

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ
FACULTAD DE MEDICINA
TRABAJO FIN DE GRADO EN MEDICINA



Título del Trabajo de Fin de Grado:

ESTUDIO PILOTO DE EVALUACIÓN DE NUEVA TÉCNICA DE DETECCIÓN DE *PLASMODIUM* EN SALIVA

AUTOR: RIQUELME MATEO, GUILLERMO.

TUTORA: COLOM VALIENTE, M^a FRANCISCA

COTUTORA: HERNÁNDEZ PÉREZ, CARMEN

Departamento y Área: Producción Vegetal y Microbiología. Microbiología.

Curso académico: 2021 - 2022.

Convocatoria: 25 de mayo de 2022.

Índice

1. Resumen y palabras clave

2. *Abstract and key words*

3. Introducción

4. Hipótesis de trabajo

5. Objetivos

5.1 Objetivo primario

5.2 Objetivos secundarios

6. Material y Métodos

6.1 Diseño

6.2 Población a estudio

6.3 Variables

6.4 Selección de pacientes

6.5 Toma de muestras

6.6 Procesado de muestras

6.7 Diagnóstico de malaria: Detección de *Plasmodium*

6.8 Amplificación de secuencias diana mediante PCR y visualización en gel

7. Resultados

7.1 Datos de población

7.2 Resultados de laboratorio.

7.2.1 Carga parasitaria

7.2.2 Detección de *Plasmodium* en sangre

7.2.3 Detección de *Plasmodium* en saliva

8. Discusión

8.1 Limitaciones

9. Conclusiones

10. Referencias Bibliográficas

11. Anexo

1. Resumen y palabras clave

Introducción. La intervención mundial para el control de la malaria se basa en distribución masiva y mundial de medidas para prevenir, detectar y tratar la malaria. La detección de casos es un componente esencial para cualquier programa de eliminación de la malaria. Sin embargo, las formas de diagnóstico actuales plantean dificultades logísticas y económicas que evidencian la falta de formas de diagnóstico móviles, económicas, sin necesidad de personal experimentado y usando muestras no invasivas.

Metodología. Se tomaron muestras de sangre y saliva de 25 pacientes positivos para *Plasmodium* en microscopía óptica en el Hospital de Referencia del Condado de Turkana (LCRH), se probó el gen de la Citocromo C oxidasa III (Cox3) como diana para la detección de *Plasmodium* en sangre y saliva usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional y anidada.

Resultados. De los 25 pacientes positivos en microscopía óptica, la PCR detectó *Plasmodium* en un 100% de las muestras de sangre y en un 4% de muestras de saliva, siendo la PCR anidada la prueba más sensible.

Conclusión. El gen Cox3 es una buena diana para el diagnóstico de malaria en sangre. Por el contrario, para el diagnóstico mediante muestras de saliva la sensibilidad del método no es suficientemente alta. Es necesaria la investigación de cómo afectan las limitaciones apuntadas en este estudio, para rediseñar un método suficientemente sensible, para un diagnóstico preciso, de malaria aplicable a muestras no invasivas.

Palabras clave

Plasmodium, Malaria, Saliva, DNA mitocondrial, cox-3, PCR anidada, Diagnóstico.

2. Abstract and key words

Introduction. The global intervention for malaria control is based on massive and worldwide distribution of measures to prevent, detect and treat malaria. Case detection is an essential component of any malaria elimination program. However, the current forms of diagnosis pose logistical and economic difficulties that show the lack of mobile, economic forms of diagnosis, without the need for experienced personnel and using non-invasive samples.

Methodology. Blood and saliva samples were taken from 25 patients positive for Plasmodium spp by light microscopy at the Turkana County Referral Hospital (LCRH), the Cytochrome C oxidase III (Cox3) gene was tested as a target for the detection of Plasmodium spp. spp in blood and saliva using conventional and nested polymerase chain reaction (PCR).

Results. Of the 25 positive patients in light microscopy, PCR detected Plasmodium spp in 100% of blood samples and 4% of saliva samples, with nested PCR being the most sensitive test.

Conclusion. The Cox3 gene is a good target for diagnosing malaria in blood. On the other hand, for diagnosis using saliva samples, the sensitivity of the method is not high enough. It is necessary to investigate how the limitations pointed out in this study are excluded, in order to redesign a sufficiently sensitive method for an accurate diagnosis of malaria applicable to non-invasive samples.

Key words

Plasmodium, Malaria, Saliva, Mitochondrial DNA, Cox-3, Nested PCR, Diagnosis.

3. INTRODUCCIÓN

La **malaria** es una enfermedad parasitaria producida por las especies de *Plasmodium*, sus principales manifestaciones son fiebre, escalofríos, anemia, y en menor frecuencia mialgias, náuseas, dolor de cabeza, dolor abdominal, diarrea, vómito, siendo bastante inespecíficas. Sin embargo, es típico de la enfermedad el paroxismo palúdico, siguiendo un patrón regular y periódico de fiebre coincidente con la lisis de los eritrocitos infectados por esquizontes liberando merozoitos a la sangre. Al infectar eritrocitos producen a su vez un cambio en su estructura, produciendo una proteína p fEMP-1 que se une a la molécula de adherencia intracelular 1 (ICAM-1) provocando la agregación de los eritrocitos con las células endoteliales de los vasos sanguíneos produciendo trombos y evitando llegar al bazo y ser eliminadas. Por estas razones, no es difícil encontrar pacientes infectados de malaria con esplenomegalia, anemia, encefalopatía, coma, convulsiones, edema agudo de pulmón y trombos entre otros, y llevando incluso a la muerte al paciente [1,2].

Plasmodium spp es un protozoo parásito que produce la enfermedad de la malaria en humanos. Existen cinco especies que infectan al ser humano: *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. knowlesi*. [3]. El vector que lo transmite es la hembra del mosquito *Anopheles*, que al picar al humano deposita en la sangre esporozoítos infectantes.

Plasmodium presenta un **ciclo de vida** que comprende una etapa previa en el **mosquito**, conocida como ciclo esporogénico, en la que en el estómago del mosquito los gametos forman cigotos que se vuelven oocinetos móviles y alargados e invaden la pared del intestino medio uniéndose y formando ooquistes, que tras crecer y romperse liberan esporozoítos que llegan a las glándulas salivales del mosquito que lo inocula en la picadura. En el **ser humano**, este ciclo

La **incidencia** de malaria es muy elevada. En 2020 se estima que hubo 241 millones de casos, siendo el 95% de ellos en África, donde se dan 81,1 casos por cada 1000 habitantes. En cuanto a su mortalidad, se estima que hubo 627.000 muertes por malaria en todo el mundo, 15,3 muertes por cada 100.000 habitantes, siendo además la responsable de un 7,8% de entre las muertes globales por cualquier causa en niños menores de 5 años [5].

Sin embargo, la **tasa de mortalidad** de malaria ha seguido una tendencia gradual descendente desde el año 2000 hasta la actualidad y se estima que se han evitado 10,6 millones de muertes por malaria, y 1.700 millones de casos de malaria en todo el mundo desde el 2000 hasta la actualidad [5].

Este **progreso** se debe a la distribución masiva y mundial de medidas para prevenir, detectar y tratar la malaria. La detección de casos es un componente esencial para cualquier programa de eliminación de la malaria, con el fin de gestionar la distribución de los recursos preventivos como el uso de insecticidas y mosquiteras, el uso de medicamentos antimaláricos preventivos, pruebas de diagnóstico rápido y eficaz, y el desarrollo de nuevos tratamientos y vacunas, siendo la terapia combinada basada en artemisinina (TCA) la mejor estrategia de tratamiento [5].

En cuanto a las pruebas de **diagnóstico**, la visualización de frotis de sangre y gota gruesa teñidos con Giemsa (*thick and thin*) siguen siendo el patrón o *gold standard*, aunque tienen la limitación de la necesidad de tener observadores experimentados, además de unas instalaciones que dispongan de microscopía óptica en las áreas remotas donde existe más riesgo de contraer malaria. Este problema se solventa con los llamados tests rápidos (RDT), basados en la detección de la proteína en sangre, que se pueden realizar inmediatamente en clínica de campo mientras

el paciente está presente. La efectividad de las RDT se está viendo comprometida ya que hay nuevas mutaciones de *Plasmodium* que no expresan dicha proteína y que ocasionan un 5% de falsos negativos [5].

También se pueden utilizar técnicas moleculares de **diagnóstico** como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), presentando mayor eficacia, sin embargo, además de las desventajas logísticas como las que plantea la microscopía óptica de necesidad de personal experimentado y centros que dispongan de la tecnología necesaria, son pruebas de alto coste económico siendo inviable su uso para el diagnóstico masivo en las campañas de vigilancia epidemiológica. En cualquier caso, todas las técnicas comentadas necesitan de una muestra de sangre del paciente para llevar a cabo el diagnóstico. Siendo la toma de muestras de difícil manejo y presentando riesgo de infección de otras enfermedades endémicas transmisibles si el personal que la práctica no está especialmente entrenado para ello. Además de la incomodidad para el paciente que supone realizarle un pinchazo con una lanceta [6,7].

Esta situación llevó al grupo de investigación a plantear la posibilidad de hallar una herramienta de diagnóstico económica, de alta sensibilidad y especificidad, que no precise ni equipamiento sofisticado ni personal cualificado, y pueda realizarse en terreno sin necesidad de recoger muestras invasivas del paciente.

Aunque no se ha demostrado que durante la enfermedad el parásito se establezca fuera de los órganos descritos, su presencia masiva en torrente sanguíneo le permite llegar a cualquier tejido y, en este sentido, existe evidencia de la presencia de *Plasmodium* en saliva de pacientes de malaria [8,9,10].

4. Hipótesis de trabajo

Asumiendo que *Plasmodium spp.* está presente en la saliva de los pacientes de malaria, se puede diseñar un método de alta sensibilidad, basado en amplificación de DNA por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permita el diagnóstico de la enfermedad utilizando una muestra no invasiva, la saliva.

5. Objetivos

5.1 Objetivo primario

Validar el uso de la secuencia del gen mitocondrial Citocromo C oxidasa III (Cox3), en la detección de *Plasmodium* en sangre y saliva humana.

5.2 Objetivos secundarios

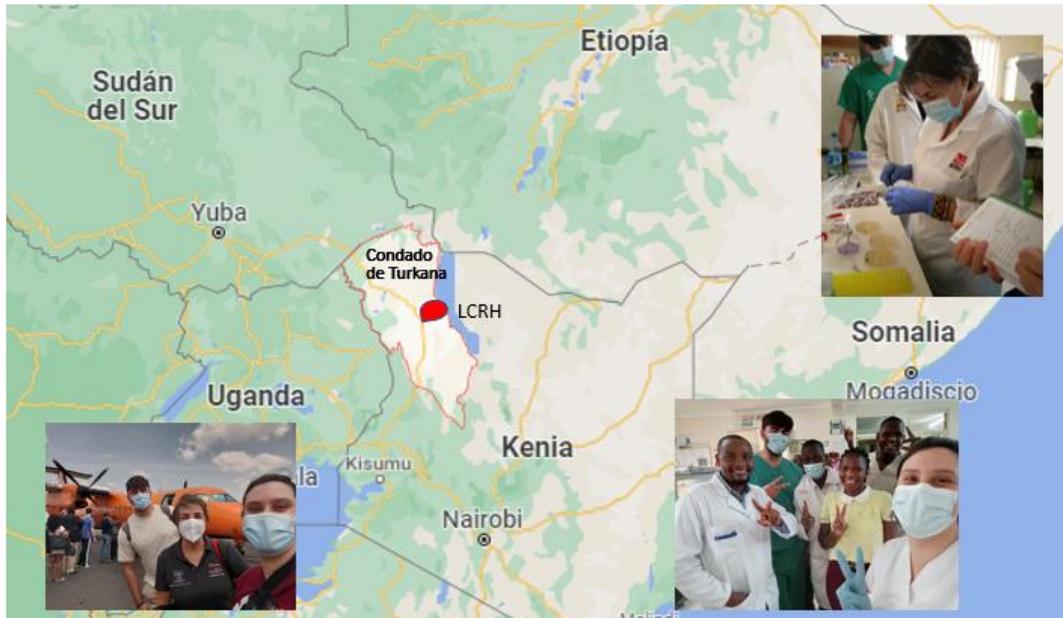
Correlacionar la detección de DNA de *Plasmodium* con el nivel de parasitemia detectado en el análisis con microscopía óptica.

Identificar el volumen de saliva necesario para detectar DNA de *Plasmodium* en pacientes infectados.

6. Material y métodos

6.1 Diseño

Se planteó un **estudio piloto experimental**, prospectivo, unicéntrico, no aleatorizado, que se llevó a cabo en el Hospital de Referencia del Condado de Lodwar (LRCH), Condado de Turkana (Kenia) (figura 2) y en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Miguel Hernández de Elche, San Juan de Alicante (España).



Localización de Turkana y LCRH y fotografías del personal. Fotografías tomadas por autor, Judith Jordá y Gisela Pretel (figura 2)

6.2 Población a estudio

La **población** objeto del estudio fueron los pacientes con diagnóstico de malaria por la técnica de gota gruesa y extensión, que acudieron al Hospital de Referencia del Condado de Turkana (LCRH) entre el 14 y el 24 de febrero de 2022.

En concreto aquellos que cumplían los siguientes **criterios de inclusión**: ser mayor de 18 años o ser menor acompañado por tutor responsable, que firmen el Consentimiento Informado ([ver hoja de Consentimiento Informado, anexo 1](#)), sean positivos en la prueba de diagnóstico de malaria realizada con microscopía óptica en el Hospital de Referencia del Condado de Turkana (LCRH). Además de ser capaz de aportar una prueba de sangre y otra de saliva. Se **excluyó** a los pacientes que fueron negativos a la prueba de microscopía óptica, a los que no firmaron el consentimiento informado por ser menores de edad o por otra situación que lo impidió o por su deseo de no participar en el estudio.

6.3 Variables

Se recopilaron **datos** de los pacientes de tipo **demográfico**: edad, sexo, zona de residencia y desde cuándo reside, localización de la casa (urbana, rural, apartado), acceso a agua potable, tipo de fuente de agua (río, lago, otros), uso de repelente de mosquitos, uso de red antimosquitos en la cama, profesión/actividad, viajes fuera del condado de Turkana; otros **datos clínicos** sobre su enfermedad: fiebre, número de días de fiebre, dolor de cabeza, diarrea, distrés respiratorio, vómitos, anorexia, pérdida de apetito, dolor abdominal, convulsiones, coma, pérdida de peso, sangrado anormal, tratamiento de malaria recibido en los últimos meses, diagnósticos previos, familiares con diagnóstico reciente de malaria; y otros datos sobre el diagnóstico: fecha de diagnóstico, test diagnóstico utilizado, nivel de parasitemia en sangre, resultado del diagnóstico. [\(ver hoja de datos del paciente, anexo 2\)](#)

6.4 Selección de pacientes

En primer lugar, para seleccionar a los pacientes e incluirlos en el estudio, se utilizó la herramienta de diagnóstico por microscopía óptica. En el Hospital de Referencia del Condado de Turkana (LCRH) se realiza diagnóstico mediante microscopía óptica [\(figura 3\)](#) de esta enfermedad las 24 horas del día. Se realizó en los pacientes que acudieron con síntomas durante los días entre el 14 y el 24 de febrero ambos inclusive.

A los pacientes positivos en microscopía óptica se les informó sobre el estudio y se les solicitó la lectura y firma del Consentimiento Informado y se les interrogó para completar la hoja de datos del paciente. Para la adecuada comunicación se recurrió a intérpretes locales de turkana - inglés y/o suajili - inglés. Después, se tomó una nueva muestra de sangre y muestra de saliva.

6.5 Toma de muestras

Para la obtención de muestras de **sangre**, se realizó mediante punción de la yema del tercer dedo de la mano izquierda mediante una lanceta estéril, obteniendo unas gotas de sangre recogidas con un tubo capilar (figura 3). Con estas muestras se impregnaron discos de papel de filtro estériles de 6 mm de diámetro. Estos son capaces de absorber entre 5 y 10 μL de sangre. Los discos impregnados se guardaron en seco en microtubos estériles de 1,5 mL a -20°C .

Para la obtención de muestras de **saliva**, se entregó al paciente un bote estéril de recogida de muestras en el que depositaba toda la saliva que fuera capaz de segregar en ese momento (figura 3). La muestra se dividió en alícuotas en microtubos de 1,5 mL. La mitad de ellos se congelaron a -20°C y la otra mitad se trabajaron directamente.



Recogida de muestras en LCRH. Fotografías tomadas por autor, Judith Jordá y Gisela Pretel (figura 3).

6.6 Procesado de muestras

En el procesado de las muestras, nos basamos en protocolo descrito en *Putaporntip C. et al* [11].

Las de sangre impregnadas en papel y las de saliva, se refrigeraron a -20 °C hasta su procesado en el laboratorio del LCRH para la extracción de DNA. Las muestras de saliva de cada paciente se dividieron en alícuotas en microtubos de 1,5 mL. La mitad de ellos se congelaron a -20°C y la otra mitad pasaron a extracción de DNA.

Previamente a la extracción de DNA de las muestras de **sangre**, se seleccionaron 1 o 2 papeles de filtro impregnados (entre 5 y 10 µL de sangre). Estos se lavaron con 100 µL de agua destilada estéril, que se dejó actuar 5-10 minutos a temperatura ambiente y después se sometió a 10 segundos de agitación para el lisado de los hematíes. Tras esto, se retiró el papel limpio de la muestra y el resto se centrifugó a 8.000 rpm durante 3 minutos. El sobrenadante se aspiró quedando un sedimento que posteriormente utilizaremos para la extracción de DNA, mientras se almacenó a -20°C.

Previamente a la extracción de DNA de las muestras de **saliva**, uno de los microtubos de 1,5 ml, se descongeló y se centrifugó a 8.000 rpm durante 3 minutos. El sobrenadante se aspiró quedando un sedimento que posteriormente utilizaremos para la extracción de DNA, mientras se almacenó a -20°C.

6.6 Extracción de DNA

Para la extracción de ácidos nucleicos trabajamos con el precipitado celular obtenido de las muestras mantenidas a -20°C

Se utilizaron dos métodos comerciales de **extracción de DNA**: Un económico y rápido, basado en lisis enzimática (*Instagene matrix*® de BIORAD®) y otro más complejo y lento pero que ofrece mayor rendimiento en la extracción y que combina cizallamiento mecánico con lisis enzimática (*MiniKit DNAEasy*® de QIAGEN®). En ambos casos se extrajo el ADN usando el protocolo de lisados celulares crudos siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA obtenido se conservó entre -20°C y -40°C dependiendo de la disponibilidad de congeladores en el laboratorio del LCHR.

6.7 Diagnóstico de malaria: Detección de *Plasmodium*.

Test rápido basado en microscopía óptica: tras fijar las muestras y teñirlas, se visualizó al microscopio óptico y se realizó el recuento de parásitos por parte de los profesionales del laboratorio del LCHR (figura 3).

Tras fijar las muestras y teñirlas con Giemsa se analizaron al microscopio, visualizando el campo con objetivo 1000X, lo que facilita una amplificación de 1000 aumentos. Se visualizó el parásito como formas anilladas intraeritrocitarias características. Para contabilizar la carga parasitaria se utilizó el método de recuento parasitario estableciendo una relación entre el número de parásitos presentes en 200 leucocitos y el número de leucocitos por mm³ mediante la fórmula (Figura 4).

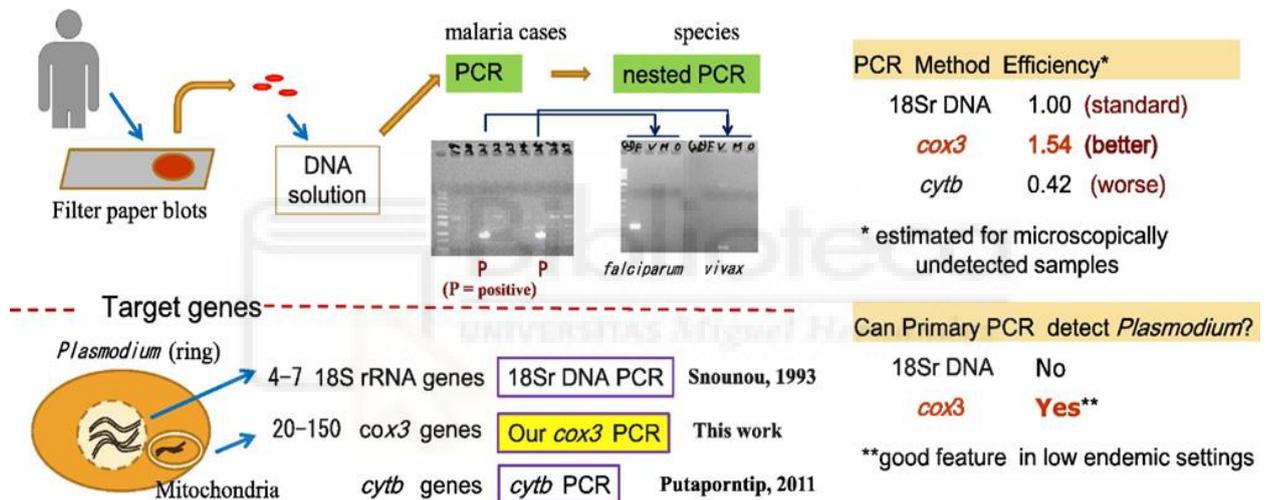
$$\# \text{ de parásitos}/\mu\text{L de sangre} = \frac{\# \text{ de parásitos} \times 8000 \text{ leucocitos}/\mu\text{L de sangre}}{200 \text{ leucocitos}}$$

Fórmula de recuento de *Plasmodium spp.* al microscopio (Figura 4) [12].

Siguiendo esa fórmula, anotamos la carga parasitaria de cada uno de los sujetos incluidos en el estudio.

6.8 Amplificación de secuencias diana mediante PCR y visualización en gel

El segundo método usado fue la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las muestras de sangre y saliva. Para la realización de este método nos hemos basado en la técnica descrita por Isozumi R. et al, (2015) [13] que utilizan como diana el gen mitocondrial *Cox3* de *Plasmodium* que codifica para la citocromo oxidasa III [9]. Se trata de un protocolo de ronda única para la detección genérica de *Plasmodium*, seguido de una reacción anidada para la identificación de *P. falciparum* en las muestras positivas (figura 5).



Protocolo de PCR anidada explicado en Isozumi R. et al, (2015) (Figura 5) [11].

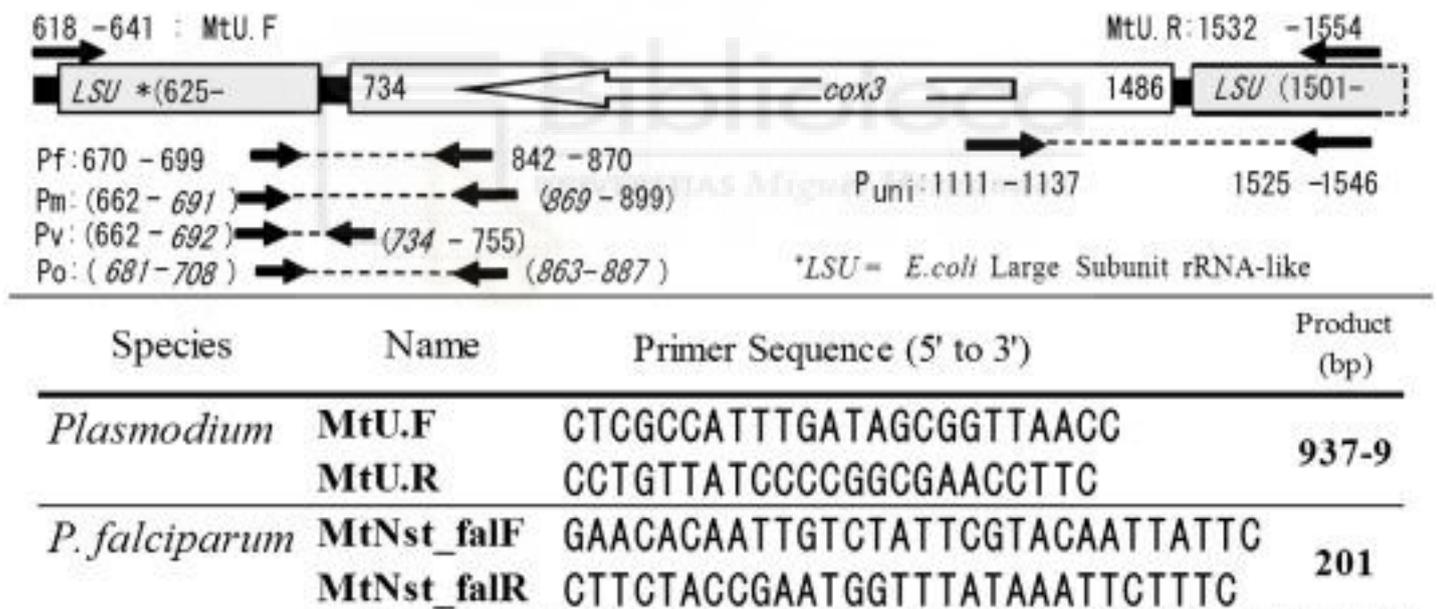
Se modificaron ligeramente estos protocolos, con intención de mejorar su sensibilidad. En concreto se añadió a cada ciclo de amplificación un minuto de extensión después de la hibridación del DNA, y se eliminó la dilución del primer producto de PCR para realizar la PCR anidada.

Todas las muestras de sangre y saliva se sometieron a la primera PCR genérica y se aplicó la segunda PCR (anidada) para las pruebas negativas con el fin de aumentar la sensibilidad, ya que en Turkana *P. falciparum* es ampliamente mayoritario.

En la **PCR genérica** se utilizó 5 µL de cada muestra de DNA extraído y 0,5 µL de la mezcla de cebadores MtUR/MtUF. Las secuencias de los cebadores y el protocolo de amplificación se especifican en la (Tabla 1) (figura 6).

Protocolo mezcla PCR	
Taq polimerasa	0,1 µL
dNTPs	0,2 µL
ClMg2	1 µL
“Reaction buffer”	2,5 µL
H2O ultrapura	16 µL

Protocolo de mezcla para amplificación PCR (Tabla 1)



Secuencias de cebadores PCR extraída de Isozumi R. et al, (2015) (figura 6) [13]

El proceso de termociclado siguió el siguiente protocolo:

1 minuto a 96°C de desnaturalización

40 ciclos de amplificación y ensamblaje:

10 segundos a 96°C

30 segundos a 63°C

1 minuto a 72°C (elongación añadida)

5 minutos a 72°C de extensión

Para la visualización de resultados se realizó la **electroforesis con gel de agarosa** al 1%, esperando una banda sobre los 900 bp (pares de bases). Los geles se visualizaron y fotografiaron mediante un sistema de imagen Gel Doc XR (BIORAD®).

Para las **muestras negativas en la primera PCR**, se hizo una segunda PCR con el producto de la primera. Se trata de una PCR anidada en la que el producto ya amplificado en una PCR convencional se somete a otra PCR con cebadores que hibridan dentro del primer fragmento, con el fin de aumentar la sensibilidad.

En la **PCR anidada**, se utilizaron sin diluir, 2µL del producto de la primera PCR de las muestras negativas y 0,5 µL de la mezcla de cebadores MtNstfaF/MtNstfaR que detectan *P falciparum*. Las secuencias de los cebadores y el protocolo de amplificación expuestas en (tabla 1) (figura 6).

El proceso de termociclado siguió el siguiente protocolo:

1 minuto a 96°C de desnaturalización

20 ciclos de amplificación y ensamblaje:

15 segundos a 96°C

30 segundos a 56°C

1 minuto a 72°C (elongación añadida)

5 minutos a 72°C de extensión

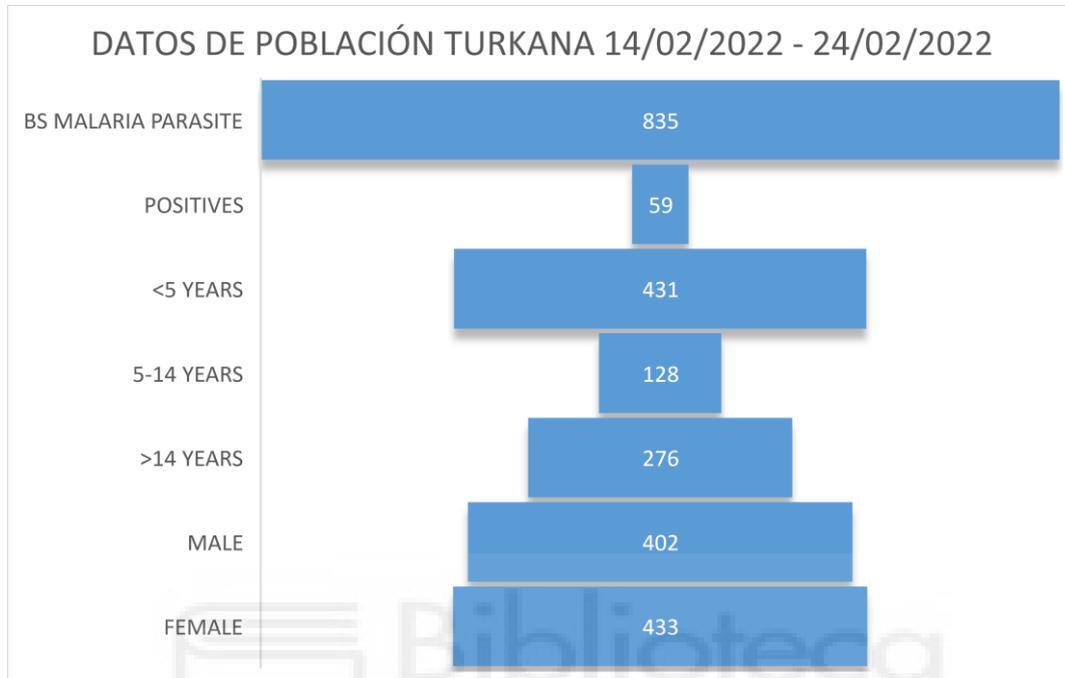
Tras esto se realizó de nuevo la **electroforesis con gel** de agarosa al 2%, esperando una banda sobre los 200 bp (pares de bases). Los gels realizados se visualizaron y fotografiaron mediante un sistema de imagen Gel Doc XR (BIORAD®).

7. Resultados

7.1 Datos de población

En el periodo de tiempo del estudio, entre el 14 y el 24 de febrero de 2022, el laboratorio del Hospital de Lodwar realizó 835 frotis de sangre con visualización al microscopio. La mayoría de los pacientes eran menores de 5 años (431), y el resto se distribuyen entre los que tenían entre

5 y 14 años (128), y mayores de 14 (276), siendo el rango de edad entre 10 meses y 57 años (figura 7).



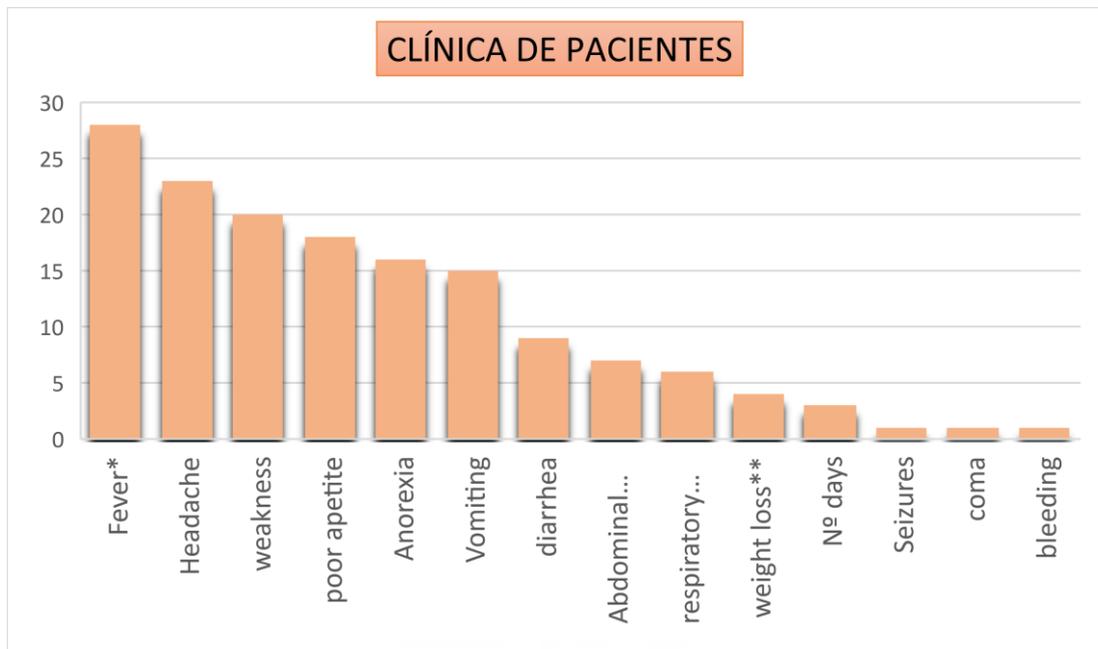
Datos de pacientes a los que se realizó diagnóstico por microscopía óptica (figura 7).

El test de visualización microscópica encontró en total 59 positivos (7%).

De estos 59 pacientes positivos, 25 cumplieron los criterios de inclusión y se recogieron muestras de sangre y saliva para nuestro estudio. Además, se añadieron muestras de sangre y saliva de 4 pacientes más como controles. Por otra parte, el laboratorio del Hospital De Referencia del Condado de Lodwar (LCRH) nos facilitó 5 muestras de sangre positivas de malaria tomadas previamente a nuestra llegada que servían de controles positivos para la prueba de modificación del protocolo. Por lo tanto, dispusimos de 30 muestras de sangre, 25 muestras de saliva, 4 muestras de control negativo de sangre y 2 muestras de saliva de pacientes negativos en sangre. En total de 61 muestras para nuestro estudio.

Los pacientes estudiados son mayoritariamente de Turkana central y sus alrededores. El rango de **edades** fue desde 10 meses a 57 años, 7 de ellos eran menores de 5 años, 3 entre 5 y 10 años, 6 entre los 10 y los 20 años, y el resto entre 20 y 57 años. Todos afirmaron tener disponibilidad de **agua** a sus alrededores, siendo 29 los que usaban agua proveniente del río y estanques, y 1 del lago Turkana. En cuanto a su **localización**, 7 de los pacientes vivían en zona urbana en la ciudad de Lodwar, 15 vivían en aldeas y 8 en zonas separadas de aldeas y ciudades. La **profesión** más frecuente fue la de pastor y la mayoría (20, 67%) no había salido del condado de Turkana. En cuanto al uso de **medidas preventivas**, 6 (20%) usaban repelentes de mosquito de manera ocasional y solo 2 (6,7%) frecuentemente; 11 (37%) de ellos usaban red antimosquitos en su cama.

En cuanto a las manifestaciones clínicas, todos los pacientes presentaban **fiebre** al momento de la toma de pruebas, de entre 2 y 5 días de evolución a excepción de 3 de ellos con más de 8 días de evolución. Aproximadamente el 50% tenía **vómitos, anorexia y/o pérdida de apetito**; 9 (30%) tenían **diarrea**, a 7 (23%) les **dolía la cabeza**, y 6 (20%) presentaron **disnea**. Otros síntomas aparecieron cada uno en uno de los pacientes, (convulsiones, coma, y astenia). Además, 2 de ellos tenían diagnosticada anemia que precisaba tratamiento con transfusiones de sangre (figura 8).



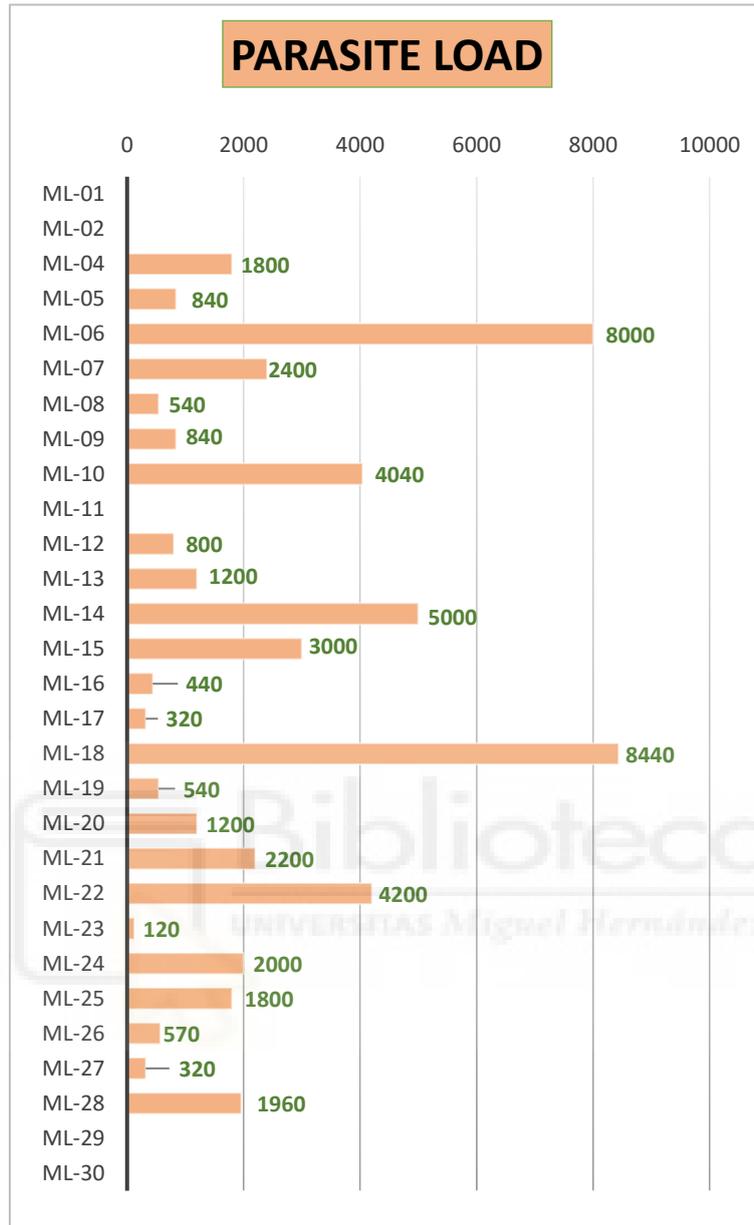
Manifestaciones clínicas de pacientes incluidos en el estudio (figura 8).



7.2 Resultados de laboratorio

7.2.1 Carga parasitaria

Las cargas parasitarias detectadas en las muestras positivas por visualización al microscopio con gota gruesa y frotis fueron muy variadas, con un rango entre 120 y 8400 p/μL (parásitos por microlitro), siendo ML-01, ML-02, ML-29, ML-30 controles negativos y en ML-11 no se recogió el dato. (figura 9)



Carga parasitaria en p/ µL por paciente (figura 9)

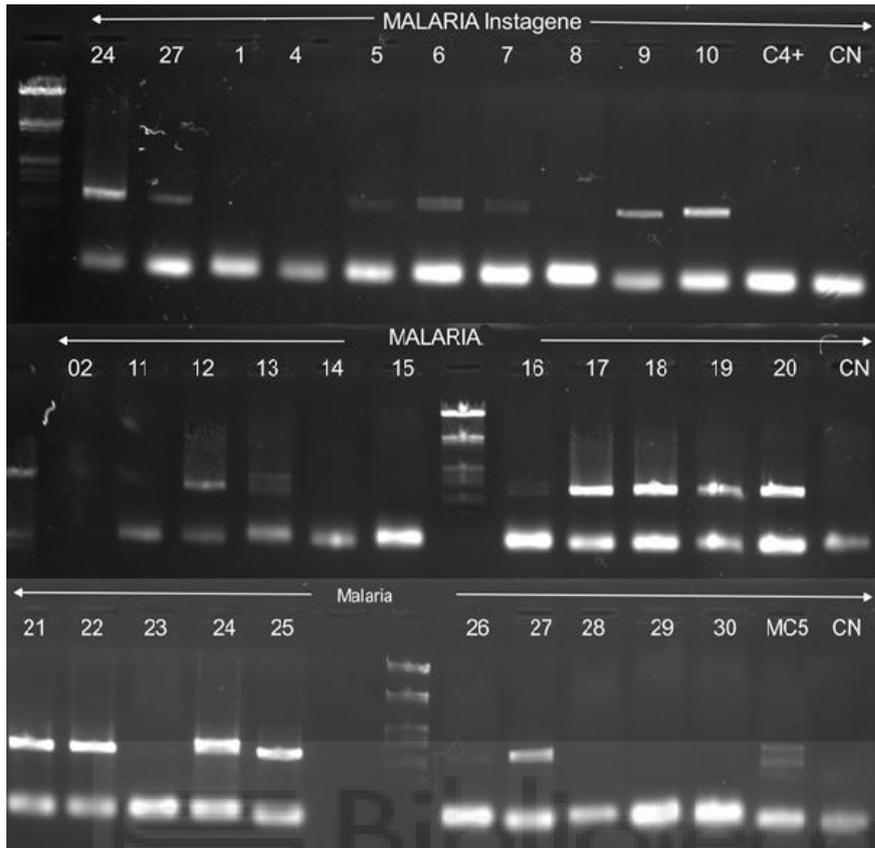
7.2.2 Detección de *Plasmodium spp* en sangre

De las 25 muestras de sangre positivas al microscopio óptico, todas han resultado positivas en la amplificación por PCR, aunque en un 16% (4) de los casos no se detectó *Plasmodium* en la primera PCR y fue necesario realizar la amplificación por PCR anidada para detectarlo. Por otra parte, también encontramos diferente efectividad en la PCR realizada con el DNA extraído con los dos sistemas de extracción de ácidos nucleicos. De hecho, de las 25 muestras de sangre, 19

de ellas resultaron positivas en la primera PCR tanto con el DNA extraído con *Instagene Matrix*[®] como con *MiniKit DNAEasy*[®] (figura 10). De las seis restantes, dos fueron positivas en la primera PCR con el DNA extraído con *MiniKit DNAEasy*[®], y de las 4 restantes solo se pudo detectar *Plasmodium* con DNA extraído con *MiniKit DNAEasy*[®] y en la PCR anidada (figura 11). Por lo tanto, tenemos 25 positivos en PCR de sangre con respecto a los 25 positivos en microscopía óptica, 100% (Tabla 2).

	EXTRACCIÓN INSTAGENE		EXTRACCIÓN QIAGEN		TOTAL
	PCR GENÉRICA	PCR ANIDADA	PCR GENÉRICA	PCR ANIDADA	
SANGRE	19	X	4	2	25
SALIVA	0	0	0	1	1

Casos positivos encontrados divididos según método de extracción y tipo de PCR. (Tabla 2)



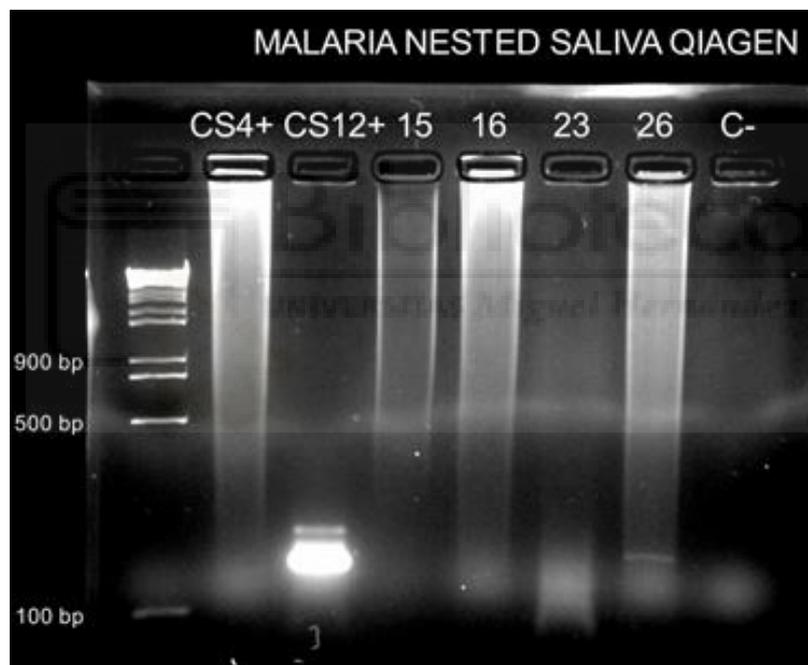
Gel de electroforesis con productos de PCR genérica mostrando positivos en sangre (bandas del centro) extraídos con *Instagene matrix*[®] (figura 10).



Gel de electroforesis con productos de PCR anidada mostrando positivos que dieron previamente negativos (figura 11).

7.2.3 Detección de *Plasmodium spp* en saliva.

El volumen de muestra de saliva recogido por individuo fue muy variable, con una media de 1,8 mL/individuo y un rango entre 0,2 y 6 mL. Se realizó amplificación mediante PCR convencional de todas ellas siendo negativas todas las muestras. Sin embargo, una de ellas si amplificó mediante PCR anidada y tras extracción de DNA por *MiniKit DNAEasy® Qiagen* (Tabla 2) (figura 12).



Gel de electroforesis con productos de PCR anidada mostrando positivos en el control positivo en sangre y a la misma altura en la muestra ML-26 (figura 12).

8. Discusión

Este estudio piloto encaminado a valorar la posibilidad de el desarrollo de una nueva técnica diagnóstica se ha llevado a cabo en áreas afectadas por brotes de malaria, concretamente en Condado de Turkana (Kenia). El elevado número de muestras analizadas en 10 días, 835, es una evidencia de la importancia de la enfermedad en la zona. De estas 835 personas, un 51,4% eran niños. El periodo en el que se realizó el trabajo no era época de lluvias que es la temporada de mayor incidencia de la enfermedad y, sin embargo, un 7% fue positivo. A pesar de ello, nos llama la atención el moderado o bajo uso que la población hace de las medidas preventivas más sencillas, como los repelentes de insectos y la protección con mosquiteras para la noche que solo usa un 30% de pacientes. La mayoría de los positivos, un 60%, vivía en aldeas y en el campo, lo que nos podría indicar que los mosquitos se encuentran en mayor cantidad en las zonas apartadas de la ciudad o que la población que usa repelentes de mosquito y mosquiteras viven en la ciudad, sin embargo, no está relacionado, ya que de los pacientes que vivían en la ciudad solo 3 usaban medidas preventivas. Estos detalles añaden evidencia a la necesidad de desarrollar una prueba diagnóstica portátil, efectiva, fácil de usar, económica y cómoda para el paciente. Los resultados son bastante claros, si queremos diagnosticar malaria mediante sangre, tenemos una buena diana para diagnosticarlo, el fragmento de DNA mitocondrial *Citocromo C oxidasa III (Cox3)*, hemos diagnosticado un 100% de los positivos previos al microscopio y algunos con cargas parasitarias muy bajas, de hasta 120 p/μL .

Al ser genoma mitocondrial, este tiene mayor número de copias de ADNr 18S, siendo una diana en teoría mejor para el diagnóstico de malaria en saliva. Sin embargo, la detección de *Plasmodium* en saliva no ha sido óptima, solo 1 caso de 25. Este el dato más importante que se

extrae de los resultados de este estudio y es la dificultad para detectar *Plasmodium* en saliva con la herramienta ensayada. No obstante, hay que tener en cuenta una serie de limitaciones que han podido influir en la baja tasa de positividad de la PCR con estas muestras.

El único trabajo que encontramos en el que se describe la presencia de DNA del parásito en saliva, y en el cual nos basamos para este estudio, procesa muestras de un volumen no inferior a 5 mL. En nuestro caso, la mayoría de los pacientes fueron incapaces de ofrecer ese volumen de muestra y las causas son varias y deben ser consideradas. Entre los pacientes de malaria, la población de mayor importancia son los menores de 5 años. Para estas edades, 5 mL de saliva es un volumen grande, difícil de conseguir especialmente en bebés de menos de 1 año. Por otra parte, la población de etnia Turkana que es la que estudiamos mayoritariamente, suele presentar desnutrición y deshidratación, ya que el agua es un bien escaso en el condado de Turkana. Esto no facilita la obtención de muestras abundantes, aunque es cierto que pueden tener una mayor concentración parasitaria en menor volumen de saliva.

Por último, no se pueden obviar las dificultades a la hora de procesar las muestras en las instalaciones del hospital de Lodwar. Por una parte, la conservación de las muestras refrigeradas o congeladas no estaba garantizada para las 24 horas del día, encontrando apagones repentinos en las instalaciones, con temperaturas externas de más de 30°C, lo que puede haber degradado el DNA y otros componentes de las muestras. Tampoco pudimos garantizar la cadena de frío para el transporte del DNA extraído, desde Turkana a Alicante, por lo que es prematuro decir que el método no es eficaz. Si que parece claro que en saliva la concentración de parásitos debe

ser muy baja respecto a la sangre, ya que todas las muestras estuvieron sometidas a las mismas condiciones, pero en las primeras pudimos detectar el DNA de *Plasmodium* en todos los casos.

Este estudio es la primera etapa de un trabajo que debe continuar, con nuevas o las mismas dianas de detección de *Plasmodium* utilizando muestras no invasivas de los pacientes como la saliva.

9. Conclusión

La amplificación del gen mitocondrial de la Citocromo C oxidasa III (Cox3), mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una buena diana para el diagnóstico de *Plasmodium* en muestras de sangre. Sin embargo, su utilización para diagnóstico con muestras no invasivas como la saliva presenta serias limitaciones.

Es necesaria la investigación de cómo afectan las limitaciones apuntadas en este estudio, para rediseñar un método suficientemente sensible, para un diagnóstico preciso, de malaria aplicable a muestras no invasivas.

10. Referencias bibliográficas

- 1- Engleberg, N. C. DiRita, V. J. y Dermody, T. S. (2013). Schaechter. Mecanismos de las enfermedades microbianas (5a. ed.). L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Wolters Kluwer Health. 2013. 844 p.
Disponible en: <https://elibro.net/es/ereader/bibliotecaumh/125913?page=526>. Consultado en: 13 May 2022. 52, 506-511. Disponible en: <https://elibro.net/es/ereader/bibliotecaumh/125913>
- 2- Internal Medicine [Internet] München, Germany. Jarrah Ali Al-Tubaikh 2010. 2, 440-441. Disponible en: <https://link-springer-com.publicaciones.umh.es/content/pdf/10.1007/978-3-642-03709-2.pdf>

- 3- Krohn, K., Stauffer, W. (2020). Malaria. In: Annamalai, A. (eds) Refugee Health Care. Springer, Cham. 8, 119-126. Disponible en: <https://link-springer-com.publicaciones.umh.es/content/pdf/10.1007/978-3-030-47668-7.pdf>
- 4- Centers for Disease Control and Prevention. USA. U.S. Department of Health & Human Services. [citado el 13/05/2022] Disponible en: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>
- 5- World Health Organization. World Malaria Report 2021. Geneva. 2021. [citado el 13/05/2022] Disponible en: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/malaria/world-malaria-reports/world-malaria-report-2021-global-briefing-kit-spa.pdf?sfvrsn=8e5e915_23&download=true
- 6- Singh, N., Shukla, M. M., Shukla, M. K., Mehra, R. K., Sharma, S., Bharti, P. K., Singh, M. P., Singh, A., & Gunasekar, A. (2010). Field and laboratory comparative evaluation of rapid malaria diagnostic tests versus traditional and molecular techniques in India. *Malaria journal*, 9, 191. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-191https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2905433/>
- 7- Wongsrichanalai C, Barcus MJ, Muth S, Sutamihardja A, Wernsdorfer WH. A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). *Am J Trop Med Hyg.* 2007 Dec;77(6 Suppl):119-27. PMID: 18165483. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18165483/>
- 8- Kaufman E, Lamster IB. Las aplicaciones diagnósticas de la saliva: una revisión. *Reseñas críticas en biología oral y medicina.* 2002;13(2):197-212. Disponible en: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/154411130201300209>
- 9- Mharakurwa, S., Simoloka, C., Thuma, P. E., Shiff, C. J., & Sullivan, D. J. (2006). PCR detection of *Plasmodium falciparum* in human urine and saliva samples. *Malaria journal*, 5, 103. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1654175/>
- 10- Lloyd YM, Esemu LF, Antallan J, Thomas B, Tassi Yunga S, Obase B, Christine N, Leke RGF, Culleton R, Mfuh KO, Nerurkar VR, Taylor DW. PCR-based detection of *Plasmodium falciparum* in saliva using

mitochondrial *cox3* and *varATS* primers. Trop Med Health. 2018 Jun 22;46:22. Disponible en:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29977122/>

- 11- Putaporntip C, Buppan P, Jongwutiwes S. Improved performance with saliva and urine as alternative DNA sources for malaria diagnosis by mitochondrial DNA-based PCR assays. Clin Microbiol Infect. 2011 Oct;17(10):1484-91. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03507.x. Epub 2011 May 20. Erratum in: Clin Microbiol Infect. 2012 Jul;18(7):720. PMID: 21595789. Disponible en:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21595789/>

- 12- Manual para el diagnóstico de malaria no complicada en puestos de diagnóstico y tratamiento.

[Internet] Instituto Nacional de Salud Ministerio de Salud y Protección Social. Milenio Editores Bogotá D.C., 2015 Disponible en:

<https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/manual-diagnostico-malaria-no-complicada.pdf>

- 13- Rie Isozumi, Mayumi Fukui, Akira Kaneko, Chim W. Chan, Fumihiko Kawamoto, Masatsugu Kimura.

Improved detection of malaria cases in island settings of Vanuatu and Kenya by PCR that targets the Plasmodium mitochondrial cytochrome c oxidase III (*cox3*) gene. Parasitology International. Volume 64, 3. Junio 2015. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383576914001275?via%3Dihub>

Agradecimientos a mis tutoras M^a Francisca Colom y Carmen Hernández, también a Consuelo Ferrer, Noelia Gómez y Javi Puentes, personal de laboratorio de Microbiología de la UMH, a John, personal de laboratorio del Hospital de Referencia del Condado de Lodwar (LRCH), al Proyecto de Cooperación Sanitaria Internacional de Cirugía en Turkana. Gracias a vicerrectorado de la UMH y por mi inclusión en la beca de Prácticas en Actividades de Fomento de la Investigación.

11. Anexo

11.1.1 Consentimiento Informado

RESEARCH PROJECT NON-INVASIVE TEST FOR MALARIA IN TURKANA

Universidad Miguel Hernández - Hospital Clínico San Carlos - Lodwar County Referral Hospital

Cirugía en Turkana - MIT-FAU

INFORMATION FOR PATIENTS

Procedure identification, description and objectives.

The medical team of Lodwar Hospital together with experts from the University Miguel Hernández, Hospital Clínico San Carlos, the surgical team of Cirugía en Turkana, FAU and MIT (through the Catalyst Europe Program) are conducting a research study on malaria in Turkana aiming to develop a non-invasive diagnostic test for Malaria in saliva. Malaria is a life-threatening disease caused by parasites that are transmitted to people through the bites of infected mosquitoes. Malaria is preventable and curable if it is detected and treated early. Nowadays, it is necessary to extract blood to detect if a person has malaria. But recent studies suggest that malaria parasites can also be detected in the saliva of infected patients. We are working towards a technology to detect malaria in saliva to eventually avoid the extraction of blood. To that end, saliva samples should be taken and compared to blood samples. Apart from the samples, it would also be necessary to collect personal and clinical data. The analysis of these samples will provide necessary insights for the development of a saliva-based detection method of malaria.

Benefits expected to be achieved. You will not receive any financial compensation but may be treated and cared to prevent recurrence. In addition, if the research is successful, your contribution will help other people in Turkana and malaria-endemic areas to avoid this disease or get adequate treatment for it.

Reasonable alternatives. The decision to allow the analysis of your data is voluntary and can be denied. You can revoke the consent at any time, without having to give any explanation.

Foreseeable consequences of its realization and the non-realization. If you decide freely and voluntarily to allow the evaluation of your data, you will be entitled to be informed of the results of the investigation.

Frequent and uncommon risks. Assessing your clinical, demographic and background data will never pose an additional risk to my health.

Risks and consequences depending on the personal clinical situation of the patient and his personal or professional circumstances. A saliva sample will be needed from each patient. No extra blood will be necessary. Pain will be avoided at all time.

Protection of personal data and confidentiality. Information about your personal data and health will be incorporated and treated in a computerized database in compliance with the guarantees established by the law on the protection of personal data and the health legislation of Spain and the European Union (law Organic 3/2018, of 5 December). The transfer to other research centers of the information contained in the databases and concerning my state of health will be made by means of an identification code that prevents that I can be identified directly or indirectly. If I decide to revoke the consent I now make, my data will not be used in any investigation after the date I have withdrawn my consent, although the data obtained up to that time will continue to be part of the investigation.

Project carried out by the *Miguel Hernández University*, in collaboration with the *Turkana County Reference Hospital* in Lodwar and by the humanitarian medicine team *Surgery in Turkana*, under the direction of Dr. María Francisca Colom Valiente, Professor of Microbiology and director of the research group in Applied Biomedicine of the Alicante Institute of Health and Biomedical Research (UMH-ISABIAL). Responsible of Turkana Team: J. Loree (Turkana Neglected Tropical Diseases); Responsible of *Cirugía en Turkana* Surgery Team: Carmen Hernández (Professor at Universidad Complutense de Madrid).

RESEARCH PROJECT NON-INVASIVE TEST FOR MALARIA IN TURKANA

Universidad Miguel Hernández - Hospital Clínico San Carlos - Lodwar County Referral Hospital

Cirugía en Turkana - MIT-FAU

INFORMED CONSENT

for the participation in the research project Non-invasive test for Malaria in
Turkana

I,..... ayear-old
patient with address at.....
and identification card number (if any).....

DECLARE:

That the doctor..... , has explained to me about:

1.- Procedure identification, description and objectives.

The medical team of Lodwar Hospital together with experts from the University Miguel Hernández, Hospital Clinico San Carlos, MIT-FAU and the surgical team of *Cirugía en Turkana*, are conducting a research study on malaria in Turkana. Malaria is a life-threatening disease caused by parasites that are transmitted to people through the bites of infected mosquitoes. Malaria is preventable and curable if it is detected and treated early. Nowadays, it is necessary to extract blood to detect if a person has malaria. But recent studies suggest that malaria parasites can also be detected in the saliva of infected patients. We are working towards a technology to detect malaria in saliva to eventually avoid the extraction of blood. To that end, saliva samples should be taken and compared to blood samples. Apart from the samples, it would also be necessary to collect personal and clinical data. The analysis of these samples will provide necessary insights for the development of a saliva-based detection method of malaria.

2.- Benefits expected to be achieved

I will not receive any financial compensation but may be treated and cared to prevent recurrence. Also, if the research is successful, my contribution will help other Turkana people to avoid this disease or get adequate treatment for it.

3.- Reasonable alternatives

The decision to allow the analysis of my data is totally voluntary, can deny me and even can revoke my consent at any time, without having to give any explanation.

4.-foreseeable consequences of its realization and the non-realization

If I decide freely and voluntarily allow the evaluation of my data, I shall be entitled to be informed of the results of the investigation.

5.- Frequent and uncommon risks

Assessing my clinical, demographic and background data will never pose an additional risk to my health.

6.-Risks and consequences depending on the personal clinical situation of the patient and his personal or professional circumstances

To obtain valid samples for the study, a sample of saliva will be asked from the patient.

7.-Protection of personal data and confidentiality.

Information about my personal data and health as well as the images of my lesions, will be incorporated and treated in a computerized database in compliance with the guarantees established by the law on the protection of personal data and the health legislation of Spain and the European Union (law Organic 3/2018, of 5 December). The transfer to other research centers of the information contained in the databases and concerning my state of health will be made by means of an identification code that prevents that I can be identified directly or indirectly. If I decide to revoke the consent I now make, my data will not be used in any investigation after the date I have withdrawn my consent, although the data obtained up to that time will continue to be part of the investigation.

I understand that:

My choice is voluntary, and I can revoke my consent at any time, without having to give explanations and without this impact in my medical care.

I give my consent to the research team of the Non-invasive test for Malaria project in Turkana, to use my data for medical research, always keeping my anonymity and the confidentiality of my data.

The information and this document have been provided to me sufficiently in advance to reflect calmly and make my decision freely and responsibly.

I have understood the explanations that I have been given in a clear and simple language and the health professional who has attended me has allowed me to make all the comments and clarified all the doubts I have raised.

Comments:.....
.....

Therefore, I am satisfied with the information received and, in such condition, I agree, and **I allow the use of my clinical and demographic data for research.**

Turkana,,20.. ,

Signature of the patient Signature of the translator Signature of the doctor (or fingerprint)

Signed:..... Signed:..... Signed:.....
(Completename) (completename) (complete name)

Project carried out by the Miguel Hernández University, in collaboration with the Turkana County Reference Hospital in Lodwar and by the humanitarian medicine team Surgery in Turkana, under the direction of Dr. María Francisca Colom Valiente, Professor of Microbiology and director of the research group in Applied Biomedicine of the Alicante Institute of Health and Biomedical Research (UMH-ISABIAL). Responsible of Turkana Team: J. Loree (Turkana Neglected Tropical Diseases); Responsible of *Cirugía en Turkana* Surgery Team: Carmen Hernández (Professor at Universidad Complutense de Madrid).



I, as patient (or representing the patient:
.....) of years of age, domiciled in
.....

ID Nº..... I revoke the consent provided on date..... that I

give with this date ended, without having to give explanations and without this impact in my medical care.

Turkana,,202... ,

Signature of the patient Signature of the translator Signature of the doctor (or fingerprint)

Signed:..... Signed:..... Signed:.....
 (Completename) (completename) (complete name)

Project carried out by the Miguel Hernández University, in collaboration with the Turkana County Referral Hospital in Lodwar and by the humanitarian medicine team Surgery in Turkana, under the direction of Dr. María Francisca Colom Valiente, Professor of Microbiology and director of the research group in Applied Biomedicine of the Alicante Institute of Health and Biomedical Research (UMH-ISABIAL). Responsible of Turkana Team: J. Loree (Turkana Neglected Tropical Diseases); Responsible of *Cirugía en Turkana* Surgery Team: Carmen Hernández (Professor at Universidad Complutense de Madrid).

11.2 Hoja de datos del paciente



RESEARCH PROJECT NTDs IN TURKANA

Pilot study of Malaria

University Miguel Hernández + Lodwar County & Referral Hospital
Cirugía in Turkana

INSTRUCCIONS

Once the informed consent is signed, the patient will be assigned a number that will be the result of adding to the campaign code (M2020), three digits correlatively and ascending, starting with 001. Thus, for example, the first patient included in the study in the 2021 campaign is **M2021/001**. The microbiology team will keep the list with the identification of each patient, but only the patient code will be shown on the data collection sheet as the only identifier.

PATIENT NUMBER

SEX: Male Female

M	L	-	0	0	0			
---	---	---	---	---	---	--	--	--

AGE (years)

DATE OF THE SAMPLE TAKING (dd/mm/yyyy)

--	--	--

		-			-				
--	--	---	--	--	---	--	--	--	--

PLACE OF RESIDENCE (locality / province / country):

FROM YEAR:

LOCATION OF THE HOUSE: URBAN (City) RURAL (Village) RURAL(apart)

WATER IN THE PROXIMITY: NO YES River..... Lake.....Other:

USE OF MOSQUITO REPELENTS: NO OCCASIONALLY FREQUENTLY ALWAYS (DAILY)

USE OF MOSQUITO NET FOR BED: NO YES ONLY OCCASIONALLY

PROFESSION/ SPECIAL RISK ACTIVITIES (Agricultural activity, shepherd, construction, firewood management, wood industry ..):

TRAVELS OUTSIDE TURKANA COUNTY? YES NO

If yes, PLACE:

YEAR:



VL DIAGNOSIS (check all that apply):

1. Symptoms (tick all that apply):

	Fever	Number of days		Temperature:	
	Headache		Diarrhea		Respiratory distress
	vomiting		Anorexia		Poor appetite
	Abdominal pain		Seizures		coma
	weight loss	Specify:		Kilograms/pounds	
	weakness		Bleeding		

2. Estimated time of evolution of the situation:

3. Any other previous

disease:Diagnosed

as:

Described as:

When:

For how long:

Treatment: specify drug, dose, and duration:

.....

.....If surgical treatment, specify the area:

.....

4. Any other family/group member with the same problem? YES NO

If YES, how many? Do they live together in a daily basis? YES NO

SAMPLE FOR DIAGNOSIS (Check all

that apply):Kind of sample:

Blood collected by Vein puncture finger puncture

Saliva

Other (specify).....

DATA COLLECTED BY:

.....

Signature