PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

ESCUELA DE BIOANÁLISIS

DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE BIOQUÍMICA CLÍNICA

FENOTIPOS DEL SISTEMA DUFFY Y SU RELACIÓN CON MALARIA ASINTOMÁTICA EN POBLADORES DEL SECTOR "50 CASAS" DE LA PARROQUIA VUELTA LARGA DEL CANTÓN Y PROVINCIA DE ESMERALDAS DURANTE EL PERIODO 2015.

PULLAS BAHAMONDE MARÍA FERNANDA

ZÚÑIGA SOSA EVELIN ALEXANDRA

DIRECTORA: Máster. Rosa Chiriboga Ponce.

QUITO, 2016

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, PULLAS BAHAMONDE MARÍA FERNANDA, C.I. 172553050-3; autora del trabajo de graduación intitulado: Fenotipos del sistema Duffy y su relación con malaria asintomática en pobladores del sector “50 casas” de la parroquia Vuelta Larga del cantón y provincia de Esmeraldas durante el periodo 2015, previa a la obtención del grado académico de BIOQUÍMICA CLÍNICA en la Escuela de Bioanálisis:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.



PULLAS BAHAMONDE MARÍA FERNANDA, C.I. 172553050-3

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, ZÚÑIGA SOSA EVELIN ALEXANDRA, C.I. 080348416-1; autora del trabajo de graduación intitulado: Fenotipos del sistema Duffy y su relación con malaria asintomática en pobladores del sector “50 casas” de la parroquia Vuelta Larga del cantón y provincia de Esmeraldas durante el periodo 2015, previa a la obtención del grado académico de BIOQUÍMICA CLÍNICA en la Escuela de Bioanálisis:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.



ZÚÑIGA SOSA EVELIN ALEXANDRA, C.I. 080348416-1

DEDICATORIA

A Dios, El Divino Niño y la Virgen María por ser mi fortaleza, porque cuando estuve cargada de preocupaciones, sus consuelos me llenaron de alegría, por la salud que me ha proporcionado para culminar con esta meta y porque todo lo puedo apoyada en su divida gracia y en la perfección de sus tiempos.

A mi madre, Advertise Myrian Sosa Rodríguez que, aunque no hay palabras suficientes para expresarte la inmensidad de mi agradecimiento y lo maravilloso que es tenerla en mi vida, le dedico esto con inmenso amor porque es el pilar más importante de mi vida quien fue mi guía y me apoyo incondicionalmente porque desconoció de distancias y de imposibles, porque siempre creyó en mí y todo lo que podía lograr y, aunque la distancia nos separa ella está presente siempre de corazón proporcionando felicidad en mi alma, demostrándome que con amor y paciencia todo es posible. Es por ella, esa mujer maravillosa y excepcional que me fue mi primer regalo de vida que luché cada día para obtener esto y hoy vuelvo a decir VA POR TI MAMÁ esto y mucho más.

A mi papá, mis hermanos Eder, Mariuxi y Carlos porque siempre están para mí y a mi sobrinos Eliel y Elian que son paz y alegría en mi vida.

Evelin Zúñiga Sosa

DEDICATORIA

A Dios y a la Virgen de la Merced, por sus bendiciones en este proceso y por la fortaleza para lograr mis objetivos.

A mis padres, Angelita Bahamonde y Gonzalo Pullas quienes han guiado mi vida con su ejemplo de perseverancia, amor y trabajo. Este estudio les dedico principalmente a ustedes por hacer de mí una profesional y siempre estar conmigo en cada momento apoyándome cuando más he necesitado.

A mí querida hermana Lissette quien con sus ocurrencias me ha dado alegría y me ha motivado cada día para ser una buena hermana mayor.

A mi querida universidad, que con su equipo docente, sus normas y reglamentos, me han formado como una profesional llena de valores éticos y molares dispuesta a servir a la sociedad de la mejor manera.

María Fernanda Pullas B.

AGRADECIMIENTO

A Dios, nuestra gratitud a Él será eterna por ser nuestra guía espiritual y brindarnos sabiduría en todas las decisiones que se tomaron durante este proceso, por las bendiciones recibidas, por la vida y salud, por concedernos este privilegio y regalarnos en este caminar personas excepcionales a las que tenemos mucho que agradecer tales como:

Los miembros de nuestras familias, quienes fueron un apoyo incondicional y nos motivaron a diario para continuar y nunca desfallecer.

A nuestra Directora, Máster Rosa Chiriboga Ponce por su labor, compromiso y dedicación, por ser nuestra compañera, amiga y apoyarnos en este logro con entusiasmo y muchas sonrisas, convirtiéndose en un ejemplo personal y profesional

A la Dra. Nadia Bernal Zambrano, Directora del Distrito 08D01 – Esmeraldas - Salud por permitirnos realizar el estudio en la zona y la Dra. Alexandra Bennet por sus sabios consejos para llevar a cabo nuestra labor.

De manera muy especial queremos agradecer al Lic. Andrés González Rodríguez y la Lic. Carolina Crespo Proaño por su inmensa ayuda en todas nuestras dudas y problemas, de igual manera queremos dar mil gracias a Lic. Eduardo Villacís, Lic. Oscar Puente, Máster Fernando Santacruz, los Bioquímicos Carolina Satán y Rafael Tamayo, la Ing. Andrea Manzano por toda la asistencia que nos brindaron, al Dr. Fabián Sáenz y al CIEIC-PUCE por permitirnos culminar con este proceso.

A la Escuela de Bioanálisis y a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por ser nuestros lugares de crecimiento personal y profesional.

Evelin y Ma. Fernanda

RESUMEN

Fenotipos del sistema Duffy y su relación con malaria asintomática en pobladores del sector "50 casas" de la parroquia Vuelta Larga del cantón y provincia de Esmeraldas durante el periodo 2015

Introducción: En el Ecuador la malaria ha disminuido en los últimos diez años; sin embargo, se han reportado brotes de la enfermedad en zonas altamente endémicas durante el año 2013, hecho ocurrido en el sector "50 casas" del cantón y provincia de Esmeraldas, convirtiéndose así en una enfermedad reemergente. Estudios publicados sobre el efecto protector a la infección malárica por *P. vivax* han sido ampliamente descritos por la ausencia del grupo sanguíneo Duffy (Fy) en individuos de descendencia afroamericana y aunque, este aspecto ha sido considerado, otros estudios revelan que *P. vivax* puede infectar a los glóbulos rojos y causar enfermedad clínica en personas Duffy-negativos. Esto sugiere que la relación entre *P. vivax* y antígeno Duffy es más compleja de lo que se describe habitualmente, motivo por el cual el objetivo del presente estudio es determinar la relación entre malaria asintomática y el sistema sanguíneo Duffy. **Materiales y Métodos:** Se analizó un total de 384 muestras a las que se caracterizó mediante Pruebas de Diagnóstico Rápido (PDR), fenotipificación serológica del sistema Duffy, ELISA (EIA) y se realizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real a las muestras con fenotipos Duffy negativo reactivas y no reactivas en EIA. **Resultados:** En PDR todas las muestras fueron negativas. Se estableció una mayor frecuencia del fenotipo Fy(a-b) con el 39.8% del total de la población de estudio, de los cuales el 72% se identifican étnicamente como "negros" y el 27,2% como "mestizos". De total de individuos Duffy negativo, se determinó que 43 (11,19%) presentaron resultados reactivos en EIA y de estas 2/43 muestras (4,65%) presentaban ADN de *P.* vivax y 1/43 (2,32) presentaban ADN de *P. falciparum,* y en las muestras no reactivas para anticuerpos contra malaria se identificó que 9/110 (8,18%) tenían ADN de *P. vivax* y 5/110 (4,54%) de *P. falciparum.* **Conclusiones y Recomendaciones:** Se estableció la relación entre el fenotipo Fy(a-b-) y la identificación étnica de los habitantes, además de la existencia de seudo-inmunidad contra el parásito al detectarse anticuerpos anti-malaria. La técnica molecular PCR en tiempo real determinó la existencia de individuos asintomáticos de *P. vivax,* comprobándose así que el sistema Duffy null proporciona inmunidad natural al portador de este fenotipo, razón por la cual se recomienda al Ministerio de Salud Pública que se implemente algoritmos de detección que permitan identificar pacientes asintomáticos de la enfermedad en zonas endémicas, con el fin de evitar brotes aislados a futuro y asegurar la calidad de vida de los pobladores.

ABSTRACT

Duffy phenotypes system and its relationship with asymptomatic malaria in people in the sector "50 Casas" of the parish "Vuelta Larga" canton and province of Esmeraldas during the period 2015.

Introduction: In Ecuador malaria has declined over the last ten years. However, they have reported outbreaks of the disease in highly endemic areas in 2013, which occurred in the sector "50 houses" in canton and province of Esmeraldas, becoming a re-emerging disease. Published on the protective effect of malaria infection by *P. vivax* studies, they have been extensively described by the absence of Duffy (Fy) blood group in individuals of Afro-American descent and although this aspect has been considered, other studies show that *P. vivax* can infect and cause clinical RBCs disease in people whom are Duffy-negative. This suggests that the relationship between *P. vivax* and Duffy antigen is more complex than is usually described, which is the objective of this study, to determine the relationship between asymptomatic malaria and Duffy blood system. **Materials and Methods:** A total of 384 samples to which was characterized by Rapid Diagnostic Tests (RDTs), serological Phenotyping of Duffy system was analyzed, ELISA (EIA) and the reaction technique were carried out in polymerase chain (PCR) in real time samples with phenotypes Duffy negative reactive and nonreactive in EIA. **Results:** In PDR all samples were negative. A higher frequency of phenotype Fy (a-b) was established with 39.8% of the total study population, of which 72% identify themselves ethnically as "black" and 27.2% as "mestizos". Total Duffy negative individuals, it was determined that 43 (11.19%) had reactive results on EIA and 2/43 of these samples (4.65%) had DNA of *P. vivax* and 1/43 (2:32) DNA had *P. falciparum*, and nonreactive for antibodies to malaria samples were identified as 9/110 (8.18%) they had DNA of *P. vivax* and 5/110 (4.54%) of *P. falciparum*. **Conclusions and Recommendations:** the relationship between phenotype Fy (a-b-) and the ethnic identity of the people was established, in addition to the existence of pseudo-immunity against the parasite to anti-malarial antibodies detected. The molecular technique real-time PCR determined the existence of asymptomatic individuals of *P. vivax*, thus proving that the Duffy null system provides natural immunity to the bearer of this phenotype, which is why it is recommended to the Ministry of Public Health algorithms to be implemented screening to identify asymptomatic patients of the disease in endemic areas, in order to avoid isolated outbreaks in the future and ensure the quality of life for residents.

TABLA DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I

1.1. JUSTIFICACIÓN.....11

1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 13

1.3. OBJETIVOS.....15

1.3.1. OBJETIVO GENERAL 15

1.3.2. OBJETIVO ESPECÍFICOS 15

1.3.3. LIMITACIÓN DEL ESTUDIO.....16

CAPÍTULO II

2.1. MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL.....17

2.1.1. Antecedentes.....17

2.2. MARCO TEÓRICO 18

2.2.1. Malaria.....18

2.2.1. Estructura Molecular de *Plasmodium vivax*.....19

2.2.2. Ciclo Biológico de *Plasmodium sp.* 21

2.2.3. Malaria y respuesta inmune 22

2.2.4. Técnicas de detección de malaria.....25

2.2.4.1. Pruebas de Diagnósticoc Rápido 25

2.2.4.2. Enzimainmunoensayo.....25

2.2.4.3. Pruebas Moleculares 25

2.3. Sistema Sanguíneo Duffy 25

2.3.1. Estructura Molecular del Sistema Duffy.....25

2.3.1.1. Receptor DARC 25

2.3.2. Antígenos del Sistema Duffy.....31

2.4. Técnicas detección del Antígeno Duffy 33

2.4.1 Fenotipificación serológica del Sistema Duffy 33

2.4.2 Fenotipificación molecular del Sistema Duffy.....33

2.5. Relación entre el Sistema Sanguíneo Duffy y Etnia 35

2.6. Relación entre Malaria y Sistema Sanguíneo Duffy 35
2.7. MARCO CONCEPTUAL 37
CAPÍTULO III
3.1. MARCO METODOLÓGICO 39
3.1.1. MATERIALES Y MÉTODOS 39
3.1.1.1. Tipo de Estudio 39
3.1.1.2. Tipo de Muestreo 39
3.1.1.3. Tamaño de Muestra 39
3.1.1.4. Hipótesis 40
3.1.1.5. Criterios de Inclusión 40
3.1.1.6 Criterios de Exclusión 40
3.1.1.7 Análisis Estadístico 40
3.2. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES 41
3.2.1. Variable dependiente 41
3.2.2. Variables independientes 41
3.3. MATERIALES Y PROCESO 43
3.3.1. Materiales 41
3.3.2. Reactivos 41
3.3.3. Control de Calidad 41
3.4. PROCEDIMIENTO 45
3.4.1. Fase Uno 45
3.4.2. Fase Dos 46
3.4.3. Fase Tres 46
3.4.4. Fase Cuatro 41
3.4.5. Base de datos 49
CAPÍTULO IV
4. CONTROL DE CALIDAD 50
4.1. Pruebas de Diagnóstico Rápido 50

4.2. Geles de Coombs-Sistema Duffy 50
4.3. Enzimainmunoensayo 51
4.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real 55
CAPITULO V
5. RESULTADOS 55
5.1. Descripción de la población de estudio 55
5.2. Fenotipos del Sistema Duffy 57
5.3. Prevalencia del Fenotipo Duffy por familia 58
5.4. Relación de los Fenotipos Duffy con la Etnia 59
5.5. Relación entre malaria y Fenotipos Duffy 66
5.6. Relación de pruebas serológicas e identificación de portadores asintomáticos 66
5.7. DISCUSIÓN 70
5.8. CONCLUSIONES 70
5.9. RECOMENDACIONES 71
5.10. BIBLIOGRAFÍA 73
5.11. ANEXOS 73

LISTA DE TABLAS

Tabla N° 1: Antígenos del Sistema Duffy 32

Tabla N° 2: Fenotipos del Sistema Duffy.....33

Tabla N° 4.1: Control de Calidad de las Pruebas de Diagnóstico Rápido.....50

Tabla N° 4.2: Control de Calidad de las Tarjetas de geles Coombs 51

Tabla N° 4.3: Valor de absorbancias de diluciones realizadas a la muestra de un paciente con anticuerpos contra *Plasmodium sp.*.....52

Tabla N° 4.4: Ubicación de muestras y controles en la placa PCR-RT 53

Tabla N° 4.5: Resultado final de la PCR-RT. 54

Tabla N° 5.1: Composición de la población de acuerdo a etnia y género.....56

Tabla N° 5.2: Frecuencia de los Fenotipos del Sistema Duffy.....57

Tabla N° 5.3: Relación entre la etnia de los pobladores del sector “50 casas” de la provincia de Esmeraldas y el Fenotipo Duffy 59

Tabla N° 5.4: Número de veces que los pobladores del sector “50 casas” mencionaron tener malaria, su relación con el fenotipo Duffy y resultados de pruebas serológicas 63

Tabla N° 5.5: Relación entre el fenotipo Duffy negativo, resultados EIA y molecular de los pobladores “50 casas” de la provincia de Esmeraldas 64

Tabla N° 5.6: Número de veces que los pobladores del sector “50 casas” mencionan haber tenido malaria, su relación con la presencia de ADN de *P. vivax* y *P. falciparum*...64

Tabla N° 5.7: Relación de Fy(a-b-) con presencia de ADN de *Plasmodium vivax* 65

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico N° 4.1.: Curva de calibración de malaria (calibrador).....51

Gráfico N° 4.2: Curva de calibración de Malaria (muestra reactiva) 52

Gráfico N° 4.3: Proceso de amplificación de muestras y controles de *Plasmodium falciparum* y *vivax* 53

Gráfico N° 4.4 : Curva de disociación de Melting 54

Gráfico N° 5.1: Distribución porcentual de la población de acuerdo al género 55

Gráfico N° 5.2: Distribución porcentual de la población de acuerdo al grupo etario 55

Gráfico N° 5.3: Lugares de procedencia de los pobladores del sector “50 casas”.....57

Gráfico N° 5.4: Distribución porcentual de los fenotipos del Sistema Duffy.....58

Gráfico N° 5.5: Distribución porcentual de los fenotipos del Sistema Duffy en las familias del sector “50 casas" 59

Gráfico N° 5.6: Distribución de los fenotipos Duffy de acuerdo a la etnia.....60

Gráfico N° 5.7: Distribución de la procedencia de los pobladores con resultados “reactivos” en EIA 61

Gráfico N° 5.8: Distribución de la procedencia de los pobladores con resultados “no reactivos” en EIA 62

LISTA DE FIGURAS

Figura N° 1: Estructura de *Plasmodium sp.* 20

Figura N° 2: Ciclo biológico de *Plasmodium sp.* 22

Figura N° 3: Ubicación de los antígenos Fy(a/b) en el eritrocito 28

Figura N° 4: SNPs del gen DARC 29

Figura N° 5: Expresión del Sistema Duffy 30

Figura N° 6: Expresión del receptor DARC en el eritrocito 31

Figura N° 7: Antígenos del Sistema Duffy. 34

Figura N° 8: Activación del receptor DARC 36

ANEXOS

Anexo 1: Autorización del MSP-Zona distrital 08D01 79

Anexo 2: Aprobación del Comité de ética de la Investigación-PUCE 80

Anexo 3: Consentimiento informado 81

Anexo 4: Encuesta.....83

Anexo 5: Protocolo 1 – Prueba de Diagnóstico Rápido.....85

Anexo 6: Inserto Anti-Fya 86

Anexo 7: Inserto Anti-Fyb 88

Anexo 8: Protocolo 2 – Malaria Ab.....90

Anexo 9: Protocolo 3 – Extracción de ADN.....92

Anexo 10: Protocolo 4 – Cuantificación de ADN en NanoDrop 93

Anexo 11: Protocolo 5 – PCR-RT 94

Anexo 12: Proceso de estudio 96

LISTA DE SIGLAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

Arg: Arginina

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

Asp: Aspartato

C: Citosina

CXCL: Cicloxigenasa

DARC: Receptor del antígeno Duffy para quimiocinas.

Gly: Glicina

HRP: Proteína rica en histidina

IAT: Prueba de antiglobulina indirecta

kDa: Kilo Dalton

MSP: Ministerio de Salud Pública.

OPS: Organización Panamericana de la Salud.

PCR-RT: Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real.

PDR: Pruebas de diagnóstico rápido.

pLDH: *Plasmodium* Lactato Deshidrogenasa

PvDBP: Proteína de unión Duffy-*Plasmodium vivax*

SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido.

T: Timina

INTRODUCCIÓN

En la última década la malaria en el Ecuador disminuyó considerablemente, motivo por el cual la Organización Panamericana de la Salud (OPS) otorgó al país el premio campeón de la lucha contra el paludismo de las Américas (MSP-Ecuador, 2012). A pesar de este gran avance, se han reportado brotes de malaria en zonas endémicas debido a la existencia de factores de riesgo tales como: aguas estancadas, movilidad humana y personas asintomáticas; esto se puede constatar en el sector “50 casas” del cantón y provincia de Esmeraldas donde se reportó un brote de malaria en el año 2013 (Diario "La Hora", 2013).

En el año 2008, se reportaron alrededor de 5000 casos en el país, de los cuales el 90% correspondían a infección malárica causada por *Plasmodium vivax* y en el 2010 se reportaron 2000 casos más; sin embargo, se calcula que esta cifra estaría muy por debajo del verdadero número (Fabián Saenz & María Eugenia Dávila, 2012) y, aunque la incidencia de los casos ha disminuido de manera constante durante los últimos años, el mal persiste en comunidades y zonas rurales como las provincias de Esmeraldas, Guayas y Orellana, pero los datos no se encuentran actualizados debido a la alta susceptibilidad de brotes que tiene el país (Fabián Sáenz & Sofía Ocaña, 2014). Por esta razón, el objetivo de este estudio es determinar la relación existente entre los brotes aislados de malaria y el sistema sanguíneo Duffy.

En varios estudios se ha reportado que la presencia de los antígenos del sistema eritrocitario Duffy favorecen para que *P. vivax* pueda invadir las células eritrocitarias y causar malaria debido a que el parásito infecta los eritrocitos del ser humano por medio de una de una proteína apical de unión al receptor Duffy (PvDBP) y el receptor de superficie eritrocitario denominado DARC (receptor del antígeno Duffy para quimiocinas) (Souza-Silva F. , y otros, 2014). En éstos se ha demostrado que el efecto protector a la malaria se encuentra relacionado con la estructura de la membrana del eritrocito y la ausencia de los antígenos mencionados (Pasvo, 2007). Por otra parte, varios autores refieren que el incremento de malaria asintomática en zonas endémicas se encuentra vinculado con las constantes infecciones o recurrencias de *Plasmodium,* y que pueden ocurrir semanas o años después de registrado el primer episodio de parasitemia (Valencia, Calderón, & Fasabi, 2012)

La identificación de portadores asintomáticos y la detección de los antígenos del sistema eritrocitario Duffy en los pobladores del sector “50 casas” de la Parroquia Vuelta Larga del cantón y provincia de Esmeraldas, son un dato de importancia para el sistema de salud porque permitirá establecer estrategias de control para el seguimiento de brotes asilados en poblaciones que son consideradas altamente endémicas constituyendo un aporte al *Objetivo 3 del Plan Nacional del Buen Vivir que consiste en Mejorar la Calidad de Vida de la Población* que menciona: *Levantar el perfil epidemiológico y sanitario del país…..mantener la calidad de vida empieza por mantener el derecho a la salud* (Plan Nacional del Buen Vivir, 2013-2017). En este estudió se identificó que el 39.8% de la población del sector “50 casas” del cantón y provincia de Esmeraldas tiene el fenotipo Duffy negativo Fy(a-b), siendo 65% de personas de género femenino y un 35% masculino entre las edades de 3 a 107 años, de los cuales 130 se identifican étnicamente como “negros” y 26 como “mestizos”, determinándose así que existe relación entre el fenotipo Duffy negativo – etnia negra y que los pobladores que poseen este fenotipo Duffy null tienen inmunidad natural contra la infección parasitaria por *P. vivax.*

En la actualidad se establece que se necesitan métodos de diagnóstico altamente sensibles y alcanzables, para orientar las intervenciones del sistema de salud con el fin de lograr erradicar la malaria y aunque la microscopía tradicional y las pruebas de diagnóstico rápido (PDR) son adecuadas para el diagnóstico de la infección sintomática de la malaria, se necesitan pruebas más sensibles para los programas de detección primaria (LabMedical, 2016) (CLAIM, 2016), razón por la cual se recomienda al Ministerio de Salud Pública y el Programa de Control y Erradicación de la Malaria implementar la identificación de portadores asintomáticos en las zonas altamente endémicas y establecer un algoritmo de detección ultrasensible que incluya pruebas serológicas y de diagnóstico molecular que permita la vigilancia epidemiológica generalizada de la población en caso de portadores asintomáticos para la detección de parasitemias bajas de *Plasmodium.*

CAPÍTULO I

1.1. JUSTIFICACIÓN

A pesar de las estrategias y procesos que se realizaron anualmente para el control y erradicación de la malaria en el país, se han reportado brotes en lugares endémicos debido a condiciones climáticas, biológicas y ecológicas, así como por la presencia de portadores asintomáticos y/o los movimientos poblacionales (Sáenz & Ocaña, 2013).

La identificación de portadores asintomáticos y la detección de los antígenos del sistema eritrocitario Duffy en los pobladores del sector "50 casas" de la Parroquia Vuelta Larga del cantón y provincia de Esmeraldas, pretende proporcionar al sistema de salud datos que permitan establecer si en los habitantes existe una disminución de la inmunidad natural ante la infección parasitaria por *Plasmodium vivax* y si está relacionado con el surgimiento de brotes aislados de malaria.

En el país no existe información publicada acerca del polimorfismo del sistema Duffy y su relación con la resistencia parcial o completa que este confiere contra infección malárica por *P. vivax,* así como tampoco se han reportado estudios sobre la prevalencia de la malaria asintomática, lo cual puede representar un problema para las estrategias de control que fueron adoptadas en caso de que se identifiquen portadores asintomáticos entre los pobladores de zonas endémicas.

Por otra parte, el incremento de la malaria asintomática se encuentra vinculado con las constantes infecciones o recurrencias de *Plasmodium.* Las reinfecciones y los relapsos son patrones de recurrencia poco conocidos; sin embargo, se sabe que los relapsos son una característica importante de *P. vivax* originados por estadios latentes en el hígado (hipnozoitos), los cuales pueden ocurrir semanas o años después de registrado el primer episodio de parasitemia (Valencia, Calderón, & Fasabi, 2012).

La proteína de unión de *P. vivax* - Duffy (PvDBP) es un tipo de proteína integral de membrana de 140 kDa que pertenece a una familia de proteínas de unión a Duffy homóloga de eritrocitos (DBL-EBP) ubicados dentro de los micronemes de merozoitos de *Plasmodium*, lo cual contribuye a que se produzca la infección parasitaria de los glóbulos rojos (Chootong, McHenry, Ntumngia, Sattabongkot, & Adams, 2014). Sin embargo, aunque durante muchos años se ha considerado que el fenotipo Duffy negativo actúa como un efecto protector ante la infección malárica por *P. vivax,* Carvalho y sus

colaboradores en el año 2012, demostraron en un estudio que no existe diferencia entre pacientes infectados por *P. vivax* y la presencia o ausencia de antígenos Duffy, concluyendo que puede tratarse de una nueva adaptabilidad del parasito para invadir a los eritrocitos sin importar que no exista el receptor DARC o que este receptor haya sufrido mutaciones, razón por la cual se impulsa la realización de estudios en la búsqueda de portadores asintomáticos y su relación con la ausencia del receptor eritrocitario de los antígenos Fy (Duffy) en países endémicos de malaria (Carvalho, y otros, 2012).

Los datos obtenidos en este estudio permitirán a las autoridades del Ministerio de Salud Pública establecer nuevas estrategias de control en zonas consideradas altamente endémicas de malaria y ofrecer un aporte al *Objetivo 3 del Plan Nacional del Buen Vivir que consiste en Mejorar la Calidad de Vida de la Población* que menciona: *Levantar el perfil epidemiológico y sanitario del país…..mantener la calidad de vida empieza por mantener el derecho a la salud* (Plan Nacional del Buen Vivir, 2013-2017).

1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Plasmodium vivax infecta los eritrocitos humanos a través de una vía que requiere la interacción entre la proteína apical del parásito, proteína eritrocitaria de unión perteneciente al sistema Duffy (PvDBP) y el receptor de antígeno Duffy para quimiocinas, denominado fracción (DARC) (Souza-Silva F. , y otros, 2014). De hecho, se ha documentado ampliamente que la presencia de los antígenos del sistema eritrocitario Duffy son necesarios para que *P. vivax* pueda invadir las células eritrocitarias y causar la enfermedad (Carvalho, y otros, 2012) (Zimmerman, Ferreira, & Howes, 2013), por lo que se considera que el efecto protector innato a la malaria está relacionado con la estructura de la membrana eritrocitaria y la respectiva ausencia de estos antígenos (Pasvo, 2007), es decir, el fenotipo Duffy negativo (Fy^a-/Fy^b-) que se caracteriza por la ausencia de esta proteína o receptor de quimiocinas, impide la unión del merozoíto a la superficie de la membrana del eritrocito y por consiguiente, no se produce la infección malárica (Gonzalez, y otros, 2012).

A pesar de la importante evidencia clínica y epidemiológica en relación con la protección contra *P. vivax* en individuos Duffy negativo, otros estudios han sugerido la existencia de infección por esta especie en ausencia de expresión de la proteína (Fy-), fenómeno que indica que el parásito ha evolucionado en su forma de infección a los eritrocitos (Zimmerman, Ferreira, & Howes, 2013) (Carvalho, y otros, 2012), y con los adelantos de la biología molecular, se pueden determinar las variaciones genéticas de las especies de *P. vivax* que son capaces de causar la enfermedad en determinadas poblaciones y las características particulares del parásito asociados a los factores epidemiológicos, clínicos y bilógicos relevantes para la prevención, control y tratamiento de malaria (Mendizabal & Padilla, 2003).

Adicionalmente, los pacientes que presentan malaria y un fenotipo Duffy (Fy negativo) en zonas consideradas endémicas en Ecuador, no han sido estudiados o reportados, por lo que el estudio de la relación del efecto protector de los antígenos Duffy y los portadores asintomáticos de malaria en el país, evidenciaría la posibilidad de la transmisión a otros individuos y el inicio de nuevos brotes.

Otro aspecto a considerarse, es la detección de portadores asintomáticos de malaria mediante el uso de reactivos que determinan antígenos y anticuerpos. De acuerdo a Gillet 2009, el uso de pruebas de diagnóstico rápido está afectado por el efecto prozona, especialmente en parasitemias elevadas y el secuestro del parásito en el ensayo

Inmunocromatográfico; pero esto puede ser superado al incluir un control de calidad que permita que los resultados falsos negativos que se obtienen generalmente en densidades bajas de parásitos puede ser controlado al aplicar un algoritmo de detección que incluya métodos de enzima inmunoensayo y molecular (Philippe, Marcella, Marjan, & Jef Van, 2009).

En el 2012, estudio realizado por González y Chiriboga estableció que existe un 93,4% de resultados falsos positivos en la determinación de antígenos de malaria mediante la metodología de enzima-inmunoensayo y la total falta de detección de antígenos de malaria asintomática mediante el uso de pruebas rápidas (González & Chiriboga, 2013); sin embargo, las pruebas rápidas son muy útiles en lugares donde los recursos son limitados, el diagnóstico microscópico rutinario no se realiza o es de mala calidad, el acceso geográfico es difícil o se trata de poblaciones socialmente aisladas o conflictivas, características que se presentan en Esmeraldas en el sector “50 casas”.

Pregunta del Problema: ¿Existe portadores asintomáticos de malaria con inmunidad innata por el sistema sanguíneo Duffy en el sector “50 casas” zona considerada endémica de la provincia de Esmeraldas?

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Identificar la existencia de pobladores asintomáticas portadores de malaria y su relación con el sistema eritrocitario Duffy en el sector “50 casas” de la parroquia Vuelta Larga del cantón y provincia de Esmeraldas.

1.3.2. OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Clasificar la población del sector “50 Casas” de acuerdo a la edad, etnia, género y procedencia.

- Determinar los antígenos del sistema eritrocitario Duffy y sus fenotipos en los pobladores del sector “50 Casas” de la Parroquia Vuelta Larga del cantón y provincia de Esmeraldas.

- Determinar la prevalencia de los fenotipos Duffy por familia de los pobladores del sector “50 Casas” de la Parroquia Vuelta Larga del cantón y provincia de Esmeraldas

- Relacionar los fenotipos Duffy con la etnia de los pobladores del sector “50 Casas” de la Parroquia Vuelta Larga del cantón y provincia de Esmeraldas.

- Relacionar a los pobladores del sector “50 Casas” que mencionan haber presentado episodios de malaria y los fenotipos del sistema eritrocitario Duffy.

- Determinar la presencia de los antígenos de malaria mediante el uso de pruebas de diagnóstico rápido en los pobladores del sector “50 Casas” de la Parroquia Vuelta Larga del cantón y provincia de Esmeraldas.

- Determinar la presencia de anticuerpos de malaria mediante el uso del método enzima inmunoensayo EIA en los pobladores del sector “50 Casas” de la Parroquia Vuelta Larga del cantón y provincia de Esmeraldas.

- Relacionar la procedencia de los pobladores del sector “50 casas” con ausencia de antígenos Duffy y resultados reactivos y no reactivos para malaria en EIA.

- Relacionar los resultados obtenidos en las pruebas de diagnóstico rápido, ELISA y molecular.

- Identificar los portadores asintomáticos de *Plasmodium vivax* mediante la correlación entre la ausencia de los antígenos Duffy y la presencia de antígenos o anticuerpos contra malaria.

1.3.3. LIMITACIÓN DEL ESTUDIO

Una de las limitaciones del estudio es que las pruebas serológicas no permiten diferenciar entre las especies de *Plasmodium vivax* y/o *falciparum*.

CAPÍTULO II

2.1. MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

2.1.1. Antecedentes

El paludismo es una enfermedad febril aguda ocasionada por la picadura del mosquito hembra del género *Anopheles* infectado con el parásito del género *Plasmodium* y, en las zonas donde el paludismo es endémico, las personas pueden adquirir inmunidad parcial lo que posibilita la aparición de infecciones asintomáticas donde el parásito puede permanecer desde pocos meses hasta los cinco años (Cornejo, 2013).

El grupo sanguíneo Duffy (Fy) fue descrito en 1950 por Cutbush y cols., al demostrar la reactividad del suero de un paciente hemofílico politransfundido, cuyo apellido era Duffy. El primer antígeno descubierto se le llamó Fy^a. El antígeno Fy^b fue encontrado un año más tarde por Ikin y cols. En 1975, se identificó al antígeno Duffy como el receptor de los parásitos *Plasmodium vivax* y *Plasmodium knowlesi*, siendo este descubrimiento la explicación del mecanismo protector ante la infección malárica originada por estos dos parásitos y la alta frecuencia del fenotipo Fy(a-b-) en personas de etnia negra del oeste de África (Arreygue, 2011).

El complejo ciclo de vida del *Plasmodium* incluye una fase eritrocítica que es responsable de los síntomas clínicos de la malaria humana donde *P. vivax* invade los reticulocitos y requiere principalmente la interacción del ligando parásito a antígeno Duffy/receptor de quimiocinas (DARC) en la membrana de glóbulo rojo (Nóbrega, Carvalho, & Alves, 2011).

Un estudio realizado por Lina González y colaboradores el 2012, postularon que *P. vivax* ha ejercido presión a favor de la selección del alelo C (FYBnull), ya que en África se confirma una fuerte correlación entre la baja endemicidad de malaria por *P. vivax* y la alta prevalencia del fenotipo Duffy negativo en población nativa. En este estudio se encontró que más de la tercera parte de las muestras con parasitemia positiva provenían de individuos asintomáticos; sin embargo, no se encontró asociación significativa entre edad y frecuencia de infección malárica entre las etnias estudiadas como: afrocolombianos,

amerindios y mestizos, por lo se recomienda que la interacción entre la edad-etnia-infección asintomática, debe ser explorada ampliamente (Gonzalez, y otros, 2012).

En Ecuador, González, 2012, realizó pruebas de enzima-inmunoensayo EIA de captura de antígenos de malaria, PDR (prueba de diagnóstico rápido) y molecular en diferentes donadores asintomáticos provenientes de zonas endémicas con el fin de establecer un método rápido para detección de malaria asintomática (González & Chiriboga, 2013).

Adicionalmente, en el país, no se han reportado estudios que relacionen los diferentes fenotipos del sistema eritrocitario Duffy con la malaria en zonas endémicas donde se reportan brotes aislados como es el sector “50 casas” de la parroquia Vuelta Larga del cantón y provincia de Esmeraldas, lo que podría estar vinculado con parasitemias asintomáticas debido a la posible predominancia de fenotipo Duffy (Fy^a-/Fy^b-) en la población.

Estudios recientes han cuestionado la teoría de que “*P. vivax* no infectaba ni causaba malaria en individuos Duffy negativos”, así Carvalho y sus colaboradores determinaron que el 6,29% de pacientes con fenotipo (Fy^a- Fy^b-) fueron diagnosticados con infección de *P. vivax*, concluyendo así que el riesgo de malaria por *P. vivax* no diferencia entre el fenotipo Duffy negativo y Duffy positivo (Carvalho, y otros, 2012), aunque existen varias teorías de qué, para que ocurra este fenómeno deben existir variaciones en el parásito y que no requiera el receptor DARC para infectar al eritrocito. Por esta razón son necesarios estudios que refuercen los mecanismos y las causas de la presencia de infección por *P. vivax* en individuos con fenotipo Duffy negativo.

2.2. MARCO TEORICO

2.2.1. Malaria

La malaria o paludismo es una enfermedad parasitaria provocada por protozoarios del género *Plasmodium* y transmitida por la picadura de mosquito hembra del género *Anopheles*. En el organismo humano, los parásitos se multiplican en el hígado y después infectan los glóbulos rojos (OMS, 2015). Existen cuatro especies de *Plasmodium* que infectan al hombre: *falciparum, vivax, malarie y ovale,* de las cuales el *P. falciparum* es considerado letal debido a la existencia de estirpes resistentes a drogas antimaláricas y su propagación mundial (Valencia, Calderón, & Fasabi, 2012).

En Sudamérica, *P. vivax* constituye la especie de *Plasmodium* más importante causante de malaria en términos de morbilidad y Ecuador es considerada una región endémica, donde la transmisión de *P. vivax* es continua (Saenz & Ávila, 2012) convirtiéndose en una enfermedad reemergente en los lugares donde antes había sido controlada (Valencia, Calderón, & Fasabi, 2012).

En muchas zonas tropicales y subtropicales es la causa más importante de enfermedad y en las zonas de alta transmisión o endémicas, los pobladores suelen presentar un grado de inmunidad parcial (Center Control Diseases, 2013), debido a que los pobladores experimentan síntomas rápidamente, lo cual conduce al incremento de pacientes con manifestaciones subclínicas no diagnosticadas, de los cuales solo algunos pasan a la detección por vigilancia pasiva en centros de salud y son sometidos a tratamiento. Sin embargo, en zonas que son consideradas altamente endémicas, se puede determinar un incremento de la inmunidad frente a las constantes infecciones parasitarias, aunque no es un efecto protector, evita las complicaciones de la enfermedad, incrementando el número de portadores asintomáticos (Valencia, Calderón, & Fasabi, 2012) y, de manera concomitante los brotes aislados de malaria en los sectores aledaños.

2.2.1. Estructura molecular de *Plasmodium vivax.*

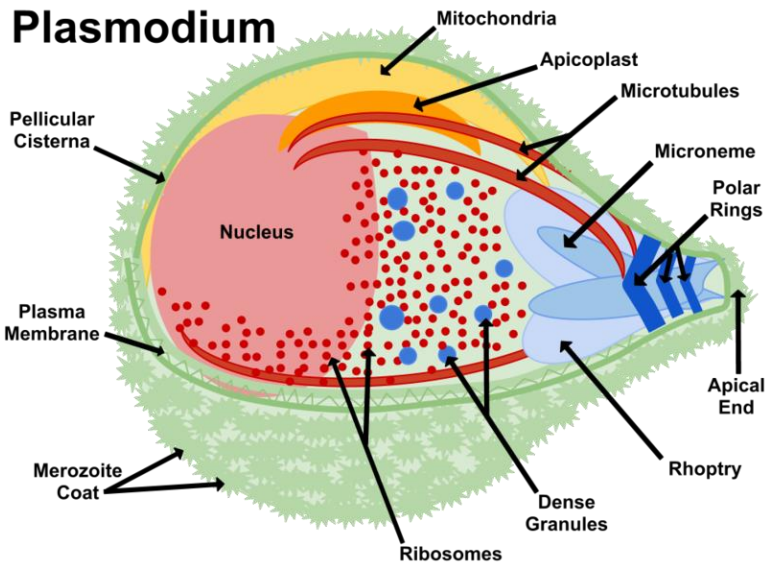
Los estudios moleculares que se han realizado en relación de la genética de los parásitos de malaria se enfocan en dos aspectos principales: la estructura de la genética poblacional de los parásitos y su dinámica dentro del hospedero (Mendizabal & Padilla, 2003).

Estos estudios moleculares permiten conocer los genotipos del agente causante de malaria presentes en una población determinada, lo cual es relevante porque se pueden determinar las características parasitarias como son: origen, antigenicidad, respuesta a medicamentos, surgimiento de cepas resistentes, respuesta a posibles vacunas y el impacto de medidas de control como los mosquiteros (Mendizabal & Padilla, 2003).

La diversidad genética de *P. vivax* ha sido descrita a través del análisis de varios genes; en particular los que codifican para antígenos que están bajo selección por presión causada por el sistema inmune del hospedero como los genes que codifican para las proteínas de superficie del merozoito (MSP) en particular para la MSP1 y MSP3α, antígenos de la membrana apical (AMA1), proteína del circumsporosoito (CSP), proteínas ligando Duffy, genes que codifican para la subunidad 18S del ARN ribosomal y DHFR

(dihidrofolato reductasa). El gen que codifica para la proteína del CSP de *P. vivax* ha sido estudiado ampliamente, es un gen de una sola copia que posee un dominio central de secuencias repetidas en serie, rodeado por secuencias conservadas, no repetitivas. Entre las diferentes especies de *Plasmodium* las secuencias repetitivas de la región central son variables en tamaño y en naturaleza de la secuencia (Mendizabal & Padilla, 2003).

Se han identificado dos variantes VK247 y VK210. Estas variantes se han detectado en varios países de América como infecciones ocasionadas por una sola variante o como infecciones mixtas. Se ha sugerido que la presencia de infecciones mixtas depende del grado de prevalencia de malaria en la región, siendo menos en regiones de baja prevalencia. También se ha encontrado asociación entre la variante del parásito responsable de la infección, el ecosistema y la especie del vector encontrado en regiones determinadas (Mendizabal & Padilla, 2003) (Figura N°1).



Autor: *GENETICS, 2014*

Fuente: *Natural Rewiew genetics*

Figura N°1. Estructura de *Plasmodium sp.*

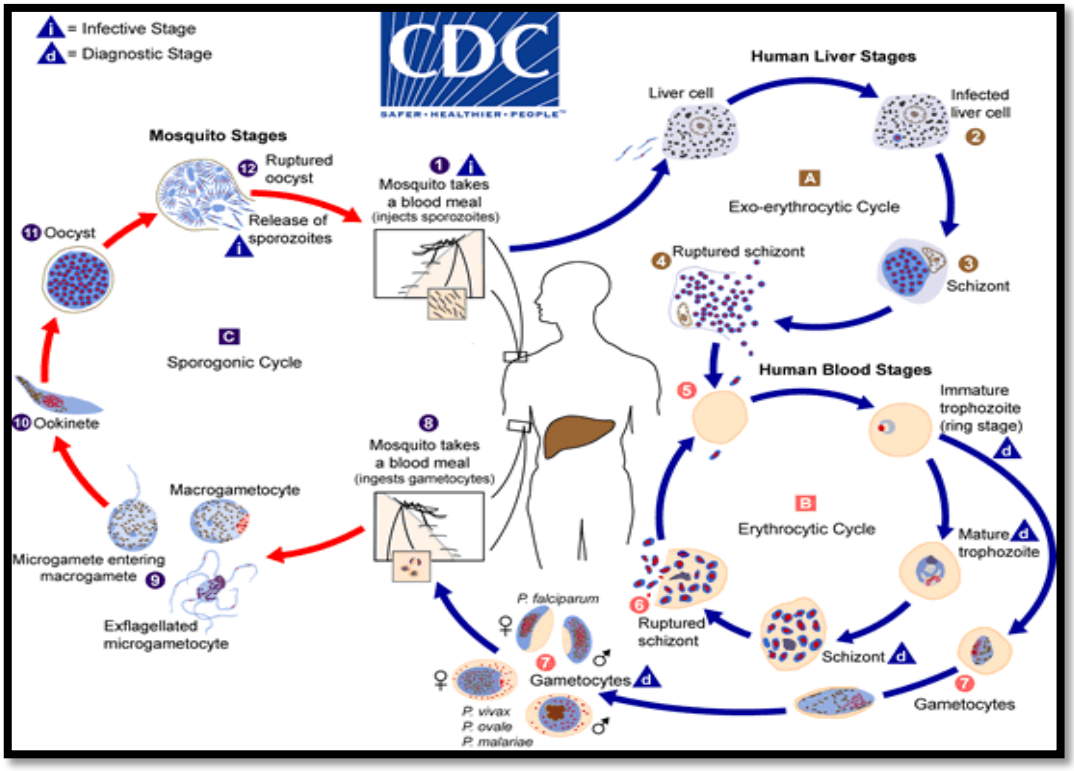
Plasmodium es un protista del filio *Apicomplexa phylum* clase *Aconoidasida,* orden *Haemosporida y* familia *Plasmodiidae*

2.2.2. Ciclo Biológico de *Plasmodium sp.*

El ciclo de vida del parásito de la malaria implica dos estadios: uno en el mosquito y otro en el ser humano: el mosquito (hembra del género *Anopheles*) mediante la picadura, ingesta sangre de un individuo infectado, los gametocitos del parásito son succionados y estos se multiplican en el intestino del mosquito dando lugar al ciclo esporogónico, se generan cigotos que pasan a fases móviles denominados ookinetos, los cuales invaden la pared intestinal del mosquito desarrollándose en ooquiste, estos crecen y liberan esporozoitos que pasan a través de las glándulas salivales del mosquitos iniciándose así el ciclo en el humano a través de la picadura a un individuo sano (Center Control Diseases, 2013). Mediante la inoculación de esporozoítos (forma infectante) al hospedero humano se cumplen el ciclo de infección en las células hepáticas, se da inicio con el cambio de estadio a esquizontes tisulares que maduran, seguido de la ruptura de los hepatocitos y la liberación de merozoítos.

Después de la replicación inicial en el hígado los parásitos se someten a multiplicación asexual en los eritrocitos, a excepción de *Plasmodium vivax* y *ovale* que pueden permanecer en etapa latente como hipnozoitos durante meses o años, y de esta manera persistir en el hígado y causar recaídas (Center Control Diseases, 2013).

Los merozoitos infectan los glóbulos rojos dando lugar a los trofozoitos que posteriormente se diferencian en etapas sexuales que son los llamados gametocitos, etapa en donde ocurren las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Algunos merozoitos que invaden los eritrocitos ya no continúan la reproducción sexual, si no que se diferencian en fases sexuadas denominadas macrogametocitos (hembras) y microgametocitos (machos), que permanecen en sangre periférica (Figura N°2).



Autor: *Centers for Disease Control and Prevention, 2013*

Fuente: *Ciclo Vital de Plasmodium*

Figura N°2. Ciclo biológico de *Plasmodium sp.*

Durante el ciclo biológico existe un agente vector (hembra del mosquito *Anopheles*), donde *Plasmodium* se reproduce sexualmente, y un hospedador vertebrado intermediario (ser humano o animal) en el que se produce una reproducción sexual.

2.2.3. Malaria y respuesta inmune

Una de las funciones más importantes del sistema inmune es la protección contra agentes extraños sean estos: bacterias, parásitos, células, sustancias entre otras. Se lo ha divido en dos grandes respuestas: innata y adquirida, las cuales se diferencian por sus mecanismos de acción, células y tipo de receptores que son activados frente a un determinado antígeno (Abbas, Lichman, & Pillai, 2012).

Cuando el mosquito pica y penetra las capas de la dermis libera los esporozoitos provenientes de sus glándulas salivales en el tejido dérmico, estos son móviles y capaces de penetrar en los pequeños vasos sanguíneos estimulando así la respuesta inmune. En la sangre circulante, son arrastrados hacia los vasos sinusoides hepáticos, penetran en el

hepatocito y se diferencia en un pequeño trofozoito creciendo en tamaño durante los próximos días para poder diferenciarse en esquizontes multinucleados en un tiempo de cinco días. Posteriormente, la membrana plasmática del hepatocito infectado y las vesículas de la membrana parasitófora se rompen y liberan merozoitos a circulación sanguínea, los cuales invaden las células rojas para iniciar el ciclo eritrocítico de infección. Sin embargo, los mecanismos que subyacen a la más rápida adquisición de inmunidad contra *Plasmodium vivax* son poco conocidos (Hay, Price, & Baird, 2013).

La respuesta inmune natural contra *P. vivax* en el estadío pre-eritrocitario y eritrocitario, incluyen antígenos de componentes humorales y celulares que hasta la fecha han sido poco estudiados; la mayoría de los estudios se centra en los antígenos del sistema Duffy y su unión al merozoito. En general, la inmunidad adquirida de forma natural determina no solo la incidencia específica de la edad y la prevalencia de las infecciones por *P. falciparum* y *vivax* sino también la expresión de procesos patológicos que subrayan las manifestaciones clínicas de la infección (Hay, Price, & Baird, 2013).

Dentro del ciclo de infección de la malaria se encuentra la destrucción de los glóbulos rojos, se ha determinado que la lisis de eritrocitos en el momento del ciclo en que se liberan los merozoitos aporta el 10% de la disminución total del hematocrito y, a pesar de que esta teoría ha sido confirmada por varios estudios, actualmente se conoce que la pérdida de eritrocitos no se debe únicamente a la lisis sino también a la acción del sistema inmune, así un número de glóbulos rojos infectados son removidos por células fagocíticas, macrófagos, factores de complemento o mediada por la presencia de células natural killer (NK); todo esto contribuye a la presencia de anemia en el individuo (Llanos, Flores, Arevalo-Herrera, & Herrera, 2004).

La presencia de sintomatología como fiebre, escalofríos, sudoración en el transcurso de la infección por malaria se debe a la presencia de formas asexuales de *Plasmodium sp.* en sangre; sin embargo, existen individuos de zonas endémicas que no presentan esta sintomatología y esto puede deberse a varias causas tales como: nivel bajo de parásitos por acción del sistema inmune adquirido, es decir, se producen anticuerpos contra las moléculas expresadas en la superficie de las formas asexuales del parásito y de esta manera se mantienen niveles bajos de parasitemia (Valencia, Calderón, & Fasabi, 2012) (González & Chiriboga, 2013). Estas acciones del sistema inmune confieren a ciertos individuos la presencia de infecciones asintomáticas constituyendo uno de los principales problemas en muchas regiones consideradas endémicas. Una de las explicaciones es que después de desarrollar infecciones repetidas de malaria desarrollan una seudo-

inmunidad contra el parásito, manteniéndose así por varios años, esta inmunidad fue demostrada en los años 60 mediante la técnica de ELISA, detectándose anticuerpos de tipo IgG entre tres y seis meses después de la infección inicial; esta forma de detección sigue siendo utilizada hasta la actualidad (Valencia, Calderón, & Fasabi, 2012).

En las zonas endémicas, la malaria es más evidente en los niños y el parásito puede estar completamente ausente en la sangre de los adultos; así los individuos que están constantemente expuestos a la infección pueden desarrollar inmunidad a la malaria después de que han sufrido numerosos ataques de la malaria con infecciones que a menudo se presentan únicamente con síntomas leves o la ausencia de estos (Hay, Price, & Baird, 2013).

En el paludismo por *P. vivax*, el desarrollo del sistema inmune adquirido depende de la exposición de infecciones primarias o recaídas con un mayor grado de inmunidad que se produce en adultos residentes de zonas endémicas, ya que esta inmunidad se presume que va a depender de la exposición acumulativa a múltiples infecciones parasitarias (recaídas). En general, se cree que requiere un importante grado de exposición continua, una condición conocida como premunición, y en algunas circunstancias el sistema inmune se disminuye en gran medida hasta que cese la infección mediante la expresión del sistema inmune adquirido específico contra la especie, lo que implica el mantenimiento de altos niveles de anticuerpos específicos de malaria y una alta frecuencia de células T específicas (Hay, Price, & Baird, 2013).

En la actualidad, todavía hay relativamente poca información disponible a nivel genómico y post-genómico de *P. vivax*, lo que ha motivado la investigación de los mecanismos de inmunidad. Si bien no se adquieren de forma inmune natural las respuestas contra antígenos en la etapa pre-eritrocítica, es poco probable que la exposición natural a esporozoitos sea suficientemente alta para inducir protección contra la infección. El papel de premunición en el mantenimiento del sistema inmune también es controversial, la duración precisa del tiempo necesario para su pérdida es desconocida, así como son los efectos de la edad y las condiciones variables de la trasmisión. Sin embargo, aún no está claro si la exposición antigénica continua perjudica la capacidad de generar memoria inmunológica a largo plazo o si la protección se mantiene parcialmente mediante la activación de los mecanismos inmunes innatos. Alternativamente, la exposición repetida de antígenos puede ser necesario para mantener altos niveles de anticuerpos reactivos para que la etapa sea totalmente protectora (Hay, Price, & Baird, 2013).

2.2.4. Técnicas de detección de malaria

El diagnóstico de malaria consiste en detectar la presencia del parásito mediante la observación microscópica directa de este en cualquier fase de su desarrollo en el interior de las células eritrocitarias (frotis sanguíneo), de sus componentes antigénicos o metabolitos (pruebas de diagnóstico rápido y biología molecular) o mediante la detección de anticuerpos ocasionados por la respuesta inmunitaria que la infección parasitaria induce en el organismo (serología) (Arreygue, 2011).

2.2.4.1. Pruebas de Diagnóstico Rápido

Las pruebas de diagnóstico rápido (PDR) están basadas en la detección de antígenos del parásito usando inmunocromatografía de flujo lateral, con anticuerpos monoclonales contra diferentes antígenos de *Plasmodium* presentes en la sangre de individuos infectados y proporcionan resultados entre 15 a 20 minutos. Estas pruebas son de gran utilidad en zonas donde no se tiene acceso a microscopía, convirtiéndose en una importante estrategia de bajo costo para diagnosticar malaria (Campuzano & Blair, 2010).

La mayoría de las PDR incorporan dos líneas de prueba para distinguir la malaria por *P. falciparum* y la malaria debido a cualquier otra especie de *Plasmodium*; estos PDR se pueden clasificar según los anticuerpos que utilizan:

- Las que detectan la proteína rica en histidina 2 (HRP-2) de *P. falciparum* y la enzima aldolasa (todas las especies);
- El tipo de PDR que utiliza HRP-2 (*P. falciparum*) y *Plasmodium* Lactato Deshidrogenasa (pLDH) de todas las especies, la cual se expresa en diferentes isoformas en los estadios asexuales de *Plasmodium* que infectan humanos y depende de la viabilidad del parásito, lo cual puede ser de utilidad clínica para el seguimiento de pacientes post-tratamiento en infecciones por *P. falciparum* y *P. vivax*; y,
- Las de uso de *Plasmodium* Lactato Deshidrogenasa (pLDH) de *P. falciparum* y pLDH de todas las especies, aunque recientemente, se han desarrollado para distinguir la parasitemia por *P. vivax* mediante la utilización de un anticuerpo específico para pLDH originada por la misma especie (Abbas, Lichman, & Pillai, 2012) (Campuzano & Blair, 2010).

Las PDR tienen la capacidad de detectar el antígeno parasitario dependiendo de su concentración en sangre y la carga de parásitos total (Campuzano & Blair, 2010), pero su

uso está afectado por el efecto prozona, especialmente en parasitemias elevadas y el secuestro del parásito, pero esto puede ser superado al incluir un control de calidad interno, en contraste con los resultados falsos negativos que se obtienen generalmente en densidades bajas de parásitos y la imposibilidad de diferenciar entre especies de *Plasmodium* (Philippe, Marcella, Marjan, & Jef Van, 2009) (Campuzano & Blair, 2010).

Actualmente, se considera que las pruebas de diagnóstico rápido de la malaria pueden mejorar el manejo de la malaria en zonas sin microscopía; Mbabazi y colaboradores compararon la precisión de la PDR que detecta la proteína rica en histidina 2 (HRP2) y la *Plasmodium* lactato deshidrogenasa (pLDH) junto con la microscopía como estándar de oro para el diagnóstico inicial, detectándose una sensibilidad del 98% para HRP2 con el 51% de resultados falsos positivos en el día 28 de la infección y un 87% de sensibilidad para pLDH sin ningún caso falso positivo al día 7, mientras que la especificidad fue del 55% y 96%, respectivamente y, durante 59 episodios de fiebre recurrente la sensibilidad fue del 100% para HRP2 y el 91% para pLDH, mientras que la especificidad fue del 33% y 100%, respectivamente (Mbabazi, y otros, 2015).

De esta manera se concluyó que las pruebas rápidas basadas en HRP2 son útiles para el diagnóstico inicial de la malaria; sin embargo, con una especificidad superior, las PDR basados en pLDH son más apropiadas para monitorizar el tratamiento y diagnosticar la malaria recurrente (Mbabazi, y otros, 2015).

2.2.4.2. Enzima-inmunoensayo

La técnica de enzima-inmunoensayo (EIA) se basa en la detección de anticuerpos anti-*Plasmodium* en el suero de los pacientes y detecta la presencia de inmunoglobulinas IgG o IgM contra antígenos del parásito, pero este método de detección no se considera de uso rutinario para el estudio y diagnóstico clínico de los pacientes con malaria debido a que su uso principal es en estudios seroepidemiológicos donde se requiere conocer el estado de inmunidad de una población y el tamizaje en donantes de bancos de sangre (González & Chiriboga, 2013).

La aparición de anticuerpos contra los antígenos de malaria comienza en pocos días después de la infección y aumenta de manera significativa en pocas semanas, y persiste por meses o inclusive años en pacientes semi-inmunes que habitan zonas endémicas (Campuzano & Blair, 2010).

2.2.4.3. Pruebas Moleculares

Desde 1990, varios estudios han mencionado la aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el diagnóstico molecular de la malaria para los estudios epidemiológicos, en el cribado de donantes infectados en los bancos de sangre, la identificación de portadores asintomáticos de malaria y en el seguimiento de la respuesta terapéutica (Nóbrega, Carvalho, & Alves, 2011).

La OMS recomienda el método y el patrón oro para el diagnóstico de laboratorio de rutina de la malaria es la microscopía, a pesar de la disminución de su sensibilidad y especificidad en situaciones de baja densidad de parásitos e infecciones mixtas, motivo por el cual, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha desarrollado para el diagnóstico rápido y correcto de la malaria, ofreciendo un resultado rápido (<2 horas) pero mucho más costoso y complejo, debido a que se necesita infraestructura adecuada, requerimientos de estandarización, personal entrenado y tiempo de ejecución en relación a la técnica de gota gruesa; adicionalmente ha demostrado ser un método eficaz, sensible y específico para el diagnóstico de infecciones mixtas, baja parasitemia y diagnóstico diferencial de especies de *Plasmodium*, teniendo el potencial de superar todas las limitaciones del método de diagnóstico tradicional, pero su alto costo limita su implicación clínica para el diagnóstico de la malaria (Shahzadi, y otros, 2014).

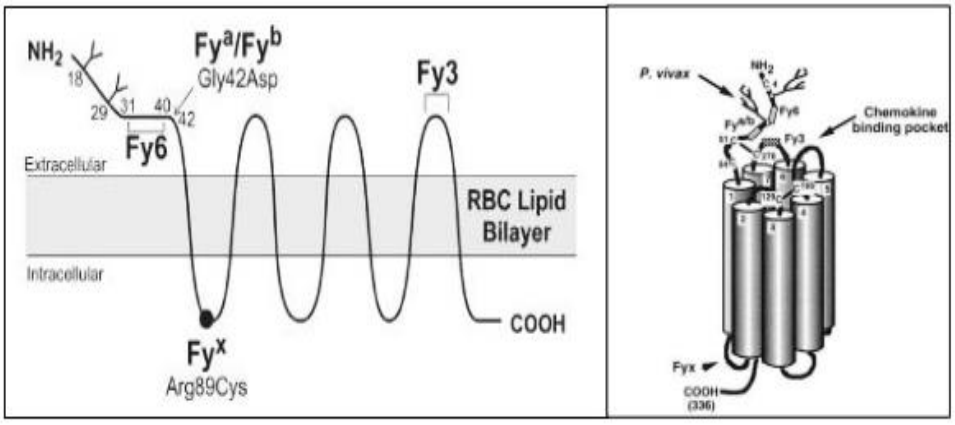
Además, la PCR permite la identificación de cepas de *Plasmodium* con polimorfismos genéticos asociados a la variabilidad genética del parasito, resistencia a antimaláricos y la realización de la prueba en muestras almacenas por varias semanas (Campuzano & Blair, 2010) (Mendizabal & Padilla, 2003).

2.3. Sistema Sanguíneo Duffy

El grupo sanguíneo Duffy (Fy) fue descrito en 1950 y está constituido por los alelos Fy^a y Fy^b. Según la Asociación Internacional de Transfusión de Sangre (ISBT) se le asigna el número 008 al Sistema Duffy y el símbolo del sistema es FY (Nathalang, Intharanut, Siriphanthong, Nathalang, & Kupatawintu, 2015). Los antígenos Fy^a y Fy^b son codificados por el gen bialélico, FY*A y FY*B que dan lugar a los cuatro fenotipos sanguíneos más frecuentes: Fy(a+b-), Fy(a-b+), Fy(a+b+) y Fy(a-b-). El mecanismo principal del fenotipo

Fy (a-b-) es resultado de una mutación en la caja GATA-1 del promotor del gen T-67C, lo cual produce la ausencia de la proteína en los eritrocitos (Arreygue, 2011).

El Sistema Duffy fue el primero de los grupos sanguíneos asignado a un autosoma mediante estudios citogenéticos y consiste de 6 antígenos: Fya, Fyb, Fy3, Fy4, Fy5 y Fy6, los cuales son codificados por el gen DARC, y este junto con el gen RH se localizan en el cromosoma 1. La glicoproteína Duffy es una proteína transmembrana que atraviesa la membrana del RBC siete veces y tiene un dominio N-terminal extracelular y un dominio C -terminal citoplasmática. Se comparte similitud estructural con G-receptores acoplados a proteína pero hasta ahora, no se ha demostrado que es un miembro de esta familia. El sitio de unión para las quimiocinas, el sitio de unión para *P. vivax*, y los principales dominios antigénicos están ubicados en las regiones superpuestas en el dominio N -terminal extracelular (Dean, 2005). (Figura N°3)



Autor: *Buelvas, Muñiz-Díaz y González, 2014.*

Fuente: *Inmunohematología básica y aplicada*

Figura N°3. Ubicación de los antígenos Fy(a/b) en el eritrocito

Los antígenos del sistema Duffy atraviesan la membrana de los eritrocitos siete veces, en los cuales se expresan sus diferentes antígenos.

2.3.1. Estructura Molecular del Sistema Duffy

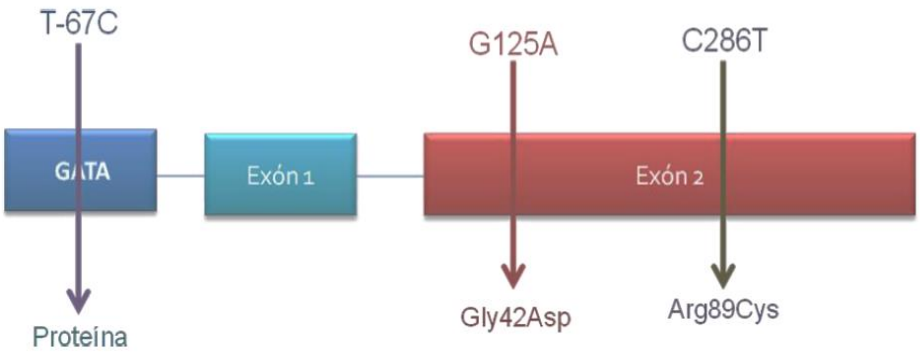
2.3.1.1. Receptor DARC

El gen DARC (receptor del antígeno Duffy para quimiocinas), codifica para una glicoproteína de membrana localizada en el brazo largo del cromosoma 1, banda 23 sub-banda 2 (1q23.2); posee 2 exones que codifican para el receptor DARC, que porta los 5

antígenos del sistema sanguíneo Duffy y el exón 1 que codifica para los primeros 7 aminoácidos de la glicoproteína y el resto de los residuos están codificados en el exón 2 (Arreygue, 2011).

El mecanismo principal del fenotipo Fy(a-b-) es resultado de una mutación en la caja GATA-1 del promotor del gen T-67C, en el alelo FY*B en población africana de etnia negra y en el alelo FY*A en individuos de Nueva Guinea, lo cual produce la ausencia de la proteína en los eritrocitos (Arreygue, 2011).

En la Figura N°4, se esquematiza el polimorfismo de un solo nucleótido (SNPs) del gen DARC y los sitios donde ocurren los cambios que originan los distintos fenotipos del grupo sanguíneo Duffy (Arreygue, 2011). El gen que codifica el antígeno Duffy tiene dos grandes polimorfismos. Una sustitución de aminoácidos Asp → Gly (codón 42) en la región N-terminal, que se asocia con los antígenos Fy^b y Fy^a, respectivamente. El segundo polimorfismo T → C, transición en el nucleótido -33 en el promotor del gen Duffy, elimina la expresión del gen en los eritrocitos (King, y otros, 2011).



Autor: *Marcelo Arreygue, 2011*

Fuente: *Determinación de los alelos principales de los grupos sanguíneos Duffy y Diego*

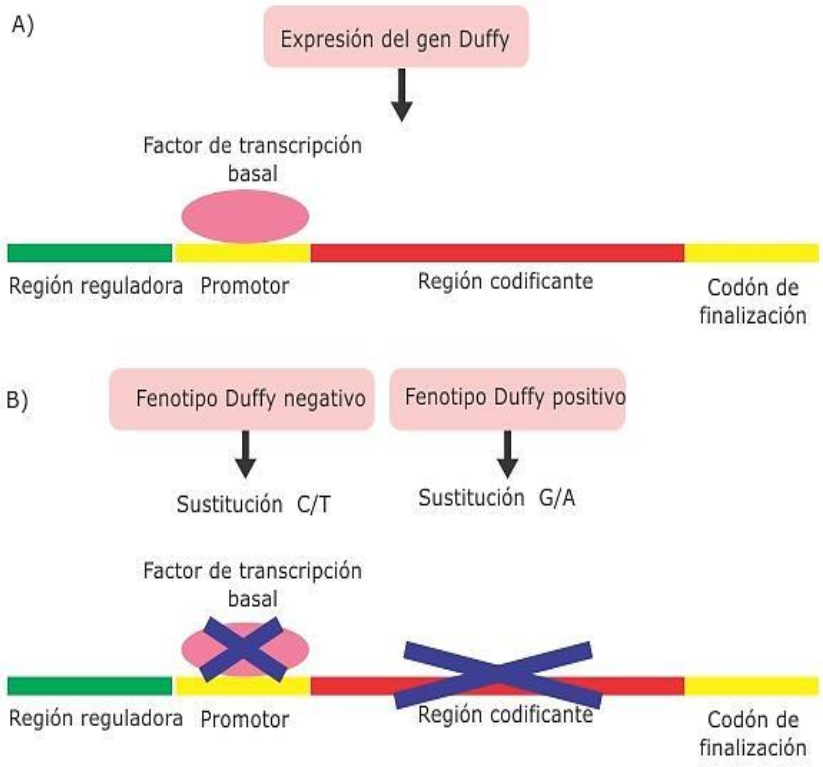
Figura N°4. SNPs del gen DARC

Diferentes fenotipos del grupo sanguíneo Duffy que se originan por una mutación puntual en el gen.

El receptor DARC pertenece a la familia de siete proteínas de dominio transmembrana, el cual puede proporcionar una señal biológica indirecta en respuesta a quimiocinas de unión debido a que es altamente expresado en las células endoteliales que recubren las vénulas post-capilar. Los autores especulan que su localización celular podría ser consistente con un papel para DARC en el tráfico de leucocitos. Sin embargo,

argumentando en contra de esta idea es el hecho de que los individuos que carecen de expresión de DARC sobre los eritrocitos parecen tener la función inmune normal (Horuk, 2015).

Un factor de transcripción basal se expresa en el promotor del gen para dar lugar al fenotipo Duffy positivo que se da por el cambio de Guanina/Adenina (FY*A/FYA*A, FY*A/FY*B, FY*A/FY*Bnull, FYB*/FY*B, FY*B/FY*Bnull) y el fenotipo Duffy negativo que ocurre por el cambio de Citosina/Timina en la región promotora interrumpiendo así la transcripción y la subsecuente expresión del gen (Figura N°5.) (Estrada, Escobar, Gomez, Cadavid, & Gil, 2013)



Autor: *Lina Estrada, 2013*

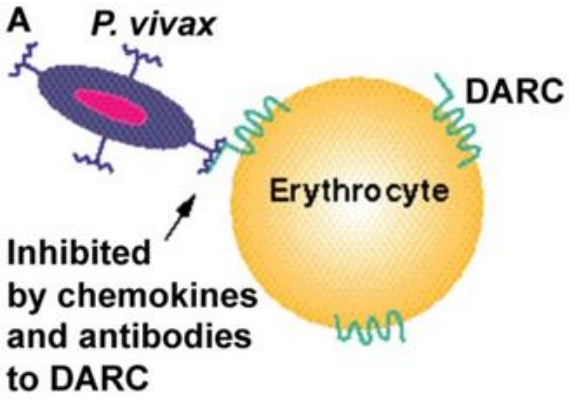
Fuente: *Expresión del fenotipo Duffy negativo en mujeres afrodescendientes y su relación con la preeclampsia*

Figura N°5. Expresión del Sistema Duffy

Esquema de la diferencia estructural entre fenotipo Duffy positivo y negativo por la sustitución C/T y G/A

Este gen polimórfico, con múltiples alelos, como las formas codominantes Fy^a y Fy^b que son codificados por el gen bialélico para los antígenos Fy^a y Fy^b de manera respectiva que difieren entre sí por un SNP que dan lugar a los cuatro fenotipos sanguíneos: Fy (a+b-), Fy (a-b+), Fy (a+b+) y Fy(a-b-) (Arreygue, 2011).

La quimiocina humana, proteína de unión a DARC que se expresa sobre los eritrocitos y es utilizado por *P. vivax* para poder entrar a la célula, puede ser inhibida por un anticuerpo monoclonal a DARC, FY6, y por quimiocinas tales como CXCL1 y CXCL8 y los anticuerpos del receptor DARC (Figura N° 6) (Horuk, 2015)



Autor: *Richar Horuk*

Fuente: *El receptor de quimiocinas del antígeno Duffy DARC / ACKR1*

Figura N°6. Expresión del receptor DARC en los eritrocitos

DARC es expresado en los eritrocitos y es utilizado por el *P.vivax* como puerta de ingreso a la célula roja, y puede ser inhibida por la producción de quimiocinas y anticuerpos.

2.3.2. Antígenos del Sistema Duffy

Los genes FY*A y FY*B dan lugar a tres fenotipos comunes en la población de etnia blanca: Fy(a+b-), Fy(a+b+) y Fy(a-b+); en la población de etnia negra da origen a un cuarto fenotipo caracterizado por la ausencia de los antígenos a y b Fy(a-b-) siendo extremadamente raro en otras razas (Geoff, 2013) (Suardíaz, 2013). Este sistema es considerado polimórfico por las combinaciones fenotípicas que se presentan. (Tabla N°1)

Tabla N°1 Antígenos del sistema Duffy

N°	*Nombre*	*Población de etnia blanca*	*Población de etnia negra*
FY1	Fy^a	Polimófico	Polimófico
FY2	Fy^b	Polimófico	Polimófico
FY3	Fy3	Alto	Polimófico
FY4	Fy4	Bajo	Polimófico
Fy5	Fy5	Alto	Polimófico
FY6	Fy6	Alto	Polimófico

Autor: *Geoff, Daniels*

Fuente: *Human Blood groups*

El polimorfismo Fy^a/Fy^b identificado tanto en individuos de etnia negra como blanca es debido a un cambio de base que da lugar a la presencia del AA glicina en la proteína Fy^a y de aspártico en la proteína Fy^b (Geoff, 2013).

Los antígenos de mayor importancia son el Fy^a y el Fy^b, los restantes son el Fy3, Fy4, Fy5 y el Fy6 (Figura N° 3). La frecuencia de los fenotipos Fy^a y Fy^b difiere entre las diferentes poblaciones. Se ha descrito una forma débil de Fy^b denominada Fy^x, que solo puede ser detectada por los anti-Fyb muy potentes. Se ha sugerido que el antígeno Fy5 es el resultado de la interacción de los productos de los genes Rh y Duffy, ya que este antígeno está ausente en los eritrocitos Rh nulo (Suardíaz, 2013).

Cuando se presenta un cambio de guanina/adenina (G/A) en la región codificante del gen, se producen los diferentes genotipos (FY*A/FY*A, FY*A/FY*B, FY*A/FY*Bnull, FY*B/FY*B, FY*B/FY*Bnull) que corresponden al fenotipo Duffy positivo y que son comunes en la población de etnia blanca. Sin embargo, cuando se presenta un cambio de citosina/timina (C/T) en la caja GATA, se expresa el genotipo (FY*Bnull/FY*Bnull) correspondiente al fenotipo Duffy negativo, que es más frecuente en la población afrodescendiente (Estrada, Escobar, Gomez, Cadavid, & Gil, 2013) (Tabla N°2)

Tabla N° 2 Fenotipos del sistema Duffy

Gen	*Nombre*	*Frecuencia Fenotípica (%)*	
		Población de etnia blanca	*Población de etnia negra*
	Fy (a+b-)	17	9
Fy^a	Fy (a+b+)	49	1
Fy^b	Fy (a-b+)	34	22
	Fy (a-b-)	Muy infrecuente	68

Autor: *Jorge Suardíaz*

Fuente: *Laboratorio Clínico-Grupos sanguíneos eritrocitarios*

2.4. Técnicas para la detección del Antígeno Duffy

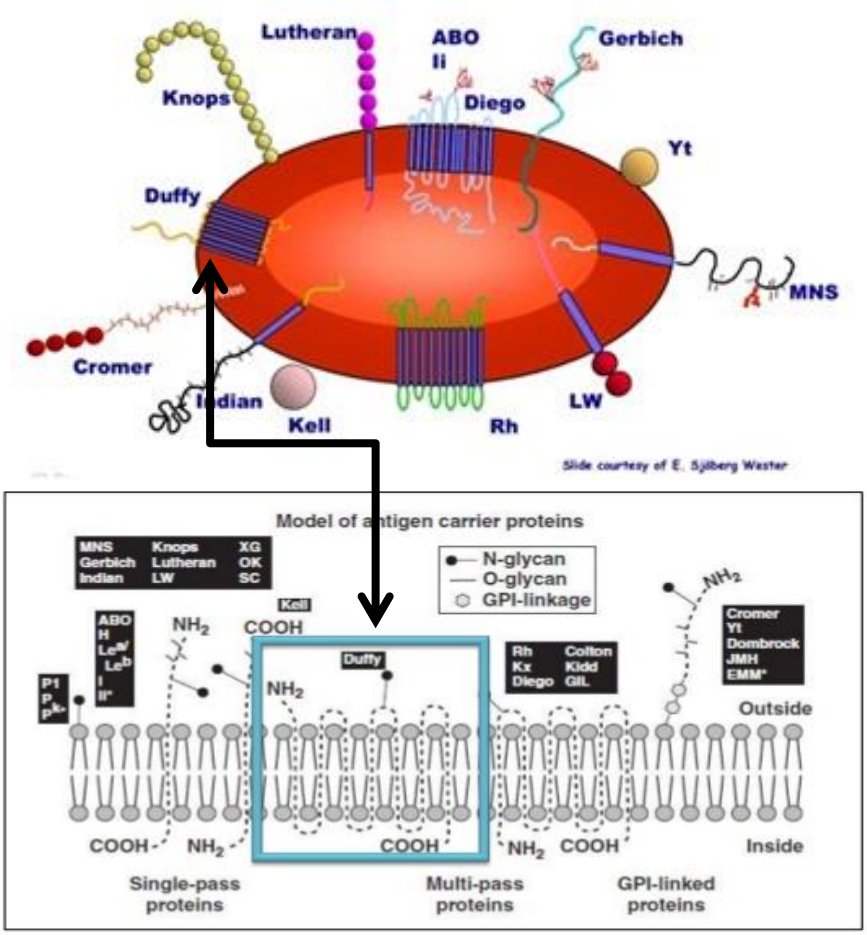
2.4.1. Fenotipificación serológica del sistema Duffy

La tipificación de antígenos del sistema Duffy se basa en la reacción antígeno-anticuerpo la cual se evidencia por la presencia de aglutinación (reacción positiva) para la detección de los antígenos Fy^a y Fy^b en las células rojas humanas que reaccionaran con los reactivos mono-policlonales que contienen anticuerpos anti-Fya y anti-Fyb, mientras que la reacción negativa se evidencia por la ausencia de aglutinación. La mayoría de los anticuerpos anti-Fya son de la clase IgG y se desarrollan principalmente como resultado de una transfusión de sangre; estos pueden presentarse solos, pero generalmente se encuentran en mezclas de anticuerpos. Anti-Fyb es relativamente raro y de clase IgG y se desarrolla principalmente como resultados de embarazo incompatibles. Ambos aloanticuerpos son identificados de manera óptima por prueba de antiglobulina indirecta (IAT) (CLS Limited, 2010) (BIOSCOT, 2013).

2.4.2. Fenotipificación molecular del Sistema Duffy

La identificación de los diferentes alelos del gen Duffy (Figura N°7) permite evaluar el estado de las posiciones -46 y 131 del gen con el fin de identificar las substituciones T-46C y A131G responsables de los diferentes alelos mediante la aplicación de cebadores específicos para amplificar el fragmento de 1.0 kb del gen Duffy, del cual se puede

amplificar con nuevos cebadores para discriminar entre Fy+ y Fy- , y en caso de Fy+ se puede realizar una segunda amplificación con cebadores específicos para definir el polimorfismo del genotipo que origina los fenotipos Fya+Fyb+, Fya+Fyb- y Fya-Fyb+ mediante análisis de los fragmentos de restricción. Adicionalmente, los productos de digestión pueden ser observados por electroforesis en gel de agarosa para determinar el tamaño de los fragmentos así como: bandas de 62, 77 y 82 pares de bases (pb) corresponden a Duffy positivo (Fy +), bandas de 12, 62, 65 y 82 pb se interpretan como Duffy negativo (Fy -), bandas de 86 y 73 pb son Fya+b- , bandas de 159, 86 y 73 pb son Fy a+b+ y una banda de 159 pb es Fy a-b+ (Gonzalez, y otros, 2012).



Autor: *Bárbara Arévalo, Gustavo González, 2014*

Fuente: *Sistema Sanguíneo Duffy*

Figura N°7. Antígenos del Sistema Duffy

2.5. Relación entre Sistema Sanguíneo Duffy y Etnia.

El grupo sanguíneo Duffy se caracteriza por una distribución poblacional étnica muy peculiar y la frecuencia de los fenotipos Duffy varía en diferentes poblaciones. El fenotipo nulo Duffy, Fy (ab-), es poco frecuente entre las poblaciones caucásicas y asiáticas, mientras que es el fenotipo más común que se producen en más de dos tercios de la población de etnia negra. Esta variación racial en la distribución de antígenos Duffy es el resultado de una selección positiva de la ausencia de antígenos Duffy, que hace que los glóbulos rojos sean más resistente a la invasión de un parásito de la malaria (Dean, 2005).

El fenotipo Duffy positivo se lo encuentra presente aproximadamente en un 32% de las personas de etnia negra, en cambio se encuentra de un 80-100% en poblaciones amerindias y caucásicas. Así, para que se presente la enfermedad en individuos genéticamente predispuestos, es necesario que se exponga al agente vector (presencia de *Plasmodium vivax*) (Lisker, Zentella, & Grether, 2013).

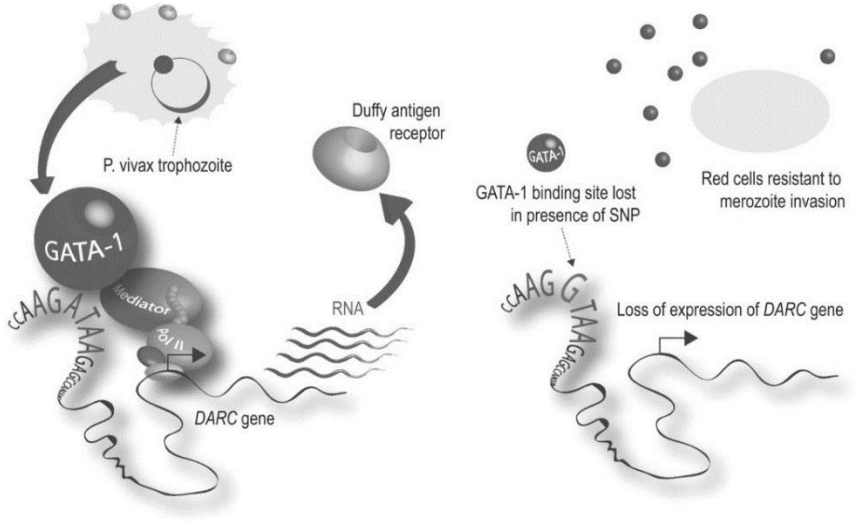
La brecha en la distribución de *P. Vivax* en África en comparación con el resto del mundo es visto como la consecuencia de la falta de expresión del antígeno Duffy en los glóbulos rojos (fenotipo Duffy-negativo), el cual permite la invasión de reticulocitos por *P. vivax*, y es predominante en las poblaciones africanas, contrario a los observados en las poblaciones europeas, asiáticas y americanas en los que el fenotipo Duffy-positivo es más común (Carvalho, y otros, 2012) (Lisker, Zentella, & Grether, 2013).

2.6. Relación entre Malaria y Sistema sanguíneo Duffy

El antígeno Duffy ha desempeñado un papel fundamental en los estudios de invasión de eritrocitos por *P.* vivax*,* y su ligando al parásito, la proteína de unión a Duffy (PvDBP), que se expresa en la superficie celular del parásito y se ha identificado en una región rica en cisteína de 330 aminoácidos que se refiere como la región II, siendo designada como PvDBPII (King, y otros, 2011). *Plasmodium vivax* infecta eritrocitos humanos a través de una vía que requiere la interacción entre la proteína del apical del parásito (PvDBP) y su receptor en los reticulocitos, el receptor de antígeno de Duffy para quimiocinas (DARC) (Souza-Silva F. , y otros, 2014)

El efecto protector a la infección por *P. vivax* ha sido ampliamente reconocida por la ausencia de grupo sanguíneo Duffy (Fy) en la superficie de los glóbulos rojos en individuos de descendencia afroamericana. De hecho, los estudios recientes de las diferentes regiones donde la malaria es endémica han comenzado a revelar nuevas perspectivas sobre la asociación entre el polimorfismo del gen Duffy y malaria ocasionada por *P. vivax* (Zimmerman, Ferreira, & Howes, 2013).

La invasión de células eritrocitarias por *P. vivax* parece ser dependiente del antígeno Duffy (Fy). Y aunque, este aspecto ha sido considerado, la enfermedad puede ocurrir en ausencia del receptor (DARC), por lo que se ha demostrado que *P. vivax* puede infectar a los glóbulos rojos y causar enfermedad clínica en personas Duffy-negativos. Esto sugiere que la relación entre *P. vivax* y antígeno Duffy es más compleja de lo que se describe habitualmente, lo que indica que el parásito evolucionó las vías alternativas de invasión de células rojas (Zimmerman, Ferreira, & Howes, 2013), y utiliza otros receptores de Duffy para invadir los eritrocitos, lo que pueden tener un enorme impacto en su distribución mundial (Carvalho, y otros, 2012) (Knight, 2009) (Figura N°8).



Autor: *J.C. Knight*

Fuente: *Functional consequences of genetic variants in malaria*

Figura N°8. Activación del receptor DARC

Representación esquemática de cómo se altera la expresión del DARC de tal manera que las células rojas carentes de este receptor resisten a la invasión por *P. vivax.*

2.7. MARCO CONCEPTUAL

- **Aloanticuerpo:** Anticuerpos contra los propios antígenos del individuo: autoanticuerpos contra antígenos, eritrocitos y plaquetas, y los producidos en enfermedades autoinmunes (Sandoval & Herrera, 2009).

- **Ciclo esporogónico:** Período de incubación del parásito dentro del vector (Martínez-Salazar, Tobón-Castaño, & Blair, 2012).

- **Efecto prozona:** Es el exceso de anticuerpos, utilizado para indicar falsos negativos por exceso (Rugeles, Patiño, & Montoya, 2009).

- **Etnia:** Grupo social, comunidad de personas que comparten diversas características y rasgos como ser: lengua, cultura, religión, música, indumentaria, ritos, fiestas (Gay, 2006).

- **Fenotipo:** Es cualquier característica observable de un organismo (Silva, 2012).

- **Merozoito**: Fase invasiva del *Plasmodium,* producido por segmentación de un esquizonte durante la fase de reproducción asexual del ciclo vital del parásito (Castro & Rodríguez, 2009).

- **Paciente Asintomático:** Individuo que no presenta síntomas de enfermedad (Gay, 2006).

- **Paciente Portador:** Individuo que alberga y disemina a otros un agente patógeno, pero sin enfermar el mismo (Gay, 2006).

- **Paciente:** Individuo que padece física y corporalmente, y especialmente que es receptor de un servicio sanitario (Gay, 2006).

- **Polimorfismo:** se define por la existencia de varios alelos (formas diferentes de un mismo gen) en una población (Coronado, Vega, Gutierrez, Pérez, & Peláez, 2011).

- **Pruebas de detección:** Las pruebas de detección se usan para identificar una afección en las personas que pueden tener una enfermedad antes de que se

presenten los síntomas; estas pueden incluir análisis de sangre, estudios de diagnóstico por imágenes o pruebas de la capacidad de una persona de realizar una tarea (Goodman & Livingston, 2013).

- **Pruebas moleculares:** Se basan en la amplificación exponencial de mínimas cantidades de genético, siendo útiles para el diagnóstico de pruebas infecciosas y parasitarias, clonación de genes, generación de librerías de cDNA a partir de pequeñas cantidades de ARNm, generación de grandes cantidades de ADN para secuenciación, análisis de mutaciones, búsqueda de expresión diferencial de genes (Gonzalez & Zavala, 2005).

- **Pruebas serológicas:** Se basan en la detección de anticuerpos en sangre producidos contra un microorganismo específico indicando una infección activa o si alguna vez se ha estado expuesto (Dugdale, 2009).

- **Quimiocinas:** son una familia de citosinas quimiotácticas de bajo peso molecular que provocan respuestas de migración celular dirigida (Monteagudoa, Pellín-Carceléna, Martínb, & Ramos, 2011).

- **Receptor:** Proteína que en el ser humano está codificada por el gen DARC, el cual regula los niveles plasmáticos de la IL-8 (Estrada, Escobar, Gomez, Cadavid, & Gil, 2013).

- **Secuestro del parasito:** Es la unión de glóbulos rojos parasitados al endotelio capilar de órganos profundos y tiene lugar durante el desarrollo de trofozoítos y esquizontes, mientras las formas inmaduras del parásito (anillos) están libres en la circulación periférica (Vásquez & Tobón, 2012).

- **Semi-inmune:** Se desarrolla de una manera lenta, de 5 a 10 años y proporciona protección rápida frente a malaria severa, pero más tardía para cursar de forma asintomática y no evita la infección ni el mantener parasitemia en sangre (Monge, 2008).

- **Premunición:** Estado de inmunidad relativa que atenúa las infecciones (Gay, 2006)

CAPÍTULO III

3.1. MARCO METODOLÓGICO

3.1.1. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.1.1. Tipo de Estudio

Estudio transversal descriptivo de asociación cruzada, porque son investigaciones que recopilan datos en un momento único con la finalidad de relacionar dos o más variables para describir las características más importantes de la población de estudio mediante la definición precisa y obtención de una muestra representativa, en la que se determinará la frecuencia de los individuos que presentan la característica o enfermedad en estudio (Argimón & Jimenez, 2013) (Fernández, Fernández, & Baptista, 2010).

3.1.1.2. Tipo de Muestreo

Es de tipo aleatorio todo los pobladores del sector “50 casas” de Esmeraldas tiene la misma probabilidad de ser seleccionados para formar parte de la muestra.

3.1.1.3. Tamaño de Muestra

Para el cálculo del tamaño de muestra se utilizó la fórmula de población infinita, utilizando la prevalencia del 50% del estudio realizado por Lina González y colaboradores, 2012.

$$n = \frac{Z_{1-\propto}{}^{2}\ x\ p\ x\ q}{d^2}$$

$$n = \frac{1.96^2 * 0.5 * 0.5}{0.05^2}$$

$$n = \frac{0.9604}{0.05^2}$$

$$n = 384$$

Dónde:

N: tamaño de la población

N: tamaño de la muestra

p: proporción esperada

q: 1-p

d: precisión del estudio 0,3%

$Z_{1-\alpha}{}^{2}$: nivel de confianza

Decisión: el número de pobladores del sector “50 casa” que participaron en la investigación es de 384, tamaño de muestra que nos permitirá relacionar la presencia de antígenos Duffy y malaria conjuntamente con anticuerpos producidos contra la enfermedad.

3.1.1.4. Hipótesis:

- **H0:** El sistema eritrocitario Duffy no está relacionado con la presencia de individuos portadores de malaria.

- **H1:** El sistema eritrocitario Duffy está relacionado con la presencia de individuos portadores de malaria.

3.1.1.5. Criterios de Inclusión

Todos los pobladores relacionados al sector “50 casas” que han permanecido durante tres años.

3.1.1.6 Criterios de Exclusión

Pobladores de otros sectores o que habiten el lugar menos de tres años.

3.1.1.7 Análisis Estadístico

Las variables obtenidas a partir del análisis de las muestras y las encuestas serán recolectadas en una base de datos creada en Excel, dentro de la base de datos se encontraran (código de la muestra, edad, sexo, etnia, procedencia, fenotipos del sistema Duffy, presencia o ausencia de anticuerpos y antígenos de malaria, número de veces que los pobladores han padecido la enfermedad y posteriormente serán agrupados por familias); se aplicará una estadística descriptiva para ordenar los datos en tablas y su posterior representación gráfica. Las variables serán analizadas en el programa estadístico informático SPSS V0.23 y la asociación entre las variables categóricas será analizada mediante la prueba estadística de independencia chi-cuadrado con un intervalo de confianza del 95% que lleva implícito un valor $p < 0,05$.

3.2. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

3.2.1. **Variable dependiente:** Malaria asintomática.

3.2.2. Variables independientes:

- Fenotipos Duffy.
- Antígenos de Malaria.
- Anticuerpos contra malaria.
- Edad.
- Procedencia.
- Etnia.
- Integrantes por familia.
- Episodios de malaria.

Operacionalización de Variables

Variable principal (dependiente)	Definición Operacional	Dimensión	Indicador	Escala	Tipo de variable	Técnica
Malaria asintomática	Individuos infectados por *Plasmodium sp.* que no presentan sintomatología clínica	Presencia o ausencia de *Plasmodium sp.* en la muestra del paciente	Presencia o ausencia de *Plasmodium vivax*	Nominal	Cualitativa	Resultados de pruebas serológicas
Variables secundarias (independientes)	**Definición Operacional**	**Dimensión**	**Indicador**	**Escala**	**Tipo de variable**	**Técnica**
Fenotipos Duffy	Expresión visible mediante aglutinación con antisueros específicos anti-Fy^a y anti-Fy^b	Presencia o ausencia de aglutinación	Frecuencia de individuos positivos para Fy^a/Total de individuos analizados. Frecuencia de individuos positivos para Fy^b/Total de individuos analizados.	Nominal	Cualitativa	Resultados de pruebas de fenotipificación.
Antígenos de malaria	Detección de antígenos de *Plasmodium* en PDR con anticuerpos monoclonales anti-p.f. y anti-pLDH	Presencia o ausencia de la segunda o tercera línea en el cassette de PDR.	Frecuencia de individuos positivos para antígenos de malaria/Total de individuos analizados.	Nominal	Cualitativo	Resultados de pruebas de diagnóstico rápido (PDR).
Anticuerpos contra malaria	Detección de anticuerpo IgG o IgM contra malaria	Presencia o ausencia de anticuerpos contra malaria mediante interpretación del punto de corte de las pruebas serológicas	Frecuencia de individuos positivos para anticuerpos de malaria/Total de individuos analizados.	Nominal	Cualitativo	Resultado de pruebas serológicas.
Edad	Número de años de un individuo registrados desde su fecha de nacimiento hasta el día de la toma de muestra	Años cumplidos del individuo.	Rango de edad del total de individuos analizados.	Discreta	Cuantitativa	Resultados de encuestas.
Procedencia	Lugar de nacimiento indicado por el individuo	Total de individuos habitantes en el sector.	Total de individuos analizados en el sector.	Nominal	Cualitativo	Resultados de encuestas.
Etnia	Grupo étnico seleccionado por el individuo	Negro Blanco Mestizo Indígena Gitano Extranjero	Frecuencia de individuos pertenecientes a los diferentes grupos étnicos	Nominal	Cualitativo	Resultados de encuestas.
Integrantes por familia	Número de familiares con diferente grado de consanguinidad que cohabitan en una casa indicado en la encuesta por el jefe de hogar	Familiares	Número de familias	Discreta	Cuantitativo	Resultado de encuestas
Episodios de malaria	Número de veces que el individuo manifiesta haber presentado malaria en un periodo de tiempo	Cuantas veces	Frecuencia de episodios de malaria en un período de tiempo	Discreta	Cuantitativa	Resultado de encuestas.

3.3. MATERIALES Y PROCESO

3.3.1. Materiales

- Agujas toma múltiple BD Vacutainer 21G x 1” (0.8 x 2 mm)
- Swabs de alcohol
- Tubos tapa roja BD vacutainer 10 mL 13x75
- Tubos tapa lila con anticoagulante EDTA BD vacutainer 4 mL 13x75
- Pipetas Pasteur
- Puntas de plástico 10 / 100 / 1000 µL
- Crioviales de 5 mL
- Gradillas para tubos
- Gradillas para Tarjetas en Gel
- Pipeta automática de 10-100 / 2-10 / 100-1000 µL
- Centrifuga automatizada para tarjetas DG Gel
- Microcentrifuga refrigerada
- Incubadora para tarjetas DG Gel
- Termociclador
- Cámara de extracción de ADN
- Tubos eppendorf de 1.5 mL
- Descartador de cortopunzantes

3.3.2. Reactivos

- Diluyente LISS
- Tarjetas DG Coombs
- Anti-Fya 5 mL
- Anti-Fyb 2 mL
- Kit SD Malaria Antigen
- ELISA Kit - Malaria Ab
- Wizard Genomic DNA Purification Kit
- Alcohol 70 %
- 2-Isopropanol
- Primer forward y reverse para especies de *Plasmodium* específicos para *vivax* y *falciparum.*

3.3.3. Control de Calidad

Pruebas de diagnóstico rápido (PDR):

- Se verificó cada lote de reactivos, que no estén contaminados y almacenados a temperatura ambiente.
- Se utilizaron controles interno de malaria positivo por *P. vivax* y *falciparum* para un grupo de pruebas.

Prueba Enzimainmunoensayo (EIA):

- Se verificó cada lote, que los reactivos no estén contaminados y su temperatura de almacenamiento esté a 4°C.
- Se llevó a cabo un control interno de anticuerpos contra malaria positivo y negativo proveniente de sueros de pacientes con y sin malaria respectivamente.
- Se realizó una curva de calibración mediante diluciones del calibrador del kit y muestra reactiva para determinar el límite de detección de la técnica.

Fenotipificación Sistema Duffy

- Se llevó a cabo un control de células comerciales Fy^a y Fy^b
- Control de calidad del reactivo anti- Fy^a y Fy^b.: se medirán las características de avidez, potencia y especificidad siguiendo los protocolos de AABB (AABB, 2012).

Tarjetas DG Coombs

- Se comparó las reacciones y los resultados obtenidos según los patrones de reacción indicados en la tabla de resultados que se encuentran en cada kit.
- Cada lote fue inspeccionada la integridad de las tarjetas.
- Se comprobó la validez de cada lote mediante el uso de controles positivos y negativos.
- En cada serie de pruebas se colocaron controles internos positivos y negativos
- No se utilizaron las tarjetas con presencia de contaminación microbiológica o cambio de color de los microtubos, ni presencia de burbujas atrapadas en el gel, o algún con disminución del volumen del gel o gel agrietado, tarjetas seca o después de la fecha de caducidad.
- Las tarjetas fueron conservadas en una temperatura adecuada según las recomendaciones de cada kit (AABB, 2012)

Extracción de ADN:

- Se verificó cada lote, que los reactivos no estén contaminados y almacenados a temperatura adecuada.
- Se cuantificó el ADN presente en la muestra mediante NanoDrop.

Reacción en cadena de la polimerasa-Tiempo Real (PCR-RT):

- Se realizó un PCR-Tiempo Real de las muestras con fenotipo Duffy negativo reactivas y no reactivas en Enzima inmunoensayo y controles positivos para *P. vivax* y *falciparum*.

3.4. PROCEDIMIENTO

Ese estudio se realizó en cuatro fases:

3.4.1. Fase Uno:

- *Autorización del Ministerio de Salud Pública del Distrito 08D01*: se realizó un oficio dirigido a la Doctora Nadia Bernal Zambrano, Directora Distrital de Salud 080D1-Esmeraldas para que autorice la realización de la investigación en la zona, obteniendo una respuesta positiva: (Anexo 1).

- *Consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética de la Investigación PUCE:* todos los pobladores que hayan habitado el sector “50 Casas” de la Parroquia Vuelta Larga del cantón y provincia de Esmeraldas durante los tres últimos años se les leyó los ítems que contenía el documento y al acceder, los pobladores firmaron un consentimiento informado en autorización a la toma de muestra y análisis de los componentes sanguíneos. Esto se realizó mediante participación voluntaria y con rotulación de códigos que se asignaron a cada habitante manteniendo la confidencialidad respectiva: Aprobación del Comité de ética de la Investigación-PUCE (Anexo 2) y Consentimiento Informado (Anexo 3).

- *Encuesta:* se realizó una encuesta general al jefe de hogar y a todos los participantes de la investigación bajo los lineamientos del Ministerio de Salud Pública y del Centro Latinoamericano de Investigación en malaria, de los cuales se utilizaran datos como:

etnia, género, edad, procedencia, número de veces que han padecido la enfermedad y la última vez de recurrencia a la misma, grupo familiar para realizar una base de datos en el programa Excel (Anexo 4).

3.4.2. Fase Dos:

Elección del período de recolección de muestra: La toma de muestras se realizó luego de la aprobación del consentimiento informado durante el mes de julio-agosto del 2015, manteniendo los criterios de inclusión y exclusión planteados en el estudio.

3.4.3. Fase Tres:

Fase pre-analítica y control de calidad: Se realizó el control de calidad de todos los reactivos siguiendo la metodología del Manual Técnico de la Asociación Americana de Bancos de Sangre, 2012 para la fenotipificación serológica de los antígenos Duffy y el control de calidad en base a las indicaciones del Kit para las pruebas de diagnóstico rápido, EIA y molecular.

3.4.4. **Fase Cuatro**: *Realización de Pruebas*:

Pruebas de Diagnóstico Rápido:

Se realizó en base al Protocolo 1 (Anexo 5):

- Preparación de muestra: se mezclaron 10 veces por inversión las muestras extraídas por venopunción con anticoagulante EDTA.

- Realización del test: Se añadieron 5 µL de sangre total con EDTA con un asa de punta circular en el pocillo redondo y se añadieron 4 gotas de diluyente en el pocillo cuadrado de cada casett.

- Lectura de los resultados: se basa en la detección de antígenos del parásito usando inmunocromatografía de flujo lateral con dos anticuerpos policlonales como dos líneas separadas a través de una tira de prueba: un anticuerpo policlonal (línea de prueba

p.f.) específica de la dehidrogenasa láctica de *P. falciparum* y otro anticuerpo policlonal (línea de prueba pan) es pan específico de la dehidrogenasa láctica de la especie *Plasmodium (vivax, malariae* y *ovale).* Se identificarán los diferentes antígenos de *Plasmodium* presentes en la sangre de individuos infectados y proporcionan resultados 15 minutos mediante la aparición de una línea control "C" que valida la prueba y la presencia de las líneas de prueba Pf y Pan que demuestran la presencia de las proteínas antigénicas del parásito.

Fenotipificación del Sistema Duffy:

Se realizó en base a los insertos de los reactivos Anti-Fya (Anexo 6) y Anti-Fyb (Anexo 7):

- Preparación de muestra: Se preparó de una suspensión de hematíes al 3% con Solución de LISS (30 uL de la muestra con anticoagulante EDTA en 1 mL de DG Gel Sol).

- Realización del test: se añadieron 15 µL de la suspensión eritrocitaria al 3% y 15 uL del reactivo anti-Fya y anti-Fyb en tarjeta DG Coombs en cada pocillos respectivamente. Se incubó durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente se centrifugó durante 9 minutos a 3200 r.p.m.

- Lectura de los resultados: se basa en el principio de reacción antígeno-anticuerpo es decir, se forman aglutinatos grandes que no pueden atravesar el gel por lo que permanecen en la superficie considerándose un resultado positivo, mientras que los que no hayan aglutinado atraviesan los poros del gel y se precipitan en el fondo de la tarjeta, característico de un resultado negativo (Soyano & Müller, 2014).

Prueba de Enzima-inmunoensayo EIA

Se realizó en base al Protocolo 2 (Anexo 8):

- Preparación de muestra: se centrifugaron los tubos tapa roja de 10 mL durante 10 minutos a 3500 r.p.m. para obtener el suero de la muestra, los cuales fueron posteriormente alicuotados en crioviales.

- Realización del test: el ensayo inmunoenzimático para la determinación de anticuerpos contra las especies de *Plasmodium sp.* en suero.

- Lectura de los resultados: se basa en la presencia de anticuerpos IgG o IgM contra la malaria los cuales al ser positivos son indicativos de un infección reciente o que alguna vez se ha estado expuesto a la enfermedad y su negatividad se caracteriza por su ausencia.

Prueba Molecular:

Extracción de ADN: La técnica fue realizada en base al Protocolo 3 (Anexo 9):

- Preparación de muestra: Todas las muestras con fenotipo Duffy negativo reactivas y no reactivas en EIA obtenidas en tubo con anticoagulante EDTA (tubo tapa lila) a temperatura ambiente.

- Realización del test: Se realizó la extracción con el Kit Wizard Genomic DNA Purification.

- Lectura de los resultados: Se cuantificó la calidad y pureza del ADN (ácido desoxirribonucleico) mediante NanoDrop.

PCR-RT:

La técnica fue realizada en base a la técnica realiza en el estudio de Carvalo y colaboradores, 2012: "*Plasmodium vivax infection in Anajás, State of Pará: no differential resistance profile among Duffy-negative and Duffy-positive individuals".* ***** Se realizaron modificaciones en base a los reactivos de trabajo - Protocolo 4 (Anexo 10):

- Preparación de muestra: todas las muestras deberán estar a temperatura ambiente.

- Realización del test: se realizó un test basado en Gold TaqMan para detectar *P. falciparum y P. vivax* mediante sondas marcadas bajo las siguientes condiciones: 10 min a 94°C para lograr una actividad AmpErase uracil-N-glicosilasa óptimo, 15 seg a 94°C para activar la ADN polimerasa AmpliTaq Gold, y 1 min a 59° C durante 55

ciclos. Cada experimento incluye una mezcla de reacción sin DNA y una muestra humana sin la enfermedad como un control negativo y dos controles positivos para las especies de *vivax* y *falciparum* (Carvalho, y otros, 2012).

- Lectura de los resultados: se basa en la amplificación de las muestras que contengan los antígenos parasitarios, mediante la interpretación de las curvas de Melting.

3.4.5. Base de datos

Las variables escogidas para propósitos del estudio de la encuesta general e individual serán recolectadas en una base de datos creada en el programa Excel y analizados en el programa SPSS V0.23. La base de datos contendrá los siguientes datos: código de la muestra, edad, sexo, etnia, procedencia, fenotipos del sistema Duffy, presencia o ausencia de anticuerpos y antígenos de malaria, número de veces que los pobladores han padecido la enfermedad y posteriormente serán agrupados por familias. La relación entre las variables categóricas será analizada mediante la prueba estadística de independencia chi-cuadrado con un intervalo de confianza del 95% que lleva implícito un valor $p < 0,05$.

CAPÍTULO IV

4. CONTROL DE CALIDAD

4.1. Pruebas de Diagnóstico Rápido

Se utilizaron pruebas de diagnóstico rápido (PDR) para antígenos de malaria (SD Malaria Antigen) de la casa comercial BIO LINE, lote 05BD14003 con fecha de caducidad 2016-09-02. Se utilizaron muestras positivas de pacientes con malaria por *P. vivax* y *falciparum* confirmadas en cada grupo de pruebas realizadas (Tabla 4.1.).

Tabla N°4.1. Control de Calidad de Pruebas de Diagnóstico Rápido

Grupo de pruebas	***Temperatura de Almacenamiento***	***Desecante***	***Control Interno***		***Lectura***
	25°C	Intacto	Falciparum	Vivax	Presencia de Línea Control
1er grupo	√	√	√	√	√
2do grupo	√	√	√	√	√
3er grupo	√	√	√	√	√
4to grupo	√	√	√	√	√
5to grupo	√	√	√	√	√
6to grupo	√	√	√	√	√

Autor: *Evelin Zúñiga Sosa y Ma. Fernanda Pullas*
Fuente: *Base de datos CIEIC*

4.2. Geles de Coombs-Sistema Duffy

Se utilizaron tarjetas de geles Coombs, lote 15091.01.01 con fecha de caducidad 2016-06 de la casa comercial Grifols. En cada grupo de pruebas se obtuvieron los resultados esperados con las células comerciales QUOTIENT Biodiagnostics Anti-Fya, lote FA230BX, con fecha de caducidad 2016-11-19 y Anti-Fyb, lote FYB080BX con fecha de caducidad 2016-03-04 de acuerdo al control de calidad de la AABB (Tabla N°4.2.).

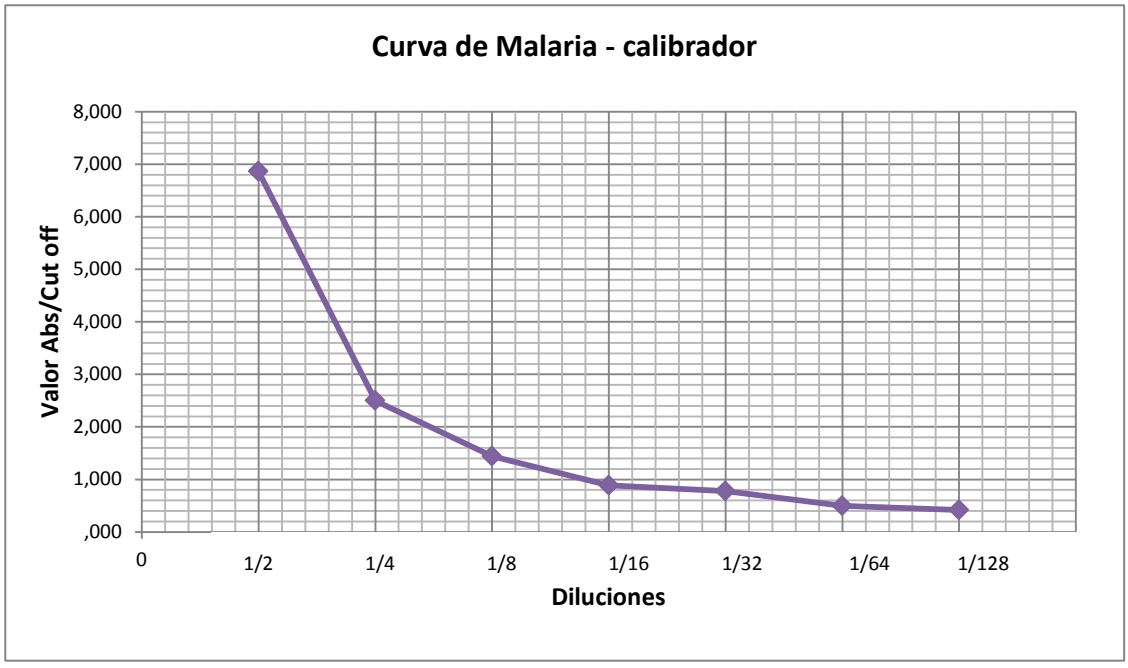
Tabla N°4.2 Control de Calidad de Tarjetas de geles Coombs

Grupo de pruebas	*Temperatura de Almacenamiento*	*Gel*	*Control Interno Células Comerciales Lote 345D*		*Lectura*
	25°C	Intacto	Fy(a)	Fy(b)	Presencia de aglutinación
1er grupo	√	√	√	√	√
2do grupo	√	√	√	√	√
3er grupo	√	√	√	√	√
4to grupo	√	√	√	√	√

Autor: *Evelin Zúñiga Sosa y Ma. Fernanda Pullas*
Fuente: *Base de datos CIEIC*

4.3. Enzima-inmunoensayo

Se realizó una dilución seriada-doblada de anticuerpos contra malaria del calibrador del kit Malaria Ab, de la casa comercial DIA.PRO, lote 0315 con fecha de caducidad 2016-06 (Gráfico N°4.1.)



Autor: *Evelin Zúñiga Sosa y Ma. Fernanda Pullas*
Fuente: *Base de datos CIEIC*

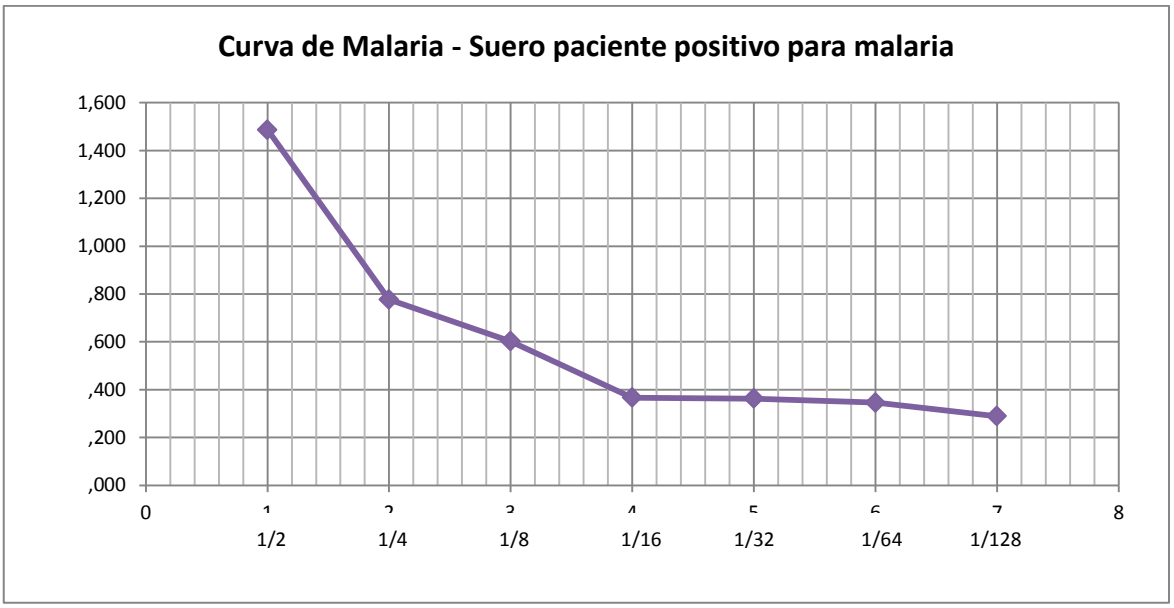
. **Gráfico N°4.1 Curva de calibración-Malaria**

La figura muestra la más alta dilución para detección de anticuerpos de malaria 1/4

También se realizó una dilución seriada-doblada de una muestra reactiva para anticuerpos contra malaria (Tabla N°4.3.) (Gráfico N°4.2.).

Tabla N°4.3. Valor de absorbancias de diluciones realizadas a la muestra de un paciente con anticuerpos contra *Plasmodium* sp.

# Dilución	Abs	Punto de Co	Valor
2	0,627	0,422	1,486
4	0,328	0,422	0,777
8	0,254	0,422	0,602
16	0,155	0,422	0,367
32	0,153	0,422	0,363
64	0,146	0,422	0,346
128	0,122	0,422	0,289



Autor: *Evelin Zúñiga Sosa y Ma. Fernanda Pullas*
Fuente: *Base de datos CIEIC*

Gráfico N°4.2 Curva de calibración-Malaria

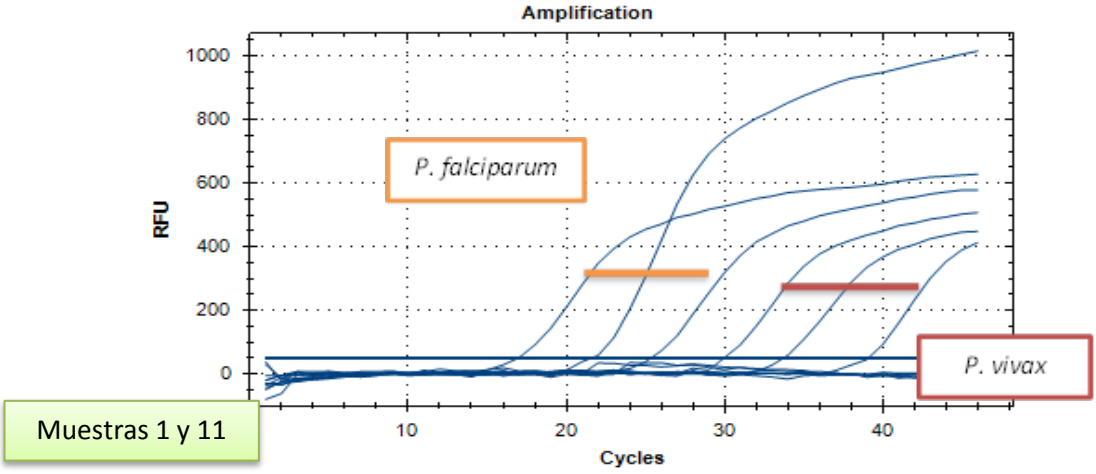
Se observa la detección de anticuerpos de malaria hasta la dilución 1/8

4.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real

Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-RT) de dos muestras por duplicado y los controles de *P. falciparum* y *P. vivax* concentrados y diluidos 1:10 (Tabla N°4.4.) (Gráfico 4.3.). También se establecieron las curvas de disociación Melting para el análisis de los resultados (Tabla N°4.5.) (Gráfico 4.4.).

Tabla N°4.4. Ubicación de muestras y controles en la placa de PCR-RT

		PCR-RT para especies del género *Plasmodium vivax y falciparum.*										
Fecha: 13-10-2015		**Responsable:** Evelin Zúñiga, Ma. Fernanda Pullas							**Contenido de la placa:**			
Proyecto: Malaria		**Código del experimento:**										
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	Muestra 1											CV1
B	Muestra 1											CV2
C	Muestra 11											CV3
D	Muestra 11											CF1
E												CF2
F												CF3
G												CNA
H												CNP
Observaciones:										**U: Muestras no determinadas**		
										NTC: Control negativo		



Autor: *Evelin Zúñiga Sosa y Ma. Fernanda Pullas*
Fuente: *Base de datos CIEIC*

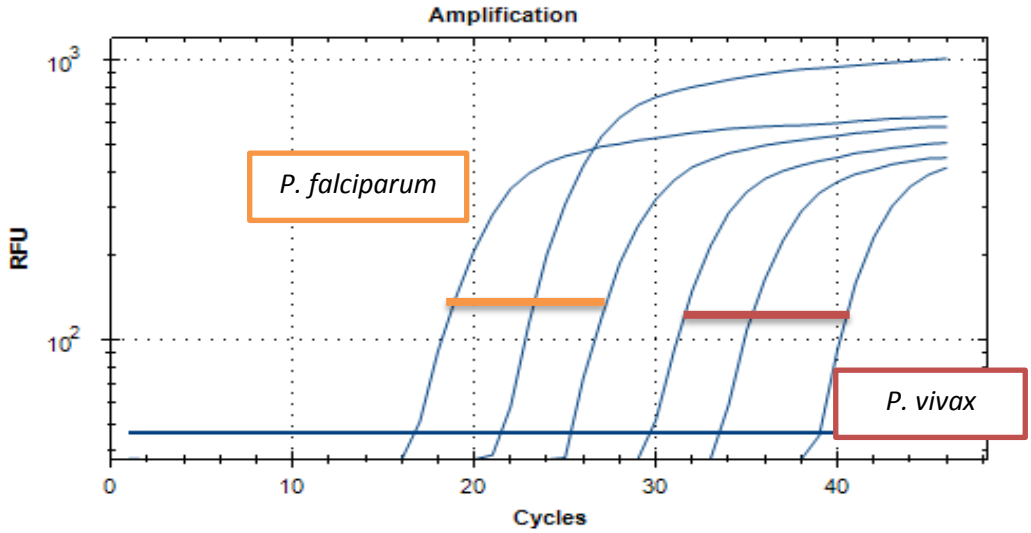
Gráfico N°4.3. Proceso de amplificación de muestras y controles *Plasmodium falciparum* y *vivax*

Este gráfico representa el proceso de amplificación de muestras y controles bajo las siguientes condiciones: 10 min a 94°C para lograr una actividad AmpErase uracil-N-glicosilasa óptimo, 15 seg a 94°C para activar la ADN polimerasa AmpliTaq Gold, y 1 min a 59° C durante 55 ciclos.

Tabla 4.5 Resultado final de PCR-RT

	A	B	C	E	F	G	H	L	M
1		Well	Fluor	Content	Sample	End RFU	Call		
2		A01	FAM	Unkn		0.91			
3		A12	FAM	Pos Ctrl		493.24	(+) Positive		
4		B01	FAM	Unkn		-21.23			
5		B12	FAM	Pos Ctrl		432.72	(+) Positive		
6		C01	FAM	Unkn		-19.68			
7		C12	FAM	Pos Ctrl		338.22	(+) Positive		
8		D01	FAM	Unkn		-2.02			
9		D12	FAM	Pos Ctrl		621.71	(+) Positive		
10		E12	FAM	Pos Ctrl		994.48	(+) Positive		
11		F12	FAM	Pos Ctrl		570.40	(+) Positive		
12		G12	FAM	NTC		-3.32			
13		H12	FAM	Neg Ctrl		0.50			

Autor: *Evelin Zúñiga Sosa y Ma. Fernanda Pullas*
Fuente: *Base de datos CIEIC*



Autor: *Evelin Zúñiga Sosa y Ma. Fernanda Pullas*
Fuente: *Base de datos CIEIC*

Gráfico 4.4. Curva de disociación de Melting

Gráfico representativo de las curvas de disociación de Melting para la validación de los controles con las especies de Plasmodium vivax y falciparum.

CAPITULO V

5. RESULTADOS

5.1. Descripción de la Población de Estudio

La población incluida en el estudio está formada por un 65% de personas de género femenino y 35% masculino comprendido entre las edades de 3 a 107 años, siendo el de mayor frecuencia los individuos entre 25-59 años de edad (Gráfico N° 5.1. - 5.2).

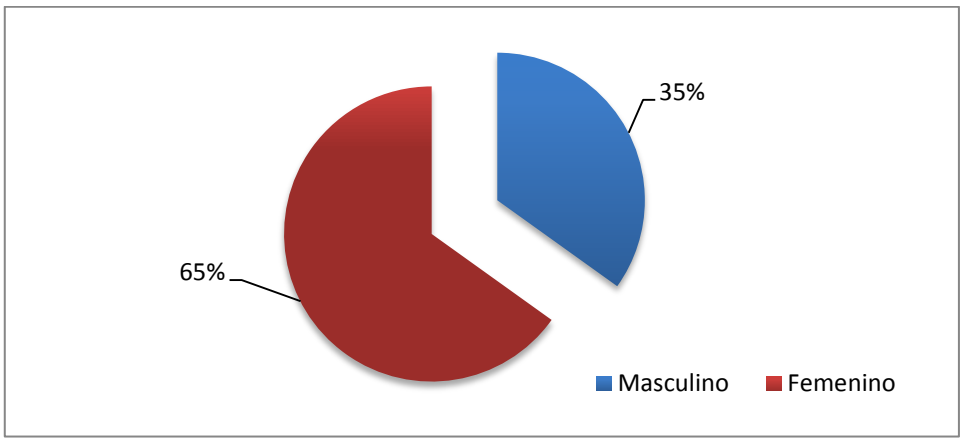
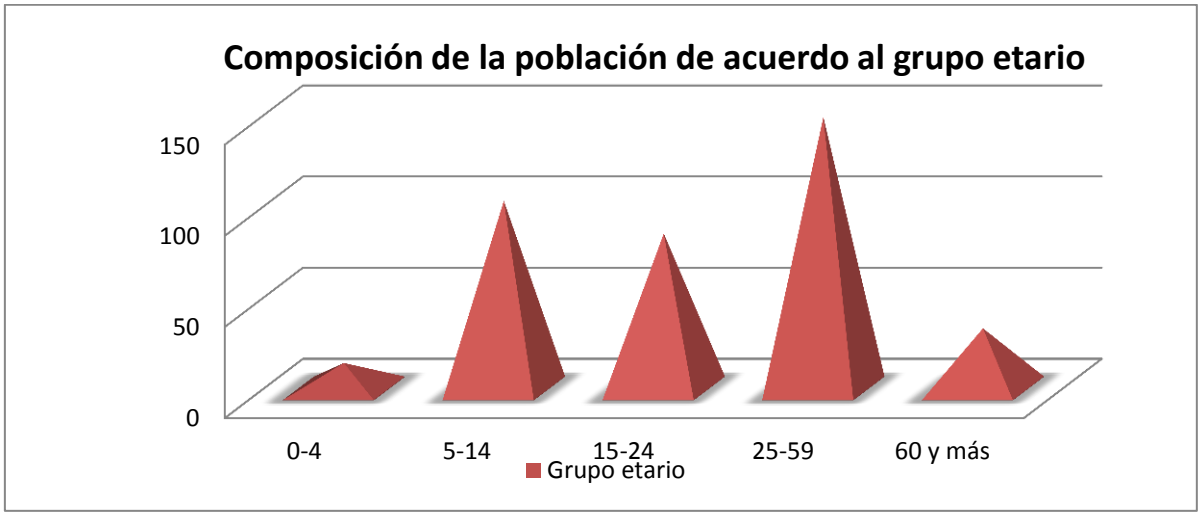


Gráfico N° 5.1 Distribución porcentual de la población de acuerdo al género



Autor: *Evelin Zúñiga Sosa y Ma. Fernanda Pullas*
Fuente: *Base de datos CIEIC*

Gráfico N° 5.2 Distribución porcentual de la población de acuerdo al grupo etario

El 79,1% y 72,4% de los pobladores del sector “50 Casas” del género masculino y femenino respectivamente, se identifican como “negros” mientras que el 20,9% y el 27,2% del género masculino y femenino respectivamente mencionaron identificarse como “mestizos” (Tabla 5.1).

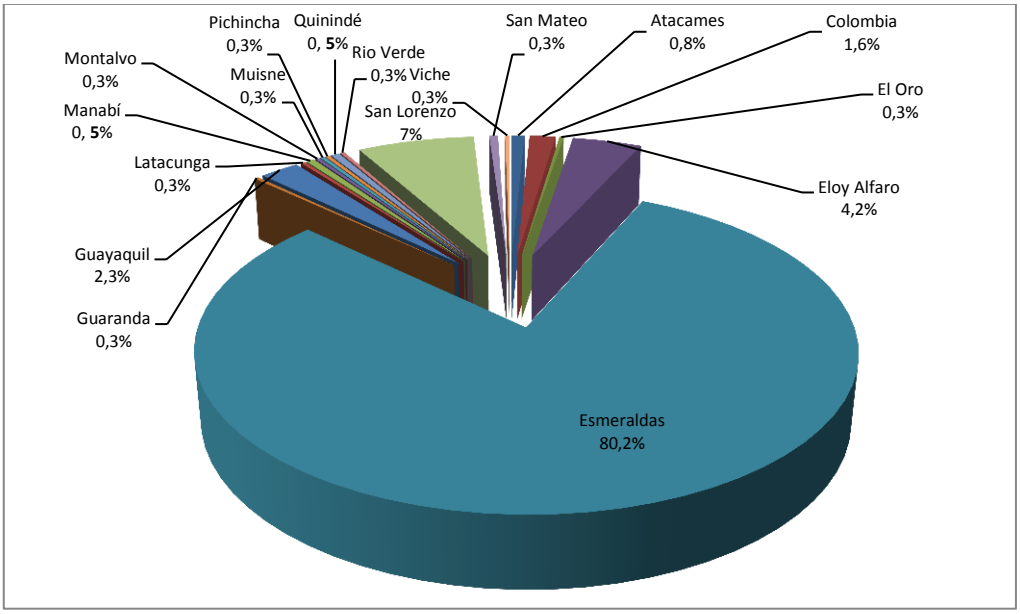
Tabla N°5.1 Composición de la población de acuerdo a la Etnia y Género

Identificación Étnica	***Género***			
	Masculino		***Femenino***	
	n	%	n	%
Blanco	0	0,00	1	0,4
Mestizo	28	20,9	68	27,2
Negro	106	79,1	181	72,4
	134		250	

Autor: *Evelin Zúñiga Sosa y Ma. Fernanda Pullas*
Fuente: *Base de datos CIEIC*

Se realizó el análisis de un total de 384 muestras de pobladores del sector “50 Casas”, provenientes de varias localidades de origen, siendo la ciudad de Esmeraldas la de mayor frecuencia (80%), (Gráfico N°5.3).

Localidad	**Frecuencia**	**Porcentaje**
Atacames	3	0,8
Colombia	6	1,6
El Oro	1	0,3
Eloy Alfaro	16	4,2
Esmeraldas	308	80,2
Guaranda	1	0,3
Guayaquil	9	2,3
Latacunga	1	0,3
Manabí	2	0,5
Montalvo	1	0,3
Muisne	1	0,3
Pichincha	1	0,3
Quinindé	2	0,5
Rio Verde	1	0,3
San Lorenzo	27	7,0
San Mateo	2	0,5
Viche	1	0,3
TOTAL	**384**	**100,0**



Autor: *Evelin Zúñiga Sosa y Ma. Fernanda Pullas*
Fuente: *Base de datos CIEIC*

Gráfico N°5.3 Lugares de procedencia de pobladores del sector "50 casas"

El gráfico muestra la distribución de la población que actualmente vive en el sector "50 casas" de acuerdo a la procedencia.

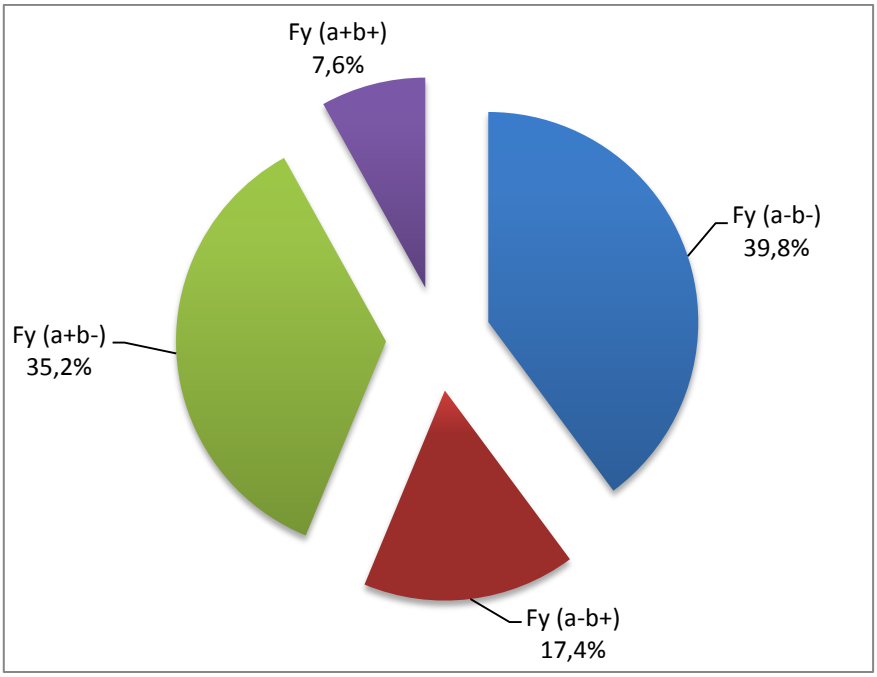
5.2. Fenotipo del Sistema Duffy

Se identificó los cuatro fenotipos más frecuentes del sistema eritrocitario Duffy en los pobladores del sector "50 casas" de la provincia de Esmeraldas, el de mayor frecuencia fue el fenotipo Fy(a-b-) con el 39,8%, seguido del Fy(a+b-) con un porcentaje del 35,2%. (Tabla N°5.2)(Gráfico N°5.4)

Tabla N°5.2 Frecuencia de fenotipos del Sistema Duffy

Fenotipo	***Frecuencia***	***Porcentaje***
Fy (a-b-)	153	39,8
Fy (a-b+)	67	17,4
Fy (a+b-)	135	35,2
Fy (a+b+)	29	7,6
Total	384	100

Autor: *Evelin Zúñiga Sosa y Ma. Fernanda Pullas*
Fuente: *Base de datos CIEIC.*



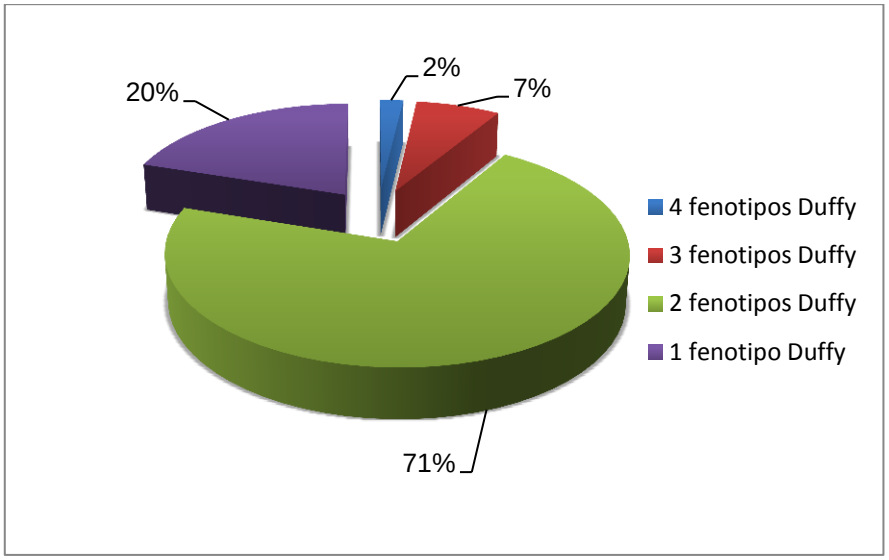
Autor: *Evelin Zúñiga Sosa y Ma. Fernanda Pullas*
Fuente: *Base de datos CIEIC*

Gráfico N°5.4 Distribución porcentual de los fenotipos del Sistema Duffy

El gráfico muestra que el fenotipo Fy(a+b+) es el de menor porcentaje (7,6 %) en el sector "50 casas" de la provincia de Esmeraldas

5.3. Prevalencia de Fenotipos Duffy por familia

El número de familias que intervinieron en este estudio fue de 160, identificándose que únicamente en 3 familias (2%) los miembros presentaron los cuatros fenotipos del sistema Duffy, incluido el fenotipo Fy(a-b-); en 11(7%) familias se expresaron tres fenotipos Duffy y 32 (20%) familias poseen integrantes que expresan el fenotipo Fy(a-b-). Los restantes grupos familiares presentan dos fenotipos el sistema Duffy (Gráfico N°5.5).



Autor: *Evelin Zúñiga Sosa y Ma. Fernanda Pullas*
Fuente: *Base de datos CIEIC*

Gráfico N°5.5 Distribución porcentual de los fenotipos del Sistema Duffy en familias del sector 50 casas.

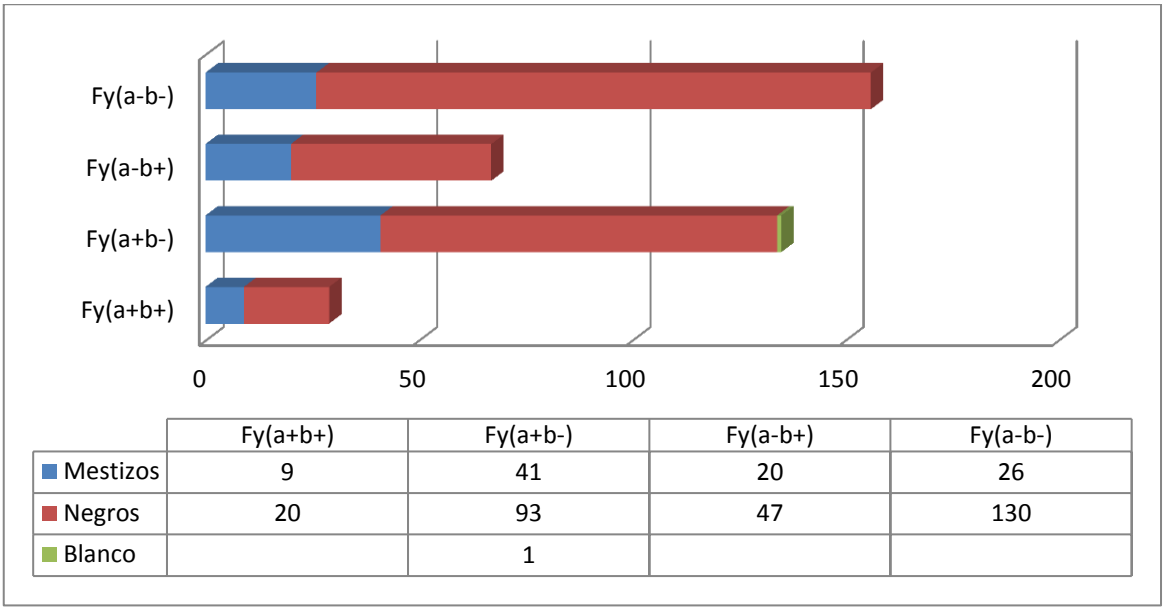
5.4. Relación de los Fenotipos Duffy con la Etnia.

Al relacionar los fenotipos del Sistema eritrocitario Duffy y la etnia de los pobladores del sector “50 casas” se estableció que existe significancia estadística con un valor p<0.05. Identificándose mayor frecuencia del fenotipo Fy(a-b-) relacionado con los individuos que se identifican con la etnia negra (130/384), mientras que en los pobladores que se reconocen como mestizos el fenotipo más común es el Fy(a+b-) y que el fenotipo Fy(a+b+) se encuentra distribuido tanto en mestizos como negros (Tabla N 5.3) (Gráfico N 5.6).

Tabla N°5.3 Relación entre la etnia de los pobladores de “50 casas” de la provincia de Esmeraldas y el fenotipo Duffy

	Etnia						
	Mestizos	***%***	***Negros***	***%***	***Blanco***	***%***	***p-valor***
Fy(a+b+)	9	9,37	20	6,89			0.000
Fy(a+b-)	41	42,70	93	32,06	1	100,0	0.000
Fy(a-b+)	20	20,83,	47	16,20			0.005
Fy(a-b-)	26	27,08	130	44,82			0.001

Autor: *Evelin Zúñiga Sosa y Ma. Fernanda Pullas*
Fuente: *Base de datos CIEIC*



	Fy(a+b+)	Fy(a+b-)	Fy(a-b+)	Fy(a-b-)
Mestizos	9	41	20	26
Negros	20	93	47	130
Blanco		1		

Autor: *Evelin Zúñiga Sosa y Ma. Fernanda Pullas*
Fuente: *Base de datos CIEIC*

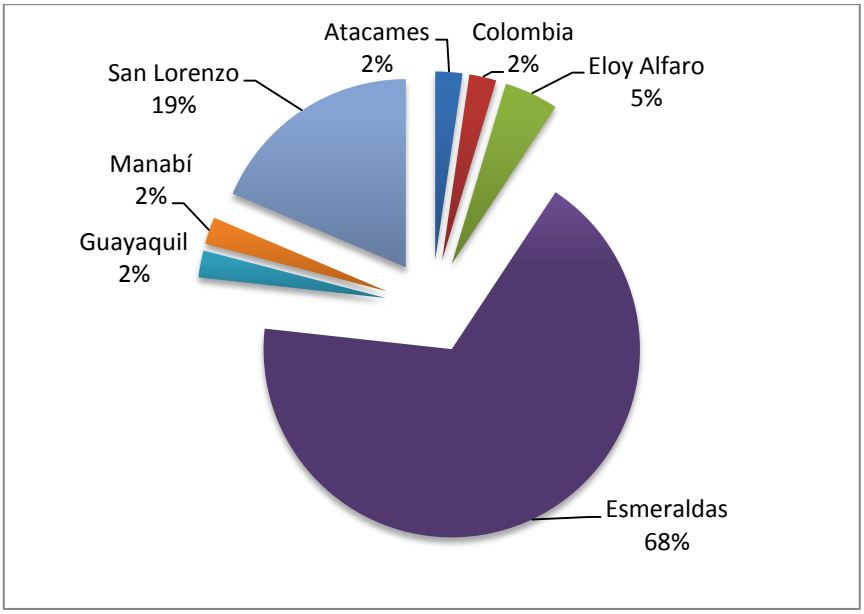
Gráfico N°5.6 Distribución de los fenotipos Duffy de acuerdo a la etnia

5.5. Relación entre malaria y Fenotipos Duffy

De los análisis realizados entre la ausencia de antígenos Duffy y la presencia de anticuerpos contra malaria se determinó que 43 (11,19%) de las muestras presentaron resultados reactivos en las pruebas de enzima-inmunoensayo EIA.

De estas 40 muestras tuvieron una absorbancia superior al punto de corte (0.800 a 1.900/0.381) y 3 muestras fueron consideradas como “indeterminadas” por el valor cercano al punto de corte. En contraste, los resultados obtenidos en las pruebas rápidas fueron negativos.

El lugar de origen de los pobladores que viven por más de tres años en el sector “50 casas” con fenotipo Duffy negativo y resultados “reactivos” en EIA fue el 68% de Esmeraldas, 19% de San Lorenzo, 5% Eloy Alfaro y 2% de Manabí, Guayaquil, Atacames y Colombia (Gráfico 5.7).

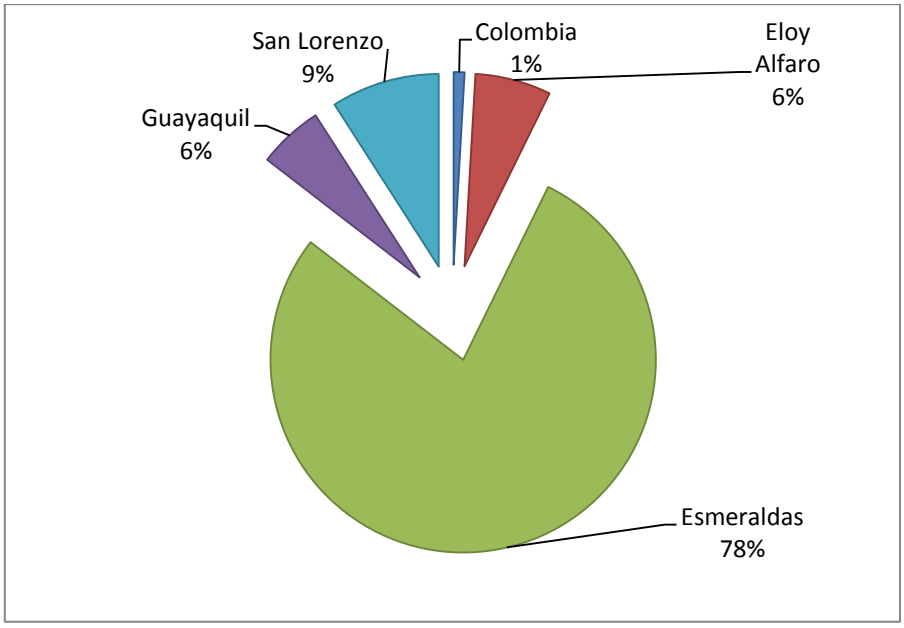


Autor: *Evelin Zúñiga Sosa y Ma. Fernanda Pullas*
Fuente: *Base de datos CIEIC*

Gráfico N°5.7 Distribución de la procedencia de los pobladores con resultados "reactivos" en EIA

El gráfico muestra la distribución porcentual de las localidades de origen de los pobladores con resultados reactivos en EIA y antígenos Duffy negativos

El análisis de datos determinó que 111(28,38%) pobladores con fenotipo Fy(a-b-) fueron negativos tanto en las pruebas de detección de antígenos (PDR) y anticuerpos contra malaria (EIA). La procedencia de origen de estos pobladores fue el 78% oriundos de Esmeraldas, 6% Guayaquil, 9% San Lorenzo, 6% Eloy Alfaro y 1% Colombia (Gráfico N°5.8).



Autor: *Evelin Zúñiga Sosa y Ma. Fernanda Pullas*
Fuente: *Base de datos CIEIC*

Gráfico N°5.8 Distribución de la procedencia de los pobladores con resultados "no reactivos" en EIA

El gráfico muestra la distribución porcentual de los lugares de origen de los pobladores con resultados no reactivos en EIA y antígenos Duffy negativos.

5.6. Relación de pruebas serológicas e identificación de portadores asintomáticos.

Se identificaron 78 individuos que tuvieron malaria una sola vez en su vida, de los cuales 34 presentaron el fenotipo Fy(a-b-) y 15 fueron reactivos en la prueba de ELISA, es decir, presentaban anticuerpos contra *Plasmodium sp.*

Los pobladores con resultados reactivos en las pruebas de ELISA se identifican 36 de etnia negra y 7 como mestizos.

Entre los individuos que nunca presentaron malaria poseen los cuatro fenotipos del sistema Duffy, de estos el 42,52% poseen el fenotipo Fy(a-b-) de los cuales 17 fueron

“reactivos” para la presencia de anticuerpos contra *Plasmodium sp*. y 3 “indeterminados”. (Tabla N 5.4)

Tabla N° 5.4 Número de veces que los pobladores del sector “50 casas” mencionan tener malaria, su relación con el fenotipo Duffy y resultados de pruebas serológicas

		Fenotipo Duffy				**Resultados**			
						Pruebas Antígenos		***Pruebas de Anticuerpos***	
# de veces sufrió malaria	*N*	*Fy(a+b+)*	*Fy(a+b-)*	*Fy(a-b+)*	*Fy(a-b-)*	*Positivo*	*Negativo*	*Reactivo*	*Negativo*
1	78	2	33	9	34	0	78	37	41
2	19	3	11	3	2	0	19	13	6
3	14	3	2	6	3	0	14	11	3
4	7	1	1	3	2	0	7	6	1
5	2	1	1	0	0	0	2	0	2
7	1	0	0	1	0	0	1	1	0
8	1	0	0	0	1	0	1	1	0
No sufrió malaria	262	19	86	45	111	0	262	43	219

Autor: *Evelin Zúñiga Sosa y Ma. Fernanda Pullas*
Fuente: *Base de datos CIEIC*

El estudio de la presencia de ADN del *Plasmodium vivax* en las muestras reactivas para anticuerpos de malaria se identificó que 2/43 muestras (4,65%) y 1/43 (2,32) presentaban ADN de *P. falciparum*. En contraste las muestras “no reactivas” para anticuerpos de malaria se identificó que 9/110 (8,18%) tenían ADN del *Plasmodium vivax* y 5/110 (4,54%) para *P. falciparum.*

La relación entre fenotipo Duffy null Fy(a-b-) y la no presencia de malaria por *P. vivax* se determinó una correlación significativa (p=0,000) (Tabla N°5.5), por lo que se establece que la presencia de portadores asintomáticos pueden presentar y no presentar anticuerpos contra malaria, aceptándose la hipótesis alterna: H1: el sistema eritrocitario Duffy (null) está relacionado con la presencia de individuos portadores de malaria.

Tabla N°5.5 Relación entre fenotipo Duffy Negativo, Resultados EIA y molecular de los pobladores del sector "50 casas" de la provincia de Esmeraldas

Fy (a- b-) **N =** 153						
EIA			**PCR-RT**			
	N	***%***	***P. vivax***	***%***	***P. falciparum***	***%***
Reactivos	43	28,10	2	4,65	1	2,32
No Reactivos	110	71,89	9	4,10	5	2,28

Autor: *Evelin Zúñiga Sosa y Ma. Fernanda Pullas*
Fuente: *Base de datos CIEIC*

Del total de los pobladores del sector "50 casas", 11 fueron positivos para la prueba molecular de ADN para *P. vivax,* de estos tres mencionan haber tenido síntomas de malaria, mientras que 8 afirman no haber presentado episodios de malaria. En contraste los pobladores con resultados positivos para *P. falciparum* reconocen haber padecido una vez malaria (Tabla N 5.6).

Tabla N°5.6 Número de veces que los pobladores del sector "50 casas" mencionan haber tenido malaria, su relación con la presencia del ADN de *P. vivax y P. falciparum.*

# de veces sufrió malaria	*N*	*P. vivax*	***# de veces sufrió malaria***	*N*	*P. falciparum*
1	3	Positivo	**1**	6	Positivo
No sufrió malaria	8	Positivo			

Autor: *Evelin Zúñiga Sosa y Ma. Fernanda Pullas*
Fuente: *Base de datos CIEIC*

Tabla 5.7 Relación de Fy (a-b-) con presencia del ADN de *Plasmodium vivax*

Prueba del Chi-cuadrado

	PCR-RT
Chi-cuadrado	112,667[a]
gl	1
Sig. asintótica	,000

Hay asociación estadísticamente significativa entre el Fenotipo Duffy negativo y la presencia de ADN de P. vivax

5.7. DISCUSIÓN

La malaria es un problema de salud pública y se ha convertido en una enfermedad reemergente en los lugares donde antes había sido controlada (Valencia, Calderón, & Fasabi, 2012). Históricamente, la mayoría de los casos de malaria han ocurrido en la ciudad de Esmeraldas, donde *P. falciparum* es el parásito predominante (Saenz & Ávila, 2012), por lo que el presente estudio se realizó en el sector "50 casas" de la ciudad y provincia de Esmeraldas al determinarse la existencia de un brote de malaria durante el año 2013.

Una de las características de esta zona es la migración poblacional, lo que constituye un factor de riesgo que puede provocar un rebrote de malaria. En este estudio se identificó un alto porcentaje de introducción de personas que proceden tanto de zonas urbanas y rurales con un 19,8% e inclusive de otro país como Colombia que representa un 0,3%; la Organización Mundial de la Salud determinó que en casos de migración población se debe establecer cercos epidemiológicos para evitar la propagación de enfermedades endémicas, así como también el control de los movimientos poblaciones en áreas endémicas de paludismo y en zonas libres de la enfermedad con el fin de evitar los brotes aislados (OMS, 2015) (Benites, 2004).

Durante muchos años, se ha reportado que el grupo sanguíneo Duffy negativo es prevalente en los habitantes de etnia negra de África occidental y confiere un efecto protector a infecciones parasitarias por *P. vivax,* aunque son susceptibles a otras especies de *Plasmodium*. Este estudio estableció que el 39,8% de los habitantes analizados del sector poseían el fenotipo Duffy negativo Fy(a-b-), de los cuales 130 se identifican étnicamente como "negros" y 26 como "mestizos", con lo que se confirma la teoría establecida por muchos autores sobre la relación del Fenotipo Duffy negativo-Etnia (King, y otros, 2011). El estudio de la distribución global del sistema Duffy estableció que el fenotipo Fy(a-b-) es prevalente en África en un 53%, mientras que en América en un 6%; Asia 3,12%; y Europa 0,15% es baja. En cambio el fenotipo Fy (a+b+) está presente en todo el mundo aproximadamente en un 0,29% (Howes, y otros, 2010), en este estudio se determinó una prevalencia de 7,6% de este fenotipo.

Estudios sugieren que los individuos portadores del grupo Duffy positivo está relacionado con receptores del eritrocito que favorecen a la infección parasitaria por *P. vivax* (King, y otros, 2011) , en esta investigación se identificaron los cuatro fenotipos del Sistema Duffy,

el 7,6% de pobladores presentan el fenotipo positivo Fy (a+b+); 17,4% el fenotipo Fy(a-b+) y el 35,2% con el fenotipo Fy(a+b-) todos considerados como Duffy positivos. Sin embargo, el de mayor prevalencia en el sector “50 casas” es el Duffy negativo Fy(a-b-), relacionado con la inmunidad innata a la infección por *Plasmodium,* siendo la condición homocigótica negativa la que confiere el efecto protector a la infección malárica por este protozoario (Gonzalez, y otros, 2012).

La frecuencia de alelos de los sistemas eritrocitarios es característico de cada población estudiada, así en esta investigación se estableció que los miembros de 3 familias presentaban los cuatro fenotipos del sistema Duffy; en 11 familias se expresaron los tres tipos de fenotipos y en 32 familias existían integrantes que expresaban el fenotipo Fy null, por estas características se considera que el sistema Duffy debe ser evaluado para determinar el impacto en la selección natural en diferentes entornos geográficos (Schneider-Weber, Pedro-Tadei, & Sotero-Martins, 2012).

De la encuesta realizada a los pobladores de “50 casas” se determinó que 37 individuos fueron diagnosticados con malaria una vez en su vida, de los cuales 34 presentaban el fenotipo Fy(a-b-) y 15 presentaron anticuerpos contra malaria. En el estudio realizado por Cavasini se observó que en áreas en la que se presentaba heterogeneidad del sistema Duffy se diagnosticaron infecciones de *P. vivax* en individuos portadores del fenotipo null (Cavasini, y otros, 2007); de igual manera las observaciones realizadas en el estudio de Ménard muestran evidencias de que *P. vivax* es capaz de producir infección y enfermedad en individuos con fenotipo Duffy negativo, en contraste en Nueva Guinea los individuos portadores Fy(a-b-) muestran una baja prevalencia de la infección por *P. vivax.* (Ménard, y otros, 2010). En esta investigación también se identificó que el 42,52% de los pobladores que nunca han presentado malaria poseen el fenotipo Fy(a-b-), y de estos 91 individuos no presentaron anticuerpos contra *Plasmodium sp*.

En esta investigación se realizaron pruebas para determinar la existencia de anticuerpos contra malaria, determinándose que existen 43 (11,19%) de individuos con resultados reactivos para EIA (Enzima inmunoensayo), pero estos resultados no son un indicativo de malaria por *P. vivax,* por tratarse de una prueba de tamizaje y no confirmatoria que detecta anticuerpos *anti-Plasmodium sp.* en el suero de pacientes, es por esta razón que investigadores como Castillo y Ramírez sugieren que las pruebas de detección de malaria deben ser elegidas de acuerdo a la población, así en zonas endémicas se debe realizar pruebas de alta sensibilidad y especificidad (Castillo & Ramírez, 2005), debido a que la aparición de anticuerpos comienza en pocos días y aumenta de manera

significativa en pocas semanas, y persiste por meses o inclusive años en pacientes semi-inmunes que habitan zonas endémicas (Campuzano & Blair, 2010); en aquellos individuos que padecen de la enfermedad en ocasiones repetidas y que habitan en áreas endémicas, pueden llegar a desarrollar una inmunidad parcial, que por lo general se presenta en edad adulta, este estado inmune impide las manifestaciones clínicas de la enfermedad, y hasta se puede observar parásitos circulando en su sangre (premunición), lo que difiere de la inmunidad antiparasitaria (Hay, Price, & Baird, 2013) (Martha Legorreta, 1999).

La procedencia de pobladores con fenotipo Duffy negativo y presencia de anticuerpo anti-*Plasmodium* fue del 68% en Esmeraldas, 19% en San Lorenzo; 5% Eloy Alfaro y 2% Manabí, zonas consideradas como endémicas de malaria por la alta tasa de morbilidad que existe (González & Chiriboga, 2013), de igual manera se determinó la procedencia de los pobladores que no presentaron anticuerpos anti-*Plasmodium,* de los cuales se obtuvieron que el 78% eran oriundos de Esmeraldas, 6% Guayaquil, 9% San Lorenzo, 6% Eloy Alfaro y 1% Colombia, razón por la cual se utilizó la técnica molecular de PCR en tiempo real para identificar la especie de *Plasmodium.*

De las 153 muestras identificadas como Duffy negativo, se obtuvieron que 43 (28,10%) fueron reactivas en la prueba de ELISA y 110 muestras (71,89%) no reactivas para anticuerpos anti-*Plasmodium*. En la técnica molecular PCR tiempo real, se determinó que 2/43 (4.65%) y 9/110 (8.18%) fueron positivas para *P. vivax,* en contraste 1/43 (2.32%) y 5/110 (4.54%) presentaron resultados positivos para ADN de *P. falciparum*.

De los 11 pobladores identificados con el fenotipo Duffy negativo del sector “50 casas” que fueron positivos en la técnica molecular PCR en tiempo real para *P. vivax,* tres mencionan haber tenido síntomas de malaria, mientras que 8 afirman no haber sufrido de episodios de malaria, indicativo de la existencia de portadores asintomáticos que en contraste con los resultados positivos para *P. falciparum* reconocen haber padecido una vez malaria. Las infecciones asintomáticas por *Plasmodium vivax* son el principal problema en muchas regiones del mundo, debido a que existen individuos con inmunidad natural los cuales están ligados a anomalías congénitas de los glóbulos rojos como lo es la ausencia de antígeno Duffy (inmunidad protectora), o en zonas que son hiperenedémicas en consecuencia del constante estímulo de los antígenos parasitarios o de sus productos, inmunidad que aunque no es protectora, evita las complicaciones de la enfermedad, aumentado así el número de portadores asintomáticos dentro de una

población (Valencia, Calderón, & Fasabi, 2012) (Beltrán & Barrera, 2012) (Silvia Antoni de Jogna, 2011).

Existe gran evidencia que indica que la invasión eritrocitaria por *P. vivax* ha ejercido presión a favor de la selección del alelo C (FYBnull) (González, y otros, 2012), lo que concuerda con este estudio que determina que las variables Duffy-negativo y malaria asintomática están asociadas (p = 0,00), razones por la cual Zimmerman y colaboradores en el 2013 determinaron que en las regiones donde la malaria es endémica se realicen estudios que puedan revelar nuevas perspectivas sobre la asociación entre el polimorfismo del gen Duffy y malaria ocasionada por *P. vivax* (Zimmerman, Ferreira, & Howes, 2013); sin embargo, estudios recientes muestran que en algunos lugares en el mundo *P. vivax* infecta y causa enfermedad en personas portadoras de Duffy-negativa, resultados que refuerzan que este parásito está evolucionando rápidamente, pudiendo hacer uso de otros receptores de Duffy para invadir los eritrocitos, lo que pueden tener un enorme impacto en la distribución actual de *P. vivax* (Carvalho, y otros, 2012).

5.8. CONCLUSIONES

- La población de estudio de esta investigación perteneciente al sector “50 Casas” del cantón y provincia de Esmeraldas estaba conformada por el 65% de género femenino y 35% de género masculino entre las edades de 3 a 107 años.
- Al determinar la etnia, los pobladores se identificaron como mestizos y negros.
- Se establecieron los cuatro fenotipos del sistema eritrocitario Duffy en la población estudiada, siendo el de mayor frecuencia el fenotipo Duffy negativo Fy(a-b-).
- Los análisis realizados establecieron que existe relación entre el fenotipo Duffy null y la etnia negra de los individuos portadores del Fy(a-b-).
- Se identificó que los miembros de tres familias eran portadoras de los cuatro fenotipos del sistema Duffy.
- A través de la encuesta individual realizada a los pobladores se determinó el número de episodios de malaria que han sufrido en su vida, dato relevante para relacionarlo a la probabilidad de la existencia de portadores sanos del parásito, así 34 personas portadoras del fenotipo Fy(a-b-) mencionaron haber tenido una sola vez en su vida episodios de malaria.
- Se identificaron 262 individuos que nunca presentaron episodios de malaria, de los cuales 111(42,36%) presentaron el fenotipo Fy(a-b-) y en menor porcentaje el fenotipo Fy(a+b-).
- Los resultados obtenidos en las pruebas de diagnóstico rápido fueron negativos para la totalidad de la población.
- Se identificó la existencia de seudo-inmunidad contra el parásito en los pobladores al detectarse anticuerpos anti-malaria.
- La procedencia de los pobladores del sector “50 Casas” con fenotipo Duffy null y anticuerpos anti-*Plasmodium* eran oriundos de Esmeraldas al igual que los que no presentaban anticuerpos.
- La prueba de PCR tiempo real determinó la existencia de individuos portadores asintomáticos de *P. vivax*. Comprobándose la hipótesis alterna de que el sistema eritrocitario Duffy null proporciona inmunidad natural al portador de ese fenotipo.

5.9. RECOMENDACIONES

- Debe considerarse que la presencia de portadores asintomáticos en la población tiene consecuencias graves, no solo para el portador del parásito, sino para el lugar en el que habita, debido a que este grupo humano es un reservorio de la enfermedad y es difícil que sea identificado mediante vigilancia de rutina de los programas de control.
- El Ministerio de Salud Pública y el Programa de Control y Erradicación de la Malaria deben implementar la identificación de portadores asintomáticos los cual permita establecer si en las zonas altamente endémicas existe seudo-inmunidad adquirida por reinfecciones de *Plasmodium* o poseen inmunidad natural protectora debido a la alta prevalencia del fenotipo Duffy null, con el fin evitar brotes asilados de la enfermedad en el futuro y asegurar la calidad de vida de los habitantes de las zonas.
- Establecer un algoritmo de detección mediante encuestas en el que se detalle el número de veces que han padecido la enfermedad, su sintomatología, condiciones de vida, resultados de pruebas serológicas de enzima-inmunoensayo que junto con los resultados basados en técnicas moleculares permitan establecer una vigilancia epidemiológica de la población en caso de portadores asintomáticos para la detección de parasitemias bajas de *Plasmodium.*
- Realizar una intervención y un ajuste en los programas de control y erradicación de la malaria como base para establecer políticas preventivas y curativas de la enfermedad mediante: la vigilancia pasiva con un diagnóstico molecular de los casos, control de la enfermedad y tratamiento, detección activa de los casos que involucra la detección del foco infeccioso, la detección de los casos reactivos y la detección de casos proactivos mediante la identificación de los pobladores asintomáticos y la educación en la población ante la enfermedad.
- Se debe incentivar la identificación de portadores asintomáticos en zonas altamente endémicas de malaria debido a que éstos son un desafío para el control y erradicación de la enfermedad porque presentan un mayor tiempo de circulación parasitaria, la parasitemia es submicroscópica y ocasiona infecciones graves en la población.
- Debería prestarse especial atención a lograr que las medidas de control de los vectores y las poblaciones migrantes, sobre todo si son personas no inmunes que

entran en zonas donde el paludismo es endémico o si son portadores de la enfermedad hacia zonas receptivas al paludismo.

- Se recomienda que para la eliminación de la enfermedad se realice una detección temprana de los portadores asintomáticos para el control de los brotes, que el diagnóstico sea rápido con un tratamiento de calidad controlado, vigilado y con campañas de salud mediante alianzas estratégicas que permitan el fortalecimiento del conocimiento del sistema de salud y así establecer una capacidad estratégica, planeada, monitoreada e investigativa de la enfermedad.

5.10. BIBLIOGRAFÍA

AABB. (2012). Manual Técnico de la Asociación Americana de Bancos de Sangre. *Manual*.

Abbas, A. K., Lichman, H., & Pillai, S. (2012). *Inmunologia celular y molecular.* España: Elseiver.

Argimón, J., & Jimenez, J. (2013). *Métodos de investigación clínica y epidemiológica.* España: Elsevier.

Arreygue, M. (2011). *Determinación de los alelos principales del grupo sanguíneo Dduffy y Diego.* México D.F.: Disertación de Tesis.

Beltrán, M., & Barrera, S. (2012). Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. Bogota, Colombia.

Benites, J. (2004). *Malaria: Un problema latente.* Guayaquil: Hospital Clínica Alcivar.

BIOSCOT. (2013). *Anti-Fyb: IgM monoclonal humana .* Livingston.

Campuzano, G., & Blair, S. (2010). Malaria: consideraciones sobre su diagnósstico. *Medicina y Laboratorio*, 43 (335-341).

Carvalho, T., Queiroz, M., Cardoso, G., Diniz, I., Silva, A., & Pinto, A. &. (2012). Plasmodium vivax infection in Anajás, State of Pará: no differential resistance profile among Duffy-negative and Duffy-positive individua. *Malaria Journal*, 11, 430. doi:10.1186/1475-2875-11-430.

Castillo, M., & Ramírez, C. (2005). Tamizaje de malaria en donantes de sangre de Cali, Colombia. *Biomédica*, 25:203-210.

Castro, I., & Rodríguez, M. (2009). Análisis proteómico de Plasmodium, el agente causal de la malaria. *Scielo*, 9 (1-2) doi:ISSN 0036-3634.

Cavasini, C., Mattos, L., Couto, A., Bonini-Domingos, C., Valencia, S., Neiras, W., . . . Machado, R. (2007). Plasmodium vivax infection among antigen-negative individuals from Brazilian Amazon region: an exception? *Trop. med. Hygiene*, 101: 1042-1044.

Center Control Diseases. (29 de Noviembre de 2013). *CDC*. Obtenido de DPDx - Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern: http://www.cdc.gov/dpdx/malaria/

Chootong, P., McHenry, A. M., Ntumngia, F. B., Sattabongkot, J., & Adams, J. H. (2014). The association of Duffy binding protein region II polymorphisms and its antigenicity in Plasmodium vivax isolates from Thailand. *Elsevier*, (7) doi: 10.1016/j.parint.2014.07.014.

CLAIM. (12 de Abril de 2016). Malaria. Ecuador.

CLS Limited. (2010). *Anti-Fya and Anti-Fyb.* Australia: CLS.

Cornejo, J. M. (2013). *Proyecto de Vigilancia y Control de Vectores para la prevención de transmisión de Enfermedades Metaxénicas en el Ecuador.* Guayaquil: SNEM-MSP.

Coronado, M., Vega, S., Gutierrez, R., Pérez, J., & Peláez, K. (2011). NUTRIGENÉTICA APLICADA: DIETA PERSONALIZADA Y FORMACIÓN ACADÉMICA PARA LA PRÁCTICA PROFESIONAL. *Scielo*, 5 (2) doi:10.4067/S0717-75182011000400013.

Dean, L. (2005). The Duffy blood group. *Blood group and red cell antigens*, 5: Bookshelf ID: NBK2271.

Diario "La Hora". (12 de Marzo de 2013). Ronda el paludismo. *Diario "La Hora"*, pág. 5A.

Dugdale, D. (02 de Noviembre de 2009). *Serología*. Obtenido de Análisis de Serología: http://www.clinicadam.com/salud/5/003511.html

Estrada, L., Escobar, J., Gomez, L., Cadavid, A., & Gil, A. (2013). Expresión del fenotipo Duffy negativo en mujeres afrodescendientes y su relación con la preeclampsia. *Scielo*, 3 (2) doi: 0138-600X.

Fabián Saenz & María Eugenia Dávila. (2012). Malara: Una enfermedad que ha dominado la humanidad desde sus orígenes. *Nuestra Ciencia*, 4, 34-37.

Fabián Sáenz & Sofía Ocaña. (2014). Malaria y el nuevo grupo del CIEI. *Nuestra Ciencia*, 3, 30-31.

Fernández, R., Fernández, C., & Baptista, P. (2010). *Metodología de la Investigación.* Perú: El Comercio S.A.

Gay, J. (2006). *Diccionario Mosby.* Barcelona, España: Oceano.

Geoff, D. (2013). *Human Blood Groups_Capítulo 10 Diego Blood Group Systems* (Vol. 3era edición). USA: Wiley-Blackwell. ISBN: 978-1-4443-3324-4.

González, A., & Chiriboga, R. (2013). *Correlación de resultados entre prueba rápida y prueba inmunoenzimática (ELISA) en la detección de antígenos de malaria en donantes asintomáticos de sangre provenientes de zonas endémicas en Ecuador.* Quito: Disertación de tesis.

Gonzalez, L., Vega, J., Ramirez, J., Bedoya, G., Carmona-Fonseca, J., & Maestre, A. (2012). Relación entre los genotipos del sistema sanguíneo Duffy y su relación con la infección de malaria en diferentes grupos étnicos del Choco-Colombia. *Colombia Médica*, 7, 190-193. PMCID: PMC4001950.

Gonzalez, N., & Zavala, J. (2005). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En J. Zavala, *Manual de técnicas básicas de biología molecular* (pág. 117). Merida, México: Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatan.

Goodman, D., & Livingston, E. (2013). Pruebas dde detección. *American Medical Association*, 1.

Hay, Price, & Baird. (2013). *Avances en parasitología. La epidemmiología de Plasmodium vivax.* Boston: ELSEVIER.

Horuk, R. (2015). El receptor de quimiocinas del antígeno Duffy DARC / ACKR1. *Frontiers Immunology*, 3: doi: 10.3389 / fimmu.2015.00279.

Howes, R., Patil, A., Piel, F., Nyangiri, O., Kabaria, C., Gething, P., . . . D, m. (2010). The global distribution of the Duffy blood group. *Nature Communications*, 1-10.DOI: 10.1038/ncomms1265.

King, C., Adams, J., Xianli, J., Grimberg, B., McHenry, A., Greenberg, L., . . . Zimmerman, P. (2011). Fya/ Fyb polimorfismo del antígeno Duffy en eritrocitos humanos que afecta a la susceptibilidad a la malaria por Plasmodium vivax. *PNAS*, 10.1073 / pnas.1109621108.

Knight, J. (2009). Functional consequences of genetic variants in malaria. *An International Journal of Medicine*, 757-772: http://dx.doi.org/10.1093/qjmed/hcp115 .

LabMedical. (17 de Febrero de 2016). Análisis ultrasensible detecta malaria asintomática de baja densidad. *LabMedical - Noticias al Día*, pág. 1.

Lisker, R., Zentella, A., & Grether, P. (2013). *Introducción de la Genética Humana.* México: El Manual Moderno S.A.

Llanos, C., Flores, M. E., Arevalo-Herrera, M., & Herrera, S. (2004). Mecanismos de generación de anemia en malaria. *Colombia Médica*, Vol. 35 Nº 4: 205-214.

Martha Legorreta, P. S. (1999). LA RESPUESTA INMUNE CELULAR CONTRA EL Plasmodium: AGENTE ETIOLÓGICO DE LA MALARIA. *VERTIENTES*, (8) 4-7.

Martínez-Salazar, E., Tobón-Castaño, A., & Blair, S. (2012). Malaria en humanos por infección natural con Plasmodium knowlesi. *Scielo*, 7 (4) doi:ISSN 0120-4157.

Mbabazi, P., Hopkins, H., Osilo, E., Kalungu, M., Byakika-Kibwika, P., & Kamya, M. (2015). Precisión de dos pruebas rápidas de diagnóstico (PDR) para el diagnóstico inicial y seguimiento del tratamiento en una transmisión alta de malaria en Uganda. *Sociedad Americana de Medicina Tropical e Higiene.*, 1. PMID: 25624399.

Ménard, D., Bardanas, C., Bouchier, C., Henry-Halldin, C., Gray, L., Ratsimbasoa, A., . . . Grimberg, B. (2010). Plasmodium vivax clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. *PNAS*, Vol 107: 5967-5971.

Mendizabal, R., & Padilla, N. (2003). Diverisdad genética de Plasmodium vivax. *Revista de la Universidad del Valle de Guatemala*, 62-64.

Monge, B. (2008). *Malaria e inmigración en Europa.* Obtenido de http://www.emprendelo.es/cs/Satellite?blobcol=urldata&blobheader=application%2Fpdf&blobheadername1=Content-disposition&blobheadername2=cadena&blobheadervalue1=filename%3D04-Bego%C3%B1a+Monge_malaria+e+immigracion.pdf&blobheadervalue2=language%3Des%26site%

Monteagudoa, C., Pellín-Carceléna, A., Martínb, J., & Ramos, D. (2011). Papel de las quimiocinas en la progresión del melanoma. *Elsevier Doyma*, 7 (2) doi:498504.

MSP-Ecuador. (2012). *la Organización Panamericana de la Salud (OPS) otorgó al país el premio campeón de la lucha contra el paludismo de las Américas .* Quito, Ecuador: Gobierno Nacional de la República del Ecuador.

Nathalang, O., Intharanut, K., Siriphanthong, K., Nathalang, S., & Kupatawintu, P. (2015). Duffy Blood Group Genotyping in Thai Blood Donors. *Annals Laboratory Medicine*, 35(6): 618–623; doi: 10.3343/alm.2015.35.6.618.

Nóbrega, T., Carvalho, L., & Alves, C. (2011). Variabilidad genética por todo el mundo de la proteína de unión a Duffy: Miradas en torno a Plasmodium vivax Desarrollo de Vacunas. *PlosOne*, 2-3.

OMS. (2015). *Temas de Salud*. Obtenido de Paludismo: http://www.who.int/topics/malaria/es/

Pasvo, G. (2007). Eroding the resistance of Duffy negativity to invasion by Plasmodium vivax? *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 101, 10: 953-954 doi:10.1016/j.trstmh.2007.05.007.

Philippe, G., Marcella, M., Marjan, V. E., & Jef Van, d. E. (2009). Assessment of the prozone effect in malaria rapid diagnostic tests. *Malaria Journal*, 8, 271.

Plan Nacional del Buen Vivir. (2013-2017). Objetivo 3. Mejorar la Calidad de Vida de la Población. *MSP*.

Rugeles, M., Patiño, P., & Montoya, C. (2009). En *Inmuología: Una Ciencia Activa* (pág. 673). Medellin: Universidad de Antioquia.

Saenz, F., & Ávila, M. E. (2012). Malara: Una enfermedad que ha dominado la humanidad desde sus orígenes. *Nuestra Ciencia*, 4, 34-37.

Sáenz, F., & Ocaña, S. (2013). Malaria y el nuevo grupo del CIEI. *Nuestra Ciencia*, 3, 30-31.

Sandoval, L., & Herrera, G. (2009). Anticuerpos irregulares en la medicina transfusional. *Salesiana Quintana Roo*, 22.

Schneider-Weber, S., Pedro-Tadei, W., & Sotero-Martins, A. (2012). Polymorphism of the Duffy blood system influences the susceptibility to Plasmodium vivas infection in especific area from Brazilian Amazon. *Brazilian Journal of Pharmacy*, 93(1):33-37.

Shahzadi, S., Akhtar, T., Hanif, A., Sahar, S., Niaz, S., & Bilal, H. (2014). Molecular detection oof Malaria in South Punjab with Higher Proportion of Mixed Infections. *Iranian J Parasitol*, 37-43 PMCID: PMC4289878.

Silva, R. (2012). Fenotipos clínicos en enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Scielo*, 5 (1) doi: ISSN 0034-9887.

Silvia Antoni de Jogna. (2011). *PALUDISMO.* Buenos Aires: Universidad Tecnica Nacional de Argentina.

Souza-Silva, F., Torres, L., Santos, J., Loren, M., Sánchez, B., Souza, T., . . . Carvalho, L. (2014). Duffy Antigen Receptor for Chemokine (DARC) Polymorphisms and Its Involvement in Acquisition of Inhibitory Anti-Duffy Binding Protein II (DBPII) Immunity. *PLOS ONE*, 10, 1-2. doi: 10.1371/journal.pone.0093782.

Souza-Silva, F., Torres, L., Santos, J., Loren, M., Sánchez, L., Souza, T., . . . Carvalho, L. (2014). Duffy Antigen Receptor for Chemokine (DARC) Polymorphisms and Its Involvement in Acquisition of Inhibitory Anti-Duffy Binding Protein II (DBPII) Immunity. *PLOS ONE*, 10, 1-2. doi: 10.1371/journal.pone.0093782.

Soyano, A., & Müller, A. (2014). El antígeno Diego alcanza los 60 años de edad: su descubrimiento y desarrollo. *Gaceta Médica de Caracas, 122*(1), 46-52.

Suardíaz, J. (2013). Grupos sanguíneos eritrocitarios. En *Laboratorio Clínico* (pág. 1024). Habana, Cuba: Ecimed.

Valencia, E., Calderón, M., & Fasabi, M. (2012). Variabilidad genética y recurrencia de Plasmodium vivax durante la malaria asintomática en Mazán, Iquitos, Perú. *An. Fac. med*, 73, 285-292 ISSN 1025-5583.

Vásquez, A., & Tobón, A. (2012). Mecanismos de patogenia en la malaria por Plasmodium falciparum. *Scielo*, 9 (2) doi:ISSN 0120-4157.

Zimmerman, P., Ferreira, M. U., & Howes, R. E.-P. (2013). Red Blood Cell Polymorphism and Susceptibility to Plasmodium vivax. *Advances in Parasitology*, 81, 27–76. doi:10.1016/B978-0-12-407826-0.00002-3.

5.11. ANEXOS

Anexo 1: Autorización del MSP – Zona distrital O8D01

Ministerio de Salud Pública

Coordinación Zonal 1- SALUD
Dirección Distrital 08D01 – Esmeraldas – Salud

Memorando Nro. MSP-CZ1-08D01-2015-1288-M

Esmeraldas, 28 de julio de 2015

PARA: Sr. Rosa De Fatima Chiriboga Ponce
Profesora e Investigadora Principal

ASUNTO: Autorización para Estudio "Fenotipos del Sistema Duffy y su relación con malaria asintomática "

De mi consideración:

En respuesta a solicitud emitida para realizar investigación denominada ***" FENOTIPOS DEL SISTEMA DUFFY Y SU RELACIÓN CON MALARIA ASINTOMATICA EL SECTOR DE LAS 50 CASAS" DE LA PARROQUIA VUELTA LARGA DEL DISTRITO 08D01,*** la cual según solicitud emitida por Mst. Chiriboga será realizada por dos estudiantes de la Escuela de Bioanálisis de la PUCE y en colaboración con el Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Crónicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, cuyo financiemiento estará a cargo por las estudiantes y los aportes del CIEIC, me permito emitir autorización para la realización de la misma.

Con sentimientos de distinguida consideración.

Atentamente,

Dra. Nadia Yadira Bernal Zambrano
DIRECTORA DISTRITO 08D01-ESMERALDAS-SALUD

Referencias:
- MSP-CZ1-08D01-PCSS-2015-0840-M

Anexos:
- Solicitud de Fenotipos del Sistemas Duyffy20150716_10060341.pdf

Copia:
Sr. Dr. Cristian Javier Burbano Vivar
Analista Distrital de Provisión de Servicios de Salud-Distrito 08D01-Esmeraldas-Salud

Av. Colon entre Venezuela y Ecuador esquina Esmeraldas- Ecuador
Código Postal: 080102 Teléfono: 593 (06) 2455-163
www.salud.gob.ec

** Documento generado por Quipux*

1/1

Anexo 2: Aprobación del Comité de ética de la Investigación de PUCE

Pontificia Universidad Católica del Ecuador
Comité de Ética de la investigación
PUCE

E-MAIL: dpe@puce.edu.ec
Av. 12 de Octubre 1076 y Roca
Apartado postal 17-01-2184
Fax: (593 – 2 – 299 16 56
Telf. 593 – 2 – 299 1647
Quito - Ecuador

Quito, 25 de junio de 2015
Oficio nº 0106-CEI-2015

Señor Doctor
Fabián Sáenz Calderón
CIEIC
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Presente

Estimado Dr. Sáenz:

El Comité de Ética de la Investigación en sesión del 25 de junio de 2015 estudió el proyecto intitulado: **"Prevalencia de malaria y fenotipos de grupo Duffy en barrios de la ciudad de Esmeraldas".**

El Comité aprueba el proyecto. Sin embargo solicita especificar mejor el título y en lugar de barrios poner el nombre del cantón en la ciudad de Esmeraldas, cantón citado posteriormente en el proyecto.

En pág. 5 poner los nombres científicos correctamente.

En Anexo 1, **Participación voluntaria,** renglón 4. Para que usted pueda participar….. lo que se vamos a necesitar, quitar se…. . Ya que es importante que la información al paciente esté bien escrita.

Con nuestra consideración y estima.

Rommel Montúfar G

Dr. Rommel Montúfar Galárraga
Secretario
Comité de Ética de la Investigación
Director de Investigación PUCE

POSTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
COMITE DE LA BIOÉTICA DE LA P.U.C.E.
QUITO

Anexo 3: Consentimiento informado

Anexo 1
Formulario de Consentimiento Informado.
CLÍNICA. Información para el paciente sano y el paciente con enfermedad activa

Responsable: Dr. Fabián Sáenz
Organización: Pontificia Universidad Católica del Ecuador
Investigación sobre la malaria en Ecuador

Introducción: El Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Crónicas (CIEIC) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) se encuentra realizando trabajos de investigación sobre la malaria en el Ecuador y deseamos invitarle a participar en esta investigación. Antes de decidir participar o no, usted puede consultar con alguien más sobre su participación. Vamos a leer este documento que tiene los detalles sobre la investigación, sin embargo, si hay alguna palabra que no entienda, por favor, infórmenos para poder explicarle. Usted puede realizar preguntas en cualquier momento.

Propósito del proyecto: La Malaria es una enfermedad que afecta a mucha gente en Ecuador. Este proyecto de investigación quiere saber si hay esta enfermedad en su comunidad y porqué. Pedimos su ayuda voluntaria. Su participación ayudará a obtener información valiosa que ayudará a diseñar maneras de controlar y prevenir esta enfermedad.

Tipo de Intervención: Esta investigación incluirá responder una encuesta con información general sobre conocimientos de la enfermedad y la toma de sangre del dedo o de la vena.

Selección de participantes: Esta es una investigación que se realizará en toda la comunidad, por lo tanto no se necesita requisitos especiales para su participación.

Participación voluntaria: Usted puede elegir libremente participar o no participar en absoluto en este proyecto de investigación. Si usted no desea participar o se retira del estudio no habrá ninguna consecuencia y no perderá ninguno de los beneficios de atención de salud que existen normalmente. Para que usted pueda participar en este proyecto, es necesario que usted entienda lo que vamos a necesitar. Si acepta colaborar voluntariamente con nosotros, debe firmar (o poner su huella digital) en la línea disponible abajo en este formulario.

Usted puede dejar de participar en este proyecto en cualquier momento sin necesidad de dar ninguna explicación. De igual manera, los investigadores pueden terminar su participación en el mismo. Si éste es el caso, usted será notificado. No hay costo por participar en esta investigación. Si usted tiene dudas sobre la investigación o sobre sus derechos en este proyecto de investigación, por favor pregunte al entrevistador o contacte a las personas nombradas abajo.

Procedimientos: Un encuestador le pedirá que responda ciertas preguntas sobre su conocimiento de malaria. Además, personal entrenado tomará muestras de sangre. Las muestras de sangre se tomarán una o dos veces mediante un pinchazo en el dedo, con una lanceta, para obtener 10 gotas de sangre. Es posible que se solicite una muestra más grande de sangre para llevar a cabo estudios más detallados, esta vez la sangre será tomada del brazo usando una jeringa para obtener entre 3 y 10 ml de sangre (entre 1 y 3 cucharaditas). Estas muestras serán examinadas por los médicos, de encontrarse que usted requiere tratamiento médico, será referido a las unidades del Ministerio de Salud.

Investigación: La investigación utilizará parte de la información clínica y parte de las muestras de sangre sin que estos tengan referencia a su nombre. A sus muestras e información privada se le asignará un código. Esta información será utilizada para estudiar las enfermedades en su comunidad y respuesta a medicamentos y cómo éstas se relacionan con los factores de riesgo a los cuales usted puede estar expuesto. Usted no será identificado por nombre en ningún informe publicado ni en presentaciones de los resultados. Las muestras, sin conexión con su nombre serán almacenadas en refrigeración o congelación y podrán ser utilizadas en el futuro para otros estudios como el cultivo de parásitos obtenidos de su sangre para determinar si hay resistencia a medicamentos, así como estudios de la biología de parásito, previa aprobación por parte de un comité de ética.

Confidencialidad: Toda la información que usted proporcione será mantenida confidencialmente y utilizada solamente para propósitos de la investigación sin conexión a su nombre. Los resultados generales, serán compartidos con el Ministerio de Salud Pública del Ecuador y su comunidad.

Av. 12 de Octubre 1076 y Roca
Teléfonos: 593 (2) 2991700 ext.: 2272

Riesgos: Los riesgos potenciales asociados a su participación son las molestias al sacar la sangre. La toma de muestras de sangre será realizada por profesionales debidamente entrenados, utilizando agujas y lancetas nuevas, siguiendo normas internacionales, lo que reducirá la posibilidad de molestias por la toma de sangre.

Beneficios: Los beneficios de su participación incluyen atención médica y tratamiento en caso de que usted tenga la enfermedad y un incremento en el conocimiento sobre la prevención de enfermedades tropicales así como la futura implementación de estrategias de control e intervención, que tienen el potencial de mejorar la salud de su comunidad.

Compensaciones: No existe compensación financiera por su participación en el estudio.

Declaración general de consentimiento: "Al firmar (o poner mi huella digital) abajo, declaro que los investigadores a cargo de este proyecto me han explicado los propósitos y los beneficios y riesgos de la investigación, y que los he entendido plenamente. Entiendo claramente que no hay compensación monetaria por mi participación de parte de la PUCE, ni de las otras instituciones implicadas, y/o de sus empleados, y que en caso de alguna lesión que pudiese sufrir por mi participación en esta investigación, se buscarán las prestaciones médicas necesarias sin costo para mí a través de las unidades del Ministerio de Salud". Al firmar (o poner mi huella digital) abajo declaro que entiendo el alcance y los objetivos del Proyecto, y estoy dispuesto a participar voluntariamente".

Nombre del participante:

Firma (o huella digital) del participante o su representante legal._____ Fecha: _____ de ___ del 201_

He leído con exactitud o he sido testigo de la lectura exacta del documento de consentimiento informado para el potencial participante y la persona ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirmo que el participante ha dado consentimiento libremente.

Nombre del testigo:_____

Firma del testigo (en caso de analfabetismo) _____ Fecha: _____ de _____ del 201_

Declaración de asentimiento (para menores entre 12 y 18 años de edad)

Yo, _____, tengo ___ años de edad, entiendo los objetivos de esta investigación y que es lo que se espera de mí. Por lo tanto acepto participar voluntariamente.

Firma, del menor) _____ Fecha: _____ de ___ del 201_

Nombre del investigador/asistente:_____

Firma del investigador/asistente: _____ Fecha: _____ de _____ del 201_

Ha sido proporcionado, al participante, una copia de este documento _____ _(iniciales del investigador/asistente)

Personas a contactar: Esta propuesta ha sido revisada y aprobada por el Comité de Ética de la PUCE, que es un comité cuya tarea es asegurarse de que se protege de daños a los participantes en la investigación. Si usted tiene preguntas sobre esta investigación por favor comuníquese con el Dr. Fabián Sáenz, CIEI Universidad Católica del Ecuador. Ave. 12 de Octubre 1076 y Roca. Tel. (02) 299 1700 ext. 2272. Fax. (02) 299 1689 Email: fsaenz213@puce.edu.ec

Si tiene preguntas sobre sus derechos como participante en esta investigación comuníquese con el Dr. Rommel Montufar, Comité de Ética, Universidad Católica del Ecuador Ave. 12 de Octubre 1076 y Roca. Tel. (02) 299 1700 ext. 1273 . Email: rjmontufar@puce.edu.ec

Anexo 4: Encuesta

LAIM P | CP | CA | SC | CE | No. Casa	**Prevalencia de Malaria en regiones no Amazónicas de América Latina:**	**Encuesta de Síntomas** **Versión 7.0-151011**

A. IDENTIFICACIÓN

1. **Fecha de visita (dd/mm/aa)** ____/ ____ /____
2. **Nombre de la persona:**_____
3. **Documento de identidad:**
   CC_____ TI_____ RN_____ Otro_____ No tiene_____
4. **Número de documento:**_____
5. **Teléfono fijo o celular propio/ o de un vecino: :**_____

Marque X

6. **La persona entrevistada es**: 1) Hombre ___| 2) Mujer ___|
7. **Fecha de nacimiento**: 1. Día: ___|___| 2. Mes: ___|___| 3. Año: ___|___|

B. ENCUESTA DE SÍNTOMAS

8. **Tiene síntomas actualmente:**

   Si_____

   No____ (si marcó esta respuesta salte a la pregunta 12)

NOTA PARA EL ENCUESTADOR: *NO lea las opciones de respuesta. Espere a que el encuestado responda y asocie la respuesta a la opción más afín.* **Coloque un número 1, 2, 3 según el orden en la respuesta.**

9. **¿Cuáles de estos síntomas tiene actualmente?** ***(Varias opciones)***
   1) Fiebre ____
   2) Escalofrío ____
   3) Dolor de cabeza ____
   4) Sudoración abundante ____
   5) Dolores en los músculos o las articulaciones ____
   6) Decaimiento o desgano general ____
   7) Todas las anteriores ____
   8) Ninguna de las anteriores ____
   9) Otro ¿Cuáles? ____
   10) No sabe/No responde ____

NOTA PARA EL ENCUESTADOR: *NO lea las opciones de respuesta. Espere a que el encuestado responda y asocie la respuesta a la opción más afín.* **Marque X en UNA sola opción.**

10. ¿Cuánto tiempo han durado estos síntomas?

1) 1 día ____
2) 2-6 días ____
3) Más de 1 semana ____

11. ¿Ha tomado algún medicamento?

1) Sí ____
2) No ____
3) Cuál _____

12. Registre temperatura axilar (3 min)

°C __.__

13. ¿Cuántas veces ha tenido malaria? _____

Nunca ha tenido malaria ____ No sabe/No responde ____

Si indica el número de veces que ha tenido malaria pase a la pregunta 14, de lo contrario se finaliza la encuesta.

14. ¿Hace cuánto tiempo presentó el último episodio de malaria? _____ Días
_____ Meses
_____ Años

15. ¿Usted a qué se dedica? ***(una sola opción)***

1) Jornalero ____ 2) Trabajador de minería ____ 3) Pescador ____
4) Explotador de madera ____ 5) Ganadero ____ 6) Agricultor propietario ____
7) Industrial ____ 8) Propietario de minas ____ 9) Ama de casa ____
10) Estudiante ____ 11) Otra ¿Cuál? _____

16. ¿Cuál es el máximo grado de escolaridad? ***(una sola opción)***

1) Ninguno ____ 2) Primaria incompleta ____ 3) Primaria completa ____
4) Secundaria incompleta ____ 5) Secundaria completa ____ 6)Técnico o universitario incompleto ____
7) Técnico o universitario completo ____ 8) No sabe/No responde ____

Código encuestador: ___|___|___|

Código supervisor: ___|___|___|

Anexo 5: Protocolo 1 - Pruebas de diagnóstico rápido

PROTOCOLO 1 DE TRABAJO PARA LA CORRIDA DE MUESTRAS				
SD Malaria Antigen				
BIO LINE				
	Version 1.0	**Preparado por:** Evelin Zúñiga Sosa, Ma. Fernanda Pullas		
Nombre Tech.		**Fecha de inicio, Día/Mes/Año:** 31-07-2015		**No. de muestras a correrse:** 391
N Lote.		**Fecha de expiración:**		**No. de cassettes usados:** 391
Fuente de las muestras:				
No.	**Descripción**	**Visto**	**Observaciones**	**Materiales**
PREPARACION DE REACTIVOS				
Lugar: Mesa de Laboratorio, BS 1				
1	Cassette PDR		Reactivos listos para su uso. Se encuentran a temperatura ambiente	
2	Aplicador de muestras desechables calibrado: 5uL			
3	Diluyente de prueba: Frasco de 5 mL			
MUESTRA				
4	Plasma con EDTA.		No se requiere ninguna preparación especial o ayuno, la sangre se debe recoger por venopunción normal y bien mezcladas	Plasma
PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA				
Lugar: Mesa de Laboratorio				
5	Reactivos a temperatura ambiente			Kits
6	Quitar el dispositivo de prueba del sobre de aluminio y colocar en la mesa de laboratorio		La superficie de la mesa de laboratorio debe estar limpia y seca	Kits
7	Sumergir el extremo circular del aplicador desechable en la muestra de sangre y trasladar al extremo circular cassette.		Las muestras deben estar bien mezcladas.	Aplicador de muestras desechables, cassette de PDR
8	Agregar 4 gotas del diluyente en el extremo cuadrado del cassette			
9	Esperar 15 minutos a temperatura ambiente			
10	Leer el resultado		Resultado Negativo: una línea de color en la línea de control C. Resultado Positivo: para P. falciparum presencia 2 línea de color (línea de control C y línea p.f.) o para infección mixta u otras especies de Plasmodium la presencia de 3 bandas de color (línea de control C, línea p.f. y línea pan)	
VALIDACION DE LA PRUEBA				
Lugar: Mesa de Laboratorio				
11	Presencia de color en la línea de control C		Si no hay color en la línea de control C el resultado se considera como NO VALIDO	
13	YO, certifico que detección de antógenos de Plasmodium mediante PDR, fue realizada tal como esta descrito en este protocolo standard.			
	Firma		Fecha:	

Anexo 6: Inserto Anti-Fya

BLOOD GROUPING REAGENT

Anti-Fy^a

ALBAsera®

REF Z151U

For Indirect Antiglobulin Test by Tube Technique

- **Meets FDA potency requirements**
- **Discard if turbid**
- **Preservative: 0.1% sodium azide**

CAUTION: THE ABSENCE OF ALL VIRUSES HAS NOT BEEN DETERMINED. THIS PRODUCT HAS COMPONENTS (DROPPER BULBS) CONTAINING DRY NATURAL RUBBER

INTERPRETATION OF LABEL SYMBOLS

LOT	Batch code
	Use by (YYYY-MM-DD)
REF	Product code
2°C – 8°C	Storage temperature limitation (2°C– 8°C)
IVD	*In vitro* diagnostic medical device
	Consult instructions for use
	Harmful
	Manufacturer

INTENDED USE

The Anti-Fy^a reagent is for the *in vitro* detection and identification of human Fy^a positive red blood cells by the indirect antiglobulin test.

SUMMARY AND EXPLANATION

Anti-Fy^a and anti-Fy^b were described in 1950 and 1951 respectively and define a pair of alleles on the long arm of chromosome 1.

In Caucasians the phenotype Fy(a-b-) is exceptionally rare. In African Americans, the incidence of Fy(a-b-) is 68% and it is perhaps not insignificant that Fy(a-b-) red cells are resistant to invasion by the malarial parasite Plasmodium vivax. This is thought to be due to balanced polymorphism.

Fy^a and Fy^b antigens are destroyed when red blood cells are treated with appropriate concentrations of the proteolytic enzymes ficin, papain and bromelin.

PRINCIPLE OF THE TEST

When used by the recommended technique, this reagent will cause agglutination (clumping) of red blood cells carrying the Fy^a antigen. Lack of agglutination of the red blood cells demonstrates the absence of the Fy^a antigen.

REAGENT DESCRIPTION

This reagent has been prepared from plasma collected from blood donors. ABO hemagglutinins were removed by adsorption. Conversion to serum was achieved by the addition of calcium chloride and where necessary, thrombin. Excess calcium was removed by the addition of sodium oxalate. The formulation also contains 1g/L sodium azide.

The volume delivered by the reagent dropper bottle is approximately 40µl. Bearing this in mind, care should be taken to ensure that appropriate serum:cell ratios are maintained in all test systems.

PRECAUTIONS

Store at 2°C - 8°C.

Do not use if turbid.

Do not dilute.

Do not use beyond the notified expiry date.

This reagent contains 0.1% (w/v) sodium azide. Sodium azide may be toxic if ingested and may react with lead and copper plumbing to form explosive compounds. If discarded into sink, flush with a large volume of water to prevent azide buildup.

Handle and dispose of reagents as potentially infectious.

CAUTION: ALL BLOOD PRODUCTS SHOULD BE TREATED AS POTENTIALLY INFECTIOUS. SOURCE MATERIAL FROM WHICH THIS PRODUCT WAS DERIVED WAS FOUND NEGATIVE WHEN TESTED IN ACCORDANCE WITH CURRENT FDA REQUIRED TESTS. NO KNOWN TEST METHODS CAN OFFER ASSURANCE THAT PRODUCTS DERIVED FROM HUMAN BLOOD WILL NOT TRANSMIT INFECTIOUS AGENTS.

This product has components (dropper bulbs) containing dry natural rubber.

This reagent is for *in vitro* diagnostic use only.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Specimens should be collected by aseptic technique with or without an anticoagulant. The specimen should be tested as soon as possible after collection. If testing is delayed, the specimen should be stored at 2°C - 8°C. Blood specimens exhibiting gross hemolysis or contamination should not be used. Do not use collection tubes that contain serum or plasma/cell separation media. Clotted samples or those collected in EDTA should be tested within fourteen days from collection. Donor blood stored in citrate anticoagulant may be tested until the expiry date of the donation.

MATERIALS

Materials provided

- ALBAsera® Anti-Fy^a

Materials required but not provided

- Isotonic saline
- Reagent red blood cells suitable for the control of Anti-Fy^a
- Polyspecific Anti-Human Globulin / Monospecific Anti-Human IgG
- IgG sensitized red blood cells
- 10 x 75mm or 12 x 75mm glass test tubes
- Pipettes
- Centrifuge
- Heating block / waterbath @ 37°C
- Optical aid

TEST PROCEDURE

General Information

This reagent has been standardized for use by the technique described below and therefore its suitability for use in other techniques cannot be guaranteed. When a test is required to be incubated for a specific period of time, a timer should be used.

RECOMMENDED TECHNIQUES

37°C Indirect Antiglobulin

- Add 2 drops of blood grouping reagent to a test tube.
- Add 1 drop of red blood cells suspended to 2-4% in isotonic saline.
- Mix the test well and incubate for 15-45 minutes at 36-38°C.
- Wash the test at least 3 times with a large excess isotonic saline. e.g. 4ml of saline per 12 (or 10) x 75mm glass tube)

NOTE: (i) allow adequate spin time to sediment the red blood cells.

(ii) make sure that most of the residual saline is removed at the end of each wash.

- Add Anti-Human Globulin to each test tube in the amount specified in the manufacturer's product insert.
- Mix the contents of the test tube well and centrifuge. Suggested centrifugation: 900-1000g for 10-20 seconds or a time and speed appropriate for the centrifuge used that produces the strongest reaction of antibody with antigen-positive cells, yet allows easy resuspension of antigen-negative cells.
- Gently shake the test tube to dislodge the cell button from the bottom and observe macroscopically for agglutination. Negative reactions may be examined with an optical aid.
- Record results.
- Add IgG sensitized antiglobulin control cells to confirm the validity of negative test results.

STABILITY OF REACTION

Test results should be read and interpreted immediately after centrifugation. Delays may cause dissociation of antigen-antibody complexes resulting in weak positive or false negative reactions.

INTERPRETATION OF RESULTS

Agglutination = positive test result
No agglutination = negative test result

Frequency (%):

Phenotype	Caucasians	African Americans
Fy(a+b-)	17	9
Fy(a+b+)	49	1
Fy(a-b+)	34	22
Fy(a-b-)	Very rare	68

QUALITY CONTROL

Quality control of reagents is essential and should be performed on each day of use and in accordance with local, state and federal regulations. We suggest that the following red blood cell samples are used to control the reactions of this reagent.

Fy(a+b+) red blood cells should be used as a positive control.
Fy(a-b+) red blood cells should be used as a negative control.

PERFORMANCE LIMITATIONS

Since the antibodies from which this product has been prepared were stimulated by red blood cells extensive tests have been undertaken to exclude the presence of additional contaminating blood group antibodies. However, it is impossible to state categorically that reagents of this nature will only contain antibodies of the required specificity.

Direct antiglobulin test positive samples will react by the indirect antiglobulin test irrespective of their Fy^a status.

Driblocks and waterbaths promote better heat transfer and are recommended for 37°C tests, particularly where the incubation period is 30 minutes or less.

Gently resuspend tube tests before reading. Excessive agitation may disrupt weak agglutination and produce false negative results.

Excessive centrifugation can lead to difficulty in resuspending the cell button, while inadequate centrifugation may result in agglutinates that are easily dispersed.

The expression of certain red blood cell antigens may diminish in strength during storage, particularly in EDTA and clotted samples. Better results will be obtained with fresh samples.

Suppressed or weak expression of blood group antigens may give rise to false-negative reactions.

False positive or false negative results can occur due to contamination of test materials, improper reaction temperature, improper storage of materials, omission of test reagents and certain disease states.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Prior to release, each lot of ALBAsera® Anti-Fy^a is tested by FDA recommended methods against a panel of antigen-positive and antigen-negative red blood cells to ensure suitable reactivity.

For additional information or technical support, contact Product Technical Support at 1-888-228-1990.

BIBLIOGRAPHY

1. Technical Manual. 16th ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks, 2008.
2. Standards for Blood Banks and Transfusion Services. 25th ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks, 2008.

DATE OF ISSUE

October 2012

US Distributor

Quotient Biodiagnostics Inc.
41 University Drive
Newtown
PA 18940
USA

Customer Service Tel: 1-888-284-1901
Product Technical Support Tel: 1-888-228-1990
Customer Service Fax: 1-888-694-5208
E-Mail: customer.service@quotientbiodiagnostics.com
Web: www.quotientbiodiagnostics.com

Manufacturer:

Alba Bioscience Limited
Ellen's Glen Road
Edinburgh
Scotland, UK
EH17 7QT

US License 1807

Tel: +44 (0) 131 536 5907
Fax: +44 (0) 131 536 5897
E-Mail: customer.services@albabioscience.co.uk

© Alba Bioscience Limited 2012

Z151UQPI/01

QUOTIENT
BIODIAGNOSTICS

Anexo 7: Inserto Anti-Fyb

BLOOD GROUPING REAGENT

Anti-Fy^b

ALBAsera®

REF Z153U

For Indirect Antiglobulin Test by Tube Technique

- **Meets FDA potency requirements**
- **Discard if turbid**
- **Preservative: 0.1% sodium azide**

CAUTION: THE ABSENCE OF ALL VIRUSES HAS NOT BEEN DETERMINED. THIS PRODUCT HAS COMPONENTS (DROPPER BULBS) CONTAINING DRY NATURAL RUBBER

INTERPRETATION OF LABEL SYMBOLS

LOT	Batch code
	Use by (YYYY-MM-DD)
REF	Product code
2°C – 8°C	Storage temperature limitation (2°C– 8°C)
IVD	*In vitro* diagnostic medical device
	Consult instructions for use
	Harmful
	Manufacturer

INTENDED USE

The Anti-Fy^b reagent is for the *in vitro* detection and identification of human Fy^b positive red blood cells by the indirect antiglobulin test.

SUMMARY AND EXPLANATION

Anti-Fy^a and anti-Fy^b were described in 1950 and 1951 respectively and define a pair of alleles on the long arm of chromosome 1.

In Caucasians the phenotype Fy(a-b-) is exceptionally rare. In African Americans, the incidence of Fy(a-b-) is 68% and it is perhaps not insignificant that Fy(a-b-) red cells are resistant to invasion by the malarial parasite Plasmodium vivax. This is thought to be due to balanced polymorphism.

Fy^a and Fy^b antigens are destroyed when red blood cells are treated with appropriate concentrations of the proteolytic enzymes ficin, papain and bromelin.

PRINCIPLE OF THE TEST

When used by the recommended technique, this reagent will cause agglutination (clumping) of red blood cells carrying the Fy^b antigen. Lack of agglutination of the red blood cells demonstrates the absence of the Fy^b antigen.

REAGENT DESCRIPTION

This reagent has been prepared from plasma collected from blood donors. ABO hemagglutinins were removed by adsorption. Conversion to serum was achieved by the addition of calcium chloride and where necessary, thrombin. Excess calcium was removed by the addition of sodium oxalate. The formulation also contains 1g/L sodium azide.

The volume delivered by the reagent dropper bottle is approximately 40µl. Bearing this in mind, care should be taken to ensure that appropriate serum:cell ratios are maintained in all test systems.

PRECAUTIONS

Store at 2°C - 8°C.
Do not use if turbid.
Do not dilute.
Do not use beyond the notified expiry date.
This reagent contains 0.1% (w/v) sodium azide. Sodium azide may be toxic if ingested and may react with lead and copper plumbing to form explosive compounds. If discarded into sink, flush with a large volume of water to prevent azide buildup.
Handle and dispose of reagents as potentially infectious.
CAUTION: ALL BLOOD PRODUCTS SHOULD BE TREATED AS POTENTIALLY INFECTIOUS. SOURCE MATERIAL FROM WHICH THIS PRODUCT WAS DERIVED WAS FOUND NEGATIVE WHEN TESTED IN ACCORDANCE WITH CURRENT FDA REQUIRED TESTS. NO KNOWN TEST METHODS CAN OFFER ASSURANCE THAT PRODUCTS DERIVED FROM HUMAN BLOOD WILL NOT TRANSMIT INFECTIOUS AGENTS.
This product has components (dropper bulbs) containing dry natural rubber.
This reagent is for *in vitro* diagnostic use only.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Specimens should be collected by aseptic technique with or without an anticoagulant. The specimen should be tested as soon as possible after collection. If testing is delayed, the specimen should be stored at 2°C - 8°C. Blood specimens exhibiting gross hemolysis or contamination should not be used. Do not use collection tubes that contain serum or plasma/cell separation media. Clotted samples or those collected in EDTA should be tested within fourteen days from collection. Donor blood stored in citrate anticoagulant may be tested until the expiry date of the donation.

MATERIALS

Materials provided

- ALBAsera® Anti-Fy^b

Materials required but not provided

- Isotonic saline
- Reagent red blood cells suitable for the control of Anti-Fy^b
- Polyspecific Anti-Human Globulin / Monospecific Anti-Human IgG
- IgG sensitized red blood cells
- 10 x 75mm or 12 x 75mm glass test tubes
- Pipettes
- Centrifuge
- Heating block / waterbath @ 37°C
- Optical aid

TEST PROCEDURE

General Information

This reagent has been standardized for use by the technique described below and therefore its suitability for use in other techniques cannot be guaranteed. When a test is required to be incubated for a specific period of time, a timer should be used.

RECOMMENDED TECHNIQUES

37°C Indirect Antiglobulin

- Add 2 drops of blood grouping reagent to a test tube.
- Add 1 drop of red blood cells suspended to 2-4% in isotonic saline.
- Mix the test well and incubate for 15-45 minutes at 36-38°C.
- Wash the test at least 3 times with a large excess isotonic saline. e.g. 4ml of saline per 12 (or 10) x 75mm glass tube)

NOTE: (i) allow adequate spin time to sediment the red blood cells.
(ii) make sure that most of the residual saline is removed at the end of each wash.

- Add Anti-Human Globulin to each test tube in the amount specified in the manufacturer's product insert.
- Mix the contents of the test tube well and centrifuge. Suggested centrifugation: 900-1000g for 10-20 seconds or a time and speed appropriate for the centrifuge used that produces the strongest reaction of antibody with antigen-positive cells, yet allows easy resuspension of antigen-negative cells.
- Gently shake the test tube to dislodge the cell button from the bottom and observe macroscopically for agglutination. Negative reactions may be examined with an optical aid.
- Record results.
- Add IgG sensitized antiglobulin control cells to confirm the validity of negative test results.

STABILITY OF REACTION

Test results should be read and interpreted immediately after centrifugation. Delays may cause dissociation of antigen-antibody complexes resulting in weak positive or false negative reactions.

INTERPRETATION OF RESULTS

Agglutination = positive test result
No agglutination = negative test result

Frequency (%):

Phenotype	Caucasians	African Americans
Fy(a+b-)	17	9
Fy(a+b+)	49	1
Fy(a-b+)	34	22
Fy(a-b-)	Very rare	68

QUALITY CONTROL

Quality control of reagents is essential and should be performed on each day of use and in accordance with local, state and federal regulations. We suggest that the following red blood cell samples are used to control the reactions of this reagent.

Fy(a+b+) red blood cells should be used as a positive control.
Fy(a+b-) red blood cells should be used as a negative control.

PERFORMANCE LIMITATIONS

Since the antibodies from which this product has been prepared were stimulated by red blood cells, extensive tests have been undertaken to exclude the presence of additional contaminating blood group antibodies. However, it is impossible to state categorically that reagents of this nature will only contain antibodies of the required specificity.

Direct antiglobulin test positive samples will react by the indirect antiglobulin test irrespective of their Fy^b status.

Driblocks and waterbaths promote better heat transfer and are recommended for 37°C tests, particularly where the incubation period is 30 minutes or less.

Gently resuspend tube tests before reading. Excessive agitation may disrupt weak agglutination and produce false negative results.

Excessive centrifugation can lead to difficulty in resuspending the cell button, while inadequate centrifugation may result in agglutinates that are easily dispersed.

The expression of certain red blood cell antigens may diminish in strength during storage, particularly in EDTA and clotted samples. Better results will be obtained with fresh samples.

Suppressed or weak expression of blood group antigens may give rise to false-negative reactions.

False positive or false negative results can occur due to contamination of test materials, improper reaction temperature, improper storage of materials, omission of test reagents and certain disease states.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Prior to release, each lot of ALBAsera® Anti-Fy^b is tested by FDA recommended methods against a panel of antigen-positive and antigen-negative red blood cells to ensure suitable reactivity.

For additional information or technical support, contact Product Technical Support at 1-888-228-1990.

BIBLIOGRAPHY

1. Technical Manual. 15th ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks, 2008.
2. Standards for Blood Banks and Transfusion Services. 25th ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks, 2008.

DATE OF ISSUE

October 2012

US Distributor

Quotient Biodiagnostics Inc.
41 University Drive
Newtown
PA 18940
USA

Customer Service Tel: 1-888-284-1901
Product Technical Support Tel: 1-888-228-1990
Customer Service Fax: 1-888-694-5208
E-Mail: customer.service@quotientbiodiagnostics.com
Web: www.quotientbiodiagnostics.com

Manufacturer:

Alba Bioscience Limited
Ellen's Glen Road
Edinburgh
Scotland, UK
EH17 7QT

US License 1807

Tel: +44 (0) 131 536 5907
Fax: +44 (0) 131 536 5897
E-Mail: customer.services@albabioscience.co.uk

© Alba Bioscience Limited 2012 Z153UCPI/01

QUOTIENT BIODIAGNOSTICS

Anexo 8: Protocolo 2 – Malaria Ab

PROTOCOLO 2 DE TRABAJO PARA LA CORRIDA DE MUESTRAS				
Malaria Ab				
DIA.PRO				
	Version 1.0 18, agosto 2015	Preparado por: Evelin Zúñiga, Ma. Fernanda Pullas		
Nombre Tech.		Fecha de inicio, Día/Mes/Año:		No. de muestras a correrse:
N Lote.		Fecha de expiración:		No. de tiras usadas:
Fuente de las muestras:				
No.	Descripción	Visto	Observaciones	Materiales
PREPARACION DE REACTIVOS				
Lugar: Mesa de Laboratorio, BS 1				
1	**REACTIVOS, KITS.** Sacar los reactivos del refrigerador. Conservación de 2° a 8° C		Todos los reactivos deben estar a Tº ambiente (18 a 30ºC) antes de su empleo, manipular todos los reactivos con mucho cuidado.	KIT Malaria Ab 3era generación DIA.PRO
2	**Placa Elisa (Microplate):** Placas con antígenos recombinantes especificos frente a las especies de P.		12 tiras de 8 pocillos rompibles. Dejar a temperatura ambiente (aprox. 1 hora)	Tiras microelisa
3	Solución de Lavado (WASHBUF 20X): Solución de buffer fosfato con tween20		Diluir la solución concentrada 20x de diluirse con agua de calidad EIA hasta 1200 ml. Mezclar suavemente antes de su uso. Evitar la formación de espuma y burbujas. La solución es estable 7 días conservada a temperatura entre 2 a 8°C en envase apropiado.	Solución de lavado, agua destilada, material volumétrico
4	Conjugado Enzimático (CONJ 1): Contiene antígenos recombinantes biotinilados de especies P.		8 viales. Se disolveran completamente con 6 ml del diluente de conjugado 1. Debe ser preparado antes del dispensado de las muestras. Puede ser almacenada de 2-8°C, no más de 12 horas.	Conjugado 20X y Diluyente de conjugado
5	Diluente del Conjugado 1: contiene tampón salino Tris complemmentado con Kathon GC 0.05%, Tween 20 y BSA.		Se utiliza para disolver el polvo liofilizado de conjugado N°1.	Diluente del conjugado
5	Conjugado Enzimático (CONJ 2): La solución contiene HRP conjugada con estreptavidina en tampon salino tris complementado con Kathon GC 0.05%, Tween 20 y BSA.		Reactivo listo para su uso. Mezclar bien con un vortex antes de usar.	Conjugado 20X y Diluyente de conjugado
7	Cromógeno/Substrato (SUBS TMB): Contiene tampon citrato 50 mM a pH 3.5-3.8 dimelsulfóxido 4%, TMB 0.03% y H2O2 0.2%.		Listo para usar. Mezclar bien con un vortex antes de usar. Proteger de la luz, agentes oxidantes y superficies metálicas. En caso de transferir usar pipetas estériles y desechables.	TMB
8	**Calibrador (CAL ...):**		Disolver con agua de calidad EIA. Mezclar con un vortex antes de usar. Almacenar en alicuotas a -20°C	Calibrador, agua EIA, tubos eppendorf
9	**Ácido sulfúrico 0,3 M**		Listo para el uso. Mezclar con un vortex antes de usar.	H2SO4
10	**Control positivo (CONTROL +):** Contiene suero humano positivo para anticuerpos frente a especies de P. y Kathon 0,1%		Listo para su uso, mezclar en un vortez antes de utilizar. Color verde claro	CP
11	**Control negativo (CONTROL -):** Contiene suero humano negativo para anticuerpos frente a especies de P. y Kathon 0,1%		Listo para su uso. Color amarillo pálido. Listo para el uso, mezclar en un vortez antes de utilizar.	CN
MUESTRA				
12	**Suero o Plasma,** con citrato, heparina o plasma		No se requiere ninguna preparación especial o ayuno, la sangre se debe recoger por venopunción normal. No se deben someter a mas de un ciclo de descongelación. Las muestras helizadas, hiperlipidemia, y otras causas de turbidez deben ser descartadas. **Las muestras deben conservarse hasta 5 dás de 2-8°C, y en periodos largos a -20°C.**	Suero o plasma.
PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA				
Lugar: Mesa de Laboratorio, BS 1				
13	Reactivos atemperados bien mezclados		Tº 15 - 30 ºC	Kits
14	Preparar la placa con la cantidad de pocillos necesarios.		Dejar un pocillo para el blanco, no colocar ni diluyente de muestras ni muestras.	Kit, Tiras microelisa, portatiras.
15	Suspender el contenido del número correcto de viales del conjugado N° 1 con diluente del conjugado N°1.		Debe realizarse antes de dispensar las muestras y controles.	pipetas, puntas, solución de lavado
16	Dejar el primer pocillo vacío para la operación del blanco.			
17	Colocar 50ul del diluente de muestras en los pocillos correspondientes.		Utilizar siempre puntas nuevas para cada muestra y evitar contaminación cruzada. Evitar topar el fondo del pocillo durante el pipeteo.	Placa de ensayo, puntas, pipetas

18	Dispensar 150 ul de control negativo el por triplicado, 150 ul de control positivo individual y 150 de calibrador por duplicado en los pocillos apropiados.		Excepto el blanco. Utilizar siempre puntas nuevas para cada muestra y evitar contaminación cruzada. Evitar topar el fondo del pocillo durante el pipeteo.	Control positivo, negativo y calibrador.
19	Dispensar 150 ul de muestras en los pocillos correspondientes. Mezclar suavemente la placa sobre la superficie de trabajo.		Excepto el blanco. Utilizar siempre puntas nuevas para cada muestra y evitar contaminación cruzada. Evitar topar el fondo del pocillo durante el pipeteo.	Placa de ensayo, muestras, pipetas, puntas.
20	Sellar las tiras con el adhesivo e incubar 60 minutos a 37°C.			Adhesivo
21	Lavar 5 veces la microplaca con el lavador automático, dispensando y aspirando 350 ul/ pocillo de la solución de lavado diluida.		Tener cuidado de no tocar la pred interna de plástico con la pipeta que contiene conjugado.	pipetas, puntas, solución de lavado
22	Dispensar 150 ul de mezcla de conjugado N° 1.		Se añade en cada pocillo, excepto en el primer pocillo blanco y cubrir con el adhesivo.	pipetas, puntas, conjugado, adhesivo.
23	Incubar a 37°C durante 30 minutos			
24	Dispensar 100 ul del conjugado N°2 en todos los pocillos y agitar suavemente la placa para mezclar los conjugados.		Excepto el blanco. Utilizar siempre puntas nuevas para cada muestra y evitar contaminación cruzada. Evitar topar el fondo del pocillo durante el pipeteo.	pipetas, puntas, conjugado.
25	Colocar adhesivo e incubar durante 30 minutos a 37°C			
26	Lavar 5 veces la microplaca con el lavador automático, dispensando y aspirando 350 ul/ pocillo de la solución de lavado diluida.		Tener cuidado de no tocar la pred interna de plástico con la pipeta que contiene conjugado.	pipetas, puntas, solución de lavado
27	Dispensar 200 ul de cromógeno/sustrato en todos los pocillos incluido el blanco.		No tocar la pared interna del pocillo al colocar el sustrato para evitar contaminación. Iniciar la medición del tiempo inmediatamente después de la adición de este componente al primer pocillo.	Substrato, pipetas, puntas
28	Se incuba a temperatura ambiente, alejado de la luz, por 30 min			Cámara obscura
29	Añadir 100 ul de ácido sulfúrico en cada pocillo, incluso en el blanco para detener la reacción enzimática.		Existirá el viraje de color de azul a amarillo en el control positivo y las muestras positivas.	puntas, H2SO4
30	Leer en el espectrofotómetro a 450 nm (usando 630 nm como referencia).		Asegurarse de que no exista impresiones digitales en el fondo de los pocillos. La lectura debe realizarse inmediatamente después de color la solución stop. Esperar máximo 30 minutos.	Lector
VALIDACIÓN DE LA PRUEBA				
Lugar: Mesa de Laboratorio, BS 1				
31	Pocillo blanco		valor ≤ 0,100	Sirve para comprobar que el sustrato no se ha contaminado.
32	Controles negativos		La media de los CN ≤ a 0,200, si uno de los valores es mayor a este valor descartar y recalcular la media. Si dos valores están fuera de este rango la serie debe repetirse.	Si los valores son superiores a 0,200: procesos de lavado no están validados, solucion inapropiada, errores de pipeteo, contaminación entre pocillos, agujas de lava semi-obstruidas.
33	Valor de calibrador		M/Co > 1	Si los valores son menores a 1: el proceso fue realizado correctamente, no ha habido errores de dispensación, contaminación externa, proceso de lavado errado.
34	Controles positivos		CP ≥ a 0,500	si es < 1,000: proceso no fue realizado correctamente,
CALCULO DEL PUNTO DE CORTE				
Lugar: Mesa de Laboratorio, BS 1				
35	CNx + 0,300 = Valor de corte (Co)			
INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS				
36	REACTIVO:		Una muestra es reactiva si la absorbancia de la misma dividida para el punto de corte es mayor a 1,1	**M/Co > 1,1**
37	NO REACTIVO:		Una muestra es reactiva si la absorbancia de la misma dividida para el punto de corte es menor a 0,9.	**M/Co < 0,9**
38	INDETERMINADO		Una muestra es reactiva si la absorbancia de la misma dividida para el punto de corte está entre 0,9 y 1,1	**M/Co: 0,9 a 1,1**
	YO, certifico que la corrida de las muestras para la determinación de Malaria Ab, fue realizada tal como esta descrito en este protocolo			
	Firma		Fecha:	

Anexo 9: Protocolo 3 – Extracción de ADN

PROTOCOLO 3 DE TRABAJO PARA LA CORRIDA DE MUESTRAS

Wizard Genomic DNA Purification Kit

Promega

	Fecha de inicio, Día/Mes/Año:		**Preparado por: Evelin Zúñiga Sosa, Ma. Fernanda Pullas**	
Nombre Tech.			**Fecha de expiración:**	**No. de muestras a correrse:**
No.	**Descripción**	**Visto**	**Observaciones**	**Materiales**
PREPARACION DE REACTIVOS				
Lugar: Mesa de Laboratorio, BS 1				
1	Cell Lysis Solution: Frasco de 500 ml		Reactivos listos para su uso. Se encuentran a temperatura ambiente	
2	Nuclei Lysis Solution: Frasco de 250 ml			
3	Protein precipitation solution: Frasco de 125 ml			
4	DNA Rehydration solution: Frasco de 100 ml			
5	ARNasa rehydration solution: Tubo eppendorf con 1.25 ml de reactivo			
6	Isopropanol			
7	Etanol 70‰			
MUESTRA				
8	**Plasma con EDTA, heparina o citrato.**		No se requiere ninguna preparación especial o ayuno, la sangre se debe recoger por venopunción normal. descongelación. Las muestras deben estar bien mezcladas.	Plasma
PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA				
Lugar: Mesa de Laboratorio, BS 1				
9	Reactivos atemperados bien mezclados		Los reactivos deben estar a temperatura ambiente.	Kits
	Colocar todo el material necesario en la cámara de extracción de ADN y dejar 15-20 minutos en luz UV			Puntas, tubos eppendorf, pipetas.
11	Añadir 900 uL de solución para lisar las células en tubos eppendorf de 1.5 mL + 300 uL de sangre total. Mezclar de 5-6 veces por inversión.		Las muestras deben estar bien mezcladas.	Pipetas, tubos eppendorf, muestras.
12	Incubar 15 minutos a 37°C		Mezclar por inversión 2-3 veces.	Termobloque
15	Incubar 10 minutos a temperatura ambiente. Invertir 1-2 veces durante la incubación			Incubadora, tubos eppendorf
13	Centrifugar 13,000-16,000 x g/ 20 segundos a temperatura ambiente			Microcentrifuga
15	Realizar vortex vigoroso hasta que las células se resuspendan durante 15-20 segundos.			Vortex, tubos eppendorf.
16	Añadir 300 uL de Nuclei Lysis solution y pipetear de 5-6 veces para homogenizar la muestra.		El grumo debe ser visible despúes de la mezcla.	Termobloque
17	Incubar a 37°C por 1 hora		Si el grumo no es destruido después de la hora de incubación, añadir 100 uL de Nuclei Lysis solution y repetir el paso 17.	Termobloque, pipetas, puntas.
18	Añadir 1.5 uL de ARNasa y mezclar por inversión de 2-3 veces			Pipetas, puntas
	Incubar 15 minutos a 37°C			Termobloque.
19	Añadir 100 uL de la solución de Protein Precipitation solution y mezclar en el vortex vigorosamente durante 20 segundos.		Si se volvieron a lisar las células, añadir un total de 130 uL de solución de Protein precipitation solution. Después de realizar el vortex los pequeños grumos de proteínas deben ser visibles.	Pipetas, puntas, vortex.
20	Centrifugar 13,000-16,000 x g/ 3 minutos a temperatura ambiente		Si el pellet no es observado, regresar al paso 11.	Microcentrifuga.
21	Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL que contenga 300 uL de isopropanol y mezclar por inversión.		Se debe mezclar hasta que el ADN sea visible.	Pipetas, puntas.
22	Centrifugar 13,000-16,000 x g/ 1 minuto			Microcentrifuga
23	Descartar el sobrenadante y añadir 300 uL de etanol al 70‰ y mezclar gentilmente por inversión.		Se debe tener cuidado de no perder el pellet.	Pipetas, puntas.
24	Centrifugar 13,000-16,000 x g/ 1 minuto			Microcentrifuga
25	Aspirar el etanol y dejar el pellet al aire libre durante 10-15 minutos para que se seque.		Se debe tener cuidado de no perder el pellet.	Pipetas, puntas, toallas de papel.
26	Rehidratar el DNA con 100 ul de solución rehidratante de DNA .			Pipetas, puntas.
27	Incubar durante 1 hora a 65° C			Termobloque.
VALIDACION DE LA PRUEBA				
Lugar: Mesa de Laboratorio, BS 1				
28	Cuantificación mediante Nanodrop			
29	YO, certifico que la extracción de ADN de las muestras, fue realizada tal como esta descrito en este protocolo standard.			
	Firma		Fecha:	

Anexo 10: Protocolo 4 – Cuantificación de ADN en Nanodrop

PROTOCOLO DE TRABAJO PARA LA CORRIDA DE MUESTRAS				
Cuantifcación de ADN				
NANODROP 1000				
		Realizado por: Evelin Zúñiga Sosa, Ma. Fernanda Pullas		
THERMO SCIENTIFIC		**Fecha de inicio:** 10-Mayo-2016		**No. de muestras a correrse:**
Fuente de las muestras:				
No.	**Descripción**	**Visto**	**Procedimiento**	**Materiales**
Lugar: Mesa de Laboratorio.				
1	**Ingresar al programa**		Dar doble clic en el icono azul Nanodrop	
2	**Escoger la opción Nucleic Acid**		Seguir basicamente las intrucciones de la pantalla	
3	**Agua de PCR**		Colocar de 1- 2 uL de agua de PCR para limpiar el intrumenteo y dar OK	Agua de PCR
4	**Buffer en el que se disolvio la muestra**		Limpiar el objetivo con el papel del lente. Poner de 1 - 2 uL del buffer (0,1TE) y dar clic en BLANK	Buffer
5	**Limpiar el Objetivo**		Colocar nuevamente el buffer que uso anteriormente como blanco y dar clic en MEASURE para medir la muestra y asegurarse que el blanco este en buenas condiciones (valores menores a 0,04 en el cuadro de absorbancia a 260 son óptimoos)	Buffer
6	**1-2 uL Muestra de ADN**		Colocar el número QCAZ correspondiente y aplastar MEASURE	
7	**Concentracion de ADN**		Verificar la concentración de ADN en el cuadro ng/uL, la calidad en el cuadro 260/280, la pureza en el cuadro 230/280 (valores 1,8 y 2 son optimos)	
8	**Agua de PCR**		Una vez medidas todas las muetras de ADN colocar una gota de agua de PCR y bajar el brazo del equipo por 1 minuto aproximadamente, luego limpiar con papel el objetivo.	
9	**Datos obtenidos**		Guardar los datos obtenidos en el boton Report Save y luego salir del programa.	
10	YO, certifico que la cuantificación del ADN de las muestras, fue realizada tal como esta descrito en este protocolo standard			
11	Firma:		Fecha:	

Anexo 11: Protocolo 5 – PCR-RT

PROTOCOLO 5 PARA CORRIDA DE MUESTRAS

PCR-RT

Responsable: Evelin Zúñiga, Ma. Fernanda Pullas
Fecha: 03 junio, 2016

1. Reconstitución de Primers

Los primers forward y reverse de todos los genes se reconstituyen de acuerdo al número de moles de cada primer de Invitrogen, de esta manera se obtiene una concentración de 100 µM de cada primer y luego se procede a bajar la concentración a 10 µM (dilución 1:10 → 10 µL del primer + 90 µL de H_2O molecular) con la cual se trabaja en la Master Mix.

	Peso molecular	Volumen de H2O molecular	Concentración
Primer Forward género Plasmodium sp.: (DNA)-ACCTCCAGGCAAAGAAAATGAC	50,43 nM	504,3 µL	100 µM
Primer Reverse género Plasmodium sp.: (DNA)-GGCGAGAAGGGAAGTGTGTTT	44, 54 nM	445,4 µL	100 µM
Primer Especie *Plasmodium vivax*: FAM-AACGGAATCAGTTAA	10000 pM	100 µL	100 µM
Primer Especie Plasmodium falciparum: VIC-ACGGAATCAATTAAC	10000 pM	100 µL	100 µM
GoTaq Probe qPCR Máster Mix	Lista para su uso		

Una vez reconstituidos los primers o cebadores, se debe alicuotar y se procede a almacenarlos a -20°C.

2. Master Mix

Se deja las alícuotas de los cebadores y las muestras de ADN a temperatura ambiente y se realiza la master mix en base al estudio de Carvalo y colaboradores, 2012: *"Plasmodium vivax infection in Anajás, State of Pará: no differential resistance profile among Duffy-negative and Duffy-positive individuals"*.

	Concentración inicial	Concentración final	Volumen inicial	Volumen final
Primer Forward género Plasmodium sp.: (DNA)-ACCTCCAGGCAAAGAAAATGAC	100 nM	300 nM	1, 5 µL	50 µL
Primer Reverse género Plasmodium sp.: (DNA)-GGCGAGAAGGGAAGTGTGTTT	100 nM	300 nM	1, 5 µL	
Primer Especie *Plasmodium vivax*: FAM-AACGGAATCAGTTAA	100 nM	200 nM	1 µL	
Primer Especie Plasmodium falciparum: VIC-ACGGAATCAATTAAC	100 nM	200 nM	1 µL	
GoTaq Probe qPCR Máster Mix	Lista para su uso		25 µL	

3. **PCR-RT**

Test basado en GoTaqMan para detectar *P. falciparum* y *P. vivax* bajo las siguientes condiciones: 10 min a 94°C para lograr una actividad óptima de AmpErase uracil-N-glicosilasa, 15 segundos a 95°C para activar la ADN polimerasa AmpliTaq Go, y 1 min a 59 °C durante 55 ciclos. Cada experimento incluye como control negativo una mezcla de reacción sin DNA y una muestra humana sin la enfermedad y dos controles positivos para las especies de vivax y falciparum.

4. **Lectura de los resultados**

Se basa en la amplificación de las muestras que contengan los antígenos parasitarios, datos analizados mediante la curva de disociación de Melting.

Anexo 12: Proceso de Estudio

Toma De Muestras



Pre análisis

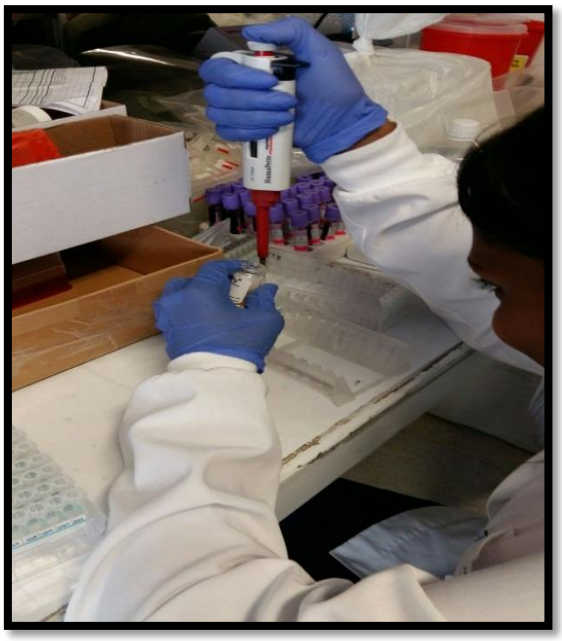


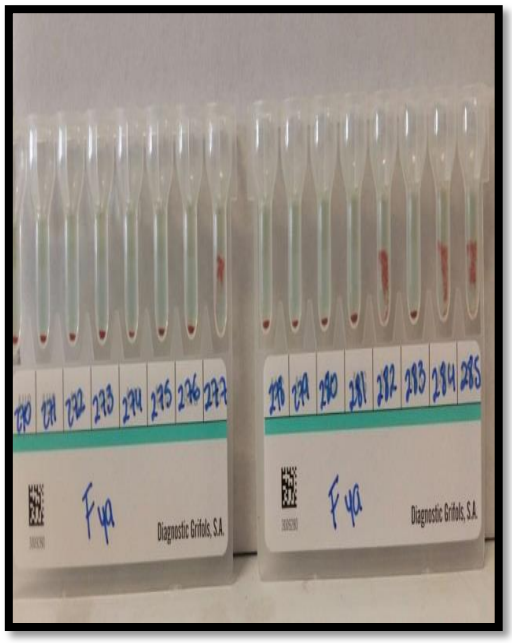
Pruebas De Diagnóstico Rápido





Fenotipificación Sistema Duffy





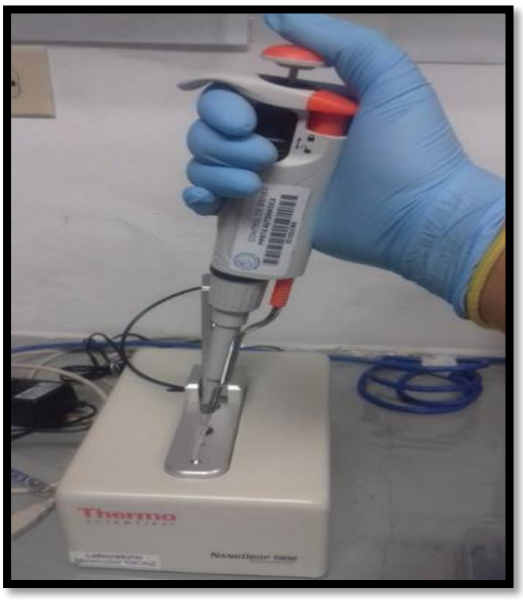
Elisa





Cuantificación de ADN





PCR – Tiempo Real

