

Comparación de gota gruesa y PCR para la detección de infecciones maláricas en Honduras

Ana Cecilia López¹, Jorge Coello Quan¹, Rosa Elena Mejía²,
Engels Banegas², Gustavo Fontecha^{1*}

RESUMEN

El diagnóstico oportuno y efectivo de la malaria es determinante para el tratamiento y control adecuado de la enfermedad; sin embargo, el diagnóstico tradicional basado en microscopía presenta limitaciones en la sensibilidad y en la detección de infecciones mixtas que dificultan el control de la malaria, especialmente en las regiones de baja y moderada endemidad. Los métodos de detección del parásito basados en la amplificación de ADN son una alternativa a este problema. En este estudio se comparó el diagnóstico microscópico mediante gota gruesa con una técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR). Se analizaron 129 muestras positivas por microscopía procedentes de 24 municipios en 5 Departamentos endémicos de malaria en Honduras. Según el diagnóstico molecular, 10% de las muestras resultaron positivas por *Plasmodium falciparum*, 86% por *Plasmodium vivax*, y 2.3% fueron infecciones mixtas. La correlación entre diagnóstico microscópico y PCR fue de un 91.4%.

De acuerdo a la PCR, se detectaron diagnósticos incorrectos de la especie del parásito por microscopía y se demostró que las infecciones mixtas son comúnmente desapercibidas. En consecuencia, la PCR mostró ser una herramienta útil para las investigaciones epidemiológicas de malaria y como control de calidad del diagnóstico tradicional.

Palabras Clave: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, PCR, malaria, gota gruesa.

¹ Universidad Nacional Autónoma de Honduras. Facultad de Ciencias. MEIZ-Escuela de Microbiología

² Secretaría de Salud. Laboratorio Nacional de Malaria. Tegucigalpa, Honduras.

* Universidad Nacional Autónoma de Honduras, Facultad de Ciencias, Escuela de Microbiología, Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas. gafontecha@yahoo.com

ABSTRACT

An early and effective malaria diagnosis is determinant for the treatment and control of the disease, however, the traditional diagnosis based on microscopy has limitations in sensitivity and power to detect mixed infections which make difficult the control of malaria, especially in regions of low and moderate endemicity. Parasite detection methods based on DNA amplification are an alternative to this problem. In this study we compared the microscopic diagnosis by thick drop with a technique of polymerase chain reaction (PCR). 129 samples from 24 Counties in 5 endemic Honduran Provinces resulted positive by microscopy. According to molecular diagnosis, 10% of them were positive for *Plasmodium falciparum*, 86% for *Plasmodium vivax*, and 2.3% showed mixed infections. The correlation between microscopic and PCR diagnosis was 91.4%.

According to the PCR results some mistakes in the microscopic diagnosis were detected in relation to correct identification of *Plasmodium* species and undetected mixed infections. Therefore, PCR method was shown to be a useful tool for epidemiological investigations of malaria and as quality control of traditional diagnosis.

Key words: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, PCR, malaria, thick drop

INTRODUCCIÓN

La malaria es la enfermedad parasitaria más importante en los humanos, ocasionando casi 3 millones de muertes cada año , y es endémica en más de cien países alrededor del mundo . Además de su importancia médica y epidemiológica, la malaria tiene una enorme relevancia desde el punto de vista socioeconómico, por su impacto sobre los países en vías de desarrollo, limitando el progreso y contribuyendo al subdesarrollo y la pobreza.

La enfermedad puede ser ocasionada por cualquiera de cuatro especies de *Plasmodium*: *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* y *P. falciparum* , pero sólo las últimas dos son endémicas en Honduras, siendo *P. falciparum* la especie que ocasiona cuadros clínicos más graves y la que origina el mayor número de muertes. En Honduras, la malaria afecta principalmente a poblaciones en situación de pobreza. Registros oficiales del país muestran una tendencia a la disminución gradual de la malaria desde el año 1999 a la fecha. A partir del año 2005, el número de casos registrados disminuyó de 16,077 a 8,211 en 2008 . No obstante, 1.7 millones de personas en 48 municipios del país aún permanecen en riesgo de contraer la enfermedad si no se continúa de forma sostenida con el esfuerzo de prevención y control. Este éxito temporal en la disminución sostenida de casos requiere de medidas concretas que consoliden esos logros para poder alcanzar la meta al año 2015 de reducción en un 50% de la incidencia y evitar muertes por malaria.

Una de esas medidas es el mejoramiento en la capacidad de diagnóstico oportuno y efectivo de casos. La detección y la identificación por microscopía de las especies de *Plasmodium* sp. presentes en muestras de sangre coloreadas con Giemsa , ha sido tradicionalmente el método de referencia y no ha tenido modificaciones desde el año 1903 . La sensibilidad de la gota gruesa es de hasta 10 a 30 parásitos por microlitro de sangre, lo que aproximadamente equivale al 0,001% de glóbulos rojos infectados. Sin embargo, esta técnica requiere de personal capacitado, particularmente cuando las parasitemias son bajas o existe una infección mixta.

Desde hace ya casi veinte años se cuenta con un creciente número de métodos basados en la amplificación de ácidos nucleicos (PCR) para el diagnóstico de malaria. El valor de este enfoque radica en su alta sensibilidad, puesto que puede detectar de tres a cuatro parásitos por μ l de sangre (0,0005% a 0,0015% de glóbulos rojos infectados). Además, permite la diferenciación certera de las especies del parásito, cuando existen dificultades para su diferenciación morfológica o una infección mixta . En consecuencia, el enfoque molecular tiene la potencialidad de suplir algunas limitaciones del método microscópico,

especialmente en lo pertinente a sensibilidad y especificidad, si bien esta tecnología también tiene inconvenientes inherentes a la técnica y a los costos e infraestructura que requieren. En el caso de Honduras, las Instituciones encargadas de monitorear y atender los casos de malaria no cuentan con la logística ni los recursos necesarios para implementar técnicas moleculares de manera rutinaria en las áreas afectadas por la malaria. A pesar de ello es importante que al menos los laboratorios de referencia cuenten con un método que permita evaluar periódicamente la calidad de los resultados diagnósticos o dar seguimiento a casos clínicos especiales.

Por estas razones hemos comparado la técnica de referencia, gota gruesa, con una técnica basada en PCR en cuanto a su capacidad de detectar las infecciones maláricas, discriminar entre especies del parásito y detectar infecciones mixtas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los sujetos seleccionados fueron pacientes febriles que se acercaron a los centros asistenciales y fueron diagnosticados como positivos por malaria de acuerdo a la gota gruesa. A todos los pacientes febriles se les tomó una muestra para análisis microscópico, antes de administrar cualquier tratamiento antimalárico. A estos pacientes se les informó sobre el estudio y se solicitó su participación mediante la firma de un documento de consentimiento informado. Los pacientes menores de edad debieron acceder a participar en el estudio voluntariamente si tenían la edad para ello, sumado al consentimiento firmado de sus tutores legales. De tratarse de infantes menores de 2 años se solicitó el consentimiento firmado de sus tutores legales.

La gota gruesa se tomó por punción capilar en el dedo índice de la mano para hacer el extendido, el cual fue teñido con Giemsa y realizado según lo propuesto por la OMS y la OPS. Se examinaron 100 campos microscópicos y el recuento de parásitos se hizo con base en 100 leucocitos, tomando 8.000 leucocitos como valor de referencia para expresar la parasitemia (parásitos/mm³). La lectura de la gota gruesa fue realizada por personal capacitado de la Secretaría de salud. De los casos positivos se obtuvo del paciente una segunda muestra de sangre en papel filtro (3 MM Whatman) por punción capilar para el análisis por PCR. La sangre se dejó secar y se almacenó en condiciones de baja humedad para su transporte y ulterior análisis en el Laboratorio Teasdale-Corti de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras, en Tegucigalpa. Se seleccionaron para este estudio 129 individuos con residencia en 24 municipios, distribuidos en 5 de los Departamentos de Honduras con mayor transmisión de malaria (Cuadro 1).

Extracción de ADN

Del papel filtro impregnado con sangre del paciente se cortaron 3 círculos de 10mm², se sumergieron en 200 µl de saponina 1% y se incubaron a 4°C durante toda la noche para lisar las células. Al día siguiente se lavó 4 veces con solución salina amortiguada con fosfatos (PBS), luego se resuspendió en Chelex-100 (Bio-Rad), incubando a 56°C durante 15 minutos y a 100°C durante 10 minutos. Se centrifugó 5 minutos a 13,000 rpm y se recuperó el ADN presente en el sobrenadante, se almacenó a 4°C para su posterior análisis.

PCR

La amplificación para el diagnóstico de *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum* se llevó a cabo de acuerdo a lo publicado por Singh et al 1999 adaptando el protocolo a las condiciones del laboratorio. Este método consta de dos amplificaciones consecutivas.

El esquema de la región amplificada se muestra en la **Figura 1** y corresponde a un segmento del gen ADNr 18S. En la primera PCR cada reacción contenía 25 µl de Master Mix 2X (Promega), 2 µl de cada cebador (rPLU 1 y rPLU 5, 10 µM cada uno), y 10 µl ADN para un volumen total de 50 µl. Las condiciones del termociclador fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos; seguido por 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, y extensión final a 72°C por 4 minutos. Se realizaron dos amplificaciones secundarias simultáneas, para la detección independiente de las dos posibles especies del protozoo.

En la segunda PCR se utilizó en cada reacción 25 µl Master Mix 2X, 2 µl de cada cebador (rFLA1 y rFLA2 / rVIV1 y rVIV2, 10 µM cada uno), 20 µl de agua y 1 µl del producto de la primera amplificación para un volumen total de 50 µl. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos; seguido por 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 58°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, extensión final a 72°C por 4 minutos.

Los productos fueron analizados en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio. El tamaño de los productos esperados fue de 205 pb para *P. falciparum* y 117 pb para *P. vivax*.

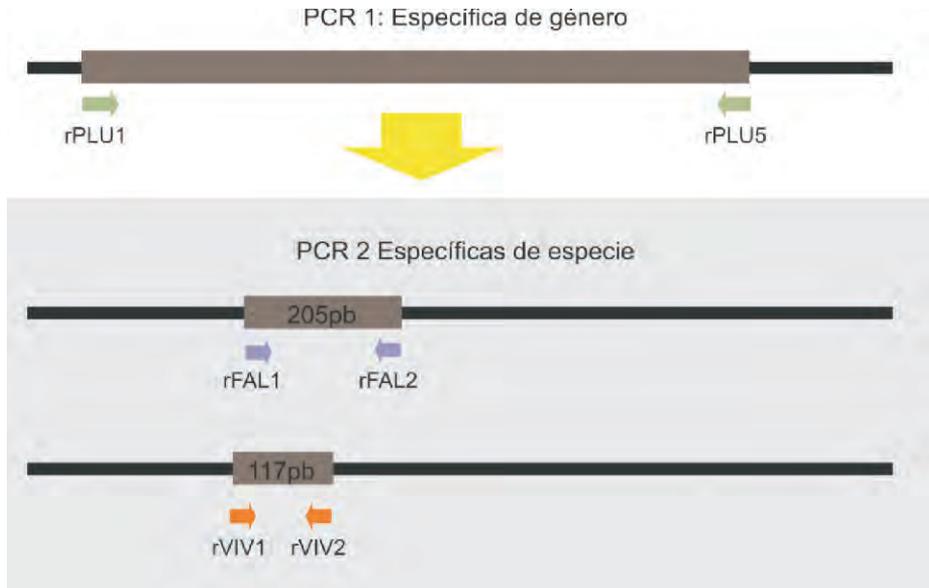


Figura 1. Representación esquemática de la región amplificada del gen ADN18s ribosomal (adaptado de Singh et al 1999).

RESULTADOS

Se analizaron 129 individuos con diagnóstico microscópico por malaria, procedentes de 24 municipios de 5 Departamentos endémicos de malaria en Honduras.

De acuerdo al análisis por gota gruesa el 14% (18/129) correspondió a malaria por *P. falciparum* (*Pf*), y el 86% (111/129) a malaria por *P. vivax* (*Pv*). Sin embargo, el análisis por PCR detectó solamente el 96% del total de casos (125/129) como positivos por *Plasmodium* sp., siendo el restante 3.1% (4/129) de los casos negativos por PCR.

Según el diagnóstico molecular, 10% (13/129) de las muestras fueron positivas para *Pf*, mientras que el 81% (105/129) lo fueron para *Pv*. El 3.1% (4/129) de los casos reveló un diagnóstico incorrecto de especie por microscopía. El 2.3% (3/129) de los casos se presentaron como infecciones mixtas según el ensayo molecular. Estas infecciones mixtas no fueron detectadas por microscopía. Comparando el diagnóstico por gota gruesa y por PCR se encontró una correlación del 91.4 % (118/129) entre las dos técnicas. Las discrepancias se debieron a que no se

diagnosticó ninguna de las infecciones mixtas y que se encontraron muestras con diagnóstico de especie incorrecta por microscopía. En la figura 2 se muestra una electroforesis con los productos de amplificación de la PCR. Se muestran tres infecciones mixtas junto a dos muestras de pacientes infectados con *Pf*.



Figura 2. PCR usada para el diagnóstico de especie. Carriles 1/2, 7/8, 9/10: individuos positivos por *P. falciparum* y *P. vivax*; carriles 3/4 y 5/6: individuos positivos por *P. falciparum*, carril 11: blanco, 12: Marcador de peso molecular 100 pb.

DISCUSIÓN

En Honduras, al igual que en la mayoría de países con presencia de malaria, la prueba usada para su diagnóstico es la gota gruesa, debido a su fiabilidad y sus ventajas económicas y operativas. Gota gruesa es la prueba de referencia para el diagnóstico de la malaria, sea con fines epidemiológicos o clínicos. Sin embargo, la sensibilidad y especificidad de este método son subjetivas y variables, porque están determinadas por la densidad de la parasitemia y por la experiencia del microscopista, con el riesgo de reportar falsos negativos o una especie del parásito diferente a la que está causando la infección.

Cuando se ejecuta por un microscopista con experiencia, el promedio de sensibilidad de la gota gruesa medida contra la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha descrito en 90% y la especificidad en 100%. Esta reducción de la sensibilidad en la gota gruesa respecto a PCR se debe a que los casos con una parasitemia baja pueden ser identificados como negativos. En el caso que nos ocupa parece ser que gota gruesa fue capaz de detectar 4 casos que

pasaron desapercibidos por PCR, lo que contradice la mayoría de las publicaciones que afirman una mayor sensibilidad de los enfoques moleculares. Lamentablemente nosotros no podemos establecer porcentajes de sensibilidad como medida estadística, ya que la población analizada no incluyó muestras negativas. En este estudio, los casos no detectados por PCR podrían deberse tanto a parasitemias bajas que impidieron la amplificación, como a errores del microscopista.

Una desventaja de la gota gruesa es el tiempo que emplea el personal desde la toma de muestra hasta la lectura de la lámina (aproximadamente una hora) postergando el inicio del tratamiento. A pesar de esto, la gota gruesa mantiene su vigencia, porque además de su alta efectividad para el diagnóstico *in situ* de la malaria sigue siendo más económica en términos operativos que las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos o las pruebas inmunocromatográficas.

En Honduras se registraron durante el 2009, 8,913 casos de malaria de los cuales 1,330 (15%) casos fueron por *P. falciparum*, y (85%) por *P. vivax*. Esta tendencia concuerda con los hallazgos de este estudio con 14% de casos de Pf y 86% de casos por Pv. Para poder hacer el diagnóstico diferencial de especies es imprescindible contar con microscopistas altamente experimentados que sean capaces de reconocer las diferencias morfológicas de cada especie y todas las etapas de desarrollo del parásito en el humano, etapas asexuales y gametocitos, para cada especie. De acuerdo a nuestros resultados, 3.1% de las muestras analizadas revelaron mal diagnóstico de especie en la gota gruesa, lo cual puede generar consecuencias relevantes para el paciente.

De esto se deriva que la buena preparación de los microscopistas es fundamental, ya que los errores en el diagnóstico de la malaria tienen implicaciones serias en la atención individual y cuando ocurren de forma sistemática tienen efectos epidemiológicos que comprometen los esfuerzos de control. Los resultados falsos positivos o equivocación de la especie parasitante conducen a administrar cantidades excesivas o incorrectas de droga que pudiera contribuir al desarrollo precoz de resistencia antimalárica en el país y conlleva al gasto innecesario de recursos.

Otro problema del enfoque diagnóstico tradicional es la alta frecuencia con la que se sub-registran infecciones mixtas, particularmente cuando las altas parasitemias que son usuales en la malaria por Pf enmascaran la presencia de los estadios típicos de Pv. De acuerdo a nuestros resultados, de 129 muestras analizadas, tres albergaron ambas especies cuando se amplificaron por PCR (2,3%), pero ninguna de ellas fue detectada por los microscopistas. Este resultado es congruente con

estudios anteriores que demuestran que la microscopía fue menos sensible para detectar infecciones mixtas que la PCR. La baja detección microscópica de infecciones por Pv coexistentes con Pf es un problema de salud pública, debido a la transmisión más temprana de Pv durante la enfermedad, y especialmente a los relapsos causados por los hipnozoítos hepáticos cuando no se aplica el tratamiento adecuado para esos estadios. Otra consecuencia negativa de los diagnósticos incorrectos de las infecciones mixtas es su aporte sobre la administración del tratamiento inadecuado, debido a un patrón diferencial de resistencia a drogas para ambas especies en aquellas regiones donde esto se presenta.

Considerando que la microscopía es la única técnica de diagnóstico empleada en varios países latinoamericanos, incluido Honduras, la implementación de técnicas basadas en PCR es una ventaja cuando se trata de detectar infecciones mixtas por *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum*, y en los casos de baja parasitemia. Las técnicas moleculares presentan así mismo varias desventajas respecto a la microscopía tradicional, entre ellas son notables los elevados costos por prueba, la dificultad de mantener un laboratorio apropiado en las áreas maláricas, y el personal especializado que requiere.

Sin embargo sus ventajas son significativas, entre ellas tenemos la posibilidad de tomar muestras de sangre sobre papel filtro, como una fuente confiable de ADN, ya que esto permite su fácil transporte, manipulación y almacenamiento, y se evita la contaminación o la degradación del ADN. Otra ventaja de los métodos moleculares es su capacidad de procesar un alto número de muestras simultáneamente, lo que le confiere gran rapidez en la entrega de resultados; y sin duda su mayor aporte es su capacidad de distinguir con precisión la especie del plasmodio presente en la muestra clínica.

De acuerdo a nuestros resultados, la bondad más notable del enfoque molecular es su alta sensibilidad para detectar infecciones causadas por ambas especies del parásito. En consecuencia, creemos que es necesario implementar en el país nuevos métodos capaces de detectar portadores asintomáticos de la infección, con mayor resolución en la identificación de la especie del parásito para ofrecer un tratamiento terapéutico apropiado, y que sirvan como controles de calidad, especialmente cuando se trata de la detección de infecciones mixtas, para el seguimiento de la cura parasitológica en algunos pacientes.

CONCLUSIONES

1. La correlación en los resultados obtenidos por gota gruesa respecto a la amplificación del ADN del protozoo es aceptable, pero es susceptible de mejora mediante la mayor capacitación del personal responsable del diagnóstico en el país.
2. Las técnicas moleculares son más sensibles que la gota gruesa en la detección de infecciones mixtas por Pf y Pv en un solo paciente.
3. Las técnicas moleculares tienen mejor capacidad de resolución en la identificación de la especie de Plasmodium causante de la malaria.
4. Aunque no es factible instalar laboratorios de biología molecular en las zonas maláricas de Honduras, convendría implementar al menos algunos laboratorios de referencia en las ciudades importantes del país para apoyar el diagnóstico y la vigilancia de la malaria.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias al financiamiento del Proyecto Teasdale-Corti, Honduras Canadá: "Fortaleciendo Capacidades para Alcanzar la Meta del Milenio Número 6: Combatir las enfermedades Infecciosas"; el cual opera con fondos Canadienses de la Iniciativa para la Investigación en Salud Global (GHRI).

REFERENCIAS

1. Álvarez Fernández B, García Esteban C, Soto Insuga V, Ruiz Jiménez M, Rubio Gribble B, Jiménez Fernández F, et al. Revisión de los casos de paludismo de los últimos 12 años en el Hospital Universitario de Getafe. *Anales de Pediatría* 2009;71(3):196-200.
2. Castro-Sancho JI, Munguía-Ramírez MdR, Ávila-Agüero ML. Malaria: una actualización. *Acta Médica Costarricense* 2002;44:107-112.
3. Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, Jaton K. Detection of four Plasmodium species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. *J Clin Microbiol* 2004;42(12):5636-43.
4. Aguilar CJ, Bú Figueroa E, Alger J. Caracterización clínica y epidemiológica de la malaria en una comunidad endémica de Honduras. In. *Revista Médica Hondureña*.; 2004. p. 178-186,.
5. Travis P, Bennett S, Haines A, Pang T, Bhutta Z, Hyder AA, et al. Overcoming health-systems constraints to achieve the Millennium Development Goals. *The Lancet* 2004;364(9437):900-906.

6. Ndao M, Bandyayera E, Kokoskin E, Gyorkos TW, MacLean JD, Ward BJ. Comparison of blood smear, antigen detection, and nested-PCR methods for screening refugees from regions where malaria is endemic after a malaria outbreak in Quebec, Canada. *J Clin Microbiol* 2004;42(6):2694-700.
7. Montoya AE, Menco J, Osorio N, Zuluaga MA, Duque J, Torres G, et al. [Concordance between thick blood smear, immunochromatography and polymerase chain reaction for malaria diagnosis]. *Biomedica* 2008;28(2):252-61.
8. Iqbal J, Sher A, Hira PR, Al-Owaish R. Comparison of the OptiMAL test with PCR for diagnosis of malaria in immigrants. *J Clin Microbiol* 1999;37(11):3644-6.
9. Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, Snounou G, Abdullah MS, Rahman HA. A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *Am J Trop Med Hyg* 1999;60(4):687-92.
10. Coleman RE, Sattabongkot J, Promstaporm S, Maneechai N, Tippayachai B, Kengluetcha A, et al. Comparison of PCR and microscopy for the detection of asymptomatic malaria in a *Plasmodium falciparum/vivax* endemic area in Thailand. *Malar J* 2006;5:121.
11. López Antuñano FJ y G Schmunis E. Diagnóstico de Malaria. Organización Panamericana de la Salud. In. Pub Cient. 512. Washington DC: OPS; 1998.
12. Londoño B, Carmona J, Blair S. [Comparison between OptiMAL and the thick smear tests for malaria diagnosis in an endemic area during a non-epidemic period]. *Biomedica* 2002;22(4):466-75.
13. Kain KC, Lanar DE. Determination of genetic variation within *Plasmodium falciparum* by using enzymatically amplified DNA from filter paper disks impregnated with whole blood. *J Clin Microbiol* 1991;29(6):1171-4.
14. Guerra AP, Knudson A, Nicholls RS, Galindo JA, Ravid Z, Rahirant S, et al. [Genotyping of the *Plasmodium falciparum* msp1 (block 2) and dhfr (codon 108) genes in field samples collected in four endemic Colombian localities]. *Biomedica* 2006;26(1):101-12.
15. Ali MS, Yousif AG, Mustafa MS, Ibrahim MH. Evaluation of malaria parasite screening procedures among Sudanese blood donors. *Clin Lab Sci* 2005;18(2):69-73.
16. Bell CE, Slutsker L, Beach RF, Foster SO, Jimenez G, Sarmiento ME. Malaria control in the municipality of San Esteban, Honduras. *Rev Panam Salud Publica* 2009;25(3):213-7.
17. Ordúñez P, Silva LC, Rodríguez MP, Robles S. Prevalence estimates for hypertension in Latin America and the Caribbean: are they useful for surveillance? *Rev Panam Salud Publica* 2001;10(4):226-31.
18. Humar A, Ohrt C, Harrington MA, Pillai D, Kain KC. Parasight F test compared

- with the polymerase chain reaction and microscopy for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in travelers. *Am J Trop Med Hyg* 1997;56(1):44-8.
19. Long GW, Jones TR, Rickman LS, Fries L, Egan J, Welde B, et al. Acridine orange diagnosis of *Plasmodium falciparum*: evaluation after experimental infection. *Am J Trop Med Hyg* 1994;51(5):613-6.
 20. Rubio JM, Benito A, Roche J, Berzosa PJ, Garcia ML, Mico M, et al. Semi-nested, multiplex polymerase chain reaction for detection of human malaria parasites and evidence of *Plasmodium vivax* infection in Equatorial Guinea. *Am J Trop Med Hyg* 1999;60(2):183-7.
 21. Oster N, Abdel-Aziz IZ, Stich A, Coulibaly B, Kouyate B, Andrews KT, et al. Comparison of different PCR protocols for the detection and diagnosis of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Res* 2005;97(5):424-8.
 22. Moody A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clin Microbiol Rev* 2002;15(1):66-78.
 23. CARMONA-FONSECA J, FRANCO GALLEGO, Alexander, ARANGO FLOREZ, Eliana *et al.* Now ICT malaria Pf/Pv[®] versus microscopy (thick-smear, thin smear) for diagnosis of malaria in Urabá (Colombia). In. *Iatreia*: 2; 2010, p. 137-145.
 24. Honduras, S.d.S.P.d., *Boletín Epidemiológico de la Malaria*. 2009: Tegucigalpa.
 25. Contreras-Ochoa C, Ramsey JM. [*Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* gametocyte stages are neglected in vaccine development]. *Salud Publica Mex* 2004;46(1):64-70.
 26. Pública. MdIPSRdCDGdS. Guía para la atención clínica integral del paciente con malaria. In. Bogotá: Organización Panamericana de la Salud OPS/ OMS Convenio de Cooperación Técnica con el Ministerio de la Protección Social Nro. 256 de 2009 y Nro. 237 de 2010; 2010.
 27. Kokwaro G. Ongoing challenges in the management of malaria. *Malar J* 2009;8 Suppl 1:S2.
 28. Moon SU, Lee HW, Kim JY, Na BK, Cho SH, Lin K, et al. High frequency of genetic diversity of *Plasmodium vivax* field isolates in Myanmar. *Acta Trop* 2009;109(1):30-6.
 29. Mixson-Hayden T, Lucchi NW, Udhayakumar V. Evaluation of three PCR-based diagnostic assays for detecting mixed *Plasmodium* infection. *BMC Res Notes* 2010;3:88.
 30. Zakeri S, Kakar Q, Ghasemi F, Raeisi A, Butt W, Safi N, et al. Detection of mixed *Plasmodium falciparum* & *P. vivax* infections by nested-PCR in Pakistan, Iran & Afghanistan. *Indian J Med Res* 2010;132:31-5.
 31. Ebrahimzadeh A, Fouladi B, Fazaeli A. High rate of detection of mixed infections of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* in South-East of Iran, using

- nested PCR. *Parasitol Int* 2007;56(1):61-4.
32. Mueller I, Widmer S, Michel D, Maraga S, McNamara DT, Kiniboro B, et al. High sensitivity detection of *Plasmodium* species reveals positive correlations between infections of different species, shifts in age distribution and reduced local variation in Papua New Guinea. *Malar J* 2009;8:41.
 33. Brown AE, Kain KC, Pipithkul J, Webster HK. Demonstration by the polymerase chain reaction of mixed *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infections undetected by conventional microscopy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992;86(6):609-12.
 34. Snounou G, Pinheiro L, Goncalves A, Fonseca L, Dias F, Brown KN, et al. The importance of sensitive detection of malaria parasites in the human and insect hosts in epidemiological studies, as shown by the analysis of field samples from Guinea Bissau. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993;87(6):649-53.
 35. Myjak P, Nahorski W, Pieniazek NJ, Pietkiewicz H. Usefulness of PCR for diagnosis of imported malaria in Poland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21(3):215-8.
 36. Parajuli K, Hanchana S, Inwong M, Pukrittayakamee S, Ghimire P. Comparative evaluation of microscopy and polymerase chain reaction (PCR) for the diagnosis in suspected malaria patients of Nepal. *Nepal Med Coll J* 2009;11(1):23-7.
 37. Price RN, Tjitra E, Guerra CA, Yeung S, White NJ, Anstey NM. *Vivax* malaria: neglected and not benign. *Am J Trop Med Hyg* 2007;77(6 Suppl):79-87.
 38. Picot S. [Is *Plasmodium vivax* still a paradigm for uncomplicated malaria?]. *Med Mal Infect* 2006;36(8):406-13.
 39. Schuurkamp GJ, Spicer PE, Kereu RK, Bulungol PK. A mixed infection of *vivax* and *falciparum* malaria apparently resistant to 4-aminoquinoline: a case report. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989;83(5):607-8.
 40. Poespoprodjo JR, Fobia W, Kenangalem E, Lampah DA, Warikar N, Seal A, et al. Adverse pregnancy outcomes in an area where multidrug-resistant *plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections are endemic. *Clin Infect Dis* 2008;46(9):1374-81.
 41. Viana GMR, Barbosa DRL, Carmo ELd, Peres JMV, Nascimento JMS, Póvoa MM. Comparison of two DNA obtainment methods as alternative protocols for the detection of human *malária* parasites by nested PCR. *Revista Pan-Amazônica de Saúde* 2010;1:49-54

Cuadro 1. Departamentos y municipios seleccionados en el estudio

Departamento	Municipio (s)
Atlántida	San Francisco La Ceiba El Porvenir Juticalpa
Islas de la Bahía	Guanaja José Santos Guardiola Oak Ridge Roatán Utila
Colón	Santa Fé Iriona Santa Rosa de Aguan Sonaguera Trujillo
Olancho	San Esteban Catacamas Juticalpa Dulce Nombre de Cumí
Gracias a Dios	Ahuas Brus Laguna Juan Francisco B. Puerto Lempira Ramón Villeda Morales Wampusirpe