

Notas Científicas

¿Es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) una alternativa al diagnóstico microscópico de la malaria en el estado Bolívar, Venezuela? Comparación de ambos métodos

Is the polymerase chain reaction (PCR) an alternative to microscopic diagnosis of malaria in Bolivar State, Venezuela? Comparison of both methods

Sandra Abou Orm¹, Angélica Jiménez¹, Irma F. Agrela¹, Nardi Torres² & Flor Herrera^{1*}

RESUMEN

A pesar de las limitaciones señaladas para el diagnóstico microscópico de la malaria (gota gruesa y extendido), éste es el método usado en las áreas endémicas del mundo. Con el propósito de evaluar nuevas herramientas que permitan superar las limitaciones del diagnóstico microscópico, se estandarizó una prueba molecular basada en la reacción en cadena de polimerasa (PCR) en sólo dos microtubos y se comparó con el diagnóstico microscópico. Para ello se realizaron ambos diagnósticos en 73 muestras sanguíneas obtenidas a partir de personas con síntomas compatibles con malaria y residentes del municipio Sifontes (estado Bolívar, Venezuela). Del total de muestras examinadas, 36 (49,3%) resultaron positivas por microscopía mientras que la PCR resultó positiva en 41 de las muestras analizadas (56,2%); de las muestras positivas por PCR seis resultaron negativas por microscopía y sólo una vez la PCR resultó negativa en una muestra positiva por microscopía; la sensibilidad de la PCR estandarizada fue de 97,2% y la especificidad fue 100%; el grado de acuerdo entre ambas pruebas fue de 90,4% y el índice de $\kappa=0,8355$ (muy buena). Por su alta sensibilidad y especificidad la PCR podría ser implementada a fin de valorar la calidad y eficacia del diagnóstico microscópico.

Palabras claves: malaria, diagnóstico, PCR, microscopía, Venezuela.

SUMMARY

Despite limitations reported for the microscopic diagnosis of malaria (thick and thin blood films) this is the method used in endemic areas around the world. In order to assess new tools for overcoming these limitations, a molecular test was standardized based on the polymerase chain reaction (PCR), in which only two micro-tubes were used, and compared with microscopic diagnosis. Both diagnosis methods were performed on 73 blood samples from patients with symptoms compatible with malaria and resident in Sifontes municipality (Bolívar State, Venezuela). Of the samples examined, microscopic examination gave 36 (49.3%) positives whilst 41 (56.2%) were PCR positive. Six of the PCR positive samples were reported as negative by microscopic examination but only one sample registered as positive by this method was PCR negative. The sensitivity of the standardized PCR was 97.2% and the specificity, 100%; the degree of agreement between the two tests was 90.4% and the κ index = 0.8355 (very good). The high sensitivity and specificity of the PCR method suggests that it could be implemented to assess the quality and effectiveness of microscopic diagnosis.

Keys Words: malaria, diagnosis, microscopy, PCR, Venezuela.

En las áreas donde la malaria es endémica, incluyendo Venezuela, la detección e identificación de la(s) especie(s) de *Plasmodium* responsable(s) del

caso, se realiza mediante diagnóstico microscópico (gota gruesa y extendido), técnica que permite, no sólo, la identificación de la especie responsable del

¹ Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Sede Aragua; Maracay, estado Aragua. Venezuela.

² Centro de Investigaciones de Campo Dr. Francesco Vitanza; Tumeremo, estado Bolívar. Venezuela.

*Autor de correspondencia: flormhq@gmail.com

cuadro clínico sino también determina la intensidad de la infección; es económica y simple (Santana-Morales *et al.*, 2012. *Malar. J.* **11**: 199. Disponible en: <http://www.malariajournal.com/content/11/1/199>). Sin embargo, se ha señalado que tiene escasa sensibilidad (Ochola *et al.*, 2006. *Lancet Infect Dis.* **6**: 582-588) e importante limitación en el diagnóstico de las infecciones mixtas (Coleman *et al.*, 2006. *Malar. J.* **5**: 121. Disponible en: <http://www.malariajournal.com/content/5/1/121>). También puede fallar si las láminas no son preparadas correctamente o cuando la forma parasitaria predominante son trofozoítos jóvenes (o en anillo) (McKenzies *et al.*, 2003. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **69**: 372-376) o incluso si el microscopista que realiza el diagnóstico tiene poca experiencia o un pobre entrenamiento (Dini & Frean, 2003. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **97**: 675-677).

Aunque las técnicas de biología molecular y particularmente las que dependen de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son costosas y complejas han demostrado ser capaces de detectar parasitemias muy bajas, identificar la especie de *Plasmodium* responsable del cuadro clínico y diagnosticar infecciones mixtas (Rodulfo *et al.*, 2007. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **40**: 535-543). Por ello su aplicación permitiría superar las limitaciones del diagnóstico microscópico. El objetivo de este trabajo fue estandarizar una prueba de PCR utilizando sólo dos reacciones mediante la modalidad múltiple de la PCR, disminuyendo así el costo de la prueba y comparar los resultados obtenidos con la técnica de referencia.

En el estudio participaron 73 personas con síntomas compatibles con malaria quienes acudían al Centro de Investigaciones de Campo Dr. Francesco Vitanza ubicado en Tumeremo, capital del municipio Sifontes del estado Bolívar. Personas > 5 años y < 80 años, pacientes con enfermedades crónicas y mujeres embarazadas fueron excluidos del estudio. Además se incluyeron 21 muestras sanguíneas de personas que no habían visitado zonas endémicas de malaria. Todas las personas que participaron en el estudio o sus representantes legales fueron informadas sobre el propósito y los objetivos del estudio y se solicitó su participación mediante la firma de un consentimiento informado. El protocolo de trabajo tuvo la aprobación del Comité de Bioética del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Carabobo.

Para la realización de la prueba de PCR, a las personas que aceptaron participar en el estudio se les tomó una muestra de sangre completa a la cual se adicionó EDTA; además a cada participantes, se les realizó gota gruesa por punción en el lóbulo de la oreja; posteriormente, la lámina se coloreó con Giemsa (López, 1988 OPS. Publ. Científica N°. 512., pp 39-50) y se examinó por microscopistas experimentados del Centro de Investigaciones de Campo Dr. Francesco Vitanza (Tumeremo, estado Bolívar).

El contenido de G-C y la formación de homo y heterodímeros, así como también el grado de complementariedad de los cebadores diseñados por Snounou *et al.* (1993. *Mol. Biochem. Parasitol.* **61**: 315-329), fue verificado utilizando los programas Oligo Analyzer versión 1.0.3 y Gene Runner versión 3.01. El análisis permitió obtener valores de ΔG mayores a -8 kcal/mol, indicando que los cebadores no forman dímeros entre ellos; tampoco se dan hibridaciones inespecíficas, ni la formación de estructuras secundarias al ponerlos juntos en un mismo microtubo, bajo el esquema de temperaturas utilizadas en esta investigación.

El ADN de cada muestra fue extraído utilizando la metodología propuesta por Rivero *et al.* (2004. *Inter. J. Trop. Insect Sci.* **24**: 266-269), y para la amplificación del genoma de *Plasmodium* spp. se utilizó la modalidad múltiple de la PCR, que permitió primero la amplificación de un fragmento amplio y común a cuatro especies de *Plasmodium*, seguido de una segunda PCR y para ello se siguió la metodología descrita por Snounou *et al.* (1993. *Mol. Biochem. Parasitol.* **61**: 315-329) con una modificación en la segunda PCR la cual consistió en colocar un total de ocho cebadores (un par para cada especie) en un único microtubo. En ambas PCRs la mezcla de reacción estuvo constituida por el tampón de la reacción (50 mM Tris-HCl y 50 mM NaCl; pH= 8,5) (Colorless GoTaq® Flexi), 1,5mM de MgCl₂, 60 µM de cada uno de los desoxirribonucleótido trifosfato (dNTPs) y 250 nM de cada cebador. Para la primera PCR se añadió a cada tubo de reacción 100 ng del ADN extraído a partir de las muestras sanguíneas a evaluar mientras que en la segunda PCR se utilizó 2,5 µL de una dilución 1/100 del producto obtenido en la primera reacción. En ambos casos el volumen final de reacción fue de 25 µL. La amplificación del ADN se realizó en un termociclador BIO-RAD modelo PTC 2000TM

incubando las muestras a 95°C por 5 minutos, luego se realizaron 24 y 30 ciclos (respectivamente) a 94°C por 1 minuto, 58°C por 2 minutos, 72°C por 2 minutos y una extensión final a 72°C por 5 minutos. En cada prueba se incluyeron controles positivos, negativos y mixtos, este último contenía el ADN de dos o más especies de *Plasmodium* y los productos obtenidos se observaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/mL). Cada muestra fue analizada por triplicado, siendo los resultados 100% reproducibles. La Fig. 1 muestra los productos de PCR obtenidos a partir del ADN extraído de las muestras sanguíneas de las personas que participaron en el estudio; así como también de los controles positivos, negativos y mixtos.

Los resultados obtenidos permitieron calcular la sensibilidad y especificidad de la prueba de PCR en relación al método de referencia (Altman & Bland, 1994. *BMJ*. **308**: 1552) y el grado de acuerdo (índice de kappa) entre la PCR y el examen microscópico (Landis & Koch, 1977. *Biometrics*. **33**: 159-174).

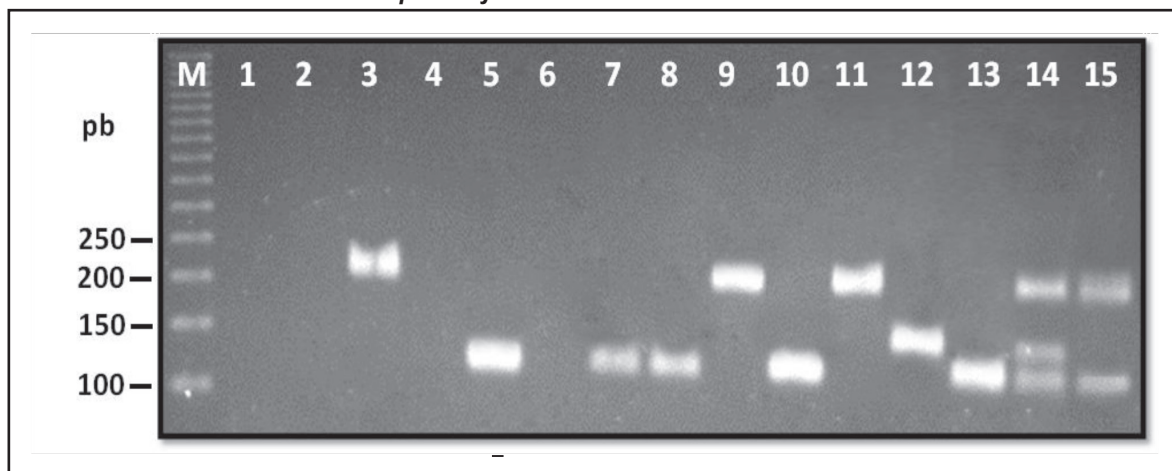
Del total de muestras sanguíneas examinadas por microscopia 49,3% resultaron positivas (36/73). La especie parasitaria identificada con más frecuencia fue *P. vivax* (30/36; 83,3%) mientras que *P. falciparum* fue identificado en seis de las 36 (16,7%) muestras positivas. Por otra parte, la prueba

de PCR resultó positiva en 41 de las 73 muestras examinadas (56,2%); del total de muestras positivas 80,5% (33/41) resultaron positivas a *P. vivax* y 19,5% (8/41) fueron positivas a *P. falciparum*, mientras que las 21 muestras procedentes de personas de áreas no endémicas, resultaron negativas. La prueba de PCR resultó positiva en seis de las muestras negativas para la prueba de microscopia y sólo una vez la PCR resultó negativa en una muestra positiva por microscopia (Tabla I). Cabe destacar que no se detectaron infecciones mixtas ni por PCR ni por microscopia.

La especificidad y sensibilidad de la prueba de PCR estandarizada en comparación con el método de referencia resultó 100 y 97%, respectivamente y el grado de acuerdo entre ambas pruebas (κ) fue de 0,8355 (IC95= 0,7197-0,9513) lo cual sugiere que la concordancia en los resultados obtenidos mediante ambas pruebas es muy bueno, de hecho el porcentaje de concordancia entre la PCR múltiple y el examen microscópico mediante gota gruesa fue de 90,4%.

La mayor parte de los protocolos para el diagnóstico molecular de malaria describen pruebas de PCR que involucran el uso de cinco reacciones separadas para detectar primero el género y posteriormente identificar la especie de *Plasmodium* presuntamente presente en la muestra (Snounou *et al.*, 1993. *Mol. Biochem. Parasitol.* **61**:

Fig. 1. Productos de PCR múltiple para malaria. M: marcador de tamaño molecular 50pb (Promega); línea 1: control negativo de reacción; líneas 3 y 9: muestras de sangre positivas a *P. falciparum* (205pb); líneas 5, 7, 8 y 10: muestras de sangre positivas a *P. vivax* (120 pb); líneas 2, 4 y 6: muestras negativas; línea 11: control positivo de *P. falciparum* (205pb); línea 12: control positivo de *P. malariae* (144pb); línea 13: control positivo de *P. vivax* (120pb); línea 14: control mixto 1 de *P. falciparum*, *P. malariae* y *P. vivax*; línea 15: control mixto 2 de *P. falciparum* y *P. vivax*.



315-329; Morassin *et al.*, 2002. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **66**: 503-508; Mens *et al.*, 2007. *Trop. Med. Int. Health.* **12**: 238-244). La PCR estandarizada aquí utiliza sólo dos reacciones por paciente, esto reduce significativamente los costos y disminuye su laboriosidad y el tiempo de respuesta, sin afectar la sensibilidad y especificidad de la prueba, que en nuestro caso, resultaron similares a los publicados por otros investigadores (Johnston *et al.*, 2006. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 1087-1089; Singh *et al.*, 2013. *J. Biol. Agric. Health.* **3**: 31-38).

Adicionalmente, se ha señalado que la sensibilidad analítica de la PCR es mucho más alta que la del diagnóstico microscópico (menor a 5 parásitos/ μ L de sangre) (Roper *et al.*, 1996. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **54**: 325-331), por ello es posible identificar casos de malaria que no son detectados usando el método tradicional (Okell *et al.*, 2009. *J. Infect. Dis.* **200**: 1509-1517), tal como se observó aquí, seis casos no fueron identificados mediante el diagnóstico microscópico pero sí mediante la prueba de PCR, esto representó el 8,2% del total de muestras analizadas.

Durante el desarrollo de esta investigación se observó un diagnóstico de malaria por *P. vivax* que resultó ser un resultado negativo mediante PCR, es posible que la secuencia blanco de los cebadores haya sufrido mutación/delección o el ADN se haya degradado (Batwala *et al.*, 2010. *Malar. J.* **9**: 349. Disponible en <http://www.malariajournal.com/content/9/1/349>) o podría ser atribuido a la observación de un artefacto durante la realización del diagnóstico microscópico que confundió al microscopista (Calderón *et al.*, 2006. *Mosaico Cient.* **3**: 43-48). Por otra parte, y aunque no se observó en este estudio, durante el diagnóstico microscópico es frecuente que se confunda una especie de *Plasmodium* con otra (Parajuli *et al.*, 2009. *Nepal Med. Coll. J.*

11: 23-27; López *et al.*, 2011. *Rev. Ciencia Tecnol.* **9**: 68-81; Fontecha *et al.*, 2012. *Malar. J.* **11**: 119. Disponible en <http://www.malariajournal.com/content/11/1/119>); estos errores pueden evitarse utilizando la PCR, que en nuestro caso demostró un 100% de especificidad.

Aunque durante este estudio no se identificaron casos de infecciones mixtas mediante la PCR ni mediante el diagnóstico microscópico, los controles mixtos de PCR muestran las bandas correspondientes a las diferentes especies de *Plasmodium* aún cuando el ADN de varias especies se encuentra en el mismo microtubo. Esto sugiere la capacidad de la PCR aquí estandarizada en el diagnóstico de las infecciones mixtas, uno de los problemas del diagnóstico microscópico de la malaria en Venezuela (Cáceres *et al.*, 2006. *Bol. Mal. Salud Amb.* **46**: 49-57).

En nuestro estudio los errores del diagnóstico microscópico alcanzaron 9,6%; pese a ello se observó una muy buena concordancia entre ambos métodos lo cual puede atribuirse a que los participantes fueron personas sintomáticas, residentes de una de las áreas maláricas de Venezuela más activas (Cáceres, 2012. *Bol. Mal. Salud Amb.* **52**: 275-285) y muy probablemente portadoras de altas parasitemias, se ha reportado que existe una buena concordancia entre PCR y diagnóstico microscópico cuando la densidad parasitaria es relativamente alta (>500 parásitos/ μ L) (Suárez-Mutis & Coura, 2006. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **39**: 495-497; Nicastrí *et al.*, 2009. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **80**: 712-717); es necesario valorar la PCR aquí estandarizada en una muestra de individuos asintomáticos a fin de verificar su potencial en el diagnóstico de este tipo de infecciones. Por otro lado, la experiencia del microscopista determina en gran medida el resultado del diagnóstico microscópico (Ginorio Gavito *et al.*, 2004. *Rev. Cubana Med.*

Tabla I. Resultados obtenidos por microscopia (gota gruesa) y reacción en cadena de la polimerasa desarrollada.

Microscopia (gota gruesa)	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)			Totales
	<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i>	Negativo	
<i>P. vivax</i>	29	0	1	30
<i>P. falciparum</i>	0	6	0	6
Negativo	4	2	31	37
Totales	33	8	32	73

Trop. **56**: 49-53; Rosas-Aguirre *et al.*, 2010. *Rev. Perú Med. Exp. Salud Pública.* **27**: 540-547) en este estudio los microscopistas eran expertos en la lectura de las láminas, lo que pudo haber determinado la muy buena concordancia entre ambos métodos obtenida en esta investigación ya que se ha reportado que la capacitación y el entrenamiento regular y sistemático disminuye los errores del diagnóstico microscópico de la malaria (Obare *et al.*, 2013. *Malar. J.* **12**: 113. Disponible en: <http://www.malariajournal.com/content/12/1/113>).

Debido a las implicaciones individuales y colectivas, el diagnóstico de la malaria no admite errores; gracias a su alta especificidad y sensibilidad, la PCR representa una alternativa al diagnóstico microscópico de la malaria pero por su costo y la complejidad en su aplicación no parecen ser una opción viable; no obstante, la PCR podría servir para

evaluar periódicamente la calidad y confiabilidad de los resultados del diagnóstico microscópico e identificar las áreas donde nuestros microscopistas requieren reforzar sus conocimientos.

Conflicto de intereses

No surgieron conflictos de intereses en el desarrollo de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a las personas que participaron en el estudio y al Dr. Jorge Moreno por facilitarnos las instalaciones para la toma de muestra y al personal a su cargo por la realización de la gota gruesa. Este estudio fue financiado por el Proyecto de Misión Ciencia N°. 2008000911-1.

Recibido el 04/10/2013
Aceptado el 09/05/2014