
3. Añadir 350 μ L de *Neutralization Solution* fría y mezclar muy bien por inversión hasta que se vuelva amarillo. Centrifugar 13.000 rpm / 3min.

4. Transferir el sobrenadante (~900 μL) a una Minicolumna sin arrastrar pellet. Poner en Tubo Colector, centrifugar a 13.000 rpm/ 15s y descartar el líquido que queda en el tubo colector.
5. Añadir 200 μL de *Endotoxin Removal Wash* a la minicolumna. Centrifugar a 13.000 rpm/15s.
6. Añadir 400 μL de *Column Wash Solution* a la minicolumna. Centrifugar a 13.000 rpm / 30s.
7. Transferir la columna a eppendorf, añadir 30 μL de agua libre de nucleasas y reposar 1 min. En el caso de plásmidos grandes (>10kb), calentar el buffer de elución a 50°C y eluir en 50 μL . Dejar reposar a temperatura ambiente unos 5-10min y centrifugar a 13.000 rpm /15s.

3.12. Tratamiento con fosfatasa alcalina

Este tratamiento se realiza sobre los plásmidos linealizados para eliminar los grupos fosfatos de los extremos 5' impidiendo así su religación. El plásmido una vez linealizado, se incuba con fosfatasa alcalina en una proporción de 1U/ μg de ADN y en el tampón de desfosforilación de la propia enzima, suministrado por el fabricante, durante 1 hora a 37°C. La reacción se detiene por calor a 65°C durante 15 minutos. El plásmido desfosforilado, se purifica empleando el kit comercial *PureYield Plasmid Miniprep System* (Promega), como se explica en el apartado 3.11.

3.13. Valores de Referencia

El cálculo de los valores de referencia se realiza en tres fases como recomienda el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI 2008). La fase preanalítica, la analítica y la postanalítica.

En la Fase Preanalítica se seleccionan los individuos de referencia que van a ser el grupo representativo de la población de referencia sobre el que se realizarán las determinaciones analíticas. Los datos obtenidos, después del

análisis, se extrapolarán a la población de referencia. En esta fase se establecen los criterios de exclusión y participación como individuos de referencia.

En la Fase Analítica se debe asegurar que el procedimiento y el instrumento analítico sean similares a los utilizados en el estudio clínico, que todos los procedimientos estén bajo control y monitorizados por un sistema de control de calidad apropiado.

En la Fase Postanalítica se procede al análisis de los datos, el cual puede realizarse de dos formas dependiendo del tipo de distribución que presenten los datos. Si se trata de una población con distribución gaussiana se puede calcular la media y la desviación estándar de los valores para crear el intervalo de confianza del 95%. Si no se conoce la distribución de los valores o no es gaussiana ni transformable en gaussiana el método no paramétrico es el más sencillo, el más directo y el adecuado. Se calculan los percentiles 2,5 y 97,5 como límites de referencia.

3.14. Análisis Estadísticos

La coincidencia entre los diferentes métodos de diagnósticos fue determinada mediante el estadístico Kappa con un intervalo de confianza del 95%. Los valores fueron interpretados según la clasificación de Landis y Koch 1977, como se explica a continuación: $k= 0,41-0,60$ presentan una coincidencia moderada, $k= 0,61-0,80$ representa buena coincidencia y $k= 0,81-1,00$ coincidencia casi perfecta más allá del azar.

La prevalencia fue calculada dividiendo el número de muestras positivas por el total de las muestras analizadas y se realizó el test de McNemar para probar la significancia de los resultados. P valor menor de 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Las correlaciones entre la cuantificación realizada por microscopía y por PCR a tiempo real fueron calculadas mediante el test estadístico R-Pearson.

La distribución de los datos se determinó empleando el estadístico Kolmogorov-Smirnov y la homocedasticidad se obtuvo utilizando el estadístico

de Levene. La comparación entre los distintos grupos se usó la prueba de comparación de medias t de Student y U de Mann Whitney. En todo los test utilizados se exigió un nivel de significancia estadístico de 5%.

La asociación entre la malaria y la anemia se determinó mediante la tabla de contingencia y estimando el riesgo probabilístico (OR).

Todos los cálculos estadísticos fueron realizados con el programa estadístico SpSS versión 19 (SPSS, Inc.).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Diagnóstico de la malaria

Un total de 471 pacientes, que visitaron el Hospital Rural de Gambo entre los meses de enero a mayo de 2010, fueron incluidos en el estudio de la prevalencia de la malaria en esa zona. Los criterios de elección de los pacientes fueron los siguientes: pacientes que eran derivados al laboratorio del hospital para realizarles alguna prueba hematológica, y pacientes a los que se les solicitaban diagnóstico parasitológico. En este último grupo pertenecían 219 muestras de las 471.

En el momento que los pacientes acudían al laboratorio del hospital se aprovechaba para coger un pequeño volumen de sangre. Cada muestra de sangre se analizó por microscopía y por biología molecular. El análisis por microscopía se realizó por gota gruesa y frotis sanguíneo en el laboratorio del hospital de Gambo y el análisis por biología molecular se realizó en los laboratorios del IUETSPC, por lo que una pequeña cantidad de sangre se depositó en un trozo de papel de filtro Whatman[®] 3MM para su conservación, traslado y posterior diagnóstico como se explica en el apartado 3.3.3 de material y métodos.

Los pacientes se dividieron en 3 grupos diferentes: mujeres con edades de 16 a 89 años, hombres con edades de 16 a 98 años y niños con edades de 1 a 15 años. Los datos de todos los pacientes se encuentran en el anexo 1. El 41% de los 471 pacientes eran mujeres, el 24% eran hombres y el 35% eran niños (tabla 2).

Nombre del grupo		% de pacientes
Mujeres	Mujeres de edades entre los 16 a los 89 años	41%
Hombres	Hombres de edades entre los 16 a los 98 años	24%
Niños	Niños de edades entre 1 a 15 años	35%

Tabla 2: Clasificación y porcentaje de pacientes.

Los pacientes procedían de regiones cercanas al hospital (tabla 3), predominando la woreda de Negele con el 50,5% de los pacientes, seguido de Kore con el 11,5% y Adami Tulu con el 5%. El mapa donde están localizadas cada una de estas woredas se encuentra en el anexo 3.

Woreda	Nº pacientes	%
Negele	238	50,5%
Kore	54	11,5%
Adami Tulu	23	5%
Asasa	21	4,5%
Shashemane	15	3,2%
Munesa	15	3,2%
Kofele	13	2,8%
Shala	11	2,3%
Dodola	9	2%
Seraro	8	1,7%
Kokosa	2	0,4%

Tabla 3: Principales woredas de donde proceden los pacientes que visitan el Hospital Rural de Gambo.

4.1.1. Diagnóstico por Microscopía

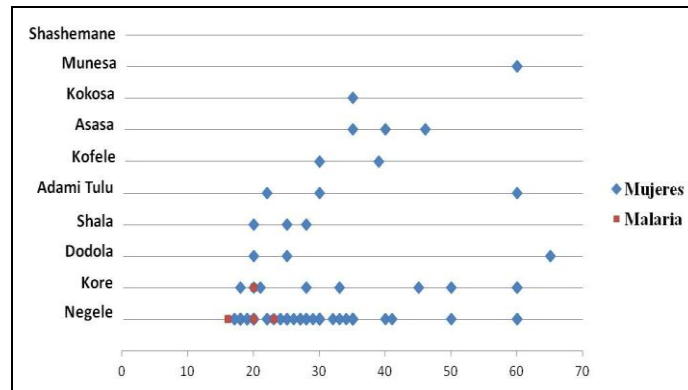
El diagnóstico mediante microscopía óptica se realizó a un total de 219 muestras. El 39% de las muestras pertenecían a mujeres, el 20% a hombres y el 41% a niños (tabla 4). En 7 muestras de las 219 no se tiene el dato de la woreda a la que pertenecen los pacientes. Estas muestras pertenecían 3 al grupo de las mujeres y 4 al grupo de los niños.

Woreda	Mujeres		Hombres		Niños		Total		Prevalencia
	Nº total	Nº positivos	Nº total	Nº positivas	Nº total	Nº positivas	Nº total	Nº positivas	
Negele	55	3	20	0	54	5	129	8	6,2%
Kore	10	1	5	0	10	1	25	2	8%
Adami Tulu	3	0	2	0	4	0	9	0	0
Asasa	3	0	2	0	1	0	6	0	0
Shashemane	0	0	2	0	6	0	8	0	0
Munesa	2	0	5	0	3	0	10	0	0
Kofele	2	0	2	0	2	0	6	0	0
Shala	3	0	3	1	3	0	9	1	11%
Dodola	3	0	3	0	1	0	7	0	0
Seraro	0	0	0	0	2	1	2	1	50%
Kokosa	1	0	0	0	0	0	1	0	0
-	3	0	-	-	4	0	7	0	0
TOTAL	85	4	44	1	90	7	219	12	5,5%

Tabla 4: Distribución en las woredas de los pacientes que formaron parte del estudio.

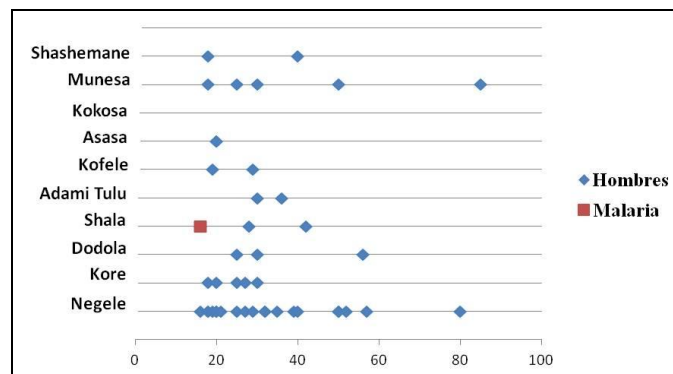
Se obtuvo una prevalencia de *Plasmodium* del 5,5% al identificarse 12 muestras positivas. La identificación de las especies de *Plasmodium* se realizó a través del frotis sanguíneo donde se identificaron dos únicas especies, *P. vivax* y *P. falciparum*, y no se detectaron infecciones mixtas en ninguna de las muestras. *Plasmodium* se identificó en los 3 grupos de muestras. De los datos obtenidos se deduce que 1 de cada 21 mujeres están infectadas con *Plasmodium*, 1 de cada 44 hombres y 1 de cada 13 niños.

En el grupo de las mujeres positivas el 75% de las muestras eran de *P. vivax* y el 25% de *P. falciparum*. Las mujeres estudiadas comprendían edades entre 16 a 65 años, con una moda de 20 años. Las mujeres infectadas tenían edades entre 16 a 23 años, con una moda de 20 años (gráfica 1).



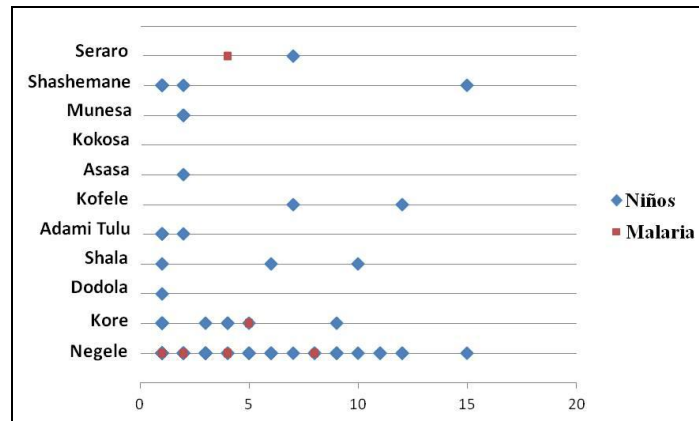
Gráfica 1: Representación gráfica de las edades del grupo de las mujeres en sus woredas correspondientes.

En el grupo de los hombres sólo se diagnosticó una muestra positiva que correspondía a la especie *P.vivax*. En este grupo las edades correspondían entre los 16 a 85 años, con una moda de 18 años. El paciente con la muestra positiva tenía 16 años (gráfica 2).



Gráfica 2: Representación gráfica de las edades del grupo de los hombres en sus woredas correspondientes.

En el grupo de los niños *P. vivax* se identificó en 6 de las 7 muestras positivas, que corresponde al 85,7% de las muestras positivas y *P. falciparum* al 14,2% restante. Los niños tenían edades entre 1 a 15 años, con una moda de 1. Los niños infectados presentaban edades entre 1 a 8 años, con una moda de 4 años (gráfica 3).



Gráfica 3: Representación gráfica de las edades del grupo de los niños en sus woredas correspondientes.

La principal woreda a la que pertenecían los pacientes positivos para *Plasmodium* era Negele con un 66,6%, seguida de Kore con un 16,6% y por último Shala y Seraro con un 8,4%, respectivamente (tabla 5). Sin, embargo, si analizamos los positivos por el número de pacientes totales de cada woreda se obtiene que en Negele 1 de cada 16 muestras son positivas, en Kore 1 de cada 13 y en Shala 1 de cada 9 por muestra total.

Woreda	Nº pacientes	Mujeres		Hombres		Niños		Total
		Pv	Pf	Pv	Pf	Pv	Pf	
Negele	129	2	1	0	0	5	0	8
Kore	25	1	0	0	0	0	1	2
Shala	9	0	0	1	0	0	0	1
Seraro	2	0	0	0	0	1	0	1
Total	165	3	1	1	0	6	1	12

Tabla 5: Distribución en las woredas de los pacientes positivos a *P. vivax* (Pv) y *P. falciparum* (Pf).

Un mínimo de 200 campos fueron examinados a 100X con aceite de inmersión antes de dar un resultado negativo para cada muestra examinada.

Se realizó la cuantificación de las muestras positivas a través de la gota gruesa y se realizó contando, de forma simultánea, parásitos y leucocitos. El recuento se detiene cuando se alcanzan los 200 leucocitos contados. La densidad

parasitaria estimada por microlito de sangre se obtiene asumiendo una media de 8000 leucocitos por microlito de sangre. Cada gota gruesa fue contada dos veces y si se obtenían resultados discordantes, la gota gruesa era leída una tercera vez y el resultado final se obtenía de las dos lecturas que más similitud tenían. En la tabla 6 se muestran los resultados de la cuantificación de las muestras por gota gruesa.

Muestra	Edades	1 ^a recuento	2 ^a recuento	Media de las lecturas	Cuantificación Parásitos / μ L
3	20	50	53	51,5	2060
5	16	91	81	86	3440
8	1	197	203	200	8000
9	4	28	33	30,5	1220
11	4	22	26	24	960
12	20	59	64	61,5	2460
13	23	16	18	17	680
14	8	30	19	24,5	980
15	16	181	184	182,5	7300
16	4	46	48	47	1880
20	5	134	147	140,5	5620

Tabla 6: Cuantificación de la parasitemia en gota gruesa. Una de las muestras no se le pudo realizar la cuantificación en la gota gruesa.

4.1.2. Diagnóstico por nested-PCR

El diagnóstico mediante nested-PCR (n-PCR) se realizó en un total de 471 muestras siguiendo el protocolo de amplificación explicado en el apartado 3.5.1 de material y método. En la figura 15 y 16 se representan los resultados tras realizar la n-PCR. En la figura 15 se muestra un gel de agarosa al 1% con el resultado de la 1^a PCR en el que se observa un fragmento humano de 321pb y en casos de parasitemias muy elevadas se puede observar el fragmento

correspondiente a *Plasmodium* de 780-820pb. En la figura 16 se muestra el resultado de la 2ª PCR en el que se observa una muestra positiva para *P. vivax*.

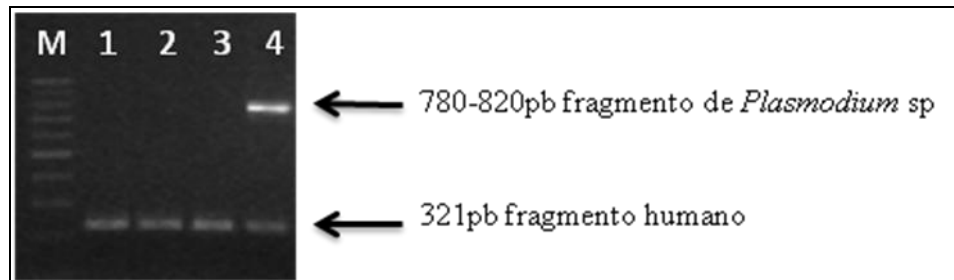


Figura 15: Resultado de la 1ª PCR en un gel de agarosa. En el primer carril se encuentra el marcador de 100 pb Promega (M) y en los cuatro carriles siguientes se encuentra el amplificado de 4 muestras.

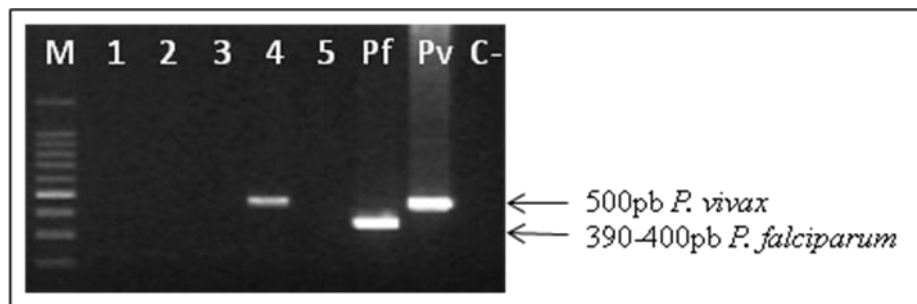


Figura 16: Resultado de la 2ª PCR en un gel de agarosa. En el primer carril se encuentra el marcador de 100 pb Promega (M), en los cuatro carriles siguientes el amplificado de 4 muestras y en los tres últimos carriles los controles positivos para *P. falciparum* (Pf) y *P. vivax* (Pv) y el control negativo (C-).

De las 471 muestras analizadas, 191 pertenecían al grupo de las mujeres, 114 al grupo de los hombres y 165 al grupo de los niños, pertenecientes principalmente a la woreda de Negele y Kore (tabla 7). En 14 muestras de las 471 muestras no se tiene el dato de la woreda a la que pertenecen los pacientes. Estas muestras pertenecían, 7 al grupo de las mujeres, 3 al grupo de los hombres y 4 al de los niños.

Woreda	Mujeres		Hombres		Niños		Total		Prevalencia
	N° total	N° positivos	N° total	N° positivas	N° total	N° positivas	N° total	N° positivas	
Negele	110	8	48	2	98	12	256	22	8,6%
Kore	27	3	17	0	27	2	71	5	7%
Adami Tulu	9	0	7	0	7	1	23	1	4,3%
Asasa	12	0	5	0	5	0	22	0	0
Shashemane	5	0	4	0	6	1	15	1	6,6%
Munesa	5	0	8	0	3	0	16	0	0
Kofele	3	1	6	0	5	0	14	1	7%
Shala	7	0	4	1	6	1	17	2	12%
Dodola	5	0	6	0	1	0	12	0	0
Seraro	1	0	4	0	3	1	8	1	12,5%
Kokosa	1	0	1	0	0	0	2	0	0
Awasa	0	0	1	0	0	0	1	0	0
-	7	0	3	0	4	0	14	0	0
TOTAL	191	12	114	3	165	18	471	33	7%

Tabla 7: Distribución en las woredas de los pacientes que formaron parte del estudio.

Se obtuvo una prevalencia de *Plasmodium* del 7% al identificarse 33 muestras positivas. Las especies de *Plasmodium* identificadas en las muestras analizadas fueron *P. vivax* y *P. falciparum* y no se detectaron infecciones mixtas en ninguna de las muestras.

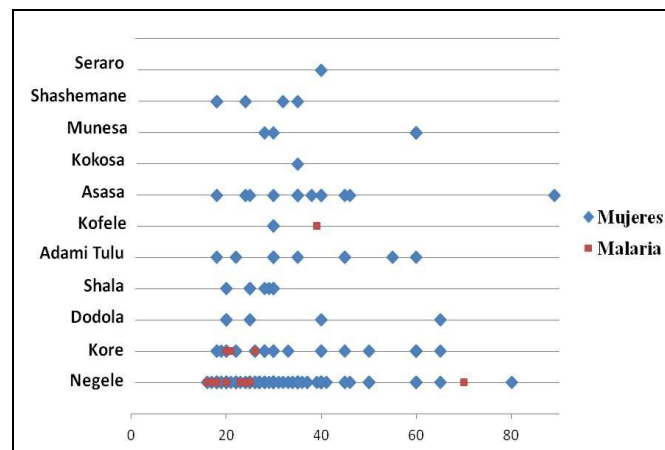
El porcentaje de mujeres parasitadas fue del 6,25%, el porcentaje de hombres parasitados fue del 2,63% y el porcentaje de niños fue del 10,9% (tabla 8).

	Mujeres	Hombres	Niños
N° Total	191	114	165
N° Positivos	12	3	18
%	6,26%	2,63%	10,9%

Tabla 8: Porcentajes de parasitación en los distintos grupos que formaron parte del estudio.

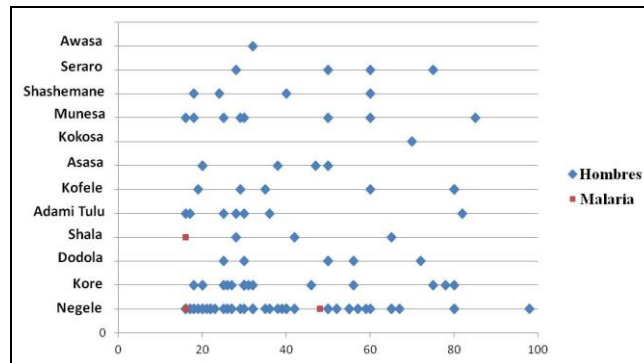
En el grupo de las mujeres 1 de cada 16 mujeres está infectada con *Plasmodium*. *P. vivax* fue identificada en 8 de las 12 muestras positivas que corresponde al 66,6% de las muestras y *P. falciparum* en el 33,3%. El total de las mujeres comprendían edades entre 16 a 89 años, con una moda de 30 años.

Las mujeres infectadas comprendían edades entre 16 y 39 años de edad, con una moda de 20 años y con una excepción de una mujer de 70 años (gráfica 4). Un total de 160 mujeres tenían edades entre los 16 y los 40 años, donde se encontraban el 92% de las mujeres parasitadas (11/12) y 32 mujeres tenían edades entre 41 a 89 años, con el 8% de las mujeres parasitadas (1/12).



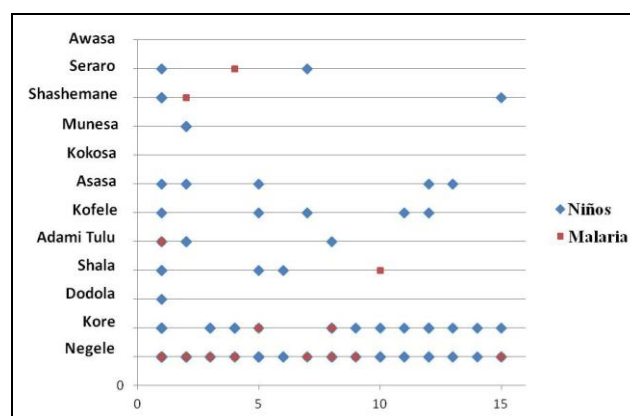
Gráfica 4: Representación gráfica de las edades del grupo de las mujeres en sus woredas correspondientes.

En el grupo de los hombres 1 de cada 38 hombre está infectado de *Plasmodium* y se identificó *P. vivax* en las 3 muestras positivas. El total de los hombres comprendían edades entre 16 a 98 años, con una moda de 30 años. Los hombres infectados tenían edades de 16 y 48 años (gráfica 5).



Gráfica 5: Representación gráfica de las edades del grupo de los hombres en sus woredas correspondientes.

En el grupo de los niños *P. vivax* fue identificado en 12 de las 18 muestras positivas obteniéndose el 66,6% de las muestras positivas y *P. falciparum* en el 33,3%, determinándose que 1 de cada 9 niños está infectado de *Plasmodium*. El total de los niños comprendían edades entre 1 a 15 años, con una moda de 1. Los niños infectados comprendían edades entre 1 a 15 años, con una moda de 4 años (gráfica 6). Un total de 105 niños tenían edades entre 1 y 5 años, donde se encontraban el 66,6% de los niños parasitados (12/18) y 61 niños tenían edades entre 6 a 15 años, con el 33,3% de los niños parasitados (6/18).



Gráfica 6: Representación gráfica de las edades del grupo de los niños en sus woredas correspondientes.

La principal woreda a la que pertenecían los pacientes positivos para *Plasmodium* era Negele con un 66,6%, seguida de Kore con un 15%, Shala con un 6% y por último Kofele, Seraro, Shashemane y Adami Tulu con un 3%,

respectivamente (tabla 9). Al analizar los positivos por el número de pacientes totales de cada woreda se obtiene que en Negele 1 de cada 12 muestras son positivas, en Kore 1 de cada 14, en Shala 1 de cada 8, en Kofele 1 de cada 14, en Seraro 1 de cada 8, en Shashemane 1 de cada 15 y en Adami Tulu 1 de cada 23.

Woreda	Nº de pacientes	Mujeres		Hombres		Niños		Total
		Pv	Pf	Pv	Pf	Pv	Pf	
Negele	255	5	3	2	0	8	4	22
Kore	71	2	1	0	0	1	1	5
Shala	17	0	0	1	0	0	1	2
Kofele	14	1	0	0	0	0	0	1
Seraro	8	0	0	0	0	1	0	1
Shashemane	15	0	0	0	0	1	0	1
Adami Tulu	23	0	0	0	0	1	0	1
Total	403	8	4	3	0	12	6	33

Tabla 9: Principales woredas a las que pertenecen los pacientes positivos a *Plasmodium* (Pv: *P. vivax*; Pf: *P. falciparum*).

Las mujeres y los hombres se agruparon en adultos y el porcentaje de parasitados fue del 4,9%. Se encontraron diferencias significativas (X^2 : 450,44; $p < 0,05$) entre niños y adultos parasitados con predominio del grupo de los niños con una media de edad de 5 años (tabla 10).

	Adultos	Niños
Nº Total	306	165
Nº Positivos	15	18
%	4,9%	10,9%

Tabla 10: Porcentaje de parasitación en los adultos y los niños.

4.1.3. Detección de *Plasmodium* a distintas altitudes

Se analizaron muestras positivas para *Plasmodium* a distintas altitudes y se observa que a los 2000 m de altitud se detectaron 27 muestras positivas de un total de 318 pacientes, correspondiendo al 82% de las muestras positivas detectadas. De estas 27 muestras, 20 se identificaron como *P.vivax* y 7 como *P.falciparum*. Sobre los 2500 m de altitud se detectaron 6 muestras positivas de un total de 85 pacientes, el 18% de las muestras positivas. *P.vivax* fue identificada en 4 de las muestras positivas y *P.falciparum* en 2 de las muestras positivas (tabla 11).

Woreda	N° pacientes	Muestras positivas			Altitud
		Totales	PV	PF	
Negele	255	22	16	6	1992m
Kore	71	5	3	2	2755m
Adami Tulu	23	1	1	0	1651m
Shashemane	15	1	1	0	2009m
Kofele	14	1	1	0	2515m
Shala	17	2	1	1	1552m
Seraro	8	1	1	0	1582m

Tabla 11: Altitud de las woredas de donde proceden el total de los pacientes parasitados (Pv: *P. vivax*; Pf: *P. falciparum*).

En base a la población estudiada determinamos que 1 de cada 12 pacientes que vive sobre los 2000 m de altitud están infectados con *Plasmodium* y que 1 de cada 14 pacientes que vive sobre los 2500 m de altitud están también infectados de malaria. Al separar los resultados por especies establecemos que sobre los 2000 m de altitud, 1 de cada 16 pacientes está infectado con *P. vivax* y 1 de 45 con *P. falciparum* y sobre los 2500 m de altitud determinamos que 1 de cada 21 pacientes está infectados con *P. vivax* y 1 de cada 42 con *P. falciparum*.

Para comprobar que las parasitosis se han producido a altas cotas se separaron los pacientes en adultos y niños, de esta forma aseguramos que las infecciones se han producido en las woredas de donde pertenecen los niños dado que su movilidad es más reducida.

Los adultos que viven a altitudes de 2000 m eran positivos el 6,5% (11/168), 8 pertenecen a la especie *P. vivax* y 3 a *P. falciparum*. Los pacientes que viven por encima de los 2500 m de altitud eran positivos el 7,5% (4/53), 3 pertenecen a la especie *P. vivax* y 1 a *P. falciparum*.

En el grupo de los niños que viven a altitudes de 2000 m eran positivos el 13,3% (16/120), 11 pertenecen a la especie *P. vivax* y 5 a *P. falciparum*. Los niños que viven por encima de los 2500 m de altitud eran positivos el 7,4% (2/27), cada una de las muestras positivas pertenecen a cada especie de *Plasmodium* (tabla 12).

Muestras positivas									
Woreda	Adultos				Niños				Altitud
	Pacientes	N° Positivo	PV	PF	Pacientes	N° Positivo	PV	PF	
Negele	157	10	7	3	98	12	8	4	1992m
Kore	44	3	2	1	27	2	1	1	2755m
Adami Tulu	16	0	0	0	7	1	1	0	1651m
Shashemane	9	0	0	0	6	1	1	0	2009m
Kofele	9	1	1	0	5	0	0	0	2515m
Shala	11	1	1	0	6	1	0	1	1552m
Seraro	5	0	0	0	3	1	1	0	1582m

Tabla 12: Altitud de las woredas de donde proceden los pacientes parasitados separados en adultos y niños (Pv: *P. vivax*; Pf: *P. falciparum*).

La separación de los resultados en adultos y niños nos indica que, a 2000 m de altitud, 1 de cada 15 adultos y 1 de cada 7 niños están infectados y que sobre los 2500 m de altitud 1 de cada 13 adultos y 1 de cada 13 niños también están infectados. Estadísticamente existen diferencias significativas en el grupo

de los niños entre las distintas altitudes ($X^2=10,889$ $p<0,05$) y en el grupo de los adultos no se observan diferencias significativas entre las altitudes ($X^2=3,267$ $p>0,05$).

4.1.4. Diagnóstico por PCR a tiempo real

El diagnóstico por PCR a tiempo real (qPCR) se realizó siguiendo dos protocolos de amplificación diferentes. En primer lugar se realizó mediante kits comerciales de *PrimerDesignTMLtd* (qPCR¹), en el cual se amplifican diferentes regiones del ADN de *Plasmodium* dependiendo de la especie a identificar. Y en segundo lugar, mediante los *primers* y sondas publicados por Rosanas-Urgell *et al.* 2010, específicos que amplifican la región del gen 18S ADNr (qPCR²).

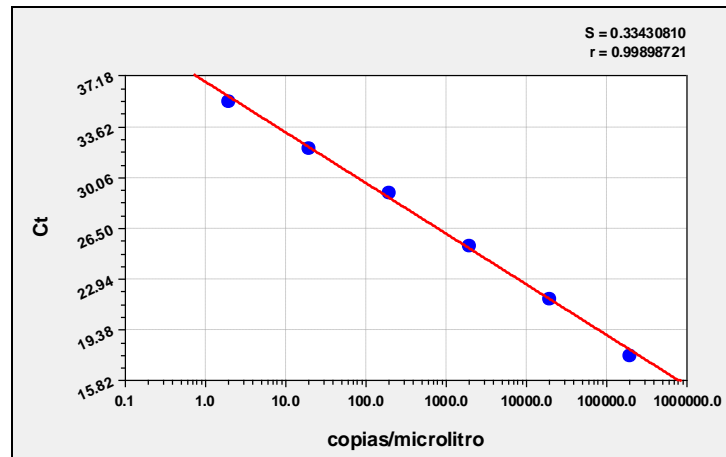
4.1.4.1. Diagnóstico por qPCR mediante Kits comerciales

El diagnóstico por qPCR¹ amplifica para *P. vivax* el gen que codifica para *aspartic protease PM4* y en *P. falciparum* el gen que codifica para *plasmepsin 4*. En ambas especies la detección se realizó mediante sondas marcadas con el fluoróforo FAM que emite la fluorescencia a una longitud de onda de 520 nm. El protocolo de amplificación seguido en la qPCR¹ está explicado en el apartado 3.5.2.1 de material y método.

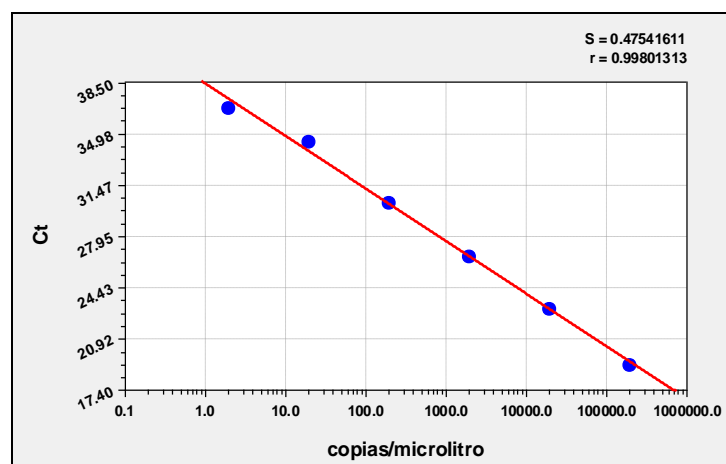
Para la cuantificación de las muestras se realizó una curva estándar para cada una de las especies. Se introdujeron 6 puntos por triplicado con concentraciones de 2×10^5 , 2×10^4 , 2×10^3 , 2×10^2 , 20 y 2 copias/ μ l de los controles positivos provistos en el Kit comercial para cada una de las especies de *Plasmodium*. Se calcularon las desviaciones estándar en cada punto de la curva para la obtención del coeficiente de correlación y la pendiente de la curva.

La eficiencia de la amplificación para cada uno de los pares de *primers* y las sondas correspondientes se calculó mediante la fórmula $E=10^{(-1/pendiente)}-1$.

La curva estándar para *P. vivax* dio como resultado un coeficiente de correlación de 0,998, una pendiente de 0,334 y una eficiencia de 99,89% (gráfica 7).

Gráfica 7: Curva estándar para *P. vivax*.

La curva estándar para *P. falciparum* dio como resultado un coeficiente de correlación de 0,998, una pendiente de 0,475 y una eficiencia de 99,2% (gráfica 8).

Gráfica 8: Curva estándar para *P. falciparum*.

Mediante qPCR¹ se cuantificaron solo las muestras positivas de *Plasmodium* que habían sido detectadas por n-PCR. Se analizaron un total de 33 muestras, 20 de las cuales dieron positivas para *P. vivax*, 4 para *P. falciparum*. No se detectaron infecciones mixtas en ninguna de las muestras. La sensibilidad obtenida en la qPCR¹ fue del 72,7%.

La cuantificación en *P. vivax* dio como media 19,05 copias/ μ l de sangre, con un máximo de 108,71 y un mínimo de 0,44 copias/ μ l de sangre. La

cuantificación en *P. falciparum* dio como media 88,57 copias/ μ l de sangre, con un máximo de 279,23 y un mínimo de 2,27 copias/ μ l de sangre (tabla 13).

Muestra	n-PCR	qPCR ¹ copias/ μ l de sangre	Muestra	n-PCR	qPCR ¹ copias/ μ l de sangre
5	PV	1,47	130	PV	18,13
7	PV	4,49	157	PV	97,99
8	PV	35,83	167	PV	44,39
9	PV	8,10	168	PV	21,32
11	PV	2,94	274	PV	0,58
12	PV	3,55	391	PV	25,40
13	PV	0,78	419	PV	0,59
14	PV	1,39	437	PV	108,71
15	PV	2,62	3	PF	33,61
16	PV	1,51	20	PF	279,23
17	PV	0,93	64	PF	39,19
106	PV	0,44	318	PF	2,27

Tabla 13: Comparación de los resultados obtenidos por nPCR y qPCR¹.

4.1.4.2. Diagnóstico por qPCR mediante el diseño de *primer* y sondas específicas

El diagnóstico por qPCR² desarrollado por Rosanas-Urgell *et al.* en 2010 utiliza *primers* y sondas que amplifican la región del gen 18S ADNr de forma específica para cada especie de *Plasmodium*. La detección se realizó mediante el marcado de las sondas con distintos fluoróforo. La sonda de *P. vivax* se marcó con el fluoróforo HEX, que emite la fluorescencia a una longitud de onda de 556 nm y en *P. falciparum* la sonda se marcó con el fluoróforo FAM, que emite la fluorescencia a una longitud de onda de 520 nm.

Como controles positivos para la realización de la curva estándar se emplearon fragmento amplificados de *P. vivax* con los *primers* *P. vivax-forward* (Viv-F), *P. vivax-reverse* (Viv-R) y de *P. falciparum* con los *primers* *P.falciparum-forward* (Fal-F) y *P.falciparum-reverse* (Fal-R), clonados en el vector pGEM®-T. La secuencia de los *primers* se muestran en el apartado 3.5.4 de material y métodos. Se cortó el amplicón con la enzima de restricción NdeI

(Roche) para evitar la formación de superestructuras. Estos plásmidos de *P. vivax* y *P. falciparum* tenían un tamaño de 3216 pb y de 3221 pb respectivamente y se conservaron a una concentración de 40 ng/μL para *P. vivax* y de 20 ng/μL para *P. falciparum*. La cuantificación se realizó en gel de agarosa al 0,7% (figura 17) y a través del NanoDrop® ND-1000.

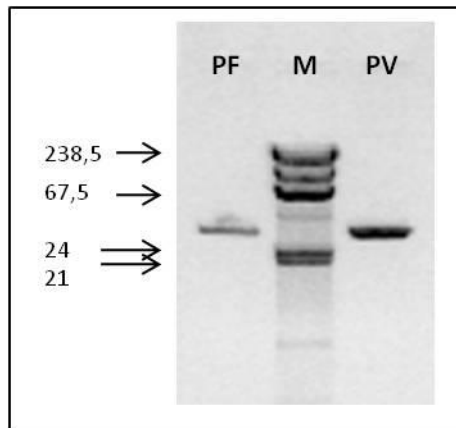


Figura 17: Cuantificación en gel de agarosa al 0,7% del plásmido con el amplicón inserto de *P. vivax* y *P. falciparum*. En el carril M está el marcador Lambda DNA/HindIII (Promega), en el carril 1 el amplicón de *P. vivax* diluido 1/10 y en el carril 2 el amplicón de *P. falciparum* diluido 1/10.

Empleando la concentración obtenida en ambas especies, se realizó la conversión de ng/μl a copias/μl de sangre para conocer el valor del control positivo que será empleado en la realización de la curva estándar. La conversión se realizó en primer lugar mediante la fórmula A, donde se obtiene el número de moléculas/ng dividiendo el número de avogadro entre el tamaño del amplicón multiplicado por la unidad de masa atómica. Y en segundo lugar empleando la fórmula B, la cual para la obtención del número de copias/μL se multiplica el número de moléculas/ng, obtenido anteriormente, por el valor de la cuantificación (Rodrigo *et al.* 1997). En el caso de *P. vivax* el tamaño del amplicón es de 3216 pb y el valor de la cuantificación es 40 ng/μL y en *P. falciparum* el amplicón son 3221 pb y la cuantificación de 20 ng/μL. Los resultados obtenidos fueron $1,15 \times 10^{10}$ copias/μL para *P. vivax* y $5,75 \times 10^9$ copias/μL para *P. falciparum*.

$$\text{N}^\circ \text{ de moléculas/ng} = \frac{\text{N}^\circ \text{ Avogadro}}{\text{Pb} \times \text{UMA}}$$

A

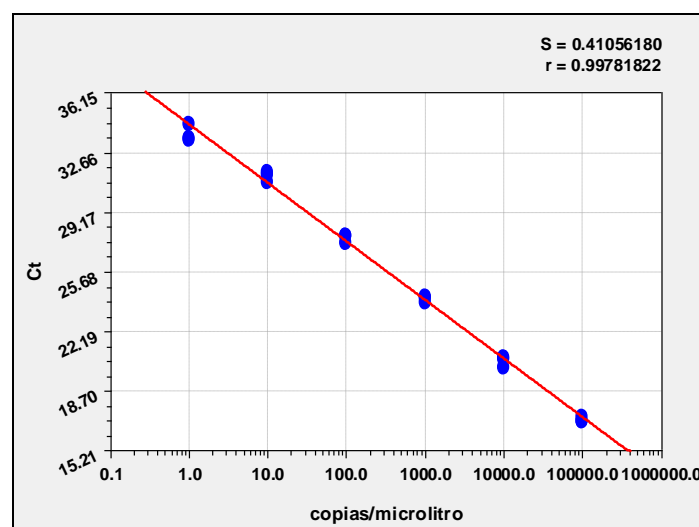
$$\text{Copias}/\mu\text{l} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de moléculas}}{\text{ng}} \times \frac{\text{Ng}}{\mu\text{l}}$$

B

Fórmulas para realizar la conversión de ng/ μl a N $^\circ$ moléculas (copias)/ μl de sangre. Pb: pares de bases, $650 \times 10^9 =$ Unidad de masa atómica y $6,022 \times 10^{23} =$ N $^\circ$ de Avogadro.

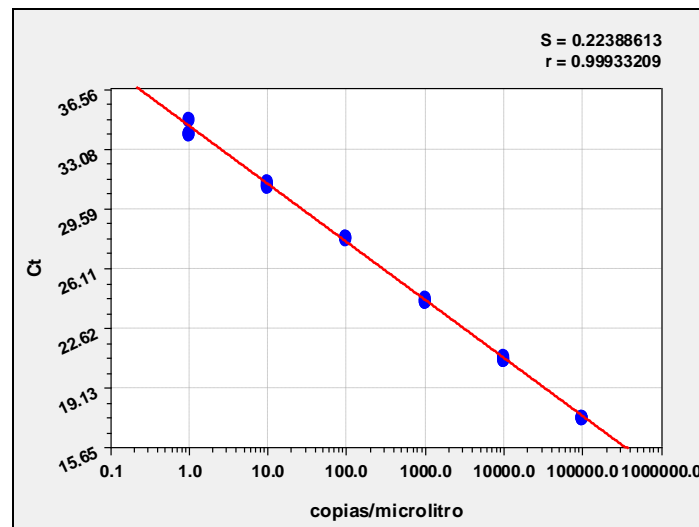
La curva estándar se realizó con 6 puntos y por triplicado a unas concentraciones de 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 y 1 copias/ μl y se calcularon las desviaciones estándar para cada punto. La eficiencia de la amplificación, para cada uno de los pares de *primers* y sus sondas, se calculó mediante la fórmula $E = 10^{(-1/\text{pendiente})} - 1$.

La curva estándar para *P. vivax* dio como resultado un coeficiente de correlación de 0,997, una pendiente de 0,410 y una eficiencia del 99,6% (gráfica 9).



Gráfica 9: Curva estándar para *P. vivax*.

La curva estándar para *P. falciparum* dio como resultado un coeficiente de correlación de 0,999, una pendiente de 0,223 y eficiencia del 99,9% (gráfica 10).



Gráfica 10: Curva estándar para *P. falciparum*.

Mediante qPCR² se cuantificaron las muestras positivas de *Plasmodium* que habían sido detectadas por n-PCR siguiendo el protocolo de amplificación explicado en el apartado 3.5.2.2 de material y método.

Se analizaron las 33 muestras positivas por n-PCR, 9 de las muestras dieron positivas para *P. vivax*, 1 muestra dio positiva para *P. falciparum*. No se detectaron infecciones mixtas en ninguna de las muestras. La sensibilidad obtenida en la qPCR² fue del 30,3%. En *P. vivax* se obtuvo una cuantificación mínima de 0,1 copias/ μ l de sangre y máxima de 90,5 copias/ μ l de sangre, obteniéndose una media de 17,82 copias/ μ l de sangre. La muestra positiva de *P. falciparum* dio una cuantificación de 0,03 copias/ μ l de sangre (tabla 14).

Muestra	n-PCR	qPCR ²
		copias/ μ l de sangre
5	PV	0,1
7	PV	7,03
8	PV	90,5
11	PV	0,1
12	PV	6,57
13	PV	0,76
15	PV	1,31
419	PV	1,14
437	PV	52,87
3	PF	0,03

Tabla 14: Comparación de los resultados obtenidos por nPCR y qPCR².

4.1.5. Comparación de diagnóstico de *Plasmodium* mediante microscopía, n-PCR y qPCR

La comparación entre microscopía y n-PCR se realizó con igual número de muestras para ambas técnicas, por lo que en este estudio sólo se incluyeron aquellas muestras que se les habían realizado un diagnóstico tanto por microscopía como por n-PCR. El número de muestras que cumplían este requisito fue de 219 muestras. La prevalencia obtenida mediante microscopía para *Plasmodium* fue del 5,5% al identificarse 12 muestras positivas y la prevalencia obtenida a través de la n-PCR fue del 10,5% al detectarse 23 muestras positivas del total de 219 (tabla 15). Todas las muestras positivas por microscopía fueron detectadas por n-PCR.

	Mujeres		Hombres		Niños		Total	Prevalencia
	Pv	Pf	Pv	Pf	Pv	Pf		
Microscopía	3	1	1	0	6	1	12	5,5%
n-PCR	7	1	1	0	9	5	23	10,5%

Tabla 15: Resultados de prevalencia obtenidos mediante microscopía y n-PCR (Pv: *P. vivax*; Pf: *P. falciparum*).

El análisis estadístico de la coincidencia entre las 2 técnicas de diagnóstico fue interpretado con la clasificación de Landis y Koch 1977, quienes determinaron un k valor de entre 0,41-0,60 como una coincidencia moderada, un k valor de entre 0,61-0,80 como una buena coincidencia y un k valor de entre 0,81-1,00 como una coincidencia casi perfecta entre los dos métodos de diagnóstico. Nuestros resultados dieron un k valor de 0,62, considerando que se encuentra en el límite con la buena coincidencia.

La sensibilidad y especificidad diagnóstica se determinó asumiendo los resultados de la n-PCR como los verdaderos positivos y negativos, ya que es un método ampliamente usado por diferentes autores debido a su buen rendimiento en la detección de *Plasmodium*. La sensibilidad se define como la probabilidad de obtener un resultado positivo cuando el individuo esté afectado de la enfermedad y la especificidad como la probabilidad de obtener un resultado negativo cuando el individuo está sano (Bartolomé 1999) (figura 18).

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{Falsos negativos}}$$
$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Verdaderos negativos} + \text{Falsos positivos}}$$

Figura 18: Fórmulas empleadas para el cálculo de la sensibilidad y especificidad de las técnicas de diagnóstico.

La sensibilidad total obtenida en la gota gruesa fue del 52,2%, entendiéndose que si se da un resultado negativo por esta técnica, hay un 47,8% de probabilidad de que no lo sea. La especificidad fue del 100%, entendiéndose que si se da un resultado positivo es 100% positivo. La sensibilidad de la gota gruesa en el caso de los adultos formado por mujeres y hombres dio como resultado una sensibilidad del 50% para *P. vivax*, para *P. falciparum* no se pudo

obtener el dato de sensibilidad por el bajo número de muestras positivas obtenidas. El grupo de los niños presentó una sensibilidad del 66,6% para *P. vivax* y del 20% para *P. falciparum* (tabla 16).

	Adultos		Niños		Total
	Pv	Pf	Pv	Pf	
Microscopía	4	1	6	1	12
n-PCR	8	1	9	5	23
Sensibilidad	50%	-	66,6%	20%	52,2%

Tabla 16: Resultados de sensibilidad obtenida por microscopía (Pv: *P. vivax*; Pf: *P. falciparum*).

La comparación entre n-PCR, qPCR¹ y qPCR² se realizó con las 33 muestras que habían sido positivas por n-PCR. La sensibilidad total obtenida en la qPCR¹ fue del 72,7% y la obtenida en la qPCR² fue del 30,3% (tabla 17).

	Pv	Pf	Total		Pv	Pf	Total
qPCR ¹	20	4	24	qPCR ²	9	1	10
n-PCR	23	10	33	n-PCR	23	10	33
Sensibilidad	87%	40%	72,7%	Sensibilidad	39,1%	10%	30,3%

Tabla 17: Resultados de sensibilidad obtenida por qPCR¹ y qPCR² (Pv: *P. vivax*; Pf: *P. falciparum*).

4.1.6. Comparación de la cuantificación de *Plasmodium* mediante microscopía, qPCR¹ y qPCR²

Las cuantificaciones obtenidas por microscopía, qPCR¹ y qPCR² se muestran en la tabla 18 y 19, analizándose estadísticamente para determinar la correlación que existía en ambas técnicas de diagnóstico. Esta comparación sólo se realiza para la especie de *P. vivax*, debido a que el número de muestras de *P. falciparum* es insuficiente (tabla 19).

Muestra	Especie	Microscopía Parásitos / μL	qPCR ¹ copias/ μl de sangre	qPCR ² copias/ μl de sangre
5	PV	3440	1,47	0,1
8	PV	8000	35,83	90,5
9	PV	1220	8,10	-
11	PV	960	2,94	0,1
12	PV	2460	3,55	6,57
13	PV	680	0,78	0,76
14	PV	980	1,39	-
15	PV	7300	2,62	1,31
16	PV	1880	1,51	-

Tabla18: Cuantificación de *P. vivax* mediante microscopía y qPCR.

Muestra	Especie	Microscopía Parásitos / μL	qPCR ¹ copias/ μl de sangre	qPCR ² copias/ μl de sangre
3	PF	2060	33,40	0,03
20	PF	5620	279,23	-

Tabla 19: Cuantificación de *P. falciparum* mediante microscopía y qPCR.

Se realizó la prueba estadística de Kolmogorov-Smirnov para obtener la distribución de los datos. Los resultados de los análisis realizados demuestran que los datos de cuantificación mediante microscopía, qPCR¹ y qPCR² siguen una distribución normal al obtenerse valores de significancia $p > 0,05$. La correlación empleando el test estadístico de R-Pearson dio como resultado una correlación significativa entre los métodos qPCR¹ y qPCR² ($R^2=0,980$ $p < 0,05$) y entre microscopía y qPCR² ($R^2=0,682$ $p < 0,05$) para *P. vivax*. Las correlaciones entre las cuantificaciones de los demás métodos de diagnóstico no fueron significativas (tabla 20).

		Microscopía	qPCR ¹	qPCR ²
Microscopía	Correlación de Pearson	1	,652	,682
	p valor		,057	,043
qPCR ¹	Correlación de Pearson	,652	1	,980
	p valor	,057		,000

Tabla 20: Correlaciones entre las cuantificaciones realizadas por microscopía, qPCR¹, y qPCR².

4.2. Valores de referencia de la hemoglobina

El tamaño muestral fue de 370 muestras pertenecientes a pacientes que eran remitidos al laboratorio del Hospital Rural de Gambo durante un periodo de un año (junio de 2009 a mayo de 2010).

Estos datos se dividieron en dos grupos: uno con resultados positivos de malaria (enfermos) y otros con resultados negativos (sanos), en ambos grupos se excluyeron las mujeres embarazadas, las serologías positivas a HIV y las muestras positivas a helmintos intestinales. El grupo enfermo son confirmados por microscopía y el sano por biología molecular, concretamente mediante la nested-PCR. En la tabla 21 se muestran como se han definido los pacientes estudiados separados por sexo y grupo de edad.

Nombre del grupo	
Mujeres sanas	Mujeres de edades mayores de 16 años que no padecían malaria.
Mujeres enfermas	Mujeres de edades mayores de 16 años que presentaban malaria.
Hombres sanos	Hombres de edades mayores de 16 años que no padecían malaria.
Hombres enfermos	Hombres de edades mayores de 16 años que presentaban malaria.
Niños sanos	Niños de edades entre 1 a 15 años que no padecían malaria.
Niños enfermos	Niños de edades entre 1 a 15 años que presentaban malaria.

Tabla 21: Clasificación de los pacientes separados por edad y sexo y entre sanos y enfermos.

4.2.1. Valores de Referencia

El cálculo de los valores de referencia se realiza en tres fases, la fase preanalítica, la analítica y la postanalítica como se explica en el apartado 3.13 de material y métodos.

4.2.1.1. Fase Preanalítica

En ambos grupos “enfermo” y “sano” los criterios de exclusión y participación como individuo de referencia se establecieron a posteriori de la toma de muestra. Los criterios que se establecieron para ambos grupos se muestran en la tabla 22.

Grupo sanos	Criterios de exclusión	<ul style="list-style-type: none"> - Mujeres embarazadas - Muestras positivas de Malaria - Serología positiva para HIV - Muestras de individuos positivas para helmintos intestinales - Muestras sin el dato de edad o sexo
	Criterios de participación	<ul style="list-style-type: none"> - Edad - Sexo - Dato de hemoglobina - Pacientes del Hospital de Gambo que fueron derivados al laboratorio por el personal sanitario
Grupo enfermos	Criterios de exclusión	<ul style="list-style-type: none"> - Mujeres embarazadas - Muestras negativas de Malaria - Serología positiva para HIV - Muestras de individuos positivas para helmintos intestinales - Muestras sin el dato de edad o sexo
	Criterios de participación	<ul style="list-style-type: none"> - Edad - Sexo - Muestra positiva de Malaria - Dato de hemoglobina - Pacientes del Hospital de Gambo que fueron derivados al laboratorio por el personal sanitario

Tabla 22: Criterios de participación y exclusión.

El grupo de sanos contó con un total de 292 muestras y el grupo de enfermos con 74 muestras. Sólo se excluyeron 4 muestras, 3 del grupo sanos y una del grupo enfermos. Del grupo sano, una muestra pertenecía a una mujer embarazada y las otras dos muestras eran positivas a helmintos intestinales de un hombre y un niño. La muestra del grupo enfermo era positiva a helmintos intestinales del grupo de niños. El total de las muestras se dividen en el caso de las mujeres en 130 sanas y 25 enfermas, los hombres en 88 sanos y 12 enfermos y por último los niños en 74 sanos y 37 enfermos.

Las woredas a las que pertenecen 285 (77%) pacientes que forman parte del estudio poseen altitudes desde los 1408 m hasta los 2755 m sobre el nivel del mar, siendo la mayoría de los pacientes de la woreda de Negele que está a una altitud de 1992 m (tabla 23), en 85 (23%) pacientes no se contó con el dato de la woreda a la que pertenecían.

Woreda	Altitud	Porcentaje de pacientes
Asoka	1408 m	1%
Shala	1552 m	3,5%
Seraro	1582 m	1,7%
Adami Tulu	1651 m	6,7%
Awasa	1680 m	0,5%
Negele	1992 m	50,5%
Shashemane	2009 m	4,2%
Asasa	2367 m	5,3%
Dodola	2488 m	1,7%
Munesa	2510 m	3,5%
Kofele	2515 m	3,2%
Kokosa	2556 m	0,5%
Kore	2755 m	18,2%

Tabla 23: Altitud de las woredas a la que pertenece la población a estudio.

4.2.1.2. Fase Analítica

Los datos de hemoglobina se obtuvieron con el aparato Hemo-Control EKF Diagnostic que permite cuantificar de forma rápida y exacta la hemoglobina en la sangre. Consta de un fotómetro de mano y micro cubetas para la lectura de las tiras elaboradas para el diagnóstico por química seca. Las muestras se

analizaron en el servicio de laboratorio del Hospital de Gambo siguiendo el procedimiento explicado en el apartado 3.3.1 de material y métodos y los resultados se muestran en el anexo 2.

Diariamente se realizaba un control del aparato empleando una muestra control suministrada por el fabricante con un valor de hemoglobina conocido donde se comprueba la correcta calibración del aparato Hemo-Control EKF Diagnostic.

El sistema Hemo-Control ofrece una gran precisión al compararlo con los métodos estándar empleados en los laboratorios (Johns y Lewis 1989). Esto hace que sea posible incluir los resultados de hemoglobina obtenidos a través de este sistema en los estudios de salud y de nutrición (WHO 2001).

4.2.1.3. Fase Postanalítica

La distribución de los datos se determinó empleando el estadístico Kolmogorov-Smirnov. Para la homocedasticidad, que determinar la homogeneidad de los datos, se utilizó el estadístico de Levene en los grupos de mujeres, hombres y niños. En ambas pruebas se utilizó un valor de significancia $p > 0,05$.

La comparación entre sanos y enfermos en los tres grupos se realizó mediante la t de Student con una significancia exigida de $p < 0,05$. Para los valores de referencia se empleó la prueba paramétrica t de Student debido a que los datos poseen una distribución gaussiana. Mediante este test estadístico se determina el intervalo de confianza al 95% de cada límite de referencia calculándose los percentiles correspondientes a los límites de referencia.

La asociación entre la malaria y la anemia se determina mediante una tabla de contingencia y para demostrar si la presencia de malaria aumenta o disminuye la probabilidad de padecer anemia, se estima el riesgo probabilístico (OR).

A continuación se analizan los datos de los grupos establecidos anteriormente.

4.2.1.3.1. Análisis de los datos de hemoglobina según la altitud

Los valores de hemoglobina se agruparon en dos grupos que corresponden a diferentes altitudes. El primer grupo está formado por los valores que se encuentran a 1600 ± 500 m de altitud y el segundo grupo a 2600 ± 500 m. La media del valor de la hemoglobina, su desviación típica y el número de pacientes que forman cada grupo se muestra en la tabla 24. Los valores de hemoglobina a 1600 ± 500 m y a 2600 ± 500 m de altitud del grupo de las mujeres, los hombres y los niños siguen una distribución normal y son homogéneos con valores de significancia $p > 0,05$.

Altitud	Mujeres		Hombres		Niños	
	Media (Desv. Tip.)	Nº Pacientes	Media (Desv. Tip.)	Nº Pacientes	Media (Desv. Tip.)	Nº Pacientes
1600 ± 500 m	12,1 ($\pm 2,6$)	92	12,8 ($\pm 2,7$)	52	10,3 ($\pm 3,2$)	49
2600 ± 500 m	12,9 ($\pm 2,7$)	36	13,7 (± 3)	30	10,9 (± 3)	26

Tabla 24: Valores medios de la hemoglobina separado por grupo y por altitud.

Las medias a 2600 ± 500 m son superiores a las medias a 1600 ± 500 m, haciendo suponer un aumento en los valores de la hemoglobina al aumentar la altitud. Se observa que los valores de las desviaciones típicas ocasionan que las medias se solapen unas con otras. Mediante el test estadístico t de Student se comprobó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los valores de hemoglobina a las distintas altitudes tanto en las mujeres, los hombres y los niños (tabla 25). Esto nos permite obtener los valores de referencia empleando todos los datos porque podemos considerar que las muestras pertenecen a una única población.

Mujeres		Hombres		Niños	
t	p valor	t	p valor	t	p valor
1,505	>0,05	1,478	>0,05	0,792	>0,05

Tabla 25: Valores de t y p valor obtenidos mediante el test t de Student para el grupo de las mujeres, los hombres y los niños.

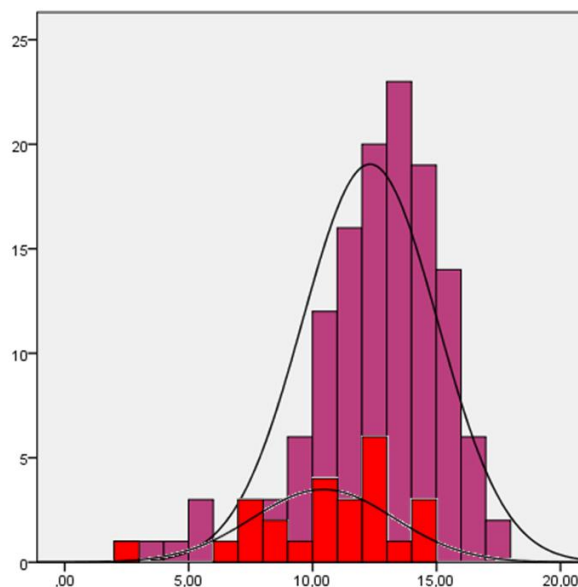
4.2.1.3.2. Valores de Referencia en la hemoglobina del grupo de las Mujeres

Los datos estadísticos de hemoglobina (g/dL) de las mujeres separadas entre sanas y enfermas es muestran en la tabla 26.

	Mujeres	
	Sanas	Enfermas
Moda	14	14
Media	12,32	10,43
Mediana	12,9	11
Desv. Típ.	2,7	2,8
Mínimo	2,1	2,3
Máximo	17,9	14

Tabla 26: Datos estadísticos de hemoglobina del grupo de las mujeres.

En la gráfica 11 se representan los valores de las hemoglobinas del grupo sanas y enfermas.



Gráfica 11: Representación gráfica de los valores de hemoglobinas. En color violeta se representa el grupo sanas y en rojo el grupo enfermas.

Los resultados de los análisis estadísticos realizados demostraron que los datos de hemoglobina de las mujeres sanas y enfermas siguen una distribución normal y son homogéneos al obtenerse valores de significancia $p > 0,05$. Al realizar la *t* de Student los resultados demostraron que hay diferencias significativas entre sanos y enfermos en el grupo de las mujeres con un valor de $t = 3,158$ $p < 0,05$.

Nuestros resultados establecen unos límites de referencia para el grupo de las mujeres sanas de 11,8 a 12,8 g/dL de hemoglobina y para las mujeres enfermas de 9,2 a 11,6 g/dL (tabla 27).

		Mujeres Sanas	Mujeres Enfermas
Intervalo de confianza al 95%	Límite inferior	11,8529	9,2498
	Límite superior	12,7979	11,6142
Percentiles	25	11,0000	8,2000
	50	12,9000	11,0000
	75	14,0000	12,5000

Tabla 27: Límites de referencia para el grupo de las mujeres sanas y enfermas.

Basándonos en la clasificación establecida por Schellenberg *et al.* 2003, que establecieron los valores de hemoglobina como anemia ligera si el valor de la hemoglobina es inferior a 11 g/dL y mayor a 8 g/dL, moderada si es menor a 8 g/dL y mayor de 5 g/dL y severa si es menor a 5g/dL, nuestros resultados muestran que el 23,8% de las mujeres sanas presentan anemia frente el 48% del grupo de las enfermas, mostrando en ambos grupos los tres tipos de anemia (tabla 28).

	Sanas	Enfermas
Total	23,8%	48%
Ligera	70%	58,3%
Moderadas	20%	33,3%
Severas	10%	8,3%

Tabla 28: Datos de anemia del grupo de las mujeres sanas y enfermas.

Según nuestros resultados, se deberían considerar anemia a partir de 11,8 g/dL de hemoglobina y establecer la clasificación en base a 3 desviaciones típicas. Obtendríamos como anemia ligera si el valor de la hemoglobina es inferior a 11,8 g/dL y mayor a 8,8 g/dL, anemia moderada si es menor que 8,8 g/dL y mayor a 5,8 g/dL y severa si es menor a 5,8 g/dL. En base a esta nueva clasificación tenemos que el 35,4% de las mujeres sanas presentan anemia frente al 60% de las enfermas predominando en ambos grupos la anemia de tipo ligera (tabla 29).

	Sanas	Enfermas
Total	35,4%	60%
Ligera	69,6%	46,7%
Moderadas	17,4%	46,7%
Severas	13%	6,6%

Tabla 29: Datos de anemia del grupo de las mujeres sanas y enfermas.

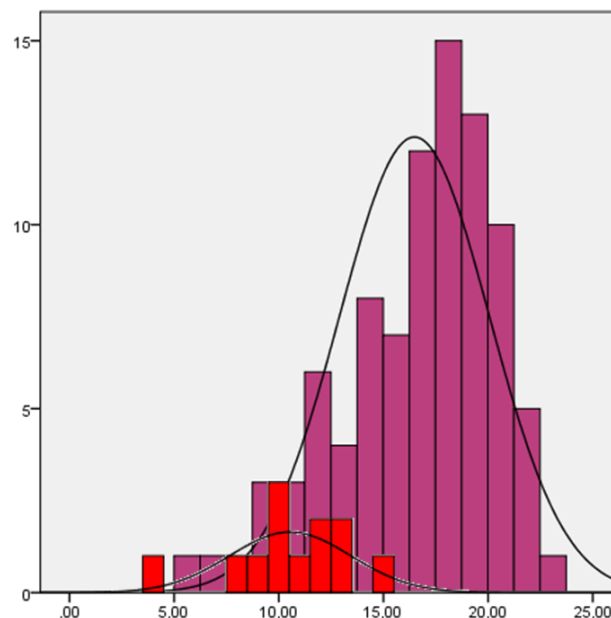
4.2.1.3.3. Valores de Referencia en la hemoglobina del grupo de los Hombres

Los valores estadísticos de la hemoglobina (g/dL) se muestran en la tabla 30 para el grupo de los hombres separados en sanos y enfermos.

	Hombres	
	Sanos	Enfermos
Moda	13	3,6
Media	13,19	10,54
Mediana	13,9	10,8
Desv. Típ.	2,8	2,9
Mínimo	4,3	3,6
Máximo	18,2	14,5

Tabla 30: Datos estadísticos de hemoglobina del grupo de los hombres.

En la gráfica 12 se representan los valores de las hemoglobinas de los grupos sanos y enfermos.



Gráfica 12: Representación gráfica de los valores de hemoglobinas. En color violeta se representa el grupo sanos y en rojo el grupo enfermos.

Los datos de hemoglobina de los hombres sanos y enfermos siguen una distribución normal y son homogéneos al obtenerse valores de significancia $p > 0,05$. Las pruebas estadísticas mostraron que hay diferencias significativas entre sanos y enfermos con un valor de $t=3,003$ $p < 0,05$.

Los límites de referencia establecidos fueron de 12,6 a 13,8 g/dL de hemoglobina en el grupo sanos y de 8,7 a 12,4 g/dL en el grupo enfermos en nuestra zona de estudio (tabla 31).

		Hombres Sanos	Hombres Enfermos
Intervalo de confianza al 95%	Límite inferior	12,5893	8,6949
	Límite superior	13,7972	12,3884
Percentiles	25	11,1000	9,2500
	50	13,9000	10,8000
	75	15,3000	12,6500

Tabla 31: Límites de referencia para el grupo de los hombres sanos y enfermos.

En base a nuestros resultados y determinando la clasificación del tipo de anemia en base a 3 desviaciones típicas, se puede establecer como anemia ligera si el valor de la hemoglobina es inferior a 12,6 g/L, moderada si es menor a 9,6g/dL y severa si es menor a 6,6g/dL. En base a esta clasificación el 33,7% de los hombres del grupo de los sanos presentan alguna anemia frente el 75% del grupo de los enfermos (tabla 32).

	Sanos	Enfermos
Total	33,7%	75%
Ligera	63,3%	66,7%
Moderadas	30%	22,2%
Severas	6,7%	11,1%

Tabla 32 Datos de anemia de los sanos y enfermos del grupo de los hombres.

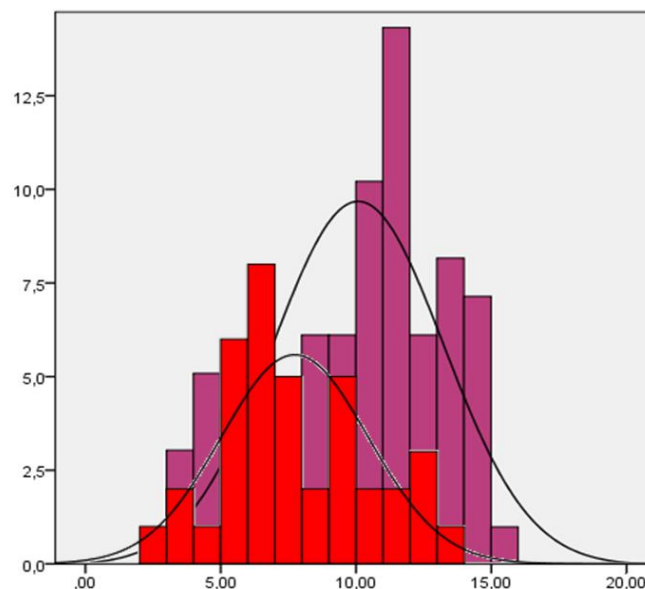
4.2.1.3.4. Valores de Referencia en la hemoglobina del grupo de niños

El grupo de los niños separados en sanos y enfermos muestran algunas diferencias en los datos estadísticos de hemoglobina (g/dL) como se observa en la tabla 33.

	Niños	
	Sanos	Enfermos
Moda	11	6,8
Media	10,06	7,67
Mediana	10,85	7,2
Desv. Típ.	3,2	2,7
Mínimo	3,2	2
Máximo	15,8	13

Tabla 33: Datos estadísticos de hemoglobina del grupo de los niños.

En la gráfica 13 se representan los valores de las hemoglobinas de los grupos sanos y enfermos.



Gráfica 13: Representación gráfica de los valores de hemoglobinas. En color violeta se representa el grupo sanos y en rojo el grupo enfermos.

En el grupo de niños los datos siguen una distribución normal y son homogéneos al obtenerse un valor de significancia $p > 0,05$. Estadísticamente se demostraron que hay diferencias significativas entre sanos y enfermos en el grupo de los niños con un valor de $t = 3,917$ $p < 0,05$.

Se establecieron límites de referencia mediante la prueba t de Student. Estos límites fueron de 9,4 a 10,8 g/dL de hemoglobina en el grupo sanos y de 6,8 a 8,6 g/dL para el grupo de los enfermos en nuestra zona de estudio (tabla 34).

		Niños Sanos	Niños Enfermos
Intervalo de confianza al 95%	Límite inferior	9,36	6,76
	Límite superior	10,80	8,58
Percentiles	25	8,50	5,50
	50	10,90	7,35
	75	12,25	9,80

Tabla 34: Límites de referencia para el grupo de los niños sanos y enfermos.

Basándonos en la clasificación establecida por Muhe *et al.* 2000, quienes establecieron los valores de hemoglobina como anemia ligera si el valor de la hemoglobina es inferior a 11 g/dL y mayor a 8 g/dL, moderada si es menor a 8 g/dL y mayor de 5 g/dL y severa si es menor a 5g/dL, nuestros resultados muestran que el 60,8% de los niños del grupo sanos presentan alguna anemia frente el 86,5% del grupo de los enfermos (tabla 35).

	Sanos	Enfermos
Total	60,8%	86,5%
Ligera	64,4%	28,1%
Moderadas	18%	59,4%
Severas	17,6%	12,5%

Tabla 35: Datos de anemia de los sanos y enfermos del grupo de los niños.

Según nuestro valor de referencia obtenido y dado que no hay antecedentes clínicos de los rangos de hemoglobina establecemos una clasificación con 1 y 2 desviaciones estándar como anemia moderada y severa respectivamente. La clasificación quedaría de la siguiente forma, anemia de tipo ligera valores de hemoglobina por debajo de 9,4 g/dL y mayores de 8,4 g/dL, de tipo moderada valores por debajo de 8,4 g/dL y mayores de 7,4 g/dL y de tipo severa valores menores de 7,4 g/dL. Bajo esta clasificación el 33,8% de los niños sanos tienen algún tipo de anemia frente al 73% de los enfermos, estando presente los tres tipos de anemia en ambos grupos (tabla 36).

	Sanos	Enfermos
Total	33,8%	73%
Ligera	24%	11,1%
Moderadas	20%	18,5%
Severas	56%	70,4%

Tabla 36: Datos de anemia de los sanos y enfermos del grupo de los niños.

4.2.2. Asociación entre Malaria y Hemoglobina

En nuestra zona de estudio, considerándose anemia valores inferiores a 11,8 g/dL de hemoglobina en el grupo de las mujeres, se determinó mediante la tabla de contingencia (tabla 37) y el test estadístico Chi-cuadrado de Pearson ($X^2 = 5,323$; $p < 0,05$) la existencia de un mayor riesgo entre las mujeres que están enfermas de malaria de presentar anemia. En la tabla 37 se observa que el 60% de las mujeres enfermas presentan anemia frente al 40% que presentan valores normales de hemoglobina y en las mujeres sanas el 35,4% presentan anemia que no está causada por *Plasmodium*. Estos resultados indican que la malaria no es la principal causa de anemia en la zona de estudio.

Mujeres		Anemia	Normal
Enfermas	Recuento	15	10
	% dentro de Mujeres	60,0%	40,0%
Sanas	Recuento	46	84
	% dentro de Mujeres	35,4%	64,6%
Total	Recuento	61	94
	% dentro de Mujeres	39,4%	60,6%

Tabla 37: Relación entre malaria y anemia del grupo de las mujeres.

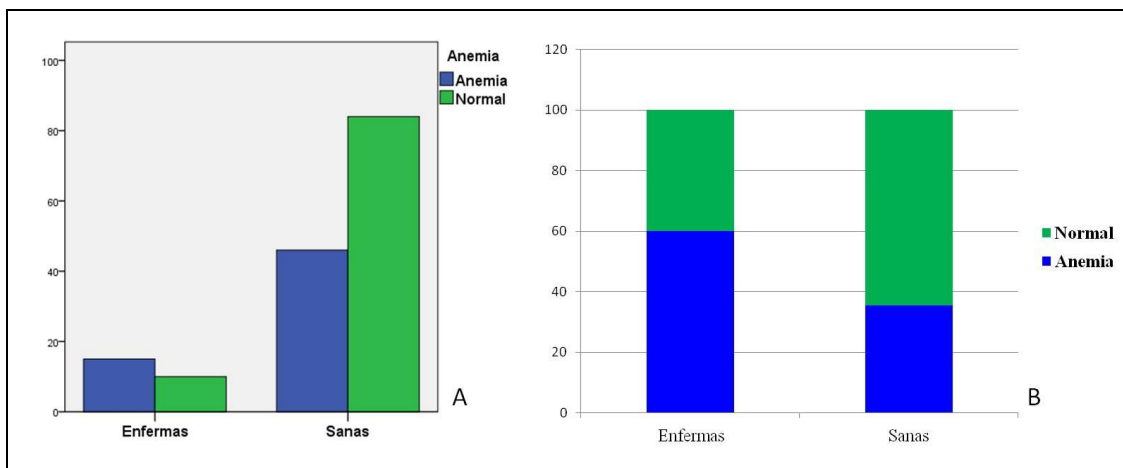
En el grupo de los hombres se emplea el test estadístico de Fisher con un $p < 0,05$ para estimar la asociación entre malaria y anemia por permitir calcular la asociación cuando se producen frecuencias menores de 5 entre los datos, como es nuestro caso donde se observa en el número de muestras de los hombres enfermos con valores de hemoglobina normales (tabla 38). El estadístico demostró que existen evidencias de un mayor riesgo entre los hombres enfermos de presentar anemia en nuestra área de estudio. De los hombres enfermos el 75% presentan anemia frente al 25% que presentan valores normales y en los hombres sanos el 33,7% presentan anemia frente al 66,3% que muestran valores normales.

Hombres		Anemia	Normal
Enfermos	Recuento	9	3
	% dentro de Hombres	75,0%	25,0%
Sanos	Recuento	30	59
	% dentro de Hombres	33,7%	66,3%
Total	Recuento	39	62
	% dentro de Hombres	38,6%	61,4%

Tabla 38: Relación entre malaria y anemia del grupo de los hombres.

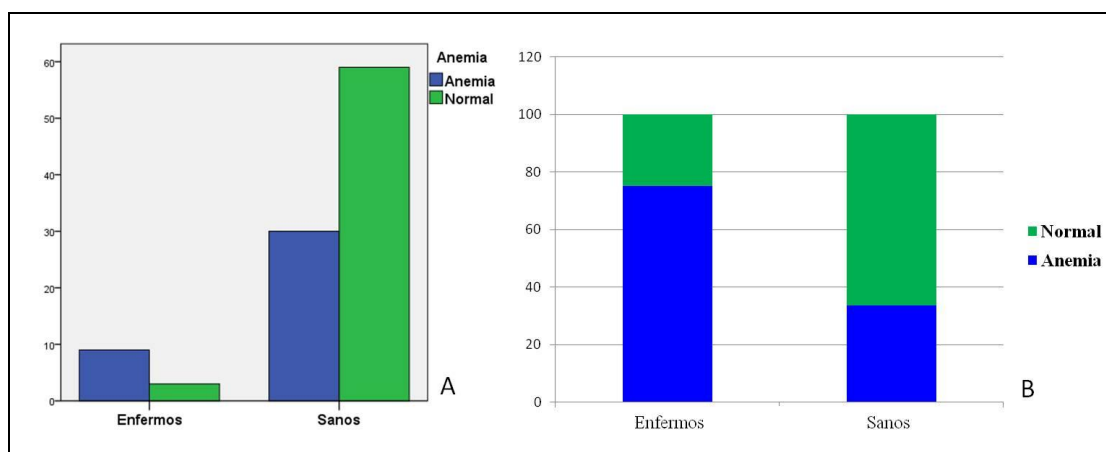
Tanto en el grupo de las mujeres como en el de los hombres que presentan anemia, aproximadamente el 24% de estos pacientes padecen malaria y en el 76% la anemia debe estar causa por otros factores.

La relación entre mujeres sanas y enfermas con la anemia se muestra en el gráfico 14 en valores absolutos (A) y en porcentajes (B).



Gráfica 14: Representación gráfica de la anemia relacionada en mujeres sanas y enfermas en valores absolutos (A) y en porcentajes (B).

En el gráfico 15 se muestra la variable dependiente que es la anemia, en la gráfica A en valores absolutos y en la B en porcentajes.



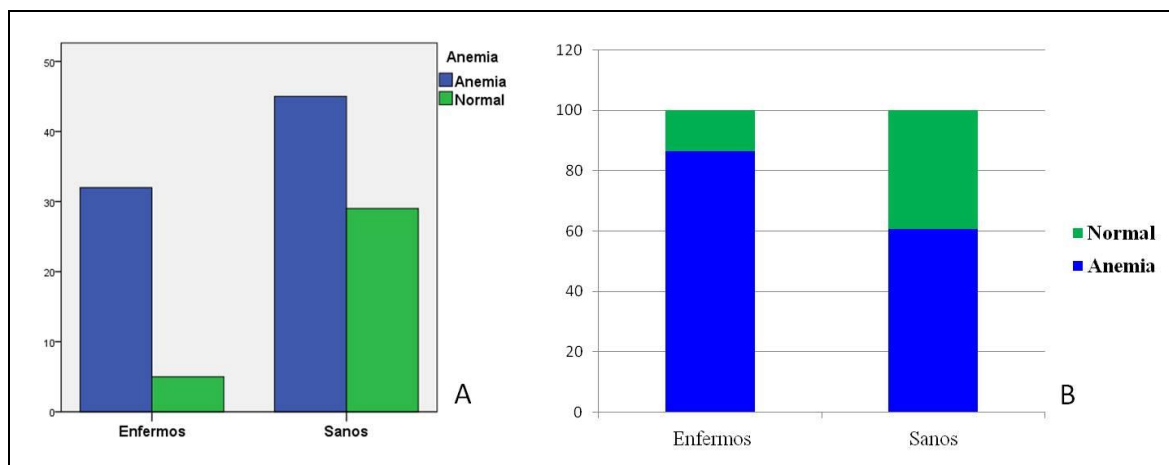
Gráfica 15: Representación gráfica de la anemia relacionada en hombres sanos y enfermos en valores absolutos (A) y en porcentajes (B).

La asociación entre la malaria y la hemoglobina del grupo de los niños, estableciendo el valor de la anemia en 11 g/dL y mediante el test estadístico Chi-cuadrado de Pearson ($X^2=7,653$; $p<0,05$), se estimó que existen evidencias de un mayor riesgo entre los niños enfermos de presentar anemia que los niños libres de malaria. Los niños enfermos presentan anemia en un 86,5% de los casos frente al 13,5% que presentan valores normales de hemoglobina y el 60,8% de los niños sanos presentan anemia frente al 39,2% que tiene valores normales (tabla 39).

Niños		Anemia	Normal
Enfermos	Recuento	32	5
	% dentro de Niños	86,5%	13,5%
Sanos	Recuento	45	29
	% dentro de Niños	60,8%	39,2%
Total	Recuento	77	34
	% dentro de Niños	69,4%	30,6%

Tabla 39: Relación entre malaria y anemia del grupo de los niños.

En la gráfico 16 se muestra la anemia relacionada en niños sanos y enfermos en valores absolutos (A) y en porcentajes (B).



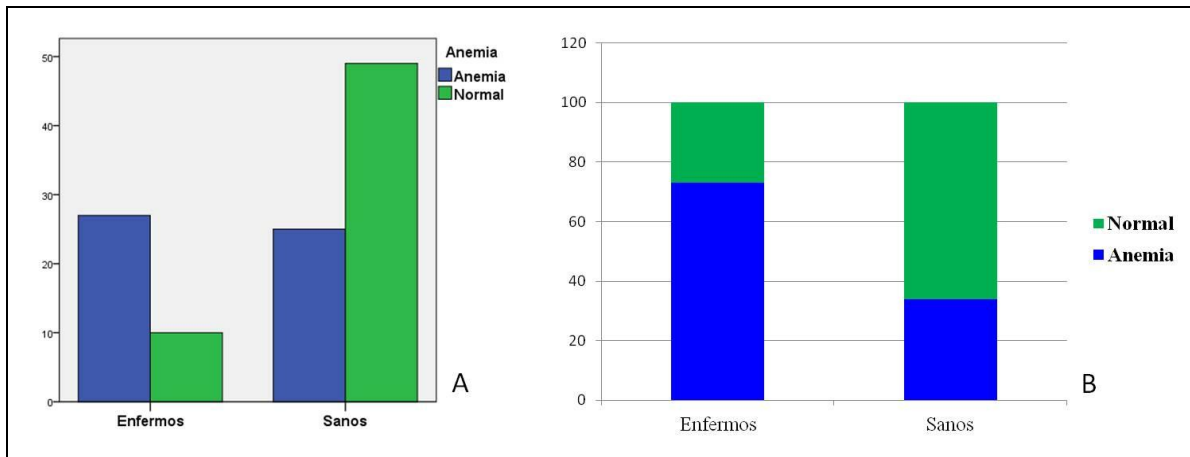
Gráfica 16: Representación gráfica de la anemia relacionada en niños sanos y enfermos en valores absolutos (A) y en porcentajes (B).

Basándonos en los valores de referencias obtenidos para el grupo de los niños en los cuales el valor de anemia se considera a partir de 9,4 g/dL, se determinó mediante el Chi-cuadrado de Pearson ($X^2=15,214$; $p<0,05$) que los niños enfermos de malaria tienen mayor probabilidad de padecer anemia. El 73% de los niños enfermos presentan anemia frente al 27% y los niños sanos el 33,8% poseen anemia frente al 66,2% que tienen valores normales de hemoglobina (tabla 40). Los niños sanos que presentan anemia puede ser debida a varios factores, que cuando se combinan con la infección con malaria producen un aumento de las anemias más severas. Los niños enfermos y que no muestran anemia puede ser debido a que no presentan los otros factores que causan la anemia en los sanos.

Niños		Anemia	Normal
Enfermos	Recuento	27	10
	% dentro de Niños	73,0%	27,0%
Sanos	Recuento	25	49
	% dentro de Niños	33,8%	66,2%
Total	Recuento	52	59
	% dentro de Niños	46,8%	53,2%

Tabla 40: Relación entre malaria y anemia del grupo de los niños.

El grupo de los niños de nuestra zona de estudio que padecen malaria tienen 5,3 veces más probabilidad de padecer anemia que los niños que no están infectados de *Plasmodium* (OR=5,292, con intervalo de confianza (CI) al 95% de 2,215 y 12,643). En la gráfica 17 se muestra la anemia relacionada en niños sanos y enfermos en valores absolutos (A) y en porcentajes (B).

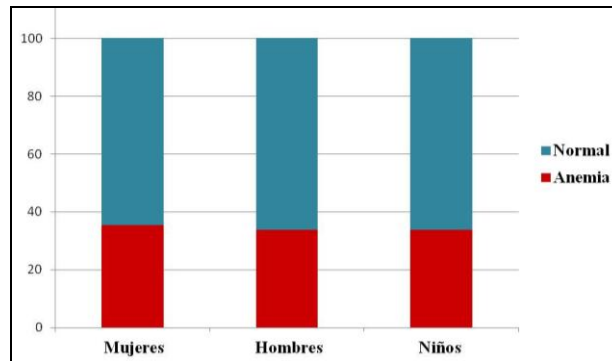


Gráfica 17: Representación gráfica de la anemia relacionada en niños sanos y enfermos en valores absolutos (A) y en porcentajes (B).

Analizando los datos de anemia presentes en los niños se obtiene, considerando valores inferiores a 11 g/dL de hemoglobina como anemia, que el 41,6% la anemia está asociada a la malaria y el 58,4% está causada por otros factores. Al analizar los datos de anemia considerando el valor de 9,4 g/dL de hemoglobina como el límite inferior en los valores de referencia de este estudio, se obtiene que el 52% de los casos la anemia está asociada a la malaria frente al 48% que es producida por otras causas.

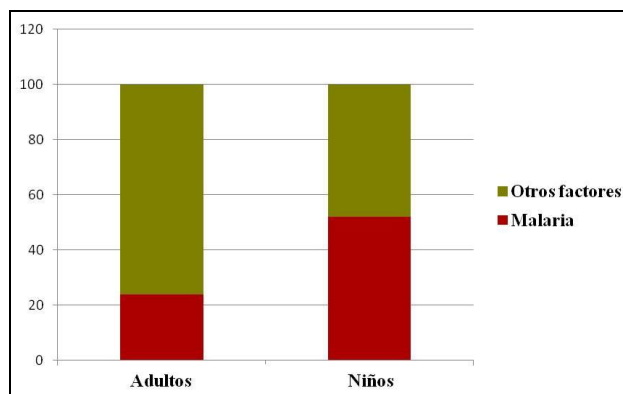
En el grupo de los niños la malaria es la principal causa de anemia ya que en el 52% de los pacientes la anemia está asociada a la malaria y en cambio en los adultos solo un 24% presentan anemia ocasionada por la malaria.

Utilizando el valor de 9,4 g/dL de hemoglobina para definir la anemia en niños podemos ver que el porcentaje de sanos que presentan anemia es del 33,8%, en el grupo de las mujeres es de 35,4% y en los hombres de 33,7%, pudiendo considerarse en torno al 34,3% el porcentaje de la población sana que va a presentar anemia (gráfica 18).



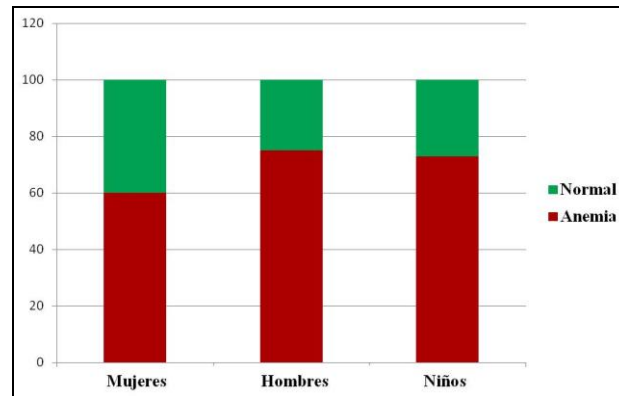
Gráfica 18: Porcentajes de anemia en el grupo sano de las mujeres, los hombres y los niños.

La anemia asociada a la malaria en adultos se produce en el 23,8% de los casos, y en el grupo de los niños en el 52% de los pacientes estudiados (gráfica 19).



Gráfica 19: Porcentaje de anemia causada por malaria y por otros factores en los adultos y los niños.

La anemia, en el caso de las mujeres no es un buen criterio de selección para el diagnóstico de la malaria ya que el 40% de las mujeres infectadas con malarías no serían detectadas. En el caso de los hombres y los niños si sería un buen criterio de selección porque solo se perdería el 25% de los infectados (gráfica 20).



Gráfica 20: Anemia en porcentajes en el grupo enfermos de las mujeres, los hombres y los niños.

En el grupo de las mujeres y los hombres infectados con malaria el análisis estadístico realizado en los valores de hemoglobina dio como resultado que no existen diferencias significativas entre los valores de hemoglobina que producen *P. falciparum* y *P. vivax* (tabla 41). En el grupo de los niños si se observan diferencias significativas entre los datos de hemoglobina originadas por ambas especies de *Plasmodium* (tabla 41), siendo *P. falciparum* la especie que origina los valores más bajos de hemoglobina.

Mujeres		Hombres		Niños	
U	p valor	U	p valor	U	p valor
45,500	>0,05	11,000	>0,05	98,000	<0,05

Tabla 41: Valores de U y p valor obtenidos mediante el test U de Mann-Whitney en el grupo de as mujeres, los hombres y los niños.

DISCUSIÓN

5. Discusión

El método de diagnóstico más empleado en los estudios de prevalencia de la malaria es la microscopía debido, principalmente, a que es un método barato y sencillo. Las limitaciones del método están en la necesidad de expertos analistas con experiencia en el diagnóstico de malaria y la baja sensibilidad (McKenzie *et al.* 2003 y Boonma *et al.* 2007).

En la actualidad se han propuesto las técnicas moleculares como las más adecuadas para el diagnóstico de la malaria (Harris *et al.* 2010), esto se debe a su alta sensibilidad y especificidad en la detección de *Plasmodium*. Esta técnica podría ser útil cuando la densidad parasitaria es baja, como ocurre en los momentos del ciclo biológico donde se produce la fase gametocítica del parásito o cuando las poblaciones adquieren cierta inmunidad (Johnston *et al.* 2006 y Okell *et al.* 2009). El empleo de la n-PCR propuesta por Snounou *et al.* 1993 es la más utilizada por ser del orden de 5 veces más sensible que el diagnóstico por microscopía (Gama *et al.* 2007).

En este trabajo hemos empleado 3 métodos de diagnóstico para *Plasmodium*, demostrando que el método de n-PCR se establece como el más sensible. Este método es capaz de detectar todos los positivos observados por microscopía y al mismo tiempo, detectar parásitos en pacientes negativos por microscopía. El hecho de que estas muestras fueron posteriormente confirmadas como positivas tras un largo periodo de visualización, nos ha permitido establecer como verdaderos positivos y negativos los resultados obtenidos por n-PCR.

Nuestros resultados ponen de manifiesto que mediante el diagnóstico microscópico el 5,5% de la población estudiada se encuentra parasitada, mientras que por la n-PCR se detecta el 10,5%. Esta mayor sensibilidad de las técnicas moleculares ya ha sido demostrada ampliamente por otros autores como Hanscheid y Grobusch 2002 y Steenkeste *et al.* 2009.

Al hacer el análisis de la sensibilidad para el método de microscopía por especie y grupo de edad (adultos y niños), los resultados reflejan que en el caso de *P. vivax* la sensibilidad es del 50% y del 66,6% respectivamente en el grupo de los adultos y los niños, mientras que para *P. falciparum* en el caso de los niños se reduce al 20% (1/5). Nuestros resultados nos demuestran que se hace imprescindible el uso de métodos moleculares frente a la microscopía debido a que con este último método se deja de detectar el parásito en un buen grupo de pacientes.

La prevalencia de malaria obtenida en este estudio es del 10%, resultado ligeramente inferior al establecido por el Ministerio de Salud de Etiopía, quien determinó en 2007-2008, una prevalencia del 12%. Con estos datos se estableció a la malaria como la primera causa de visita a los hospitales. Una de las razones que justifica la menor prevalencia obtenida en nuestro estudio es que el muestreo se realizó entre los meses de enero a mayo que coinciden con el periodo más bajo de transmisión.

El porcentaje de mujeres parasitadas fue del 6,25%, 2,4 veces mayor que el porcentaje de hombres parasitados. No hay hasta el momento teorías científicas que justifiquen este hecho.

El 92% de las mujeres parasitadas tienen edades entre 16 y 39 años. Este grupo de edades representan el 83,4% de las mujeres analizadas. Las mujeres en este grupo de edad presentan el doble de posibilidad de estar infectadas con malaria que las mujeres de edades superiores a los 40 años, como así lo demuestra el hecho de que el 7% (11/161) de las mujeres eran positivas para el primer grupo de edad, mientras que sólo un 3,1% (1/32) del segundo grupo de edad estaban parasitadas.

El porcentaje de niños parasitados fue del 10,9%, 2,2 veces mayor que el porcentaje de adultos, lo que representa una diferencia significativa ($p < 0,05$). A diferencia de los adultos la probabilidad de los niños de infectarse es la misma en todos los grupos de edad desde 1-15 años, encontrándose que 1 de cada 9 niños está parasitado. En este grupo de edad se hace especialmente crítico el uso de

métodos moleculares porque, mediante el método microscópico, 10 de los 18 casos positivos pasan desapercibidos.

Tradicionalmente se ha indicado que la cota de los 2000 m de altitud es la barrera de transmisión de la malaria. Nuestros resultados muestran valores positivos para *Plasmodium* en población situada en torno a los 2000 m y a los 2500 m de altitud. El porcentaje de las muestras positivas en 2000 m fue del 9,15% y el detectado en 2500 m de altitud fue del 8,95%. Los resultados demuestran que no existe diferencia en la posibilidad de infectarse a 2000 m o a 2500 m de altitud, por tanto esto nos indica que la altitud no es un factor limitante en la transmisión de la malaria en esta zona. Algunos autores indican que el calentamiento global es una de las mayores causas por la que aparecen epidemias de malaras en zonas de gran altitud (Martens *et al.* 1995 y Lindsay y Martens 1998). Debido a estas afirmaciones y basándonos en nuestros resultados se podría refutar lo sugerido por Cox *et al.* 1999, quienes ponen el corte para la transmisión de la malaria a 2000 m de altitud.

Al separar los resultados en adultos y niños en ambas altitudes se comprobó que la población infantil tiene el doble de probabilidad de estar infectado frente a los adultos cuando viven en cotas de 2000 m de altitud, mientras que a 2500 m es equivalente, ver apartado 4.1.3. Los niños durante su infancia desarrollan inmunidad en las zonas de alta transmisión, como proponen algunos autores (Baird 1995 y Lusingu *et al.* 2004) y hace que los adolescentes y los adultos sean capaces de controlar la parasitemia, por lo que pocas veces desarrollan los síntomas de la malaria. En zonas de baja transmisión de la malaria, la capacidad protectora de la inmunidad se desarrolla muy poco, por lo que la malaria se desarrolla en todos los grupos de edad (Giha *et al.* 2000 y Smith *et al.* 2007).

En nuestra área de estudio de Etiopía, las zonas de mayor altitud no producen protección debido a que se comportan como zonas de baja transmisión de la malaria afectando a todos los grupos de edad, a diferencia de las zonas de

menor altitud que se comportan como zonas de alta transmisión afectando en su mayoría a los niños.

Como el estudio se realizó en la época de baja prevalencia de la malaria, las zonas de menor altitud dan unos valores de prevalencia que corresponden a zonas de moderada transmisión.

En Etiopía, en ciertas *woredas* de las regiones de Oromia, Karunamoorthi y Bekele en 2009 mediante microscopía y Graves *et al.* 2009 mediante test de diagnóstico rápido, determinaron una mayor prevalencia para *P. falciparum* en las infecciones diagnosticadas con respecto a *P. vivax*. Sin embargo, Mula *et al.* 2011 observaron una disminución de la prevalencia de *P. falciparum* frente a un aumento de *P. vivax* en la región de Oromia en estudios realizados desde noviembre del 2007 hasta mayo de 2009 y Ashton *et al.* 2011 encontraron mayor proporción de infecciones causadas por *P. vivax* en un estudio realizado de octubre a diciembre de 2009. Nuestro estudio realizado en la región de Oromia determina que la especie que presentaba mayor prevalencia fue *P. vivax* frente a *P. falciparum*. En *P. vivax* se determinó una prevalencia del 70% y en *P. falciparum* del 30% de las muestras parasitadas. El mayor porcentaje de una especie frente a la otra ha podido ser debido por una parte el realizar el estudio en una zona de alta montaña donde se establece que *P. vivax* predomina en un 90% en las epidemias que se producen (Ashton *et al.* 2011) y por otra parte, simplemente a la transmisión variable e inestable de las zonas altas que favorece el aumento de casos de *P. vivax* (Abeku *et al.* 2003).

Otro posible factor es el hecho de que *P. vivax* puede soportar menores temperaturas y *P. falciparum* requiere temperaturas superiores a 20°C para poder completar su ciclo biológico (CDC 2010).

Kitaw *et al.* 1989 determinaron que *P. vivax* tiende a predominar durante la estación seca mientras que *P. falciparum* predomina en los picos de transmisión de la malaria. Por otra parte, los casos de recidivas e infecciones crónicas a largo plazo de *P. vivax* podrían incrementar la prevalencia de la especie (Abeku *et al.* 2003 y Tesfaye *et al.* 2011).

La mayor prevalencia de *P. vivax* frente a *P. falciparum* en nuestro estudio podemos atribuirla a la época cuando se tomaron las muestras donde las temperaturas medias de los meses de enero a mayo favorecieron el predominio de *P. vivax* y al hecho de que esta especie predomina en zonas montañosas que es la característica geográfica de las woredas que han formado parte de nuestro estudio.

En la actualidad se propone la PCR a tiempo real como el método más sensible para la detección de *Plasmodium*. Por esta razón se decidió probar 2 tipos de qPCR, una comercial y otra mediante el diseño de *primer* y sondas en las muestras procedentes de Etiopía. Los resultados de ambas qPCR se contrastaron con los obtenidos en la n-PCR para determinar la sensibilidad de ambas técnicas. La sensibilidad obtenida con respecto a la n-PCR fue del 72,2% para la qPCR¹ y del 30,3% para la qPCR².

Actualmente existe controversia en el empleo de la PCR a tiempo real como método para el diagnóstico de la malaria. Nuestros resultados muestran que ambos métodos son válidos, pero en zonas donde la parasitemia es baja, las qPCR pierden sensibilidad. Esto ya fue demostrado cuando lo determinaron varios autores al establecer un límite de detección de 10 parásitos/mL (Schneider *et al.* 2005) o de 20 parásitos/mL (Hermsen *et al.* 2001) en la qPCR, en cambio la n-PCR al ser una doble amplificación es capaz de detectar menores parasitemias.

De estos resultados se puede proponer la n-PCR como la técnica de elección para la detección de la malaria en zonas endémicas donde podemos encontrar pacientes con niveles de bajas y altas parasitemias, mientras que recomendamos la PCR a tiempo real en zonas no endémicas por encontrar a pacientes con altas parasitemias.

La cuantificación parasitaria se realizó en las muestras que habían sido positivas por microscopía. Se correlacionaron la cuantificación obtenida en la gota gruesa con la obtenida en la qPCR¹ y en qPCR². La correlación obtenida entre la qPCR¹ y la qPCR² dieron como resultado correlaciones significativas

($R^2=0,980$, $p<0,05$), aunque la cuantificación realizada por qPCR² daba resultados de densidades parasitarias más bajos que los obtenidos por qPCR¹. Al analizar la correlación entre la microscopía y las técnicas moleculares solo se obtuvo una correlación significativa con la qPCR² ($R^2=0,682$, $p<0,05$). Esto puede ser debido a que ambas técnicas disminuyen las densidades parasitarias.

Entre los tres métodos se elige la cuantificación realizada por qPCR¹, ya que por microscopía la cuantificación es más subjetiva al considerarse como media en todas las muestras estudiadas la cantidad de 8000 leucocitos/ μ l de sangre (Prybylski *et al.* 1999) y por qPCR² porque la sensibilidad observada es menor que la sensibilidad de la qPCR¹. La correlación para *P. falciparum* no pudo ser analizada debido al bajo número de muestras positivas por microscopía.

Estudios previos han demostrado que los valores de la hemoglobina varían con la edad, el sexo, el origen étnico, la altitud, las características socio-demográficas y el contexto medioambiental (Hurtado *et al.* 1945, Badenhorst *et al.* 1995 y Saathoff *et al.* 2008). Desde 1930 varios autores han indicado una diferencia en la concentración de hemoglobina entre la raza blanca y la negra. Estudios realizados en población estadounidenses mostraron que en general la raza negra tiene niveles de hemoglobina entre 0,4 a 1 g/dL más bajo que la raza blanca (Dallman *et al.* 1984 y Yip *et al.* 1984), datos que coinciden con estudios realizados en diferentes regiones de África (Zeh *et al.* 2011 y Humberg *et al.* 2011), aunque estas diferencias han sido discutidas por varios autores proponiendo el estatus socioeconómico (Grantham-McGregor *et al.* 1974), los factores nutricionales, la diferencia genética o la deficiencia en hierro (Gran *et al.* 1981 y Beutler y West 2005) como la posible base para las diferencias en los niveles hematológicos (Alur *et al.* 2000).

Un estudio realizado por Hurtado *et al.* 1945 y Dirren *et al.* 1994, establecieron que se produce un incremento de la hemoglobina cuando se está expuesto a altitudes durante largos periodos de tiempo. Así determinaron que vivir en cotas de 1500 m suponía un aumento de 0,5 g/dL en el valor de la hemoglobina con respecto al nivel del mar, mientras que en cotas de 2000 m el

incremento era de 0,8 g/dL y en cotas de 2500 m el incremento era de 1,3 g/dL. Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo en las distintas altitudes, muestran que no se producen diferencias significativas entre los valores de la hemoglobina en la población estudiada. A pesar de que existan diferencias en las medias en las diferentes altitudes, las desviaciones típicas tan grandes hacen que los resultados no sean estadísticamente significativos.

Los valores de referencia establecidos en la población Estadounidense y Europea son para las mujeres de entre 12-16 g/dL y para los hombres de entre 13,5-17,5 g/dL (DAIDS 2005). Estudios elaborados en diferentes regiones de África muestran valores de hemoglobina contradictorios, ya que en Kenia se determinaron valores de hemoglobina inferior a la población estadounidense, (mujeres entre 8-14,2 g/dL y hombre entre 11,4-16,9 g/dL) (Zeh *et al.* 2011) y sin embargo, en Etiopía se obtuvieron valores similares a los caucásicos (mujeres entre 12,2-16,6 g/dL y hombres entre 13,9-18,3 g/dL) (Tsegaye *et al.* 1999).

Los valores de referencia obtenidos en nuestra área de estudio para el grupo de las mujeres sanas fue de entre 11,8 a 12,8 g/dL (media 12,3 g/dL) y en los hombres sanos entre 12,5 a 13,8 g/dL (media 13,2 g/dL), considerando el límite de referencia en un 95%. Nuestros valores mínimos de hemoglobina reflejan niveles similares a los establecidos para la población caucásica, coincidiendo con el otro estudio realizado en Etiopía. Por otra parte, nuestros datos reflejan que nuestra población a estudio no alcanza los valores máximos de hemoglobina que se observan en la población caucásica. La diferencia observada entre Etiopía y otros países Africanos puede ser debida a la altitud o bien a la dieta pobre y escasa (Van der Hof 1968 y Peters 1984).

En el caso de la población infantil Estadounidense y Europea el intervalo de referencia varía entre 11,5-15,5 g/dL (Kliegman *et al.* 2007), dichos valores son superiores a los establecidas en una población de Tanzania que presentan valores entre 10,3-14,7 g/dL (Buchanan *et al.* 2010) y en una población de Uganda que presenta valores entre 10-13,7 g/dL (Lugada *et al.* 2004). En la población infantil de este estudio se obtuvieron valores de referencia entre 9,4 a

10,8 g/dL (media 10,06 g/dL). El 95% de la población infantil sana de la región de estudio presentan valores ligeramente inferiores a Tanzania y Uganda y con un estrecho rango entre los valores. La diferencia con respecto a las poblaciones Estadounidenses y Europeos en los valores de referencia puede ser debido a varias causas como la existencia de un estado nutricional deficitario, o el alto índice de alteraciones genéticas como la α -talasemia o la anemia drepanocítica (anemia de células falciformes) en estas regiones (Beutler y Waalen 2006, Jima *et al.* 2010 y Maina *et al.* 2010).

En base a los valores de referencia obtenidos en este estudio podemos considerar individuos con anemia aquellos que presentan valores inferiores a 11,8 g/dL en las mujeres, a 12,5 g/dL en los hombres y a 9,4 g/dL en los niños. Estos valores se asemejan a los establecidos por la WHO en 2001 en la población adulta (12 g/dL en mujeres y 13 g/dL en los hombres) pero difiere del valor establecido para el grupo de los niños (11,5 g/dL).

La anemia es de las manifestaciones clínicas más frecuentes en la infección por *Plasmodium*. Algunos estudios han mostrado que el control de la malaria reduce la prevalencia de anemia, tanto moderada como severa. Esto ha llevado a algunos autores a indicar la presencia de anemia como indicador de malaria en zonas de inestable o de baja endemicidad (Schellenberg *et al.* 2003). Sin embargo, otros autores proponen la anemia como un indicador en el seguimiento y la monitorización de la malaria en zonas de alta o moderada transmisión, debido a que en estas zonas la fracción de anemia atribuible a la malaria es suficientemente alta como para reflejar los cambios en la transmisión y control del *Plasmodium* (Mathanga *et al.* 2010).

Nuestros resultados muestran una asociación entre la anemia y la malaria en los tres grupos de pacientes, pero esta asociación solo es significativa en el grupo de los niños con valores inferiores a 9,4 g/dL. La cuantificación de la asociación, que se mide estimando la probabilidad de padecer anemia estando infectado de malaria, determinó que el 52% de los niños anémicos presentan malaria, lo que nos indicaría que con presencia de anemia, los niños tienen 5,3

veces (95% CI 2,215-12,643) más probabilidad de estar infectados con *Plasmodium*. Cuando analizamos la anemia en los adultos sólo el 24,6% en las mujeres y el 23,1% en los hombres está asociado a la malaria, por lo que podemos establecer que en los adultos hay otros factores como deficiencias hemáticas, características genéticas, o infecciones recurrentes que van a predominar en la disminución de los valores de hemoglobina (Roberts *et al.* 2005).

Al analizar los pacientes con malaria, en el grupo de las mujeres el 60% de las enfermas tienen anemia. Por lo tanto, si usáramos la anemia como un indicador de sospecha de malaria en nuestro estudio el 40% de las infecciones con *Plasmodium* no serían detectadas, con lo cual el empleo de la anemia como principal indicador de sospecha de malaria no es recomendado en el grupo de las mujeres.

Por el contrario en el grupo de los hombres y los niños más del 70% que se encuentran infectados con *Plasmodium* presentan anemia. Si empleamos este análisis se perdería un 25% y un 27% respectivamente de individuos infectados por no presentar anemia. En estos grupos, podría considerarse la anemia como un criterio aceptable de selección para el diagnóstico y seguimiento de la malaria.

Al analizar la anemia en la población, sólo el 24,6% de las mujeres, el 23,1% de los hombres y el 52% de los niños, presentan anemias asociadas a la malaria. En el resto de la población la anemia pueden deberse a que esta población acumula diferentes factores como son las hemoglobinopatías, un estado nutricional deficitario o infecciones previas de malaria (Maina *et al.* 2010). Como conclusión, en la población adulta son estos factores los responsables de las anemias, y en la población infantil la malaria por si sola tiene un porcentaje de anemia igual al resto de los demás factores, por lo que la malaria es la principal causa de anemia.

En nuestra área de estudio tanto en el grupo enfermos de malaria como en el grupo sanos de los adultos predomina la anemia de tipo ligera. En el caso de las mujeres enfermas se produce un aumento en el porcentaje de anemia de tipo moderada y en los hombres enfermos aumenta la anemia de tipo severa.

En el caso de la población infantil la principal causa de anemia sigue siendo la malaria ya que, aunque los porcentajes de anemias producidos por otros factores son similares a los producidos por la malaria, los porcentajes de enfermos que presentan anemia son muy altos.

En el caso de los niños el 56% del grupo sanos presentan anemia severa y en el grupo enfermos este tipo de anemia aumenta hasta el 70,4% de los casos, esto puede ser debido por un lado que la carga parasitaria aumenta las anemias severas (Agan *et al.* 2010) y por otro lado que *P. falciparum* produce una disminución en los valores de hemoglobina ocasionando anemias más severas (Haldar y Mohandas 2009).

En este estudio hay que destacar que, al excluir los pacientes maláricos, en torno a un 30% de las personas sanas se detectan anemias en los tres grupos, coincidiendo con los valores detectados por Deribew *et al.* 2010 en una población infantil al suroeste de Etiopía, con lo cual podemos establecer que este es el porcentaje de anemia que presenta la población sana del área rural de Gambo.

CONCLUSIÓN

6. CONCLUSIONES

1°. Por detectar el doble de casos positivos, la nested PCR se considera el método de elección en el diagnóstico de la malaria. En el grupo de niños esta técnica se hace necesaria debido a que detecta 5 veces más casos de malaria producidos por *P. falciparum* que el método de microscopía.

2°. En zonas endémicas se observan muchos casos de bajas parasitemias, por lo que se propone la nested PCR como técnica para la detección de la malaria. En cambio en zonas no endémicas, al observarse parasitemias más elevadas se propone la PCR a tiempo real como el método de diagnóstico más rápido y simple.

3°. En la zona de Etiopía estudiada, la altitud no es un factor que interfiera en la transmisión de la malaria debido a que la posibilidad de infectarse a 2000 m es la misma que a 2500 m de altitud.

4°. Las woredas a 2000 m de altitud se comportan como zonas de alta transmisión de malaria ocasionando que las poblaciones durante la infancia desarrollen inmunidad disminuyendo la prevalencia en adultos. Las woredas a 2500 m de altitud se comportan como zonas de baja transmisión de malaria afectando por igual tanto a adultos como a niños.

5°. El 10% de prevalencia de malaria indica que el lugar de estudio es una zona de prevalencia moderada predominando los niños parasitados frente a los adultos.

6°. En nuestra área de estudio predominó la especie *P. vivax* frente a *P. falciparum*.

7°. Los valores de las hemoglobinas no muestran diferencias significativas entre las distintas altitudes analizadas en el grupo de las mujeres, los hombres y los niños.

8°. Los valores de referencia de hemoglobina propuestos en el grupo de las mujeres es de entre 11,8 a 12,8 g/dL, en el grupo de los hombres entre 12,6 a 13,8 g/dL y en el grupo de los niños entre 9,4 a 10,8 g/dL.

9°. La población adulta del área rural de Gambo presenta valores de hemoglobina inferiores a los establecidos para la población caucásica. Los valores de hemoglobina en la población infantil del área rural de Gambo son inferiores a los indicados en otros países africanos y a la población caucásica.

10°. Un tercio de la población de Gambo está anémica por otros motivos diferentes a la malaria.

11°. En el área rural de Gambo sólo el 24,6% de las mujeres que presentan anemia y el 23,1% de los hombres con anemia presentan malaria, por lo que no podemos considerar la anemia como un buen indicador de diagnóstico de la malaria.

12°. El 52% de la población infantil del área rural de Gambo con anemia presentan malaria.

13°. En el área rural de Gambo el 40% de las mujeres con malaria no presentan anemia en el momento del estudio y en los hombres y los niños sólo en 25% y el 27% respectivamente están infectados con malaria y no presentan anemia.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

A

- Abeku T.A., van Oortmarsen G.J., Borsboom G., De Vlas S.J., Habbema J.D. 2003. Spatial and temporal variations of malaria epidemic risk in Ethiopia: factors involved and implications. *Acta Trop.* 87:331-340.

- Adetifa I.M., Hill P.C., Jeffries D.J., Jackson-Sillah D., Ibang H.B., Bah G., Donkor S., Corrah T., Adegbola R.A. 2009. Haematological values from a Gambian cohort—possible reference range for a West African population. *Int. J. Lab. Hematol.* 31: 615–622.

- Adhanom T., Deressa W., Witten K.H., Getachew A., Seboxa T. 2006. Malaria. Epidemiology and ecology of health and disease in Ethiopia Addis Ababa, Ethiopia: *Shama Books* Berhane Y, Haile-Mariam D, Kloos H. 556-576.

- Agan T.U., Ekabua J.E., Udoh A.E., Ekanem E.I., Efiok E.E., Mgbekem M.A. 2010. Prevalence of anaemia in women with asymptomatic malaria parasitemia at first antenatal care visit at the University of Calabar Teaching Hospital, Calabar, Nigeria. *Int. J. Womens. Health.* 2:229-233.

- Alemu A., Abebe G., Tsegaye W., Golassa L. 2011. Climatic variables and malaria transmission dynamics in Jimma town, South West Ethiopia. *Parasites Vectors.* 4:30.

- Alur P., Devapatla S.S., Super D.M., Danish E., Stern T., Inagandla R., Moore J.J. 2000. Impact of race and gestational age on red blood cell indices in very low birth weight infants. *Pediatrics.* 106:306–310.

- Andrews L., Andersen R.F., Webster D., Dunachie S., Walther R.M., Bejon P., Hunt-Cooke A., Bergson G., Sanderson F., Hill A.V.S., Gilbert S.C.

2005. Quantitative real-time polymerase chain reaction for malaria diagnosis and its use in malaria vaccine clinical trials. *Am. J. Trop. Hyg.* 73 (1): 191-198.

- Ashton R.A., Kefyalew T., Tesfeye G., Pullan R.L., Yadete D., Reithinger R., Kolaczinski J.H., Brooker S. 2011. School-based surveys of malaria in Oromia Regional State, Ethiopia: a rapid survey method for malaria in low transmission settings. *Malar. J.* 10:25.

B

- Badenhorst C.J., Fourie J., Steyn K., Jooste P.L., Lombard C.J., Bourne L., Slazus W. 1995. The haematological profile of urban black Africans aged 15-64 years in the Cape Peninsula. *East. Afr. Med. J.* 72:19–24.

- Baird J.K. 1995. Host age as a determinant of naturally acquired-immunity to *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Today.* 11:105-111.

- Bartolomé A. 1999. Manual de Diagnóstico y Laboratorio. AB-Diagnóstika®. pp: 383.

- Beadle C., Long G.W., Weis W.R., McElroy P.D., Maret S.M., Oloo A.J., Hoffman S.L. 1994. Diagnosis of malaria by detection of *Plasmodium falciparum* HRP-2 antigen with a rapid dipstick antigen-capture assay. *Lancet.* 343:564-568.

- Bejon P., Andrew L., Hunt-Cooke A., Sanderson F., Gilbert S.C., Hill A.V.S. 2006. Thick blood film examination for *Plasmodium falciparum* malaria has reduced sensitivity and underestimates parasite density. *Malar. J.* 5:104.

- Benito A., Roche J., Molina R.A., Amela C., Altar J. 1994. Application and evaluation of QBC® malaria diagnosis in a holoendemic area. *Appl. Parasitol.* 35:266-272.

- Berman J.G., Egan A., Keush G.T. 2001. The intolerable burden of malaria: a new look at the numbers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 64:4-7.

- Beutler E., Waalen J. 2006. The definition of anemia: what is the lower limit of normal of the blood hemoglobin concentration? *Blood.* 107 (5):1747-1750.

- Beutler E., West C. 2005. Hematologic differences between African-Americans and whites: the roles of iron deficiency and alpha-thalassemia on hemoglobin levels and mean corpuscular volume. *Blood.* 106:740-745.

- Bialasiewicz S., Whiley D.M., Nissen M.D., Sloots T.P. 2007. Impact of competitive inhibition and sequence variation upon the sensitivity of malaria PCR. *J. Clin. Microbio.*, 45:1621-1623.

- Boonma P., Christensen P.R., Suwanarusk R., Price R.N., Russell B., Lek-Uthai U. 2007. Comparison of three molecular methods for the detection and speciation of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*. *Malar. J.* 6:124.

- Buchanan A.M., Muro F.J., Gratz J., Crump J.A., Musyoka A.M., Sichangi A.M., Morrissey A.B., M'rimberia J.K., Njau B.N., Msuya L.J., Bartlett J.A., Cunningham C.K. 2010. Establishment of haematological and immunological reference values for healthy Tanzanian children in Kilimanjaro Region. *Trop. Med. Int. Health.* 15:1011-1021.

C

- Choong M.L., Ton S.H., Cheong S.K. 1995. Influence of race, age and sex on the lymphocyte sub-sets in peripheral blood of healthy Malaysian adults. *Ann. Clin. Biochem.* 32(6):532-539.

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2010. <http://www.cdc.gov/malaria/about/distribution.html>.

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline, 3rd edn. Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.

- Cnops L., Jacobs J., Van Esbroeck M. 2010. Validation of a four-primer real-time PCR as a diagnostic tool for single and mixed *Plasmodium* infections. *Clin. Microbiol. Infect.* 17. "Accepted Article"; doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03344.x

- Comes A.N., Humbert J.F., Laurent F. 1997. Rapid cloning of PCR-Derived RAPD probes. *Biotech.* 23: 210-212.

- Cooke A.H., Moody A.H., Lemon K., Chiodini P.L., Horton J. 1992. Use of the fluorochrome benzothiocarboxypurine in malaria diagnosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 87:549.

- Cooke A.H., Morris-Jones S., Horton J., Greenwood B.M., Moody A.H., Chiodini PL. 1993. Evaluation of benzothiocarboxypurine for malaria diagnosis in an endemic area. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 87:549.

- Cox J., Craig M., Le Sueur D., Sharp B. 1999. Mapping malaria risk in the highlands of Africa. MARA/HIMAL Technical Report. London: Disease Control and Vector Biology Unit, Department of Infectious and Tropical Diseases, London School of Hygiene and Tropical Medicine.

D

- DAIDS. 2005. Division of AIDS Table for Grading the Severity of Adult and Pediatric Adverse Events. Bethesda, MD, USA: DAIDS.

- Dallman P.R., Yip R., Johnson C. 1984. Prevalence and causes of anemia in the United States, 1976 to 1980. *Am. J. Clin. Nutr.* 39:437-445.

- Deribew A., Alemseged F., Tessema F., Sena L, Birhanu Z., Zeynudin A., Sudhakar M., Abdo N., Deribe K., Biadgilign S. 2010. Malaria and Under-Nutrition: A Community Based Study Among Under-Five Children at Risk of Malaria, South- West Ethiopia. *PLoS ONE*. 5(5)e10775.

- Dirren H., Logman M.H.G.M., Barclay D.V., Freire W.B. 1994. Altitude correction for hemoglobin. *Eur. J. Clin. Nutr.* 48:625-623.

- Dowling M.A., Shute G.T. 1966. A comparative study of thick and thin blood films in the diagnosis of scanty malaria parasitemia. *Bull. World Health Orgn.* 34:249-267.

E

- Elsayed S., Plewes K., Church D., Chow B., Zhang K. 2006. Use of molecular beaconprobes for real-time PCR detection of *Plasmodium falciparum* and other *Plasmodium* species in peripheral blood specimens. *J. Clin. Microbiol.* 44:622-624.

F

- Farcas G.A., Zhong K.J., Mazzulli T., Kain K.C. 2004. Evaluation of the RealArt Malaria LC real-time PCR assay for malaria diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 42: 636-638.

- Federal Democratic Republic of Ethiopia CSA: Summary and Statistical Report of the 2007 Population and Housing Census. Addis Ababa, Ethiopia; 2007.

- Federal Democratic Republic of Ethiopia. Ministry of Health: Health and health related indicators. Addis Ababa, 2008, 1-71.

- Fontaine R.E., Najjar A.E. Prince J.S. 1961. The 1958 malaria epidemic in Ethiopia. *Am. J. Trop. Hyg.* 10:795-803.

G

- Gama B.E., Silva-Pires Fdo. E., Lopes M.N., Gardoso M.A., Britto C., Torres K.L., de Mendonça Lima L., de Souza J.M., Daniel-Ribeiro C.T., Ferreira-da-Cruz M. F. 2007. Real-time PCR versus conventional PCR for malaria parasite detection in low-grade parasitemia. *Exp. Parasitol.* 116: 427-432.

- Gran S.M., Ryan A.S., Owen G.M., Abraham S. 1981. Income matched black-white Hemoglobin differences after correction for low transferrin saturations. *Am. J. Clin. Nutr.* 34: 1645-1647.

- Gay F., Traore B., Zanoni J., Danis M., Gentilini. 1996. Direct acridine orange fluorescence examination of blood slides compared to current techniques for malaria diagnosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 90:516-518.

-Gaye O., Diouf M., Diallo S. 1999. A comparison of thick films, QBC malaria, PCR and PATH falciparum malaria test strip in *Plasmodium falciparum* diagnosis. *Parasite.* 6:273-275.

- Gebremariam N. 1988. The ecology of health and disease in Ethiopia. In *Malaria* Edited by: Kloos H, Zein AZ, Boulder Westview Press; 136-150.

- Ghebreyesus T.A., Derressa Witten K.H., Getachew A., Seboxa T. 2006. The epidemiology and ecology of health and disease in Ethiopia. *Malaria.* 556-576.

- Giha H.A., Rosthoj S., Dodoo D., Hviid L., Satti G.M.H., Scheike T., Arnot D.E., Theander T.G. 2000. The epidemiology of febrile malaria episodes in an area of unstable and seasonal transmission. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94:645-651.

-
- Gilles H. 1993. Diagnostic methods in malaria, p78. In H.M.Gilles and D. A. Warrell (ed), *Essential malariology*, 3rd ed. P Edward Arnold, London, United Kingdom.

 - Gilles H.M. 2002. Historical outline. In Warrell DA, Gilles HM (ed): *Essential Malariology*, 4th ed. London, Arnold, p 7, ref 3.

 - Grantham-McGregor S.M., Desai P., Milner P.F. 1974. Haematological levels in Jamaican infants. *Archives of Disease in Childhood*. 49:525–530.

 - Graves P.M., Richards F.O., Ngondi J., Emerson P.M., Shargie E.B., Endeshaw T., Ceccato P., Ejigsemahu Y., Mosher A.W., Hailemariam A., Zerihun M., Teferi T., Ayele B., Mesele A., Yohannes G., Tilahun A., Gebre T. 2009. Individual, household, and environment risk factors for malaria infection in Amhara, Oromia and SNNP regions of Ethiopia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103:1211-1220.

 - Greenwood B.M., Armstrong J.R. 1991. Comparison of two simple methods for determinig malaria parasite density. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85:186-188.

 - Guerrant R.L., Walker D.H., Weller P.F. 2006. *Tropical Infectious Diseases. Principles, Pathogens and Practice*. 2th ed. Elsevier Inc, p 1024-1062.

 - Guinovart C., Navia M.M., Tanner M., Alonso P.L. 2006. Malaria: burden of disease. *Curr. Mol. Med.* 6(2):137-40.

 - Gupta S., Snow R.W., Donnelly C., Newbold C. 1999. Acquired immunity and postnatal clinical protection in childhood cerebral malaria. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci.* 266:33-38.

H

- Haldar K., Mohandas N. 2009. Malaria, erythrocytic infection, and anemia. *Hematology. Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 87-93.
- Hanscheid T., Grobusch M.P. 2002. How useful is PCR in the diagnosis of malaria. *Trends. Parasitol.* 18: 395-398.
- Harris I., Sharrock W.W., Bain L.M., Gray K.A., Bobogare A., Boaz L., Lilley K., Krause D., Vallely A., Johnson M.L., Gatton M.L., Shanks G.D., Cheng Q. 2010. A large proportion of asymptomatic *Plasmodium* infections with low and sub-microscopic parasite densities in the low transmission setting of Temotu Province, Solomon Islands: challenges for malaria diagnostics in an elimination setting. *Malar. J.* 9:254.
- Hay S.I., Simba M., Busolo M., Noor A.M., Guyatt H.L., Ochola S.A., Snow R.W. 2002. Defining and detecting malaria epidemics in the highlands of Western Kenya. *Emerg. Infect. Dis.* 8:555-562.
- Hermsen C.C., Telgt D.S.C., Linders E.H.P., van de Locht L.A.T.F., Eling W.M.C., Mensink E.J.B.M., Sauerwein R.W. 2001. Detection of *Plasmodium falciparum* malaria parasites in vivo by real-time quantitative PCR. *Mol. Biochem. Parasitol.* 118:247-251.
- Huerga H., Lopez-Velez R. 2002. Intecious diseases in sub-Saharan African immigrant children in Madrid, Spain. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 21:830-834.
- Humberg A., Kammer J., Mordmüller B., Kremsner P.G., Lell B. 2011. Haematological and biochemical reference intervals for infants and children in Gabon. *Trop. Med. Int. Health.* 16(3):343-348.
- Hurtado A., Merino C., Delgado E. 1945. Influence of anoxemia on haematopoietic activities. *Arch. Intern. Med.* 75:284-323.

I

- Iqbal J., Sher A., Rab A. 2000. *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2-based immunocapture diagnostic assay for malaria: cross-reactivity with rheumatoid factors. *J. Clin. Microbiol.* 38:1184-1186.

J

- Jelinek T., Grobusch M.P., Schwenke S., Steidl S., von Sonnenburg F.N.E., Loscher T. 1999. Sensitivity and specificity of dipstick tests for rapid diagnosing in non-immune travellers. *J. Clin. Microbiol.* 37:721-723.

- Jima D., Getachew A., Bilak H., Steketee R.W., Emerson P.M., Graves P.M., Gebre T., Reithinger R., Hwang J. 2010. Malaria indicator survey 2007, Ethiopia: coverage and use of major malaria prevention and control interventions. *Mal. J.* 9:58.

- Johns W.L., Lewis S.M. 1989. Primary health screening haemoglobinometry in a tropical community. *Bull. World. Health. Organ.* 67:627-633.

- Johnston S.P., Pieniazek N.J., Xayavong M.V., Slemenda S.B., Wilkins P.P., da Silva A.J. 2006. PCR as a Confirmatory Technique for Laboratory Diagnosis of Malaria. *J. Clin. Microbiol.* 44(3):1087-1089.

- Jonathan A., Patz D., Sarah H. 2006. Malaria risk and temperature: influences from global climate change and local land use practices. Center for Sustainability and the Global Environment (SAGE). 103:5635-5636.

K

- Kain K.C., Harrington M.A., Tennyson S., Keystone J.S. 1998. Imported malaria: prospective analysis of problem in diagnosis and management. *Clin. Infect. Dis.* 27:142-149.

- Kain K.C., Kyle D.E., Wongrichanalai C., Brown A.E. 1994. Qualitative and semi-quantitative polymerase chain reaction to predict *Plasmodium falciparum* treatment failure. *J. Infect. Dis.* 170:1626-1630.

- Kano S. 2006. Malaria rapid diagnostic kit. *Medico.* 37:36-40.

- Kantele A., Jokiranta T.S. 2011. Review of Cases With the Emerging Fifth Human Malaria Parasite, *Plasmodium knowlesi*. *Clin Infect Dis.* 52(11):1356-62.

- Karita E., Ketter N., Price M.A., Kayitenkore K., Kaleebu P., Nanvubya A., Anzala O., Jaoko W., Mutua G., Ruzagira E., Mulenga J., Sanders E.J., Mwangome M., Allen S., Bwanika A., Bahemuka U., Awuondo K., Omosa G., Farah B., Amornkul P., Birungi J., Yates S., Stoll-Johnson L., Gilmour J., Stevens G., Shutes E., Manigart O., Hughes P., Dally L., Scott J., Stevens W., Fast P., Kamali P. 2009. CLSI-derived hematology and biochemistry reference intervals for healthy adults in eastern and southern Africa. *PLoS ONE* 4, e4401.

- Karunamoorthi K., Bekele M. 2009. Prevalence of malaria from peripheral blood smears examination: a 1-year retrospective study from the Serbo Health Center, Kersa Woreda, Ethiopia. *J. Infect. Public Health.* 2:171-176.

- Kawamoto F., Miyake H., Kaneko O., Kimura M., Dung N.T., Liu Q., Zhou M., Duc Dao L., Kawai S., Isomura S., Wataya Y. 1996. Sequence variation in the 18S rRNA gene, a target for PCR-based malaria diagnosis, in *Plasmodium ovale* from Southern Vietnam. *J. Clin. Microbiol.* 34:2287-2289.

- Kibaya R.S., Bautista C.T., Sawe F.K., Shaffer D.N., Sateren W.B., Scott P.T., Michael N.L., Robb M.L., Birx D.L., de Souza M.S. 2008. Reference ranges for the clinical laboratory derived from a rural population in Kericho, Kenya. *PLoS One*. 3:3327.

- Kimura M., Kaneko O., Inoue A., Ishii A., Tanabe K. 1995. Amplification by polymerase chain reaction of *Plasmodium falciparum* DNA from Giemsa-stained thin blood smears. *Mol. Biochem. Parasitol.* 70:193-197.

- Kiszewski A.E., Tekelehaimanot A. 2004. A review of the clinical and epidemiologic burdens of epidemic malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71(suppl 2):128-135.

- Kitaw Y., Kelbessa T., Gebre-Mariam N. 1989. The bibliography of malaria in Ethiopia. *Ethiop. J. Health. Dev.* 3: 57-71.

- Kitua A.Y., Smith T., Alonso P.L., Masanja H., Urassa H., Menendez C., Kimario J., Tanner M. 1996. *Plasmodium falciparum* malaria in the first year of life in an area of intense and perennial transmission. *Trop. Med. Int. Health.* 1:475-484.

- Kliegman R., Behrman R.E., Jenson H.B., Stanton B.F. 2007. Laboratory Medicine. Nelson Textbook of Pediatrics. Saunders Elsevier, Philadelphia, PA.

L

- Landis J.R., Koch G.G. 1977. An application of hierarchical kappa-type statistics in the assessment of majority agreement among multiple observers. *Biometrics.* 33:363-374.

- Laveran A. 1880. Note sur un nouveau parasite trouve dans le sang de plusieurs maladies atteints de fièvre palustre. *Bull. Acad. Med. Ser. 2*, 9:1235-1236.

-
- Lee M.A., Tan C.H., Aw L.T., Tang C.S., Singh M., Lee S.H., Chia H.P., Yap EP. 2002. Real-time fluorescence-based PCR for detection of malaria parasites. *J. Clin. Microbiol.* 40:4343-4345.

 - Levine R.A., Wardlaw S.C., Patton C.L. 1989. Detection of haemoparasites using quantitative buffy coat analysis tubes. *Parasitol. Today.* 5:132-133.

 - Lindsay S., Ansell J., Selman C., Cox V., Halmilton K., Walraven G. 2000. Effect of pregnancy on exposure to malaria mosquitoes. *Lancet.* 355:1972.

 - Lindsay S.W., Martens W.J.M. 1998. Malaria in the African Highlands: past, present and future. *Bull. World. Health. Organ.* 76:33-45.

 - Llop A.H., Valdez-Dapena M.V., Suazo J.L.S. 2001. Microbiologia y Parasitologia Medicas. *Editorial Ciências medicas.* Ciudad de la Habana. Vol. 3.

 - López-Vélez R. 2002. Malaria y viajes internacionales. Ed. Marco Gráfico, S.L. p: 69-84.

 - Lowe B.S., Jeffa N.F., New L., Pederson C., Engback K., Marsh K. 1996. Acridine orange fluorescence techniques as alternatives to traditional Giemsa staining for the diagnosis of malaria in developing countries. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 90:34-36.

 - Lugada E.S., Mermin J., Kaharuza F., Ulvestad E., Were W., Langeland N., Asjo B., Malamba S., Downing R.. 2004. Population-based hematologic and immunologic reference values for a healthy Ugandan population. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11:29-34.

 - Lusingu J.P.A., Vestergaard L.S., Mmbando B.P., Drakeley C.J., Jones C., Akida J., Savaeli Z.X., Kitua A.Y., Lemnge M.M., Theander T.G. 2004. Malaria morbidity and immunity among residents of villages with different

Plasmodium falciparum transmission intensity in North-Eastern Tanzania. *Malar. J.* 3:26.

M

- Maina R.N., Walsh D., Gaddy C., Hongo G., Waitumbi J., Otieno L., Jones D., Ogutu B.R. 2010. Impact of *Plasmodium falciparum* infection on haematological parameters in children living in Western Kenya. *Malar J.* 9(3):S5.

- Makler M.T., Piper R.C., Milhous W. 1998. Lactate dehydrogenase and diagnosis of malaria. *Parasitol. Today.* 14:376-377.

- Makler M.T., Plamer C.J., Ager A.L. 1992. A review of practical techniques for the diagnosis of malaria. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 92:419-433.

- Makler M.T., Ries J.M., Williams J.A., Bancroft J.E., Piper R.C., Gibbins B.L., Hinrichs D.J. 1993. Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48:739-741.

- Martens W.J.M., Niessen L.W., Rotmans J.O., Jetten T.H., McMichael A.J. 1995. Potential impact of global climate change on malaria risk. *Environ. Health. Prospect.* 103: 409-525.

- Mathanga D.P., Campbell Jr C.H., Vanden Eng J., Wolkon A., Bronzan R.N., Malenga G.J., Ali D., Desai M. 2010. Comparison of anaemia and parasitaemia as indicators of malaria control in household and EPI-health facility surveys in Malawi. *Malar. J.* 9:107.

- McKenzie F.E., Sirichaisinthop J., Miller R.S., Gasser R.A., Wong-srichanalai C. 2003. Dependence of malaria detection and species diagnosis by microscopy on parasite density. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 69:372-376.

- McNabb A., Chen R., Lo T., Wong Q., Isaac-Renton J. 2008. Detection and speciation of *plasmodium* species in blood by real-time PCR; is there a role in today's diagnostic laboratory? *Can. J. Med. Sci.* 70:88-98.

- Meier B., Dobeli H., Certa U. 1992. Stage-specific expression of aldolase isoenzymes in the rodent malaria parasite *Plasmodium bergeri*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 52:15-27.

- Mills C.D., Burgess D.C.H., Taylor H.J., Kain K.C. 1999. Evaluation of a rapid and inexpensive dipstick assay for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria. *Bull. World. Health. Organ.* 77:553-559.

- Moody A. 2002. Rapid diagnostic test for malaria parasites. *Clin. Microbiol. Rev.* 15:66-78.

- Muhe L., Oljira B., Degefu H., Jaffar S., Weber M.W. 2000. Evaluation of clinical pallor in the identification and treatment of children with moderate and severe anaemia. *Trop. Med. Int. Health.* 5(11):805-810.

- Mula P., Fernández-Martínez A., de Lucio A., Ramos J.M., Reyes F., González V., Benito A., Berzosa P. 2011. Detection of high levels of mutations involved in anti-malarial drug resistance in *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* at a rural hospital in southern Ethiopia. *Malar. J.* 10:214.

N

- Negash K., Kebede A., Medhin A., Argaw D., Babaniyi O., Guintran J.O., Delacollette C. 2005. Malaria epidemics in the highlands of Ethiopia. *East. Afr. Med. J.* 82:186-192.

- Ngowi B.J., Mfinanga S.G., Bruun J.N., Morkve O. 2009. Immunohaematological reference values in human immunodeficiency virus-negative adolescent and adults in rural northern Tanzania. *BMC. Infect. Dis.* 9:1.

O

- Okell L.C., Ghani A.C., Lyons E., Drakeley C.J. 2009. Submicroscopic infection in *Plasmodium falciparum*-endemic populations: Asystematic review and met-analysis. *J. Infect. Dis.* 1509-1517.

P

- Palmer C.J., Lindo J.F., Klaskala W.I., Quesada J.A., Kaminsky R., Baum M.K., Ager A.L. 1998. Evolution of the OptiMAL test for rapid diagnosis *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* malaria. *J. Clin. Microbiol.* 36:203-206.

- Patz J.A., Olson S.H. 2006. Malaria risk and temperature: influences from global climate change and local land use practices. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:5635-5636.

- Perandin F., Manca N., Calderaro A., Piccolo G., Galati L., Ricci L., Medici M.C., Arcangeletti M.C., Snounou G., Dettori G., Chezzi C. 2004. Development of a real-time PCR assay for detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium ovale* for routine clinical diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1214-1219.

- Peters W.H. 1984. Haematocrit and haemoglobin levels in adult males and in pregnant and non-pregnant females in northern Ethiopia. *Ethiop. Med. J.* 22:17-27.

- Peterson I., Borrell L.N., El-Sadr W., Teklehaimanot A. 2009. Individual and household level factors associated with malaria incidence in a highland region of Ethiopia: a multilevel analysis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80:103-111.

-
- Phillips R.S. 2001. Current status of malaria and potential for control. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:208-226.

 - Piper R., Lebras J., Wentworth, Hunt Cooke A., House S., Chiodini P., Makler M. 1999. A capture diagnostic assay for malaria using *Plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60:109-118.

 - Piper R., Lebras J., Wentworth L., Hunt-Cooke A., Houzé S., Chiodini P., Makler M. 1999. Immunocapture diagnostic assays for malaria using *Plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60:109-118.

 - Piper R.C., Vanderjagt D.L., Holbrook J.J., Makler M. 1996. Malaria lactate dehydrogenase: target for diagnosis and drug development. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 90:433.

 - Prats G. 2006. Microbiología clínica. Ed. Médica Panamericana, pp:366.

 - Prybylski D., Khaliq A., Fox E., Sarwari A.R., Strickland G.T. 1999. Parasite density and malaria morbidity in the pakistani punjab. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61(5): 791–801.

 - Puente S., Subirats M., Benito A., Rubio J.M., González-Lahoz J.M. 2001. Hyperreactive malarial splenomegaly in Europeans: report of five cases. *J. Travel. Med.* 8:322-324.

Q

- Queraltó J.M., Antoja F., Cortés M., Doménech M.V., Fuentes J., Llagostera M.J., Ordóñez J., Ramón F., Rojo I. 1982. Concepto de valores de referencia en Química Clínica. *Quim. Clin.* 2 (1):39-41.

R

- Roberts D.J., Casals-Pascual C., Weatherall D.J. 2005. The clinical and pathophysiological features of malarial anaemia. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 295:137-167.

- Rocco F. 2003. *The Miraculous Fever Tree: Malaria and the Quest for the Cure That Changed the World.* New York, HarperCollins.

- Rock E.P., Marsh K., Saul S.J., Wellems T.E., Taylor D.W., Maloy W.L., Howard R.J. 1987. Comparative analysis of the *Plasmodium falciparum* histidine-rich proteins HRP1, HRP2 and HRP3 in malaria diagnosis of diverse origin. *Parasitology.* 95:209-227.

- Rodrigo A.G., Goracke P.C., Rowhanian K., Mullins J.I. 1997. Quantitation of target molecules from polymerase chain reaction-based limiting dilution assays. *Clin. Exp. Immunol.* 13:737-742.

- Rosanas-Urgell A., Mueller D., Betuela I., Barnadas C., Iga J., Zimmerman P.A., del Portillo H.A., Silba P., Mueller I., Felger I. 2010. Comparison of diagnostic methods for the detection and quantification of the four sympatric *Plasmodium* species in field samples from Papua New Guinea. *Malar. J.* 9:361.

- Ross R. 1897. On some peculiar pigmented cells found in two mosquitoes fed on malarial blood. *B.M.J.* 2:1786-1788.

- Rougemont M., Van S.M., Sahli R., Hinrikson H.P., Bille J., Jatou K. 2004. Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. *J. Clin. Microbiol.* 42:5636-5643.

- Rubio J.M., Benito A., Berzosa P.J., Roche J., Puente S., Subirats M., López-Vélez R., García L., Alvar J. 1999. Usefulness of Seminested Multiplex

PCR in Surveillance of Imported Malaria in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 37(10):3260-3264.

- Rubio J.M., Benito A., Roche J., Berzosa P.J., García M.L., Micó M., Edú M., Alvar J. 1999. Semi-nested, multiplex polymerase chain reaction for detection of human malaria parasites and evidence of *Plasmodium vivax* infection in Ecuatorial Guinea. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60:183-187.

- Russell P.F. 1955. *Man's Mastery of Malaria*. London: Oxford University Press.

S

- Sachs J., Malaney P. 2002. The economic and social burden of malaria. *Nature*. 415:680-685.

- Schellenberg J., Verhoeff F., Kilian A., Taylor T., Arnold F., Wijnhoven T., Crawley J., Korenromp E. 2003. Minutes of the merg anemia task force meeting. Roll Back Malaria (RBM) Partnership.

http://rollbackmalaria.org/partnership/wg/wg_monitoting/docs/MERG_Anaemia_tfm_1minutes.doc.

- Schlesinger P.H., Krogstad D.J., Herwaldt B.L. 1988. Antimalarial agents: mechanisms of action. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 32:793-798.

- Schneider P., Wolters L., Schoone G., Schallig H., Sillekens P., Hermsen R., Sauerwein R. 2005. Real-time nucleic acid sequence-based amplification is more convenient than real-time PCR for quantification of *Plasmodium falciparum*. *J. Clin. Microbiol.* 43:402-405.

- Scopel K.G., Fontes C.J., Nunes A.C., Horta M.F., Braga E.M. 2004. High prevalence of *Plasmodium malariae* infections in a Brazilian Amazon endemic area (Apiacás-Mato Grosso State) as detected by polymerase chain reaction. *Acta. Trop.* 90:61-64.

-
- Scopel K.G., Fontes C.J., Nunes A.C., Horta M.F., Braga E.M. 2004. Low sensitivity of nested PCR using *Plasmodium* DNA extracted from stained thick blood smears: an epidemiological retrospective study among subjects with low parasitaemia in an endemic area of the Brazilian Amazon region. *Malar. J.* 3:8.
- Shiff C.J., Minjas J., Premji Z. 1994. The ParaSight®-F test: a simple rapid manual dipstick test to detect *Plasmodium falciparum* infection. *Parasitol. Today.* 10:494-495.
- Shokoples S.E., Ndao M., Kowalewska-Grochowska K., Yanow S.K. 2009. Multiplex real-time PCR assay for discrimination of *Plasmodium* species with improved sensitivity for mixed infections. *J. Clin. Microbiol.* 47(4): 975-980.
- Singh B., Cox-Singh J., Miller A.O., Abdullah M.S., Snounou G., Rahman H.A. 1996. Detection of malaria in Malaysia by nested polymerase chain reaction amplification of dried blood spots on filter-paper. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 90:519-521.
- Singh B., Sung L.K., Matusop A., Radhakrishnan A., Shamsul S.S., Cox-Singh J., Thomas A., Conway D.J. 2004. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet.* 363:1017-1024.
- Smith D.L., Guerra C.A., Snow R.W., Hay S.I. 2007. Standardizing estimates of the *Plasmodium falciparum* parasite rate. *Malar. J.* 6:131.
- Snounou G., Viriyakosol S., Zhu X.P., Jarra W., Pinheiro L., do Rosario V.E., Thaithong S., Brown K.N. 1993. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.* 61:315-320.
- Snounou G., Viriyakosol S., Zhu X.P., Jarra W., Thaithong S., Brown K.N. 1993. Identification of the four human malaria parasite species in field

samples by the polymerase chain reaction and detection of high prevalence of mixed infection. *Mol. Biochem. Parasitol.* 58:283-292.

- Snow R.W., Craig M., Deichmann U., Marsh K. 1999. Estimating mortality, morbidity and disability due to malaria among Africa's non-pregnant population. *Bull. World Health Orgn.* 77(8):624-40

- Snow R.W., Marsh K. 2002. The consequences of reducing transmission of *Plasmodium falciparum* in Africa. *Adv. Parasitol.* 52:235-264.

- Srinivasan S., Moody A.H., Chiodini O.L. 2000. Comparison of blood-film microscopy, the OptiMal® dipstick, Rhodamine 123 and PCR for monitoring anti-malaria treatment. *Am. Trop. Med. Parasitol.* 94:227-232.

- Steenkeste N., Incardona S., Chy S., Duval L., Ekala M.T., Lim P., Hewitt S., Sochantha T., Socheat D., Rogier C., Mercereau-Puijalon O., Fandeur T., Ariey F. 2009. Towards high-throughput molecular detection of Plasmodium: new approaches and molecular markers. *Malar. J.* 8:86.

T

- Tekelehaimanot H.D., Lipsitch M., Tekelehaimanot A., Schwartz J. 2004. Weather-based prediction of *Plasmodium falciparum* malaria in epidemic-prone regions of Ethiopia I. Patterns of lagged weather effects reflects biological mechanisms. *Malar. J.* 3(1):41.

- Tesfaye S., Belyhun Y., Teklu T., Mengesha T., Petros B. 2011. Malaria prevalence pattern observed in the highland fringe of Butajira, Southern Ethiopia: a longitudinal study from parasitological and entomological survey. *Malar. J.* 10:153.

- Tjitra E., Suprianto S., Dyer M., Currie B.J., Anstey N.M. 1999. Field evaluation of the ICT malaria Pf/Pv immunochromatographic test for detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in patients with presumptive

clinical diagnosis of malaria in Eastern Indonesia. *J. Clin. Microbiol.* 37:2412-2417.

- Tsegaye A., Messele T., Tilahun T., Hailu E., Sahlu T., Doorly R., Fontanet A.L., Rinke de Wit T.F. 1999. Immunohematological Reference Ranges for Adult Ethiopians. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6(3):410-414.

- Tugume S.B., Piwovar E.M., Lutalo T., Mugenyi P.N., Grant R.M., Mangeni F.W., Pattishall K., Katongole-Mbidde E. 1995. Hematological reference ranges among healthy Ugandans. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2:233-235.

V

- Van der Hof Y. 1968. Haematological investigation in Ethiopia, with special reference to high iron intake. *Acta Med. Scand. Suppl.* 494:1-74.

W

- Warhurst D.C., Williams J.E. 1996. Laboratory diagnosis of malaria. ACO broadsheet n° 148. *J. Clin. Pathol.* 49:533-538.

- Weyessa A., Gebremichael T., Ali A., 2004. An indigenous malaria transmission in the outskirts of Addis Ababa, Akaki Town and its environs. *Ethiop. J. Health Dev.* 18:2-9.

- WHO 1990. Control of Tropical Diseases: Severe and Complicated Malaria, 2nd ed. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84(suppl 2):1-65.

- WHO 2000. Severe *falciparum* malaria. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94(suppl 1):1-90.

- WHO 2001. Iron deficiency anaemia. Assessment, prevention, and control. A guide for programme managers. *World Health Organization*.

-WHO/UNICEF 2003. The Africa Malaria Report. *World Health Organization / UNICEF*.

- Wongsrichanalai C., Pornsilapatip J., Namsiriponpun V., Webster H.K., Luccini A., Pansamdang P., Wilde H., Prasittisuk M. 1991. Acridine orange fluorescent microscopy and the detection of malaria in populations with low-density parasitemia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44:17-20.

- Worrall E., Rietveld A., Delacoelette C. 2004. The burden of Malaria epidemics and cost-effectiveness of interventions in situations in Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71:136-140.

Y

- Yamamura M., Makimura K., Ota Y. 2009. Evaluation of a new rapid molecular diagnostic system for *Plasmodium falciparum* combined with DNA filter paper, loop-mediated isothermal amplification and melting curve analysis. *Jpn. J. Infect. Dis.* 62:20-25.

- Yip R., Johnson C., Dallman P.R. 1984. Age-related changes in laboratory values used in the diagnosis of anemia and iron deficiency. *Am. J. Clin. Nutr.* 39: 427-436.

Z

- Zeh C., Amornkul P.N., Inzaule S., Ondoa P., Oyaro B., Mwaengo D.M., Vandenhoudt H., Gichangi A., Williamson J., Thomas T., DeCock K.M., Hart C., Nkengasong J., Laserson K. 2011. Population-Based Biochemistry, Immunologic and Hematological Reference Values for Adolescents and Young Adults in a Rural Population in Western Kenya. *Plos One.* 6(6):e21040.

- Zhou G., Minakawa N., Githeko A.K., Yan G. 2004. Association between climate variability and malaria epidemics in the East African highlands. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101:2375-2380.

ANEXO

ANEXO 1

1. Datos del grupo de las mujeres que se incluyeron en el estudio.

Muestra	Edad	Woreda	Muestra	Edad	Woreda	Muestra	Edad	Woreda
170	16	Negele	349	25	Asasa	418	35	Kokosa
15	16	Negele	226	25	Negele	38	35	Negele
283	16	Negele	351	25	Negele	105	35	Negele
378	17	/	144	25	Negele	213	35	Negele
437	17	Negele	25	25	Negele	350	35	Negele
453	17	Negele	107	25	Negele	352	35	Negele
348	18	Adami Tulu	140	25	Negele	358	35	Negele
297	18	Asasa	197	25	Negele	395	35	Negele
35	18	Kore	244	25	Negele	404	35	Negele
327	18	Kore	256	25	Shala	364	35	Negele
150	18	Negele	417	25	Shala	232	35	Shashemane
167	18	Negele	344	26	Kore	199	35	/
203	18	Negele	193	26	Kore	186	36	Negele
219	18	Negele	332	26	Kore	250	37	Negele
222	18	Negele	22	26	Negele	257	37	Negele
254	18	Negele	422	26	Negele	191	38	Asasa
384	18	Negele	329	26	Negele	141	39	Kofele
405	18	Negele	115	27	Negele	89	39	Negele
448	18	Negele	136	27	Negele	245	40	Asasa
235	18	Shashemane	334	27	Negele	436	40	Asasa
319	18	Shashemane	381	27	Negele	174	40	Dodola
173	19	Kore	278	27	Negele	280	40	Kore
211	19	Negele	154	28	Kore	42	40	Negele
345	19	Negele	169	28	Kore	171	40	Negele
441	19	Negele	243	28	Kore	273	40	Negele
238	20	Negele	201	28	Munesa	308	40	Negele
103	20	Dodola	94	28	Negele	379	40	Negele
328	20	Dodola	301	28	Negele	176	40	Seraro
12	20	Kore	431	28	Negele	45	40	Negele
247	20	Kore	458	28	Negele	310	40	Negele
466	20	Kore	363	28	Shala	279	40	Kore
3	20	Negele	129	29	Negele	44	41	Negele
32	20	Negele	117	29	Shala	183	45	Adami Tulu
142	20	Negele	216	30	Adami Tulu	347	45	Adami Tulu
158	20	Negele	264	30	Adami Tulu	337	45	Asasa
240	20	Negele	286	30	Asasa	156	45	Kore
242	20	Negele	260	30	Kore	303	45	Negele
284	20	Negele	249	30	Shala	253	45	Negele
412	20	Negele	227	30	Kofele	435	46	Asasa
440	20	Negele	452	30	Kofele	285	46	Negele
410	20	Shala	316	30	Kore	299	46	/
234	21	Negele	341	30	Kore	266	50	Negele
157	21	Kore	122	30	Munesa	87	50	Kore
34	22	/	59	30	Negele	151	50	Negele
368	22	/	233	30	Negele	194	50	Negele
390	22	Adami Tulu	288	30	Negele	205	55	Adami Tulu
368	22	/	289	30	Negele	147	60	Adami Tulu
281	22	Kore	315	30	Negele	134	60	Kore

Muestra	Edad	Woreda	Muestra	Edad	Woreda	Muestra	Edad	Woreda
124	22	Kore	343	30	Negele	463	60	Kore
162	22	Negele	386	30	Negele	47	60	Munesa
366	22	Negele	420	30	Negele	224	60	Munesa
119	22	Negele	424	30	Negele	396	60	Munesa
189	22	Negele	428	30	Negele	357	60	Negele
248	22	Negele	442	30	Negele	457	60	Negele
403	22	Negele	180	30	Shala	480	60	Negele
456	22	Negele	127	31	Negele	293	60	Kore
13	23	Negele	99	32	Negele	426	60	/
221	23	Negele	305	32	Shashemane	19	65	Dodola
28	24	Asasa	432	33	Kore	241	65	Kore
318	24	Negele	383	33	Negele	321	65	Negele
365	24	Negele	298	34	Negele	306	70	Negele
402	24	Negele	454	34	Negele	377	80	Negele
179	24	Shashemane	72	35	Adami Tulu	184	89	Asasa
484	25	/	259	35	Asasa			
217	25	Addis Abeba	336	35	Asasa			

2. Datos del grupo de los hombres que se incluyeron en el estudio.

Muestra	Edad	Woreda	Muestra	Edad	Woreda	Muestra	Edad	Woreda
17	16	Negele	6	27	Negele	312	50	Asasa
5	16	Shala	346	27	Negele	228	50	Dodola
320	16	Adami Tulu	188	28	Adami tulu	263	50	Dodola
258	16	Munesa	202	28	Seraro	401	50	Munesa
132	16	Negele	97	28	Shala	430	50	Negele
270	16	Negele	483	29	Kofele	474	50	Negele
354	16	Negele	317	29	Munesa	300	50	Seraro
31	17	Adami Tulu	223	29	Negele	255	50	/
164	17	Negele	131	30	Adami tulu	461	52	Negele
177	17	Negele	423	30	Dodola	262	55	Negele
209	18	Kore	68	30	Kore	196	55	Negele
429	18	Munesa	187	30	Kore	393	56	Dodola
110	18	Negele	276	30	Kore	252	56	Kore
269	18	Negele	304	30	Kore	208	57	Negele
215	18	Shashemane	40	30	Munesa	339	59	Negele
135	19	Kofele	272	30	Negele	313	60	Kofele
155	19	Negele	181	31	Kore	338	60	Munesa
210	20	Asasa	98	32	Awasa	70	60	Negele
439	20	Asasa	206	32	Kore	268	60	Seraro
163	20	Kore	101	32	Negele	292	60	Shashemane
462	20	Kore	326	32	Negele	342	60	/
55	20	Negele	388	32	Negele	236	65	Negele
113	20	Negele	204	35	Kofele	71	65	Negele
449	20	Negele	421	35	Negele	333	65	Shala
392	21	Negele	214	36	Adami tulu	61	67	Negele
322	22	Negele	307	36	Negele	290	70	Kokosa
330	22	Negele	261	38	Asasa	54	72	Dodola
331	22	Negele	267	38	Negele	62	75	Kore
53	23	Negele	67	39	Negele	355	75	Seraro
282	24	Shashemane	207	40	Negele	335	78	Kore
230	25	Adami Tulu	353	40	Negele	246	80	Kofele
479	25	Dodola	340	40	Shashemane	314	80	Kofele

Muestra	Edad	Woreda	Muestra	Edad	Woreda	Muestra	Edad	Woreda
137	25	Kore	370	42	Negele	63	80	Kore
152	25	Munesa	369	42	Shala	65	80	Negele
459	25	Negele	309	45	/	251	80	Negele
287	26	Kore	160	46	Kore	178	82	Adami Tulu
192	26	Negele	2	47	Asasa	467	85	Munesa
153	27	Kore	168	48	Negele	239	98	Negele

3. Datos del grupo de los niños que se incluyeron en el estudio.

Muestra	Edad	Woreda	Muestra	Edad	Woreda	Muestra	Edad	Woreda
391	1	Adami tulu	385	2	Adami tulu	182	7	Negele
8	1	Negele	43	2	Asasa	447	7	Negele
394	1	Negele	24	2	Munesa	444	7	Seraro
485	1	/	325	2	Munesa	274	8	Kore
83	1	Adami tulu	445	2	Munesa	14	8	Negele
218	1	Adami tulu	425	2	Negele	26	8	Adami tulu
75	1	Asasa	36	2	Negele	60	8	Kore
451	1	Dodola	46	2	Negele	231	8	Kore
56	1	Kofele	85	2	Negele	323	8	Kore
96	1	Kore	86	2	Negele	51	8	Negele
18	1	Kore	120	2	Negele	159	8	Negele
434	1	Kore	125	2	Negele	175	8	Negele
121	1	Kore	277	2	Negele	373	8	Negele
416	1	Kore	398	2	Negele	433	8	Negele
446	1	Kore	399	2	Negele	464	8	Negele
450	1	Kore	465	2	Negele	407	8	/
275	1	Negele	73	2	Negele	130	9	Negele
37	1	Negele	478	3	Negele	143	9	Kore
41	1	Negele	190	3	Kore	10	9	Negele
52	1	Negele	477	3	Kore	408	9	Negele
58	1	Negele	50	3	Negele	443	9	Negele
76	1	Negele	139	3	Negele	145	10	Shala
77	1	Negele	413	3	Negele	296	10	Kore
78	1	Negele	473	3	Negele	161	10	Negele
79	1	Negele	33	3	Negele	172	10	Negele
80	1	Negele	9	4	Negele	294	10	Negele
81	1	Negele	460	4	Negele	400	10	Negele
93	1	Negele	16	4	Negele	360	11	Kofele
104	1	Negele	11	4	Seraro	88	11	Kore
112	1	Negele	64	4	Negele	138	11	Negele
146	1	Negele	118	4	Kore	475	11	Negele
220	1	Negele	414	4	Kore	102	12	/
225	1	Negele	367	4	Kore	295	12	Asasa
374	1	Negele	69	4	Negele	471	12	Kofele
387	1	Negele	265	4	Negele	291	12	Kore
397	1	Negele	389	4	Negele	29	12	Kore
406	1	Negele	20	5	Kore	302	12	Kore
409	1	Negele	271	5	Asasa	1	12	Negele
415	1	Negele	49	5	Kofele	48	12	Negele
427	1	Negele	476	5	Kore	311	12	Negele
455	1	Negele	116	5	Negele	468	12	Negele

Muestra	Edad	Woreda	Muestra	Edad	Woreda	Muestra	Edad	Woreda
469	1	Negele	166	5	Negele	356	13	Asasa
361	1	Negele	212	5	Negele	30	13	Kore
21	1	Seraro	359	5	Negele	198	13	Negele
27	1	Shala	372	5	Negele	237	13	Negele
148	1	Shala	375	5	Negele	165	14	Kore
362	1	Shala	376	5	Negele	200	14	Negele
23	1	Shashemane	472	5	Negele	106	15	Negele
84	1	Shashemane	123	5	Shala	185	15	Kore
380	1	Shashemane	382	6	Negele	4	15	Negele
438	1	Shashemane	470	6	Negele	108	15	Negele
7	2	Negele	411	6	Negele	195	15	Negele
419	2	Shashemane	481	6	Shala	229	15	Negele
57	2	Adami tulu	482	7	Negele	39	15	Shashemane
74	2	Adami tulu	149	7	Kofele	371	15	/

4. Datos de las muestras positivas para *Plasmodium* detectadas por microscopía.

Muestra	Especie	Sexo	Edad	Woreda
15	PV	F	16	Negele
12	PV	F	20	Kore
13	PV	F	23	Negele
5	PV	M	16	Shala
7	PV	F	2	Negele
8	PV	M	1	Negele
9	PV	M	4	Negele
11	PV	F	4	Seraro
14	PV	M	8	Negele
16	PF	F	4	Negele
20	PF	F	5	Negele
3	PF	F	20	Kore

5. Datos de las muestras positivas para *P. vivax* detectadas por n-PCR.

Muestra	Especie	Sexo	Edad	Woreda	Muestra	Especie	Sexo	Edad	Woreda
15	PV	F	16	Negele	391	PV	M	1	Adami Tulu
437	PV	F	17	Negele	7	PV	F	2	Negele
167	PV	F	18	Negele	419	PV	F	2	Shashemane
12	PV	F	20	Kore	11	PV	F	4	Seraro
157	PV	F	21	Kore	16	PV	F	4	Negele
13	PV	F	23	Negele	9	PV	M	4	Negele
144	PV	F	25	Negele	460	PV	M	4	Negele
141	PV	F	39	Kofele	274	PV	F	8	Kore
17	PV	M	16	Negele	14	PV	M	8	Negele
5	PV	M	16	Shala	130	PV	M	9	Negele
168	PV	M	48	Negele	106	PV	F	15	Negele
8	PV	M	1	Negele					

6. Datos de las muestras positivas para *P. falciparum* detectadas por n-PCR.

Muestra	Especie	Sexo	Edad	Woreda
3	PF	F	20	Negele
318	PF	F	24	Negele
344	PF	F	26	Kore
306	PF	F	70	Negele
394	PF	F	1	Negele
478	PF	M	3	Negele
64	PF	F	4	Negele
20	PF	F	5	Kore
482	PF	F	7	Negele
145	PF	F	10	Shala

7. Datos de las muestras positivas para *Plasmodium* detectadas por qPCR (PrimerDesignTMLtd).

Muestra	Especie	Ct	Cuantificación copias/ μ l de sangre	Muestra	Especie	Ct	Cuantificación copias/ μ l de sangre
5	PV	36,22	1,47	391	PV	31,83	25,40
7	PV	34,5	4,49	419	PV	37,63	0,59
8	PV	31,3	35,83	437	PV	29,59	108,71
9	PV	33,59	8,10	3	PF	32,95	33,61
11	PV	35,15	2,94	20	PF	29,63	279,23
12	PV	34,86	3,55	64	PF	32,7	39,19
13	PV	37,2	0,78	318	PF	37,15	2,27
14	PV	36,3	1,39	141	Neg	/	/
15	PV	35,33	2,62	144	Neg	/	/
16	PV	36,18	1,51	145	Neg	/	/
17	PV	36,92	0,93	306	Neg	/	/
106	PV	38,65	0,44	344	Neg	/	/
130	PV	32,35	18,13	394	Neg	/	/
157	PV	29,75	97,99	460	Neg	/	/
167	PV	30,97	44,39	478	Neg	/	/
168	PV	32,1	21,32	482	Neg	/	/
274	PV	37,64	0,58				

8. Datos de las muestras positivas para *Plasmodium* detectadas por qPCR (Rosanas-Urgell *et al.* 2010).

Muestra	Especie	Ct	Cuantificación copias/ μ l de sangre
5	PV	38,5	0,1
7	PV	31,4	7,03
8	PV	27,6	90,5
11	PV	38,03	0,1
12	PV	31,5	6,57
13	PV	34,7	0,76
15	PV	33,9	1,31
16	PV	42	-
419	PV	34,1	1,14
437	PV	28,4	52,87
3	PF	39,4	0,03
9	Neg	/	/
14	Neg	/	/
17	Neg	/	/
20	Neg	/	/
64	Neg	/	/
106	Neg	/	/
130	Neg	/	/
141	Neg	/	/
144	Neg	/	/
145	Neg	/	/
157	Neg	/	/
167	Neg	/	/
168	Neg	/	/
274	Neg	/	/
306	Neg	/	/
318	Neg	/	/
344	Neg	/	/
391	Neg	/	/
394	Neg	/	/
460	Neg	/	/
478	Neg	/	/
482	Neg	/	/

ANEXO 2

1. Datos de Hemoglobina de la población sana, que fue sometida a nuestro estudio.

Nº de pacientes	Mujeres	Hombres	Niños	Nº de Pacientes	Mujeres	Hombres	Niños	Nº de Pacientes	Mujeres
1	13,9	9	11	45	13,8	18,2	11	89	15,2
2	11,2	17	11	46	15	13,2	12	90	12,1
3	12,7	11	4	47	2,1	14	11,3	91	10,4
4	14	12,6	9	48	11,3	14,7	12,3	92	13
5	13	10	13	49	9	12,2	14,2	93	16
6	14,7	4,3	11	50	10	14,9	5,5	94	16,7
7	15	15,8	4	51	10,9	8,8	10,3	95	14,5
8	13,1	14,5	3	52	12	16	13,9	96	11,6
9	14,5	9,7	6	53	12,7	13	12,8	97	5,7
10	13,6	12,9	8	54	10,1	13,3	13,6	98	9,8
11	16,4	13,9	10	55	10,8	17,2	14,3	99	14
12	12,9	15	9	56	7,4	11,4	15,8	100	12
13	16,4	13,1	12	57	13,8	12,7	14	101	11,2
14	13	13	9	58	13,4	15	12,5	102	12
15	14	14,1	11	59	11,6	14,6	6,8	103	9,9
16	5,7	17,4	13	60	14	10,9	13,2	104	16,7
17	15	16,9	7	61	11,6	15	7,7	105	17,9
18	15	15,4	8	62	10,1	14,4	14,1	106	8,8
19	14	16,5	11	63	9,7	15,3	11,6	107	11,6
20	11	13,4	12	64	13,1	13	13	108	8,5
21	12	11	4	65	13	9,4	12,2	109	13,7
22	12	9,7	10	66	14	16	9,9	110	14,8
23	14	11,8	11	67	10,4	7,6	9,1	111	11
24	15	16	6	68	15	16,5	13,5	112	10,4
25	15	14,6	11	69	9,6	13	4,1	113	11
26	11,5	14	12	70	13	17,1	14,2	114	12,8
27	10,1	14,1	6	71	12,5	7,6	9,9	115	17,5
28	14	16,2	13	72	12,9	12	14,2	116	13
29	11,6	17,3	11	73	10,2	14	5,3	117	11
30	15	11,7	14	74	13,3	14,2	11	118	12,3
31	15	10,1	8,2	75	10,4	13		119	13,2
32	11,8	15,2	11,5	76	14	16		120	13,3
33	7	14	9,6	77	12	9,8		121	12
34	14,5	15,6	3,2	78	11,4	12,6		122	5,8
35	4,4	5,6	10,4	79	14,7	9,6		123	16
36	14	11	10,9	80	12,5	8,7		124	12,3
37	3,7	16,6	8,9	81	7,1	13,3		125	13
38	11	11,1	10,7	82	8,6	10		126	13,2
39	15	15,4	4,7	83	9,1	8,4		127	12
40	15	13,3	11,1	84	15,3	15		128	13
41	15	15,3	11,6	85	14	11		129	10,7
42	12	15,8	3,7	86	12	14		130	13,5
43	13	7,9	8,8	87	14,1	15,1			
44	13	16,5	10,6	88	14	14,3			

2. Datos de Hemoglobina de la población enferma (infectada con *Plasmodium*) que fue sometida a nuestro estudio.

N° de pacientes	Mujeres	Hombres	Niños
1	7	11,7	2
2	12,4	3,6	7,6
3	14	9,8	9,7
4	14	8,2	5,5
5	11,2	13,3	5,2
6	12	10,2	4,4
7	12,5	14,5	6,8
8	10,4	12,1	6,1
9	14	9,7	5,4
10	7	13,2	5
11	10	11,4	9,8
12	7,3	8,8	7,2
13	8,2		6,6
14	2,3		3,7
15	13,2		5,3
16	10,2		12,7
17	8,1		6,3
18	10,2		7,5
19	12,3		6,8
20	6,9		9,3
21	11		6,8
22	9,4		6,7
23	11,8		11
24	12,9		3,6
25	12,5		7,6
26			12,3
27			13
28			8,6
29			10,4
30			6,7
31			9,2
32			5,5
33			10,9
34			7,5
35			12
36			8,2
37			11,1

ANEXO 3

1. Mapa de la región de West Arsi, donde se encuentran las principales Woredas a la que pertenecen los pacientes que visitan el Hospital Rural de Gambo.