



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE ENFERMERÍA

**DIFERENCIAS ENTRE LA MICROSCOPIA CONVENCIONAL Y LA PCR
NESTED MULTIPLEX EN LA DETECCIÓN DE INFECCIONES MIXTAS E
INFECCIONES SUBMICROSCÓPICAS DE MALARIA EN UN ÁREA DE ALTA
ENDEMICIDAD DEL ESTADO BOLÍVAR, VENEZUELA**

Profa. BRUNNELL ROSARIO GONZÁLEZ RIVAS

TRABAJO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA ASCENDER A LA
CATEGORÍA DE PROFESOR ASOCIADO

CUMANÁ, 2023

ÍNDICE

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
LISTA DE TABLAS	IV
LISTA DE FIGURAS	V
RESUMEN	VI
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	12
Población y muestra	12
Información clínico-epidemiológica	12
Recolección de la muestra	12
Diagnóstico microscópico	13
Diagnóstico molecular	14
Extracción de ADN genómico a partir de punción venosa	14
Realización de la PCR <i>Nested</i> multiplex	15
Análisis estadístico	17
RESULTADOS	18
DISCUSIÓN	26
CONCLUSIONES	36
BIBLIOGRAFÍA	37
ANEXOS	50
APÉNDICES	52
HOJAS DE METADATOS	55

DEDICATORIA

A

Jehová, Dios supremo creador... “Te amo, Oh Jehová fortaleza mía. Jehová, roca mía y castillo mío, y mi libertador; Dios mío, fortaleza mía, en él confiaré; Mi escudo, y la fuerza de mi salvación, mi alto refugio”

Mi hijo amado, Cristhian Sucre, cuya presencia me empuja a ser cada día más fuerte y a crecer en la fe y confianza en el Señor Jesucristo.

Mis padres, hermanos y sobrinos, con los que se fortalece cada día el amor de familia.

Mis apreciados y respetados estudiantes en todos estos años de labor, que me motivan e incentivan a seguir formándome y actualizándome.

AGRADECIMIENTOS

A

Dios todopoderoso por renovar mis fuerzas cada día, por levantarme cuando decaigo y por sostenerme en los momentos difíciles.

Mis amigos y colegas, profesor Marcos De Donato y profesora Hectorina Rodulfo por su ayuda y motivación... ¡se les aprecia mucho!

Todas las personas que hicieron posible la realización de esta investigación... muchas gracias!

LISTA DE TABLAS

TABLA I. Frecuencia de infecciones por especies de <i>Plasmodium</i> diagnosticadas por microscopía convencional, en individuos sintomáticos y asintomáticos en Tumeremo, municipio Sifontes, estado Bolívar. -----	18
TABLA II. Comparación entre la microscopía convencional y la PCR <i>Nested</i> multiplex para la identificación de especies maláricas en individuos de Tumeremo, municipio Sifontes, estado Bolívar -----	21
TABLA III. Discordancia entre la microscopía convencional y la PCR <i>Nested</i> multiplex en la identificación de especies maláricas en individuos de Tumeremo, municipio Sifontes, estado Bolívar -----	21
TABLA IV. Valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) y eficiencia de la microscopía convencional comparado con la PCR <i>Nested</i> multiplex. -----	22
TABLA V. Frecuencia de infecciones maláricas de acuerdo al sexo en individuos sintomáticos y asintomáticos de Tumeremo, municipio Sifontes, estado Bolívar. -----	23
TABLA VI. Variables clínico-epidemiológicas asociadas estadísticamente a las infecciones maláricas en individuos sintomáticos y asintomáticos de Tumeremo, municipio Sifontes, estado Bolívar. -----	25

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Productos amplificados por PCR *Nested* multiplex para la identificación de especies maláricas. **A:** detección del género *Plasmodium* (1200 pb) pozos 3-16. **B:** identificación de *P. falciparum* (205 pb) pozos 3-12 **C:** identificación de *P. vivax* (120 pb) pozos 1-5 y *P. malariae* (144 pb) pozos 7-9. **D:** PCR *Nested* multiplex para identificación de *P. vivax* (pозos 1,5,7) y *P. falciparum* (pозos 2,4,8,10,11,13-18,20) e infecciones mixtas por ambas especies (pозos 3,6,9,12,19). M: marcador de peso molecular (100 pb); C+: control positivo; C-: control negativo. Gel de agarosa al 2% coloreado con bromuro de etidio. ----- 20

FIGURA 2. Frecuencia de infecciones maláricas de acuerdo a los grupos etarios en individuos sintomáticos y asintomáticos de Tumeremo, municipio Sifontes, estado Bolívar. ----- 24

RESUMEN

En Venezuela a pesar de ser un país endémico a la malaria en donde circulan tres de las cinco especies productoras de la enfermedad, siendo además uno de los países de América con los más graves problemas de control en los últimos años, se han reportado muy pocos trabajos de investigación donde se evalúen las fallas en el diagnóstico de las infecciones mixtas y submicroscópicas usando métodos moleculares, así como su impacto en el ámbito epidemiológico; razón que motivó la realización de la siguiente investigación, la cual se llevó a cabo en Tumeremo, municipio Sifontes, estado Bolívar, donde se estudiaron 229 individuos de ambos géneros y diferentes grupos etarios que asistieron a la consulta de diagnóstico de malaria del centro de investigación de campo "Dr. Francesco Vitanza". A los cuales se les aplicó una encuesta clínico epidemiológica y se les informó el motivo del estudio para su previo consentimiento. Posteriormente se realizó punción del lóbulo de la oreja para elaborar la gota gruesa y el extendido sanguíneo con el fin de llevar a cabo el diagnóstico por microscopía convencional; luego se les extrajo sangre venosa para la obtención del ADN genómico del parásito usando el kit Wizard Genomic® de Promega, y posteriormente se identificaron las especies maláricas involucradas a través de la técnica de PCR *Nested* multiplex. Esta última técnica permitió detectar 160 casos de malaria (69,90%), superior al encontrado por microscopía (59,40%). 15,00% de los positivos fueron infecciones mixtas (*P. vivax*/*P. falciparum*) y 15,60% de los negativos microscópicamente (infecciones submicroscópicas) fueron positivos por la técnica molecular. La sensibilidad de la microscopía para cualquier especie de *Plasmodium* fue menor del 80,00%. La concordancia de ambos métodos fue discreta para detectar malaria e identificar *P. vivax*, mientras que para *P. falciparum* la concordancia resultó buena. Las infecciones mixtas, así como las monoinecciones por *P. vivax* y *P. falciparum* se relacionaron con presencia de fiebre, cefalea y escalofríos, además de debilidad para esta última especie. Se demostró asociación de *P. vivax* con el sexo femenino y de esta especie y *P. falciparum* con la práctica de la minería en la zona. Este estudio demuestra que en áreas endémicas del estado Bolívar es necesario la aplicación de diagnóstico molecular para detectar mayor número de infecciones submicroscópicas e infecciones mixtas, lo que revela mayor riesgo de transmisión malárica, además el uso de PCR en Venezuela puede proporcionar una visión relevante para el diseño de estrategias específicas de control y erradicación de la enfermedad.

INTRODUCCIÓN

La malaria o paludismo, es la parasitosis de mayor importancia en el mundo debido a la elevada morbilidad y mortalidad que produce, estimándose según el informe de malaria de la Organización Mundial de la Salud (OMS) del año 2015, que existen alrededor de 3,2 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad. En el 2016, se reportaron 212 millones de casos nuevos y 429 mil muertes por paludismo. Más recientemente para el año 2022 la OMS señala que solamente en el continente africano se reportaron el 95,00% de los casos de malaria del mundo correspondiendo esto a 234 millones de personas infectadas (OMS, 2015; OMS, 2016; OMS, 2022).

De las cinco especies del género *Plasmodium*, parásito que la produce, y que se conoce que infectan a los humanos, se destacan cuatro de ellas: el *Plasmodium vivax* por ser el que tiene la distribución más amplia, estimándose que aproximadamente un 35% de la población mundial está en riesgo de contraerlo; el *Plasmodium falciparum* por ser el que causa la mayor tasa de mortalidad, el *Plasmodium malariae* que se distribuye en Suramérica y Asia, así como el *Plasmodium ovale* que es de mayor frecuencia en el continente asiático (Demas *et al.*, 2011; OMS, 2015; Barrada *et al.*, 2019). En cuanto al *Plasmodium knowlesi*, reportado más recientemente, y que infecta principalmente a monos macacos, los estudios sugieren que no se trata de una especie emergente en el humano, sino que no estaba siendo diagnosticada, debido a la similitud morfológica de esta con *P. malariae* y *P. falciparum*, lo cual dificulta su reconocimiento mediante el examen microscópico (Martínez *et al.*, 2012).

Los parásitos maláricos presentan un ciclo de vida complejo, si bien existen diferencias morfológicas entre las especies, en general sus ciclos de vida son similares; comenzando con la inoculación de esporozoítos en el torrente sanguíneo del hombre cuando este es picado por un mosquito infectado. Los esporozoítos invaden los hepatocitos en los cuales se produce la diferenciación y división del parásito, al cabo de cierto tiempo cada esporozoíto desarrolla entre 10 a 100 merozoítos, que invadirán los glóbulos rojos al ser liberados desde el hígado luego de la ruptura del esquizonte. El merozoíto penetra por medio de la región apical al eritrocito induciendo la formación de una vacuola en éste, derivada de la membrana plasmática que lo envuelve, adquiriendo una forma anillada conocida como trofozoíto. Se produce nuevamente un proceso de esquizogonia. El ciclo eritrocitario se repite cuando el esquizonte maduro libera un determinado número de merozoítos, que van a invadir a otros eritrocitos. Una pequeña proporción de estos merozoítos, genéticamente determinados, se convertirán en gametocitos, esenciales para el ciclo de infección del mosquito *Anopheles* hembra (Miller *et al.*, 2002; March *et al.*, 2013; Liehl *et al.*, 2015).

Cuando el mosquito *Anopheles* hembra adquiere las formas gametocíticas del parásito en la sangre ingerida del hombre infectado, estas se dirigen al estómago del insecto donde las formas masculinas (microgametocitos) se transforman en formas flageladas móviles (microgametos) que se fusionan con las formas femeninas (macrogametos) formando el cigoto, que posteriormente se transforma en ooquinete, y penetra la pared del estómago del mosquito, donde crece y se transforma en el ooquiste redondeado que al madurar liberará una gran cantidad de esporozoítos que se diseminan en todo el mosquito especialmente en su saliva, donde permanecen hasta ser inoculados al hombre a través de una nueva picadura (Botero y Restrepo, 1998).

El grado de infección y la severidad del cuadro clínico establecido en el

hospedero por causa de estos parásitos dependerá, de la especie, del proceso de multiplicación, y de su interacción con el sistema inmune del hospedero. Las manifestaciones clínicas de la malaria son pleomórficas pudiendo ocasionar desde episodios febriles de corta duración, hasta complicaciones sistémicas severas y la muerte (Llanos *et al.*, 2004). El espectro asociado a la enfermedad varía dependiendo de la especie y puede ir desde una parasitemia asintomática al paludismo grave y mortal, pasando por la enfermedad febril no complicada.

En personas no inmunes el paludismo da lugar a una fiebre paroxística bien definida con una periodicidad variable que dependiendo de la especie puede presentarse cada 24, 48 o 72 horas, y generalmente va precedida de escalofríos, y asociada a otros signos y síntomas como cefalea, anorexia, mialgias, dolor abdominal, tos, diarrea, intranquilidad, delirio y anemia (Ansley *et al.*, 2012). Aunque el cuadro clínico característico comprende escalofríos, fiebre y sudoración asociado a anemia, leucopenia y posteriormente a esplenomegalia, en muchos casos se presentan cuadros atípicos. El periodo de incubación es de 10 a 14 días, pero puede variar dependiendo de la especie del parásito implicada. Antes de aparecer el ataque agudo pueden observarse síntomas premonitorios inespecíficos tales como cefalea, malestar general, lumbalgia, mialgias, anorexia y vómitos. A medida que la infección malárica progresa se va originando la sintomatología clásica, la fase aguda se inicia con los accesos febriles precedidos por escalofríos, seguido de intensa sudoración; estos paroxismos se repiten cada 48 a 72 horas según la especie, en sintonía con la liberación de los parásitos por lisis de los eritrocitos (Londoño, 1998; Incani, 2000).

Aunque las diferentes especies de *Plasmodium* causan anemia por hemólisis del eritrocito, es *P. falciparum* el que generalmente conlleva a complicaciones a nivel cerebral, hipoglicemia, acidosis metabólica, dificultad respiratoria e insuficiencia renal, aunque en los últimos años se han observado también

episodios de esta naturaleza durante infecciones causadas por *P. vivax* (Echeverri *et al.*, 2003; Baird, 2013).

La infección ocasionada por *P. falciparum* es denominada fiebre terciaria maligna y en ella se presenta la sintomatología más severa, acompañada de frecuentes complicaciones a nivel sanguíneo, renal, hepático, pulmonar y cerebral que pueden ocasionar la muerte del paciente. Esta forma de paludismo se caracteriza por ocasionar anemia intensa, fiebre alta y prolongada, con una periodicidad de cada 36 a 48 horas, aunque puede ser irregular, remitente o continua. En los casos graves la cefalea es fuerte, el vómito es frecuente y puede presentarse delirio. La malaria cerebral es la presentación clínica más frecuente y la causa más común de defunción en la infección por esta especie (Rodríguez *et al.*, 2000; Baird, 2013).

En ese mismo ámbito el espectro de los síndromes graves descritos con *P. vivax* es similar a lo observado con *P. falciparum*, pero la frecuencia relativa y la importancia de cada síndrome son diferentes. Las manifestaciones clínicas del paludismo grave por *P. vivax* incluyen la anemia grave, trombocitopenia, edema pulmonar agudo y, con menos frecuencia, paludismo cerebral, pancitopenia, ictericia, rotura esplénica, hemoglobinuria, insuficiencia renal aguda y choque. El coma y otras complicaciones neurológicas son raras, así como la acidosis metabólica, pero hay que tener presente que tanto en la infección con *P. vivax* como en la de *P. falciparum* las comorbilidades contribuyen de forma importante a las complicaciones graves de la enfermedad (Baird, 2013; Douglas *et al.*, 2014; OMS, 2016).

La malaria es una enfermedad multifactorial, por lo que su epidemiología está determinada por factores humanos (edad, sexo, inmunidad, estado nutricional, hábitos culturales, grupos raciales, étnicos y los movimientos poblacionales; factores climáticos (principalmente la temperatura ambiental, la humedad y la

presencia de animales que permiten el mantenimiento de vectores infectados con el parásito); y factores vectoriales, ya que no todas las especies de *Anopheles* son vectoras, ni la capacidad vectorial es igual. *Anopheles darlingi* es considerada la especie más efectiva en la transmisión en toda América. La distribución y la estabilidad de la enfermedad y las diferentes especies que la producen en una determinada región se ve condicionada principalmente por tres factores, la distribución de los mosquitos vectores apropiados en la zona, las condiciones climáticas adecuadas que permiten el desarrollo del parásito en el vector y la genética humana (Guerra *et al.*, 2009; Hay *et al.*, 2010; Gething *et al.*, 2011). Por otro lado, aunque la razón más importante para la persistencia de la malaria es la presencia del vector *Anopheles*, los factores sociales y económicos también son importantes (Greenwood y Mutabingwa, 2002).

El paludismo presenta una amplia distribución geográfica en el mundo, por lo que se ha constituido en uno de los problemas de salud pública en Asia, Sudamérica, y en África Subsahariana, donde ocurren cerca de un 90% de muertes de los casos. Por consiguiente, la amenaza más alta de paludismo en el mundo se registra en el África Subsahariana, donde solo seis países de esa región registraron más de la mitad de todas las muertes por malaria a escala mundial en el año 2020, siendo estos: Nigeria con 26,80%, República Democrática Del Congo (12,00%), Uganda (5,40%), Mozambique (4,20%), Angola (3,40%) y Burkina Faso con 3,40% (OMS,2023).

En la región de las Américas después de un descenso sostenido en el número de casos de malaria durante varios años, se evidenció un aumento notable a partir del año 2015, observándose que países como Brasil, Ecuador, México, Nicaragua y Venezuela notificaron un incremento de los casos (OPS, 2018; OMS, 2018). Lo cual afecta notablemente la estrategia técnica mundial contra la malaria 2016-2030 de la OMS, que tiene como objetivo erradicar la enfermedad en 35 países como mínimo, y reducir las tasas mundiales de incidencia y

mortalidad en un 90% (OMS, 2017; OMS, 2018).

Los factores más importantes para el resurgimiento de la malaria tanto en el país como a nivel mundial, se asocian con la proliferación y dispersión de mosquitos resistentes a insecticidas, así como a la variación de sus hábitos; a la aparición y dispersión de formas resistentes de las especies del parásito a las drogas antimaláricas y en muchos casos al abandono o descuido en las políticas de erradicación y control de la infección (Sachs y Malaney, 2002; OMS, 2010; Messenger *et al.*, 2012).

La OMS en su informe mundial de malaria en el año 2017 señala que, para el año 2016 Venezuela reportó el 34,40% de todos los casos de malaria en el continente americano ocupando así el primer lugar de incidencia, llegando a desplazar a Brasil además esta cifra llegó a superar la suma de todos los casos de malaria de Brasil y Colombia para ese año (OMS, 2017).

Por su lado, el Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS) en su boletín epidemiológico N° 52 de ese mismo año (2016) registra en Venezuela hasta el 1 de diciembre un reporte total de 240.613 casos, lo que representa un aumento de 76,40% en relación al número de casos totales del año anterior (2015). Para la semana epidemiológica N° 26 del año siguiente (2017) según una data oficial no divulgada se señala que la incidencia aumentó 63,10% (184.225 casos) en comparación con el periodo homólogo del año 2016.

Aunque no se dispone de cifras actualizadas oficialmente publicadas por los órganos gubernamentales, ya que su divulgación está restringida en el país, un informe de la Organización Panamericana de la Salud elaborado en diciembre de 2017 con data oficial parcial suministrada por el MPPS, pone en evidencia una cifra alarmante de 319.765 casos de malaria lo que constituyó un record como la cifra más alta reportada en la historia del país desde el inicio del

registro obligatorio de casos (Oletta, 2018).

En esa misma data se reportó que para el año 2016 hubo transmisión autóctona de casos en 209 parroquias distribuidas en 89 municipios pertenecientes a 17 estados del país, siendo el estado Bolívar con 74,00%, el que aportó la mayor cantidad de casos en el país, y dentro de este el municipio Sifontes, que es donde se lleva a cabo la mayor actividad minera, fue el responsable del 43,00% de los casos; posteriormente se señala al estado Amazonas con el 10,00% de los casos, seguido de Sucre con 9,00%; Delta Amacuro con 4,00% y Monagas con 2,00%, lo que significa que solo estos cinco estados aportaron el 99,00% de la casuística nacional. Para este mismo año la fórmula parasitaria estuvo dominada por *P. vivax* con un 74,62% de los casos, seguida de *P. falciparum* con 19,00%, las infecciones mixtas con un 6,00% de los casos y *P. malariae* con 0,01%, fórmula que se mantuvo de manera similar para el año 2017 (Oletta, 2018).

Más recientemente en el informe mundial de malaria de la OMS (2020) se estima que en el año 2019 se produjeron en el país 467 421 casos de malaria lo que representa un aumento de 1200,00% en comparación con el año 2000, destacando además que la incidencia de la enfermedad en el país (32,8 casos por cada 1000 habitantes) es ocho veces más alta que la de países vecinos como Brasil y comparable a la de países como Etiopía (34 casos por cada 1000 habitantes), así como también las cifras de mortalidad son igual de alarmantes, estimándose 403 fallecimientos debido a la enfermedad durante ese mismo año, lo que significa que Venezuela representó para ese año el 73,00% del total de muertes por malaria en el continente americano.

A pesar de que entre el año 2019-2020 se observó una reducción de los casos reportados en el país, esto se debió principalmente a las restricciones en la movilidad durante el proceso de pandemia de Covid-19 y a la escasez de

combustible que afectó el transporte y a la industria minera en esa época (OMS, 2022); la baja en la casuística actualmente se ha mantenido debido a la reactivación de algunos aspectos en la logística del programa antimalárico en el país que habían estado muy descuidados, sin embargo aún está lejos de haber sido controlada.

Por otro lado, se ha podido observar en las fórmulas parasitarias de los últimos años, que se ha evidenciado un incremento en la proporción de los casos y números absolutos para las infecciones mixtas en el país, lo que implica un mayor desafío diagnóstico, así como una mayor posibilidad de casos graves y un mal control vectorial. Aunque se sigue estimando que la frecuencia de este tipo de infecciones es muy superior a la admitida tradicionalmente a nivel mundial. Reportándose en países desarrollados una frecuencia que oscila entre 2,00 y 12,00%, pero en algunos países endémicos, las técnicas moleculares han demostrado que estas infecciones pueden representar más del 30,00% de los casos de malaria (McKenzie y Smith, 2006; Kotepui *et al.*, 2020).

Estas variaciones de frecuencias dependen de los métodos empleados para el diagnóstico, porque aunque la microscopia convencional continúa siendo considerada la técnica de oro para el diagnóstico de la malaria, su sensibilidad disminuye notablemente cuando se encuentran bajas parasitemias, unido a esto contribuyen otros factores que afectan el diagnóstico como: la calidad de la gota gruesa y el extendido sanguíneo, la experiencia del microscopista, la falta de control periódico de la calidad de los procesos, entre otros (Cáceres *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2007). El límite de detección con microscopistas expertos se considera de aproximadamente 4 a 20 parásitos/ μ L de sangre, pero en entornos clínicos se considera que la microscopía carece de fiabilidad por debajo de 50 parásitos/ μ L (Wongrichanalai, 2007; Mohapatra *et al.*, 2008; Steenkeste, 2010).

Las fallas en la eficiencia del diagnóstico microscópico para la malaria incentivaron el desarrollado de métodos inmunológicos a fin de detectar antígenos específicos de *Plasmodium*, los cuales a pesar de su sencillez de ejecución, y rapidez de diagnóstico, muestran un desempeño de sensibilidad controversiales (Pérez *et al.*, 2007), observándose en estudios realizados en Venezuela baja sensibilidad de las pruebas rápidas de malaria frente a bajas parasitemias (<200 parásitos/ μ L), además de no permitir discriminar especies en infecciones mixtas, ni diferenciar entre *P. vivax* y *P. malariae*, lo que las hace de poca elección debido al aumento de casos de infecciones mixtas en áreas endémicas cuyo diagnóstico exacto permitiría la aplicación de un tratamiento apropiado (De Abreu *et al.*, 2001; Pabón *et al.*, 2007; Rodulfo *et al.*, 2007a; Zerpa *et al.*, 2008).

Por su lado, el desarrollo y la aplicación de las técnicas basadas en detección de secuencias de ADN de las especies maláricas, han sido aplicadas usando diferentes oligonucleótidos y diversos protocolos de extracción y detección, demostrando poseer alta especificidad y sensibilidad incluso en bajas parasitemias y en las infecciones mixtas (Barker *et al.*, 1992; Kain *et al.*, 1993; Snounou *et al.*, 1993a; Snounou *et al.*, 1993b; Patsoula *et al.*, 2003; Perandin *et al.*, 2004; Imwong *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014).

P. vivax es la especie que causa la mayor morbilidad en áreas endémicas de malaria en nuestro país, esta especie y *P. malariae* aunque causan cuadros clínicos menos severos, pueden encontrarse en coinfecciones con *P. falciparum* que es responsable de la mayor mortalidad. Los efectos de estas coinfecciones son inciertos, sin embargo, en áreas endémicas las infecciones mixtas por especies de *Plasmodium* son comunes y sugiere interacciones entre especies, que en conjunto con las diferencias en la estacionalidad e intensidad de la transmisión malárica, originan variaciones en la epidemiología y presentación

clínica del paludismo (Bruce *et al.*, 2000; Bruce y Day, 2003; Kotepui *et al.*, 2020).

En este ámbito es de resaltar que a pesar de que el estado Bolívar presenta la mayor casuística del país y de que en él circulan tres de las especies del parásito que causan la malaria, la fórmula parasitaria de los diagnósticos maláricos siempre reporta predominio de *P. vivax* y *P. falciparum*, y muy bajas frecuencias de infecciones mixtas por estas dos especies (Cáceres 2013; MPPS, 2000-2015). Además importante destacar que el patrón de transmisión concentrada localmente en el país ha cambiado desde hace más de una década a una fase de diseminación, lo cual está relacionado con la masiva migración humana hacia y desde el foco de mayor incidencia, que se encuentra ubicado precisamente en el municipio Sifontes del estado Bolívar, donde se originan el 40,00% de los casos del país y el 21,00% de todos los casos del continente, y donde convergen una situación social sin control favorecida por la explotación minera ilegal de oro en condiciones climáticas y ecológicas que favorecen y amplifican la transmisión, contribuyendo además a esto, otros factores como el abandono notable de las políticas y planes de control de la enfermedad así como la suspensión nacional de las medidas para el control de vectores por parte del gobierno nacional (Oletta, 2018).

Aunque para el año 2016 ya se señalaba un aumento en el número absoluto de casos de *P. falciparum* y de las infecciones mixtas (6,00%) en este estado, lo que se traduce en un incremento en el desafío diagnóstico y en la mayor probabilidad de desarrollarse casos clínicos graves que además deja entrever un mal manejo en el control de los vectores, lo que aunado al hecho de que cifras no divulgadas reportan que para ese estado del país el 64,00% de los casos de *P. vivax* sufren recaídas y el 13,00% de los casos de *P. falciparum* sufren recrudescencia, agravando aún más la perspectiva para lograr el control.

En el país existen muy pocos estudios que evalúen las infecciones mixtas en el contexto de su impacto clínico y epidemiológico empleando los métodos moleculares (Postigo *et al.*, 1998; Rodulfo *et al.*, 2007a; Rodulfo *et al.*, 2007b; Abou *et al.*, 2014). Es por ello, y por todo lo antes expuesto que se planteó el presente trabajo de investigación a fin de evaluar el desempeño de la microscopia en el diagnóstico de las infecciones mixtas producidas por las tres especies de *Plasmodium* que circulan en la zona de Tumeremo, municipio Sifontes del estado Bolívar, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa como estándar de referencia.

METODOLOGÍA

Población y muestra

Se evaluaron 229 pacientes que asistieron a la consulta de diagnóstico de malaria del Centro de Investigación de Campo "Dr. Francesco Vitanza" del Instituto de Altos Estudios en Salud Pública Dr. Arnoldo Gabaldón, situado en la población de Tumeremo, capital del municipio Sifontes en el estado Bolívar al este de Venezuela (ubicada a 7°17'57"N 61°30'16"O/7.299041, -61.504415). Para ello, se suministró información previa sobre el objetivo del estudio a todos los individuos evaluados utilizando un consentimiento previa información bajo la autorización del Comité de Bioética y Bioseguridad (CoBioBios) del Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas de la Universidad de Oriente (IBCAUDO) para la recolección de muestras sanguíneas en humanos y fue conducido de acuerdo a las normas establecidas para el trabajo en humanos según la declaración de Helsinki (OPS, 1990), en el caso de los niños se solicitó la autorización de los padres (Apéndice 1).

Información clínico-epidemiológica

A cada uno de los individuos evaluados, se le aplicó una ficha clínico-epidemiológica para obtener información de edad, sexo, procedencia y sintomatología al momento de la toma de muestras (Apéndice 2).

Recolección de la muestra

Posterior a la recolección de los datos se procedió a extraer a cada individuo una muestra de sangre por punción venosa en la región antecubital, la cual se

colocó en un tubo con anticoagulante EDTA, y una muestra por punción del lóbulo de la oreja para la preparación de la gota gruesa y el extendido sanguíneo (OMS, 2014).

Diagnóstico microscópico

Consistió en la demostración de la presencia del *Plasmodium* sp. en la sangre del paciente, empleando la gota gruesa y el extendido sanguíneo, coloreados con Giemsa por el método de lámina invertida. Por reunir en un espacio relativamente más pequeño una mayor cantidad de sangre, la gota gruesa facilita el diagnóstico de la infección malárica, principalmente cuando la parasitemia es baja; mientras que el extendido permite estudiar con más detalles la morfología del parásito dentro de los glóbulos rojos y establecer así el diagnóstico de la especie infectante. Las láminas fueron rotuladas con el número del paciente y la fecha de la realización de la prueba (OMS, 1999).

1. Elaboración de la gota gruesa:

Para la realización de la gota gruesa se colocaron 3 gotas de sangre obtenidas por punción del lóbulo de la oreja, previa antisepsia en la zona, las cuales se colocaron en un extremo de la lámina. Posteriormente se procedió a homogeneizar con la finalidad de desfibrinar la muestra de sangre hasta obtener una película gruesa y regular. Luego se dejó secar en forma horizontal y después se desheomoglobinizó con agua, para luego realizar la tinción con el colorante de Giemsa.

2. Elaboración del extendido sanguíneo:

Para la realización del extendido se colocó una gota de sangre, obtenida en el mismo momento de la punción del lóbulo de la oreja, la cual fue colocada en el centro de la lámina con la gota gruesa correspondiente al mismo paciente, se sostuvo otra lámina formando un ángulo de 45° y se deslizó para extender la gota mediante un movimiento suave, rápido y uniforme sin levantarla formando

una película delgada que se dejó secar (Homez y Soto, 1995).

3. Coloración y visualización de la gota gruesa y el extendido sanguíneo: Una vez preparadas las láminas, se fijaron los extendidos con metanol durante 5 minutos, luego se tiñeron las láminas con la gota gruesa y el extendido sanguíneo de forma simultánea, por el método de lámina invertida con colorante de Giemsa a una dilución de 1:10 (3 gotas de colorante por cada mililitro de amortiguador de Giemsa) durante 30 minutos, finalmente las láminas se lavaron con agua destilada y se secaron al aire libre. Las láminas se examinaron al microscopio bajo el objetivo de 100X usando aceite de inmersión. Los análisis de gota gruesa y extendido sanguíneo se consideraron negativos después del examen de 100 campos microscópicos, de acuerdo a los criterios definidos por la OMS (OMS, 1999).

Diagnóstico molecular

Extracción de ADN genómico a partir de punción venosa

La extracción y purificación del ADN genómico de las 229 muestras se realizó a partir de sangre completa anticoagulada (5 mL con EDTA) obtenida mediante la punción venosa y empleando el kit de extracción de ADN genómico Wizard Genomic[®] de Promega Corp., Madison, WI, USA, realizando el siguiente protocolo:

1. Se colocaron 300 μ L de la sangre total de cada paciente en tubos eppendorf estériles posteriormente se lavó con 1 mL de PBS pH 7,4, para luego centrifugarse a 14 000 rpm durante 2 minutos a 18°C.
2. Después de descartar el sobrenadante al sedimento obtenido se le añadió nuevamente 1 mL de PBS pH 7,4 y 20 μ L de proteinasa K (10 mg/mL) y se incubó durante 2 horas a 56°C en un bloque de calentamiento.

3. Posteriormente se centrifugó a 14 000 rpm durante 2 minutos a 18°C, luego se descartó el sobrenadante.
4. Al sedimento se le añadieron 900 µL de solución lisante de células, se mezcló y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Luego de la incubación se centrifugó nuevamente a 14 000 rpm durante 5 minutos a 18°C y se descartó el sobrenadante, el sedimento se mezcló vigorosamente en un vortex por 20 segundos.
6. Seguidamente se mezcló con 300 µL de solución lisante de núcleos y 10 µL de ARNasa (10 mg/mL), invirtiéndose suavemente e incubándose durante 10 minutos a temperatura ambiente.
7. Luego a la mezcla anterior se le añadió 100 µL de solución precipitante de proteínas, se mezcló vigorosamente durante 20 segundos y se incubó en frío durante 5 minutos.
8. Pasado el tiempo se procedió a centrifugar a 14 000 rpm durante 5 minutos a 4°C.
9. El sedimento con proteínas fue eliminado y el ADN obtenido fue precipitado con 400 µL de isopropanol a temperatura ambiente, luego de mezclar bien se centrifugó a 14 000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
10. Se descartó el isopropanol y se agregaron 600 µL de etanol al 70% a temperatura ambiente, se procedió a centrifugar a 14 000 rpm durante 3 minutos a 4°C.
11. Posteriormente se descartó el etanol y se dejó secar a 37°C.
12. Por último, se procedió a hidratar con buffer 10 mM Tris-1 mM EDTA pH 8, y se incubó a temperatura ambiente durante 24 horas.

Realización de la PCR *Nested* multiplex

Una vez purificado el ADN genómico se procedió a realizar la amplificación de la secuencia que codifica la subunidad pequeña del ARN ribosomal 18S,

genero-especie específica de acuerdo al protocolo propuesto por Snounou *et al.* (1993b). Para ello, se amplificó un fragmento de 1200 pb específico del género *Plasmodium* (oligonucleotidos rPLU5 y rPLU6) y posteriormente se realizó multiplex PCR amplificando los fragmentos específicos de 120 pb para la especie *P. vivax* (rPV1 y rPV2), 205 pb para *P. falciparum* (rPF1 y rPF2) y 144 pb para *P. malariae* (rMAL1 y rMAL2).

Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 20 μ L usando: buffer de PCR 1X, 2 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3; 0,1 mg/mL^{-1} gelatina, 125 μ M de cada desoxirribonucleótido trifosfato, 250 nM de cada oligonucleótidos y 0,75 U de taq polimerasa (Promega Corp.). El programa usado para la amplificación fue el siguiente: para la primera reacción de 25 ciclos: desnaturalización a 94°C por 1 minuto; apareamiento a 58°C por 2 minutos, extensión a 72°C por 2 minutos y extensión final a 72°C por 10 minutos. Luego se realizó una segunda amplificación de la misma manera a la descrita anteriormente, pero con un total de 30 ciclos en un termociclador marca Techne, modelo TC-512.

Los productos amplificados fueron corridos por electroforesis en gel de agarosa al 2%, en buffer TBE 1X (Tris-Ácido Bórico-EDTA) a 100 V por 30 minutos, luego fueron visualizados en un transluminador ultravioleta usando coloración de bromuro de etidio (0,5 μ g/mL) y marcador de peso molecular de 100 pb (Promega). Se emplearon 25 muestras controles (10 muestras de *P. vivax*, 10 de *P. falciparum* y 3 de *P. malariae*) que fueron diagnosticadas positivas por microscopía, OptiMAL y PCR en un estudio previo (Rodulfo *et al.*, 2007b) del Laboratorio de Genética Molecular (LGM) del IIBCAUDO. Una vez lograda la optimización de la PCR *Nested* multiplex se procedió a realizar las amplificaciones correspondientes en las 229 muestras de individuos de Tumeremo.

Análisis estadístico

La evaluación de las metodologías de extracción de ADN y diagnóstico de malaria, se realizó mediante el análisis de asociación utilizando la prueba de Kappa con su interpretación en fuerza de concordancia: < 0,10 (ninguna); 0,11- 0,40 (regular); 0,41- 0,60 (discreta); 0,61- 0,80 (buena); 0,81- 1,00 (óptima) (Abraira, 2000; Fleiss, 2000). El diagnóstico por PCR *Nested* multiplex fue considerado método de referencia, debido a que las metodologías moleculares han demostrado tener mayor sensibilidad y especificidad que la microscopía convencional para la detección e identificación de infecciones maláricas en individuos asintomáticos e infecciones mixtas (Boonma *et al.*, 2007; Rodulfo *et al.*, 2007b; Ohrt *et al.*, 2008; Rakotonirina *et al.*, 2008). Las variables medidas fueron: el número de verdaderos positivos (VP), número de verdaderos negativos (VN), número de falsos positivos (FP) y el número de falsos negativos (FN). La sensibilidad fue calculada como $VP / (VP + FN)$, la especificidad como $VN / (VN + FP)$, el valor predictivo positivo (VPP) fue calculado como $VP / (VP + FP)$ y valor predictivo negativo (VPN) como $VN / (FN + VN)$. Adicionalmente, se calculó la eficiencia de los métodos por medio de la combinación de los datos de sensibilidad y especificidad como $(VN + VP) / (VN + VP + FP + FN)$ (Margni, 1999; Bravo *et al.*, 2015)

RESULTADOS

Se evaluaron 229 individuos, de ambos sexos y con edades comprendidas entre los 0 y 67 años de edad. El diagnóstico microscópico permitió la detección de 136 individuos positivos (59,40%), siendo las infecciones por *P. vivax* las más frecuentes, seguidas de las producidas por *P. falciparum*, mientras que tres casos correspondieron a mono infecciones por *P. malariae* y solo un 2,20% (5 casos) de las infecciones fueron diagnosticadas como mixtas para las especies *P. vivax/P. falciparum*. El análisis clínico de los individuos demostró que la mayoría de los infectados por cualquiera de las especies de *Plasmodium* encontradas eran sintomáticos para el momento de la toma de muestra, mientras que, como era de esperarse, la mayor frecuencia de asintomáticos correspondió a los individuos no infectados, sin embargo, hay que resaltar que dos individuos reportados infectados con *P. falciparum* no presentaron ningún tipo de sintomatología (Tabla I).

TABLA I. Frecuencia de infecciones por especies de *Plasmodium* diagnosticadas por microscopía convencional, en individuos sintomáticos y asintomáticos en Tumeremo, municipio Sifontes, estado Bolívar.

Especies	Individuos					
	Sintomáticos		Asintomáticos		Total	
	N	%	N	%	N	%
<i>P. vivax</i>	79	34,50	0	0	79	34,50
<i>P. falciparum</i>	47	20,50	2	0,90	49	21,40
<i>P. malariae</i>	3	1,30	0	0	3	1,30
Infecciones mixtas	5	2,20	0	0	5	2,20
Negativos	68	29,70	25	10,90	93	40,60
Total	202	88,20	27	11,80	229	100,00

Por su lado, el diagnóstico molecular de malaria por PCR *Nested* multiplex en los individuos evaluados, amplificando el género *Plasmodium* (Figura 1A), y las especies *P. falciparum*, *P. vivax* y *P. malariae*, permitió detectar mayor número de casos positivos 160 (69,90%), en comparación con la microscopía convencional, tal como se observa en la tabla II, destacando un 15,00% de los positivos a malaria que fueron identificados por la técnica molecular como infecciones mixtas causadas por *P. vivax/P. falciparum* (Figura 1D); así como un 56,88% de monoinfecciones por *P. vivax* que se traduce en 12 casos adicionales que no fueron detectados por la microscopía convencional, además de 24 casos que se habían reflejado como negativos a la infección con la microscopía convencional, y que a través de la técnica molecular resultaron positivos (Tabla II).

Del total de muestras analizadas, el 21,00% (48/229) presentaron resultados discordantes entre la microscopía y el PCR *Nested* multiplex, encontrándose que, de las muestras diagnosticadas por microscopía como monoinfecciones por *P. vivax*, seis de estas resultaron ser infecciones mixtas por la técnica molecular y una resultó ser negativa. En cuanto a las 49 monoinfecciones producidas por *P. falciparum* microscópicamente diagnosticadas, catorce fueron encontradas como infecciones mixtas por la técnica molecular y una muestra resultó ser positiva para la especie *P. vivax*. Fue importante el hecho de que, de las 93 muestras reportadas negativas a malaria por la microscopía convencional, al ser analizadas con la PCR *Nested* multiplex se detectaron 17 muestras positivas a monoinfecciones con *P. vivax* y 8 a monoinfecciones por *P. falciparum*, lo que representa una discordancia de 15,60% de individuos infectados que no fueron diagnosticados mediante el método convencional (Tabla III).

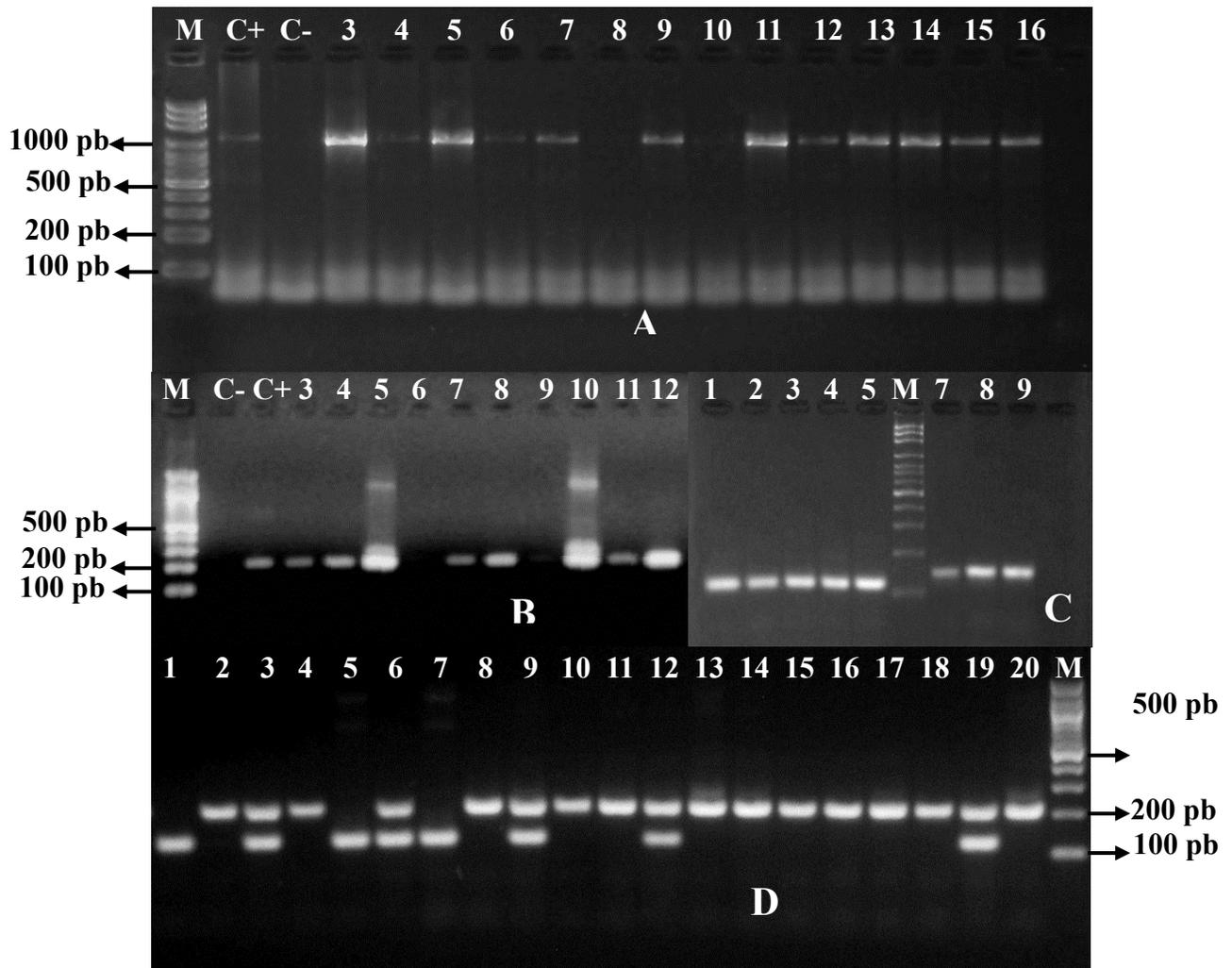


FIGURA 1: Productos amplificados por PCR *Nested* multiplex para la identificación de especies maláricas. **A**: detección del género *Plasmodium* (1200 pb) pozos 3-16. **B**: identificación de *P. falciparum* (205 pb) pozos 3-12 **C**: identificación de *P. vivax* (120 pb) pozos 1-5 y *P. malariae* (144 pb) pozos 7-9. **D**: PCR *Nested* multiplex para identificación de *P. vivax* (pozos 1,5,7) y *P. falciparum* (pozos 2,4,8,10,11,13-18,20) e infecciones mixtas por ambas especies (pozos 3,6,9,12,19). M: marcador de peso molecular (100 pb); C+: control positivo; C-: control negativo. Gel de agarosa al 2% coloreado con bromuro de etidio.

TABLA II. Comparación entre la microscopía convencional y la PCR *Nested multiplex* para la identificación de especies maláricas en individuos de Tumeremo, municipio Sifontes, estado Bolívar

Especie	Microscopía		PCR <i>Nested multiplex</i>	
	N	%	N	%
<i>P. vivax</i>	79	34,50	91	39,74
<i>P. falciparum</i>	49	21,40	42	28,34
<i>P. malariae</i>	3	1,31	3	1,31
Mixtas	5	2,18	24	10,48
Negativas	93	40,61	69	30,13
Total	229	100,00	229	100,00

Infecciones mixtas: infecciones *P. vivax/P. falciparum*

TABLA III. Discordancia entre la microscopía convencional y la PCR *Nested multiplex* en la identificación de especies maláricas en individuos de Tumeremo, municipio Sifontes, estado Bolívar

Microscopía	PCR <i>Nested multiplex</i>						
	Especies	<i>P. vivax</i>	<i>P.falciparum</i>	<i>P. malariae</i>	Mixtas	Negativos	Total
<i>P. vivax</i>		72	0	0	6	1	79
<i>P. falciparum</i>		1	34	0	14	0	49
<i>P. malariae</i>		0	0	3	0	0	3
Mixtas		1	0	0	4	0	5
Negativos		17	8	0	0	68	93
Total		91	42	3	24	69	229

Infecciones mixtas: infecciones *P. vivax/P. falciparum*

Por consiguiente, los resultados obtenidos por la PCR *Nested* multiplex afectaron los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la microscopía para la detección de la infección malárica, así como también la identificación de especies. En este sentido, se observó que la sensibilidad de la microscopía para la detección de la infección malárica y para la identificación de las especies no superó el 85,00%, siendo menos eficaz para la identificación de las infecciones producidas por *P. vivax*; mientras que la especificidad de la técnica fue similar en todos los casos (Tabla IV). Por otro lado, al evaluar las concordancias entre los resultados de la microscopía convencional con respecto a PCR *Nested* multiplex por coeficiente de Kappa, se encontró que ambos métodos presentaron una concordancia discreta para detectar la positividad a la malaria ($0,56 \pm 0,05$) así como, para identificar las infecciones individuales producidas por la especie *P. vivax* ($0,57 \pm 0,05$) mientras que para las infecciones por *P. falciparum* la concordancia resultó buena ($0,63 \pm 0,05$).

TABLA IV. Valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) y eficiencia de la microscopía convencional comparado con la PCR *Nested* multiplex.

Diagnóstico	Sensibilidad %	Especificidad %	VPP %	VPN %	Eficiencia %
Malaria	84,38	98,55	99,26	73,12	88,65
<i>P. falciparum</i>	78,79	98,77	96,30	92,00	93,01
<i>P. vivax</i>	72,17	99,12	98,81	77,93	85,59

Al asociar el sexo con la especie de *Plasmodium* identificada en los individuos evaluados en Tumeremo, la mayor frecuencia de infecciones por *P. vivax* ocurrieron en individuos del sexo femenino (52,73%) mientras que *P. falciparum* fue más frecuente en el sexo masculino (33,30%) y las infecciones mixtas se presentaron con la misma frecuencia en ambos sexos. No obstante, el análisis

de la asociación por regresión logística binaria entre el sexo y las infecciones según las especies de *Plasmodium* diagnosticadas demostró que solo hubo asociación estadística de *P. vivax* con el sexo femenino (P=0,003).

TABLA V. Frecuencia de infecciones maláricas de acuerdo al sexo en individuos sintomáticos y asintomáticos de Tumeremo, municipio Sifontes, estado Bolívar.

	Femeninos				Masculinos			
	Infectados		No Infectados		Infectados		No Infectados	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>P. vivax</i>	29	52,73	26	47,27	86	49,93	88	50,57
<i>P. falciparum</i>	8	14,55	47	85,45	58	33,33	116	66,67
Mixtas	1	1,82	54	98,18	2	1,15	172	98,85

Infecciones mixtas: infecciones *P. vivax*/*P. falciparum*

Por otro lado, cuando se analizaron las infecciones maláricas con respecto a los grupos etarios de los individuos evaluados, *P. vivax* mostró patrón de aumento hasta el grupo de 20 a 29 años de edad, de allí en adelante no hay un patrón característico para esta especie. Por su parte las infecciones por *P. falciparum* tampoco mostraron un patrón específico, mientras que las infecciones mixtas por estas dos especies maláricas mostró un patrón de aumento hasta el grupo etario de 30 a 39 años y de allí se observa un descenso entre los 40 a 49 años (Figura 2). Sin embargo, a pesar de estos resultados los análisis de asociación por Chi-cuadrado entre los grupos de edades y las infecciones por *P. vivax* ($\chi^2=0,57$; P=0,967), *P. falciparum* ($\chi^2=6,26$; P=0,181), mixtas por *P. vivax*/*P. falciparum* ($\chi^2=1,66$; P=0,798), no mostraron significancia estadística.

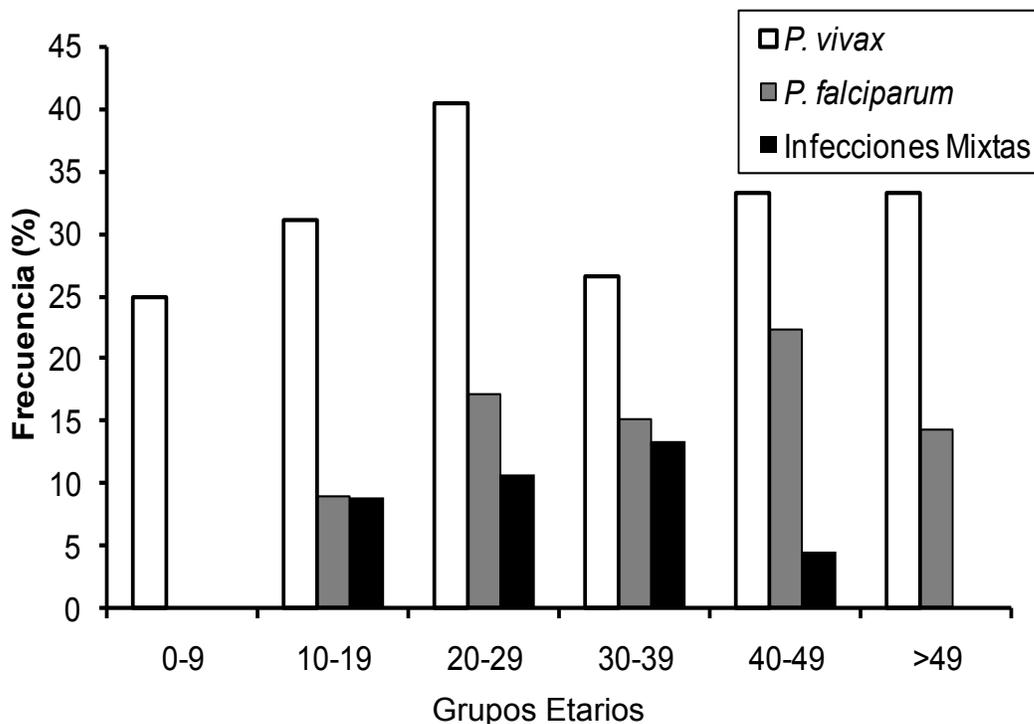


FIGURA 2. Frecuencia de infecciones maláricas de acuerdo a los grupos etarios en individuos sintomáticos y asintomáticos de Tumeremo, municipio Sifontes, estado Bolívar.

Quando se analizó la sintomatología que presentaron estos individuos al momento de la toma de muestras, como era de esperarse las infecciones por *P. vivax*, *P. falciparum* e infecciones mixtas por estas dos especies se asociaron estadísticamente de forma significativa con la presencia de fiebre, cefalea y escalofríos; sin embargo, las mono infecciones producidas por *P. falciparum* adicional a esta sintomatología clásica presentaron asociación con la debilidad, de la misma manera, tanto las infecciones por *P. vivax* como las producidas por *P. falciparum* resultaron asociadas con la actividad minera de la zona, no obstante no se observó asociación de esta actividad con las infecciones mixtas producidas por ambas especies (Tabla VI).

TABLA VI. Variables clínico-epidemiológicas asociadas estadísticamente a las infecciones maláricas en individuos sintomáticos y asintomáticos de Tumeremo, municipio Sifontes, estado Bolívar.

Especies de Plasmodium	Variable	Chi-cuadrado	Risk Ratio	RR-CI	RR+CI
<i>P. falciparum</i>	Minería	7,42**	1,62	1,16	2,26
	Fiebre	4,71*	1,14	1,03	1,27
	Cefalea	12,70***	1,42	1,20	1,68
	Temblor	18,29***	1,60	1,32	1,93
	Debilidad	5,27*	1,28	1,05	1,55
<i>P. vivax</i>	Minería	19,73***	2,28	1,54	3,37
	Fiebre	6,76**	1,16	1,04	1,30
	Cefalea	32,26***	1,75	1,42	2,15
	Temblor	52,93***	2,30	1,78	2,98
Mixtas <i>P. falciparum/P. vivax</i>	Fiebre	5,03*	1,21	1,14	1,29
	Cefalea	10,76**	1,54	1,34	1,76
	Temblor	17,82***	1,81	1,60	2,04

*Significativo (P< 0,05)

** Muy significativo (P< 0,01)

*** Altamente significativo (P< 0,001)

DISCUSIÓN

La incidencia malárica del estado Bolívar durante los últimos 15 años ha sido la más alta reportada en la historia malárica de Venezuela desde que se realizan los registros de los casos (Cáceres, 2011; Cáceres, 2013; Rodríguez y Paniz, 2014), lo que coincide con la elevada frecuencia de infecciones maláricas encontradas en esta investigación (69,90%) empleando PCR *Nested* multiplex en los individuos evaluados de la población de Tumeremo, municipio Sifontes, estado Bolívar, así como el predominio de la especie *P. vivax*, que ha sido históricamente reportada como especie dominante en la fórmula parasitaria del país.

En esta investigación se observó que los individuos con edades comprendidas entre los 0-29 años fueron los más afectados por la infección malárica, y las infecciones por *P. falciparum* se presentaron con mayor frecuencia en el sexo masculino, coincidiendo esto con el estudio de Marques *et al.* (2008) en Brasil, donde determinaron mayor frecuencia de infecciones maláricas en hombres que en mujeres (77,00% y 23,00%, respectivamente) pero a diferencia de esta investigación ellos reportan que el mayor número de casos se produjo en edades comprendidas entre los 30 y los 39 años.

Por su lado, Forero *et al.* (2021) reportan en un estudio realizado en pacientes que acudieron a tres centros de atención de Ciudad Bolívar en el año 2019, que, al igual que en la presente investigación en general hubo una mayor prevalencia de casos por *P. vivax* (69,70%) y con mayor incidencia en el sexo masculino (69,00% de los casos), y señalan la edad de 33 años como promedio entre los individuos infectados.

Sin embargo, en el presente estudio la mayor frecuencia de infecciones por *P. vivax* ocurrieron en individuos del sexo femenino (52,70%). Hallazgos similares

han sido reportados por Duarte *et al.* (2001) señalando además que el sexo femenino es un factor de riesgo asociado a las recaídas por *P. vivax*, así como por Sojo *et al.* (2008) en un estudio donde se determinó la recurrencia de malaria en 53 personas infectadas por *P. vivax* sin complicaciones, en el estado Sucre, donde reportaron mayor infección en el sexo femenino y una frecuencia de recurrencias de 53,80% para el mismo. No obstante, Iannacone *et al.* (1999) en Perú, al evaluar 208 muestras de sangre para diferenciar *P. vivax* de *P. malariae* señalaron que la prevalencia de malaria fue independiente del sexo, mientras que los grupos de edades de 0-10 años y de 41-50 años presentaron la mayor prevalencia de infección.

Las infecciones maláricas con respecto a los grupos etarios evaluados en los individuos de Tumeremo no evidenciaron asociación; sin embargo, *P. vivax* mostró patrón de aumento hasta el grupo de 20-29 años y las infecciones mixtas demostraron aumento hasta el grupo etario de 30-39 años. Otros investigadores, señalan que las infecciones por *P. vivax* tienen picos en edades jóvenes, contribuyendo proporcionalmente a disminuir la enfermedad febril de *P. falciparum* (Genton *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 2001; Kasehagen *et al.*, 2006).

En individuos no inmunes, la infección con alguna de las especies del parásito da lugar a la aparición de un cuadro febril paroxístico bien definido, con una periodicidad que varía según la especie, entre 48 a 72 horas en aparecer, y que generalmente está precedido de escalofríos. pudiendo desarrollarse otros síntomas como cefaleas, anorexia, mialgias, dolor abdominal, tos, diarrea, intranquilidad y delirio (Paya y Carreras, 2004). Sin embargo, existen individuos que residen en forma permanente en zonas de alta endemicidad malárica, que adquieren de manera progresiva una inmunidad parcial, que consiste en una protección inicial contra las formas más graves de la enfermedad, disminuyendo los riesgos de malaria complicada en función de la edad y posteriormente hay una supresión de la parasitemia a niveles bajos o incluso indetectables (Snow

et al., 1998; Bassat *et al.*, 2008). Esta inmunidad adquirida se debe posiblemente, a la exposición acumulativa de un gran repertorio de variantes antigénicas de las formas sanguíneas de los parásitos maláricos (Bull *et al.*, 1998). Algunos estudios señalan que en las zonas con mayor endemidad a la malaria, la inmunidad a *P. vivax* se adquiere más rápidamente que la inmunidad a *P. falciparum*, por lo que las tasas de incidencia y prevalencia de infecciones por *P. vivax* alcanzan sus valores máximos a edades menores que en el caso de las infecciones por *P. falciparum* (González *et al.*, 2008; Mueller *et al.*, 2009).

En lo que se refiere a la sintomatología de los individuos evaluados en esta investigación, a pesar que la mayoría de los infectados con malaria fueron sintomáticos, siendo la fiebre, el escalofrío y la cefalea los principales síntomas asociados, se detectaron individuos infectados con *P. falciparum* asintomáticos, lo que pudiera estar relacionado con lo previamente expuesto sobre la adquisición de inmunidad en áreas endémicas; esto, también ha sido reportado anteriormente en el estado Amazonas, Venezuela, por Rodolfo *et al.* (2007a), quienes al estudiar 200 muestras de pacientes sintomáticos y asintomáticos, detectaron que el 24,60% (14/57) de los individuos que estaban infectados por *Plasmodium* no presentaron síntomas y de éstos, 15,20% fueron diagnosticados como *P. falciparum*. Una de las consecuencias más importantes de la infección malárica asintomática es que las personas no buscan atención médica o tratamiento y, por tanto, pueden llegar a ser portadores de gametocitos, que contribuyen a la persistencia de la transmisión, los que se constituyen en un gran reservorio de personas infectadas que ignoran que lo están y son foco de infección a los vectores (Bousema *et al.*, 2004; Alves *et al.*, 2005; Cucunubá *et al.*, 2008). Además, la infección asintomática también se ha señalado como un factor de riesgo para el desarrollo de anemia crónica y complicaciones en los pacientes con malaria (Verhoef *et al.*, 2001).

En un estudio reciente realizado en Botswana por Motshoge *et al.* (2021) donde

se evaluaron 1614 niños usando PCR, resaltan que el 99,60% de los que resultaron infectados eran asintomáticos, lo que se traduce en que el parásito se ha expandido dentro de la población de ese país de esa manera, por lo que ellos recomiendan poner una cuidadosa atención en el diagnóstico adecuado a fin de poder aplicar medidas eficientes para su eliminación.

Por otro lado, Forero *et al.* (2021) señalan que en su investigación encontraron como síntomas más frecuentes la fiebre (96,50%), seguida de los escalofríos (91,30%) y la cefalea (90,60%), hallazgos similares al presente trabajo, señalando que al menos uno de esos síntomas en su investigación se asoció con el desarrollo de malaria severa en 69 casos, resaltando además que la inesperada alta prevalencia de *P. vivax* encontrada en pacientes con al menos un criterio de enfermedad clínica severa en la zona evaluada, resultó un motivo importante de preocupación, ya que independientemente de la especie diagnosticada se presentaron alteraciones hematológicas y bioquímicas notables. En este mismo ámbito, Barrada *et al.* (2019) en el contexto de un estudio que realizaron en indígenas del Bajo Caura, en el estado Bolívar encontraron por igual las variables clínicas, fiebre, escalofríos, y dolor de cabeza entre los factores asociados.

El diagnóstico oportuno y específico de los casos es fundamental para la atención de los pacientes y el control de la enfermedad. La OMS privilegia un diagnóstico eficaz de los casos como preámbulo efectivo al tratamiento y control de la enfermedad. Desde que se describiera por primera vez en 1880, el diagnóstico del paludismo se ha realizado mediante la observación de las distintas formas del parásito en el examen microscópico de extendidos de sangre periférica teñidas con diferentes colorantes. Esta técnica que sigue siendo considerada el método de referencia, sin embargo tiene sus limitaciones o desventajas como el hecho de que se considera que el límite de detección con microscopistas expertos es de aproximadamente de 4 a 50 parásitos por

microlitros de sangre, por lo que en entornos clínicos se considera que carece de fiabilidad cuando la parasitemia está por debajo de 50 parásitos por microlitro (Wongsrichanalai *et al.*, 2007), situación que se presenta en un alto porcentaje personas que viven en zonas endémicas a la enfermedad por el desarrollo de inmunidad parcial o debido al consumo de drogas antimaláricas a niveles subcurativos, lo que hace que el grado de sensibilidad y especificidad de la técnica esté directamente relacionada con el grado de la parasitemia (Bianco *et al.*, 2007; Bassat *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009).

Lo anteriormente planteado ha impulsado el desarrollo y uso de otras técnicas como los métodos basados en la amplificación y detección de ácidos nucleicos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) los cuales han demostrado poseer una alta sensibilidad y especificidad para detectar parasitemias de hasta 5 parásitos por microlitro de sangre con seguridad en la identificación de la especie infectante y que además resultan muy valiosas para los estudios de diversidad genética de los parásitos, ya que proveen más información sobre la epidemiología de la enfermedad, así como en estudios de control y evaluación de tratamientos. Se ha señalado que la sensibilidad analítica de la PCR es mucho más alta que la del diagnóstico microscópico (<5 parásitos por microlitros de sangre), lo que hace posible la identificación de casos de la enfermedad que no son detectados usando el método convencional, tal como sucedió en el presente trabajo de investigación donde se evidenció que la PCR detectó un mayor número de individuos infectados con especies maláricas (69,90%) que la microscopia convencional (59,40%), además, de que permitió la identificación exacta de las especies maláricas causantes de la infección en los individuos evaluados de Tumeremo, siendo importante 25 casos (15,60%) de infecciones maláricas que fueron reportadas negativas por la microscopia convencional.

Steenkeste *et al.* (2010) señalan que la microscopia convencional y las pruebas

de diagnóstico rápido tienen baja sensibilidad cuando se presentan parasitemias de muy baja densidad, lo que conduce a que estas personas que generalmente son asintomáticas, se conviertan en un reservorio potencial de infección, además de que por este método suelen pasarse por alto infecciones mixtas dobles y triples que pudieran estar presentes; por lo cual recomiendan el uso de técnicas moleculares en las zonas endémicas por presentar mayor sensibilidad y especificidad.

En Venezuela se han reportado fallas en el diagnóstico microscópico debido a la calidad de la preparación teórica y práctica del personal de la red de vigilancia de malaria, en su componente de diagnóstico microscópico, municipio Cajigal, estado Sucre (Sojo *et al.*, 2008), así como también se han llevado a cabo algunos estudios que han demostrado elevada sensibilidad de la PCR para el diagnóstico de infecciones maláricas, detección de falsos negativos de la microscopia convencional e infecciones mixtas (Postigo *et al.*, 1998; Rodulfo *et al.*, 2007a; Rodulfo *et al.*, 2007b; Abou *et al.*, 2014), lo que ha sido señalado también en otras regiones como Pará, Brasil donde se evaluaron infecciones mixtas por PCR tiempo real a fin de esclarecer el impacto que tiene la identificación errónea de las distintas especies del parásito que circulan en esa región, detectándose una elevada prevalencia de infecciones mixtas circulantes (46,00%) de las cuales 33,30% eran producidas por *P. vivax* y *P. malariae* las cuales habían sido reportadas por la microscopia como monoinfecciones por *P. vivax*, por lo que señalan la necesidad de implementar técnicas moleculares en el diagnóstico en estas áreas (Cunha, *et al.*, 2021).

Hallazgo similar al encontrado en la presente investigación en donde se detectaron 24 casos (15,00%) de infecciones mixtas *P. vivax/P. falciparum* mediante la PCR *Nested* multiplex, de los cuales 20 de estos habían sido diagnosticados por la microscopía como monoinfecciones por *P. vivax*. Al respecto, se ha señalado que en las infecciones mixtas puede existir

predominio de una especie sobre otra, lo que podría ser importante en el debilitamiento de los síntomas clínicos de la infección (Lorenzetti *et al.*, 2008). Además, los casos de infecciones mixtas suelen ser confundidos como una infección simple por microscopía, debido en parte a la similitud morfológica entre algunas especies, lo que hace difícil diferenciarlas (Mohapatra *et al.*, 2008). La identificación correcta de especies es frecuente por PCR, hecho que se evidencia en un estudio llevado a cabo en Malasia donde un caso que había sido reportado microscópicamente como *P. malariae*, luego fue identificado como *P. knowlesi* por esta técnica molecular (Lee *et al.*, 2009).

En Venezuela se han reportado errores de diagnóstico microscópico de infecciones mixtas que alcanzan un 33,30% del total de desaciertos por especie y se reporta aumento sostenido de los casos de este tipo de infecciones. Los casos de malaria mixta son considerados un grupo de riesgo especial, porque con frecuencia son diagnosticados y tratados como una malaria por *P. vivax*, y la infección de *P. falciparum* queda sin tratar. Estos pacientes tienen infecciones más prolongadas y, por lo tanto, están en riesgo de desarrollar complicaciones tardías. La detección de infecciones mixtas es importante no sólo para la aplicación del tratamiento médico, sino también para el conocimiento real de la incidencia de cada una de las especies de *Plasmodium* y consecuentemente su potencial transmisión, factores ambos fundamentales para la elaboración de medidas de control y valoración de su eficacia (Cáceres *et al.*, 2006; Tobón, 2009; Cáceres, 2010).

En Etiopía hay estudios que han demostrado que la PCR puede ser la mejor herramienta para medir la prevalencia de *Plasmodium* y para detectar parasitemias submicroscópicas que indudablemente afectan el control de la malaria; Dentro de estos resaltan la investigación realizada por Tajebe *et al.* (2014) en el noreste de ese país durante un periodo de tres meses en pacientes que acudieron a siete centros de salud y al reevaluar por PCR tiempo real, los

168 casos que habían sido diagnosticados por microscopia como positivos a *P. falciparum* (158 casos), *P. vivax* (7 casos) y 3 como infecciones mixtas, encontraron resultados totalmente discordantes, concluyendo que la reevaluación de las muestras mostró niveles altos de infecciones mixtas así como, de mono infecciones con *P. ovale* y *P. vivax* que habían sido pasadas por alto, por lo que recomiendan el uso de las herramientas de diagnóstico molecular para prevenir el advenimiento de cepas resistentes a los medicamentos debido a la aplicación de tratamientos inadecuados a consecuencia de diagnósticos erróneos. En otra investigación llevada a cabo por Ehtesham *et al.* (2015) en el sureste de Irán donde se compararon cuatro técnicas de diagnóstico para la malaria, se reportó al igual que la sensibilidad de la microscopia fue baja en comparación con la PCR en la identificación de las infecciones mixtas.

Lo anteriormente planteado es respaldado en un estudio más reciente realizado en ese mismo país por Leonard *et al.* (2021) donde se evaluaron fallas en el diagnóstico de infecciones mixtas en el contexto de un gran estudio de eficacia terapéutica que se llevaba a cabo, y en el cual participaron múltiples microscopistas expertos y aun así al reevaluar las muestras de los pacientes diagnosticados como positivos por microscopia, se encontraron infecciones mixtas que no habían sido reportadas pasándolas por alto. Por su lado, Golassa *et al.*, (2013); Alemu *et al.* (2014) y Mwingira *et al.* (2014) señalan que en Tanzania la microscopia ha mostrado el peor desempeño para detectar portadores de *P. falciparum* que han sido identificados por PCR, por lo que resaltan que la microscopia no es una técnica suficientemente exacta para elaborar políticas de control de la malaria debido a que para ello se necesitan datos de prevalencia precisas a fin de garantizar el éxito de la vigilancia epidemiológica, por ello recomiendan la necesidad de normalizar el uso de técnicas moleculares para estimar con precisión la infección malárica y el potencial de transmisión en una población. En este mismo orden de ideas, Deo

et al. (2012) evaluaron la diferencia entre los resultados obtenidos por la microscopia y la PCR *Nested* en el diagnóstico de la enfermedad y en el seguimiento del tratamiento antimalárico en la región de Sumba Barat Daya en Indonesia, señalando que observaron marcadas diferencias en los resultados, siendo estas más notables en el diagnóstico de las infecciones mixtas y en los pacientes con post tratamiento reciente, por lo que basado en lo observado consideran que se necesitan evaluar las políticas de las pruebas de detección a aplicar en las zonas endémicas.

Como se ha señalado previamente, la malaria en Venezuela pasó en los últimos años de estar focalizada en zonas endémicas específicas a expandirse por prácticamente todo el territorio nacional, siendo el estado Bolívar, donde se llevó a cabo la presente investigación, la fuente principal de origen y diseminación, este fenómeno se debió principalmente a la migración masiva y desordenada hacia esta zona, debido a las actividades mineras que se llevan a cabo en este estado después de la puesta en marcha el decreto del arco minero por parte del Ejecutivo Nacional, constituyéndose principalmente el municipio Sifontes como el foco principal; así que como era de esperarse este factor se encontró asociado a los casos de malaria (por cualquiera de las especies determinadas) en el presente estudio, hallazgo que coincide con Forero *et al.* (2021) en su investigación, donde observaron que el 40,00% de los hombres evaluados practicaban la minería como ocupación, por lo que señalan que este es un factor de riesgo que aumenta la posibilidad de padecer la enfermedad; lo que al igual coincide con lo encontrado por Abdallah *et al.* (2022) en su estudio realizado en tres puestos de salud del estado de Roraima en Brazil donde se evaluaron 1222 pacientes provenientes de la frontera con Venezuela y Guyana, reportando una alta positividad de 80,00%, resaltando además que el 80,00% de las personas infectadas adquirieron la enfermedad en nuestro país, y que además el 50,00% de los individuos que participaron en su estudio manifestaron ejercer como ocupación la minería.

El cálculo del riesgo relativo corrobora que este viene siendo un factor muy relevante para la adquisición de la enfermedad en la zona evaluada en el presente estudio, ya que la magnitud del efecto obtenida se encuentra por encima de la unidad, lo que deja claramente en evidencia que practicar la minería como ocupación aumenta la probabilidad de ser infectado con el parásito, probablemente debido a que el individuo se expone a un mayor contacto con los vectores infectados.

Por lo cual, el presente estudio demuestra que en áreas endémicas del estado Bolívar es necesario la aplicación de diagnóstico molecular a fin de detectar mayor número de infecciones submicroscópicas e infecciones mixtas circulantes, lo que pondría en evidencia un mayor riesgo de transmisión malárica en la zona, además el uso de la PCR para el diagnóstico de malaria en Venezuela puede proporcionar una visión relevante y más moderna para el diseño de estrategias de control y de erradicación de la malaria que sean más efectivas.

CONCLUSIONES

Se detectaron 160 casos de malaria por la técnica molecular (PCR *Nested multiplex*) lo que resultó superior a los 136 casos reportados como positivos por la técnica microscópica convencional.

Se presentó discordancia entre los resultados obtenidos por ambas técnicas, siendo la concordancia discreta para la detección general de la enfermedad y de la infección específica con la especie *P. vivax*, mientras que para la detección de la especie *P. falciparum* la concordancia resultó buena.

La sensibilidad de la técnica microscópica convencional se vio afectada por los resultados de la técnica molecular siendo menor del 85,00% y menos eficaz para la identificación de las monoinfecciones producidas por *P. vivax*.

Las monoinfecciones por *P. vivax* y *P. falciparum*, así como las infecciones mixtas por estas dos especies se asociaron a la presencia de síntomas como la fiebre, cefalea y escalofríos; y solo las producidas por *P. falciparum* se asociaron a la presencia de debilidad. Adicionalmente se halló asociación de las infecciones únicas por *P. vivax* con el sexo femenino, así como de estas y de las monoinfecciones con *P. falciparum*, con la práctica de la minería como ocupación en la zona.

Con este estudio se demuestra que en áreas endémicas del estado Bolívar es necesario la aplicación de diagnóstico molecular para detectar mayor número de infecciones submicroscópicas e infecciones mixtas circulantes en la zona, lo que revela mayor riesgo de transmisión malárica, además el uso de PCR en el país puede proporcionar una visión relevante para el diseño de estrategias específicas de control y erradicación de la enfermedad más eficientes.

BIBLIOGRAFÍA

Abou, S.; Jiménez, A.; Agrela, I.; Torres, N. y Herrera, F. 2014. ¿Es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) una alternativa al diagnóstico microscópico de la malaria en el estado Bolívar, Venezuela? Comparación de ambos métodos. *Bol. Mal. Salud Amb.*, 54: 95-99.

Abdallah, R.; Louzada, J.; Carlson, C.; Ljolje, D.; Udhayakumar, V. Oliveira, J. y Lucchi, N. 2022. Cross border malaria in the triple border region between Brazil, Venezuela and Guyana. *Sci. Rep.*, 12(1): 1200.

Abraria, V. 2000. *El índice de Kappa*. Semergen, 2: 247-249.

Alemu, A.; Fuehrer, H.; Getnet, G.; Kassu, A.; Getie, S. y Noed, H. 2014. Comparison of Giemsa microscopy with nested PCR for the diagnosis of malaria in North Gondar, north-west Ethiopia. *Mal. J.*, 13: 174.

Alves, F.; Gil, L.; Marrelli, M.; Ribolla, P.; Camargo, E. y Da Silva, L. 2005. Asymptomatic carriers of Plasmodium spp. as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon. *J. Med. Entomol.*, 42: 777-779.

Anstey, N.; Douglas, N.; Poespoprodjo, J. y Price, R. 2012. *Plasmodium vivax*: clinical spectrum, risk factors and pathogenesis. *Advanc. Parasitol.*, 80: 151-201.

Baird, J. 2013. Evidence and implications of mortality associated with acute *Plasmodium vivax* malaria. *Clin. Microbiol. Rev.*, 26(1): 36-57.

Barat, L.; Chipipa, J.; Kolczak, M. y Sukwa, T. 1999. Does the availability of blood slide microscopy for malaria at health centers improve the management of persons with fever in Zambia?. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 60: 1024-1030.

Barker, R.; Banchongaksorn, T.; Courval, J.; Suwonkerd, W.; Rimwungtragoon, K. y Wirth, D. 1992. A simple method to detect Plasmodium falciparum directly

from blood samples using the polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 46: 416-426.

Barrada, Y.; Castillo, P.; Mata, M.; Rojas Glenda.; Mejía R.; Pérez, L. y Ortega, R. 2019. Malaria en indígenas del Bajo Caura, municipios Sucre y Cedeño, estado Bolívar, Venezuela. *Rev. Ven. Sal. Pub.*, 7(1): 17-25.

Bassat, Q.; Gascon, J. y Alonso, P. 2008. Complicaciones neurológicas de la malaria. *Neurol.*, 2: 39-47.

Bianco, M.; Koster, K.; Kombila, U.; Kun, J.; Grobusch, M.; Nojoma, G.; Matsiegui, P.; Supan, C.; Salazar, C.; Missinou, M.; Issifou, S.; Lell, B. y Kremsner, P. 2007. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection in Gabonese adults. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 77: 939-942.

Boletines epidemiológicos del Ministerio del Poder Popular Para la Salud. Semana Epidemiológica N° 52. Año 2000-2014.

Boletín epidemiológico del Ministerio del Poder Popular Para la Salud. Semana Epidemiológica N° 26. Año 2015.

Boonma, P.; Christensen, P.; Suwanarus, R.; Price, R.; Russell, B. y Lekuthai, U. 2007. Comparison of three molecular methods for the detection and speciation of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*. *Mal. J.*, 6: 124.

Bousema, J.; Gouagna, L.; Drakeley, C.; Meutstege, A.; Okech, B.; Akim, I.; Beier, J.; Githure, J. y Sauerwein, R. 2004. *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage in asymptomatic children in western Kenya. *Mal. J.*, 3: 18.

Botero, D. y Restrepo, M. 1998. *Parasitosis humanas*. 3ra Edición. Corporación para investigaciones biológicas. Medellín, Colombia. 45 p.

Bravo, S. y Cruz, J. 2015. Estudios de exactitud Diagnóstica: herramientas para su interpretación. *Rev. Chil. Rad.*, 21(4): 158-164.

Bruce, M.; Donnelly, C.; Alpers, M.; Galinski, M. y Barwell, J. 2000. Cross-species interactions between malaria parasites in humans. *Science*, 287: 845-848.

Bruce, M. y Day, K. 2003. Cross-species regulation of *Plasmodium* parasitaemia in semi-immune children from Papua New Guinea. *Trends. Parasitol.*, 19: 271-277.

Bull, P.; Lowe, B.; Kortok, M.; Molyneux, C.; Newbold, C. y Marsh, K. 1998. Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria. *Nat. Med.*, 4: 358-360.

Cáceres, J. 2010. Situación epidemiológica de la malaria en Venezuela Año 2009. *Bol. Malariol. Sal. Amb.*, 50: 271-282.

Cáceres, J. 2011. La malaria en el estado Bolívar, Venezuela: 10 años sin control. *Bol. Malariol. Sal. Amb.*, 51: 207-214.

Cáceres, J. 2013. Récord de incidencia malárica en Venezuela. *Bol. Malariol. Sal. Amb.*, 53: 88-98.

Cáceres, J.; Vaccari, E.; Campos, E.; Terán, E.; Ramírez, A.; Ayala, C. y Itriago, M. 2006. Concordancia del diagnóstico malárico en Venezuela, año 2003. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.*, 66: 49-57.

Cucunubá, Z.; Guerra, A.; Rahirant, S.; Rivera, J.; Cortés, L. y Nicholls, R. 2008. Asymptomatic *Plasmodium* spp. infection in Tierralta, Colombia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 103: 668-73.

Cunha, M.; Sanos, C.; Raial, M.; Costa, S.; Ventura, A.; Paroa, M. y Ribeiro, A. 2021. Mixed *Plasmodium malariae* infections were underdetected in a malaria endemic area in the Amazon region Brasil. *Am. J. Med. Trop.*, 105(5): 1184-1186.

De Abreu, N.; Zabala, L. y Pérez, H. 2001. El PCR versus la microscopia y la prueba de OPTIMAL en el diagnóstico de la malaria. *Rev. Talleres.*, 7: 151.

Deo, D.; Hermingtyas, E.; Intansari, U.; Perdana, T.; Murhandurwati, E. y Suesatyo, M. 2022. Difference between microscopic and PCR examination

result for malaria diagnosis and treatment evaluation in Sumba Barat Daya, Indonesia. *Trop. Med. Infect. Dis.*, 7(153):1-10.

Demas, A.; Oberstaller, J.; DeBarry, J.; Lucchi, N.; Srinivasamoorthy, G.; Sumari, D.; Kabanywany, A.; Villegas, L.; Escalante, A.; Katchur, P.; Barnwell, J.; Peterson, D.; Udhayakumar, V. y Kissinger, J. 2011. Applied Genomics: data mining reveals species-specific malaria diagnostic targets more sensitive than 18S rRNA. *J. Clin. Microbiol.*, 49(7): 2411-2418.

Douglas, N.; Pontororing, G.; Lampah, D.; Yeo, T.; Kenangalem, E.; Poespoprodjo, J.; Ralph, A.; Bangs, M.; Sugiarto, D.; Anstey, N. y Price, R. 2014. Mortality attributable to *Plasmodium vivax* malaria: a clinical area from Papua, Indonesia. *BMC Med.*, 12(1): 217.

Duarte, E.; Pang, L.; Ribeiro, L. y Fernandes, C. 2001. Association of subtherapeutic dosages of a standar drug regimen with failures in preventing relapses of vivax malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 65: 471-476.

Echeverri, M.; Tobón, A.; Alvarez, G.; Carmona, J. y Blair, S. 2003. Clinical and laboratory findings of *Plasmodium vivax* malaria in Colombia, 2001. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.*, 45(1): 29-34.

Ebrahimzadeh, A.; Fouladi, B. y Fazaeli, A. 2007. High rate of detection of mixed infections of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* in South-east of Iran, using nested PCR. *Parasitol. Int.*, 56: 61-64.

Ethesham, R.; Fazaeli, A.; Raeisi, A.; Keshavarz, H. y Heidari, A. 2015. Detection of mixed species infections of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* by nested PCR and rapid diagnostic test in southeastern Iran. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 93(1): 181-185.

Forero, D.; Carrión, F.; Chavero, M.; Gamardo, A.; Figuera, L.; Camejo, N.; Marcano, M.; Hidalgo, M.; Arenas, C.; Villegas, L.; Grillet, M.; Pacheco, M.; Sandoval, M. y Escalante, A. 2021. The clinical epidemiological profile of

malaria patients from southern Venezuela, a critical hotspot in Latin America. *Malar. J.*, 20(1): 375.

Fleiss, J. 2000. *Statistical methods for rates and proportions*. Editorial John Wiley. 2da Edición. New York, USA.

Gething, P.; Van Boeckel T.; Smith D.; Guerra, C.; Patil, A.; Snow, R. y Flay, S. 2011. Modelling the global constraints of temperature on transmission of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. *Parasite and vectors*, 4(1): 92.

Genton, B.; Al Yaman, F.; Beck, H.; Hii, J.; Mellor, S.; Narara, A.; Gibson, N.; Smith, T. y Alpers, M. 1995. The epidemiology of malaria in the Wosera area, East Sepik Province, Papua New Guinea, in preparation for vaccine trials. I. Malariometric indices and immunity. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 89: 359-376.

Golassa, L.; Enweji, N.; Erko, B.; Aseffa, A. y Swedberg, G. 2013. Detection of a substantial number of submicroscopic *Plasmodium falciparum* infections by polymerase chain reaction: a potential threat to malaria control and diagnosis in Ethiopia. *Malar. J.*, 12: 352.

Guerra, C.; Howes, R.; Patil, A.; Gething P.; Van Boeckel T.; Temperley, W.; Kavaria, C.; Tatem, A.; Manh, B.; Elyazar, I.; Baird, K. y Snow, R. 2010. The international limits and population and risk of *Plasmodium vivax* transmission in 2009. *Plos. Neglec. Trop. Dis.*, 4(8): e774.

González, B. 2008. *Parámetros Hematológicos y niveles de IgG en individuos con malaria por Plasmodium vivax en áreas endémicas del estado Sucre, antes, durante y después del tratamiento*. Tesis de Maestría. Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre. Cumaná, estado Sucre.

Greenwood, B. y Mutabingwa, T. 2002. Malaria in 2002. *Nature.*, 415: 669-715.

Grillet, M.; Moreno, J.; Hernández, J.; Vianti, M.; Noya, O.; Tami, A.; Paniz, A.; Llervellin, M.; Lowe, R.; Escalante, A. Conn, J. 2021. Malaria in southern

Venezuela: the hottest hotspot in Latin America. *Plos. Negl. Trop. Dis.*, 15:e0008211

Godfray, H. 2010. Developing global maps of the dominant *Anopheles* vectors of human malaria. *Plos Med.*; 7(2): e1000209.

Hay, S.; Sinka, M.; Okara, R.; Kabaria, C.; Mbithi, P.; Tago, C.; Benz, D.; Gething, P.; Howes, R.; Patil, A.; Temperley, W.; Bangs, M.; Chareonviriyaphap, T.; Elyazar, I.; Harbaeh, R.; Hemingway, J.; Manguin, S.; Mbogo, C.; Rubio, Y. y

Homez, J.; Soto, R.; De Soto, S.; Méndez, H. y Mármol, P. 1995. *Parasitología*. 8va Edición. EDILUZ Editorial de la Universidad del Zulia. 374 p.

Iannacone, J.; Caballero, C. y Renteria, J. 1999. La técnica de precoloración de Walker para evaluar *Plasmodium vivax* Grassi y *Plasmodium malariae* Laveran en comunidades Ashaninkas en Satipo (Junín, Perú). *Rev. Peruan. Biol.*, 7: 233-237.

Incáni, R. 2000. *Parasitología*. 2da Edición. Universidad de Carabobo. Departamento de Parasitología. 251 pp.

Imwong, M.; Hanchana, S.; Malleret, B.; Rénia, L.; Day, N.; Dondorp, A.; Nosten, F.; Snounou, G. y White, N. 2014. High-Throughput Ultrasensitive Molecular Techniques for Quantifying Low-Density Malaria Parasitemias. *J. Clin. Microbiol.*, 52: 3303-3309.

Kain, K.; Brown, A.; Mirabelli, L. y Webster, H. 1993. Detection of *Plasmodium vivax* by polymerase chain reaction in a field study. *J. Infect. Dis.*, 168: 1323-1326.

Kasehagen, L.; Mueller, I.; McNamara, D.; Bockarie, M.; Kiniboro, B.; Rare, L.; Lorry, K.; Kastens, W.; Reeder, J.; Kazura, J. y Zimmerman, P. 2006. Changing patterns of Plasmodium bloodstage infections in the Wosera region of Papua New Guinea monitored by light microscopy and high throughput PCR diagnosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 75: 588-596.

Kotepui, M.; Kotepui, K.; Milanez, G. y Masangkay, F. 2020. Prevalence and proportion of *Plasmodium* spp. triple mixed infections compared with double mixed infections: a systematic review and meta-analysis. *Malar. J.*, 19(1): 224.

Leonard, C.; Mohammed, H.; Tadesse, M.; McCaffery, J.; Nace, D.; Halsey, E.; Girma, S.; Assefa, A.; Hwang, J. y Rogier, E. 2021. Missed *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* mixed infections in Ethiopia threaten malaria elimination. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 106(2): 667-670.

Llanos, C.; Flores, M.; Arévalo, M. y Herrera, S. 2004. Mecanismos de generación de anemia en malaria. *Colomb. Med.*, 35: 205-214.

Li, P.; Zhao, Z.; Wang, Y.; Xing, H.; Parker, D.; Yang, Z.; Baum, E.; Li, W.; Sattabongkot, J.; Sirichaisinthop, J.; Li, S.; Yan, G.; Cui, L. y Fan, Q. 2014. Nested PCR detection of malaria directly using blood filter paper samples from epidemiological surveys. *Malar. J.*, 13: 175.

Liehl, P.; Meireles, P.; Albuquerque, I.; Pinkevych, M.; Baptista, F.; Mota, M.; Davenport, M. y Prudencio, M. 2015. Innate Immunity Induced by *Plasmodium* Liver Infection Inhibits Malaria Reinfections. *Infect. Immun.*, 83(3): 1172-1180.

Londoño, I. *Clínica y complicaciones de las parasitosis*. 1998. 1ra Edición. Editorial Universidad de Antioquia. Antioquia, Colombia.

Lorenzetti, A.; Fornazari, P.; Bonini, A.; De Souza, R.; Fugikaha, E.; Bonini, C.; Fraga, V.; Conceição, L.; Rossit, A.; Cavasini, C.; Couto, V. y Machado, R. 2008. mixed *Plasmodium falciparum* infections and its clinical implications in four areas of the Brazilian Amazon region. *Acta Trop.*, 107: 8-12.

Lee, K.; Cox, J. y Singh, B. 2009. Morphological feature and differential counts of *Plasmodium knowlesi* parasites in naturally acquired human infections. *Malar. J.*, 8: 73.

March, S.; Shengyong, N.; Velmurugan, S.; Galstian, A.; Shan, J.; Logan, D.; Carpenter, A.; Thomas, D.; Lee Sim, K.; Mota, M.; Hoffman, S. y Bhatia, S. 2013. A microscale human liver platform that supports the hepatic stages of *Plasmodium falciparum* and *vivax*. *Cell. Host. Microb.*, 14(1): 104-115.

Margni, R. 1996. *Inmunología e inmunoquímica. Fundamentos*. 5ta Edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires, Argentina.

Martínez, E.; Tobón, A. y Blair, S. 2012. Malaria en humanos por infección natural con *Plasmodium Knowlesi*. *Revista del Instituto Nacional de Salud Biomédica*, 32: 121-130.

Marques G, Condino M, Serpa L, Cursino T 2008. Epidemiological aspects of autochthonous malaria in the Atlantic forest area of the northern coast of the State of São Paulo, 1985-2006. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 41: 386-389.

Messenger, L.; Matias, A.; Manana, A.; Stile, J.; Knowles, S.; Boakye, D.; Couhibaly, M.; Larsen, M.; Traoré, A.; Diallo, B.; Konate, M.; Guindo, A.; Traoré, S.; Mulder, C.; Le, H.; Kleinschmidt, I. y Rowland, M. 2012. Multicentre studies of insecticide treated durable wall lining in Africa and South East Asia: entomological efficacy and household acceptability during and year of field use. *Mal. J.*, 11(1): 358

Menge, D.; Ernst, K.; Vulule, J.; Zimmerman, P.; Guo, H. y John, C. 2008. Microscopy underestimates the frequency of *Plasmodium falciparum* infection in symptomatic individuals in a low transmission highland area. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 79: 173-177.

Miller, L.; Baruch, D.; Marsh, K. y Doumbo, O. 2002. The pathogenicity of malaria. *Nature*, 415: 673-679.

Mckenzie, F. y Smith, D. 2006. Mixed species malaria infections in travelers. *J. Travel Med.*, 13: 199-200.

Mekonnen, S.; Aseffa, A.; Medhin, G.; Berhe, N. y Velavan, T. 2014. Re-evaluation of microscopy confirmed *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria by nested PCR detection in southern Ethiopia. *Malar. J.*, 13:48.

Mohapatra, P.; Prakash, A.; Bhattacharyya, D.; Goswami, B.; Ahmed, A. y Sarmah, B. 2008. Detection and molecular confirmation of a focus of *Plasmodium*. *Indian J. Med. Res.*, 128: 52-56.

Motshoge, T.; Haiyambo, D.; Ayanful, R.; Aleksenko, L.; Ntebela, D.; Malleret, B.; Rénia, L.; Peloewetse, E.; Pagano, G. y Quaye, I. 2021. Recent molecular

assessment of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* asymptomatic infections in Botswana. *Am. J. Med. Hyg.*, 104(6):2159-2164.

Mueller, I.; Galiski, M.; Baird, J.; Carlon, J.; Kochar, D.; Alonso, P. 2009. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Inf. Dis.*, 9(9): 555-566.

Mwingira, F.; Genton, B.; Kabanywany, A. y Felger, I. 2014. Comparison of detection methods to estimate asexual *Plasmodium falciparum* parasite prevalence and gametocyte carriage in a community survey in Tanzania. *Malar. J.*, 13:433.

Ohrt, C.; Prudhomme, W.; Remich, S.; McEvery, P.; Ogutu, B.; Mtalib, R. y Sande, J. 2008. Pilot assessment of the sensitivity of the malaria thin film. *Malar. J.*, 7(22): 1-9.

Oletta, J. 2018. Análisis del reporte mundial de malaria. 2018, y la grave epidemia de malaria en Venezuela. Estimaciones para 2018. Informe especial. Sociedad Venezolana de Salud Pública. Red Defendamos la Epidemiología Nacional.

Organización Mundial de la Salud. 1999. *Procedimientos laboratoriasis em parasitología médica*. Livraria Editora Santos. Sao Paulo, Brasil.

Organización Mundial de la Salud. 2008. Informe mundial de malaria 2008. Disponible en: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2008/report/es/>

Organización Mundial de la Salud. 2010. Informe mundial de malaria 2010. Disponible en: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2010/report/es/>

Organización Mundial de la Salud. 2014. Bases del diagnóstico microscópico del paludismo-parte I: Guía del alumno. 2ª Edición.

Organización Mundial de la Salud. 2014. Informe mundial de malaria 2014. Disponible en: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2014/report/es/>

Organización Mundial de la Salud. 2015. Informe mundial de malaria 2015. Disponible en: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/report/es/>

Organización Mundial de la Salud. 2016. Informe mundial de malaria 2016. Disponible en: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2016/report/es/>

Organización Mundial de la Salud. 2017. Informe mundial de Malaria 2017. Disponible en: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2017/report/es/>

Organización Mundial de la Salud. 2018. Informe mundial de Malaria 2018. Disponible en: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/report/es/>

Organización Mundial de la Salud. 2022. Informe mundial de malaria 2022. Disponible en: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2022/report/es/>

Organización Panamericana de la Salud. 1990. Bioética. Boletín de la Organización Panamericana de la Salud. Vol. 108.

Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud. 2018. Actualización Epidemiológica. Aumento de la Malaria en las Américas.

Pabon, R.; Telo, C.; Wide, A.; Zerpa, N.; Capaldo, J. y Noda, A. 2007. Evaluación de la prueba NOW® ICT Pf/Pv para el diagnóstico de malaria en Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.*, 47: 169-176.

Patsoula, E.; Spanakos, G.; Sofianatou, D.; Parara, M. y Vakalis, N. 2003. A single-step, PCR-based method for the detection and differentiation of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 97:15-21.

Paya, A. y Carreras, R. 2004. Paludismo y gestación. *Ginecol. Obstet. Clín.*, 5: 204-210.

Perandin, F.; Manca, N.; Calderaro, A.; Piccolo, G.; Galati, L. y Ricci, L. 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.

Pérez, H.; Bracho, C. y De La Rosa, M. 2007. El paludismo y las pruebas rápidas de diagnóstico. *Bol. Mal. Salud Amb.*, 47: 3-13.

Postigo, M.; Mendoza, A. y Pérez, H. 1998. Malaria diagnosis by the polymerase chain reaction: a field study in south-eastern Venezuela. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 92: 509-511.

Rakotonirina, H.; Barnada, C.; Raherijafy, R.; Adrianantenaina, H.; Ratsimbaoa, A.; Randrianasolo, L.; Jahevitra, M.; Adriantsoanirina, V. y Ménard, D. 2008. Accuracy and reliability of malaria diagnostic techniques for guiding febrile outpatient treatment in malaria-endemic countries. *Am. J. Med. Hyg.*, 78(2): 217-221.

Rodríguez, A. y Paniz, A. 2014. Venezuela's failure in malaria control. *Lancet*, 384:663-664.

Rodríguez, S.; Ruíz, R. y Boggiano, G. 2000. Malaria por *Plasmodium vivax*: efectos del tratamiento sobre los niveles de inmunoglobulinas y variación de la expresión del antígeno CD23. *Med. Interm.*, 16(2): 118-127.

Rodulfo, H.; De Donato, M.; Mora, R.; González, L. y Contreras, C. 2007a. Comparison of the diagnosis of malaria by microscopy, immunochromatography and PCR in endemic areas of Venezuela. *Braz. J. Biol. Rev.*, 40: 535-43.

Rodulfo, H.; De Donato, M.; Quijada, I. y Peña, A. 2007b. High prevalence of malaria infection in Amazonas state, Venezuela. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.*, 49: 79-85.

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

Sojo, M.; Cáceres, J. y Sojo, M. 2008a. Valoración de la calidad del diagnóstico malárico. Red de vigilancia, municipio Cajigal, estado Sucre, Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.*, 48: 153-160.

Sojo, M.; Cáceres, J.; Pizzo, N.; Rojas, J.; Maldonado, A.; Rubio, N.; Campos, E.; Terán, E. y Pérez, A. 2008b. Malaria recurrente a *Plasmodium vivax*. Municipio Cajigal, estado Sucre, Venezuela. *Rev. Biomed.*, 19: 3-15.

Smith, T.; Hii, J.; Genton, B.; Muller, I.; Booth, M. y Gibson, N. 2001. Associations of peak shifts in age prevalence for human malarias with bednet coverage. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 95: 1-6.

Snounou, G.; Viriyakosol, S.; Zhu, X.; Jarra, W.; Pinhero, L. y Do rosario, V. 1993a. 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.; Jarra, W.; Thathong, S. y Brown, N. 1993b. Identification of the four human malaria parasites species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 58: 283-292.

Snow, R.; Nahlen, B.; Palmer, A.; Donnelly, C.; Gupta, S. y Marsh, K. 1998. Risk of severe malaria among African infants: direct evidence of clinical protection during early infancy. *J. Infect. Dis.*, 177: 819-822.

Steenkeste, N.; Roger, W.; Okell, L.; Joanne, I.; Incardona, S.; Duval, I.; Chy, S.; Hewitt, S.; Chou, M. y Socheat, D. 2010. Submicroscopic malaria cases and mixed malaria infection in a remote area of high malaria endemicity in Rattana Kiri province, Cambodia: implication for malaria elimination. *Malar. J.*, 9(108): 1-11.

Tajebe, A.; Magoma, G.; Aemero, M. y Kimani, F. 2014. Detection of mixed infection level of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* by SYBR Green I-based real time PCR in North Gondar, north west Ethiopia. *Malar. J.*, 13:411.

Tobón, A. 2009. Signos de peligro en el paciente con malaria. *Biomédica*, 29: 320-329.

Verhoef, H.; West, C.; Ndeto, P.; Burema, J.; Beguin, Y. y Kok, F. 2001. Serum transferrin receptor concentration indicates increased erythropoiesis in Kenyan children with asymptomatic malaria. *Am. J. Clin. Nutr.*, 74: 767-775.

Wongsrichanalai, C.; Barcus, M.; Muth, S.; Sutamihardja, A. and Wernsdorfer, W. 2007. A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). *Am. J. Trop. Med, Hyg.*, 77(6): 119-127.

Zerpa, N.; Pabón, R.; Wide, A.; Gavidia, M.; Medina, M.; Cáceres, J.; Capaldo, J.; Baker, M. y Noya, O. 2008. Evaluation of the OptiMAL test for diagnosis of malaria in Venezuela. *Invest. Clin.*, 49:93-101.

ANEXOS

CONSENTIMIENTO PREVIA INFORMACIÓN

Mediante la presente hago constar que he sido informado sobre el desarrollo de la realización del trabajo de investigación titulado: **FALLAS EN EL DIAGNÓSTICO DE INFECCIONES MIXTAS POR *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum* EN UN ÁREA DE ALTA ENDEMICIDAD MALÁRICA DEL ESTADO BOLÍVAR, VENEZUELA**, el cual tiene como objetivo principal detectar fallas en el diagnóstico microscópico convencional usado para el diagnóstico de malaria mediante la utilización de la prueba molecular Reacción en Cadena de la Polimerasa *Nested* multiplex, para lo cual se realizará la toma de una muestra sanguínea por punción venosa, además de una muestra por punción cutánea del lóbulo de la oreja. Me ha sido informado que esta investigación es llevada a cabo por personal bien capacitado en el área, y que las muestras y los datos aquí obtenidos serán utilizados única y exclusivamente para uso de investigación. Los datos obtenidos serán mantenidos anónimos y la información recogida no podrá ser utilizada en mi perjuicio.

Yo, _____ doy fe de conocer sobre el estudio y autorizo a los responsables del mismo a utilizar mis datos y muestras de sangre.

Firma

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN BIOMEDICINA
Y CIENCIAS APLICADAS Dra. SUSAN TAI

FICHA CLÍNICO EPIDEMIOLÓGICA

NOMBRES Y APELLIDOS: _____

EDAD: _____

SEXO: _____

PROCEDENCIA: _____

DIRECCIÓN DE HABITACIÓN: _____

OCUPACIÓN: _____

SIGNOS Y SÍNTOMAS PRESENTES:

Fiebre: _____

Náuseas: _____

Escalofríos/temblores: _____

Dolor articular: _____

Sudoración: _____

Dolor abdominal: _____

Dolor de cabeza: _____

Palidez: _____

Dolor de huesos: _____

Insomnio: _____

Debilidad: _____

Diarreas: _____

Mareos: _____

Otro: _____

Vómitos: _____

APÉNDICES

APÉNDICE 1.

Evaluación de la microscopia en el diagnóstico de Malaria

	Positivos (+)	Negativos (-)
Positivos (+)	135 pacientes	1 pacientes
Negativos (-)	25 pacientes	68 pacientes

Verdaderos positivos= 135

Verdaderos Negativos= 68

Falsos positivos= 1

Falsos negativos= 25

$$\text{Sensibilidad} = \frac{135}{135 + 25} \times 100 = 84,38\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{68}{68 + 1} \times 100 = 98,55\%$$

$$\text{Valor predictivo positivo} = \frac{135}{135 + 1} \times 100 = 99,26\%$$

$$\text{Valor predictivo negativo} = \frac{68}{68 + 25} \times 100 = 73,12\%$$

$$\text{Eficiencia} = \frac{68 + 135}{68 + 135 + 25 + 1} \times 100 = 88,65\%$$

APÉNDICE 2.

Evaluación de la microscopia en el diagnóstico de Malaria causada por

Plasmodium falciparum

	Positivos (+)	Negativos (-)
Positivos (+)	52 pacientes	2 pacientes
Negativos (-)	14 pacientes	161 pacientes

Verdaderos positivos= 52

Verdaderos Negativos= 161

Falsos positivos= 2

Falsos negativos= 14

$$\text{Sensibilidad} = \frac{52}{52 + 14} \times 100 = 78,79\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{161}{161 + 2} \times 100 = 98,77\%$$

$$\text{Valor predictivo positivo} = \frac{52}{52 + 2} \times 100 = 96,30\%$$

$$\text{Valor predictivo negativo} = \frac{161}{4 + 161} \times 100 = 92,00\%$$

$$\text{Eficiencia} = \frac{161 + 52}{161 + 52 + 14 + 8} \times 100 = 93,01\%$$

APÉNDICE 3.

Evaluación de la microscopia en el diagnóstico de Malaria causada por

Plasmodium vivax

	Positivos (+)	Negativos (-)
Positivos (+)	83 pacientes	1 pacientes
Negativos (-)	32 pacientes	113 pacientes

Verdaderos positivos= 83

Verdaderos Negativos= 113

Falsos positivos= 1

Falsos negativos= 32

$$\text{Sensibilidad} = \frac{83}{83 + 32} \times 100 = 72,17\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{113}{113 + 1} \times 100 = 99,12\%$$

$$\text{Valor predictivo positivo} = \frac{83}{83 + 1} \times 100 = 98,81\%$$

$$\text{Valor predictivo negativo} = \frac{113}{113 + 32} \times 100 = 77,93\%$$

$$\text{Eficiencia} = \frac{83 + 113}{83 + 113 + 32 + 1} \times 100 = 85,59\%$$

HOJAS DE METADATOS

HOJA DE METADATOS PARA TESIS Y TRABAJOS DE ASCENSO – 1/6

Título	Diferencias entre la microscopia convencional y la pcr nested multiplex en la detección de infecciones mixtas e infecciones submicroscópicas de malaria en un área de alta endemicidad del estado Bolívar, Venezuela
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
González R. Brunnell R.	ORCID	
	e-mail	brunnellgonzalez@Gmail.com
	e-mail	brunnell_gonzalez@hotmail.com Brunnell_gonzalez@yahoo.com

Palabras o frases claves:

Malaria
<i>Plasmodium vivax</i>
<i>Plasmodium falciparum</i>
Microscopia convencional
Reacción en cadena de la polimerasa
Infecciones mixtas

HOJA DE METADATOS PARA TESIS Y TRABAJOS DE ASCENSO – 2/6

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Sub-área
Ciencias	Parasitología

Resumen (abstract):

En Venezuela a pesar de ser un país endémico a la malaria en donde circulan tres de las cinco especies productoras de la enfermedad, siendo además uno de los países de América con los más graves problemas de control en los últimos años, se han reportado muy pocos trabajos de investigación donde se evalúen las fallas en el diagnóstico de las infecciones mixtas y submicroscópicas usando métodos moleculares, así como su impacto en el ámbito epidemiológico; razón que motivó la realización de la siguiente investigación, la cual se llevó a cabo en Tumeremo, municipio Sifontes, estado Bolívar, donde se estudiaron 229 individuos de ambos géneros y diferentes grupos etarios que asistieron a la consulta de diagnóstico de malaria del centro de investigación de campo “Dr. Francesco Vitanza”. A los cuales se les aplicó una encuesta clínico epidemiológica y se les informó el motivo del estudio para su previo consentimiento. Posteriormente se realizó punción del lóbulo de la oreja para elaborar la gota gruesa y el extendido sanguíneo con el fin de llevar a cabo el diagnóstico por microscopía convencional; luego se les extrajo sangre venosa para la obtención del ADN genómico del parásito usando el kit Wizard Genomic® de Promega, y posteriormente se identificaron las especies maláricas involucradas a través de la técnica de PCR *Nested* multiplex. Esta última técnica permitió detectar 160 casos de malaria (69,90%), superior al encontrado por microscopía (59,40%). 15,00% de los positivos fueron infecciones mixtas (*P. vivax*/*P. falciparum*) y 15,60% de los negativos microscópicamente (infecciones submicroscópicas) fueron positivos por la técnica molecular. La sensibilidad de la microscopía para cualquier especie de *Plasmodium* fue menor del 80,00%. La concordancia de ambos métodos fue discreta para detectar malaria e identificar *P. vivax*, mientras que para *P. falciparum* la concordancia resultó buena. Las infecciones mixtas, así como las monoinecciones por *P. vivax* y *P. falciparum* se relacionaron con presencia de fiebre, cefalea y escalofríos, además de debilidad para esta última especie. Se demostró asociación de *P. vivax* con el sexo femenino y de esta especie y *P. falciparum* con la práctica de la minería en la zona. Este estudio demuestra que en áreas endémicas del estado Bolívar es necesario la aplicación de diagnóstico molecular para detectar mayor número de infecciones submicroscópicas e infecciones mixtas, lo que revela mayor riesgo de transmisión malárica, además el uso de PCR en Venezuela puede proporcionar una visión relevante para el diseño de estrategias específicas de control y erradicación de la enfermedad.

HOJA DE METADATOS PARA TESIS Y TRABAJOS DE ASCENSO – 3/6

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail				
	ROL	CA <input style="width: 20px;" type="text"/>	AS <input style="width: 20px;" type="text"/>	TU <input style="width: 20px;" type="text"/>	JU <input style="width: 20px;" type="text"/>
	CVLAC				
	e-mail				
	ROL	CA <input style="width: 20px;" type="text"/>	AS <input style="width: 20px;" type="text"/>	TU <input style="width: 20px;" type="text"/>	JU <input style="width: 20px;" type="text"/>
	CVLAC				
	e-mail				
	ROL	CA <input style="width: 20px;" type="text"/>	AS <input style="width: 20px;" type="text"/>	TU <input style="width: 20px;" type="text"/>	JU <input style="width: 20px;" type="text"/>
	CVLAC				
	e-mail				

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2024	05	05

Lenguaje: SPA

HOJA DE METADATOS PARA TESIS Y TRABAJOS DE ASCENSO – 4/6

Nombre de archivo	Tipo MIME
Trabajo ascenso Asociado-BRGR.Doc	Aplicación Word
NSUASO_GRBR2024.DOC	

Alcance:

Espacial: _____ Nacional _____ (Opcional)

Temporal: _____ Temporal _____ (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

_____ Licenciado en Bioanálisis _____

Nivel asociado con el Trabajo: _____ Magister Scientiarum _____

Área de Estudio: _____ Parasitología _____

Institución (es) que garantiza (n) el Título o grado:

_____ UNIVERSIDAD DE ORIENTE – VENEZUELA _____

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CUN°0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano
Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ
Vicerrector Académico
Universidad de Oriente
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

UNIVERSIDAD DE ORIENTE SISTEMA DE BIBLIOTECA
RECIBIDO POR <i>[Firma]</i>
FECHA 5/8/09 HORA 5:30

Cordialmente,
JUAN A. BOLAÑOS CUMPEL
Secretario

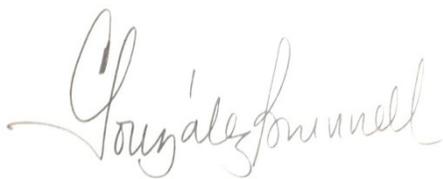
C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/maruja

Apartado Correos 094 / Telfs: 4008042 - 4008044 / 8008045 Telefax: 4008043 / Cumaná - Venezuela

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 6/6

Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009): “Los trabajos de grados son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y solo podrá ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Concejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Concejo Universitario, para su autorización”.



Prof. Brunnell Rosario González Rivas

Autor