



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**EPIDEMIOLOGÍA SEROLÓGICA Y MOLECULAR
DE LA MALARIA EN LA COMUNIDAD DE
SANTA LUCÍA DE INAWAY, ESTADO BOLÍVAR,
VENEZUELA.**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Emily Timaury como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

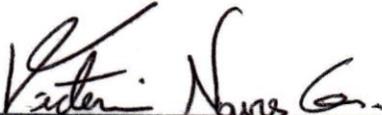
Tutor(a)(es): Mercedes Fernández
Guillermina Alonso

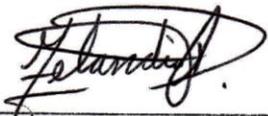
CARACAS, VENEZUELA
OCTUBRE - 2018

**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL
DE GRADO DEL (A) Br. EMILY TIMAURY**

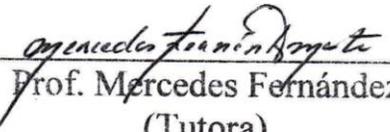
Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado del (la) Br. Emily Timaury, C.I: V-20.913.029, titulado "Epidemiología serológica y molecular de la malaria en la comunidad de Santa Lucía de Inaway, Estado Bolívar, Venezuela", para optar al título de Licenciado (a) en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los quince (15) días del mes de octubre del año 2018, dejando constar que la Prof. Guillermina Alonso actuó como Coordinadora del jurado examinador.


Prof. Victoria Navas


Prof. Zelandia Fermin


Prof. Guillermina Alonso
(Co-Tutora)


Prof. Mercedes Fernández
(Tutora)

RESUMEN

La malaria es una de las parasitosis humana más importante en las regiones tropicales y subtropicales del mundo debido a su alta prevalencia y tasa de mortalidad. En Venezuela, la malaria persiste como uno de los grandes problemas de salud pública, con más de 240.613 casos notificados para el año 2016. Siendo el estado Bolívar, particularmente el municipio Sifontes, uno de los focos de infección más importantes en el país. Como es bien sabido, el receptor de antígeno Duffy para las quimiocinas (DARC) es una glicoproteína que actúa como receptor en la invasión de los eritrocitos por *Plasmodium vivax* y los polimorfismos del gen que lo codifica afectan la susceptibilidad a la infección por *P. vivax* en la etapa sanguínea. Considerando la relevancia de detectar portadores asintomáticos de la infección por *Plasmodium*, al ser fuente natural silenciosa que no buscan atención médica y que no existen criterios estándares para infección malárica asintomática, basándose el diagnóstico en la presencia del parásito durante un período específico de la infección, se planteó caracterizar el perfil demográfico y clínico-epidemiológico, así como determinar la prevalencia de la infección por *Plasmodium*, en la comunidad Santa Lucía de Inaway, empleando técnicas de diagnóstico parasitológico, molecular y serológico. En el estudio se incluyó 110 individuos de la comunidad de Santa Lucía de Inaway, a quienes se les realizó el diagnóstico microscópico, el diagnóstico molecular por PCR con iniciadores específicos (PCR-SSP) y la determinación de anticuerpos dirigidos contra la proteína recombinante PvMSP-1₁₉ de *P. vivax* y GLURP-154 de *P. falciparum* (diagnóstico serológico). Además, a los individuos *Plasmodium vivax* positivo se les determinó la variabilidad del gen *DARC* por PCR-SSP. Al establecer la prevalencia de la infección por *Plasmodium*, ésta varió según el método de diagnóstico. El diagnóstico microscópico mostró una prevalencia de 3,73%, siendo todos los casos infecciones por *P. vivax*. Con el diagnóstico molecular la prevalencia fue

de 19,09%, de las cuales 11,82% fueron infecciones por *P. vivax*, 4,55% por *P. falciparum* y un 2,73% infecciones mixtas (*P. vivax* + *P. falciparum*). El 33,3% de los casos fueron infecciones asintomáticas y el 66,6% sintomáticas. Al establecer comparaciones entre los pacientes clasificados clínicamente e infectados por diferentes especies de *Plasmodium*, se observó una mayor frecuencia de pacientes sintomáticos mono-infectados con *P. vivax* con respecto a pacientes mono-infectados con *P. falciparum*. Con el diagnóstico serológico la prevalencia fue de 75,45%, siendo 47,27% de los casos positivos (IR>1) para anti-PvMSP-1₁₉ de *P. vivax* y 28,18% positivos (IR>1) para anti- GLURP-154 de *P. falciparum*. En relación al polimorfismo del gen *DARC* en los pacientes *P. vivax* positivos. El genotipo más frecuente fue *FYA/FYB* (80%), seguido por *FYA/FY* y *FYB/FY* (6,67%) y *FYA/FYA*, *FYB/FYB* (4,44% y 2,22%, respectivamente). El genotipo *FY/FY* no se observó en el presente estudio. Finalmente, al correlacionar la variabilidad del gen *DARC* con el índice de reactividad de los Anticuerpos IgG contra *P. vivax* en los individuos *P. vivax* positivos (n=45) no se observaron correlaciones significativas. Sin embargo, al correlacionar las distintas variables demográficas, epidemiológicas y clínicas consideradas en el estudio en los individuos de la comunidad de Santa Lucía de Inaway, se observó una correlación negativa entre los antecedentes maláricos y sintomatología y una correlación positiva entre la infección por *P.vivax* y sintomatología. Los resultados obtenidos demuestran que la comunidad de Santa Lucía de Inaway representa un área endémica de alta transmisión malárica. En vista de esto, es necesario reforzar el mantenimiento de la vigilancia epidemiológica y adoptar mejores medidas de control de la enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

Me complace distinguir a las personas que de una u otra forma contribuyeron a la realización de este trabajo especial de grado:

A mis padres Evelyn y Eduardo, mis principales mentores, por haberme guiado y apoyado en todo momento. A mi abuelo, mi segundo padre, por alentarme. A mi hermano, que en la distancia siempre estuvo apoyándome. A mi esposo, por ser mi pilar, por creer en mí y motivarme a seguir, a no desistir nunca. Los amo.

Un agradecimiento especial a mi tutora, la Dra. Mercedes Fernández Mestre, por todo el apoyo, por la paciencia, confianza y disposición. La admiro y estimo muchísimo. Sin ella no hubiera sido posible esto.

Al IVIC, especialmente al Laboratorio de Fisiopatología del Centro de Medicina Experimental, por abrirme las puertas y permitirme realizar este trabajo, a pesar de todas las adversidades. A todo el personal del laboratorio y los chicos de postgrado: Eva, Omar, Violeta, Fernando, Stefani, Rita, Rublee... De todos aprendí algo y eso vale más que cualquier cosa, gracias por hacerme sentir parte del equipo.

A la profesora Albina Wide, quien también fue un pilar fundamental en la realización de este trabajo. Muchísimas gracias por todo su conocimiento y apoyo, es una persona maravillosa. De igual forma quiero agradecer al personal del Instituto de Medicina Tropical de la UCV que colaboró con este proyecto.

Un agradecimiento especial a mi asesora académica, la Dra. Guillermina Alonso, por su orientación y apoyo. Gracias por ser tan excelente profesora y por hacer que me enamorara (más) de mi carrera.

Gracias a todos mis profesores, quienes contribuyeron a formarme académicamente.

A mis jurados, la Dra. Mariana Hidalgo y la profesora Victoria Navas, ambas excelentes profesionales. Gracias por sus aportes.

A mi querida UCV, especialmente la Facultad de Ciencias, por ser mi hogar todos estos años. A mis compañeros y amigos que estuvieron conmigo en esta etapa de mi vida, los llevaré siempre en mi corazón.

ABREVIACIONES

A: Adenina.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNr: ADN ribosómico.

API: Infección plasmódica asintomática.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: ARN mensajero.

C: Citosina.

CS: Circunsporozoítica

CPS: Proteína circunsporozoítica

D: Aspartato.

DARC, *FY* o *DUFFY*: Gen que codifica el antígeno Duffy.

DARC: Receptor de antígeno Duffy para las quimiocinas.

DO: Densidad óptica.

dNTPs: Desoxinucleótidos trifosfato.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

ELISA: Ensayo Inmunoenzimático Ligado a Enzima.

ES: Erithroid Silent (eritroide silente)

G: Guanina.

GGE: Gota gruesa y extendido.

GLURP: Proteína rica en glutamato de *Plasmodium falciparum*.

HAI: Hemaglutinación Indirecta.

HRP-2: Proteína rica en histidina 2.

IFA: Ensayo de inmunofluorescencia.

IFI: Inmunofluorescencia Indirecta.

IgG: Inmunoglobulina G.

IMT: Instituto de Medicina Tropical.

IPA: Incidencia parasitaria anual.

IR: Índice de reactividad.

kDa: Kilodaltons.

mmHg: Milímetro de mercurio

MSP-1: Proteína 1 de la superficie del merozoíto.

NaCl: Cloruro de sodio.

NLB: Buffer de lisis nuclear.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OPS: Organización Panamericana de la Salud.

PAHO: Pan American Health Organization.

pb: Pares de bases.

PBS: Buffer fosfato salino.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

pLDH: Enzima lactato deshidrogenasa de *Plasmodium*.

PvMSP-1(19): Fragmento 19 de la proteína principal de la superficie del merozoíto de *Plasmodium vivax*.

R: Arginina.

RCLB: Buffer de lisis de células rojas.

RDTs: Pruebas de diagnóstico rápido.

SLI: Santa Lucía de Inaway.

SSP: Iniciador de secuencia específica.

T: Timina.

TE: Buffer Tris-EDTA.

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.

WHO: World Health Organisation.

Y: Tirosina.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	III
ABREVIACIONES.....	V
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	14
OBJETIVOS.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
RESULTADOS.....	33
DISCUSIÓN.....	52
CONCLUSIONES.....	62
BIBLIOGRAFÍA.....	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de los iniciadores para determinar el ADN mitocondrial de <i>Plasmodium falciparum</i> y <i>Plasmodium vivax</i>	25
Tabla 2. Secuencia de los iniciadores para determinar los alelos del gen <i>DARC</i>	27
Tabla 3. Características socio-demográficas de los individuos de la comunidad de Santa Lucía de Inaway.....	34
Tabla 4. Distribución de los grupos etarios de la comunidad de Santa Lucía de Inaway con relación al sexo.....	35
Tabla 5. Características clínico-epidemiológicas de los individuos de la comunidad de Santa Lucía de Inaway.....	36
Tabla 6. Principales síntomas manifestados por los individuos de la comunidad de Santa Lucía de Inaway.....	37
Tabla 7. Prevalencia molecular de infecciones maláricas en la comunidad Santa Lucía de Inaway.....	40
Tabla 8. Frecuencia de individuos infectados y no infectados, de la comunidad de Santa Lucía de Inaway, agrupados por grupos etarios.....	41
Tabla 9. Prevalencia de la infección por <i>Plasmodium</i> spp., en los individuos de la comunidad de Santa Lucía de Inaway, clasificados de acuerdo a la condición clínica.....	42
Tabla 10. Seroprevalencia de anticuerpos anti-PvMSP-1 ₁₉ en los individuos de la comunidad de Santa Lucía de Inaway.....	43
Tabla 11. Seroprevalencia de anticuerpos IgG anti-PvMSP-1 ₁₉ en individuos de la comunidad de Santa Lucía de Inaway, agrupados por grupos etarios.....	44

Tabla 12. Seroprevalencia de anticuerpos anti-GLURP-154 de <i>P. falciparum</i> en los individuos de la comunidad de Santa Lucía de Inaway.....	45
Tabla 13. Seroprevalencia de anticuerpos IgG anti-GLURP-154 en individuos de la comunidad de Santa Lucía de Inaway, agrupados por grupos etarios.....	46
Tabla 14. Seroprevalencia de anticuerpos IgG anti- <i>Plasmodium</i> en individuos sintomáticos y asintomáticos de la comunidad de Santa Lucía de Inaway.....	47
Tabla 15. Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas del gen <i>DARC</i> en individuos infectados con <i>P. vivax</i>	49
Tabla 16. Correlaciones entre los distintos parámetros estudiados en los individuos de la comunidad de Santa Lucía de Inaway.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida del parásito de la malaria.....	3
Figura 2. Áreas de riesgo de Malaria - Municipios Según la incidencia parasitaria anual (IPA).....	12
Figura 3. Casos confirmados de malaria, años 2011–2015.....	14
Figura 4. Visualización de los ADN genómicos, mediante electroforesis en gel de agarosa (0,75%) en buffer TBE 1X, coloreado con bromuro de etidio	38
Figura 5. Visualización de los productos amplificados de PCR correspondiente al gen citocromo c oxidasa de <i>Plasmodium falciparum</i> (<i>coxIII</i>), en gel de agarosa (1,5%) en buffer TBE 1X, coloreado con bromuro de etidio.....	39

Figura 6. Visualización de los productos amplificados de PCR correspondiente al gen citocromo c oxidasa de *Plasmodium vivax* (*coxI*), en gel de agarosa (1,5%) en buffer TBE 1X, coloreado con bromuro de etidio.....40

Figura 7. Respuesta de anticuerpos IgG contra la proteína PvMSP-1₁₉, expresada como índice de reactividad (IR), en individuos de la comunidad de Santa Lucía de Inaway.....43

Figura 8. Respuesta de anticuerpos IgG contra la proteína GLURP-154, expresada como índice de reactividad (IR), en individuos de la comunidad de Santa Lucía de Inaway.....45

Figura 9. Visualización de los productos amplificados de PCR correspondiente al alelo *FYA* del gen *DARC*, en gel de agarosa (1,5%) en buffer TBE 1X, coloreado con bromuro de etidio.....48

INTRODUCCIÓN

La malaria o paludismo es la enfermedad parasitaria más importante en el mundo. Esta enfermedad infecciosa es causada por un protozoo del género *Plasmodium*, perteneciente al Phylum Apicomplexa, que es transmitido de una persona a otra mediante la picadura del mosquito hembra *Anopheles* spp. (Becerril, 2011). Diferentes especies parasitan al hombre y a diversos animales. Las dos especies principales de *Plasmodium* que afectan al hombre son *P. vivax* y *P. falciparum*, pero existen otras dos especies, de importancia regional, que son *P. malariae* y *P. ovale*. Asimismo, se han descrito infecciones en humanos causadas por parásitos de simios, tales como las infecciones por *Plasmodium knowlesi* (Botero y Restrepo, 2012), *Plasmodium cynomolgi* (Ta y col., 2014) y *Plasmodium simium* (Brasil y col., 2017)

Ciclo de vida de *Plasmodium* spp.

Los parásitos de la malaria humana tienen un ciclo de vida complejo (Figura 1), que alterna entre dos hospedadores: un invertebrado (los mosquitos hembras *Anopheles* spp.), que se comporta como vector y hospedador definitivo, y un vertebrado u hospedador intermediario (el hombre).

En el mosquito se desarrolla el ciclo esporogónico con reproducción sexuada, el cual se inicia cuando el mosquito hembra hematófaga *Anopheles* spp. ingiere la sangre de un individuo infectado con *Plasmodium* spp., tomando las diferentes formas evolutivas circulantes (trofozoítos, merozoítos, esquizontes y gametocitos). En el estómago del insecto son destruidas las formas asexuadas (trofozoítos, merozoítos y esquizontes) junto con los glóbulos rojos y sobreviven las formas sexuadas (gametocitos), los cuales continúan su desarrollo hacia la diferenciación (gametogénesis) en gametos masculinos (microgametos) y gametos femeninos (macrogametos). La maduración del gametocito femenino (macrogametocito) se lleva a cabo sin muchos cambios morfológicos, mientras que el gametocito masculino divide su núcleo 8 veces,

originando 8 microgametos. La fecundación del macrogameto por el microgameto da inicio al proceso de fertilización y la fase sexual del ciclo de vida del parásito. Posteriormente, se forma el huevo o cigoto (oocineto). Éste penetra la pared del estómago del mosquito y se coloca entre las capas muscular y epitelial donde se enquistas, dando lugar a un cuerpo circular (ooquiste), cuyo citoplasma y núcleo se dividen en elementos alargados llamados esporozoítos, los cuales salen del ooquiste y migran hacia las células de las glándulas salivales, para luego ser inoculados al hospedador vertebrado en una próxima ingesta de sangre (Revisado en Wide y col., 2011).

En el hombre, el parásito realiza una fase de reproducción asexual denominado esquizogonia. Ésta consta de dos sub-fases: 1. Esquizogónica exo-eritrocítica, que se efectúa en el hígado, y 2. Esquizogónica eritrocítica.

La sub-fase esquizogónica exo-eritrocítica inicia cuando los esporozoítos son inoculados en el torrente sanguíneo por el mosquito infectado durante la picadura. Estas formas parasitarias son fusiformes, móviles, y circulan en sangre periférica por un período de 30 a 60 minutos, hasta que penetran en las células del parénquima hepático (hepatocitos) vía células de Küpffer, a través de la interacción ligando-receptor. En esta interacción está involucrada la proteína circumsporozoítica (CS), que tiene afinidad por un receptor presente a nivel del hígado, el heparán sulfato (Revisado en Wide y col., 2011).

Dentro de cada hepatocito parasitado se forma el esquizonte tisular primario, constituido por múltiples núcleos con su correspondiente citoplasma. Este esquizonte madura y deforma la célula hepática. Después de seis a doce días sufre ruptura y libera miles de merozoítos tisulares, los cuales van a la circulación e invaden los eritrocitos. En *P. vivax* y *P. ovale* algunas formas tisulares se desarrollan muy lentamente en el hígado y pueden permanecer latentes por varios

meses, por lo cual se han llamado hipnozoítos. Cuando estos salen tardíamente a la circulación producen las recaídas de la enfermedad (Botero y Restrepo, 2012).

Cuando el merozoíto invade el eritrocito se transforma en trofozoíto joven o anular, que evoluciona a trofozoíto mediano o ameboide, esquizonte presegmentado (inmaduro) y esquizonte segmentado maduro. El esquizonte maduro al romper el eritrocito libera merozoítos, toxinas y pigmento malárico (hemozoína). Cada una de estas formas del parásito invade un nuevo eritrocito y da comienzo a otro ciclo eritrocítico. Algunos merozoítos se diferencian sexualmente en el interior del glóbulo rojo inmediatamente o después que se han producido varias generaciones de merozoítos, originando gametocitos, que pueden ser hembras (macrogametocitos) o machos (microgametocitos). Estos gametocitos no se dividen en la sangre y circulan por aproximadamente 60 días, representando la forma infectante para el mosquito (Revisado en Wide y col., 2011).

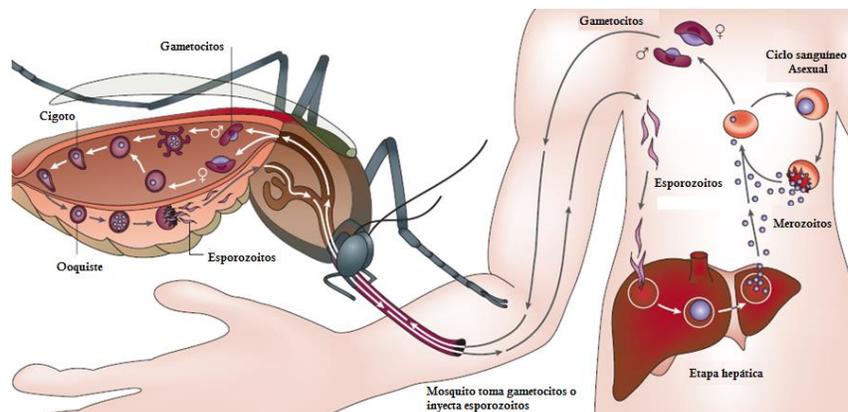


Figura 1. Ciclo de vida del parásito de la malaria (Su y col., 2007, modificado).

Manifestaciones clínicas

Las infecciones por *Plasmodium* inducen un amplio espectro de síntomas en el humano, desde parasitemias asintomáticas hasta enfermedades graves con resultados fatales. La patogénesis de la infección depende de varios factores, tales como la respuesta del hospedero, especie y genética

del parásito, grado de infección, co-infección con otros microorganismos, estado nutricional, edad y sexo (Botero y Restrepo, 2012).

Los casos de malaria no complicados suelen presentarse como cualquier síndrome febril no diferenciado. No obstante, los síntomas más frecuentes en cualquier tipo de malaria son escalofríos, fiebre, diaforesis, cefalea, artralgia y mialgias. Después que los esquizontes tisulares maduran en el hígado y se rompen, liberan los merozoítos que invadirán los eritrocitos en sangre periférica, y es a partir de este momento y durante liberaciones masivas de merozoítos, en ciclos eritrocíticos subsecuentes, que se inician los síntomas de la malaria. El período de incubación depende principalmente de la especie parasitaria, de la carga de parásitos que ingresa al hospedero y del estado de inmunidad del hospedero. La concentración de parásitos en sangre necesaria para producir síntomas se conoce como “umbral pirogénico”. El primer paroxismo malárico suele tener un menor umbral pirogénico que los subsecuentes episodios. Los paroxismos clásicos de la malaria se describen como la aparición abrupta de fiebre con escalofríos, seguidos de sudoración profusa, luego fatiga extrema y, finalmente, somnolencia. La duración de los períodos varía con la especie de *Plasmodium* infectante. La malaria causada por *P. falciparum* puede en algunas ocasiones llevar a malaria severa. (Zuluaga y Trujillo, 2010).

Diagnóstico de la Malaria

El diagnóstico de la Malaria puede clasificarse en métodos de diagnóstico parasitológico, inmunológico y de biología molecular.

Diagnóstico parasitológico

El diagnóstico parasitológico de la enfermedad se realiza en los laboratorios de manera rutinaria, mediante la observación de las distintas formas del parásito en el examen microscópico de la

sangre, a través de las técnicas de gota gruesa y de extendidos de sangre, teñidos con diversos colorantes (Zuluaga y Trujillo, 2010).

La gota gruesa y extendido tienen una sensibilidad de 20 y 100 parásitos/ μ L, respectivamente, permite la identificación de la especie y el estadio de desarrollo del parásito, suministra información sobre la viabilidad del parásito identificado e incluso permite la cuantificación de éstos (Revisado en Wide y col., 2011).

Diagnóstico inmunológico

Los métodos inmunológicos desarrollados hasta ahora en el diagnóstico de la malaria tienen como propósito detectar anticuerpos dirigidos contra el parásito, así como identificar antígenos circulantes del mismo. Una variedad de métodos serológicos han sido evaluados, tales como la Inmuno-fluorescencia Indirecta (IFI), el Inmuno-ensayo Enzimático (ELISA) y la Hemaglutinación Indirecta (HAI). El método de ELISA es uno de los principales métodos de rutina de serodiagnóstico, ya que es relativamente fácil, tiene utilidad en estudios epidemiológicos y puede utilizarse en el despistaje de malaria en los bancos de sangre en áreas endémicas (Revisado en Wide y col., 2011). Para esta prueba se usa habitualmente antígeno soluble, preparado a partir de estadios asexuales de *P. falciparum*, generalmente, obtenidos a partir de cultivo *in vitro* (Revisado en Wide y col., 2011). También pueden utilizarse como antígenos péptidos sintéticos o antígenos recombinantes, como MSP-1 (proteína 1 de la superficie del merozoíto) o la proteína circumsporozoítica (CSP) (Revisado en Wide y col., 2011). Una vez que se enfrenta el suero problema con el antígeno, se añade el conjunto anti-IgG o anti-IgM humanos y se revela una reacción enzima-sustrato. Esta prueba tiene como ventajas adicionales el poder procesar un gran número de muestras y ser cuantitativa, al registrarse el grado de reacción en un espectrofotómetro (Wide y col., 2011).

Hacia finales del siglo pasado se desarrollaron las RDTs (del inglés, *Rapid Diagnostic Test*) basadas en técnicas inmuno-cromatográficas para el diagnóstico de la malaria, que dan resultados entre 15 a 20 minutos. Estas pruebas rápidas se basan en la detección de antígenos del parásito, usando inmuno-cromatografía de flujo lateral, con anticuerpos monoclonales contra diferentes antígenos de *Plasmodium*, presentes en la sangre de individuos infectados. El primer prototipo se basa en la detección de la proteína rica en histidina 2 (HRP-2, del inglés *Histidine Rich Protein*) de *P. falciparum*, ejemplos de este prototipo son los estuches ParaSight F® (IgG) y la ICT Malaria Pf® (IgM). El segundo se basa en la detección de la enzima lactato deshidrogenasa de *Plasmodium* (pLDH), como el estuche OptiMal. El tercer prototipo detecta la aldolasa de *Plasmodium*, que se expresa principalmente en trofozoítos (Zuluaga y Trujillo, 2010).

Antígenos MSP-1₁₉ y GLURP de *Plasmodium* spp.

Los antígenos expresados en la superficie de los parásitos de la malaria, en su fase sanguínea, son los blancos principales de los anticuerpos producidos durante la exposición a la infección. Uno de los antígenos de superficie, mejor caracterizado, es la proteína de superficie del merozoíto 1 (MSP-1), esta es una proteína altamente conservada entre las especies de *Plasmodium*. MSP-1 es sintetizada como una proteína precursora, de ~ 200 kDa, unida a la superficie del merozoíto a través de un anclaje C-terminal. Posteriormente esta proteína es clivada en cuatro fragmentos principales antes de la ruptura del esquizonte. El fragmento de 19 kDa (MSP-1₁₉), de la porción C-terminal, es el único fragmento que permanece anclado en la superficie del merozoíto al momento de la invasión eritrocítica (Ladeia-Andrade, y col. 2007).

Varios estudios han demostrado que el fragmento MSP-1₁₉ es altamente inmunogénico, tanto en infecciones humanas como en animales. Además, los anticuerpos adquiridos naturalmente contra

MSP-1₁₉ se han asociado con la inmunidad protectora contra la infección por malaria (Revisado en Wang y col., 2016).

Por otra parte, la proteína rica en glutamato (GLURP) es un antígeno de 220 kDa presente en todas las etapas de desarrollo de *Plasmodium falciparum*, tanto en la fase pre-eritrocítica como en la eritrocítica. Adicionalmente, GLURP ha sido identificado como un antígeno diana para anticuerpos implicados en la inmunidad protectora adquirida contra la malaria (Doddo y col., 2000). La proteína GLURP consiste de tres regiones definidas, una región N-terminal no repetitiva (R0), una secuencia central repetitiva (R1) y una región C-terminal repetitiva (R2) (Pattaradilokrat y col., 2018). En estudios previos se ha demostrado que la región R0 es altamente conservada y está implicada en la actividad parasitaria antipalúdica, provocando una respuesta de anticuerpos estable en el tiempo (Duru y Thomas, 2014).

Diagnóstico molecular

La detección por medio de PCR (del inglés, *Polymerase Chain Reaction*) tiene la mayor especificidad y sensibilidad para el diagnóstico de malaria. El método consiste en la amplificación de secuencias específicas de los genes del parásito por la reacción en cadena de la polimerasa. La ventaja principal de esta prueba es que puede detectar 2,5 a 10 parásitos/ μ L de sangre (Revisado en Wide y col., 2011), correspondiendo a una sensibilidad 10 veces mayor que la gota gruesa y manteniendo una especificidad del 100%. La alta sensibilidad de la PCR sobre la microscopía y el diagnóstico de RDTs fue confirmada por estudios, realizados en Canadá, en los que se evaluaron la prevalencia de la malaria en refugiados asintomáticos (Revisado en Recht y col., 2017). Sin embargo, son pruebas difíciles de realizar en condiciones de campo, ya que requieren de equipos y reactivos costosos, de personal calificado y manipulación adecuada de las muestras.

Grupo sanguíneo Duffy y la malaria

El antígeno Duffy, también llamado receptor de antígeno Duffy para las quimiocinas (DARC: Duffy antigen receptor for chemokines, por su siglas en inglés), es una glicoproteína de 40-45 kDa, que está constituida por una región extracelular o dominio amino terminal, de aproximadamente 60 aminoácidos, una región central conformada por alrededor de 250 aminoácidos, los cuales constituyen siete dominios transmembrana, y un corto dominio citosólico carboxilo terminal de 28 residuos, al que no se le unen proteínas G ni otro efector intracelular conocido, a diferencia de otros receptores de quimiocinas, esto probablemente debido a la ausencia del motivo Asp-Arg-Tyr (DRY) y, por lo tanto, a la no activación de cascadas de señalización intracelular (Hadley y Peiper, 1997; Wurtz y col., 2011). El antígeno Duffy está presente en eritrocitos, células endoteliales (médula ósea, pulmón, riñón, glándula suprarrenal, tiroides, bazo, colon) y células epiteliales (conductos colectores de riñón, células de pulmón alveolar de tipo I, células de Purkinje del cerebelo) (Chaudhuri y col., 1997)

El gen que codifica el antígeno Duffy (*DARC*, también referido como *FY* o *DUFFY*) se localiza en el brazo largo del cromosoma 1, específicamente situado en la región 1q21-25, comprende dos exones y un intrón de, aproximadamente, 450 pares de bases (pb). El procesamiento del intrón produce la transcripción de dos ARN mensajeros (ARNm). Uno denominado transcrito primario o forma β , que codifica la forma predominante de DARC de 336 aminoácidos, y otro denominado transcrito menor o forma α , que codifica una forma menos abundante de la proteína con 338 aminoácidos. Sin embargo, ambas proteínas son funcionalmente idénticas (Chaudhuri y col., 1993; Yazdanbakhsh y col., 2000).

El gen *DARC* presenta dos polimorfismos principales. Uno consiste en la transición de guanina (G) por adenina (A) en el nucleótido 125 (G125A), que conlleva a un cambio de un solo

aminoácido (Gly42Asp) en el dominio amino extracelular del polipéptido, generando los alelos *FYA* y *FYB*, que codifican los antígenos Fya y Fyb del grupo sanguíneo Duffy, respectivamente. El segundo polimorfismo consiste en la transición de timina (T) por citosina (C) en el nucleótido -33 (T-33C) en la región promotora del alelo *FYB*, evitando la expresión del antígeno Duffy en los eritrocitos (antígeno Fyb^{ES}, ES de las siglas en inglés “Erythroid Silent”) (King y col., 2011). La transición de T→C está ubicada en el sitio de unión para el factor eritroide de transcripción GATA1, impidiendo la transcripción del alelo mutado en células derivadas de la médula ósea, pero no en otros tejidos (Olsson y col., 1998).

La variabilidad genética, define tres alelos: *FYA*, *FYB* y *FYB^{ES} o nulo*, que son alelos co-dominantes y codifican los antígenos antitéticos Fya, Fyb y Fyb^{ES} (Meny, G. M., 2010).

Los antígenos Fya y Fyb difieren entre sí en un cambio simple de aminoácido en la posición 42 del dominio extracelular, el antígeno Fya posee un residuo glicina en esta posición y el antígeno Fyb un ácido aspártico (Pogo y Chaudhuri, 2000). El alelo *FYB^{ES}* presenta una mutación en el sitio de unión para el factor de transcripción eritroide específico GATA-1 (T-33C), convirtiendo la secuencia consenso del sitio de unión GATA-1 de TTATCT a TTACCT (Tournamille y col., 1995).

Los polimorfismos del gen *DARC* afectan la expresión del antígeno Duffy y la susceptibilidad a la infección por *P. vivax* en la etapa sanguínea. Los individuos Fy⁺ poseen uno de los cinco genotipos comunes (*FYA/FYA*, *FYA/FYB*, *FYA/FYB^{ES} o nulo*, *FYB/FYB* y *FYB/FYB^{ES} o nulo*), que determinan tres fenotipos posibles (Fya⁺/b⁺, Fya⁺/b⁻, Fya⁻/b⁺). Los eritrocitos de los individuos Fy⁺ son susceptibles a la infección por *P. vivax*, a diferencia de los eritrocitos de los individuos con mutaciones en la región promotora del gen *DARC*, las cuales anulan la expresión del antígeno Duffy (*FYB^{ES} o nulo*/ *FYB^{ES} o nulo* o *FY*), atribuyéndole a estos eritrocitos un fenotipo

Duffy negativo (Fy^-). Sin embargo, la invasión de los hepatocitos por esporozoitos no requieren el antígeno Duffy y, por lo tanto, los individuos Fy^+ como Fy^- son susceptibles a la infección por esporozoitos y al desarrollo de parásitos en fase hepática. Bajo la liberación de los merozoitos en la circulación, solo los individuos Fy^+ desarrollan la etapa sanguínea de la infección, porque los eritrocitos de los individuos Fy^- no expresan el antígeno Duffy. Este antígeno es requerido para la invasión de los eritrocitos por merozoitos. Sin embargo, la respuesta humoral y celular contra parásitos pre-eritrocíticos de *P. vivax* han sido descritos en individuos Fy^- . Además, la frecuencia de la respuesta de anticuerpos a la proteína de CS es similar entre individuos Fy^- y Fy^+ . No obstante, las respuestas contra antígenos eritrocíticos son menos frecuentes entre individuos Fy^- que en individuos Fy^+ , debido a que los individuos Fy^- no desarrollan infecciones eritrocíticas (Maestre y col., 2010).

Con la disponibilidad del diagnóstico molecular, se ha observado en individuos Duffy negativos positividad por PCR para *P. vivax*, sugiriendo que la invasión de eritrocitos por *P. vivax* en personas Duffy negativas podría estar alterada en comparación con la invasión en individuos Duffy positivos. Investigaciones en Madagascar muestran evidencias concluyentes de que *P. vivax* es capaz de causar la infección en fase sanguínea y la enfermedad en personas Duffy-negativas, exhibiendo la capacidad que tienen los merozoítos para infectar eritrocitos humanos sin antígeno Duffy. Los datos recogidos en estos estudios sugieren que otros receptores adicionales a Duffy pueden estar implicados en el proceso de unión del merozoíto y eritrocitos (Menard y col., 2010).

Epidemiología de la malaria

La malaria persiste como uno de los grandes problemas de salud pública en el mundo y en Venezuela. La Organización Mundial de la Salud (OMS), para el año 2016 estimó 216 millones de casos de paludismo en todo el mundo y 445.000 muertes ocasionadas por la enfermedad. Todas las regiones registraron reducciones en la mortalidad en comparación con los datos obtenidos en 2010. Sin embargo, entre el año 2015 y 2016, la tendencia de descenso de la mortalidad se interrumpió en las regiones de la OMS de África, Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental, y aumentó en las regiones del Mediterráneo Oriental y las Américas. (World Health Organisation (WHO), 2017).

Históricamente, la República Bolivariana de Venezuela ha servido como modelo para la erradicación de la malaria en las Américas, con su región norte declarada libre de malaria por la OMS en 1961 (Griffing y col., 2014). Tras la reciente crisis política y económica, la malaria ha aumentado anualmente desde el 2008. Entre los años 2015 y 2016, los casos notificados aumentaron en más del 76% (de 136.402 a 240.613) y el país superó a Brasil, como el mayor contribuyente a la carga de la malaria en las Américas (WHO, 2017).

Situación actual de la malaria en Venezuela

De acuerdo al último reporte epidemiológico publicado por el Ministerio del Poder Popular para la Salud correspondiente a la semana epidemiológica N° 26 (25 de Junio al 01 de Julio de 2017), se notificaron 4.825 casos de malaria en el país, de los cuales 4.787 (99,2%) eran autóctonos, notificados por los estados Carabobo, Bolívar, Monagas, Anzoátegui, Barinas, Delta Amacuro, Aragua y Sucre; y 38 casos (0,8%) eran importados. El 65,79% de los casos correspondieron a infecciones por *P. vivax*, 31,58% por *P. falciparum* y 2,63% a infecciones mixtas (*P.vivax/P.falciparum*). Hasta la fecha hubo un acumulativo de 184.225 casos maláricos, lo que

representó un aumento de 63,1% con respecto al período homólogo del año anterior ($\eta=112.932$). La incidencia parasitaria anual (IPA) en el país fue de 33,6 por cada 1.000 habitantes (Reporte Epidemiológico N° 26 (MPPS), 2017).

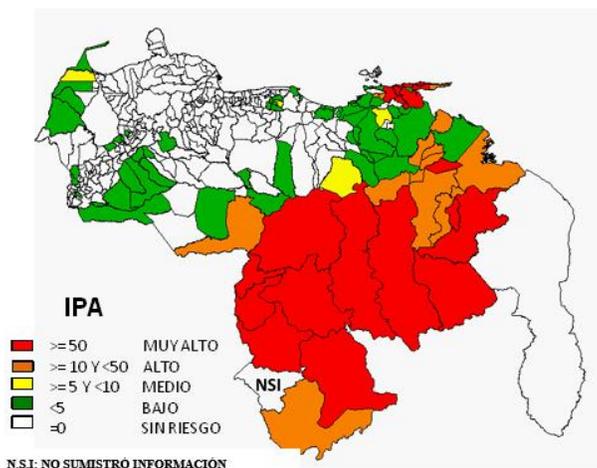


Figura 2. Áreas de riesgo de Malaria - Municipios Según la incidencia parasitaria anual (IPA).

República Bolivariana de Venezuela, año 2017.

Semana Epidemiológica N° 26 (Reporte Epidemiológico N° 26 (MPPS), 2017).

Comunidad de Santa Lucía de Inaway.

La comunidad indígena Santa Lucía de Inaway está ubicada en el km 85 al sur de El Dorado, en el eje vial Tumeremo-Santa Elena de Uairén, esta área pertenece a la Parroquia San Isidro, ciudad Las Claritas del municipio Sifontes, estado Bolívar, Venezuela. Presenta una altitud de 150 msnm y ocupa un área abierta, más o menos arbolada de 30 hectáreas, aproximadamente (Revisado en Lugo, M., 2002).

Las Claritas es un área geográfica ubicada al sureste del estado Bolívar, en donde conviven comunidades criollas e indígenas. Comprende alrededor de 40 km² de superficie y ha constituido desde 1930 una zona minera por excelencia. En ella se encuentran ubicados importantes yacimientos de oro, cobre, diamante y caliza. La calidad de vida de estas comunidades se

encuentra sujeta en gran medida al precario desarrollo urbano de la zona, a su ubicación geográfica y a una limitada base económica dependiente en forma determinante de la actividad minera (Revisado en Rodríguez, B., 2003).

La malaria es endemo-epidémica en el estado Bolívar, con brotes epidémicos frecuentes debido a causas naturales y antrópicas. La minería aurífera se ha relacionado estrechamente con la morbilidad malárica, debido a la fuerte intervención ambiental que ha ocasionado alteración del suelo y la hidrología superficial, creando ambientes propicios para la cría de anofelinos. Adicionalmente, las características espaciales y temporales de la malaria en el municipio Sifontes lo establecen como el foco más importante de malaria en Venezuela (Revisado en Moreno y col., 2014). Es por ello que el estudio epidemiológico de la comunidad Santa Lucía de Inaway y demás comunidades que conforman el municipio Sifontes debe ser de carácter prioritario en los planes de control de la enfermedad.

ANTECEDENTES

Muchos países en América han demostrado una notable tendencia en la disminución de la incidencia de la malaria en la primera década del milenio, incluyendo Colombia, Brasil y Perú, con la excepción de Venezuela. Sin embargo, de los cuatro países vecinos de Sur América, solamente Colombia y Brasil han continuado demostrando una disminución gradual en el número de casos confirmados de malaria por 1000 habitantes, mientras que Perú y Venezuela han experimentado un incremento (Figura 3) (Recht y col., 2017).

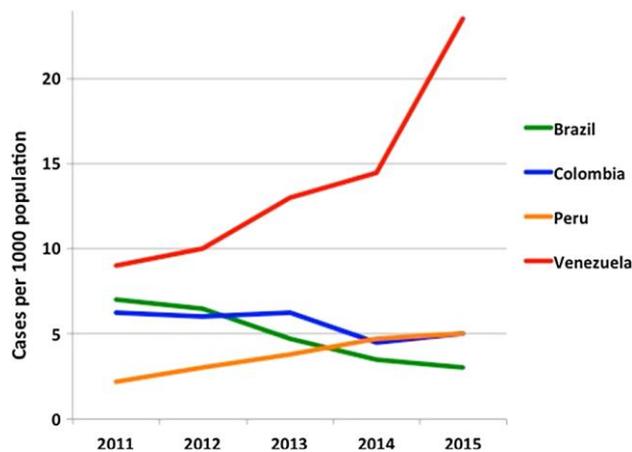


Figura 3. Casos confirmados de malaria, años 2011–2015. El número de casos de malaria confirmados en Brasil, Colombia, Perú y Venezuela se muestran por cada 1000 habitantes, de acuerdo a los datos de la Organización Mundial de la Salud (2016) (Recht y col., 2017).

Adicionalmente, la Organización Panamericana de la Salud (PAHO, por sus siglas en inglés *Pan American Health Organization*) alertó en Febrero de 2017 un incremento en los casos de malaria severa en los países de América, incluyendo Colombia y Venezuela, basándose en fuentes distintas a la de la Organización Mundial de la Salud. Para el año 2016 fueron notificados 83.356 casos de malaria en Colombia, con un 57% (47.497 casos) causado por *P. falciparum*, 39,7% (33.055 casos) por *Plasmodium vivax* y 3,3% (2.804 casos) por infecciones mixtas, mientras que en Venezuela se notificó un incremento del 75% de los casos de malaria en el año 2016 (240.613 casos) con respecto al año 2015 (136.402 casos) (Revisado en Recht y col., 2017).

Debido a que la malaria persiste como uno de los grandes problemas de salud pública en Venezuela, en el país se han realizado diferentes estudios epidemiológicos serológicos y moleculares de la malaria. Entre estos estudios destacan los siguientes.

Contreras y col. (1999), determinaron la presencia de anticuerpos contra *P. falciparum* en muestras de suero de donantes de bancos de sangre, provenientes de zonas endémicas y no endémicas para malaria. En el estudio se analizaron en 1.000 sueros la presencia de anticuerpos mediante técnicas serológicas, como el ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFA), ELISA y dot-ELISA, también se usó un cultivo aislado de *P. falciparum* como fuente antigénica. Encontrándose, con el ensayo IFA, resultados positivos de anti-*Plasmodium falciparum* en 0,8% y 3,8% de los donantes procedentes de Caracas (zona no-endémica) y Ciudad Bolívar (zona endémica), respectivamente. Mediante el ensayo de ELISA, encontraron 0,8% de resultados positivos en Caracas y 2% en Ciudad Bolívar. A través de estos resultados, los autores concluyeron que la presencia de anticuerpos anti-maláricos en donantes de zona no-endémica (Caracas) representa un riesgo potencial de malaria post-transfusional, por lo tanto, la combinación de un proceso de selección como el establecido y un historial médico adecuado representaría un avance en la seguridad de la transfusión.

En otro estudio, Contreras y col. (2011) investigaron el riesgo de transmisión transfusional de malaria en bancos de sangre de áreas endémicas (Sucre, Bolívar y Amazonas) y no endémicas (Distrito Capital) para malaria en Venezuela. Para ello evaluaron un total de 762 muestras de sangre de donantes, usando estuches comerciales para detectar tantos anticuerpos específicos (*P. vivax*, *P. falciparum* y *P. malariae*), como antígenos contra la malaria (sólo *P. falciparum*). Adicionalmente, estudiaron las muestras mediante microscopía y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Observaron que la sensibilidad y la especificidad era mayor al detectar los

antígenos de la malaria (100 y 99.8%, respectivamente) con respecto a la detección de anticuerpos (82,2% de sensibilidad y 97,4% de especificidad). En este estudio encontraron que donantes de Caracas, Ciudad Bolívar, Puerto Ayacucho y Cumaná presentaban anticuerpos anti-*Plasmodium*, con prevalencias de 1.02, 1.60, 3.23 y 3.63%, respectivamente. Sin embargo, a través de la PCR no detectaron entre los donantes la presencia de *Plasmodium*. A través de estos estudios observaron niveles significativos de seropositividad en donantes de sangre, resultado similar a lo obtenido previamente por este grupo (Contreras y col., 1999).

Rodulfo y col. (2007a) realizaron un estudio epidemiológico donde evaluaron la prevalencia de la infección por malaria en un área endémica del estado Amazonas, Venezuela. Analizaron 200 muestras de sangre de individuos escogidos al azar del área de San Fernando de Atabapo y Santa Bárbara, del estado Amazonas, y diagnosticaron la infección por malaria por observación microscópica y amplificación por PCR de la secuencia del ADNr 18S. Asimismo, relacionaron factores epidemiológicos como edad, género, ocupación y uso de mosquitero con la infección de malaria. A través de este estudio observaron una prevalencia del 28,5% de la infección en la población (12% para *P. vivax* y 17% para *P. falciparum*) y no encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre las infecciones maláricas y factores epidemiológicos, como el género y ocupación. Sin embargo, determinaron que el uso de mosquiteros era útil para prevenir las infecciones por *P. vivax*, pero no las infecciones por *P. falciparum*. El hecho de que los mosquiteros protegen contra *P. vivax*, sugiere la posibilidad de la presencia de más de una especie de *Anopheles* competente que transmite las especies de *Plasmodium* diferencialmente. Asimismo, dependiendo de la especie de *Plasmodium*, observaron que los patrones de prevalencia diferían entre los diferentes grupos etarios. Finalmente, demostraron que 24,6% de

los individuos infectados con *Plasmodium* eran asintomáticos, de los cuales 34,8% y 15,2% dieron positividad para *P. vivax* y *P. falciparum*, respectivamente.

En otro estudio, Rodulfo y col. (2007b) evaluaron los tres principales métodos de diagnóstico de la malaria: microscopía, pruebas rápidas (OptiMAL™) y PCR. En este estudio analizaron muestras de sangre de 295 individuos, de distintas locaciones de los estados Amazonas y Sucre, y detectaron que 93 individuos estaban infectados, 66 por *P. vivax*, 26 por *P. falciparum* y uno por ambas especies (infección mixta). Al analizar la sensibilidad y especificidad de cada método de diagnóstico, observaron que éstas eran altas: 95,7 y 97,9% para microscopía, 87,0 y 97,9% para OptiMAL, y 98,0 y 100% para PCR, respectivamente. También observaron que la sensibilidad del diagnóstico por microscopía y OptiMAL disminuía cuando menor era la parasitemia. En virtud de ellos, los autores recomendaron el uso de la microscopía y PCR para la caracterización de cualquier prueba diagnóstica, así como la utilización de la PCR para el diagnóstico específico de la especie, a fin de evaluar el tratamiento adecuado para la malaria.

Rodríguez y col. (2010) evaluaron la presencia de infecciones maláricas en individuos asintomáticos de la población indígena Jivi, del estado Amazonas. Para ello realizaron un estudio prospectivo en tres momentos (Abril, Septiembre y Diciembre, 2003), donde se determinó mediante gota gruesa y extendido (GGE), PCR y ELISA la presencia de infecciones maláricas. El diagnóstico por microscopía mostró que en el mes de abril el 2% de las láminas eran positivas para *Plasmodium* spp., 1% en el mes de septiembre y 4% en diciembre. Mientras que la frecuencia de infecciones por PCR fue del 46% en abril, 49% en septiembre y 35% en diciembre, con una predominancia de *P. vivax* en los tres momentos. Estos resultados por PCR detectaron infecciones de *Plasmodium* spp. en 81% de la población asintomática. Con la prueba de ELISA observaron que la prevalencia de anticuerpos en abril, septiembre y diciembre era de 72%, 53%

y 60%, respectivamente. Con estos resultados concluyeron que las infecciones ocultas pudieran ser responsables, en alguna medida, de la transmisión de la malaria en la localidad y que pudieran existir reservorios de gametocitos dentro de la comunidad, lo cual traería como consecuencia que personas no inmunes en Puerto Ayacucho y en áreas cercanas pudiesen contraer la infección.

Todos estos estudios resaltan la importancia de detectar aquellos individuos infectados con parásitos plasmodio, pero que no muestran síntomas (asintomáticos). Aunque no existen una definición estándar de la infección plasmódica asintomática (API por sus siglas del inglés, *asymptomatic plasmodial infection*), los individuos con API albergan el parásito como lo demuestra la parasitemia positiva. Sin embargo, estos individuos no desarrollan ningún síntoma durante un período de tiempo definido. Por lo tanto, la API constituye un importante obstáculo a los esfuerzos de erradicación del paludismo, representando un serio problema de salud por las siguientes razones: (1) sirven como reservorios de parásitos, que permiten que la malaria permanezca en el tiempo dentro de la población, ya que pueden transmitir el parásito a individuos no infectados, (2) los portadores asintomáticos representan un riesgo grave para la seguridad en bancos de sangre, ya que los portadores de API pueden transmitir la malaria a través de transfusiones de sangre y (3) los individuos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) con API algunas veces exhiben un aumento de la carga viral, incrementando la transmisión del VIH y acelerando la progresión y severidad de la enfermedad en países endémicos para la malaria (Revisado en De Mendonça y Barral-Netto, 2015).

La API se puede atribuir a varios factores, incluidas las diferencias entre especies de *Plasmodium* y los mecanismos de protección del hospedero. La API está frecuentemente asociada con personas mayores que viven en áreas endémicas, ya que es probable que, en el

tiempo al tener una mayor exposición a la malaria y a su vector en entornos endémicos, adquieren una inmunidad parcial. En el mismo contexto, las personas que hayan tenido varios episodios previos de malaria sintomática son más propensas a convertirse en portadores asintomáticos a la infección por *Plasmodium*. Por lo tanto, la respuesta inmunitaria subyacente en la infección asintomática necesita ser dilucidada (Revisado en: De Mendonça y Barral-Netto, 2015).

Considerando la relevancia de detectar aquellos individuos con API en la población, ya que los portadores asintomáticos de la infección por *Plasmodium* representan una gran amenaza para el control de la malaria en todo el mundo, al ser fuente natural silenciosa que no buscan atención médica y que no existen criterios estándares para infección malárica asintomática, basándose el diagnóstico en la presencia del parásito durante un período específico de la infección, se plantean los siguientes objetivos:

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar por epidemiología serológica y molecular la malaria en la comunidad de Santa Lucía de Inaway, Estado Bolívar, Venezuela.

Objetivos específicos

1. Caracterizar demográficamente la comunidad de Santa Lucia de Inaway.
2. Caracterizar desde el punto de vista clínico a los individuos de la comunidad en base a la presencia de síntomas compatibles con la malaria.
3. Determinar la seroprevalencia de malaria en los individuos de la comunidad, mediante la detección de anticuerpos IgG contra la proteína principal de la superficie del merozoíto

de *Plasmodium vivax* PvMSP-1₁₉ y la proteína rica en glutamato de *Plasmodium falciparum* (GLURP).

4. Determinar la prevalencia de la infección por *Plasmodium* spp. mediante diagnóstico molecular en los individuos de la comunidad.
5. Determinar la frecuencia de los alelos del gen *DARC* en individuos *Plasmodium vivax* positivos.
6. Correlacionar la variabilidad del gen *DARC* y el índice de reactividad de los Anticuerpos IgG contra *P. vivax*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Población

En la presente investigación se incluyeron 134 individuos, procedentes de la comunidad indígena Santa Lucía de Inaway, ubicada en la parroquia San Isidro, ciudad Las Claritas, municipio Sifontes, estado Bolívar, Venezuela. Las muestras de sangre de estos individuos fueron recolectadas en salidas de campo realizadas por el equipo de trabajo del Centro para Estudios sobre Malaria (CEM)-IAE Dr. Arnoldo Gabaldón, ubicado en la Universidad Central de Venezuela, y el Centro de Investigación de Campo Francesco Vitanza en Tumeremo, Estado Bolívar, en julio del 2017.

A las personas se les informó sobre el estudio y se solicitó su participación mediante la firma de un documento de consentimiento informado, aprobado por el comité Ético-Científico del Instituto de Medicina Tropical-Universidad Central de Venezuela. Los menores de edad que accedieron a participar voluntariamente debieron contar con el consentimiento firmado de sus tutores legales.

A través de una encuesta clínico-epidemiológica, realizado por el personal del Centro para Estudios sobre Malaria (CEM)-IAE Dr. Arnoldo Gabaldón, se recopiló toda la información sociodemográfica (edad, sexo, tiempo viviendo en el área, ocupación, etnia), y clínico-epidemiológica (antecedente malárico, número de episodios maláricos, consumo de antimaláricos, uso de repelente, mosquitero o tela metálica, y condición clínica) de la población de estudio. Por otra parte, se consideraron como individuos sintomáticos aquellos que mostraron cualquier síntoma relacionado con la malaria (temperatura corporal de 38°C o superior, y/o cefalea persistente, dolor general o debilidad) en el momento de la recolección de la muestra de sangre o declarado por el paciente o tutor legal, y los individuos asintomáticos como aquellos

que no mostraron o declararon ninguna sintomatología compatible con malaria al momento de la toma de muestra.

Criterios de inclusión:

Individuos sin consideración de sexo, ≥ 5 años, quienes quisieron participar voluntariamente en el estudio.

Con permanencia en el área endémica durante un tiempo mayor a un mes.

Criterios de exclusión:

Individuos menores de 5 años de edad.

Individuos sin información en la ficha epidemiológica.

Personas con enfermedades crónicas o con el sistema inmunológico comprometido, tales como individuos con trasplantes o en quimioterapia, igualmente personas con patologías autoinmunes.

2. Diagnóstico parasitológico:

Se realizó a partir de muestras de sangre capilar del lóbulo de la oreja, mediante gota gruesa y extendido de sangre (GGES) coloreado con Giemsa (Bruce-Chwatt, 1986; Alger, J., 1999). La observación y diferenciación morfológica de los plasmodios estuvo a cargo del personal del Centro de Investigación Francesco Vitanza (CIFV) en Tumeremo, Estado Bolívar.

Asimismo, el examen físico de los individuos incluidos en el estudio fue realizado por el Dr. Oscar Noya del Centro para Estudios sobre Malaria-Instituto de Altos Estudios “Dr. Arnaldo Gabaldon”/ Instituto de Medicina Tropical-Universidad Central de Venezuela.

3. Extracción de ADN genómico:

El ADN genómico se obtuvo a partir de 5 mL de sangre periférica utilizando EDTA como anticoagulante, empleando el método con solvente orgánico (Bunce, 2000). El procedimiento fue el siguiente:

La muestra de sangre periférica se centrifugó por 10 minutos a 1000 g para obtener los leucocitos (capa blanca), éstos se lavaron con 10 mL de buffer de lisis de células rojas (RCLB: Red Cell Lysing Buffer) y se agitó por inversión. Luego se centrifugó de nuevo por 10 minutos a 1000 g, se descartó el sobrenadante y se repitió el lavado con RCLB hasta obtener un precipitado de leucocitos blanco. El precipitado se re-suspendió en 3 mL de buffer de lisis nuclear (NLB: Nuclear Lysing Buffer) y se dejó en baño a 56°C hasta disolverse. Una vez disuelto, se añadió 1 mL de cloruro de sodio (NaCl 5,25 M), se agitó en vórtex y se añadió 2 mL de cloroformo, se agitó nuevamente hasta formar una solución lechosa, luego se centrifugó por 20 minutos a 1000 g. Posteriormente, se aspiró la fase acuosa que contiene el ADN y se transfirió a un tubo de polipropileno. A la fase acuosa extraída se le añadió 2 volúmenes de etanol 95% frío y se rotó el tubo hasta que la malla de ADN precipitara. La malla de ADN se tomó con una pipeta de polipropileno y se transfirió a un tubo estéril de 1,5 mL. El ADN se lavó con etanol 70%, se centrifugó durante 5 minutos a máxima velocidad y se retiró el exceso de etanol. Finalmente, el ADN se re-suspendió en buffer TE 1X (Tris 2 M pH 7.6 y EDTA 0.25 M pH 8).

4. Determinación de la concentración del ADN genómico:

La concentración de ADN genómico se estimó por lectura de la densidad óptica (D.O.), midiendo la absorbancia a 260nm y a 280nm de cada muestra (2 µL) utilizando un nanodrop (NanoDrop™ 2000, Thermo Scientific).

La concentración del ADN ($\mu\text{g/mL}$) se determinó a través de la fórmula:

$[\text{ADN}] \text{ doble cadena} = 50 \mu\text{g/mL (factor constante)} \times \text{DO } 260\text{nm}$.

$1\text{DO}260\text{nm} = 50 \mu\text{g de ADN/mL}$

También se calculó la relación $\text{DO}260\text{nm}/\text{DO}280\text{nm}$ para estimar la pureza del ADN (la cual debió ser mayor a 1,6).

5. Calidad del ADN:

La calidad del ADN genómico se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa (Agarosa LE, ACTGENE) al 0,75% en TBE 1X (0,5 M Tris-HCL, 0,6 M ácido bórico, 10 mM EDTA- Na_2 , pH=8,2) coloreado con bromuro de etidio (0,5 $\mu\text{g/mL}$), y se visualizó en un transiluminador UV (ultravioleta). En cada pozo del gel se colocó 5 μL de ADN mezclado con 2 μL de buffer de carga (Orange G), se utilizó como control 5 μL del ADN del Fago Lambda (Promega) sin digerir (200 $\mu\text{g/mL}$). La corrida electroforética se realizó a 100 voltios durante 30 minutos.

6. Estudio Molecular:

Para el diagnóstico molecular de *Plasmodium* spp. y el análisis del gen *DARC* se utilizó la técnica conocida como reacción en cadena de la polimerasa o PCR (del inglés, Polymerase Chain Reaction). Esta técnica fue descrita en 1983 por Kary Mullis (Mullis y Faloona, 1987). El principio básico de la PCR es el incremento exponencial de la secuencia específica de ADN utilizando iniciadores oligonucleotídicos, cuyas secuencias corresponden con la secuencia blanco y delimitan el segmento de ADN a amplificar (Mullis y Faloona, 1987).

6.1 Método para el diagnóstico molecular de *P. vivax* y *P. falciparum*:

La detección de *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax* se realizó utilizando los iniciadores y el protocolo descrito por Cunha y colaboradores (Cunha y col., 2009). (Tabla 1).

Con este protocolo la secuencia blanco es el ADN mitocondrial, amplificándose por PCR los genes citocromo c oxidasa de *P. falciparum* (cox III) y de *P. vivax* (cox I), en las muestras positivas para estos parásitos. Este es un método de PCR simple y sensible para detectar *P. falciparum* y *P. vivax*, con una sensibilidad y especificidad del 100%, constituyéndose en un buen método de diagnóstico, especialmente porque solo involucra un paso, lo que lo hace menos laborioso y lento en comparación con la PCR anidada (Cunha y col., 2009).

Tabla 1. Secuencia de los iniciadores para determinar el ADN mitocondrial de *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*.

Iniciadores	Secuencia	Tamaño del producto amplificado
<i>P.f. sentido</i>	5'-CCTGCATTAACATCATTATATGGTACATCT-3'	273 pb
<i>P.f. antisentido</i>	5'-GATTAACATTCTTGATGAAGTAATGATAAATACCTT-3'	
<i>P.v. sentido</i>	5'-AAGTGTTGTATGGGCTCATCATATG-3'	290 pb
<i>P.v. antisentido</i>	5'- CAAAATGGAAATGAGCGATTACAT-3'	

Para la detección de *P. vivax* y *P. falciparum* se prepararon dos mezclas de reacción por separado. La PCR se realizó en un termociclador Applied Biosystem empleando la siguiente mezcla de reacción: PCR Buffer 1X, 1 µM de cada uno de los iniciadores específicos (Tabla 1), 2,5 mM de KCl, 0,4 mM de Tris-HCl, 0,2 mM de dNTP mix, 3,5 mM de MgCl₂, 2,5 U/µL de la enzima DNA polimerasa EconoTaq (Lucigen), 1 µL de muestra de ADN genómico y agua destilada para completar un volumen total de reacción de 10 µL. En todas las reacciones se incluyó un control negativo (mezcla de reacción sin ADN) y un control positivo (mezcla de reacción con ADN de un individuo con diagnóstico *P. falciparum* o *P.vivax* positivo).

La condición de la PCR fue la siguiente: un paso inicial de desnaturalización a 96°C por 5 minutos; 35 ciclos de: 95°C por 1 minuto; 60°C (*P. falciparum*) o 62°C (*P. vivax*) por 1 minuto y 72°C por 1 minuto. Finalmente, una extensión de 10 minutos a 72°C.

El producto de PCR (273 pb para *P. falciparum* y 290 pb para *P. vivax*) se verificó en geles de agarosa al 1,5% (Agarosa LE, ACTGENE), teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/mL). La corrida se realizó a 100 V por 30 minutos, utilizando como referencia un marcador de tamaño molecular de 100 pb (Lucigen).

6.2 Determinación de los alelos del gen *DARC* (*DUFFY*):

Para el análisis del polimorfismo del gen *DARC* se utilizó la técnica PCR-SSP (reacción en cadena de la polimerasa con iniciadores de secuencia específicas), la cual se fundamenta en que solo los iniciadores cuyas secuencias son perfectamente complementarias a la muestra del ADN, hibridan y producen el fragmento correspondiente al gen de interés (Shymala y Ames, 1993). Posteriormente, los fragmentos de ADN amplificados son separados mediante electroforesis en geles de agarosa, previamente teñidos con bromuro de etidio. La interpretación de los resultados de la PCR-SSP se basa en la presencia o ausencia de un fragmento específico de ADN. Dado que la amplificación durante la reacción de PCR puede ser adversamente afectada por diversos factores (errores de pipeteo, calidad deficiente del ADN, presencia de inhibidores, etc.), es incluido un par de iniciadores que amplifican un control interno. Este par de iniciadores amplifican una región conservada de un gen constitutivo, que está presente en todas las muestras de ADN humano y se utiliza para verificar la eficacia de la reacción de PCR. En presencia de una banda positiva de tipificación (amplificación específica de un alelo), el producto del par de iniciadores del control interno puede estar débil o ausente debido a las diferencias en

concentración y a las temperaturas de fusión entre los pares de iniciadores específicos y el par de iniciadores del control interno.

La determinación de los alelos del gen *DARC* se realizó utilizando los iniciadores y el protocolo descrito por Olsson y col., 1998 (Tabla 2).

Tabla 2. Secuencia de los iniciadores para determinar los alelos del gen *DARC*.

Se empleó como control interno de la PCR el gen *ABO*.

Variante polimórfica	Iniciador	Secuencia (5'-3')	Tamaño del producto amplificado
<i>FYA</i>	<i>FYAB2</i> <i>FYAREV1</i>	5'-CTCATTAGTCCTTGGCTCTTAT-3' 5'-AGCTGCTTCCAGGTTGCAC-3'	711 pb
<i>FYB</i>	<i>FYAB2</i> <i>FYBREV2</i>	5'-CTCATTAGTCCTTGGCTCTTAT-3' 5'-AGCTGCTTCCAGGTTGGCAT-3'	711 pb
<i>FY</i>	<i>GTAFY2</i> <i>FYBREV2</i>	5'-CTCATTAGTCCTTGGCTCTTAC-3' 5'-AGCTGCTTCCAGGTTGCAC-3'	711 pb
<i>ABO</i>	<i>ABO-516</i> <i>ABO-926</i>	5'-GCTGGAGGTGCGCGCCTAC-3' 5'-ACGAATTCTACTTGTTCAGGTGGCTCTCGTC-3'	419 pb

Se prepararon tres mezclas de reacción por separado (correspondiente a los tres alelos del gen *DARC*) para cada paciente a evaluar. La PCR se realizó en un termociclador Applied Biosystem empleando la siguiente mezcla de reacción: PCR Buffer 1X, 1 µM de los iniciadores respectivos para cada alelo *FY*, 0,1 µM de los iniciadores *ABO-516* y *ABO-926*, 2,5 mM de KCL, 0,4 mM de Tris HCL, 0,2 mM de dNTPs mix, 2,0 mM de MgCl₂, 1,25 U/µL de la enzima DNA polimerasa GoTaq (Promega), 1 µL de muestra de ADN genómico y agua destilada hasta completar un volumen total de reacción de 10 µL. Se incluyó un control negativo (mezcla de

reacción sin ADN) para descartar contaminación y un control positivo (mezcla de reacción con ADN de un individuo con alelo *FY* conocido)

La condición para la amplificación fue la siguiente: 96°C por 8 minutos, seguida por 10 ciclos con: desnaturalización 94°C por 20 segundos, hibridación a 69°C por 1 minuto, seguida por 25 ciclos con las siguientes características: desnaturalización 94°C por 20 segundos, hibridación 64°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto. Luego una extensión final a 72°C por 10 minutos.

El producto de PCR se verificó en geles de agarosa al 1,5% (Agarosa LE, ACTGENE) teñidos con bromuro de etidio (0,5µg/mL). La corrida se realizó a 100 V por 30 minutos, utilizando como referencia un marcador de tamaño molecular de 100 pb (Lucigen).

7. Método para el diagnóstico inmunológico de anticuerpos IgG contra *Plasmodium* spp.

7.1 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para la detección de anticuerpos IgG contra la proteína PvMSP-1₁₉.

La presencia de anticuerpos IgG anti-*P. vivax* en los sueros de los individuos incluidos en el estudio, se determinó mediante el Ensayo Inmunoenzimático Ligado a Enzima (ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) indirecto. Este ensayo se fundamenta en la detección de anticuerpos presentes en muestras de suero o plasma, contra un antígeno específico inmovilizado en una superficie de poliestireno. La reacción antígeno-anticuerpo es detectada mediante un anticuerpo secundario marcado con una enzima (conjugado) contra el anticuerpo primario. La detección tiene mayor sensibilidad por presentar una amplificación de señal debida a la hidrólisis del sustrato específico de la enzima acoplada en el conjugado. La intensidad de la reacción colorimétrica permite determinar indirectamente mediante espectrofotometría la reactividad de

los anticuerpos presentes en la muestra evaluada frente al antígeno específico (Voller y Engvall, 1974).

La estandarización del presente protocolo fue realizada por la Lic. Marilyn Toledo, la Lic. Ana Cecilia Bruces, la Magister Albina Wide, del Instituto de Medicina Tropical de la Universidad Central de Venezuela y mi persona. La proteína recombinante PvMSP-1₁₉ fue sintetizada en la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), Bogotá-Colombia.

El procedimiento fue el siguiente, se sensibilizaron placas de ELISA NUNC MaxiSorb™ (Thermo Fisher Scientific) con la proteína recombinante PvMSP-1₁₉ a la concentración de 10 µg/mL en Buffer Carbonato/Bicarbonato pH 9,6 (50 µL/pozo), incubadas en cámara húmeda a 4°C durante 18 horas. Luego de descartar el antígeno se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20 al 0,05% incubando a temperatura ambiente durante 10 minutos cada vez. Los pozos fueron bloqueados con leche descremada al 5% en PBS-Tween 20 al 0,05% (100 µL/pozo), y se incubó durante dos horas en cámara húmeda a 37°C. Se descartó la solución de bloqueo y se realizó un lavado con PBS-Tween 20 al 0,05%. Posteriormente, se colocaron los sueros de referencia (sueros positivos y negativos para anticuerpos anti-*P. vivax*) y los sueros problemas por duplicados a la dilución 1:100 en solución de bloqueo (50 µL/pozo), y se incubó durante una hora en cámara húmeda a 37°C. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20 al 0,05% incubando a temperatura ambiente durante 10 minutos cada vez. Se adicionó el conjugado anti-IgG acoplado a Fosfatasa Alcalina (SIGMA) a la dilución 1:1000 en solución de bloqueo (50 µL/pozo) y se incubó durante una hora en cámara húmeda a 37°C. Se lavaron los pozos dos veces con PBS-Tween 20 al 0,05%. Finalmente, el revelado se llevó a cabo adicionando 50 µL/pozo del sustrato p-nitrofenil fosfato 1 mg/mL (SIGMA) en Dietanolamina pH 9,6. Las lecturas de densidad óptica (D.O) se registraron a los 10 y 30 minutos post-incubación en un

lector de ELISA (TECAN SUNRISE™) a 405 nm, tomando como referencia las D.O de los sueros de referencia.

7.2 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para la detección de anticuerpos IgG contra la proteína rica en glutamato de *Plasmodium falciparum* (GLURP-154).

El péptido sintético de la proteína GLURP-154 utilizado en este estudio fue sintetizado en el Laboratorio de Péptidos del Instituto de Medicina Tropical (IMT), Universidad Central de Venezuela (Zerpa y col., 2006). Asimismo, este ensayo fue previamente estandarizado por el personal del Instituto de Medicina Tropical de la Universidad Central de Venezuela.

Las placas de ELISA NUNC MaxiSorb™ (Thermo Fisher Scientific) se sensibilizaron con el péptido sintético de la proteína GLURP-154 a una concentración de 20 µg/mL (previamente estandarizado) en Buffer Carbonato/Bicarbonato pH 9,6 (50 µL/pozo), se incubaron en cámara húmeda a 4°C durante 18 horas. Luego de descartar el antígeno se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20 al 0,05%, incubando a temperatura ambiente durante 10 minutos cada vez. Los pozos fueron bloqueados con leche descremada al 5% en PBS-Tween 20 al 0,05% (100 µL/pozo), y las placas se incubaron durante dos horas en cámara húmeda a 37°C. Una vez descartada la solución de bloqueo se realizó un lavado con PBS-Tween 20 al 0,05%. Posteriormente, se colocaron los sueros de referencia (positivos y negativos) y los sueros problemas a la dilución 1:100 en solución de bloqueo (50 µL/pozo), se incubó durante una hora en cámara húmeda a 37°C. Seguidamente, se realizó tres lavados con PBS-Tween 20 al 0,05% y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos cada vez. Se adicionó el conjugado anti-IgG acoplado a Fosfatasa Alcalina (SIGMA) dilución 1:1000 en solución de bloqueo (50 µL/pozo) y se incubó durante una hora en cámara húmeda a 37°C. Se realizó dos lavados rápidos

con PBS-Tween 20 al 0,05%. Finalmente, el revelado se llevó a cabo adicionando 50 µL/pozo de p-nitrofenil fosfato 1 mg/mL (SIGMA) en Dietanolamina pH 9,6 y se realizaron las lecturas de densidad óptica (D.O) a los 10 y 15 minutos post-incubación en un lector de ELISA (TECAN SUNRISE™) a 405 nm, tomando como referencia las D.O de los sueros de referencia.

7.3 Determinación del punto de corte.

El punto de corte necesario para determinar el índice de reactividad de los anticuerpos se determinó evaluando 36 muestras de individuos aparentemente sanos, sin antecedentes de infección malárica, procedentes de zonas sin transmisión de malaria, no infectados por *Plasmodium* spp. y sin antecedentes de transfusión sanguínea.

Este punto se determinó a partir de la media de las densidades ópticas de los sueros negativos más tres desviaciones estándar de dichos valores. Posteriormente se determinó el índice de reactividad (IR) de los anticuerpos IgG de las muestras problemas.

8. Análisis estadístico:

Los análisis descriptivos (frecuencias) se realizaron con el paquete estadístico SPSS *Statistics 17* (Nie, N., Hull, H., Bent, D. 2011. SPSS. Chicago: IBM).

Frecuencias alélicas y genotípicas de los alelos FYA, FYB y FY del gen DARC.

Las frecuencias alélicas (FA) y frecuencias genotípicas (FG) se determinaron por conteo directo a partir de los fenotipos asignados a cada individuo.

Frecuencia alélica. Se determinó el número de veces que se observó el alelo y se dividió entre dos veces el número total de individuos estudiados (N).

$$FA = \frac{n^{\circ} \text{ veces que se observa el alelo}}{2N}$$

Frecuencia genotípica. Se determinó el número de veces que se observó el genotipo y se dividió entre el número total de individuos estudiados (N).

$$FG = \frac{n^{\circ} \text{ veces que se observa el genotipo}}{N}$$

Determinación del índice de reactividad (IR) de los anticuerpos IgG.

Se determinó el Índice de Reactividad (IR) de los anticuerpos IgG contenido en los sueros problemas mediante la relación de la densidad óptica (D.O.) de la muestra problema y el valor (D.O.) del punto de corte (Cassiano y col., 2016), a través la fórmula:

$$IR = \frac{DO \text{ muestra problema}}{DO \text{ Punto de corte}}$$

Las muestras con un IR mayor a uno (>1) se consideraron como positivas.

Análisis de correlación.

La correlación denota una relación entre dos o más variables, es decir, el cambio en una variable está acompañado de cambio en la otra. El resultado final de un análisis de correlación mide la fuerza, el alcance de la relación entre las variables y su dirección. El resultado es indicado como un coeficiente de correlación (r) que va de +1.0 a -1.0. Cuanto más cerca estén los coeficientes de +1,0 y -1,0, mayor será la fuerza de la relación entre las variables. En general, $r > 0$ indica una relación positiva y $r < 0$ indica una relación negativa, mientras que $r = 0$ indica que no hay relación, o que las variables son independientes y no están relacionadas. En el caso positivo, ambas variables aumentan o disminuyen juntas en la misma dirección, por el contrario, en el caso negativo el cambio se produce en la dirección opuesta, de modo que el aumento de una variable está acompañado de un descenso en la otra.

El coeficiente de correlación de Pearson se determinó con el paquete estadístico SPSS *Statistics 17* (Nie N, Hull H, Bent D. 2011. SPSS. Chicago: IBM).

RESULTADOS

Características socio-demográficas de la población de estudio.

En el estudio se incluyeron 134 individuos pertenecientes a la comunidad Santa Lucía de Inaway, municipio Sifontes, estado Bolívar. En la Tabla 3 se muestra las características socio-demográficas de los individuos incluidos en el estudio. Como se puede observar, el 32,08% (43) de los habitantes eran del sexo masculino y 67,91% (91) del sexo femenino. La edad media de los individuos fue de 24 ± 17 años, siendo la edad mínima 5 años y la máxima 79 años. Al establecer los grupos etarios, se encontró la siguiente distribución: 32,84% individuos en edad escolar, 20,15% adolescentes, 29,85% adultos jóvenes, 14,93% adultos contemporáneos y 3,73% adultos mayores. El 15,67% (21) de los habitantes tenían ≤ 5 años viviendo en el área, 23,13% (31) de 6 a 10 años y 58,21% (78) más de 10 años de residencia en el lugar. Además, un 48,50% (65) de los habitantes eran estudiantes, 22,39% (30) amas de casa y 6,72% (9) mineros. En relación con la etnia, el 76,12% de la población eran Amerindia de la etnia Pemón, 21,64% mestizos/criollos y 1,49% de ascendencia africana.

Tabla 3. Características socio-demográficas de los individuos de la comunidad de Santa Lucía de Inaway.

Características	Individuos evaluados (n=134)
Sexo:	
Hombres	32,09 (43)
Mujeres	67,91 (91)
Edad ($\bar{X} \pm DE$ años)	24 \pm 17
Rango de edad (años)	5 – 79
Grupos etarios:	
Escolar (5-12 años)	32,84 (44)
Adolescentes (13-18 años)	20,15 (27)
Adultos jóvenes (19-40 años)	29,85 (40)
Adultos contemporáneos (41-60 años)	14,93 (20)
Adultos mayores (61 años o más)	3,73 (5)
Tiempo de residencia (años):	
\leq 5 años	15,67 (21)
6 a 10 años	23,13 (31)
> 10 años	58,21 (78)
Ocupación:	
Agricultor	0,75 (1)
Alfarería	0,75 (1)
Ama de casa	22,39 (30)
Campesino	1,49 (2)
Carpintero	0,75 (1)
Cocinera	2,24 (3)
Comerciante	2,99 (4)
Costurera	1,49 (2)
Docente	4,48 (6)
Estudiante	48,51 (65)
Minero	6,71 (9)
Obrero	2,24 (3)
No específica	5,22 (7)
Grupo étnico:	
Amerindio	76,11 (102)
Mestizo/Criollo	21,64 (29)
Ascendencia Africana	1,49 (2)

Nota: La frecuencia está expresada en porcentaje. Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de individuos.

Al agrupar a los individuos de los diferentes grupos etarios en relación al sexo, observamos que los individuos del sexo masculino eran principalmente escolares (41,86%) y las del sexo femenino adultas jóvenes (34,07%), sin embargo, las diferencias no fueron significativas (Tabla 4).

Tabla 4. Distribución de los grupos etarios de la comunidad de Santa Lucía de Inaway con relación al sexo.

Grupos etarios	Sexo	
	Masculino (n=43)	Femenino (n=91)
Escolar (5-12 años)	41,86 (18)	28,57 (26)
Adolescentes (13-18 años)	25,58 (11)	17,58 (16)
Adultos jóvenes (19-40 años)	20,93 (9)	34,07 (31)
Adultos contemporáneos (40-60 años)	9,30 (4)	15,38 (14)
Adultos mayores (\geq 61 años)	2,33 (1)	4,40 (4)

Nota: La frecuencia está expresada en porcentaje. Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de individuos.

Características clínico-epidemiológicas de la población de estudio.

En la Tabla 5 se muestran las características clínico-epidemiológicas de los individuos incluidos en el estudio. Como se puede observar, el 82,08% de los habitantes afirmó haber presentado al menos algún episodio por *Plasmodium* spp., de los cuales 58,21% manifestó haber sufrido de 1-5 episodios, 10,45% de 6-10 episodios y 13,43% más de 10 episodios. Por otra parte, 79,85% de los habitantes habían sido tratados con antimaláricos. En cuanto al uso de mosquiteros, el 72,39% de los individuos manifestó que se hacían uso de los mismos. Asimismo, 5,22% de los individuos manifestaron hacer uso de telas metálicas en ventanas y puertas de las viviendas,

8,21% hace uso de repelentes y un 8,96% realiza rociamientos intradomiciliarios. Finalmente, basados en la ausencia o presencia de síntomas/signos compatibles con la malaria, en el momento de la toma de la muestra, los individuos se clasificaron clínicamente en sintomáticos y asintomáticos. Presentando el 55,97% de los individuos manifestaciones clínicas de malaria y un 42,54% ausencia de las mismas.

Tabla 5. Características clínico-epidemiológicas de los individuos de la comunidad de Santa Lucía de Inaway.

Características	Individuos evaluados (n=134)
Antecedentes maláricos:	
Si	82,09 (110)
No	16,42 (22)
Ingestión Antimalaricos:	
Si	79,85 (107)
No	17,91 (24)
Mosquiteros:	
Si	72,39 (97)
No	21,64 (29)
Telas metálicas:	
Si	5,22 (7)
No	88,06 (118)
Repelente:	
Si	8,21 (11)
No	83,58 (112)
Rociamiento intradomiciliario:	
Si	8,96 (12)
No	85,07 (114)
Sintomatología:	
Sintomáticos	55,97 (75)
Asintomáticos	42,54 (57)

Nota: La frecuencia está expresada en porcentaje. Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de individuos.

En la tabla 6 se muestra la frecuencia de los principales síntomas manifestados, en el momento de la toma de la muestra, por los individuos de la comunidad de Santa Lucía de Inaway. Como se puede observar, el dolor de cabeza fue el principal síntoma (66,36%), seguido por malestar general (58,18%), fiebre (54,55%) y escalofríos (52,73%).

Tabla 6. Principales síntomas manifestados por los individuos de la comunidad de Santa Lucía de Inaway.

Síntomas clínicos	Individuos Sintomáticos (n=75)
Fiebre	54,55 (60)
Escalofríos	52,73 (58)
Sudoración	47,27 (52)
Debilidad	49,09 (54)
Mareos	47,27 (52)
Náuseas	33,64 (37)
Vómitos	25,45 (28)
Palidez	34,55 (38)
Ictericia	3,64 (4)
Dolor de cabeza	66,36 (73)
Dolor de espalda	40,00 (44)
Dolor muscular	44,55 (49)
Dolor abdominal	41,82 (46)
Dolor en ojos	36,36 (40)
Alteraciones mentales	3,64 (4)
Confusión mental	1,82 (2)
Hemorragia	1,82 (2)
Diarrea	17,27 (19)
Malestar general	58,18 (64)
Dificultad respiratoria	7,27 (8)
Falta de apetito	31,82 (35)

Nota: La frecuencia está expresada en porcentaje. Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de individuos.

Calidad del ADN genómico.

La extracción del ADN genómico de los leucocitos de las muestras de sangre venosa periférica, tomada a cada uno de los individuos, se realizó empleando cloroformo, como solvente orgánico. Una vez obtenido el ADN genómico, se procedió a realizar su visualización en geles de agarosa al 0,75% en TBE 1X teñidos con bromuro de etidio, colorante utilizado para la detección de las bandas de ADN, lo que permitió evidenciar la calidad del ADN extraído, así como estimar su concentración al compararlo con un patrón ajustado a 200 $\mu\text{g/mL}$ (Fago Lambda) (Figura 4). De las 134 muestras evaluadas, 91,04% (122) presentaban un ADN no fragmentado y el 8,96% (12) un ADN fragmentado, estas últimas se excluyeron del estudio.

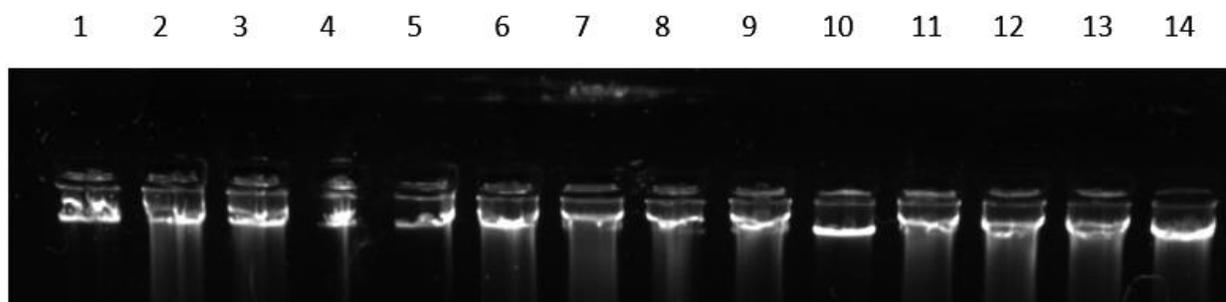


Figura 4. Visualización de los ADN genómicos, mediante electroforesis en gel de agarosa (0,75%) en buffer TBE 1X, coloreado con bromuro de etidio. Observamos el ADN genómico (carriles 2 al 14) correspondientes a muestras de ADN de individuos incluidos en el estudio, así como el fago lambda ajustado a 200 $\mu\text{g/ml}$ (carril 1).

Prevalencia de la infección malárica mediante diagnóstico parasitológico.

El análisis del examen parasitológico (gota gruesa y extendido) mostró que 96,27% de los individuos eran negativos para parásitos *Plasmodium* spp, mientras que 3,73% estaban infectados con *Plasmodium vivax*. La observación y diferenciación de los plasmodios estuvo a

cargo del personal de microscopistas del Centro de Investigación de Campo Francesco Vitanza (CIFV) en Tumeremo, Bolívar.

Diagnóstico molecular de Plasmodium spp.

Para el diagnóstico molecular de infecciones maláricas por *P. vivax* o *P. falciparum*, se realizó mediante la técnica de PCR de una ronda basada en la detección del ADN mitocondrial de este parásito. El diagnóstico molecular solo se realizó en aquellos individuos con datos demográficos, epidemiológicos y clínicos completos (n=110 individuos). En las figuras 5 y 6 se muestra un gel representativo de los productos del PCR del ADN mitocondrial de *P. vivax* y de *P. falciparum*, respectivamente.

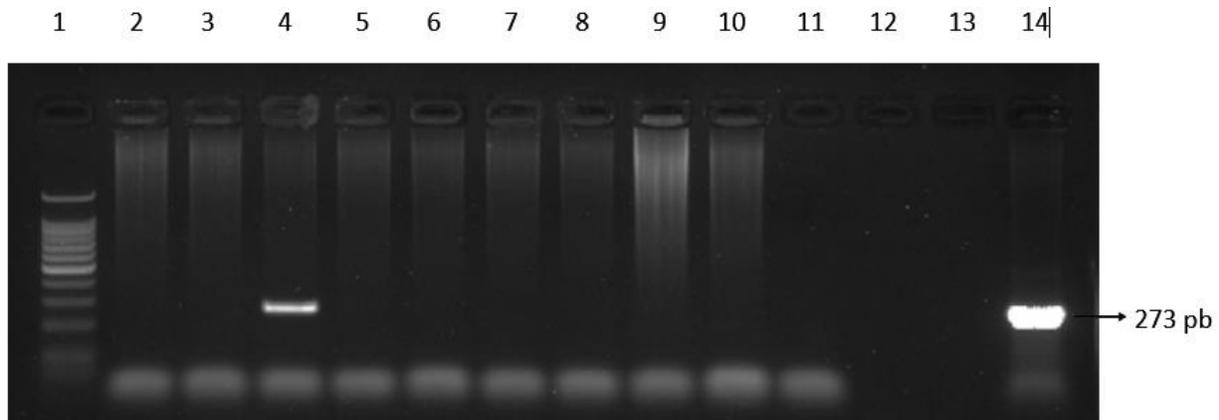


Figura 5. Visualización de los productos amplificados de PCR correspondiente al gen citocromo c oxidasa de *Plasmodium falciparum* (*coxIII*), en gel de agarosa (1,5%) en buffer TBE 1X, coloreado con bromuro de etidio. El carril 1 corresponde al marcador de tamaño molecular de 100 pb; los carriles del 2-10 a muestras de individuos negativos para *P. falciparum*, el carril 4 corresponde a un individuo positivo para *P. falciparum* (273 pb); el carril 11 al control negativo (mezcla de reacción sin ADN) y el 14 al control positivo (*P. falciparum*, ADN de individuo infectado).

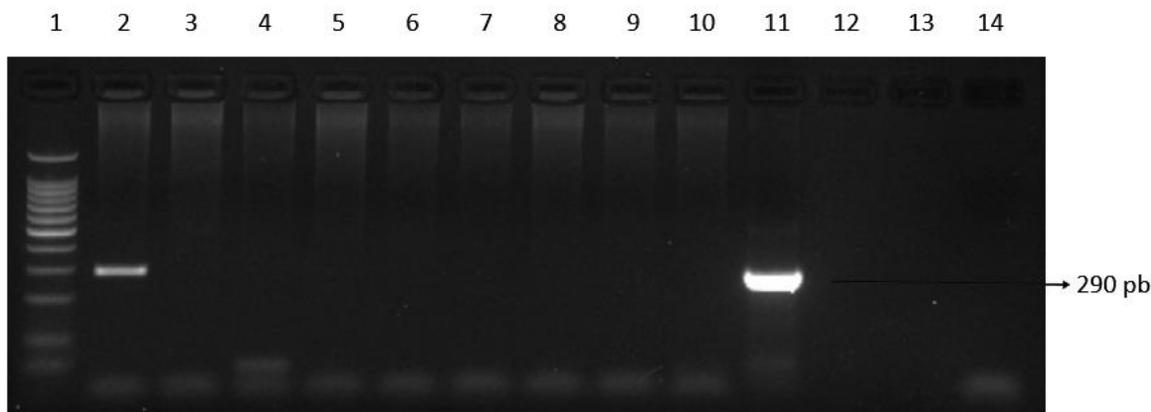


Figura 6. Visualización de los productos amplificados de PCR correspondiente al gen citocromo c oxidasa de *Plasmodium vivax* (*coxI*), en gel de agarosa (1,5%) en buffer TBE 1X, coloreado con bromuro de etidio. El carril 1 corresponde al marcador de tamaño molecular de 100 pb; el carril 2 a una muestra de un individuo positivo para *P. vivax* (290 pb); los carriles del 3-10 corresponden a muestras de individuos negativos para *P. vivax*; el carril 11 al control positivo (*P. vivax*, ADN de individuo infectado) y el carril 14 el control negativo (mezcla de reacción sin ADN).

Prevalencia molecular de la infección malárica.

La prevalencia de la malaria en la población de estudio fue de 19,09%, en que 11,82% de los casos eran infecciones por *P. vivax*, 4,55% por *P. falciparum* y un 2,73% infecciones mixtas (*P. vivax* + *P. falciparum*) (Tabla 7).

Tabla 7. Prevalencia molecular de infecciones maláricas en la comunidad Santa Lucía de Inaway.

Especies	Nº de personas evaluadas (n=110)
<i>P. vivax</i>	
Negativo	88,18 (97)
Positivo	11,82 (13)
<i>P. falciparum</i>	
Negativo	95,45 (105)
Positivo	4,55 (5)
<i>Pv + Pf</i>	
Negativo	97,27 (107)
Positivo	2,73 (3)

Nota: La frecuencia está expresada en porcentaje. Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de individuos.

En cuanto a la distribución de individuos infectados con *Plasmodium* spp., agrupados de acuerdo a la edad, se observó que la mayor proporción de infectados se encontraba dentro del grupo escolar (38,10%), sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente significativa (Tabla 8). Asimismo, se observó que 52,38% de los infectados eran del sexo femenino y un 47,62% del sexo masculino.

Tabla 8. Frecuencia de individuos infectados y no infectados, de la comunidad de Santa Lucía de Inaway, agrupados por grupos etarios.

Grupos etarios	Infectados* (n=21)	No infectados* (n=89)
Escolar	38,10 (8)	28,09 (25)
Adolescentes	23,81 (5)	19,10 (17)
Adultos jóvenes	19,05 (4)	33,71 (30)
Adultos contemporáneos	14,29 (3)	15,73 (14)
Adultos mayores	4,76 (1)	3,37 (3)

Nota: La frecuencia está expresada en porcentaje. Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de individuos. *Individuos evaluados mediante diagnóstico molecular (PCR).

Al analizar la frecuencia de los individuos infectados con respecto al número de episodios maláricos, previamente presentados, el 19,05% manifestó no haber padecido infecciones previas, por lo tanto pudiesen considerarse casos de primo-infección, 52,38% habían padecido de 1 a 5 episodios maláricos, 9,52% entre 6 y 10 episodios y 19,05% más de 10 episodios maláricos previos.

Prevalencia molecular de la infección malárica en los individuos de la comunidad, agrupados de acuerdo con la condición clínica.

Al agrupar a los individuos infectados con *Plasmodium* spp. de acuerdo a la condición clínica, se observó que el 66,67% de los casos presentaban sintomatología compatible con malaria y 33,33% eran casos de infecciones asintomáticas (Tabla 9). En el grupo de asintomáticos, 42,86% (3/7) eran mono-infecciones por *P. vivax* y 57,14% (4/7) por *P. falciparum*.

Tabla 9. Prevalencia de la infección por *Plasmodium* spp., en los individuos de la comunidad de Santa Lucía de Inaway, clasificados de acuerdo a la condición clínica.

Especies	Sintomáticos	Asintomáticos	Total
<i>P. vivax</i>	10	3	13
<i>P. falciparum</i>	1	4	5
Infecciones mixtas (Pv + Pf)	3	0	3
Con Infecciones maláricas	14	7	21
Sin infecciones	55	34	89
Total	69	42	110

Nota: Se indica el número de individuos

Al establecer comparaciones entre individuos mono-infectados con *P. vivax* e individuos mono-infectados con *P. falciparum*, agrupados de acuerdo con la presencia o ausencia de sintomatología, se observó una mayor frecuencia de pacientes sintomáticos mono-infectados con *P. vivax* con respecto a pacientes mono-infectados con *P. falciparum* (55,56% vs. 5,56%, respectivamente; OR = 13,3; IC 95% = 1,05-169,53; p = 0,01).

Seroprevalencia de Plasmodium vivax en individuos de la comunidad de Santa Lucía de Inaway.

La presencia de anticuerpos IgG anti-PvMSP-1₁₉ de *P. vivax* se determinó en los sueros de 110 individuos, mediante ELISA indirecto. De los individuos evaluados, 47,27% de los individuos presentaron anticuerpos IgG (positivos, IR>1) contra la proteína PvMSP-1₁₉ y 52,73% no presentaron dichos anticuerpos (negativos, IR<1) (Tabla 10).

Tabla 10. Seroprevalencia de anticuerpos anti-PvMSP-1₁₉ en los individuos de la comunidad de Santa Lucía de Inaway.

Especie	Nº de personas evaluadas (n=110)
<i>P. vivax</i>	
Negativo (IR<1)	52,73 (58)
Positivo (IR>1)	47,27 (52)

Nota: La frecuencia está expresada en porcentaje. Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de individuos. IR: índice de reactividad.

En la figura 7 se visualiza la respuesta de anticuerpos IgG, expresada como índice de reactividad (IR), contra la proteína PvMSP-1₁₉ en los individuos evaluados.

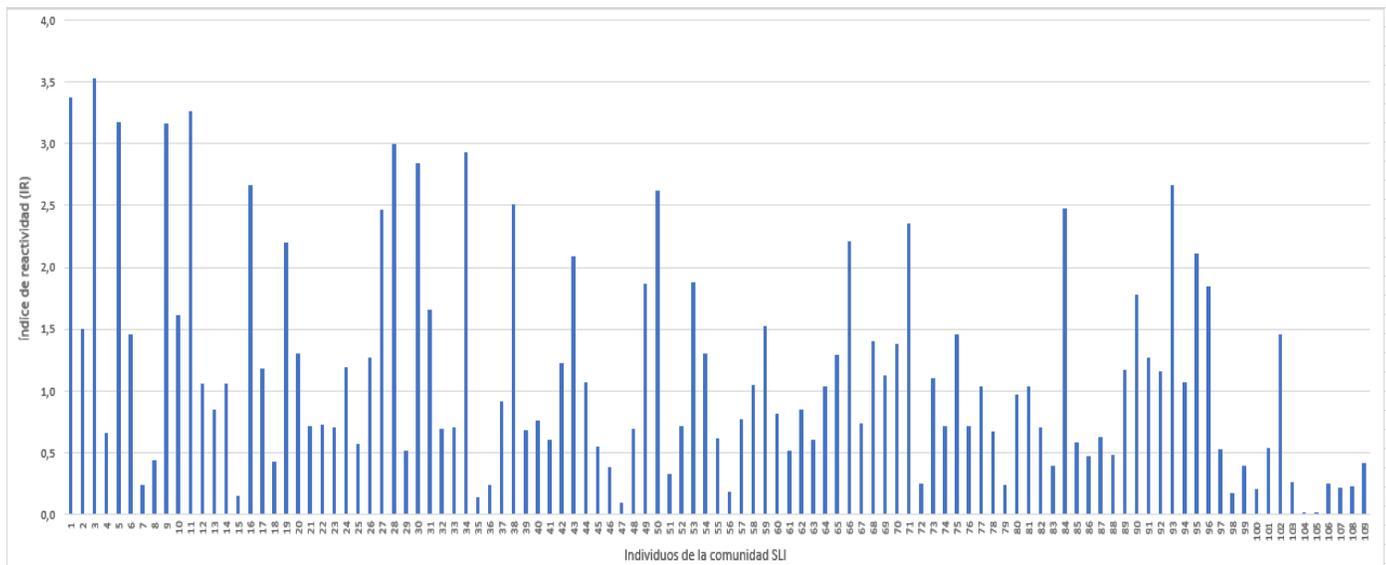


Figura 7. Respuesta de anticuerpos IgG contra la proteína PvMSP-1₁₉, expresada como índice de reactividad (IR), en individuos de la comunidad de Santa Lucía de Inaway. Se

considera una respuesta IgG positiva contra la proteína PvMSP-1₁₉ cuando el índice de reactividad es mayor a uno (>1). Punto de corte: 0,248.

Al evaluar la frecuencia de los individuos seropositivos contra PvMSP-1₁₉ en los diferentes grupos etarios, se observó una mayor seroprevalencia en el grupo de adultos jóvenes (28,85%), seguido por escolares (25%) (Tabla 11). Además, en cuanto a la distribución por sexo, las mujeres presentaron una mayor seroprevalencia (73,08%) con respecto a los hombres (26,92%).

Tabla 11. Seroprevalencia de anticuerpos IgG anti-PvMSP-1₁₉ en individuos de la comunidad de Santa Lucía de Inaway, agrupados por grupos etarios.

Grupos etarios	Seropositivos PvMSP-1₁₉ (n=52)	Seronegativos PvMSP-1₁₉ (n=58)
Escolar	25,00 (13)	34,48 (20)
Adolescentes	19,23 (10)	20,69 (12)
Adultos jóvenes	28,85 (15)	32,76 (19)
Adultos contemporáneos	19,23 (10)	12,07 (7)
Adultos mayores	7,69 (4)	0

Nota: La frecuencia está expresada en porcentaje. Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de individuos.

En relación a los episodios maláricos previos en los individuos seropositivos contra PvMSP-1₁₉, el 9,62% de los casos había manifestado no haber presentado episodios previos (sin antecedentes maláricos), mientras que 57,69% manifestó haber padecido de 1 a 5 episodios maláricos, 17,31% entre 6 y 10 episodios y 15,39% más de 10 episodios maláricos.

Seroprevalencia de Plasmodium falciparum en individuos de la comunidad Santa Lucía de Inaway.

La presencia de anticuerpos IgG anti GLURP-154 de *P. falciparum* se determinó en los sueros de 110 individuos, mediante ELISA indirecto. De los individuos evaluados, 28,18% individuos

presentaron anticuerpos IgG (positivos, IR>1) contra la proteína GLURP-154 y 71,82% no presentaron dichos anticuerpos (negativos, IR<1) (Tabla 12).

Tabla 12. Seroprevalencia de anticuerpos anti-GLURP-154 de *P. falciparum* en los individuos de la comunidad de Santa Lucía de Inaway.

Especie	Nº de personas evaluadas (n=110)
<i>P. falciparum</i>	
Negativo (IR<1)	71,81 (79)
Positivo (IR>1)	28,18 (31)

Nota: La frecuencia está expresada en porcentaje. Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de individuos. IR: índice de reactividad.

En la figura 8 se visualiza la respuesta de anticuerpos IgG, expresada como índice de reactividad (IR), contra la proteína GLURP-154 en los individuos evaluados.

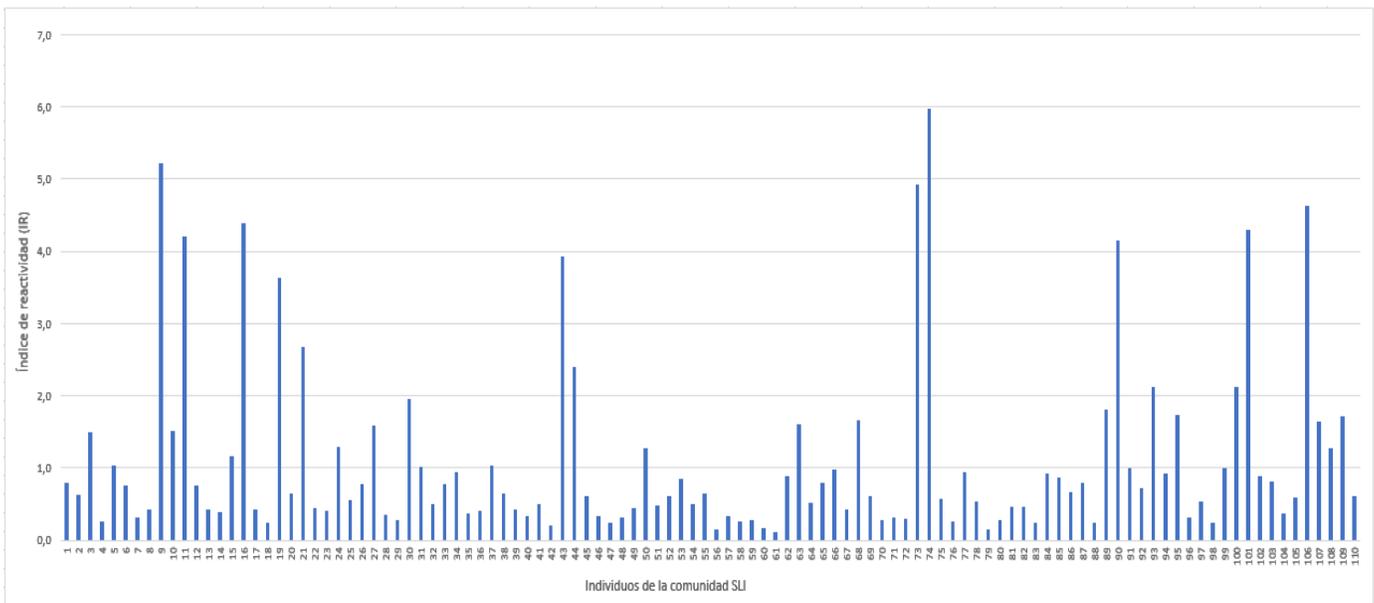


FIGURA 8. Respuesta de anticuerpos IgG contra la proteína GLURP-154, expresada como índice de reactividad (IR), en individuos de la comunidad de Santa Lucía de Inaway. Se considera una respuesta IgG positiva contra la proteína GLURP-154 cuando el índice de reactividad es mayor a uno (>1). Punto de corte: 0,199.

Al evaluar la frecuencia de los individuos seropositivos contra GLURP-154 en los diferentes grupos etarios, se observó una mayor seroprevalencia en el grupo de adultos jóvenes (38,71%), seguido por adultos contemporáneos (25,81%) (Tabla 13). Asimismo, en cuanto a la distribución por sexo, las mujeres presentaron una mayor seroprevalencia (80,65%) con respecto a los hombres (19,35%).

Tabla 13. Seroprevalencia de anticuerpos IgG anti-GLURP-154 en individuos de la comunidad de Santa Lucía de Inaway, agrupados por grupos etarios.

Grupos etarios	Seropositivos GLURP-154	Seronegativos GLURP-154
	(n=31)	(n=79)
Escolar	22,58 (7)	32,91 (26)
Adolescentes	9,68 (3)	24,05 (19)
Adultos jóvenes	38,71 (12)	27,85 (22)
Adultos contemporáneos	25,81 (8)	11,39 (9)
Adultos mayores	3,23 (1)	3,80 (3)

Nota: La frecuencia está expresada en porcentaje. Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de individuos.

Con respecto a los episodios maláricos previos en los individuos seropositivos contra GLURP-154, el 3,23% de los casos había manifestado no haber presentado episodios previos (sin antecedentes maláricos), mientras que 67,74% manifestó haber padecido de 1 a 5 episodios maláricos, 12,90% entre 6 y 10 episodios y 16,13% más de 10 episodios maláricos.

Seroprevalencia de la malaria en los individuos de la comunidad Santa Lucía de Inaway, agrupados de acuerdo con la condición clínica.

En la tabla 14 se muestra la prevalencia de anticuerpos IgG anti-PvMSP-1₁₉ de *P. vivax* y anti-Glurp-154 de *P. falciparum* en los individuos de la comunidad de Santa Lucía de Inaway, agrupados de acuerdo con la condición clínica (sintomáticos y asintomáticos). Entre el grupo de

individuos con sintomatología compatible con la malaria, 84,06% fueron seropositivos para anticuerpos anti-*Plasmodium*. Además, 60,97% de los asintomáticos presentaron anticuerpos anti-*Plasmodium*.

Tabla 14. Seroprevalencia de anticuerpos IgG anti-*Plasmodium* en individuos sintomáticos y asintomáticos de la comunidad de Santa Lucía de Inaway.

	Condición Clínica	
	Sintomáticos (n=69)	Asintomáticos (n=41)
<i>Plasmodium vivax</i> <i>PvMSP-119</i>	52,17 (36)	39,02 (16)
<i>Plasmodium falciparum</i> GLURP-154	31,88 (22)	21,95 (9)
Total	84,05 (58)	60,97 (25)

Nota: La frecuencia está expresada en porcentaje. Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de individuos.

Determinación del polimorfismo del gen DARC en los individuos con PCR y serología positiva para Plasmodium vivax.

En la Figura 9 se muestra un ejemplo de la visualización del producto amplificado correspondiente a uno de los alelos del gen *DARC* (*FYB*: 711 pb) y al control interno (*ABO*: 419 pb). Con respecto a los otros alelos, *FYA* y *FY* igualmente se visualizó la correspondiente banda de 711 pb y el control interno (*ABO*: 419 pb).

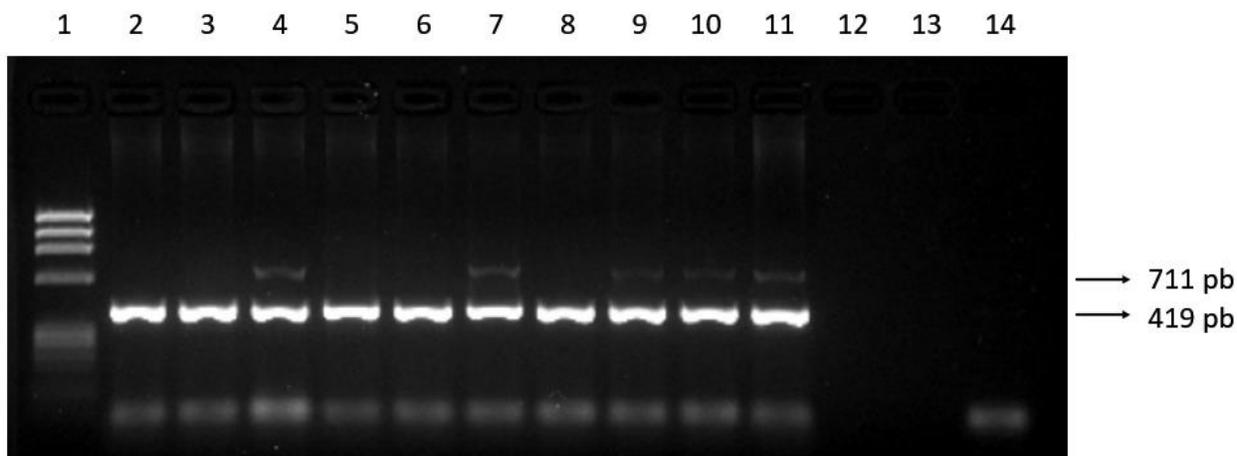


Figura 9. Visualización de los productos amplificados de PCR correspondiente al alelo *FYB* del gen *DARC*, en gel de agarosa (1,5%) en buffer TBE 1X, coloreado con bromuro de etidio. El carril 1 corresponde al marcador de tamaño molecular de 100 pb; los carriles 2-10 corresponden a muestras de individuos con el alelo *FYBb* (711 pb), en estos también se observó la presencia de la banda correspondiente al control interno *ABO* (419 pb); el carril 11 no corresponde a ninguna muestra y el carril 12 al control negativo (mezcla de reacción sin ADN).

Frecuencia genotípica del gen DARC

De las 110 muestras evaluadas, solo se determinó la variabilidad del gen *DARC* en 45 individuos que, por diagnóstico molecular y serológico, eran *P. vivax* positivos. Al realizar el análisis genotípico del grupo sanguíneo Duffy, observamos que estaban presentes cinco genotipos (*FYA/FYA*, *FYB/FYB*, *FYA/FYB*, *FYA/FY*, *FYB/FY*). El genotipo heterocigoto *FYA/FYB* presentó la mayor frecuencia (80,00%), seguido por los genotipos *FYB/FY* (6,67%), *FYA/FY* (6,67%), *FYA/FYA* (4,44%) y *FYB/FYB* (2,22%). Con respecto a las frecuencias alélicas del gen *DARC*, se observó una mayor frecuencia del alelo *FYA* (47,77%), seguido por el alelo *FYB* (45,55%) y el alelo *FY* (6,68%) (Tabla 15).

Tabla 15. Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas del gen *DARC* en individuos infectados con *P. vivax*.

Genotipo	Individuos infectados con <i>P. vivax</i> (n=45)
<i>FYA/FYA</i>	4,44% (2)
<i>FYA/FYB</i>	80,00% (36)
<i>FYA/FY</i>	6,67% (3)
<i>FYB/FYB</i>	2,22% (1)
<i>FYB/FY</i>	6,67% (3)
<i>FY/FY</i>	0
Alelos	
<i>FYA</i>	47,77% (43)
<i>FYB</i>	45,55% (41)
<i>FY</i>	6,68% (6)

NOTA. La frecuencia está expresada en porcentajes. Los valores entre paréntesis muestran el número de individuos con el genotipo o el número de veces que se repite el alelo.

Correlaciones entre los distintos parámetros estudiados.

Cabe destacar que al correlacionar la variabilidad del gen *DARC* con el índice de reactividad de los Anticuerpos IgG contra *P. vivax* en los individuos *P. vivax* positivos (n=45) no se observaron correlaciones significativas. Sin embargo, al correlacionar las distintas variables demográficas, epidemiológicas y clínicas consideradas en el estudio en los individuos de la comunidad de Santa Lucía de Inaway, se obtuvieron algunas correlaciones significativas, las cuales se resaltan en negrita (Tabla 16).

Tabla 16. Correlaciones entre los distintos parámetros estudiados en los individuos de la comunidad de Santa Lucía de Inaway (n=110).

Parámetros de la correlación	<i>r</i>	Valor de <i>p</i>	Correlación
Antecedentes maláricos con sintomatología	0,209	0,014	Negativa

Infección por <i>P. vivax</i> con sintomatología	0,158	0,050	Positiva
Infección por <i>P. falciparum</i> con sintomatología	0,070	0,233	Negativa
Tiempo viviendo en el área con N° de episodios maláricos <i>P. vivax</i>	0,313	0,000	Positiva
Tiempo viviendo en el área con N° de episodios maláricos <i>P. falciparum</i>	0,089	0,175	Positiva
Tiempo viviendo en el área con sintomatología	0,034	0,363	Negativa
Ingestión de antimaláricos con N° de episodios maláricos <i>P. vivax</i>	0,202	0,017	Negativa
Ingestión de antimaláricos con N° de episodios maláricos <i>P. falciparum</i>	0,026	0,395	Negativa
Ingestión de antimaláricos con antecedentes maláricos	0,792	0,000	Positiva
Anticuerpos anti-<i>P. falciparum</i> con antecedentes maláricos	0,168	0,039	Positiva
Anticuerpos anti- <i>P. vivax</i> con antecedentes maláricos	0,036	0,353	Positiva
Anticuerpos anti- <i>P. falciparum</i> con sintomatología	0,075	0,217	Positiva
Anticuerpos anti- <i>P. vivax</i> con sintomatología	0,137	0,076	Positiva
Anticuerpos anti-<i>P. falciparum</i> con infección por <i>P. falciparum</i>	0,193	0,021	Positiva
Anticuerpos anti- <i>P. vivax</i> con infección por <i>P. vivax</i>	0,129	0,089	Positiva
Uso de mosquitero con tiempo viviendo en el área	0,026	0,392	Negativa
Uso de repelentes con tiempo viviendo en el área	0,011	0,454	Positiva

Uso de repelentes con antecedentes maláricos	0,076	0,215	Negativa
Rociamientos intradomiciliarios con tiempo viviendo en el área	0,103	0,141	Negativa
Ingestión de antimaláricos con sintomatología	0,151	0,057	Negativa
Ingestión de antimaláricos con infección por <i>P. vivax</i>	0,116	0,114	Negativa
Ingestión de antimaláricos con infección por <i>P. falciparum</i>	0,014	0,441	Positiva
Uso de mosquitero con N° de episodios maláricos <i>P. falciparum</i>	0,050	0,299	Negativa
Uso de mosquitero con N° de episodios maláricos <i>P. vivax</i>	0,009	0,462	Negativa
N° de episodios maláricos <i>P. vivax</i> con sintomatología	0,061	0,264	Negativa
N° de episodios maláricos <i>P. falciparum</i> con sintomatología	0,100	0,148	Positiva
Rociamiento intradomiciliario con N° de episodios maláricos <i>P. vivax</i>	0,014	0,443	Negativa
Rociamiento intradomiciliario con N° de episodios maláricos <i>P. falciparum</i>	0,112	0,121	Negativa

DISCUSIÓN

La malaria es uno de los problemas de salud pública más importantes en términos de morbilidad y mortalidad, causando más de 200 millones de casos y 655000 muertes cada año (Autino y col., 2012). La epidemiología de la malaria puede verse afectada por la interacción entre factores humanos (edad, inmunidad, estado nutricional), climáticos (temperatura y humedad) y biológicos (vectores, parásitos) que contribuyen al establecimiento de la infección en áreas endémicas (Revisado en Rodulfo y col., 2007a). En el caso del municipio Sifontes del Estado Bolívar, Venezuela, ha sido suficientemente documentado que la malaria está claramente asociada a la minería artesanal de oro, actividad que combina la presencia de personas susceptibles, provenientes de áreas no endémicas, presencia de mosquitos vectores y alteración medioambiental (Revisado en Moreno y col., 2014). Debido a que la malaria persiste como uno de los grandes problemas de salud pública en Venezuela, planteamos caracterizar por epidemiología serológica y molecular la malaria en la comunidad de Santa Lucía de Inaway, Estado Bolívar, Venezuela

Prevalencia molecular y serológica de la malaria en individuos de la comunidad Santa Lucía de Inaway

La comunidad Santa Lucía de Inaway es un área de alta transmisión malárica y esto se evidenció con los resultados obtenidos en el presente estudio. En dicha comunidad la prevalencia parasitológica de la infección malárica fue 3,73%, muy similar a la prevalencia descrita en el estado Sucre (3,2%) (Sojo, M., 2011), indicando que estos individuos presentaban una parasitemia detectable. No obstante, la prevalencia parasitaria por PCR fue casi tres veces mayor

que la prevalencia por microscopía, relación anteriormente descrita por otros autores en ambientes rurales de Gambia, Guinea-Biseseau y Brasil (Revisado en Sojo, M., 2011).

Aunque la microscopía es el método de referencia y el más utilizado para el diagnóstico de *Plasmodium* spp, su sensibilidad y especificidad son limitados. Algunos investigadores sugieren que la mayor desventaja del diagnóstico microscópico es la posibilidad de un diagnóstico erróneo de especies de *Plasmodium*, particularmente en casos de baja parasitemia, infecciones mixtas y cuando solo se ven las formas anulares del parásito (Rodulfo y col., 2007a). Esto concuerda con el presente estudio, donde el 50% de los casos positivos por microscopía fueron negativos por PCR.

En el presente estudio, la prevalencia molecular fue de 19,09%, en que 11,82% de los casos eran infecciones por *P. vivax*, 4,55% por *P. falciparum* y un 2,73% infecciones mixtas (*P. vivax* + *P. falciparum*). Hallazgos similares han sido descritos, a nivel regional, en comunidades indígenas pertenecientes a la región del Caura (Bevilacqua y col., 2005), así como en áreas endémicas para malaria en el país (Rodulfo y col., 2007b), observándose en estas comunidades una prevalencia de *Plasmodium vivax* de 72% y 22,37%, respectivamente. Además, *Plasmodium vivax* ha sido la especie predominante a lo largo de los años en el país, muy particularmente en el municipio Sifontes, del Estado Bolívar (Revisado en Moreno y col., 2014).

Al analizar la distribución de individuos infectados con *Plasmodium* spp., agrupados de acuerdo a la edad, se observó una mayor prevalencia en niños en edad escolar (5-12 años), en concordancia con los estudios de Rodulfo y colaboradores (Rodulfo y col., 2007b) y Marcano y colaboradores (Marcano y col., 2004), quienes observaron una alta prevalencia de malaria en niños menores de 10 años. En áreas endémicas, los niños suelen ser los más afectados por la enfermedad con respecto a los adolescentes, esto debido a que en la adolescencia los individuos

han desarrollado inmunidad protectora contra la infección (Howes y col., 2016). Sin embargo, tanto los niños como los adultos tienen la misma probabilidad de ser picados por los anofelinos y, por ende, ser infectados por *Plasmodium* spp. (Rodulfo y col., 2007b).

Con respecto al número de episodios maláricos, se detectaron por diagnóstico molecular 19,05% casos de primo-infección, mientras que 80,95% de los individuos de la comunidad habían padecido por lo menos un episodio malárico previamente. En concordancia, con los resultados descritos por Rodulfo y colaboradores, donde el 50% de los individuos infectados presentaron dos o más episodios maláricos previos (Rodulfo y col., 2007b).

Al agrupar a los individuos infectados con *Plasmodium* spp. de acuerdo a la condición clínica, se observó que el 66,67% de los casos presentaban sintomatología compatible con malaria y 33,33% eran casos de infecciones asintomáticas. Aunque se desconoce por qué algunos individuos desarrollan manifestaciones clínicas durante la infección por *Plasmodium*, mientras otros siguen siendo asintomático, se sabe que el estado de salud, así como la condición fisiológica del hospedador, particularmente la inmunidad junto con la predisposición genética y los factores parasitarios implicados en la virulencia de la infección, pueden influir en la progresión de la infección de la malaria hacia un resultado asintomático (Galatas y col, 2016).

La proporción de infecciones asintomáticas puede variar considerablemente en situaciones endémicas. En el presente estudio, se observó una mayor prevalencia de infecciones asintomáticas en el grupo de niños en edad escolar (41,46%). Se ha descrito que personas de todas las edades y con distintos patrones de exposición a la malaria pueden presentar parasitemia asintomática, lo cual puede deberse a factores del parásito y del hospedador, además, de la inmunidad del hospedador (Howes y col., 2016). Los casos de malaria asintomática son de gran importancia epidemiológica, ya que estos individuos representan una fuente oculta de infección

activa, que permite la persistencia y eventual propagación de la malaria a otros hospedadores humanos (Revisado en Galatas y col., 2016). En vista de esto, el diagnóstico molecular es un método útil para identificar bajas parasitemias, frecuentemente asintomáticas, que pueden no ser detectadas por métodos estándar, pero que pueden transmitirse y causar brotes clínicos (Revisado por Veloz, E., 2015). Asimismo, observamos una mayor frecuencia de pacientes sintomáticos mono-infectados con *P. vivax* con respecto a pacientes mono-infectados con *P. falciparum* (55,56% vs. 5,56%, respectivamente; OR = 13,3; IC 95% = 1,05-169,53; p = 0,01), indicando que los individuos mono-infectados con *P. vivax* tienen 13 veces más posibilidades de manifestar síntomas clínicos. La mayor parte de la literatura de investigación se centra en el estudio de *P. falciparum* y en menor medida de *P. vivax*. Este enfoque se debe a la gran carga de mortalidad atribuida a las infecciones por *P. falciparum* en África. Sin embargo, cada vez hay más pruebas de que *P. vivax* es responsable de una importante carga de morbilidad a nivel mundial, que representa la mitad de todos los casos de malaria en Asia y América Latina. El término "malaria benigna" implica que el paludismo por *P. vivax*, generalmente, es una enfermedad no complicada que tiene un curso benigno y rara vez es fatal. Este paradigma clínico ha sido cuestionado recientemente por numerosos casos con síntomas y signos de enfermedad severa, atribuyéndose incluso muertes por mono-infecciones de *P. vivax* (Genton y col., 2008). Entre estos estudios de malaria severa por *P. vivax* se resaltan los publicados en países como Tailandia, Brasil, Indonesia, Papúa Nueva Guinea y la India. Las complicaciones relacionadas con la malaria más frecuentes en países endémicos para *P. vivax* son la anemia severa y la dificultad respiratoria aguda. Además, se ha observado que, en áreas endémicas, la terapia inadecuada y los episodios recurrentes pueden inducir una mayor morbilidad y casos severos de malaria por *P. vivax* (Naing y col., 2014).

Estudios previos han demostrado que los métodos serológicos para el diagnóstico de la malaria se pueden considerar como una herramienta eficaz en estudios epidemiológicos y programas de prevención de la malaria, ya que estos métodos pueden detectar la exposición previa o el contacto de los individuos con el parásito *Plasmodium*. La medición de la prevalencia de anticuerpos contra la malaria (seroprevalencia) es un enfoque valioso para definir el estado de la transmisión de la malaria en un área determinada y también un método útil para la vigilancia de la enfermedad (Hatam y col., 2015). La infección por malaria impone una "huella" de anticuerpos que, en contraste con la esperanza de vida del vector o la vida media de las infecciones discretas, persisten marcadamente más tiempo, lo que sugiere que las tasas de seroprevalencia podrían proporcionar una herramienta confiable para evaluar la endemidad de la malaria (Folegatti y col., 2017).

El 80,95% de los individuos de la comunidad de Santa Lucía de Inaway, manifestaron que habían padecido previamente por lo menos un episodio malárico y esto se corroboró con la alta prevalencia de anticuerpos anti-*Plasmodium* encontrados en el diagnóstico serológico (47,27% para *P. vivax* y 28,18% para *P. falciparum*), lo cual puede relacionarse con la alta tasa de transmisión de la malaria en la comunidad Santa Lucía de Inaway. La persistencia de anticuerpos IgG refleja la memoria del sistema inmunológico, por ende, es considerado un buen indicador para el monitoreo del contacto con el parásito (Sojo, M., 2011). Adicionalmente, se considera que varios factores, tales como la edad del paciente, la duración de la infección, la exposición previa con el parásito y la intensidad de la infección, influyen en la presencia y la respuesta de anticuerpos (Sánchez y col., 1990).

Resultados serológicos similares fueron encontrados en otros estudios. Sánchez y colaboradores (1990) describieron una elevada prevalencia de anticuerpos IgG contra *P.*

falciparum (91.2%) en amerindios del Amazonas venezolano. Por otro lado, Soares y colaboradores (1999) evaluaron la respuesta de anticuerpos IgG contra PvMSP-1₁₉ en individuos del pueblo de Cotijuba, Brazil, observándose una prevalencia de 42.3%. Adicionalmente, observaron que la presencia de anticuerpos contra PvMSP-1₁₉ al parecer estaba relacionada con episodios previos de malaria, aseverando que, la proteína PvMSP-1₁₉ es altamente inmunogénica durante las infecciones por *P. vivax*. Un resultado similar fue observado en la comunidad de Santa Lucia de Inaway, en la que el 90,39% de los individuos, que manifestaron haber padecido episodios maláricos previos, presentaron un índice de reactividad positivo contra PvMSP-1₁₉.

Asimismo, el 60,98% de los individuos seropositivos para anticuerpos anti-*Plasmodium* (IgG anti-PvMSP-1₁₉ de *P. vivax* y anti-Glurp-154 de *P. falciparum*) no presentaban sintomatología compatible con la malaria (asintomáticos). Estos casos seropositivos asintomáticos pueden ser un gran desafío para la eliminación de la malaria en cualquier área endémica, ya que algunos de estos casos pudieran presentar parásitos, aunque a un nivel muy bajo, y actuar, así como fuente de infección por *Plasmodium* (Hatam y col., 2015).

Distribución de frecuencia de los alelos del gen DARC en individuos Plasmodium vivax positivos.

Los polimorfismos del grupo sanguíneo *Duffy* son importantes en áreas donde predomina *P. vivax*, ya que esta molécula actúa como un receptor para este protozooario (pero no para las otras especies del parásito de la malaria) en la superficie de los glóbulos rojos (Cavasini y col., 2007).

En cuanto a la distribución global del gen *DARC*, se ha visto una alta heterogeneidad alélica en el continente Americano, con prevalencia de los tres alelos. El alelo *FYA* es altamente

frecuente en el sureste de Asia, incluyendo aquellas áreas donde existe una alta endemicidad de *P. vivax*. El alelo *FYB* es el menos prevalente a nivel mundial, con la mayor frecuencia registrada en Europa y partes de América. Por otro lado, el alelo *FY* se encuentra altamente fijado en la región del África subsahariana, con frecuencias mayores al 90% (Revisado en Howes y col., 2011).

En el estudio del polimorfismo del gen *DARC*, se observó una mayor frecuencia de los alelos *FYA* (47,77%) y *FYB* (45,55%) en los individuos *P. vivax* positivos evaluados, en contraste con el alelo *FY* (silente) que estuvo presente en menor frecuencia (6,68%). Estos resultados son semejantes a los descritos por Layrisse y colaboradores (1962), quienes evaluaron los distintos grupos sanguíneos de sub-tribus de la etnia Pemón (Tauperan, Arecuna y Camaracoto), encontrando para el sistema Duffy una frecuencia de 72.98% para el alelo *FYA* y 27.02% para el *FYB*. Por otra parte, Cavasini y colaboradores (2007) genotipificaron el gen *DARC* en pacientes infectados con *P. vivax* de distintas áreas endémicas del Amazonas Brasileiro, observando que el genotipo *FYA/FYB* era el más común, seguido por los genotipos homocigotos *FYB* y *FYA* y por los genotipos heterocigotos *FYA/FY* y *FYB/FY*, presentando el genotipo *FY/FY* una menor frecuencia en la población (3,2%). Algunos estudios afirman que la presencia del alelo mutado *FY* da como resultado una reducción del 50% en la expresión de la proteína Duffy en la superficie de los eritrocitos, pudiendo limitar la invasión de los glóbulos rojos por el parásito. Por lo tanto, los genotipos heterocigóticos Duffy-negativos parecen ser menos susceptibles a la malaria por *P. vivax* (Revisado en Cavasini y col., 2007). Sin embargo, en nuestro estudio los datos obtenidos no avalan la hipótesis de que la heterocigosidad para el alelo nulo *FY* confiere cierta protección, debido a que observamos una mayor frecuencia de individuos infectados con genotipos heterocigoto, *FYB/FY* (6,67%) y *FYA/FY* (6,67%), con respecto a los

genotipos homocigotos, *FYA/FYA* (4,44%) y *FYB/FYB* (2,22%). Por lo tanto, se debe tomar en consideración que el número de muestras evaluadas fue reducido (n=45), por lo que convendría analizar los individuos restantes a fin de poder obtener frecuencias genotípicas más representativas del gen *DARC* de la comunidad de Santa Lucía de Inaway. Por otra parte, la alta frecuencia del genotipo *FYA/FYB* en los individuos infectados parece indicar que la condición de heterocigosis de dichos alelos favorece la infección malárica por *P. vivax*.

Varios estudios caso-control han corroborado este planteamiento, encontrándose altas prevalencias del genotipo *FYA/FYB* en pacientes infectados con *P. vivax* (Cavasini y col., 2006; Cavasini y col., 2007; Albuquerque y col., 2010; Miri-Moghaddam y col., 2014). Esto probablemente debido a que el genotipo heterocigoto expresa en mayor medida la glucoproteína Fy (Duffy), la cual es requerida para la invasión eritrocítica de *P. vivax*, como lo demostró Woolley y colaboradores (Woolley y col., 2000).

Correlaciones entre los distintos parámetros estudiados.

Al correlacionar la variabilidad del gen *DARC* y el índice de reactividad de los anticuerpos IgG contra *P. vivax* no se observó ningún tipo de correlación. Sin embargo, se observó una correlación negativa entre los antecedentes maláricos y la sintomatología de la enfermedad, esto posiblemente debido a la adquisición de la inmunidad natural contra la malaria en áreas de alta y estable transmisión. La inmunidad adquirida debido a una exposición repetida reduce el riesgo de presentar síntomas graves de malaria. Por lo tanto, la malaria asintomática podría ser una consecuencia de la inmunidad natural (Laishram y col., 2012). La inmunidad natural protege contra la malaria clínica (inmunidad clínica), no contra la infección, condicionando lo que se llama “premunición” la cual puede ser adquirida después de años de exposición repetida al parásito, ésta se caracteriza por infección asintomática con parasitemia subpatente (Suárez-Mutis

y col., 2007). La inmunidad clínica a la malaria puede adquirirse durante tres fases: inmunidad a la enfermedad, inmunidad a la infección sintomática e inmunidad parcial a la parasitemia. La premunición (ausencia de fiebre con infección y bajas densidades de parasitemia) está presente en lugares donde la malaria es endémica y en personas que han sufrido varias infecciones a través de los años (8-15 años), adquiriendo así respuestas inmunitarias que reducen el riesgo de enfermedad clínica. El término fue acuñado a pacientes de áreas endémicas, quienes controlaban la parasitemia y desarrollaban una infección sub-clínica. La premunición se caracteriza por adquirirse progresivamente, por presentarse en áreas holo o hiperendémicas, por perderse rápidamente, ser dependiente de las cepas, dependientes de IgG y estar dirigidas hacia parásitos en etapa sanguínea. Si bien la respuesta inmunitaria inducida es fuerte, no es una inmunidad esterilizante. Aunque, el mecanismo de protección no ha sido completamente descrito, hay evidencia que los anticuerpos citofílicos y las células de memoria producidas después de infecciones repetidas son las responsables de este tipo de protección. (López y col., 2017).

Por otro lado, las infecciones por *P. vivax* se correlacionaron positivamente con la sintomatología de la enfermedad. Esto probablemente se deba al hecho de que, en nuestro estudio, el grupo de niños en edad escolar fue el más afectado por las infecciones por *P. vivax*, siendo un grupo de riesgo para las manifestaciones clínicas de la malaria.

Adicionalmente, cabe destacar que las recaídas producto de la activación de los hipnozoítos de *P. vivax* pueden ser el origen de la mayoría de las manifestaciones clínicas en las infecciones por dicha especie. Los hipnozoítos causan ataques clínicos múltiples a partir de una sola picadura de un mosquito infectado con *P. vivax*. Por el contrario, la infección por *P. falciparum* produce una única infección. En otras palabras, la “infección” como un evento es

singular y clara en *P. falciparum*, mientras que en el caso de *P. vivax* adquiere una pluralidad compleja y ambigua en el sentido epidemiológico (Howes y col., 2016).

La epidemiología de la malaria viene dada por un conjunto complejo de características y patrones. Siendo altamente heterogénea entre entornos y poblaciones, influenciada además por una gran cantidad de características, incluyendo las especies de los mosquitos vectores, la intensidad de transmisión, recaídas, factores de riesgo del hospedador, disponibilidad y eficacia del tratamiento, desnutrición, prevalencia de comorbilidades, entre otros (Howes y col., 2016).

El presente estudio epidemiológico de la comunidad de Santa Lucía de Inaway sirve como referencia para dar a conocer la dinámica de la malaria en el área, siendo actualmente un grave problema de salud pública en el país que amerita mayor atención en el sistema de vigilancia y control por parte de las autoridades locales.

CONCLUSIONES

1. La prevalencia molecular de *Plasmodium* spp. en la comunidad de Santa Lucía de Inaway fue del 19,09%, mientras que las prevalencias de *P. vivax* y *P. falciparum* fueron de 11,82% y 4,55%, respectivamente.
2. La seroprevalencia de *Plasmodium* spp. en la comunidad de Santa Lucía de Inaway fue del 75,45%, mientras que las prevalencias de *P. vivax* y *P. falciparum* fueron de 47,27% y 28,18%, respectivamente.
3. El análisis clínico de las personas infectadas con *Plasmodium* spp. demostró que el 33,33% de los individuos eran asintomáticos, donde 42,86% eran mono-infecciones por *P. vivax*, y 57,14% por *P. falciparum*.
4. La sintomatología depende de las especies de *Plasmodium*, observándose una mayor frecuencia de pacientes sintomáticos mono-infectados con *P. vivax* y una correlación positiva entre la infección por esta especie y la presencia de manifestaciones clínicas.
5. Las manifestaciones clínicas disminuyen con el incremento del número de episodios maláricos.
6. Este estudio demostró que la comunidad de Santa Lucía de Inaway representa un área endémica de malaria de alta transmisión.

BIBLIOGRAFÍA

- Albuquerque, S. R. L., de Oliveira Cavalcante, F., Sanguino, E. C., Tezza, L., Chacon, F., Castilho, L., y dos Santos, M. C. 2010. FY polymorphisms and vivax malaria in inhabitants of Amazonas State, Brazil. *Parasitology Research*, **106(5)**, 1049–1053.
- Alger, J. 1999. Diagnóstico Microscópico de la Malaria Gota Gruesa y Extendido Fino. *Rev Med Hond.* **67**, 216-218.
- Autino, B., Noris, A., Russo, R., y Castelli, F. 2012. Epidemiology of malaria in endemic areas. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, **4(1)**, e2012060.
- Becerril, M. 2011. Parasitología médica. McGraw-Hill, Tercera Edición, Distrito Federal, México.
- Bevilacqua M., D.A. Medina y L. Cárdenas. 2008. La malaria en poblaciones indígenas de la cuenca del río Caura, estado Bolívar Venezuela. Principales Hallazgos Período 2005-2007, Proyecto Wesoichay. ACOANA. Serie Publicaciones Divulgativas. Caracas.
- Botero, D., y Restrepo, M. 2012. Parasitosis humanas. Editorial CIB, Quinta edición, Medellín, Colombia.
- Brasil, P., Zalis, M. G., de Pina-Costa, A., Siqueira, A. M., Júnior, C. B., Silva, S., ... Daniel-Ribeiro, C. T. 2017. Outbreak of human malaria caused by Plasmodium simium in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. *The Lancet Global Health*, **5(10)**, 1038–1046.
- Bruce-Chwatt, L. J., Black, R. H. Canfield, C. J., Clyde, D. F., Peters, W., Wernsdorfer, W. H., World Health Organization. 1986. Chemotherapy of malaria. Revised Second Edition.
- Bunce M. 2000. "PCR-SSP typing in histocompatibility testing," in Bidwell and Navarrette C. Imperial Collage Press, London, UK.

- Cassiano, G. C., Furini, A. A., Capobianco, M. P., Storti-Melo, L. M., Almeida, M. E., Barbosa, D. R., Póvoa, M. M., Nogueira, P. A., y Machado, R. L. 2016. Immunogenetic markers associated with a naturally acquired humoral immune response against an N- terminal antigen of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 (PvMSP-1). *Malar J.* **15**, 1-11.
- Cavasini, C. E., Mattos, L. C. D., Alves, R. T., Couto, Á. A., Calvosa, V. S. P., Domingos, C. R. B., ... Machado, R. L. D. 2006. Frequencies of ABO, MNSs, and Duffy Phenotypes Among Blood Donors and Malaria Patients from Four Brazilian Amazon Areas. *Human Biology.* **78(2)**, 215–219.
- Cavasini, C. E., de Mattos, L. C., Couto, Á., Couto, V., Gollino, Y., Moretti, L. J., ... Machado, R. L. 2007. Duffy blood group gene polymorphisms among malaria vivax patients in four areas of the Brazilian Amazon region. *Malaria Journal.* **6(1)**, 167.
- Chaudhuri, A., Polyakova, J., Zbrzezna, V., Williams, K., Gulati, S., y Pogo, A. O. 1993. Cloning of glycoprotein D cDNA, which encodes the major subunit of the Duffy blood group system and the receptor for the *Plasmodium vivax* malaria parasite. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90(22)**, 10793–10797.
- Chaudhuri, A., Nielsen, S., Elkjaer, M-L., Zbrzezna, V., Fang, F., y Pogo, O. 1997. Detection of Duffy Antigen in the Plasma Membranes and Caveolae of Vascular Endothelial and Epithelial Cells of Nonerythroid Organs. *Blood.* **89(2)**, 701-712.
- Contreras, C. E., Pance, A., Marcano, N., González, N., y Bianco, N. 1999. Detection of specific antibodies to *Plasmodium falciparum* in blood bank donors from malaria-endemic and non-endemic areas of Venezuela. *Am J Trop Med Hyg.* **60(6)**, 948–953.
- Contreras, C. E., de Donato, M., Rivas, M. A., Rodulfo, H., Mora, R., Batista, M. E., y Marcano, N. 2011. Malaria seroprevalence in blood bank donors from endemic and non-endemic

- areas of Venezuela. *Mem I Oswaldo Cruz*. **106(2)**, 123–129.
- Cunha, M. G., Medina, T. S., Oliveira, S. G., Marinho, A. N., Póvoa, M. M., y Ribeiro-dos-Santos, A. K. C. 2009. Development of a Polymerase Chain Reaction (PCR) method based on amplification of mitochondrial DNA to detect *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Acta Trop*. **111(1)**, 35–38.
- De Mendonça, V. R., y Barral-Netto, M. 2015. Immunoregulation in human malaria: The challenge of understanding asymptomatic infection. *Mem I Oswaldo Cruz*. **110(8)**, 945–955.
- Dodoo, D., Theisen, M., Kurtzhals, J. A. L., Akanmori, B. D., Koram, K. A., Jepsen, S., ... Hviid, L. 2000. Naturally Acquired Antibodies to the Glutamate-Rich Protein Are Associated with Protection against *Plasmodium falciparum* Malaria. *J. Infect. Dis*. **181(3)**, 1202–1205.
- Duru, K. C., y Thomas, B. N. 2014. Genetic Diversity and Allelic Frequency of Glutamate-Rich Protein (GLURP) in *Plasmodium falciparum* Isolates from Sub-Saharan Africa. *Microbiology Insights*, **7**.
- Folegatti, P. M., Siqueira, A. M., Monteiro, W. M., Lacerda, M. V. G., Drakeley, C. J., y Braga, É. M. 2017. A systematic review on malaria sero-epidemiology studies in the Brazilian Amazon: insights into immunological markers for exposure and protection. *Malaria Journal*, **16(1)**.
- Galatas, B., Bassat, Q., y Mayor, A. 2016. Malaria Parasites in the Asymptomatic: Looking for the Hay in the Haystack. *Trends in Parasitology*, **32(4)**, 296–308.
- Genton, B., D'Acremont, V., Rare, L., Baea, K., Reeder, J. C., Alpers, M. P., y Müller, I. 2008. *Plasmodium vivax* and Mixed Infections Are Associated with Severe Malaria in Children: A Prospective Cohort Study from Papua New Guinea. *PLoS Medicine*, **5(6)**.

- Griffing, S. M., Villegas, L., y Udhayakumar, V. 2014. Malaria Control and Elimination, Venezuela, 1800s–1970s. *Emerg Infect Dis.* **20(10)**, 1691–1696.
- Hadley, T., y Peiper, S. 1997. From Malaria to Chemokine Receptor: The Emerging Physiologic Role of the Duffy Blood Group Antigen. *Blood.* **89(9)**, 3077–3092.
- Hatam, G. R., Nejati, F., Mohammadzadeh, T., Shahriari Rad, R., y Sarkari, B. 2015. Population-Based Seroprevalence of Malaria in Hormozgan Province, Southeastern Iran: A Low Transmission Area. *Malar Res Treat.* **2015**, 1–5.
- Howes, R. E., Patil, A. P., Piel, F. B., Nyangiri, O. A., Kabaria, C. W., Gething, P. W., ... Hay, S. I. 2011. The global distribution of the Duffy blood group. *Nature Communications*, **2(1)**.
- Howes, R. E., Battle, K. E., Mendis, K. N., Smith, D. L., Cibulskis, R. E., Baird, J. K., y Hay, S. I. 2016. Global Epidemiology of *Plasmodium vivax*. *Am J Trop Med Hyg.* **95(6 Suppl)**, 15–34.
- King, C. L., Adams, J. H., Xianli, J., Grimberg, B. T., McHenry, A. M., Greenberg, L. J., Siddiqui, A. y colaboradores. 2011. Fya/Fyb antigen polymorphism in human erythrocyte Duffy antigen affects susceptibility to *Plasmodium vivax* malaria. *PNAS.* **108(50)**, 20113–20118.
- Ladeia-Andrade, S., Ferreira, M. U., Scopel, K. K. G., y Braga, É. M. 2007. Naturally acquired antibodies to merozoite surface protein (MSP)-119 and cumulative exposure to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in remote populations of the Amazon Basin of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **102(8)**, 943-951.
- Laishram, D. D., Sutton, P. L., Nanda, N., Sharma, V. L., Sobti, R. C., Carlton, J. M., y Joshi, H. 2012. The complexities of malaria disease manifestations with a focus on asymptomatic malaria. *Malaria Journal*, **11(1)**, 29.

- Layrisse, M., Layrisse, Z., García, E., y Wilbert, J. 1962. Blood group antigens of the Pemon Indians of Venezuela. *Am J Phys Anthropol.* **20(4)**, 411–420.
- López, C., Yepes-Pérez, Y., Hincapié-Escobar, N., Díaz-Arévalo, D., y Patarroyo, M. A. 2017. What Is Known about the Immune Response Induced by Plasmodium vivax Malaria Vaccine Candidates? *Frontiers in Immunology*, **8**.
- Lugo, M. 2002. Notas sobre la biología del mosquito *Trichoprosopon digitatum* rondani 1848 en criaderos artificiales al sur del estado bolívar, Venezuela. *Acta Biol. Venez.* **22(3-4)**, 67-70.
- Maestre, A., Muskus, C., Duque, V., Agudelo, O., Liu, P., Takagi, A., Francis, B. y colaboradores. 2010. Acquired antibody responses against *Plasmodium vivax* infection vary with host genotype for duffy antigen receptor for chemokines (DARC). *PLoS ONE.* **5(7)**, 1-11.
- Marcano, T. J., Morgado, A., Tosta, C. E., y Coura, J. R. 2004. Cross-sectional study defines difference in malaria morbidity in two Yanomami communities on Amazonian boundary between Brazil and Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **99(4)**, 369–376.
- Menard, D., Barnadas, C., Bouchier, C., Henry-Halldin, C., Gray, L. R., Ratsimbaoa, A., Thonier, V. y colaboradores. 2010. *Plasmodium vivax* clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. *PNAS.* **107(13)**, 5967–5971.
- Meny, G.M. 2010. The Duffy blood group system: a review. *Inmunohaematology.* **26(2)**, 51-56.
- Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS). 2017. Reporte Epidemiológico Semanal. Año 23. Semana Epidemiológica N° 26. Período del 25 de Junio al 01 de Julio 2017.
- Miri-Moghaddam, E., Bameri, Z., y Mohamadi, M. 2014. Duffy blood group genotypes among malaria Plasmodium vivax patients of Baoulch population in southeastern Iran. *Asian Pac J Trop Dis.* **7(3)**, 206–207.

- Moreno, J., Rubio-Palis, Y., Martínez, A., y Acevedo, P. 2014. Evolución espacial y temporal de la malaria en el municipio Sifontes del estado Bolívar, Venezuela. 1980-2013. *Bol. Mal. Salud Amb.* **54(2)**, 236-249.
- Mullis, K., y Faloona, F. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Method Enzymol.* **155**, 335-350.
- Naing, C., Whittaker, M. A., Nyunt Wai, V., y Mak, J. W. 2014. Is Plasmodium vivax Malaria a Severe Malaria?: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **8(8)**, e3071.
- Olsson, M. L., Hansson, C., Avent, N. D., Åkesson, I. E., Green, C. A., y Daniels, G. L. 1998. A clinically applicable method for determining the three major alleles at the Duffy (FY) blood group locus using polymerase chain reaction with allele-specific primers. *Transfusion.* **38(2)**, 168–173.
- Pattaradilokrat, S., Trakoolsoontorn, C., Simpalipan, P., Warrit, N., Kaewthamasorn, M., y Harnyuttanakorn, P. 2018. Size and sequence polymorphisms in the glutamate-rich protein gene of the human malaria parasite Plasmodium falciparum in Thailand. *Parasites & Vectors*, **11(1)**.
- Pogo, A. O., y Chaudhuri, A. 2000. The Duffy Protein: A Malarial and Chemokine Receptor. *Semin Hematol.* **37(2)**, 122–129.
- Recht, J., Siqueira, A. M., Monteiro, W. M., Herrera, S. M., Herrera, S., Lacerda, M. V. G. 2017. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: Current challenges in malaria control and elimination. *Malar J.* **16(1)**, 1–18.
- Rodríguez, B. 2003. Una experiencia de supervivencia económica en zonas mineras: el caso de Las Claritas. *Rev. Venez. de Econ. y Ciencias Sociales.* **9(2)**, 37-64.

- Rodríguez, I., Abreu, N. De, Carrasquel, A., Bolívar, J., Scorza, J. V., y Pérez, H. 2010. Infecciones maláricas en individuos asintomáticos en la población indígena Jivi, Amazonas, Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* **50(2)**, 197-205.
- Rodulfo, H., de Donato, M., Quijada, I., y Pena, A. 2007a. High prevalence of malaria infection in Amazonas State, Venezuela. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.* **49(2)**, 79–85.
- Rodulfo, H. 2007b. Comparison of the diagnosis of malaria by microscopy, immunochromatography and PCR in endemic areas of Venezuela. *Braz J Med Biol Res.* **40(4)**, 535–543.
- Sanchez, E., A.Perez, H., y Martinez, C. 1990. Malaria in the Amazon. Prevalence of *Plasmodium falciparum* antibodies in Amerindians inhabiting the Venezuelan Amazon. *Ann Trop Med Parasitol.* **84(4)**, 307–312.
- Shymala, V., y Ferro-Luzzi, G. 1993. Single Specific Primer-Polymerase Chain Reaction (SSP-PCR) and Genome Walking. *Methods Mol Biol.* **15**, 339-348.
- Soares, I. S., Oliveira, S. G., Souza, J. M., y Rodrigues, M. M. 1999. Antibody response to the N and C-terminal regions of the *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein 1 in individuals living in an area of exclusive transmission of *P. vivax* malaria in the north of Brazil. *Acta Tropica*, **12**.
- Sojo, M. 2011. Prevalencia y factores asociados a infección malárica en la parroquia Yaguaraparo, Sucre, Venezuela, 2004-2005. Tesis doctoral, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", La Habana, Cuba.
- Su, X., Hayton, K., y Wellems, T.E. 2007. Genetic linkage and association analyses for trait mapping in *Plasmodium falciparum*. *Nat Rev Genet.* **8**, 497-506.
- Ta, T. H., Hisam, S., Lanza, M., Jiram, A. I., Ismail, N., y Rubio, J. M. 2014. First case of a

- naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*. *Malaria Journal*, **13(1)**, 68.
- Tournamille, C., Colin, Y., Cartron, J. P., y Kim, C. L. Van. 1995. Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. *Nat Genet.* **10(2)**, 224–228.
- Veloz, E. 2015. Duffy blood group phenotypes/genotypes and their association with malaria prevalence in four communities of northwest Ecuador. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.
- Voller, A., Bidwell, D., Huldt, G., y Engvall, E. 1974. A microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay and its application to malaria. *Bull World Health Organ.* **51(2)**, 209-211.
- Wang, Q., Zhao, Z., Zhang, X., Li, X., Zhu, M., Li, P., ... Cui, L. 2016. Naturally Acquired Antibody Responses to *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 1 (MSP1) C-Terminal 19 kDa Domains in an Area of Unstable Malaria Transmission in Southeast Asia. *PLOS ONE*, **11(3)**, e0151900.
- Wide, A., Moreno, J., y Noya, O. 2011. Fundamentos en el diagnóstico y control de la malaria. <http://www.iaes.edu.ve>. [Consulta: 23 de marzo de 2018].
- World Health Organisation (WHO). 2017. World Malaria Report 2017.
- Woolley, I. J., Hotmire, K. A., Sramkoski, R. M., Zimmerman, P. A., y Kazura, J. W. 2000. Differential expression of the Duffy antigen receptor for chemokines according to RBC age and FY genotype. *Transfusion*, **40(8)**, 949–953.
- Wurtz, N., Mint Lekweiry, K., Bogreau, H., Pradines, B., Rogier, C., Ould Mohamed Salem Boukhary, A., Eddine Hadif, J. y colaboradores. 2011. Vivax malaria in Mauritania includes

infection of a Duffy-negative individual. *Malaria J.* **10**, 1–8.

Yazdanbakhsh, K., Rios, M., Storry, J. R., Kosower, N., Parasol, N., Chaudhuri, A., Reid, M. E.

2000. Molecular mechanisms that lead to reduced expression of Duffy antigens.

Transfusion. **40(3)**, 310–320.

Zerpa, N. C., Wide, A., Noda, J., Bermúdez, H., Pabón, R., y Noya, O. O. 2006. Immunogenicity

of synthetic peptides derived from Plasmodium falciparum proteins. *Experimental*

Parasitology, **113(4)**, 227–234.

Zuluaga, G., y Trujillo, S. 2010. Malaria: consideraciones sobre su diagnóstico. *Medicina &*

Laboratorio. **16**, 7–8.