

Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades

Vigilancia molecular de la expresión génica de
HRP2 y HRP3* en los parásitos *Plasmodium
***falciparum* de América del Sur y Centroamérica**

Abreviaturas

CDC	Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades
HRP2	Proteína 2 rica en histidina (antígeno)
HRP3	Proteína 3 rica en histidina (antígeno)
MSP2	Proteína 2 de superficie del merozoíto
OPS	Organización Panamericana de la Salud
<i>pfhrp2</i>	Proteína 2 rica en histidina de <i>Plasmodium falciparum</i> (gen)
<i>pfhrp3</i>	Proteína 3 rica en histidina de <i>Plasmodium falciparum</i> (gen)
OMS	Organización Mundial de la Salud

Vigilancia molecular de la expresión génica de *hrp2* y *hrp3* en los parásitos de *Plasmodium falciparum* de América del Sur y Centroamérica

Informe sobre los progresos realizados: julio de 2012

Preparación del informe

John W. Barnwell

Venkatachalam (Kumar) Udhayakumar

Alexandre Macedo de Oliveira

Participantes en los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades que contribuyeron a la genotipificación y la notificación

Curtis Huber

Joseph Abdallah

Amanda Poe

Tonya Mixson-Hayden

Ira Goldman

Sheila Akinyi

Alexandra Sowers

Investigadores de los países asociados

Los siguientes investigadores en cada país actuaron como contactos primarios y se encargaron de la coordinación de la evaluación en su país o su centro y cumplieron una función primordial en la inscripción de los pacientes, la recopilación de los datos, la gestión de las muestras, el apoyo a los laboratorios y las investigaciones.

Bolivia

Arletta Añez, Organización Panamericana de la Salud, Bolivia

Brasil

Franklin Simoes, Instituto de Medicina Tropical

Luis Marcelo Aranha, Universidad de São Paulo

Marinete Marins Pova, Instituto Evandro Chagas

Suiane Negreiros do Valle, Secretaría Estatal de Salud del Estado de Acre

Colombia

Claribel Murillo, Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas, Cali

Guyana

Karanchand Krishnalall, Ministerio de Salud, Guyana

Nicholas Ceron, Organización Panamericana de la Salud, Guyana

Honduras

Rosa Elena Mejía Torres, Laboratorio Nacional de la Malaria, Departamento de Laboratorio Nacional de Vigilancia, Secretaría de Salud, Honduras

Tamara Sandra Mancero, Organización Panamericana de la Salud, Honduras

Perú

Dionicia Gamboa, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima

Suriname

Malti Adhin, Universidad Anton De Kom de Suriname, Paramaribo

Otros asociados

Fundación para la Obtención de Medios de Diagnóstico Innovadores, Ginebra, Suiza

David Bell, Sandra Incardona y Mark Perkins

USAID, Perú

Jaime Chang Neyra

Organización Panamericana de la Salud, Washington, D.C., EUA

Keith Carter y María de la Paz Ade

Agradecimientos

Se agradece a todos los países, los Ministerios de Salud y los institutos nacionales asociados a la Iniciativa contra la Malaria en la Amazonia que trabajaran en los diferentes estudios y evaluaciones que presentamos en este informe.

Liberación de responsabilidad

Se espera que los hallazgos de este reporte sean publicados en la literatura científica. Agradeceremos ser conscientes de esto a la hora de compartir y citar este reporte

Objetivo

El objetivo de este programa de vigilancia fue recoger y evaluar muestras de parásitos de *Plasmodium falciparum* en países de América del Sur y Centroamérica donde la malaria es endémica, con el fin de analizar la presencia o ausencia del gen que codifica la proteína 2 rica en histidina y el que codifica la proteína 3 rica en histidina de *P. falciparum*, con miras a orientar los programas de control de la malaria en materia de adquisición y aplicación de las pruebas rápidas de diagnóstico que sean apropiadas en cada país.

Antecedentes

En la actualidad, la mayoría de las pruebas rápidas de diagnóstico de la malaria utiliza la proteína 2 rica en histidina (HRP2) como diana en el diagnóstico de los parásitos de *P. falciparum*. Estas pruebas permiten un diagnóstico acelerado de la malaria causada por *P. falciparum*, por lo cual constituyen uno de los componentes de las medidas de control de la enfermedad recomendados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Alianza para Hacer Retroceder el Paludismo (1-8). Los anticuerpos usados en estos estuches reconocen de manera específica el antígeno HRP2 y pueden además presentar una reacción cruzada con otra proteína miembro de la familia de proteínas ricas en histidina denominada la proteína 3 rica en histidina (HRP3). Las evaluaciones recientes de las pruebas diagnósticas rápidas realizadas por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) en colaboración con la OMS, el Programa Especial de Investigaciones y Enseñanzas sobre Enfermedades Tropicales y la Fundación para la Obtención de Medios de Diagnóstico Innovadores, pusieron en evidencia en un número considerable de parásitos de malaria del Perú la supresión de los genes que codifican las proteínas HRP2 y HRP3, denominados *pfhrp2* y *pfhrp3*, respectivamente. En el presente estudio retrospectivo realizado en el Perú, se observó que 41% de las muestras de parásitos de *P. falciparum* carecía del gen *pfhrp2*, 70% carecía del gen *pfhrp3* y que en 20% de los parásitos evaluados faltaban ambos genes. Estas delecciones génicas se comunicaron detalladamente en una publicación reciente (9). Dado que la mayoría de las pruebas de diagnóstico rápido de la malaria utiliza como diana la HRP2 por su mayor sensibilidad, las delecciones de los genes que codifican HRP2 y HRP3 anularán la eficacia de las pruebas diseñadas para detectar estos antígenos en los parásitos de las muestras de sangre de los pacientes. Los países en toda América del Sur han recibido subsidios del Fondo Mundial con el fin de adquirir las pruebas de diagnóstico rápido destinadas a los programas de control de malaria. Debido a la alta proporción de parásitos que carecen de los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* en el Perú, fue importante llevar a cabo una vigilancia molecular exhaustiva de los parásitos de *P. falciparum*, a fin de determinar la magnitud de estas delecciones génicas en América del Sur y orientar en consecuencia la adquisición y la aplicación de las pruebas de diagnóstico rápido en los programas nacionales de control. Esta información es también fundamental para el uso de los estuches de diagnóstico apropiados en la atención de los pacientes en esta región.

En 2001, ocho países en América del Sur establecieron una red de vigilancia destinada a abordar la resistencia a los antimaláricos: la Red Amazónica de Vigilancia de la Resistencia a los Antimaláricos (RAVREDA). También en 2001, la Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional inició su respaldo técnico y financiero a esta red mediante la Iniciativa contra la Malaria en la Amazonia (AMI). Los CDC iniciaron un proyecto de vigilancia molecular en 2009, con apoyo adicional de la Iniciativa contra la Malaria en la Amazonía, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la Fundación para la Obtención de Medios

de Diagnóstico Innovadores, a fin de evaluar la magnitud de las delecciones de *pfhrp2* y *pfhrp3* en los diferentes países de América del Sur. En el presente informe se presentan los resultados y la situación actual de la genotipificación de esta investigación en curso.

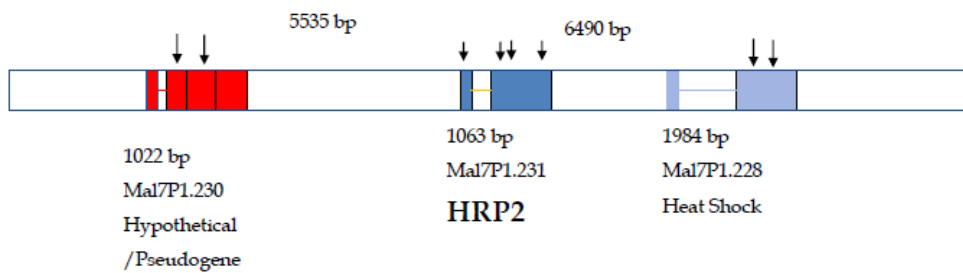
Métodos

El protocolo recomendaba recoger para el estudio muestras de 3 ml de sangre venosa y conservar cada muestra en tres alícuotas de plasma y de sedimento sanguíneo, estas últimas destinadas a la extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) del parásito con fines de genotipificación y el plasma con el fin de detectar la proteína soluble HRP2 mediante la prueba inmunoenzimática por adsorción (elisa). El plan proponía conservar dos viales de plasma y de sedimento sanguíneo en el país de origen (para puesta a prueba y como fuente de material de referencia en el futuro) y suministrar a los CDC un par de alícuotas de plasma y sedimento sanguíneo con el fin de verificar los resultados del análisis molecular y realizar la confirmación serológica de los datos moleculares. Lamentablemente, algunos países no tomaron la muestra de sangre por punción venosa y decidieron recoger solo gotas de sangre en papel de filtro por punción digital, el cual es un procedimiento más sencillo. Este método generó algunas dificultades técnicas importantes, que se abordarán más adelante en otra sección de este informe. La muestra de sangre por punción (o de sangre intravenosa en algunos casos) se obtuvo de pacientes con un parasitismo *P. falciparum* confirmado mediante el examen microscópico. Las gotas de sangre desecada o alícuotas de sangre venosa se expidieron para genotipificación al laboratorio de la División de la Malaria de los CDC.

Con el fin de extraer el ADN de los sedimentos sanguíneos o de las gotas de sangre se utilizaron estuches comerciales (QIAamp DNA Mini® o QIAamp DNA Blood Mini®). El estado del parasitismo por *P. falciparum* se confirmó además mediante una reacción en cadena de la polimerasa (RCP) anidada, específica de cada especie, basada en la amplificación del ácido ribonucleico ribosómico (ARNr) 18S [10]. Con el objeto de verificar la calidad del ADN destinado a la RCP, se amplificaron los alelos del gen que codifica la proteína principal de superficie 2 (*msp2*). Se amplificaron los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* utilizando los cebadores que se representan con flechas en los diagramas de la figura 1A y 1B y se describen al detalle en el apéndice II. Con el fin de obtener una confirmación adicional y la caracterización de las delecciones cromosómicas, se amplificaron además los siguientes genes que flanquean *pfhrp2* y *pfhrp3* en dirección 5' y en dirección 3'. El gen Mal7P1.230 está ubicado a cerca de 5,5 kb en dirección 5' de *pfhrp2* y el gen Mal7P1.228 a 6,5kb en dirección 3' (figura 1A). El gen Mal13P1.475 está ubicado a 1,7 kb en dirección 5' de *pfhrp3* y el gen Mal13P1.485 a 4,4 kb en dirección 3' (figura 1B). Se verificó la calidad del material de ADN parasitario en las muestras, se practicó su genotipificación con los marcadores *msp2* y solo las muestras en las cuales se obtuvo la amplificación de por lo menos un alelo de este gen y el gen ARNr 18s se calificaron de buena calidad (aptas) para continuar la evaluación de las delecciones de *pfhrp2* y *pfhrp3*.

Figura 1. Posicionamiento genómico de *pfhrp2*, *pfhrp3* y sus genes flanqueantes.

A. Gen *pfhrp2* y genes flanqueantes:



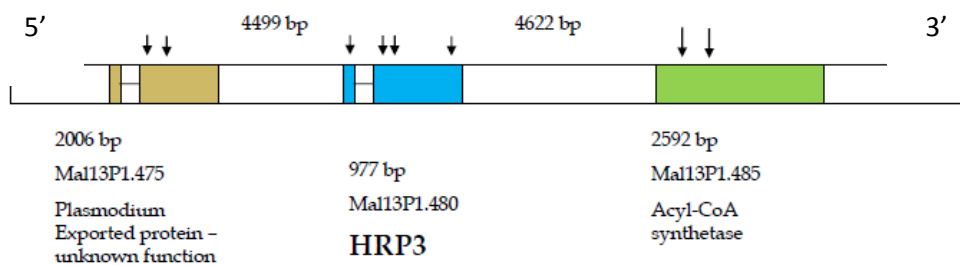
Leyenda última línea:

Gen hipotético o seudogen

hrp2

Choque térmico

B. Gen *pfhrp3* y genes flanqueantes:



Leyenda última línea:

Proteína exportada
de *Plasmodium*, cuya
función se desconoce

hrp3

Acil CoA sintetasa

Resultados

Bolivia

Total de muestras previstas: 100

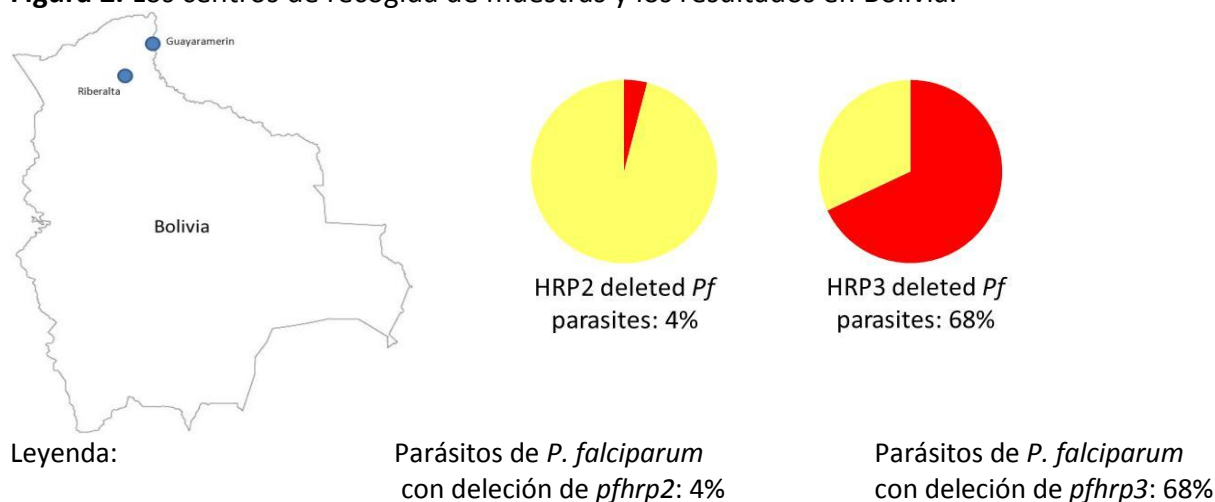
Total de muestras suministradas: 27

Tipo de muestras sanguíneas:

- Gota de sangre sobre papel de filtro: suministrada
- Sedimento sanguíneo: suministrado
- Plasma sanguíneo y suero: suministrados

Centros de recogida de muestras: Riberalta y Guayaramerín

Figura 2. Los centros de recogida de muestras y los resultados en Bolivia.



Recogida de las muestras, capacitación y dificultades

El doctor A. Macedo de Oliveira y el doctor V. Udhayakumar visitaron Bolivia en 2010 durante una semana, con el fin de colaborar con la doctora Añez en la capacitación sobre obtención de muestras en Riberalta y Guayaramerín (figura 2). El doctor Jorge Cuba, Director de la sección de Malaria en el Laboratorio de Salud Pública de Riberalta, prestó asistencia y orientación en este proyecto. La señora Gladys Nakaq, técnica de laboratorio (Laboratorio de Salud Pública de Riberalta) y la señora Rosling Ocampo Zambrano (Centro de Salud de Guayaramerín) recibieron la formación sobre obtención de muestras. Se escogieron los centros de salud locales donde se obtendrían las muestras de sangre intravenosa y las gotas de sangre en papel de filtro. El tamaño previsto de la muestra fue de 100 muestras en ambos centros combinados en Bolivia. Después de un año, solo se habían recogido 27 muestras con monoparasitismo por *P. falciparum* y se enviaron para verificación a los CDC. Inicialmente, el 8 de junio de 2011, se suministraron al laboratorio de los CDC 27 muestras en papel de filtro. Luego, el 5 de julio de 2011, se expidieron a los CDC 27 muestras de sedimento sanguíneo y plasma que correspondían a las muestras de sangre. La cadena de frío no se mantuvo de manera adecuada durante la expedición y las muestras llegaron a su destino derretidas (en lugar de congeladas). Además, no fue posible encontrar un asociado comprometido en el Ministerio de Salud de Bolivia que recibiese la capacitación en las técnicas de laboratorio de vigilancia molecular, lo cual constituye un obstáculo importante a una transferencia de tecnología apropiada que permita realizar la vigilancia molecular local en el futuro.

Las muestras excluidas del análisis:

N	Muestra número	18S	<i>msh2</i>	230	<i>pfhrp2</i>	228	485	<i>pfhrp3</i>	475
1	BR16	-	-	-	-	+	-	-	-
2	BR27	-	-	-	-	-	-	-	-

Razones de la exclusión

Estas muestras se excluyeron del análisis final porque no se obtuvo de ellas ninguna amplificación del gen 18S ni de uno o ambos alelos del gen *msh2*. Solo se incluyeron en el análisis final las muestras en las que se logró amplificar estos dos genes, pues la amplificación confirmaba la presencia de *P. falciparum*.

Resumen de resultados

Todas las muestras, las gotas de sangre en papel de filtro y los sedimentos sanguíneos, se analizaron en conformidad con los procedimientos definidos por el laboratorio de los CDC y ambos conjuntos dieron resultados idénticos. Se excluyeron dos muestras del análisis final, pues no satisficieron los criterios de inclusión indicados arriba; de las 25 muestras restantes, una presentó delección del gen *pfhrp2* (figura 2, cuadro 1), en 17 muestras se observó delección del gen *pfhrp3* y en nueve muestras delección de Mal7P1.230 que es un pseudogen cercano de *pfhrp2*, en dirección 5'. Doce muestras presentaron delección del gen Mal13P1.475 y en 14 muestras se encontró supresión de Mal13P1.485; estos dos, son genes flanqueantes de *pfhrp3* (cuadro 1).

Cuadro 1: Resultados resumidos sobre la delección de *pfhrp2*, *pfhrp3* y los genes aledaños en Bolivia.

País	Centro de muestreo	Genes *					
		230	<i>pfhrp2</i>	228	475	<i>pfhrp3</i>	485
Bolivia	Riberalta y Guayaramerín	9/25 (36,0%)	1/25 (4,0%)	0/25 (0,0%)	12/25 (48,0%)	17/25 (68,0%)	14/25 (56,0%)

* Los datos muestran el número (y el porcentaje) de parásitos que presentaron delecciones génicas en el total de muestras analizadas

Actividades pendientes y otras medidas necesarias a fin de completar el proyecto en Bolivia

La presencia de 4% de delecciones de *pfhrp2* en un número limitado de muestras (una de cada 25) indica la necesidad de examinar nuevas muestras, con el fin de obtener un cálculo más preciso de la prevalencia de esta delección en Bolivia. Además, se debe despachar a los CDC otra alícuota de muestras de plasma en condiciones térmicas apropiadas, pues en el envío anterior no se respetó la cadena de frío (lo cual pudo haber alterado la integridad de las muestras). En las nuevas muestras de plasma se determinará la concentración de la proteína HRP2 y se confirmarán así los resultados moleculares sobre el gen *pfhrp2*.

Bolivia debería definir si desea continuar la vigilancia sistemática encaminada a determinar

con mayor precisión la prevalencia de parásitos de *P. falciparum* con delección de *pfhrp2* en las diferentes regiones, pues el número actual de 25 muestras es insuficiente. En vista de que Bolivia no recibió ninguna formación técnica en materia de análisis molecular, es importante que el personal del país participe en la próxima ronda de capacitación (si la Iniciativa contra la Malaria en la Amazonía y la OPS deciden apoyarla). Es también pertinente señalar aquí que los CDC pueden apoyar el adiestramiento de un científico boliviano en el análisis molecular de las delecciones de *pfhrp2* y *pfhrp3* (si Ministerio de Salud decide escoger alguno).

Colombia

Total de muestras previstas: 100

Total de muestras suministradas: 53

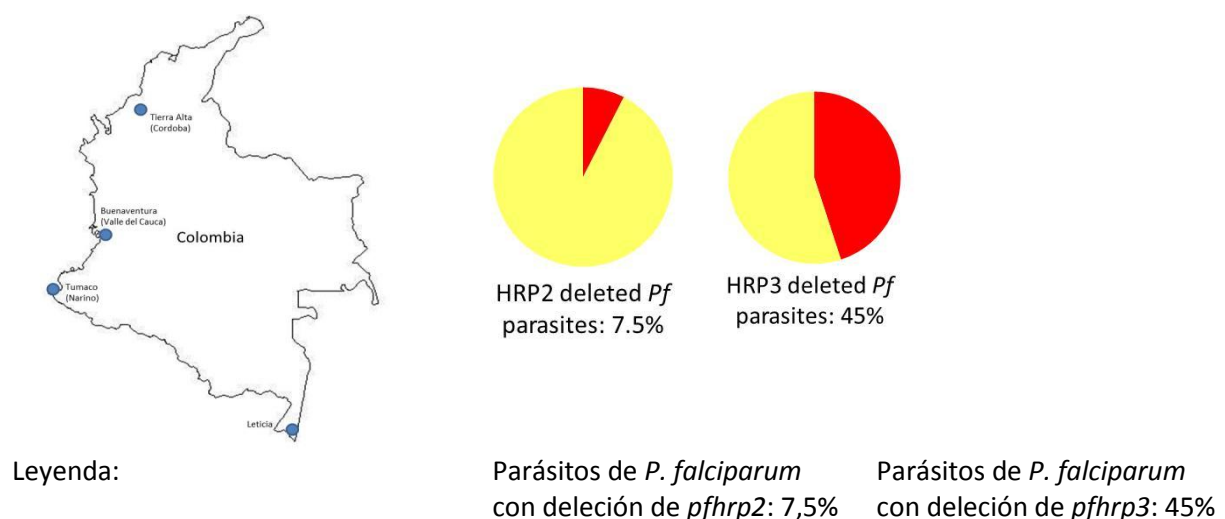
Tipo de muestras sanguíneas:

- Gota de sangre en papel de filtro: suministrada
- Plasma sanguíneo y suero: no suministrados
- Sedimento sanguíneo: no suministrado

Centros de recogida de muestras:

- Tierra Alta (Córdoba) (10 muestras)
- Tumaco (Nariño) (22 muestras)
- Buenaventura (Valle del Cauca) (21 muestras)

Figura 3: Los centros de recogida de muestras y los resultados en Colombia.



Recogida de las muestras, capacitación y dificultades

La Fundación para la Obtención de Medios de Diagnóstico Innovadores aportó financiamiento y capacitación en materia de recogida de muestras en Colombia. La doctora Claribel Murillo (Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas de Cali) actuó como contacto primario en la obtención de las muestras. La doctora Murillo recibió además capacitación en los CDC sobre los métodos de análisis molecular de las delecciones génicas de *pfhrp3* y *pfhrp2* (del 14 de febrero al 27 de marzo de 2010). En Colombia no se recogieron muestras de sangre venosa como lo definía el protocolo, sino que se decidió recoger gotas de sangre en papel de filtro por razón de su asociación con la Fundación para la Obtención de Medios de Diagnóstico Innovadores. Este método constituyó una limitación

a la realización de un análisis molecular detallado. No se pudo llevar a cabo la confirmación serológica de los datos moleculares debido a la falta de plasma. Se recibió solo cerca de 50% de la muestra prevista en Colombia (100 muestras).

Las muestras excluidas del análisis:

N	Muestra número	18S	<i>msp2</i>	230	<i>pfhrp2</i>	228	485	<i>pfhrp3</i>	475
1	TA02	+	-	+	+	+	-	-	-
2	TA04	+	-	-	+	-	-	-	-
3	TA06	+	-	-	-	-	-	-	-
4	TA07	+	-	-	-	+	-	-	+
5	BV17	+	-	-	-	-	-	-	-
6	BV20	-	-	-	-	-	-	-	-
7	BV21	-	+	-	-	+	-	-	+
8	BV24	-	-	-	-	+	-	-	+
9	BV25	-	-	-	-	-	-	+	-
10	BV26	-	+	-	+	+	+	-	+
11	BV27	-	-	-	-	-	-	-	-
12	BV32	-	-	-	+	-	-	-	-
13	BV35	-	+	-	-	-	-	-	-

Razones de la exclusión

Estas muestras se excluyeron del análisis final pues no se obtuvo de ellas ninguna amplificación del gen 18S ni de *msp2*. Solo se incluyeron en el análisis final las muestras en las que se logró amplificar estos dos genes, pues la amplificación confirmaba la presencia de *P. falciparum*.

Resumen del análisis

Se suministró al laboratorio de malaria de los CDC, el 3 de septiembre de 2010, un total de 53 muestras recogidas entre 2009 y 2010. Solo 40 muestras produjeron ADN de buena calidad que satisficiera los criterios del análisis de *pfhrp2*. En la figura 3 y el cuadro 2 se presentan los resultados obtenidos con estas 40 muestras. En resumen, tres muestras (7,5%) mostraron delección de *pfhrp2* y 18 muestras (45,0%) delección de *pfhrp3* (figura 3, cuadro 2). En 21 muestras estaba suprimido Mal7P1.230, en una muestra Mal7P1.228, en 17 muestras se detectó delección del gen Mal13P1.475 y en 13 muestras la delección de Mal13P1.485 (cuadro 2). Otro análisis de un número reducido de muestras recogidas retrospectivamente, que se realizó durante la sesión de capacitación de la señora Murillo en los CDC, indicó que alrededor de Leticia en la provincia del Amazonas de Colombia se pueden encontrar delecciones de *pfhrp2* y *pfhrp3* en proporción equivalente a las observadas en el Perú; esta región no se examinó en el presente estudio prospectivo.

Cuadro 2: Resultados resumidos sobre la delección de *pfhrp2*, *pfhrp3* y los genes aledaños en Colombia.

País	Centros de muestreo	Genes *					
		230	<i>pfhrp2</i>	228	475	<i>pfhrp3</i>	485
Colombia	Tierra Alta (Córdoba)	3/6	2/6	1/6	6/6	6/6	6/6
	Tumaco (Nariño)	11/22	0/22	0/22	6/22	7/22	5/22
	Buenaventura (Valle del Cauca)	7/12	1/12	0/12	5/12	5/12	2/12
	Total	21/40 (52,5%)	3/40 (7,5%)	1/40 (2,5%)	17/40 (42,5%)	18/40 (45,0%)	13/40 (32,5%)

* Los datos muestran el número (y el porcentaje) de parásitos que presentaron delecciones génicas en el total de muestras analizadas

Actividades pendientes y otras medidas necesarias a fin de completar el proyecto en Colombia

Los datos indican la presencia de algunos parásitos con delección de *pfhrp2* en las costas Pacífica y del Caribe de Colombia, sobre todo en la segunda región. Sin embargo, sin muestras adicionales de algunas de las regiones evaluadas (Tierra Alta) y de otras zonas diferentes del país, es difícil obtener un cálculo preciso de la prevalencia de parásitos con delección de *pfhrp2* en todo el país. La mayoría de las muestras se recogieron solo en la costa Pacífica y unas pocas muestras en Tierra Alta en la costa del Caribe, donde se observó 33% de delecciones de *pfhrp2* (2 de 6). Es preciso impulsar nuevas recogidas de muestras y en número suficiente de la región de Tierra Alta y también en otras regiones del interior del país. Como se señaló arriba, el análisis de un número limitado de muestras retrospectivas demostró una alta tasa de delecciones de *pfhrp2* y *pfhrp3* en la provincia del Amazonas. Colombia tiene que considerar nuevas estrategias de vigilancia aun más sistemáticas, a fin de alcanzar una mayor comprensión de la prevalencia de delecciones de los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* en los parásitos de *P. falciparum* en el país. En una posible ronda futura de recolección de muestras de vigilancia, Colombia podría tomar muestras con una base geográfica más amplia y un tamaño adecuado, respetando además las recomendaciones de recogida (plasma y sedimento sanguíneo), a fin de calcular con exactitud la prevalencia de delecciones génicas.

Guyana

Total de las muestras previstas: 100

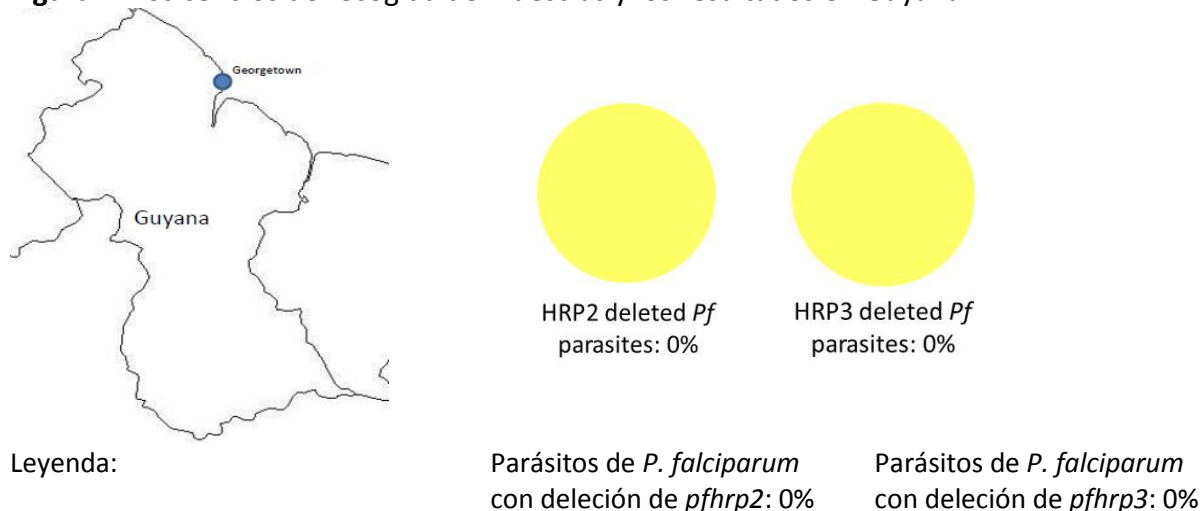
Total de muestras suministradas: 100

Tipo de muestras sanguíneas:

- Gota de sangre en papel de filtro: suministrada
- Plasma sanguíneo y suero: recogidos y suministrados en agosto de 2012
- Sedimento sanguíneo: recogido y suministrado en agosto de 2012

Centro de recogida: Georgetown (todas las muestras de un solo consultorio)

Figura 4: Los centros de recogida de muestras y los resultados en Guyana.



Recogida de las muestras, capacitación y dificultades

El doctor Nicholas Cerón y el señor Krishnalall tomaron parte activa en la organización eficiente de la recogida de muestras. El doctor Udhayakumar visitó Guyana en 2010 (del 22 al 26 de marzo de 2010) con el fin de prestar apoyo técnico e impartir capacitación en materia de obtención de muestras. Durante esta visita, la oficina de la OPS y el Ministerio de Salud participaron activamente al facilitar la capacitación y la organización de la obtención de muestras. El Ministro de Salud, honorable doctor Ramasamy, mostró un interés personal en facilitar el proyecto y vinculó al Laboratorio de Nacional de Referencia de Guyana en Georgetown, con el uso de la infraestructura del laboratorio en el procesamiento y almacenamiento de las muestras y con la colaboración del doctor Colin Roach y el señor Chandrabose de este laboratorio. Las muestras se recogieron en el consultorio de malaria en Georgetown, donde acude para tratamiento la mayoría de los pacientes de malaria de la zona costera y la zona interior de la Guyana (figura 4). La Guyana es el único país que alcanzó el tamaño previsto de la muestra en un tiempo muy corto y recogió, como estaba planeado, sangre venosa y gotas de sangre en papel de filtro. Guyana suministró las muestras en papel de filtro a los CDC para el análisis molecular e inicialmente no pudo despachar los sedimentos sanguíneos y el plasma destinados a las pruebas adicionales, por limitaciones logísticas; por último, en agosto de 2012 se enviaron a los CDC las muestras restantes. Lamentablemente, durante la expedición no se respetó la cadena de frío y a su llegada las muestras se encontraban a temperatura ambiente.

Las muestras excluidas del análisis:

N	Muestra número	18S	<i>msp2</i>	230	<i>pfhrp2</i>	228	485	<i>pfhrp3</i>	475
1	032	-	-	-	+	+	-	-	-
2	076	-	-	-	-	+	+	-	-
3	092	-	-	-	+	+	+	+	+

Razones de la exclusión

Estas muestras se excluyeron del análisis final porque no se obtuvo de ellas ninguna amplificación del gen 18S ni de uno o ambos alelos del gen *msh2*. Solo se incluyeron en el análisis final las muestras en las que se logró amplificar estos dos genes, pues la amplificación confirmaba la presencia de *P. falciparum*.

Resumen de los resultados

Se suministraron al laboratorio de los CDC un total de 100 muestras de gotas de sangre en papel de filtro (en marzo de 2011) para este proyecto. Se analizaron todas las muestras en conformidad con los procedimientos definidos por el laboratorio de los CDC. Se excluyeron tres muestras del análisis final, ya que no satisfacían los criterios de inclusión, como se indicó arriba. De las 97 muestras restantes, ninguna exhibió delección de los genes *pfhrp2* o *pfhrp3* (figura 4, cuadro 3). En 40 muestras se observó delección de Mal7P1.230, que es un pseudogen ubicado cerca del gen *pfhrp2*, hacia el extremo 5'. En una muestra se encontró delección de Mal7P1.228 que es un gen ubicado hacia el extremo 3' de *pfhrp2* (cuadro 3). En resumen, en este lote de muestras analizadas no se encontró ninguna muestra con delección génica de *pfhrp2* ni *pfhrp3*.

Cuadro 3: Resultados resumidos sobre la delección de *pfhrp2*, *pfhrp3* y los genes aledaños en Guyana.

País	Centro recogida	de	Genes *					
			230	<i>pfhrp2</i>	228	475	<i>pfhrp3</i>	485
Guyana	Georgetown		40/97 (41,2%)	0/97 (0,0%)	1/97 (1,0%)	0/97 (0,0%)	0/97 (0%)	0/97 (0,0%)

* Los datos muestran el número (y el porcentaje) de parásitos que presentaron delecciones génicas en el total de muestras analizadas

Actividades pendientes y otras medidas necesarias a fin de completar el proyecto en Guyana

Se completó el análisis molecular de los genes *pfhrp2* y *pfhrp3*. La confirmación serológica de los resultados del análisis molecular se podrá completar cuando Guyana suministre nuevas muestras de plasma a los CDC.

Perú

Total de las muestras previstas: 100

Total de las muestras suministradas: 94

Tipo de muestras sanguíneas:

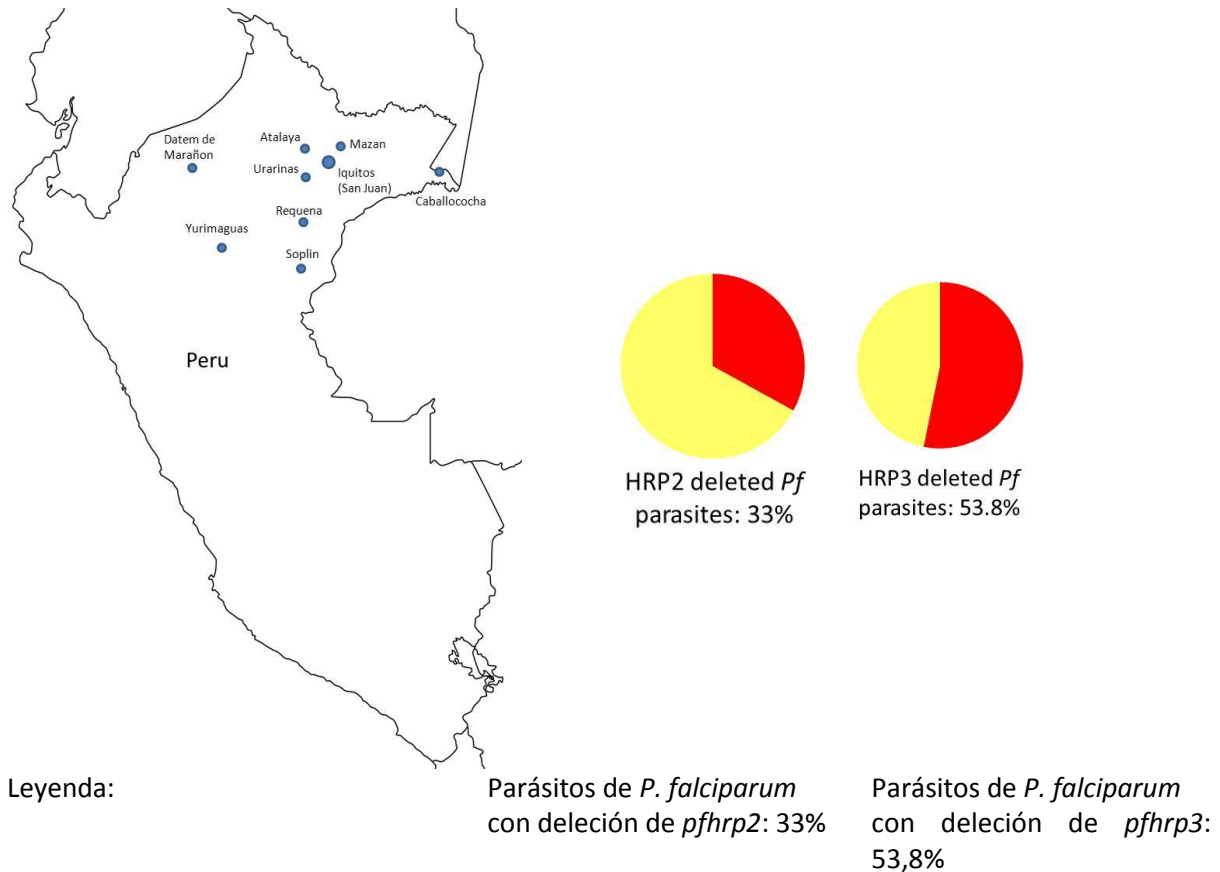
- Gota de sangre en papel de filtro: suministrada
- Plasma sanguíneo y suero: no suministrados
- Sedimento sanguíneo: no suministrado

Centros de recogida de las muestras (todos en la región de Loreto)

- Atalaya
- Caballococha
- Datem del Marañón
- Mazán

- San Juan
- Soplín
- Requena
- Yurimaguas
- Urarinas

Figura 5: Los centros de recogida y los resultados en el Perú.



Recogida de las muestras, capacitación y dificultades

La doctora Dionicia Gamboa (Universidad Peruana Cayetano Heredia de Lima) y su personal, en colaboración con la Fundación para la Obtención de Medios de Diagnóstico Innovadores, recogieron las muestras del presente estudio de vigilancia activa entre 2009 y 2010 (figura 5). Estas muestras comportaron solo gotas de sangre en papel de filtro. La falta de muestras de sangre venosa constituyó un obstáculo a la caracterización molecular de la expresión de los genes *pfhrp2*. Al no contar con muestras de plasma, fue imposible confirmar los resultados del análisis molecular con las pruebas serológicas. La señora Katherine Jessica Torres-Fajardo, una estudiante de posgrado del laboratorio de la doctora Gamboa, recibió capacitación en los CDC (del 20 de julio al 18 de septiembre de 2009) sobre el análisis molecular de las delecciones de *pfhrp2* y *pfhrp3*. La colaboración con la doctora Gamboa se desarrolló sin ningún tropiezo.

Resumen de los resultados

El 13 de julio de 2010 los CDC recibieron 94 muestras recogidas en diferentes centros de la cuenca amazónica del Perú entre 2009 y 2010. Las muestras se analizaron de conformidad con los procedimientos definidos por los CDC; en el cuadro 4 se presentan los resultados de 93 muestras, pues una muestra no reunió los criterios de inclusión sobre la integridad del ADN. Treinta y un muestras mostraron delección del gen *pfhrp2* (33,3%) y 50 muestras supresión de *pfhrp3* (53,8%) (figura 5, cuadro 4). Se encontraron 73 muestras con delección de Mal7P1.230, 17 muestras con delección de Mal7P1.228, 36 muestras con delección de Mal13P1.475 y 18 muestras con supresión de Mal13P1.485 (cuadro 4). Hasta el momento, las proporciones más altas de delección de *pfhrp2* se han detectado solo en la cuenca amazónica en el Perú. La proporción de delecciones de *pfhrp2* y de *pfhrp3* en esta encuesta prospectiva es equivalente a los niveles descritos en los estudios retrospectivos de publicación reciente (9). Cabe señalar, que la proporción de parásitos con delección de *pfhrp2* o *pfhrp3* es muy variable de una localidad a otra. Por ejemplo la población de parásitos en la comunidad de Atalaya fue 100% positiva para el gen *pfhrp2* y los parásitos de la comunidad de Requena fueron 100% negativos para este mismo gen. Sin embargo, globalmente esta región del Perú muestra un alto grado de delección de *pfhrp2* y *pfhrp3*.

Cuadro 4: Resultados resumidos sobre la delección de *pfhrp2*, *pfhrp3* y los genes aledaños en el Perú

País	Centros recogida	de	Genes *					
			230	<i>pfhrp2</i>	228	475	<i>pfhrp3</i>	485
Perú	Atalaya		16/19	0/19	2/19	1/19	3/19	1/19
	Caballococha		1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	0/1
	Datem Marañón	del	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	0/2
	Mazán		11/11	3/11	5/11	2/11	7/11	3/11
	San Juan		1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1
	Requena		9/11	11/11	1/11	11/11	11/11	0/11
	Soplín		16/31	8/31	1/31	15/31	17/31	8/31
	Urarinas		5/5	3/5	4/5	4/5	4/5	3/5
	Yurimaguas		12/12	2/12	2/12	1/12	4/12	2/12
	Total		73/93 (78,5%)	31/93 (33,3%)	17/93 (18,3%)	36/93 (38,7%)	50/93 (53,8%)	18/93 (19,4%)

* Los datos muestran el número (y el porcentaje) de parásitos que presentaron delecciones génicas en el total de muestras analizadas

Actividades pendientes y otras medidas necesarias a fin de completar el proyecto

El laboratorio de la doctora Gamboa realizó evaluaciones independientes de la delección de *pfhrp2* y *pfhrp3* en las mismas muestras. Es necesario comparar los resultados realizados en

el Perú con los datos del laboratorio de los CDC a fin de detectar incongruencias y resolver las diferencias.

En resumen, se ha analizado un número considerable de muestras de múltiples centros de la cuenca del río Amazonas en el Perú. Los datos indican una distribución generalizada de parásitos con delección de *pfhrp2* y *pfhrp3* en esta región endémica del Perú. Aunque no se supo si existen en la actualidad parásitos con delección del gen *pfhrp2* en la región costera debido a que no se recogieron muestras en ningún centro de la costa (porque la transmisión de *P. falciparum* es extremadamente baja), el análisis de menos de una docena de muestras recogidas en 2001 no encontró ninguna delección de este gen. Sin embargo, una investigación muy reciente sobre la reaparición de la malaria en Tumbes en la costa del norte del Perú puso en evidencia que los 18 aislados de parásitos que se recogieron y analizaron presentaban delección de *pfhrp2*. Los datos genéticos indican que los parásitos introducidos provenían originalmente de los alrededores de Requena en la provincia de Loreto. Está bien confirmado ahora que existe una alta prevalencia de delección de *pfhrp2* en el Perú. Por consiguiente, no se recomienda usar las pruebas que se basan en HRP2, en el diagnóstico de la malaria por *P. falciparum* en este país.

Suriname

Total de las muestras previstas: 100

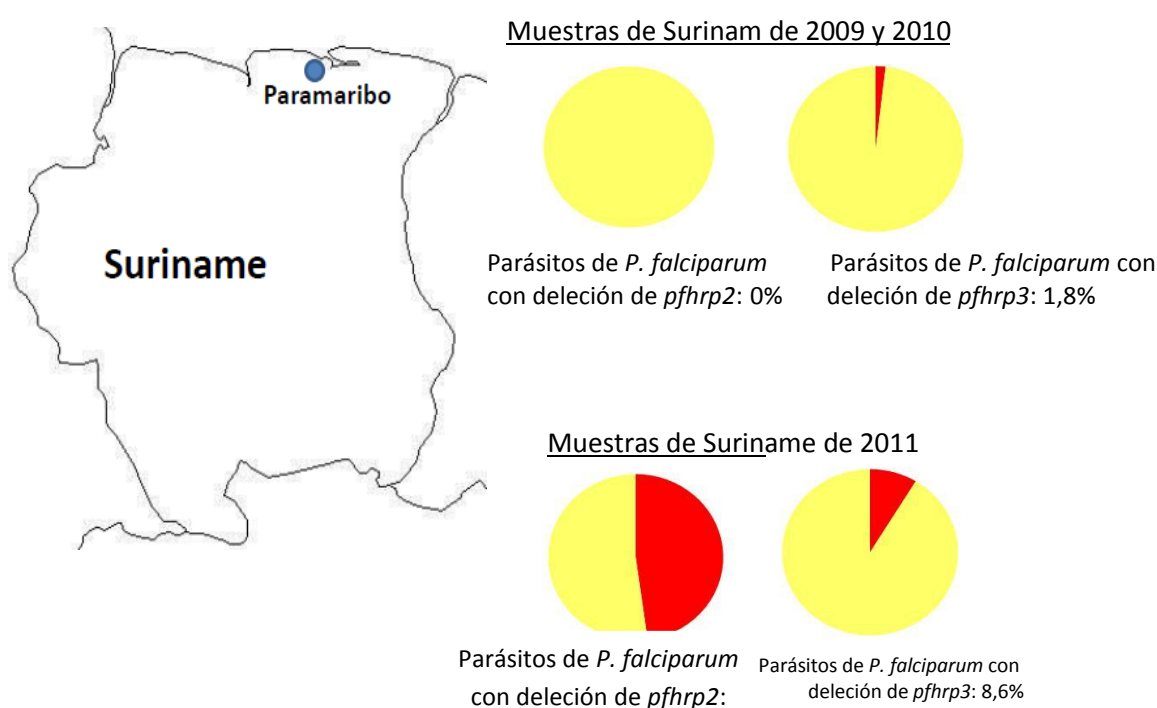
Total de las muestras suministradas: 103

Tipo de muestras sanguíneas:

- Gota de sangre en papel de filtro: suministrada
- Plasma sanguíneo y suero: no suministrados
- Sedimento sanguíneo: no suministrado

Centro de recogida de las muestras: Paramaribo

Figura 6: El centro de recogida y los resultados en Suriname



Recogida de las muestras, capacitación y dificultades

Suriname decidió usar inicialmente en esta investigación las muestras retrospectivas existentes en su colección del banco de parásitos y puso a disposición las muestras de gotas de sangre conservadas en papel de filtro. Se presentaron considerables problemas técnicos con la genotipificación de algunas de las muestras. Suriname suministró muestras en tres lotes diferentes. Habría sido mejor si todas las muestras se hubiesen presentado en un lote único, por razones logísticas relacionadas con la eficacia de la puesta a prueba. La señora Mergior Y Bracho Garrido del laboratorio de la doctora Malti Adhin (Universidad Anton de Kom, Paramaribo, Suriname) recibió capacitación sobre el análisis molecular de la delección de *pfhrp2* y *pfhrp3* durante el taller realizado en el Brasil y luego puso en marcha la capacidad local de evaluación de las delecciones de *pfhrp2* y *pfhrp3* en Suriname. La señora Bracho Garrido analizó en paralelo las mismas muestras, a fin de comparar sus resultados con los resultados de las pruebas en los CDC.

Lista de las muestras excluidas del análisis:

Envío 1 de Suriname

N	Muestra número	18S	<i>msp2</i>	230	<i>pfhrp2</i>	228	485	<i>pfhrp3</i>	475
1	M10-0127	-	-	+	-	+	-	-	-
2	M10-0286	+	-	-	+	+	+	+	+
3	M10-0373	-	-	-	+	+	-	-	-
4	M10-0867	+	-	+	+	+	+	+	+
5	M10-1055	-	-	+	-	+	+	+	+

Envío 2 de Suriname

N	Muestra número	18S	<i>msp2</i>	230	<i>pfhrp2</i>	228	485	<i>pfhrp3</i>	475
1	M9-0029	-	+	-	+	+	+	+	+
2	M9-0201	-	+	-	+	+	+	-	+
3	M9-0272	-	+	-	+	+	+	+	+
4	M9-0374	-	-	-	-	+	+	-	+
5	M9-0816	+	-	+	+	+	+	+	+
6	M9-0825	-	-	-	-	+	+	-	+
7	M9-1049	+	-	-	-	-	+	-	+
8	M9-1187	-	-	-	+	+	+	-	+
9	M9-1204	-	-	-	-	-	+	-	+
10	M9-1255	+	-	+	+	+	+	+	+
11	M9-1300	-	-	-	-	-	+	+	+

Envío 3 de Suriname

N	Muestra número	18S	<i>msp2</i>	230	<i>pfhrp2</i>	228	485	<i>pfhrp3</i>	475
1	M10-0147	-	-	-	-	-	NA	-	-
2	M11-0161	-	-	-	-	-	-	-	+
3	M10-0176	-	-	-	-	-	NA	-	-
4	M10-0886	-	-	-	+	-	NA	+	-
5	M10-1124	-	-	+	-	-	NA	-	+
6	M11-0192	-	-	-	-	-	-	-	-
7	M11-0207	-	-	-	-	-	-	-	-
8	M11-0370	-	-	-	-	-	-	-	-
9	M11-0379	-	-	-	-	-	-	-	-

NA: no analizada

Razones de la exclusión

Estas muestras se excluyeron del análisis final porque no se obtuvo de ellas ninguna amplificación del gen 18S ni de uno o ambos alelos del gen *msp2*. Solo se incluyeron en el análisis final las muestras en las que se logró amplificar estos dos genes, pues la amplificación confirmaba la presencia de *P. falciparum*.

Resumen de los resultados

Para este proyecto se suministraron inicialmente al laboratorio de los CDC 53 muestras en febrero de 2011 (recogidas en 2010) y en mayo de 2011 (recogidas en 2009). El primer envío contenía 23 muestras y el segundo 30 muestras. Se analizaron todas las muestras en conformidad con los procedimientos definidos por el laboratorio de los CDC. Se excluyeron del análisis final 16 muestras (cinco del primer envío y 11 del segundo), pues no satisficieron los criterios de inclusión. De las 37 muestras restantes, ninguna exhibió delección del gen *pfhrp2*. Se encontró una muestra con delección de *pfhrp3* (figura 6, cuadro 5). En 12 muestras se observó delección de Mal7P1.230. Ninguna de las muestras presentó delección de los genes Mal7P1.228, Mal13P1.475 ni Mal13P1.485 (cuadro 5). En febrero de 2012 se recibió en los CDC un tercer lote de muestras (50) de Suriname y las delecciones de *pfhrp2* y *pfhrp3* se analizaron recientemente. Dieciocho de estas muestras que satisfacían los criterios de inclusión se habían recogido en 2010 y no presentaron ninguna delección de *pfhrp2* ni *pfhrp3* (figura 6, muestras de 2009 y 2010, que incluye un total de 55 muestras). En una muestra se observó delección del gen Mal7P1.228. Las otras 23 muestras que satisficieron los criterios de inclusión se habían recogido en 2011. Se encontró que once de estas 23 muestras (47,82%) presentaban una delección parcial o completa del gen que codifica HRP2 (ocho muestras con delección parcial y tres muestras con delección completa). Dos de estas muestras de 2011 también habían suprimido el gen *pfhrp3*. En dos muestras no se logró amplificar Mal7P1.228, en cinco no se amplificó Mal7P1.230 y en una muestra no se amplificó Mal7P1.485.

Cuadro 5: Resultados resumidos sobre la delección de *pfhrp2*, *pfhrp3* y los genes alelaños en Suriname

País	Centro de recogida	Genes *					
		230	<i>pfhrp2</i>	228	475	<i>pfhrp3</i>	485
Suriname	Paramaribo	17/78 (21,8%)	11/78 (14,10%)	3/78 (3,9%)	0/78 (00,0%)	3/78 (3,84%)	1/78 (1,3%)

* Los datos muestran el número (y el porcentaje) de parásitos que presentaron delecciones génicas en el total de muestras analizadas

Actividades pendientes y otras medidas necesarias a fin de completar el proyecto en Suriname

Algunas muestras produjeron resultados deficientes o contradictorios, porque se recogieron en papel de filtro #1 de Whatman, lo cual exigió la realización de múltiples pruebas a fin de confirmar los resultados y provocó un retraso en el análisis. Algunas de estas muestras (25) se excluyeron debido a una calidad deficiente del ADN. Se suministró a Suriname un resumen de los resultados de las pruebas realizadas en los CDC con los dos primeros lotes. Se elaboró un resumen independiente con los resultados del tercer lote de muestras; debido a un alto número de muestras con delección de *pfhrp2* puede ser necesario renovar los estudios de vigilancia con muestras de sangre de buena calidad. No se han recibido los resultados de las pruebas individuales llevadas a cabo en Suriname a fin de compararlos con los resultados obtenidos en los CDC.

Brasil

Total de muestras previstas: 400 (100 en cada uno de cuatro estados diferentes)

Total de muestras suministradas a los CDC: Ninguna, la recogida de muestras sigue en curso

Tipo de muestras sanguíneas

- Plasma sanguíneo y suero
- Sedimento sanguíneo (extracción de ADN)

Centros de recogida de muestras:

- Para
- Rondonia
- Acre
- Amazonas

Recogida de las muestras, capacitación y dificultades

La recogida de muestras comenzó solo recientemente en el Brasil, pero se prevé que tres centros completarán la recolección entre agosto y octubre de 2012. La lentitud en el comienzo de la recolección se debe en parte a varios retrasos (durante dos años) en la obtención de las aprobaciones por parte de los Comités de Ética de Investigación Clínica a escala local y nacional; estos comités han solicitado aclaraciones y modificaciones. Todavía está pendiente la aprobación de la recogida de muestras por el comité del Amazonas, aunque ya se cuenta con la aprobación de la instancia nacional. El análisis molecular en los CDC se iniciará cuando se procesen las muestras sanguíneas y se extraiga el ADN en el Instituto Evandro Chagas. El material extraído de estas muestras sanguíneas, al tiempo que una alícuota de plasma se transferirán entonces a los CDC.

Con el propósito de proporcionar capacitación sobre el análisis molecular de la delección de los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* en las poblaciones de parásitos de *P. falciparum*, se llevó a cabo un taller en el Instituto Evandro Chagas en Belem, del 30 de agosto al 10 de septiembre de 2010. Este taller contó con diez participantes (ocho del Brasil, uno de Guyana y uno de Suriname). La formación fue impartida por los doctores John Barnwell y V. Udhayakumar, con la ayuda técnica de la señora Amanda Poe. La finalidad de este taller fue crear capacidad local de realizar las pruebas en Brasil, Guyana y Suriname. La siguiente es la lista de los asistentes a la capacitación:

- Marinete M. Povia, jefe de investigación científica, Instituto Evandro Chagas en Belem, Brasil
- Giselle M. R. Viana, científica, Instituto Evandro Chagas en Belem, Brasil
- Danielle R. L. Barbosa, estudiante, Instituto Evandro Chagas en Belem, Brasil
- Yonne Cheuhan, científica, Fundación de Medicina Tropical del Amazonas, Manaus, Brasil
- Marilia L.O. Guedes, estudiante, Facultades Integradas Maria Coelho Aguiar, Porto Velho, Brasil
- Eponina C. M. Melo, del personal del Laboratorio Central de Cruzeiro do Sul, Cruzeiro do Sul, Acre, Brasil
- Joana D. N. Costa, del personal del Centro de Investigación en Medicina Tropical de Rondonia, Porto Velho, Brasil
- Maristela G. D. Cunha, profesora, Universidad Federal de Para, Belem, Brasil
- Javin Chandrabose, técnico superior de laboratorio médico, del Laboratorio de Referencia de Salud Pública Nacional, Georgetown, Guyana

- Mergiory Labadie-Bracho, científica, Instituto de Ciencias Biomédicas, Paramaribo, Suriname

Resumen de la recogida de muestras en curso y los resultados

El plan actual del análisis de las muestras de los centros de recogida en el Brasil consiste en enviar todas las alícuotas de sedimento sanguíneo y plasma al Instituto Evandro Chagas de Belem, en Para. Allí, un par de alícuotas (sangre y plasma) de cada muestra se conservará a -80°C. De las otras dos alícuotas de cada muestra de sangre se extraerá el ADN; el material extraído de una de ellas se analizará en el Instituto Evandro Chagas y el otro se expedirá a Atlanta para su evaluación en los CDC. Hasta la fecha, se han recogido 85 muestras sanguíneas en Acre, 62 en Rondonia, 42 en Itaituba al oeste del estado de Para y al menos 33 en Goianesia do Para al este del estado de Para cerca a Tukurui. En el Instituto Evandro Chagas ya comenzó la extracción del ADN y el análisis de una porción de las muestras de sangre. Los resultados iniciales obtenidos en los CDC en 14 muestras recogidas en el oriente del estado de Para no revelan ninguna delección de *pfhrp2*, pero los 14 aislados (100%) parecen haber perdido el gen *pfhrp3*. Como se señaló arriba, se prevé que la recogida de muestras se completará entre agosto y octubre de 2012, salvo en el estado del Amazonas debido a la aprobación pendiente del comité local de ética de investigación clínica.

Honduras

Encuesta retrospectiva usando muestras tomadas en Honduras

Total de muestras disponibles para la prueba: 68

Tipo de muestras sanguíneas:

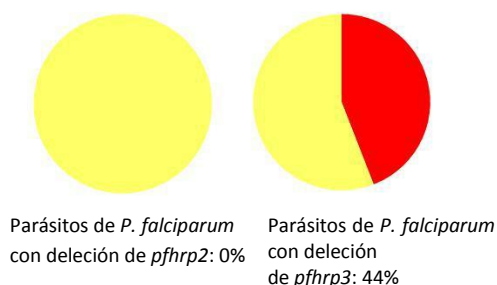
- Gota de sangre en papel de filtro: suministrada
- Sedimento sanguíneo: no suministrado
- Plasma sanguíneo y suero: no suministrados

Centro de recogida de muestras

- Puerto Lempira, provincia de Gracias a Dios

Figura 7. El centro de recogida de muestras y los resultados en Honduras.





Recogida de las muestras, capacitación y dificultades

Existían 68 muestras de un estudio de eficacia de la cloroquina realizado de septiembre de 2008 a septiembre de 2009. Estas muestras se enviaron a los CDC con el fin de analizar los marcadores moleculares de farmacoresistencia y el sobrante de las muestras se utilizó en el presente estudio, según lo solicitó Honduras. El doctor Gustavo Fontecha y la señora Meisy Mendoza-Montoya (Laboratorio Nacional de Malaria, Ministerio de Salud, Honduras) recibieron capacitación en los CDC (del 20 de enero al 22 de febrero de 2011) sobre el análisis molecular de las delecciones de *pfhrp2* y *pfhrp3* (además del análisis molecular de los marcadores de resistencia a cloroquina). Esta colaboración se realizó de manera y los asociados del país están tratando de fortalecer la capacidad de los laboratorios locales en materia de vigilancia molecular de la delección de *pfhrp2*.

Resumen de los resultados

Se analizaron 68 muestras en conformidad con los procedimientos de laboratorio definidos por los CDC. No se excluyó del análisis final ninguna muestra. Ninguna de estas muestras, presentó delección del gen *pfhrp2* (cuadro 6). Se observó que 30 muestras presentaban delecciones de *pfhrp3* (cuadro 6). En ninguna muestra se encontró delección de Mal7P1.230, que es un pseudogen ubicado cerca del gen *pfhrp2* hacia el extremo 5' ni delección de Mal7P1.228, que es un gen de choque térmico ubicado cerca del gen *pfhrp2* en dirección del extremo 3'. Treinta y dos muestras mostraban delección de Mal13P1.475 y 13 muestras delección de P1.485 de Mal13, que son genes flanqueantes de *pfhrp3* (cuadro 6).

Cuadro 6: Resultados resumidos sobre la delección de *pfhrp2*, *pfhrp3* y los genes aledaños en Honduras

País	Centro de recogida	Genes *					
		230	<i>pfhrp2</i>	228	475	<i>pfhrp3</i>	485
Honduras	Puerto Limpera, departamento de Gracias a Dios	0/68 (0%)	0/68 (0%)	0/68 (0%)	32/68 (47,1%)	30/68 (44,1%)	13/68 (19,1%)

* Los datos muestran el número (y el porcentaje) de parásitos que presentaron delecciones génicas en el total de muestras analizadas

Notificación final y publicación

Tan pronto como se completen la recogida de muestras y el análisis de los resultados moleculares en todos los países participantes se preparará un informe final, que se comunicará a los países participantes y demás asociados de la Iniciativa contra la Malaria en

la Amazonía, especialmente la OPS. Se elaborarán manuscritos con los diferentes resultados y se someterán para publicación en una o varias revistas científicas.

Resumen

Anteriormente se había comunicado la ausencia del gen *pfhrp2* en una amplia proporción de parásitos de *P. falciparum* en la cuenca del río Amazonas en el Perú (9). Esta mutación tiene como consecuencia la carencia total de producción del antígeno HRP2 y la imposibilidad de detectar el parásito en la sangre de los pacientes con las pruebas rápidas de diagnóstico, que se basan en la detección de esta proteína. Las pruebas rápidas de diagnóstico de la malaria que se basan en el antígeno HRP2 son las más sensibles, más estables y de utilización más difundida en el diagnóstico de *P. falciparum*. En la actualidad, se han completado o están a punto de completarse los estudios prospectivos iniciales sobre la delección de *pfhrp2* y *pfhrp3* en las poblaciones de *P. falciparum* del Perú, Colombia, Bolivia, Brasil, Guyana, Suriname y otros países que participan en la Iniciativa contra la Malaria en la Amazonía.

En el Perú, la encuesta permitió confirmar la magnitud de la presencia de parásitos negativos para el gen *pfhrp2* y también para el gen *pfhrp3*. Un acontecimiento que ocurrió posteriormente y su estudio pusieron en evidencia que estos parásitos pueden saltar a un nuevo punto distante de transmisión y desencadenar un brote de parasitismo resistente al diagnóstico. La proporción global de delección de *pfhrp2* en Colombia fue cerca de 7,5%; sin embargo, en la costa del Pacífico la tasa fue solo de 3,0% (1 de 34), pero en Tierra Alta en la costa del Caribe fue cercana a 33% (2 de 6) y las delecciones de *pfhrp3* oscilaron entre 32% y 100%. Una investigación retrospectiva indicó que la proporción de parásitos con delección de *pfhrp2* alrededor de Leticia, en Colombia, era equivalente a la proporción observada en el Perú. Otros países participantes han demostrado grados bajos de delección de *pfhrp2* en las poblaciones de parásitos, que oscilan entre 0% en Guyana y Honduras, 4% en Bolivia y 7,7% en Suriname. En este momento, se desconoce el grado y la magnitud de la población de *P. falciparum* negativa para *pfhrp2* en el Brasil, pero se prevé que en octubre o noviembre de 2012 se contará con datos mucho más precisos sobre la delección de *pfhrp2* en este país.

La delección de los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* parece generalizada pero es heterogénea, con proporciones generalmente bajas de parásitos negativos para *pfhrp2* por fuera de la cuenca del río Amazonas del Perú y la región colindante de Colombia, donde existe un alto grado de delección del gen *pfhrp2* en las poblaciones de *P. falciparum* (>25%). Sin embargo, ejemplos como el brote epidémico de parásitos negativos para *pfhrp2* en la costa del Perú y el aumento de los casos de parásitos negativos para *pfhrp2* en Suriname en el 2011 ponen de manifiesto la necesidad de una vigilancia continua.

Recomendaciones

1. Es preciso continuar con la vigilancia de las poblaciones de *P. falciparum* con delección del gen *pfhrp2*, mediante encuestas realizadas al menos cada tres años, con el objeto de evaluar toda tendencia continua o las nuevas tendencias de parásitos resistentes al diagnóstico.

2. El número de centros examinados debe constituir una representación adecuada y abarcar las diferentes zonas de transmisión de *P. falciparum* en un país. Además, el número de muestras recogidas en un centro dado de la encuesta debe ser lo suficientemente grande, que permita detectar y evaluar de manera adecuada la tendencia de la presencia de parásitos negativos para *pfhrp2* y su proporción, donde las tasas son inferiores a 10% (alrededor de 100 muestras).
3. Las muestras deben consistir en muestras de sangre, con separación del sedimento sanguíneo para la extracción del ADN y el análisis molecular y del plasma para la detección de HRP2 por elisa, de manera que se puedan verificar los resultados del análisis molecular. Los análisis se deben realizar según los protocolos establecidos, con las normas apropiadas y aplicando las medidas de control de la calidad.
4. Cuando se detecten tasas de negatividad de *pfhrp2* de 10% o superiores en la población de parásitos de una zona evaluada, se debe desaconsejar y discontinuar el uso de las pruebas diagnósticas rápidas basadas en el antígeno HRP2. Se deben escoger otras pruebas que detecten la deshidrogenasa láctica del parásito (pLDH) exclusiva de *P. falciparum* o una pan pLDH de las listas de productos recomendados, escogidos por el Fondo Mundial o la OMS con base en el programa de evaluación de pruebas rápidas de diagnóstico de la malaria de la OMS, la Investigación sobre Enfermedades Tropicales, la Iniciativa contra la Malaria en la Amazonía y los CDC. Es extremadamente importante mencionar que en las zonas de baja transmisión y de muy baja transmisión de la malaria, se deben tener en cuenta umbrales más bajos de detección, pues es necesario tomar todas las medidas posibles que reduzcan al mínimo los resultados negativos falsos. Además, aunque se apliquen las pruebas rápidas de diagnóstico de la malaria, las autoridades de salud pública deben continuar los esfuerzos encaminados a mantener y mejorar la capacidad de realizar el examen microscópico en los países de América del Sur y Centroamérica, pues la microscopia sigue siendo la piedra angular del diagnóstico, en el tratamiento corriente de los casos de malaria.

1. World Malaria Report 2008. WHO, Ginebra.
<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/MAL2008-SumKey-SP.pdf/>
2. Guidelines for the treatment of malaria. WHO, Ginebra, 2006.
<http://www.who.int/malaria/treatmentguidelines.html>
3. The Global Malaria Action Plan. Roll Back Malaria Partnership, Ginebra, 2008.
<http://www.rollbackmalaria.org/gmap/index.html>
4. Malaria Rapid Diagnostic Tests, WHO-WPRO website. Selecting and purchasing malaria RDTs: A total list of ISO13485 certified manufacturers,
http://www.wpro.who.int/sites/rdt/using_rdt/selecting_rdt/
5. Baker J, McCarthy J, Gatton M, Kyle DE, Belizario V, Luchavez J, Bell D, Cheng Q: Genetic diversity of Plasmodium falciparum histidine-rich protein 2 (PfHRP2) and its effect on the performance of PfHRP2-based rapid diagnostic tests. *J Infect Dis* 2005,

192(5):870-877.

6. Lee N, Baker J, Andrews KT, Gatton M, Bell D, Cheng Q, McCarthy J: Effect of sequence variation in *Plasmodium falciparum* histidine- rich protein 2 on binding of specific monoclonal antibodies: Implications for rapid diagnostic tests for malaria. *J Clin Microbiol* 2006, 44(8):2773-2778.
7. Malaria Rapid Diagnostic Tests. WHO-WPRO Sitio web. <http://www.wpro.who.int/sites/rdt/>
8. Improving quality diagnostic testing. Foundation for Innovative New Diagnostics (FIND), Ginebra. http://www.finddiagnostics.org/programs/malaria/find_activities/
9. Gamboa D, Ho MF, Bendezu J, Torres K, Chiodini PL, Barnwell JW, Incardona S, Perkins M, Bell D, McCarthy J, Cheng Q. A large proportion of *P. falciparum* isolates in the Amazon region of Peru lack *pfhrp2* and *pfhrp3*: implications for malaria rapid diagnostic tests. *PLoS One* 2010, 5(1):e8091.
10. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, Thaithong S, Brown KN. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 1993, 61(2):315-320.

Apéndice I: Resumen de las muestras con delección génica de *pfhrp2*, *pfhrp3* y los genes aledaños en América del Sur y Centroamérica

Genes analizados	Países					
	Bolivia (%)	Colombia (%)	Guyana (%)	Perú (%)	Suriname (%)	Honduras (%)
230	9 (36%)	21 (52,2%)	40 (41,2%)	73 (78,5%)	17 (21,8%)	0 (0%)
<i>pfhrp2</i>	1 (4%)	3 (7,5%)	0 (0%)	31 (33,3%)	11 (14,1%)	0 (0%)
228	0 (0%)	1 (2,5%)	1 (1,0%)	17 (18,3%)	3 (3,8%)	0 (0%)
475	12 (48%)	17 (42,5%)	0 (0%)	36 (38,7%)	0 (0%)	32 (47,5%)
<i>pfhrp3</i>	17 (68%)	18 (45%)	0 (0%)	50 (53,8%)	3 (3,84%)	30 (44,1%)
485	14 (56%)	13 (32,5%)	0 (0%)	18 (19,4%)	1 (1,3%)	13 (19,1%)
Total de muestras	25	40	97	93	78	68

Apéndice II: Cebadores utilizados en la amplificación de los genes dianas

En la amplificación de los genes dianas se usaron los siguientes cebadores:

- 1) Cebadores del ADN 18S ribosómico (confirmación de la presencia de *Plasmodium falciparum* en las muestras)

- 1.^a reacción (específica de género)

AL3765: 5' CCT GTT GTT GCC TTA AAC TTC 3'

AL3766: 5' TTA AAA TTG TTG CAG TTA AAA CG 3'

- 2.^a reacción (específica de la especie *P. falciparum*)

AL3767: 5' TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AA ATA TAT T 3'

AL3768: 5' ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC 3'

- 2) Cebadores del gen *msp2* (RPC múltiple)

- 1.^a reacción

M1-O directo: 5' CTA GAA GCT TTAGAA GAT GCA GTA TTG 3'

M1-O inverso: 5' CTT AAA TAG TAT TCT AAT TCA AGT GGA TCA 3'

M2-O directo: 5' ATG AAG GTA ATT AAA ACA TTG TCT ATT ATA 3'

M2-O inverso: 5' CTT TGT TAC CAT CGG TAC ATT CTT 3'

G-O directo: 5' TGA ATT TGA AGA TGT TCA CAC TGA AC 3'

G-O inverso: 5' GTG GAA TTG CTT TTT CTT CAA CAC TAA 3'

- 2.^a reacción

M1-K directo: 5' AAA TGA AGA AGA AAT TAC TAC AAA AGG TGC 3'

M1-K inverso: 5' GCT TGC ATC AGC TGG AGG GCT TGC ACC AGA 3'

M1-M directo: 5' AAA TGA AGG AAC AAG TGG AAC AGC TGT TAC 3'

M1-M inverso: 5' ATC TGA AGG ATT TGT ACG TCT TGA ATT ACC 3'

M1-R directo: 5' TAA AGG ATG GAG CAA ATA CTC AAG TTG TTG 3'

M1-R inverso: 5' CAA GTA ATT TTG AAC TCT ATG TTT TAA ATC AGC GTA 3'

M2-FC directo: 5' AAT ACT AAG AGT GTA GGT GCA TAT GCT TCC A 3'

M2-FC inverso: 5' TTT TAT TTG GTG CAT TGC CAG AAC TTG AAC 3'

M2-IC directo: 5' AGA AGT ARG GCA GAA AGT AAG CCT TCT ACT 3'

M2-IC inverso: 5' GAT TGT AAT TCG GGG GAT TCA GTT TGT TCG 3'

- 3) Cebadores del gen *msp2* (RPC anidada)

- 1.^a reacción

MSP2 directo1: 5' GAA GGT AAT TAA AAC ATT GTC 3'

MSP2 inverso1 (2): 5' GAT GTT GCT GCT CCA CAG 3'

- 2.^a reacción

MSP2 directo2: 5' GAG TAT AAG GAG AAG TAT G 3'

MSP2 inverso2: 5' CTA GAA CCA TGA ATA TGT CC 3'

- 4) Exón 1-2 de *pfhrp2*

- 1.^a reacción

HRP2E12 directo1: 5' GGT TTC CTT CTC AAA AAA TAA AG 3'

HRP2E12 inverso1: 5' TCT ACA TGT GCT TGA GTT TCG 3'

- 2.^a reacción

HRP2E12 directo: 5' GTA TTA TCC GCT GCC GTT TTT GCC 3'

HRP2E12 inverso: 5' CTA CAC AAG TTA TTA TTA AAT GCG GAA 3'

- 5) Cebador del gen Mal7P1.230 (gen en dirección 5' de *pfhrp2*; un pseudogen)
- 1.^a reacción
- 230 directo: 5' GAT ATC ATT AGA AAA CAA GAG CTT AG 3'
- 230 inverso: 5' TAT CCA ATC CTT CCT TTG CAA CAC C 3'
- 2.^a reacción
- 230 directo: 5' TAT GAA CGC AAT TTA AGT GAG GCA G 3'
- 230 inverso: 5' TAT CCA ATC CTT CCT TTG CAA CAC C 3'
- 6) Mal7P1.228 (gen en dirección 3' de *pfhrp2*, que codifica una proteína de choque térmico)
- 1.^a reacción
- 228 directo: 5' AGA CAA GCT ACC AAA GAT GCA GGT G 3'
- 228 inverso: 5' TAA ATG TGT ATC TCC TGA GGT AGC 3'
- 2.^a reacción
- 228 directo: 5' CCA TTG CTG GTT TAA ATG TTT TAA G 3'
- 228 inverso: 5' TAA ATG TGT ATC TCC TGA GGT AGC 3'
- 7) Exón 1-2 de *pfhrp3*
- 1.^a reacción
- HRP3E12 directo: 5' GGT TTC CTT CTC AAA AAA TAA AA 3'
- HRP3E12 inverso: 5' CCT GCA TGT GCT TGA CTT TA 3'
- 2.^a reacción
- HRP3E12 directo: 5' ATA TTA TC GCT GCC GTT TTT GCT 3'
- HRP3E12 inverso: 5' CTA AAC AAG TTA TTG TTA AAT TCG GAG 3'
- 8) Mal13PMal13PMal13P1.475 (gen en dirección 5' de *pfhrp3*, que codifica una proteína exportada cuya función se desconoce)
- 1.^a reacción
- 475 directo: 5' TTC ATG AGT AGA TGT CCT AGG AG 3'
- 475 inverso: 5' TCG TAC AAT TCA TCA TAC TCA CC 3'
- 2.^a reacción
- 475 directo: 5' TTC ATG AGT AGA TGT CCT AGG AG 3'
- 475 inverso: 5' GGA TGT TTC GAC ATT TTC GTC G 3'
- 9) Mal13PMal13PMal13P1.485 (gen en dirección 3' de *pfhrp3*, que codifica la sintetasa de Acil-coA)
- 1.^a reacción
- 485 directo: 5' TTG AGT GCA ATG ATG AGT GGA G 3'
- 485 inverso: 5' AAA TCA TTT CCT TTT ACA CTA GTG C 3'
- 2.^a reacción
- 485 directo: 5' GTT ACT ACA TTA GTG ATG CAT TC 3'
- 485 inverso: 5' AAA TCA TTT CCT TTT ACA CTA GTG C 3'