UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CAMPUS IV

"ANÁLISIS DE LOS EPISODIOS RECURRENTES PRODUCIDOS POR *Plasmodium vivax* EN PACIENTES DEL SOCONUSCO, CHIAPAS DURANTE 1996 - 2007"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOQUÍMICA CLÍNICA

PRESENTA:
ELENA VICTORIA CHOY CHANG

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. LILIA GONZÁLEZ-CERÓN

ASESOR INTERNO:
DRA. ANA OLIVIA CAÑAS URBINA

Tapachula, Chiapas, México. Noviembre del 2012.

Universidad Autónoma de Chiapas

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CAMPUS IV
DIRECCION

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

OFICIO No. 318/12

TAPACHULA, CHIS., A 06 DE NOVIEMBRE DEL 2012.

C. **ELENA VICTORIA CHOY CHANG**
PASANTE DE LA MAESTRIA EN CIENCIAS
EN BIOQUIMICA CLINICA
P R E S E N T E.-

DE ACUERDO A LA RESPUESTA QUE EMITIERON LOS SINODALES QUE REVISARON EL PROYECTO DE TESIS PROFESIONAL TITULADO: **"ANALISIS DE LOS EPISODIOS RECURRENTES PRODUCIDOS POR PLASMODIUM VIVAX EN PACIENTES DEL SOCONUSCO, CHIAPAS DURANTE 1996-2007".** ME ES GRATO INFORMARLE QUE SE LE AUTORIZA LA IMPRESIÓN DE LA MISMA.

ASI COMO TAMBIEN, ME PERMITO INFORMAR A USTED QUE DE ACUERDO AL ARTICULO 119 DEL REGLAMENTO GENERAL DE INVESTIGACION Y POSGRADO DE ESTA UNIVERSIDAD EL JURADO ASIGNADO PARA SU EXAMEN PROFESIONAL QUEDA INTEGRADO DE LA SIGUIENTE MANERA:

c. DR. JOSE LUIS INCHAUSTEGUI ARIAS	PRESIDENTE
DRA. ANA OLIVIA CAÑAS URBINA	SECRETARIO
DRA. LILIA GONZALEZ CERON	VOCAL
c. DR. MIGUEL A. RODRIGUEZ FELICIANO	SUPLENTE
M.C. DANIEL MARCOS MINA	SUPLENTE

A T E N T A M E N T E
"POR LA CONCIENCIA DE LA NECESIDAD DE SERVIR"

M.E. JOSE LUIS INCHAUSTEGUI ARIAS
DIRECTOR

AUTONOMA
CAMPUS IV
Facultad de Ciencias Químicas
DIRECCIÓN
Tapachula de Córdova y Ordóñez, Chis.

c.c.p. Archivo/Minutario

DEDICATORIA

A Dios, Gracias Señor... gracias por permitirme estar aquí, hoy, en este momento... y por saber que Tú estás a mi lado siempre...

A mi querido compañero de vida, Mariano, por su amor, paciencia y comprensión, has estado conmigo en todo momento.

A mis amados padres, Ma. Elena y Juan y mis hermanos Fabián Eduardo, Antonio Francisco y Juan Carlos, quienes con su amor, ejemplo y confianza me alientan a seguir adelante con mis metas.

En memoria de mi suegro, Arq. Marianno Bravo Vaquero (q.e.p.d.) por su amable insistencia para que finalizara este proyecto profesional.

A mis familiares y amigos, que me demostraron de muchas formas su cariño y me apoyaron a cumplir con este proyecto profesional.

"Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado.

Un esfuerzo total es una victoria completa."

Mahatma Ghandi

AGRADECIMIENTO

A la Dra. Lilia González-Cerón por compartir conmigo su conocimiento y experiencia.

A la Dra. Ana Olivia Cañas Urbina por los consejos, comentarios y amistad brindados.

A los amigos del laboratorio de Parasitología del CRISP por su amistad y apoyo técnico, particularmente a Frida y Pepe Nettel.

A la Jurisdicción Sanitaria VII por el apoyo con la información de casos de paludismo de los años 1996 al 2007.

A mis amigos Blanquita Gálvez, Doris Barrita y Miguel Ángel Medina por sus aportes y palabras de estímulo en la realización de esta tesis.

A la H. Facultad de Ciencias Químicas

Este trabajo se realizó como parte de las actividades del proyecto CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) SALUD-2004-C01-199/A: INVESTIGACIÓN DEL FLUJO DE LA TRANSMISIÓN DE CEPAS DE *PLASMODIUM VIVAX* EN UNA ZONA CON PERSISTENCIA DE PALUDISMO PARA SU CONTROL OPORTUNO" bajo responsabilidad de la Dra. Lilia González-Cerón, investigadora en Ciencias Médicas "E" del Centro Regional de Investigación en Salud Pública (CRISP/INSP) ubicado en la Ciudad de Tapachula, Chiapas.

INDICE

CONTENIDO		PAGINA
Lista de figuras		3
Abreviaturas		5
Resumen		6
I.INTRODUCCION		8
1.1	Situación actual del paludismo	9
1.2	Ciclo biológico de *Plasmodium vivax*	13
	1.2.1 Esquizogonia o fase asexual	14
	1.2.2 Esporogonia	15
1.3	Recaídas	16
1.4	Tratamiento	17
1.5	Propiedades de los medicamentos antipalúdicos	18
	1.5.1 Cloroquina	18
	1.5.2 Primaquina	19
1.6	Genotipos del gen de la proteína CSP	20
II.ANTECEDENTES		21
III.JUSTIFICACION		25
IV.OBJETIVOS		26
V.MATERIAL Y METODOS		27
5.1	Identificación de pacientes con sangre infectada con *P. vivax*	27
5.2	Preservación de muestras sanguíneas infectadas con *P. vivax*	27
5.3	Análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de los productos digeridos de CSP	28
5.4	Base de datos de individuos con paludismo del período 1996-2007	30
	5.4.1 Estructuración	30
	5.4.2 Captura de datos y criterios para la identificación de individuos con recurrencia de paludismo por *P.vivax*	31
	5.4.3 Procesamiento de la base de datos	33
	5.4.3.1 Distribución de los casos	33
	5.4.3.2 Cambios en la parasitemia	34
	5.4.3.3 Distribución de los fenotipos del gen CSP	34
	5.4.3.4 Dinámica e intensidad de la transmisión de paludismo	35

INDICE

CONTENIDO		PAGINA
VI. RESULTADOS		36
6.1	Casos de paludismo por *Plasmodium vivax* por año del período 1996 a 2007 en la región del Soconusco, Chiapas, México.	36
6.2	Distribución de la frecuencia mensual de casos de paludismo reportados para la región de la Jurisdicción VII de Chiapas durante 1996-2007.	36
6.3	Distribución de la frecuencia de casos primarios de paludismo y recurrencias de los 3 años posteriores por edad y sexo para la región de la Jurisdicción Sanitaria VII de Chiapas durante 1999-2007.	37
6.4	Distribución anual de los casos primarios de paludismo y recurrencias en el periodo de 3 años por sexo para el periodo 1999-2007.	38
6.5	Distribución de recurrencias por intervalo de tiempo con respecto a la infección primaria.	39
6.6	Análisis de los intervalos de tiempo entre la percepción de los síntomas y la búsqueda de atención ó detección de la infección con paludismo.	39
6.7	Variaciones de la parasitemia con respecto al intervalo de tiempo entre la infección primaria y recurrente.	41
6.8	Distribución de la frecuencia del genotipo de CSP de *P. vivax* en infecciones primarias y recurrentes por mes durante 2006-2007.	42
6.9	Relación de casos primarios y los episodios recurrentes (R) en la dinámica de la transmisión.	42
VII. DISCUSION		57
VIII. CONCLUSIONES		61
IX. REFERENCIAS		62
X. APENDICE		70

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PAGINA
1.	Distribución de paludismo en el mundo.	11
2A.	Ciclo biológico de *P.vivax.*	13
2B.	Esquizogonia hepática.	15
3A.	Sitio de restricción de las enzimas Alu I para la secuencia de CSPVK210 y CSPVK247.	28
3B.	Sitio de restricción de las enzimas Mva I (BST OI) para la secuencia de CSPVK210 y CSPVK247.	29
4.	Casos de paludismo por *P. vivax* por año del período 1996 a 2007 en la región del Soconusco, Chiapas, México.	46
5.	Distribución de casos de paludismo observados por mes durante el período 1996 al 2007.	47
6.	Distribución de casos de paludismo por *P. vivax* (A) y recurrencias (B) en rangos de edad y sexo en la zona del Soconusco, Chiapas, México del período 1999 a 2007.	48
7.	A) Relación de la infección primaria por *P. vivax* en personas del sexo femenino y masculino del período 1996 a 2007 del Sur de México. B) Relación entre las recurrencias de paludismo por *P. vivax* en personas del sexo femenino y masculino del período 1999 a 2007 del Sur de México.	49
8.	Distribución de las recurrencias producidas por *P. vivax* con respecto a la infección primaria agrupadas por trimestres en la zona del Soconusco, Chiapas, México del período 1996-2007.	50
9.	Comparación del número de días con síntomas previo a la detección de la infección primaria y recurrente.	51
10.	Comparación de las densidades de parásitos de *P. vivax* encontrados entre la infección primaria (IP) y la recurrente (R) en individuos con paludismo.	53

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PAGINA
11.	Distribución de los fenotipos del gen CSP VK210 y VK247 de *P. vivax* en casos primarios (C) y recurrencias (R) ocurridas por mes para los años de 2006 y 2007.	54
12.	Distribución mensual de los casos de paludismo por *P. vivax* concentrados en la Jurisdicción Sanitaria VII de Chiapas para el período 1996-2007. Las barras gris y negra indican el número de casos primarios y recurrentes únicamente de pacientes detectados con más de un episodio.	
12A.	Ejemplo A , asociación de los casos recurrentes ó primarios que ocurrieron en mayo del 2006 (pico de transmisión) con previos ó posteriores episodios de paludismo en las mismas personas.	55
12B.	Ejemplo B, asociación de los casos recurrentes ó primarios que ocurrieron en distintos momentos de baja transmisión del 2002-2006 con previos ó posteriores episodios de paludismo asignado por persona.	56

Abreviaturas

ADN	ácido desoxirribonucleico
CA	Centroamérica
CQ	cloroquina
CSP	proteína circumesporozoítica
°C	grados Celsius
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
G6P	glucosa 6 fosfato deshidrogenasa
h	hora
IP	Infección primaria
km^2	kilómetro cuadrado
min	minutos
mg	miligramos
ml	mililitros
mM	milimolar
n	número de
nm	nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	pares de bases
PQ	Primaquina
PI	Principal investigador
R	recurrencia
rpm	revoluciones por minuto
seg	segundos
sem	semana
Taq	Thermus aquaticus
UI	Unidades internacionales
µg	microgramos
µL	microlitros
µM	micromolar
p/µl	parásitos por microlitro
v:v	medida de concentración volumen a volumen
>	signo "mayor que"
<	signo "menor que"
~	signo "aproximadamente"

Resumen

El paludismo es una de las enfermedades más distribuídas en el mundo que es transmitido al humano a través de la picadura del mosquito hembra perteneciente al Género *Anopheles*. Esta enfermedad es causada por parásitos protozoarios del genero *Plasmodium* siendo los principales *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*. El hombre actúa como huésped intermediario por desarrollarse en él la fase asexual o esquizogónica del ciclo biológico y el mosquito es el huésped definitivo. En el hígado del hospedero vertebrado ocurre el primer ciclo de amplificación del parásito, aquí *P. vivax* puede desarrollar una fase estacionaria, el hipnozoito. Esta fase causa las recaídas de la enfermedad cuyo patrón de temporalidad varía en las distintas zonas geográficas afectadas. El determinar el patrón y prevalencia de recaídas es de suma importancia para evaluar la eficacia de los tratamientos con primaquina (PQ) y los tiempos de seguimiento de los pacientes. La primaquina es el medicamento sugerido para eliminar las recaídas por *P. vivax*. Se realizó un estudio retrospectivo a partir de la información con datos de los pacientes registrados como casos de paludismo por *P. vivax* en la Jurisdicción Sanitaria VII. Se organizó una base de datos universal, se sustrajo la información necesaria para identificar el número de eventos de paludismo en cada paciente durante el período de 10 años (1996 al 2007), la edad, el sexo, los intervalos de tiempo de acuerdo a la fecha de toma de la muestra de cada caso (temporalidad), el porcentaje de recurrencias y la presencia dentro de la curva de transmisión; por otro lado en un estudio prospectivo, se realizó el análisis molecular con el gen de la proteína circumsporozoítica (csp) en las muestras de pacientes recolectados de los años 2006 y 2007 para conocer la prevalencia de los genotipos de la csp en los casos y en su(s) recurrencia(s). Los casos secundarios se categorizaron de corto tiempo (<6 meses), de largo tiempo (entre 6-12 meses) y de tiempo tardío (mayor de 12 meses). Se formó una base de datos con información de 9,105 casos de reportados por *P. vivax*. El 7.2% de pacientes mostraron uno o más casos de recurrencias sin asociación con el sexo y la edad de los pacientes. De estas, en el 77.6% se detectó una infección

recurrente. La mayoría de las infecciones recurrentes que siguieron a un primer ataque de paludismo por *P. vivax* (74.3%) ocurrieron dentro de doce meses, en proporciones similares por trimestre, aunque el tercer trimestre presentó mayor número de casos. Las demás se distribuyeron en los años siguientes con similar porcentaje. Los dos fenotipos del gen CSP, VK210 y VK247 se presentaron tanto en los casos primarios como en las recurrencias de distinto intervalo de tiempo. Los resultados sugieren que la mayoría de las infecciones recurrentes que siguieron a un primer ataque de paludismo por *P. vivax* y que sucedieron dentro de 12 meses corresponden a recaídas, la temporalidad sugiere la presencia de dos patrones de latencia conocidos de tipo tropical y de tipo templado. Estas observaciones son de importancia ya que el tratamiento que indica la Norma Oficial Mexicana comprende 3 años con dosis mensuales intermitentes cada tres meses lo cual no es congruente con los resultados, indicando que es necesario evaluar la efectividad de los esquemas con PQ utilizados.

I. INTRODUCCIÓN

El descubrimiento del parásito sanguíneo que causaba la enfermedad febril reconocida como paludismo o malaria fue observado por el médico francés Charles Louis Alphonse Laveran en el año de 1880 de un paciente que sufría de paludismo. En ésa época las investigaciones giraban en torno al entendimiento de saber qué parásitos producían esas fiebres con síntomas característicos; si las fiebres tercianas y cuartanas eran producidas por el mismo parásito, se conocería más adelante que eran producidas por especies separadas por Camillo Golgi un neurofisiólogo italiano que estableció que habían al menos dos formas en que se presentaban las fiebres por paludismo: de periodicidad terciana y cuartana y con las investigaciones de Giovanni Batista Grassi y Raimondo Filetti se introdujeron los nombres de *Plasmodium vivax* y *P. malariae* respectivamente en 1890; en 1897 un americano William H. Welch nombró al parásito que producía el paludismo terciano maligno *P. falciparum*; en 1922 *P. malariae* fue descrito por John William Watson y en 1965 se describió por primera vez la infección de paludismo en humanos por *P. knowlesi* (CDC, 2012).

Una práctica de esa época que proporcionó considerable información acerca de las recaídas de paludismo fue la auto-experimentación y las numerosas observaciones y experiencias realizadas en torno a los soldados que regresaban de los campos de batalla en diversas partes del mundo, sobretodo durante la Primera Guerra Mundial. Hasta los años 1920's fue usual recomendar un tratamiento de 8 semanas con quinina para curar el paludismo, pero se seguían observando recaídas, si estas eran el resultado de infección en el estadío sanguíneo o provenían de un estadío latente en un tejido, era desconocido. Mejor entendimiento acerca de las recaídas de paludismo por *P. vivax* se vieron en los descubrimientos de Julius Wagner-Jaureggs (CDC, 2012) donde la infección con paludismo parecía curar la neurosífilis. Entre los años 1920's y 1950's muchos pacientes con neurosífilis eran llevados a hospitales mentales y fueron tratados con infecciones de paludismo, época donde se conoció a este procedimiento como terapia con malaria marcando un período único en la historia de la medicina.

Después de la Segunda Guerra Mundial se realizaron muchos estudios con infecciones artificiales de paludismo conducidos en diferentes lugares para estudiar los regímenes de tratamiento anti-paludismo. El interés por el fenotipo de período largo de latencia de la infección de paludismo *P. vivax* recobró interés al inicio de los años 1950's por el problema que implicaba para los soldados estar en batalla en la guerra de Corea (Hankey at al., 1953).

La evaluación de las drogas anti-palúdicas inició con la introducción de la mepacrina (atebrina, quinacrina) en 1932, una droga anti-palúdica con una vida media de alrededor de un mes, se observó que las recaídas tempranas eran retardadas en aproximadamente 30 días, comparado con el tratamiento con quinina que era de 3 a 7 semanas (Findlay, 1951). Después con la cloroquina se encontró que retardaba la aparición de las recaídas de 2 a 6 semanas (Findlay, 1951); todas estas drogas utilizadas retardaban el inicio de la recaída de paludismo por *P.vivax* y reducían su frecuencia pero no parecían reducir el número de recaídas experimentadas (Most, 1963).

1.1 Situación actual del Paludismo

El paludismo es una enfermedad producida por parásitos del Género *Plasmodium* y es transmitida al ser humano por la picadura de mosquitos hembras infectadas del género *Anopheles*. Hasta el momento hay cinco especies conocidas de parásitos humanos :

1- *Plasmodium vivax*
2- *Plasmodium falciparum*
3- *Plasmodium malariae*
4- *Plasmodium ovale*
5- *Plasmodium knowlesi*

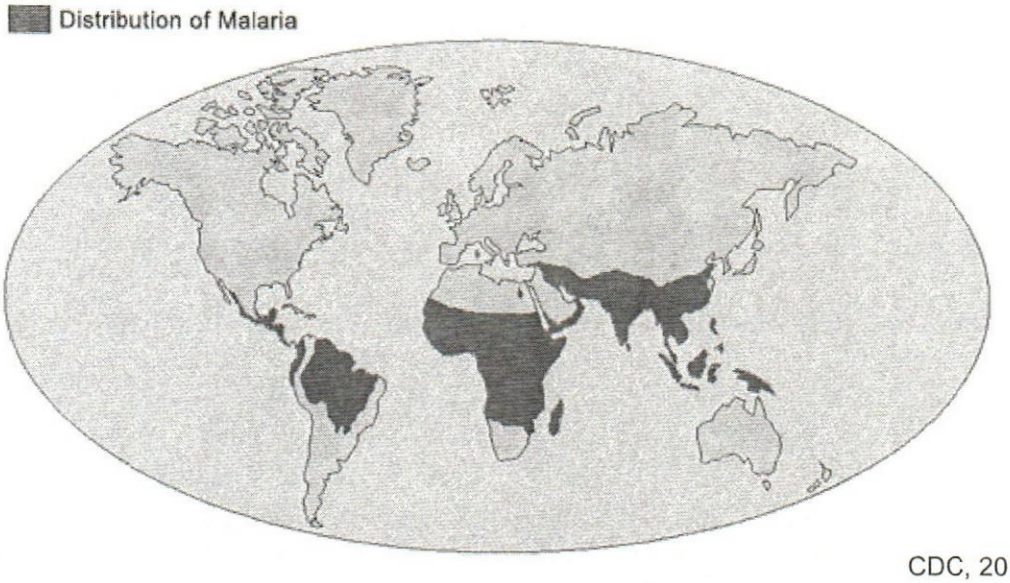
Los parásitos más frecuentes que producen paludismo son *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax,* y el más mortal es el paludismo producido por *Plasmodium falciparum*. La mayoría de los casos y las muertes se registran en el África sub-sahariana. Sin embargo, también se ven afectadas Asia, Latinoamérica, Oriente Medio y algunas zonas de Europa. En 2006 el paludismo estaba presente en 109 países.

Se estima que 3.3 millones de personas alrededor del mundo se encuentran en riesgo de contraer esta enfermedad. Cada año se tienen cifras de 250 millones de casos de paludismo, sobretodo en los habitantes de los países de bajos ingresos económicos. La distribución del paludismo en el mundo puede observarse en la Figura 1.

Más allá de las víctimas humanas, el paludismo causa estragos económicos en las zonas donde es frecuente, reduciendo el producto interior bruto (PIB) en hasta un 1,3% en países con altos niveles de transmisión. Los costos sanitarios del paludismo incluyen gastos tanto personales como públicos en prevención y tratamiento (WHO, 2010).

En algunos países con gran carga de paludismo, la enfermedad es responsable de:

- hasta un 40% del gasto sanitario público;
- un 30% a 50% de los ingresos en hospitales, y
- hasta un 60% de las consultas ambulatorias.



CDC, 2011

Figura 1. Distribución de paludismo en el mundo.

Los primeros síntomas comunes (fiebre, dolor de cabeza, escalofríos y vómitos) suelen aparecer 10 a 15 días después de que se ha producido la infección. Si no se trata rápidamente con medicamentos eficaces, el paludismo puede ser grave, y a menudo mortal (WHO, 2010).

En México se le considera un problema de salud pública. Se tienen datos de que el paludismo en nuestro país se introdujo en el año de 1519 por los conquistadores españoles (NAAIS, 2001), lugar en el cual este parásito encontró vectores como los anofelinos mexicanos, iniciando de esta forma una rápida propagación y generando brotes epidémicos de graves consecuencias como la muerte. Entre los años de 1922 y 1929 fue la segunda causa de mortalidad en nuestro país (NAAIS, 2010); en 1959 se colocaba en el cuarto lugar y para 1960 había desaparecido del grupo de las diez primeras causas de defunción, esto debido en gran parte a las acciones realizadas por la Campaña Nacional para la Erradicación del Paludismo (CNEP).

Entre los años de 1960 y 1980 y por cuestiones que sugieren un control de eficacia limitada la incidencia de paludismo sufrió altibajos, y posteriormente por una serie de factores principalmente por un deterioro del programa de las actividades de erradicación y con las migraciones de enfermos provenientes de Centroamérica se inició un nuevo incremento que alcanzó cifras de 133,698 casos en 1985 y en los años siguientes continuaron una metodología similar como el rociado residual con DDT, la búsqueda de febriles y tratamiento de enfermos con cloroquina y primaquina (NAAIS. 2001).

A partir de 1989, se estableció el Plan de Acciones Intensivas Simultáneas (PAIS), aplicando acciones especiales en localidades hiperendémicas, con tratamientos masivos durante 5 días consecutivos y nebulizaciones simultáneas de 3 a 5 días; el resultado fue la disminución de la endemia nacional de 116,230 casos en 1988 hasta 4,870 casos en el año de 1997.

En 1999 el programa modificó las estrategias, con un modelo de estratificación epidemiológica orientada para definir acciones, previendo que con la eliminación de criaderos de larvas podrían disminuirse los insecticidas. A partir del año 2000 el Programa descontinuó el DDT y se integró un piretroide en forma racional, se optó por una estrategia focalizada a la que se denominó Tratamiento Focalizado (NAAIS, 2001); en ese año el número de casos de paludismo informado en el boletín epidemiológico fue de 7,244 y en los años siguientes comenzó un descenso en el que se tuvieron datos registrados de 2562 casos en el territorio nacional de los cuales 1037 casos correspondieron al estado de Chiapas (a la semana No.52 del 2009) (DGEPI, 2009).

1.2 Ciclo biológico de *Plasmodium vivax*

Plasmodium es un protozoo con un ciclo de vida complejo, que comprende cuatro fases: una fase sexual o esporogonia y la primera fase asexual en el mosquito vector y dos fases asexuales o esquizogonia que ocurren en el hospedero humano (segunda ocurre en el hígado y tercera fase asexual ocurre en la sangre). Sólo los mosquitos hembras parasitadas del género *Anopheles* cuando se alimentan de la sangre del humano, pueden infectarlo (Knell, 1991) (Figura 2A).

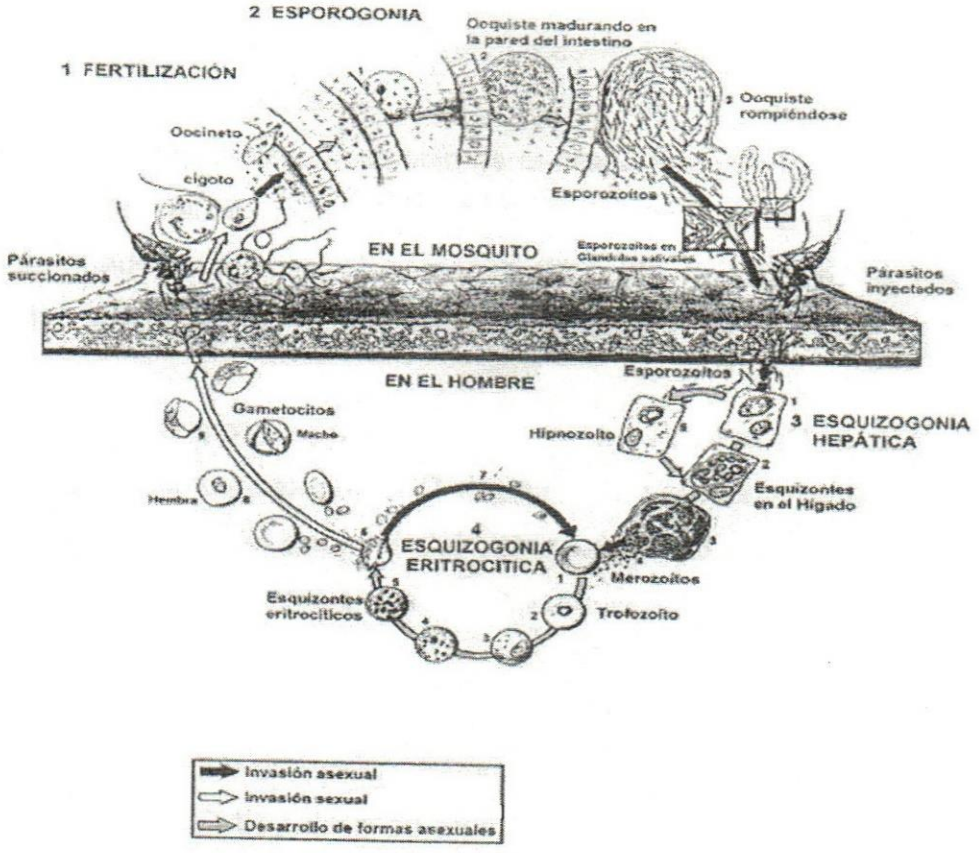


Figura 2A. Ciclo biológico de *Plasmodium vivax*

Knell, 1991

1.2.1 Esquizogonia o fase asexual

El ciclo biológico se describe a continuación: cuando el mosquito hembra infectada pica a una persona sana y le inocula esporozoítos, habitualmente antes de una hora, inician la invasión a los hepatocitos. En este momento tiene lugar la primera etapa de desarrollo en humanos, el ciclo de esquizogonia hepática (fase exoeritrocítica).

Dentro de los hepatocitos, en un período de 8 a 9 días el parásito se multiplica aumentado la progenie (sin causar síntomas), los merozoitos (de 800 a 1000 criptozoitos), rompen y salen del hepatocito, entran al torrente sanguíneo e invaden a los eritrocitos, iniciando el ciclo de esquizogonia eritrocítica.

Dentro del eritrocito crece y se forma una gran vacuola con un gránulo de cromatina como "un anillo de compromiso", y esta forma se conoce como trofozoito. El núcleo del trofozoito se divide después asexualmente, y produce un esquizonte con 12 a 24 granos de cromatina (núcleos). El citoplasma se fragmenta y envuelve a cada núcleo para formar los merozoitos; así al romperse la pared del eritrocito parasitado del esquizonte maduro, los merozoitos quedan en libertad e invaden nuevos glóbulos rojos; después de varios ciclos eritrocíticos algunos de estos merozoitos sufren un proceso de diferenciación en formas sexuales denominadas el masculino microgametocito y el femenino macrogametocito que son los estadíos infectantes para el mosquito vector.

Algunos esporozoitos dentro de los hepatocitos permanecerán en una fase estacionaria de desarrollo denominados hipnozoitos (Figura 2B) y serán los responsables de las recaídas, los cuales al reactivarse e iniciar la esquizogonia hepática con liberación de criptozoitos que invadirán eritrocitos, desencadenarán el cuadro clínico.

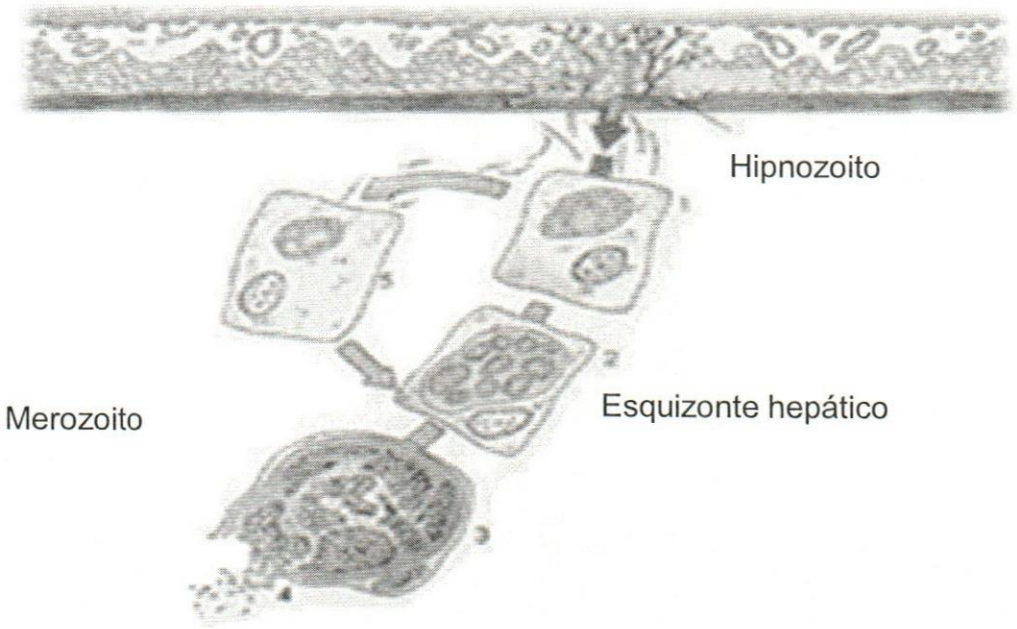


Figura 2B. Esquizogonia hepática Knell, 1991

1.2.2 Esporogonia

El ciclo sexual o esporogonia ocurre dentro del mosquito. Cuando el mosquito hembra de *Anopheles* succiona sangre de una persona parasitada, ingiere gametocitos femenino y masculino, los cuales maduran y se transforman en gametos en su estómago, ambos se combinan y de la fecundación resulta el huevo o cigoto, el cual se convierte en una forma móvil e invasiva que se llama oocineto, luego atraviesa la pared gástrica del mosquito y se convierte en ooquiste. El ooquiste madura y se forman miles de esporozoitos, y al romperse la pared del mismo quedan libres y emigran hacia las glándulas salivales del mosquito. En este momento están listos para infectar a un nuevo huésped y son el estadío infectante para el humano (Knell, 1991).

1.3 Recaídas

Las recaídas son eventos que causan un episodio de paludismo en el individuo que ha tenido una infección primaria (se producen en infecciones por *P. vivax* y *P. ovale* por fases llamadas hipnozoítos) que corresponden a fases latentes que se adquirieron después de la inoculación de esporozoítos por el mosquito. La Organización Mundial de la Salud (WHO, 2010) define *recaída* como la recurrencia de la parasitemia asexual causada por *P. vivax* y *P. ovale* derivado de los estadíos persistentes en el hígado (los hipnozoitos) que maduran y forman esquizontes hepáticos, y después de un intervalo variable de semanas a meses, estos rompen la célula y liberan merozoitos al torrente sanguíneo. El término *recaída* es un vocablo frecuentemente utilizado en el ambiente médico y describe la reaparición de los signos y síntomas clínicos de la enfermedad después de su aparente eliminación. Sin embargo aplicado a la infección de paludismo por *P. vivax*, la recaída es la reaparición de la parasitemia sanguínea originada por parásitos persistentes en el hígado (hipnozoitos). El mecanismo de activación aún se desconoce.

Los tiempos en que ocurren las recaídas varían con la zona geográfica y clásicamente se han aceptado dos patrones de latencia principales: la de *tipo tropical* que ocurren en el Sureste de Asia y la de tipo *templado* que ocurre en Korea, China y Rusia. Los períodos de latencia de recurrencias posterior a la infección primaria son variables pero se han agrupado en: de duración corta que ocurre dentro de los 6 meses después del ataque primario, de duración larga entre los 9 y 12 meses y de duración tardía que ocurre después de 12 meses (Adak, 1998).

1.4 Tratamiento

Recomendaciones de la OMS para el tratamiento de paludismo por *P. vivax*

Tratamiento de paludismo en fase sanguínea

Las recomendaciones de la OMS para el tratamiento de paludismo por *Plasmodium vivax* (no complicada) y en los lugares donde es el parásito prevalente (donde el paludismo es sensible a la cloroquina) una dosis efectiva y bien tolerada de CQ 25 mg base/kg de peso corporal dividida en tres días. Se inicia con una dosis de CQ de 10 mg base/kg de peso corporal, seguida por: opción a) 5 mg/kg de peso corporal a la 6 hr, 24 hr y 48 hr ó la opción más común b): 10 mg/kg de peso corporal en el segundo día y 5 mg/kg de peso corporal en el tercer día. Estudios recientes (WHO, 2010) han demostrado la eficacia de la terapia combinada con artemisinina (ACTs) recomendados en el tratamiento de ésta infección en zonas donde hay resistencia a la CQ.

Tratamiento de paludismo en fase hepática

Para la eliminación completa de las fases latentes en el hígado (hipnozoitos) por *P. vivax* debe administrarse primaquina (WHO, 2010). La dosis terapéutica se encuentra entre 0.25 y 0.5 mg/kg/día , una vez al día tomada con alimentos por catorce días. Para los casos de paludismo resistentes a la CQ se recomienda el uso de la terapia combinada con artemisinina más PQ.

1.5 Propiedades de los medicamentos anti-palúdicos

1.5.1 Cloroquina

La cloroquina es una 4-aminoquinolina con peso molecular de 436 , eficaz para el tratamiento de las infecciones producidas por *P. vivax, P. ovale* y *P. malarie* y no produce cura radical. La cloroquina interfiere con la destoxificación del grupo hem, y la resistencia a este fármaco está relacionada con cambios genéticos en transportadores que reducen su concentración en el sitio de acción (vacuola alimenticia del parásito). Se encuentra en tabletas de 100 o 250 mg de cloroquina base como fosfato o sulfato (OMS, 2010).

Cuando es administrada oralmente, se absorbe totalmente en el tracto gastrointestinal y se distribuye ampliamente en los tejidos del cuerpo incluyendo la placenta y en la leche materna. Se elimina a través de los riñones en un tiempo estimado de vida media de 1-2 meses. Se metaboliza en el hígado principalmente a monodietilcloroquina que tiene actividad similar contra *P. falciparum*.

Los efectos adversos son el sabor poco agradable; puede ocasionar prurito en personas de piel oscura, otros efectos secundarios menores son dolor de cabeza, desórdenes gastrointestinales como náuseas, vómitos y diarrea. Su uso continuo (>5 años) puede causar queratopatía y retinopatía. La sobredosis de cloroquina es muy peligrosa y la muerte puede ocurrir en pocas horas.

1.5.2 Primaquina

La primaquina (PQ) es una 8-aminoquinolina [6-metoxi-8-(4-amino-1-metilbutilamino) quinoleina] con un peso molecular de 259.4, que desde 1950 (Edgecomb et al.,1950) ha sido la droga de elección y actúa sobre esquizontes intrahepáticos, gametocitos (de *P. falciparum*) y también tiene actividad sobre los estadíos sanguíneos de *P. vivax* .

Esta droga es capaz de distribuirse eficientemente en el tejido del hospedero sin importar su vía de administración; en hígado se concentra 10 veces más que en el plasma. La PQ parece interferir con el proceso respiratorio del parásito (Bruce-Chwatt et al.,1986) . El mecanismo de acción es desconocido (WHO, 2010). Es usada para la cura radical de paludismo *por P. vivax y P. ovale*, en combinación con un esquizonticida sanguíneo para los parásitos eritrocíticos.

La PQ se encuentra en tabletas que contienen 5.0 mg, 7.5 mg ó 15 mg de primaquina base como difosfato. Es importante mencionar la toxicidad, el efecto adverso más importante es la anemia hemolítica en pacientes con deficiencia de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), otros efectos son sobre el metabolismo de la glucosa en el eritrocito en la vía de las pentosas y en algunos otros tipos de hemoglobinopatías. La dosis terapéutica puede causar dolor abdominal si se administra con el estómago vacío. Grandes dosis pueden causar náusea y vómitos. La metohemoglobinemia puede suceder. Otros efectos poco comunes incluyen anemia ligera y leucocitosis.

La resistencia y/o baja tolerancia a la primaquina se determina por la presencia de recaídas en los individuos después de una infección primaria, la cual se ha reportado en distintas regiones (Collins y Jeffery, 1996) por ejemplo en Asia (Krotoski ,1980) y muy cerca de México en Guatemala (Gascon et al.,1994).

1.6 Genotipos del gen de la proteína CSP

El gen CSP de *P. vivax*, codifica al polipéptido más abundante en la superficie del esporozoito y es conocido como proteína circumesporozoítica (CS) con un peso molecular de 58 kDa; presenta dos regiones altamente conservadas (Región I y II) que flanquean la región central. La región central contiene unidades repetidas de aminoácidos y varían en composición y en número de secuencia y difieren entre las especies de *Plasmodium*. Los análisis de la secuencia del gen de CSP de *P. vivax* revelaron que existen dos tipos de unidades repetidas, GDRA(A/D)GQPA ó ANGA(G/D)(N/D)QPG conocidos como VK210 y VK247 respectivamente (Arnot at al., 1985; Rosenberg et al., 1989). Estas variantes tienen una distribución mundial así como también se han encontrado en nuestro país (Kain et a.,| 1992, González-Ceron et al., 2001; Imwong et al., 2005, Zakery at al., 2006). Este gen es uno de los genes más estudiados es ésta especie de parásito y su polimorfismo ha sido investigado en aislados provenientes de diversas regiones endémicas en el mundo; es un candidato a vacuna, la investigación acerca de su polimorfismo puede proveer de datos valiosos para su desarrollo; como un marcador molecular de monitoreo ante la emergencia de cepas de *P. vivax* resistentes a tratamiento que permita conocer su expansión, asociados a la resistencia con cloroquina o primaquina que conforman el tratamiento de primera línea para esta infección parasitaria; además de su importancia para vacunas, tiene una importancia epidemiológica ya que la presencia y proporción de los genotipos varia en las distintas zonas geográficas afectadas. En realidad poco se sabe de la distribución de estos genotipos, se puede determinar para ver su proporción en las recurrencias de distinto intervalo de tiempo después de la infección primaria y explorar si hay alguna tendencia a presentarse en recurrencias y con el tiempo en que estas ocurren.

II ANTECEDENTES

Ronald Ross encontró la fase de *Plasmodium* en el mosquito del género Anopheles en 1897 (CDC, 2011).

El estadío parasitario pre-eritrocítico de *P. vivax* fue demostrado en 1948 por Shortt y Garnham en una biopsia de hígado de un voluntario en Inglaterra. En 1979, Krotoski trabajando con Garnham y otros colaboradores finalmente identificaron las formas latentes en hígado o "hipnozoitos", los responsables de las recaídas de paludismo por *P. vivax* (CDC, 2011).

Soldados en el Pacífico Sur con paludismo por *P. vivax* exhibían recaídas que eran frecuentes y la tasa era muy alta. Las infecciones ocurrían a intervalos de 3 semanas si se administraba quinina, e intervalos de 7 semanas si el tratamiento era con mepacrina (Eyles y Young,1948; Bianco et al., 1947). Ese tipo de cepa que provenía de zona con clima tropical y que producía frecuentes recaídas por *P. vivax* se conoció como cepa Chesson.

Se ha aceptado que *Plasmodium vivax* posee dos patrones principales de recaídas, la de zona tropical que está representada por la cepa Chesson proveniente de la región del Sur Pacífico y del Sureste de Asia (Nueva Guinea-Sur Pacífico), caracterizada por un ataque primario temprano seguido por un período de latencia corto antes de la aparición de recaídas frecuentes, y la de tipo templado representada por la cepa Santa Elizabeth (de USA) que posee un ataque primario temprano seguido por un período largo de latencia de 6 a 14 meses y sucedido por una serie de recaídas de intervalos cortos (Coatney at al., 1950; Hankey at al., 1953).

En la India la presencia de recaídas ha variado con el tiempo indicando que posiblemente la exposición a la PQ reduce la sensibilidad del parásito, un reporte de 1954 indica que no se produjeron recaídas en el tratamiento de 15 mg por 5 días con PQ (Singh et al., 2000).

Los estudios de Contacos y col. (1972) compararon los distintos patrones de recaídas y en Centro América encontraron que por individuo había variación en el patrón de recaídas. Las cepas de *P. vivax* que provenían de Panamá (cepa Panamá), El Salvador (cepas Sal I y Sal II) y Nicaragua (cepa NICA) fueron estudiadas en voluntarios y se concluyó que los patrones de recaídas se encontraban en la categoría de zona templada, con un período de incubación corto seguido por un período largo de latencia antes de la aparición de actividad frecuente de recaídas; el tratamiento era con CQ 1.5 gr base seguido por PQ 15 mg base por 14 días consecutivos.

En Centro América, El Salvador en los años 70´s se reportó el tratamiento de 15 mg por 5 días de PQ y curó al 79.4% de los casos mientras 15 mg por 14 días de PQ curó al 89.8% de los casos donde se aplicó, además se mencionó que el tratamiento con PQ 15 mg por 5 días fue similarmente eficaz que la dosis única de 45 mg (Cedillos et al.,1978).

El tiempo en que se presentan las recaídas puede variar con la época de secas o lluvias y la zona geográfica, el número de recaídas también puede variar, en los individuos que permanecen en áreas de transmisión es difícil distinguir si episodios posteriores corresponden a recaídas o re-infecciones (Adak et al., 1998).

En India más recientemente se reportó que las recaídas ocurrieron dentro de 6 meses, y en la actualidad para el tratamiento se aplica 25 mg por 15 días de PQ (Rajgor et al., 2003).

En Irak (Leslie et al., 2008) y la India (Gogtay et al., 2000) el mayor porcentaje de recaídas fueron de corto tiempo. Mientras en Korea, el 69.4% de las recaídas se concentraron dentro de 6-12 meses después de la infección primaria (Moon et al., 2009).

Un reporte reciente de Río de Janeiro revela que 6 de 80 personas que viajaban en ese país presentaron paludismo por *P. vivax* (ya habían salido de esa región y no habían recibido tratamiento) y tuvieron un período de incubación de 3 a 12 meses (Brasil et al., 2011). Otro estudio pero procedente de Brasilia describió tres casos de pacientes con período largo de latencia sugiriendo que en Brasil parásitos de período largo pueden coexistir con aquéllos que producen recaídas frecuentes (Tauil et al., 2010).

Sólo los fármacos 8-aminoqinolonas reducen o previenen las recaídas y son una condición que favorece la persistencia de transmisión de paludismo en las zonas afectadas con *P. vivax*. Wellems y Millar en 2003 reportaron que la susceptibilidad de las cepas de *P. vivax* a la primaquina es variable; por su parte Alecrim y col. en 1999 reportaron que la dispersión de los parásitos con distintos grados de susceptibilidad puede ser clonal.

Mientras en México, se ha citado que hace más de tres décadas que los esquemas de tratamiento con CQ y PQ pueden resultar en 10-20% de recaídas (Rodríguez et al. 1990). El tratamiento de dosis únicas (TDU 3x3x3) tiene la intención de disminuir ó eliminar las recaídas (NOM-032-SSA2-2002), pero individuos con la infección recurrente de *P. vivax* se continúan detectando.

De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-032-SSA2-2002), para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector, en el tratamiento de la infección por paludismo en el numeral 9.1 dice a este respecto:

9.1 Tratamiento médico del paludismo. Se emplea la combinación de dos medicamentos, la cloroquina que elimina las formas sanguíneas del *P. vivax y del P. falciparum*, excepto los gametocitos de este último y la primaquina que elimina los hipnozoítos del *P. vivax* y los gametocitos del *P. falciparum*. Se administrarán diferentes esquemas de acuerdo al objetivo que se persiga.

El Tratamiento de cura radical (TCR) se logra aplicando diferentes esquemas terapéuticos :

a) Tratamiento de dosis única (TDU) con cloroquina y primaquina
b) TCR a 5 días (cloroquina y primaquina)
c) TCR a 14 días (cloroquina y primaquina)
d) Dosis única (TDU con cloroquina y primaquina) 3x3x3

De estos tratamientos los más utilizados son el TCR de 5 días que en la actualidad es poco efectivo (OMS, 2006). Si los episodios recurrentes fueran por recaídas entonces deberían coincidir con la aplicación del medicamento en el esquema 3x3x3 (consiste en una sola dosis de CQ y PQ administrada mensualmente por 3 meses, sin tratamiento en los siguientes tres meses durante un total de tres años) para que fuera efectivo en la supresión de la infección sanguínea por recaídas.

III. JUSTIFICACION

En la región del Soconusco, Chiapas el paludismo por *P. vivax* ha persistido y este trabajo tiene la finalidad de identificar retrospectivamente la frecuencia con que los individuos que viven en las zonas de riesgo repiten infección, así como los intervalos de tiempo con que la segunda o tercera infección ocurrieron en los últimos 10 años (período de 1997 a 2007), registradas por el programa de control (Jurisdicción Sanitaria VII). Este es el primer estudio en México dirigido a identificar las posibles recaídas por *P. vivax*, es de suma importancia conocer cuando y donde ocurrieron en esta zona con transmisión persistente y reuniendo toda la información poder identificar las características que rodean la presencia de las recaídas en el tiempo y el uso de un marcador molecular el gen CSP de *P. vivax* para conocer su comportamiento en los casos primarios y las recurrencias, que tienen competencia en mejorar las políticas de salud enfocadas en el control de paludismo.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Analizar los episodios sintomáticos recurrentes por *Plasmodium vivax* en individuos que viven en el Sureste de Chiapas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- Identificación de las recurrencias en tiempo y espacio en pacientes infectados con *Plasmodium vivax* durante el período de 1996 a 2007.

2.- Identificar el genotipo de la proteína de CSP en los casos primarios y recurrentes mediante el análisis molecular RFLP de la región central repetida del gen.

3.- Identificar las características epidemiológicas asociadas a las recurrencias.

V. MATERIAL Y METODOS

5.1 Identificación de pacientes con sangre infectada con *P. vivax*

En la ciudad de Tapachula, Chiapas se encuentra el Centro Regional de Investigación en Salud Pública (actualmente CRISP, antes conocido como Centro de investigación de Paludismo ó por sus siglas CIP) y cuenta esta institución con el departamento de Parasitología con un área de diagnóstico donde acuden los pacientes. El diagnóstico de enfermedad de paludismo se estableció por microscopía en el laboratorio de Parasitología del CRISP mediante frotis y gota gruesa sanguínea teñido con colorante de Giemsa por punción (generalmente la parte lateral de la falange terminal de un dedo), de acuerdo con a la norma oficial mexicana, NOM-032-SSA2-2002, para la vigilancia epidemiológica de enfermedades transmitidas por vectores como esta enfermedad, numeral 6.1 para hacer diagnóstico de paludismo que a toda persona sospechosa de paludismo con cuadro febril, escalofríos y sudoración, residir o provenir de áreas endémicas donde la toma deberá hacerse antes de iniciar la administración de cualquier medicamento antipalúdico.

Las muestras de sangre infectadas con *P. vivax* fueron obtenidas extrayendo 5 ml de sangre venosa en una jeringa que contenía heparina (100 UI/mL) de pacientes que aceptaron donar sangre venosa para diversos estudios del parásito, con consentimiento informado de cada uno de los participantes durante los años 1996 hasta al 2007.

5.2 Preservación de muestras sanguíneas infectadas con *P. vivax*

La sangre obtenida se centrífugó a 5,000 rpm por 5 minutos, se descartó el plasma y el paquete globular se identificó y guardó a -20°C. El paquete globular se lavó v:v con solución PBS 1X, se centrífugó por 1 min y se descartó el sobrenadante. El paquete globular resultante se almacenó en viales de 600 μL en nitrógeno líquido.

De los pacientes con los que sólo se contaba con sangre impregnada en círculos de papel filtro se secaron al aire e identificaron, y se guardaron en bolsas de papel celofán dentro de recipientes de plástico que contenían silica gel para su preservación.

5.3 Análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de los productos digeridos de CSP

Para distinguir entre las dos variantes del gen de CSP en VK210 y VK247, los productos de PCR fueron digeridos separadamente con las endonucleasas Alu I o Bst OI, estas enzimas poseen actividad específica en al menos un sitio de corte por cada repetido de las variantes VK210 y VK247 respectivamente (puede observarse en la Figura 3A y 3B respectivamente), lo que hace posible su identificación.

A

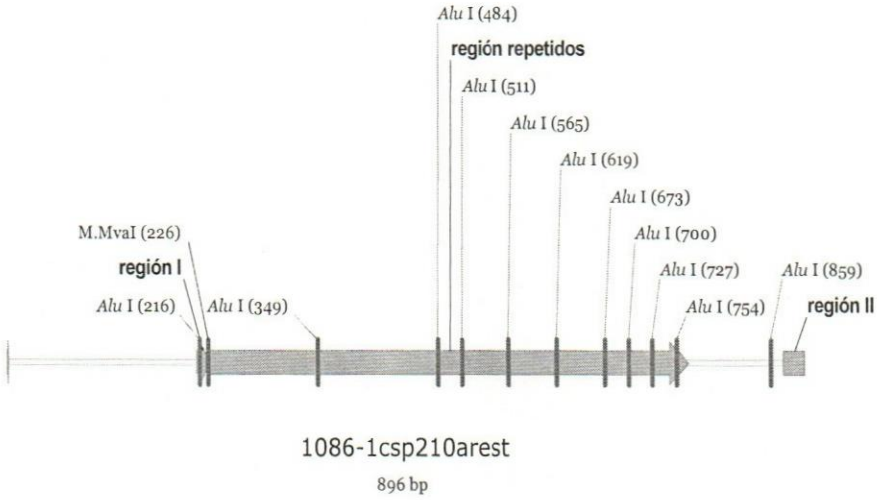


Figura 3A. Sitio de restricción de las enzimas Alu I para la secuencia de CSPVK210.

B

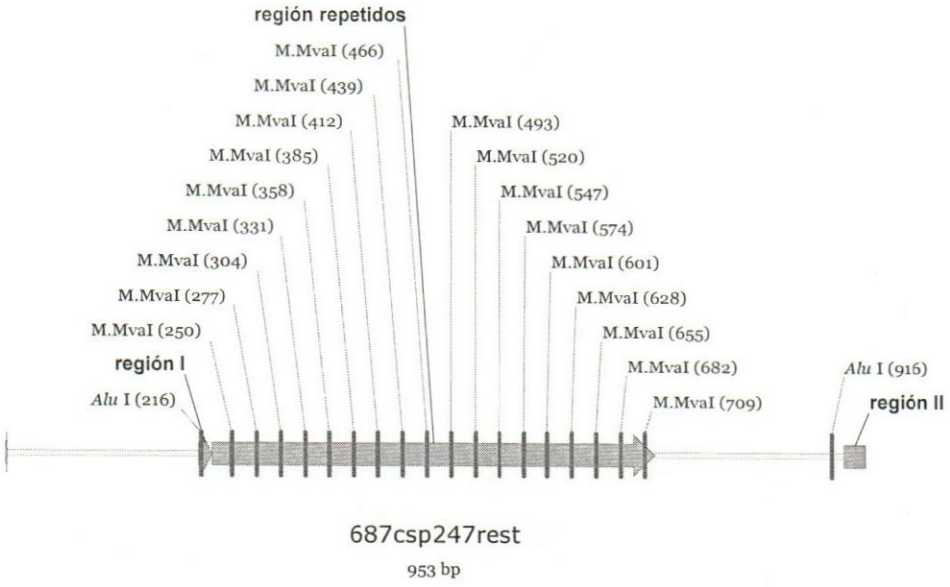


Figura 3B. Sitio de restricción de las enzimas Mva I (Bst OI) para la secuencia de CSPVK247.

Nota. Se esquematiza el corte con Mva I porque tienen el mismo sitio de corte que Bst OI.

Se realizaron las condiciones de la digestión para las enzimas *Bst OI* y *Alu I* de la siguiente manera: para la enzima *Bst OI* (Promega R6031), en un tubo eppendorf de 1.5 mL se añadieron 25 µL del producto de PCR, 3µL de buffer C 1X, 0.25 µL de BSA acetilada 0.083 ug/uL, 0.5 µL de enzima Bst OI 5 U/uL y 1.25 µL de agua estéril libre de nucleasas (GIBCO Invitrogen, Grand Island,NY. Cat. 10977-015), se incubó a 60°C por 3 h en termoblock (TERUMO) . Para la digestión de la enzima *Alu I* (Biolabs R0137S) la condiciones fueron 25 µL del producto de PCR, 3 µL de buffer NE 1X , 0.5 µL de la enzima Alu 1 5 U/, µL y 1.5 µL de agua GIBCO. La digestión se incubó a 37°C durante 5 horas en la incubadora REVCO Elite TM II Termo Scientific.

Para visualizar el producto de la digestión, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2% con las condiciones anteriormente descritas. Por cada muestra se ocuparon dos carriles uno para el producto obtenido de la digestión con la enzima *Bst OI* y en el carril siguiente el producto digerido con la enzima *Alu I*; el primer y último carril para el marcador de 100 pb; los geles se fotografiaron en un transiluminador de luz ultravioleta Modelo LMS-20E a 254 nm (UVP, Upland CA. Cat. 97017001) que cuenta con un sistema digital de fotodocumentación BioDoc-it™ ; el análisis de los resultados se realizó de manera visual, obteniéndose los fenotipos de las muestras de acuerdo con los patrones establecidos por Immwong *et al.*, (2005) y Zakery et al., (2006).

5.4 Base de datos de individuos con paludismo del periodo 1996-2007

5.4.1 Estructuración

Se tomó como base de esta etapa de trabajo, información del formato de registro de casos de paludismo, recopilados y reportados desde los años de 1996 y hasta el 2007 por la Jurisdicción Sanitaria VII que incluye los municipios de Frontera Hidalgo, Metapa de Domínguez, Talismán, Suchiate, Unión Juárez, Cacahoatán, Tuxtla Chico, Tapachula, Huehuetán, Villa Comaltitlán, Tuzantán, Huixtla, Escuintla, Acapetahua, Acacoyagua y Mapastepec; esta región comprende una extensión territorial de 5,475 km^2 (el 7.2% del territorio del estado) que mantiene un registro nominal de los casos confirmados de *P. vivax* y corroborando con los casos registrados por el laboratorio de Parasitología del Centro Regional de Investigación en Salud Pública INSP (CRISP) para el mismo período. Para organizar lo datos se utilizó el programa Excel 2007, se generaron columnas en el siguiente orden: A: código de identificación de la muestra, B: semana epidemiológica, C: mes epidemiológico. La fecha de la toma de muestra en tres columnas ordenadas D: día, E: mes , F: año ; G: edad del paciente, H: primer nombre, I: segundo nombre, J: apellidos, K: sexo, L: localidad, M: anexo , para detallar el domicilio o una señal específica para una rápida localización, N:

municipio, O: fecha de inicio de síntomas; P: días de síntomas (días que resultan de la diferencia entre la fecha de inicio de síntomas hasta el momento de la toma de la muestra de sangre). P: parasitemia (densidad de parásitos por microlitro de sangre en los casos de estar disponible este dato); Q: recurrencia (para diferenciarlo del registro del caso primario); R: letras del alfabeto como código identificación del número de episodio de paludismo; S: resultado del genotipo CSP (VK210/VK247). En una base de datos previa que contaba con diez columnas con datos pre-existentes se añadieron nueve columnas para anexar más información y se procedió a completar las columnas; a esta base se le denominó ***Base Única de Datos***, también un código de identificación le fue asignado a cada paciente. Se definió como *caso de paludismo* al individuo que presentó síntomas de paludismo, se le realizó examen de gota gruesa (con tinción de GIEMSA) y resultó POSITIVO a *P. vivax*.

5.4.2 Captura de datos y criterios para la identificación de individuos con recurrencias de paludismo por *P. vivax*

En la captura de los datos se respetaron los siguientes criterios: el llenado con letra en mayúsculas, sin acentos; los nombres en dos celdas, primer y segundo nombre según era el caso, en la siguiente columna los apellidos, una columna para el lugar de procedencia o localidad. El nombre del paciente se incluyó con fines de búsqueda para las recurrencias de paludismo.

A partir de los datos existentes y ordenados, se realizó una búsqueda minuciosa de pacientes que coincidieran sus datos y mostraran dos o más casos de infección de paludismo en esta base de datos. La búsqueda se realizó utilizando una herramienta del programa Excel 2007 mediante el uso de filtros; se inició la primer búsqueda de repetidores de paludismo en la columna con el primer nombre y en orden alfabético, de la letra A hasta la letra Z; se realizó otra búsqueda utilizando filtros para el segundo nombre y por último una tercera búsqueda iniciando con apellidos. En las tres formas de búsquedas anteriormente descritas se tomaron en cuenta las siguientes consideraciones gramaticales y

observaciones de escritura en la forma de escribir los nombres y apellidos, según se trataran: el uso de letra **s** ó **z**; letra **i** ó **y**; uso de la letra **h** o sin **h**; usando **v** ó **b** ; **n** ó **m**; el uso de una vocal por otra; con presencia o ausencia de alguna consonante; si se encontraban homónimos, entonces se verificaban otros datos como edad, sexo, procedencia y la localidad donde vivían; el uso de abreviaturas con el segundo nombre o el segundo apellido o ausencia de algunos de los nombres (si estaba compuesto por dos) o del segundo apellido. En total se hicieron cinco búsquedas para encontrar individuos repetidores de infección por paludismo de toda la base de datos desde el año de 1996 al año 2007 y en cinco períodos diferentes en este trabajo de investigación y de esta manera se procedió a validar la presencia de individuos con recurrencias de paludismo en este período de tiempo.

Una vez que se terminó la búsqueda, se eliminó el nombre del paciente (la base original fue resguardada por el PI del proyecto). Cuando se encontraban pacientes con recurrencias se les asignaba un código con una letra "**R**" de paciente recurrente en otra columna (Q) y otra columna más (R) para la identificación del número de episodio de paludismo, usando el orden de las letras del alfabeto: "A" referente al primer episodio (infección primaria), "B" segundo episodio (primer recurrencia), y así sucesivamente se les asignó letras en el orden alfabético de acuerdo al número de recurrencias que presentara cada paciente. Otros datos importantes por calcular son los intervalos de tiempo entre las recurrencias y la infección primaria, por lo que se realizó una transferencia de datos de todos los individuos recurrentes, se ordenaron de manera cronológica de acuerdo al caso primario por cada paciente y sus recurrencias; en una columna denominada *intervalo entre recurrencias* se procedió a calcular este tiempo en semanas y meses; para determinar el tiempo de ocurrencia en las infecciones de paludismo subsecuentes a la infección primaria estos intervalos de tiempo entre cada infección se agruparon por trimestre y se asignó otro código de identificación en una columna y para apoyar más la presencia de infecciones recurrentes se aplicó un criterio de búsqueda de 3 años atrás para determinar antecedentes de la

infección por paludismo a cada individuo asignándoles el código CAP ó SAP (CAP: con antecedentes de paludismo; SAP: sin antecedentes de paludismo).

5.4.3 Procesamiento de la base de datos

5.4.3.1. Distribución de casos

Se graficaron los casos de paludismo por *P. vivax* desde los años de 1996 al 2007 a partir de la Base de datos única correspondiente a cada año de estudio por distribución de casos (región del Soconusco, Chiapas) destacándose los períodos de lluvia y seca, por grupo de edad y sexo (para conocer si existe predominio en alguno de los grupos etarios y determinar el porcentaje que corresponde a las recurrencias), por distribución de los casos de paludismo en rangos de edad por sexo donde de 1 año a 5 años se le asignó la primer letra del alfabeto A; de 6 a 14 años la letra B, y sucesivamente de 15 a 24 letra (C), de 25 a 36 (D), 36 a 45 (E) y mayor a 45 años (F). Para la distribución de edad y sexo de las recurrencias se utilizó la base de datos de los pacientes con recurrencias y se le aplicó un criterio de búsqueda de 3 años (mismo procedimiento anteriormente descrito para las recurrencias) del período 1999 a 2007 y para graficar se procedió en la misma forma que en los casos.

También se obtuvieron los porcentajes de los pacientes que tuvieron recurrencias con respecto al total de casos reportados y los porcentajes de acuerdo con el número de episodios de repetición de paludismo (se obtuvieron los porcentajes del número de pacientes que repitieron una vez, dos, tres o más veces) donde los datos se recolectaron de la base datos única y de la base de recurrencias.

Se observó también la relación entre los casos y las recurrencias con respecto al sexo y con respecto a la longitud de los intervalos de tiempo ocurrido entre infecciones por *P. vivax* distribuyendo los períodos de tiempo en trimestres (5-13 semanas primer trimestre, 14-26 segundo trimestre, 27-39 tercer trimestre, 40-52 cuarto trimestre) y con respecto al tiempo entre la búsqueda de diagnóstico

y el inicio de síntomas en días para determinar diferencias entre el grupo de casos primarios y recurrencias, el primer, segundo o tercer episodio. La distribución del tiempo en días expresado por el paciente desde el comienzo de síntomas hasta el momento en que acude a la clínica de salud y le diagnostican paludismo por *P. vivax*, a todos los pacientes con infección que contenían este dato (los años de 1996, 1997 y 1998 no tienen esta información) se seleccionaron los días de síntomas en rangos y cada rango se identificó con una letra del alfabeto de la letra "A" a la letra "H": de 0 a 5 días (A), de 6 a 10 días (B), 11 a 15 (C), 16 a 20 (D), 21 a 25 (E) , de 26 a 30 (F) , 31 a 35 (G) y de 36 a 40 días (H).

Para obtener los porcentajes por cada rango y grupo y el subgrupo de tiempo igual o menor a 12 meses entre infecciones (tiempo entre la IP y R), se aplicó el análisis estadístico *t de student* para comparar los días de síntomas entre el grupo y subgrupo de casos primarios y las recurrencias.

5.4.3.2 Cambios en la parasitemia

Para determinar si se presentaban cambios en la parasitemia de las recurrencias, se compararon las densidades parasitarias producidas entre el caso primario (IP) y la infección recurrente (IR) en distintos tiempos: grupo A con intervalo de 1 a 3 meses, grupo B de 3 a 6 meses y el grupo C de 6 a 12 meses. De la base de datos de recurrencias se seleccionaron a los pacientes que contaran con la información de la concentración parasitaria de sus episodios de paludismo, y se distribuyeron en cada grupo. Se anotaron los datos de edad y sexo de los pacientes así como los fenotipos del gen CSP VK210 y VK247 (6 pacientes carecieron de estos datos).

5.4.3.3 Distribución de los fenotipos del gen CSP

Para determinar la distribución de los fenotipos del gen CSP variantes VK210 y VK247 en los casos y recurrencias con los resultados de las personas a quienes se les realizó el gen de CSP de *Plasmodium vivax* de los años 2006 y 2007, estos se ordenaron por mes y año. De estas infecciones se procedió a seleccionar cuales eran casos y cuales eran recurrencias con ayuda de la base de datos de recurrencias y con la gráfica de recurrencias, y se distribuyeron por genotipo, VK210 y VK247.

5.4.3.4 Dinámica e intensidad de transmisión de paludismo

Para conocer la dinámica y la intensidad de la transmisión del paludismo se comparó el número de casos registrados del período 1996 al 2007, por año y la distribución mensual. Se graficó la distribución de los casos de paludismo totales por mes de cada año de estudio así como la presencia de pacientes que tuvieron infecciones posteriores al primer episodio (recurrencias) a través del tiempo en la región del Soconusco, Chiapas, durante el período de 1996 al 2007; se tomaron de la base única de datos el número de casos totales por mes de cada año y de la base de datos de recurrencias, se identificaron los casos primarios y las recurrencias; se contabilizaron separadamente por mes y año; estos datos se tabularon y se graficaron en una figura con dos escalas diferentes ; en el eje de las abscisas (X) el tiempo en meses y dos ejes de ordenadas (Y), del lado izquierdo de la gráfica las infecciones de paludismo en casos primarios y recurrencias y del lado derecho los casos totales informados por mes, con diferentes escalas. Para visualizar más los casos y las recurrencias se identificaron las infecciones que tuvo cada paciente de la manera siguiente: el caso primario se identificó con la letra "a", la primer recurrencia con la letra "b" , "c" y "d" con la tercer y cuarta recurrencia y sucesivamente en ese orden.

VI. RESULTADOS

6.1 Casos de paludismo reportados para la región de la Jurisdicción Sanitaria VII de Chiapas durante 1996-2007. El número de pacientes con infección de paludismo por *P. vivax* registrados en la Jurisdicción Sanitaria VII y organizados en la Base única de Datos fue de 9,105 (nueve mil ciento cinco), la Figura 4 muestra los casos acumulados de paludismo por año durante el período 1996-2007; se observa que después del año 1996 (n=534) hubo un incremento moderado de casos, el cual fue claramente notorio para el año 1998 (n=1662), más del doble de la cifra que había anteriormente. Después en 1999-2000 hubo una reducción discreta de casos, siendo nuevamente más notoria la reducción en el año 2001(n=506) con el 35% de los reportados en el año 2000 (n=1460). Los años siguientes hubo variaciones pero con tendencia a la disminución de casos de paludismo para los años 2003, 2004 y 2005, en este último año la región alcanzó los niveles más bajos históricamente, con sólo 155 casos. Posteriormente, para el 2006 y 2007, el número de casos se incrementó cuatro veces más (n=653 y n=641 respectivamente) en comparación al año anterior.

6.2 Distribución de la frecuencia mensual de casos de paludismo reportados para la región de la Jurisdicción VII de Chiapas durante 1996-2007. Para observar la dinámica de la transmisión en la zona, el número de casos de paludismo se agruparon por mes durante el periodo bajo estudio (Figura 5) indicando el periodo que corresponde a la temporada de lluvias (abril-septiembre/octubre) y de secas (enero a febrero/marzo y noviembre a diciembre). En el año de 1996 se observa una gráfica aplanada con un discreto incremento en el número de casos durante abril-agosto que corresponde a la temporada de lluvias; en el año 1997 la distribución se casos es muy similar a la anterior con un discreto incremento en los casos durante marzo-mayo así como en noviembre; el año 1998, se presentó un notable incremento iniciando en abril, continuando el incremento en mayo y alcanzó el mayor registro en junio, el cual mostró descenso gradual los siguientes meses julio—agosto, el resto de los meses el reporte fue

constante y bajo. En 1999 es una dinámica similar a la anterior pero desplazada hacia el periodo febrero-junio con pico máximo en abril y un incremento en noviembre de mayor magnitud al reportado en 1997. Para el año 2000, el reporte de casos permaneció alto en enero-mayo descendiendo en junio-agosto y un pequeño incremento en noviembre nuevamente. Mientras en el 2001 la gráfica se aplanó nuevamente con dinámica similar a la encontrada en el año de 1996. Para los años siguientes los gráficos variaron en esquemas ya mostrados anteriormente; en el año 2002 se observa el incremento de casos en abril-junio cayendo drásticamente para julio y manteniendo niveles bajos los demás meses; el 2003 fue parecido pero con cifras más bajas, que se redujeron aún más en el 2004 y en el 2005. Los dos años siguientes la curva de casos se levantó, siendo mayor en el 2006 con mayor reporte en abril-junio y en el 2007 en marzo-mayo.

6.3 Distribución de la frecuencia de casos primarios de paludismo y recurrencias de los 3 años posteriores por edad y sexo para la región de la Jurisdicción Sanitaria VII de Chiapas durante 1999-2007. Distribución de casos de paludismo por edad y sexo durante 1996-2007. Los casos primarios de paludismos se encontraron presentes en ambos sexos y distintos grupos de edad, el grupo de menos de 5 años mostró el menor número de casos (8.3%) con cifras similares para niños y niñas (47% de sexo femenino y el 53% de sexo masculino). En los grupos de edad 6-14 y 15-24 años mostraron mayor número de casos (24.2% y 23.2% respectivamente) con mayor porcentaje del sexo masculino (54.2 y 55.4 respectivamente). En el grupo de edad de 25-35 el número de casos se redujo al 17.9% del total siendo también mayor los del sexo masculino (53.7%). Los grupos de edad mayor, de 36-45 y más de 45 mostraron el 12% y 14.4% del total reportado, de forma similar los del sexo masculino fueron el mayor porcentaje (55 y 57% respectivamente) (Figura 6). Con respecto a las recurrencias, este grupo de 0-5 años de edad también repite la infección por *P. vivax* y hay un mayor porcentaje en el sexo femenino (63.6%) que en el masculino (36.4%) así como en el grupo de 25-35 años de edad (51.9% y 48.1% respectivamente) mientras que los demás grupos muestran un porcentaje más elevado en el sexo masculino

(51.5%) que en el femenino (48.5%); los porcentajes por grupo de edad son: 0-5 años , 7.8%; 6-14 años, 21.2%; 15-24 años, 23%; 25-35 años, 18.8%; 36-45 años, 11.2% y 46 o más años, 18%; y el mayor porcentaje en las recurrencias fue en el grupo de 15 a 24 años de edad, seguido por el grupo de 6 a 14 años; no se observa una notable diferencia entre el sexo masculino y el sexo femenino ni en las infecciones primarias ni en las recurrencias; y todas las edades son susceptibles de tener la infección de paludismo por *P. vivax*.

De un total de 9,105 datos reportados de infecciones de paludismo por *P. vivax* proporcionados por la Jurisdicción Sanitaria VII para la zona del Soconusco, Chiapas, México del período 1996-2007; 697 infecciones correspondieron a recurrencias (R) producidas en 608 pacientes; del total de número de pacientes, el 7.2% mostraron una o más recurrencias; el 77.6% mostraron una infección recurrente con *P. vivax*, 15.2% fueron afectados por dos infecciones recurrentes después de la infección primaria, el 5.1% sufrieron tres recurrencias y el 2.1% fueron con más de tres recurrencias.

6.4 Distribución anual de los casos primarios de paludismo y recurrencias en el periodo de 3 años por sexo para el periodo 1999-2007. En general el número de casos de paludismo por año fue mayor para el sexo masculino (Figura 7A); mientras que para las recurrencias se reportaron números similares para ambos sexos (Figura 7B); cabe destacar que el punto máximo de personas reportadas infectadas con *P. vivax* se da entre los años 1998 al 2000, aunque las recurrencias se señalan sólo para 1999 en adelante (de los 3 años previos a 1999 no hubo información disponible para realizar el cálculo). La proporción de casos relacionados a recurrencias siguió la dinámica del reporte de casos totales; a mayor incidencia fue mayor el número de recurrencias, por ejemplo en los años 2004-2005 donde se reportaron el menor número de casos (n=180 y n=142 respectivamente) así también las recurrencias (n=32 y n=13 respectivamente) pero al incremento de casos en el 2006 y 2007 (n=613 y n=589 respectivamente) fue acompañado del incremento en el número de recurrencias (n=40 y n=52 respectivamente).

6.5 Distribución de recurrencias por intervalo de tiempo con respecto a la infección primaria. Para determinar el patrón de ocurrencia de infecciones recurrentes post-infección primaria, éstas se agruparon por trimestre (Figura 8; total 697); la mayoría de las recurrencias ocurrieron dentro del primer año posterior a la detección de la infección primaria (74.3%; 518 infecciones recurrentes) distribuidas en los cuatro trimestres de año (Figura 5) siendo mayor los porcentajes para el tercer y cuarto trimestre (61.4%; 318/518). 65 recurrencias ocurrieron dentro del segundo año post-infección primaria, siendo el 63% (41) entre 12-18 meses. Produciendo un total acumulado del 80.2% de recurrencias ocurriendo dentro de los primeros 18 meses (518+41/697 post infección primaria). En los años siguientes de 3 al 6 años la prevalencia de infecciones recurrentes fue disminuyendo de forma gradual a 4.6%, 3.5%, 3.1% y 1.7% respectivamente y 3.5% de recurrencias totales se presentaron después de los 6 años, todas distribuidas en los cuatro trimestres de cada año.

6.6 Análisis de los intervalos de tiempo entre la percepción de los síntomas y la búsqueda de atención ó detección de la infección con paludismo. El tiempo en días entre que el paciente se percata (indicado al momento que asiste en búsqueda de diagnóstico) del inicio de síntomas (principalmente fiebre, dolor de cabeza, dolor de cuerpo, dolor de articulaciones y paroxismo) y la toma de muestra de sangre para la confirmación de la infección por diagnóstico parasitológico varió desde 1 a 38 días. Del total de pacientes con un episodio primario de paludismo (n=5097), el 63.7% buscó atención dentro de los primeros 5 días después del inicio de síntomas, otro 25.3% entre 5 a 10 días, así como después de 10 días el 11% buscó atención y diagnóstico (Figura 9). Los días con síntomas de las infecciones recurrentes (n=486) mostraron un porcentaje ligeramente mayor a cuando se presentó el caso primario; 75.5% buscó atención en los primeros 5 días y el 18.5% lo hizo entre los 5 y 10 días y el 6% restante se retrasó más de 10 días. Los pacientes que presentaron una infección recurrente

(n=374) mostraron una distribución parecida a cuando se presentó su caso primario (n=304); los días de síntomas para los casos primarios en pacientes que tuvieron una infección recurrente el 62% buscó atención dentro de los primeros 5 días después del inicio de síntomas, el 27.2% lo hizo entre los 5 y 10 días, y el 10.8% restante se retrasó más de 10 días en la búsqueda de atención, mientras que para las infecciones recurrentes fueron de 75%, 18% y 7% respectivamente.

Cuando correspondía a una segunda recurrencia (n=76), el 97.3% de personas mostró la búsqueda de atención dentro de los 10 días de percibir los síntomas, ligeramente más elevada vs 89% y 93% para la infección primaria y la primer infección recurrente; para pacientes que presentaron una tercer recurrencia o más (n=36), aunque pocos, todos buscaron atención dentro de los primeros 10 días, siendo el 80% dentro de los primeros 5 días posterior a la infección primaria.

Algunos pacientes que en la infección primaria no se presentaron pronto (se tardaron más de 20 días y tampoco sabemos si asistieron por su cuenta o fueron encontrados enfermos en sus casas) para el diagnóstico y tratamiento cuando se enfermaron por segunda vez si asistieron en pocos días, rara vez de forma inmediata. En contraste, otros pacientes que habían buscado atención en pocos días, la segunda vez que presentaron la infección sintomatológica se retrasaron en buscar atención, un paciente la primera vez se diagnosticó 12 días después del inicio de síntomas, a la presencia de una infección recurrente se tardó 9 días y al presentar la tercera infección recurrente mencionó haber estado con síntomas por 38 días. En la comparación del número de días con síntomas entre 2 grupos, el valor *P* no fue estadísticamente significativo para los días de síntomas (n=259) de los casos primarios contra la primer infección recurrente (valor *P* de 0.148) mientras que para el subgrupo con intervalo de tiempo entre las infecciones igual o menor a un año (n=233) mostró diferencia estadísticamente significativa (valor *P* de 0.01018).

6.7 Variaciones de la parasitemia con respecto al intervalo de tiempo entre la infección primaria y recurrente. La comparación de las densidades parasitarias producidas en la infección primaria (IP) y en los episodios posteriores de paludismo (Fig. 7) mostró que las parasitemias producidas en recurrencias con latencia corta (Grupo A: dentro de 3 meses) fueron en general menores que las encontradas en la infección primaria (figura 7), en los pacientes 20 y 25 la parasitemia fue muy elevada (>20,000 p/µl) en la infección primaria pero esta se encontró en densidades muy bajas (<5,000 p/µl) en la recurrencia, en los pacientes 15, 16 y 32 la densidad de parásitos de *P. vivax* en la infección primaria fue mayor en distintos grados, dos con parasitemias mayores de 10,000 y otra menor a 5000 p/µl; en los pacientes 19 y 28 la parasitemia de ambas infecciones primarias fueron <5,000 p/µl muy similar a la registrada para la recurrencia. Las densidades parasitarias producidas en la IP y en los episodios recurrentes de paludismo (R) con intervalo de tiempo entre 3-6 meses (Grupo B) 2 de 5 pacientes tuvieron mayor densidad de parásitos en la IP que en la R; en el paciente 8B la parasitemia fue más elevada en la IP (>15,000 p/µl) y menor en la recurrencia ~5,000 p/µl, mientras el paciente 33B tuvo menos aprox. 5,000 p/µl en la IP y ~1,500 p/µl. En el paciente 14B en ambos episodios las parasitemias fueron bajas aunque el tiempo de infección de la recurrencia fue más largo. En otros dos pacientes (27B y 38B), las parasitemias en la recurrencias fueron mayores (>15,000 p/µl y 5,000 p/µl respectivamente) que en la IP (~2,000 y 800 p/µl respectivamente).

Para el grupo C que contiene intervalos de tiempo de 6 a l2 meses entre la infección primaria y la recurrencia se encontraron distintos patrones de parasitemia, muy similares a los descritos en los grupos anteriores (Figura 10).

6.8 Distribución de la frecuencia del genotipo de CSP de *P. vivax* en infecciones primarias y recurrentes por mes durante 2006-2007. De las muestras de pacientes procesadas para el gen de CSP de *P. vivax* para el año 2006 (n=126) 45.3% resultaron VK210, 49.9% VK247 y un 4.8% fueron mixtos (VK210 y VK247). Para el año de 2007 (n=135), el 45.2% fueron VK210, 50.4% VK247 y un 4.4% mixtos; de los casos mixtos, uno de ellos provenía de una recurrencia. Se detectaron 95 personas con infección recurrente de los años 2006 y 2007, de las cuales se obtuvieron 41 muestras de sangre con *P. vivax* (45%); 17 (de 40) fueron de pacientes del año 2006, ocho fueron VK210 y ocho fueron VK247, un paciente presentó una infección mixta VK210/VK247. Mientras de 25 (de 55) del año 2007, 11 fueron VK210 y 14 fueron VK247.

La presencia de ambos genotipos tanto en los casos primarios como en las recurrencias fue observada en todos los tiempos, donde se contaba con menos muestras se podían ver tendencias a predominar un genotipo, pero en los tiempos donde fueron más numerosos fue muy equilibrada la presencia de ambos genotipos (Figura 11).

6.9 Relación de casos primarios y los episodios recurrentes (R) en la dinámica de la transmisión. La gráfica 12 muestra los casos de paludismo que se encuentran registrados en todos los meses del año, los años de 1998 a 2000 fueron de mayor transmisión y otros con muy baja transmisión como el período 2004 a 2005 (las dos cifras más bajas de transmisión durante todo el período de estudio). En los años 1998 a 1999 se observa una transmisión estacional que es menos marcada en el 2000 y después fue notoriamente estacional nuevamente mostrando fluctuaciones consistentes con incrementos graduales a partir del mes de enero, alcanzando picos en abril, mayo o junio para la mayoría de los años y decremento hasta muy bajos niveles en agosto y hasta noviembre más marcado para el periodo 2001 a 2007.

Se muestra que para cada mes un número de pacientes que por primera vez se registraron con la infección con *P .vivax* (Figura 12; barra gris) y que posteriormente presentaron una recurrencia con variable intervalo de tiempo (un mes, varios meses o años después) la cual fluctuó de acuerdo a la intensidad de la transmisión o número de casos registrados.

Las recurrencias de variable intervalo de tiempo (Figura 12; barra negra) también se observaron distribuidas en todos los meses con mayor número, antes, durante y después del pico de transmisión y en algunos años su número se mantuvo alto durante los meses de baja transmisión.

En el análisis de un pico de transmisión de paludismo, por ejemplo en el mes de mayo de 2006 con 651 casos totales recopilados, se aprecia que muchos de los pacientes a quienes se les detectó paludismo recurrente en este mes, habían enfermado una o más de una vez previamente con intervalo de tiempo variable, por ejemplo los pacientes 579 y 585 en ambos con caso primario un mes antes abril de 2006 (sin más infecciones posteriores dentro del periodo analizado); muchos de estos pacientes presentaron su primer caso de paludismo en los años 2000, 2001 y más atrás, sólo en un paciente se registró el caso primario en el 2005.

En el paciente 70, se registró el primer caso de paludismo en abril de 1997, segundo en octubre de 1999, tercero en mayo de 2006 y cuarto episodio en diciembre de 2007. El paciente 516 con caso primario en mayo de 2002, primer recurrencia en marzo de 2003, segunda recurrencia en mayo de 2006 y después una tercera recurrencia en abril de 2007; mientras que otros tienen su primer ataque en este mes (sin historia de infección de paludismo previamente) como los pacientes 587 y 589, con segundo episodio en mayo de 2007 y diciembre de 2006 respectivamente.

En la figura B están señalados diferentes períodos de baja transmisión de paludismo de los meses de septiembre a diciembre para los periodos del 2002 al 2006; para los años de más baja transmisión (2003,2004,2005) se aprecia que las infecciones recurrentes fueron de mayor número que las infecciones primarias que posteriormente están relacionadas a episodios recurrentes, lo cual también se relaciona con la baja transmisión y con diferentes intervalos de tiempo entre las infecciones; así se observa en julio-septiembre de 1999, julio-octubre 2000, julio-febrero 2001-2002, marzo-diciembre 2007; puede observarse que hay pacientes que refirieron haber tenido su primer caso de paludismo en Mayo del 98' y febrero del 99' en momentos de alta transmisión pero que tuvieron su primer recurrencia en un tiempo de baja transmisión en noviembre de 2002 y diciembre de 2003, pacientes 155 y 263 respectivamente; caso contrario para los pacientes 534 y 535 con casos primarios en el mes de Noviembre de 2002(tiempo de baja transmisión) y recurrencias en período de alta transmisión, Febrero y Abril de 2003 respectivamente; así como pacientes en donde las infecciones de paludismo registradas ocurrieron en temporada de baja transmisión, como los pacientes 562 con caso primario en diciembre de 2003 y recurrencia en agosto de 2004 y el paciente 569 con primera infección en febrero de 2005 y repeticiones en octubre de 2005 y enero de 2006 (1R y 2R) respectivamente.

Capitulo VI . RESULTADOS

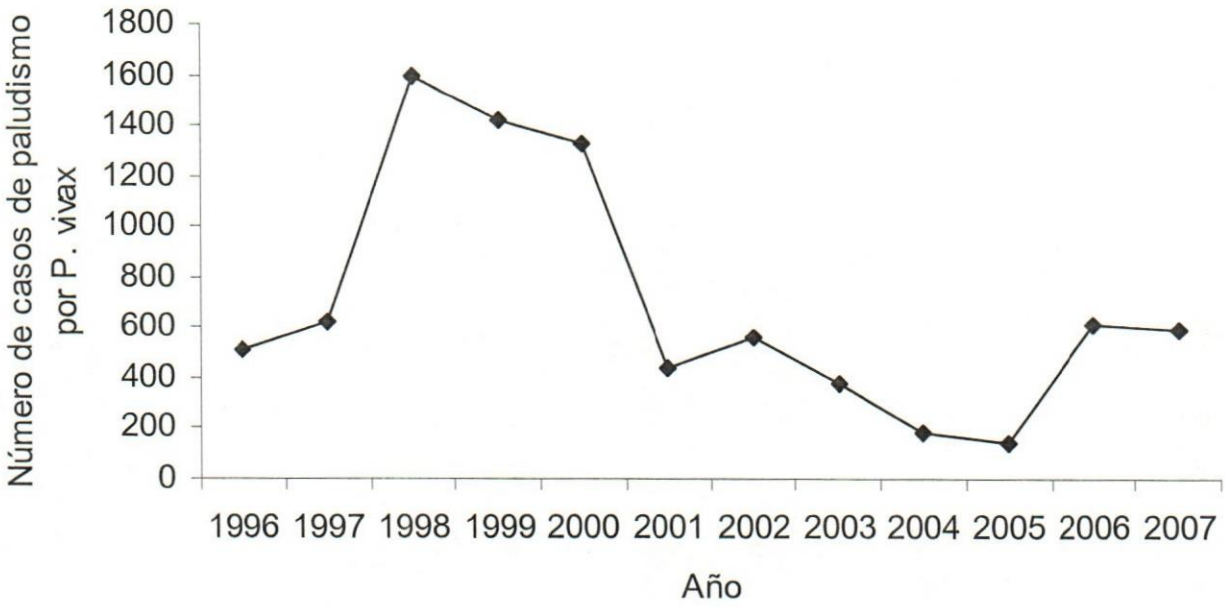


Figura 4. Casos de paludismo por *P. vivax* por año del período 1996 a 2007 en la región del Soconusco, Chiapas, México; los datos fueron obtenidos de la Jurisdicción Sanitaria VII.

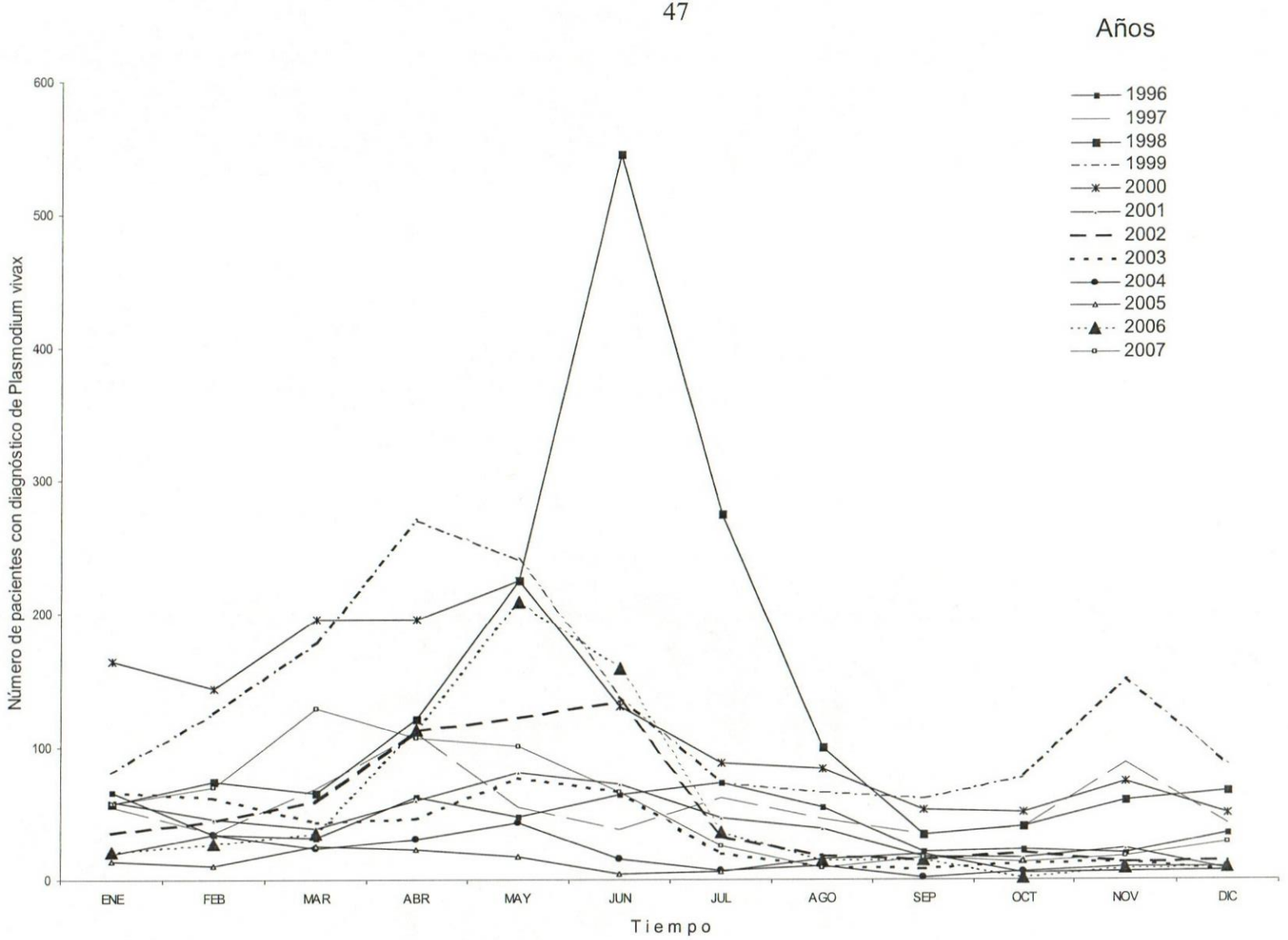


Figura 5. Distribución de casos de paludismo observados por mes durante el período 1996 al 2007.

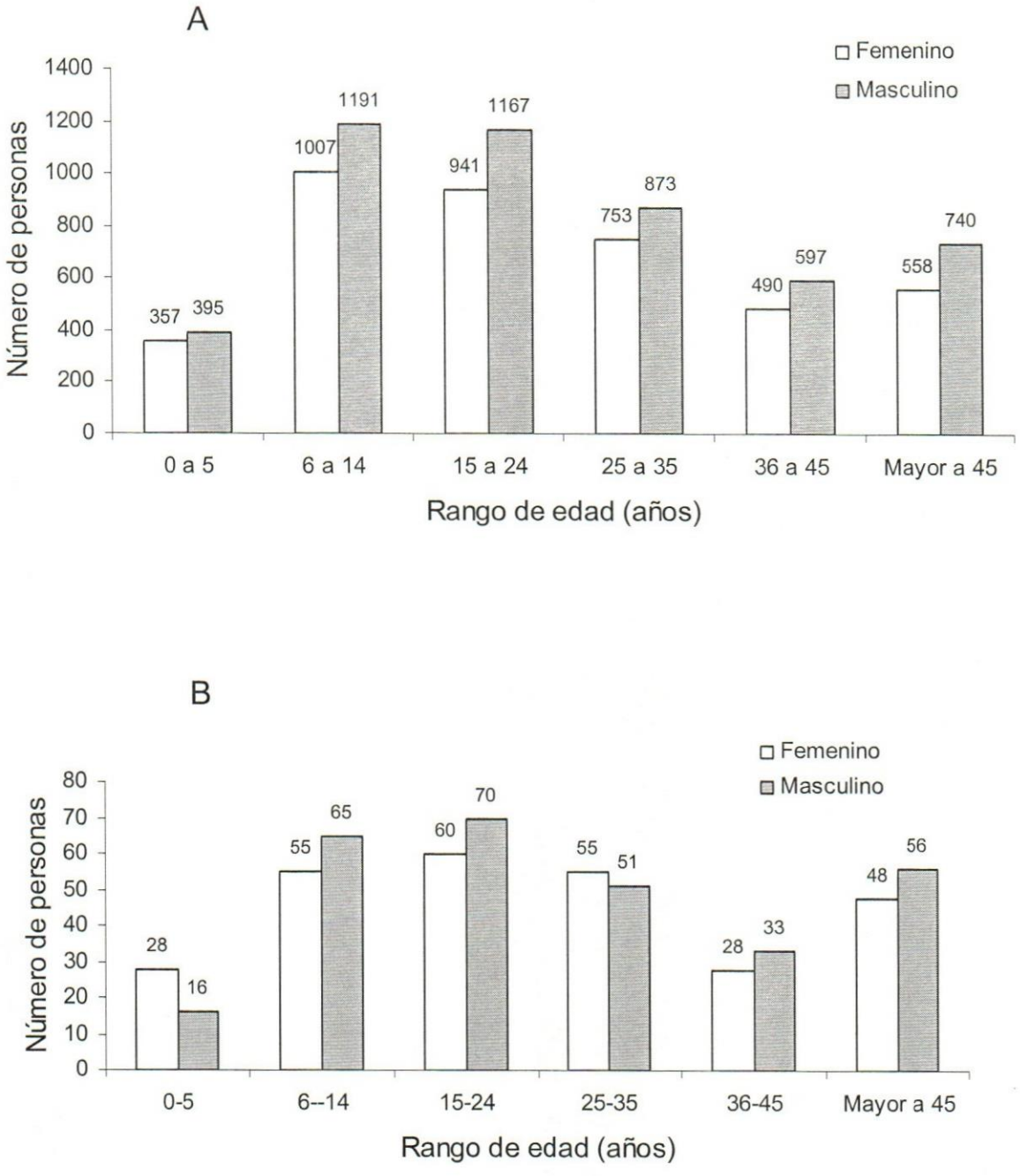
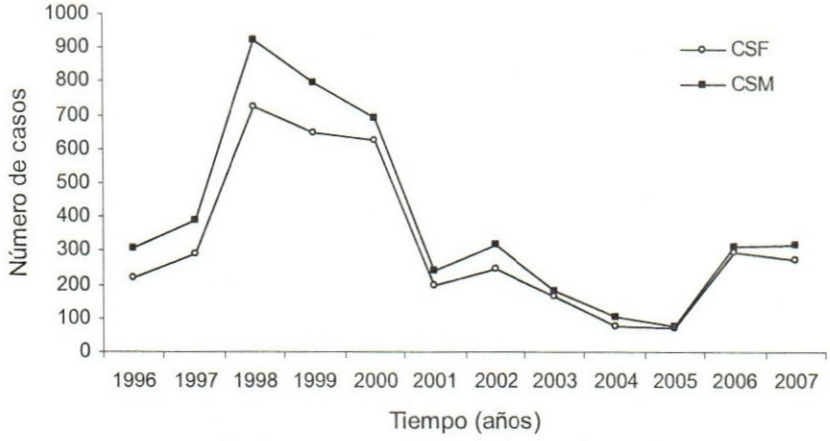


Figura 6. Distribución de casos de paludismo (A) por *P. vivax* y recurrencias (B) en rangos de edad y sexo en la zona del Soconusco, Chiapas, México del período 1999 a 2007.

A



B

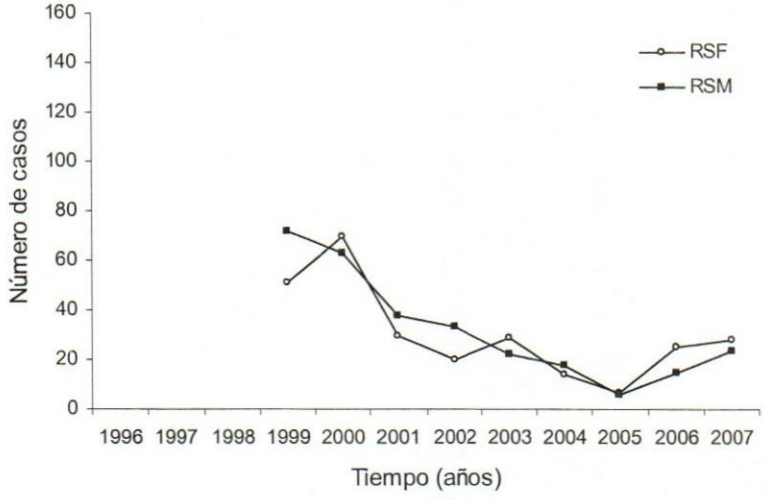


Figura 7. A) Relación de la infección primaria por *P. vivax* en personas del sexo femenino y masculino del período 1996 a 2007 del Sur de México. B) Relación entre las recurrencias de paludismo por *P. vivax* en personas del sexo femenino y masculino del período 1999 a 2007 del Sur de México. Los casos recurrentes de paludismo se identificaron mediante la identificación de cada persona de su primer reporte de paludismo y la búsqueda de casos previos a 3 años. CSF, casos sexo femenino; RSF, recurrencias sexo femenino; CSM, casos sexo masculino: RSM, recurrencias sexo masculino.

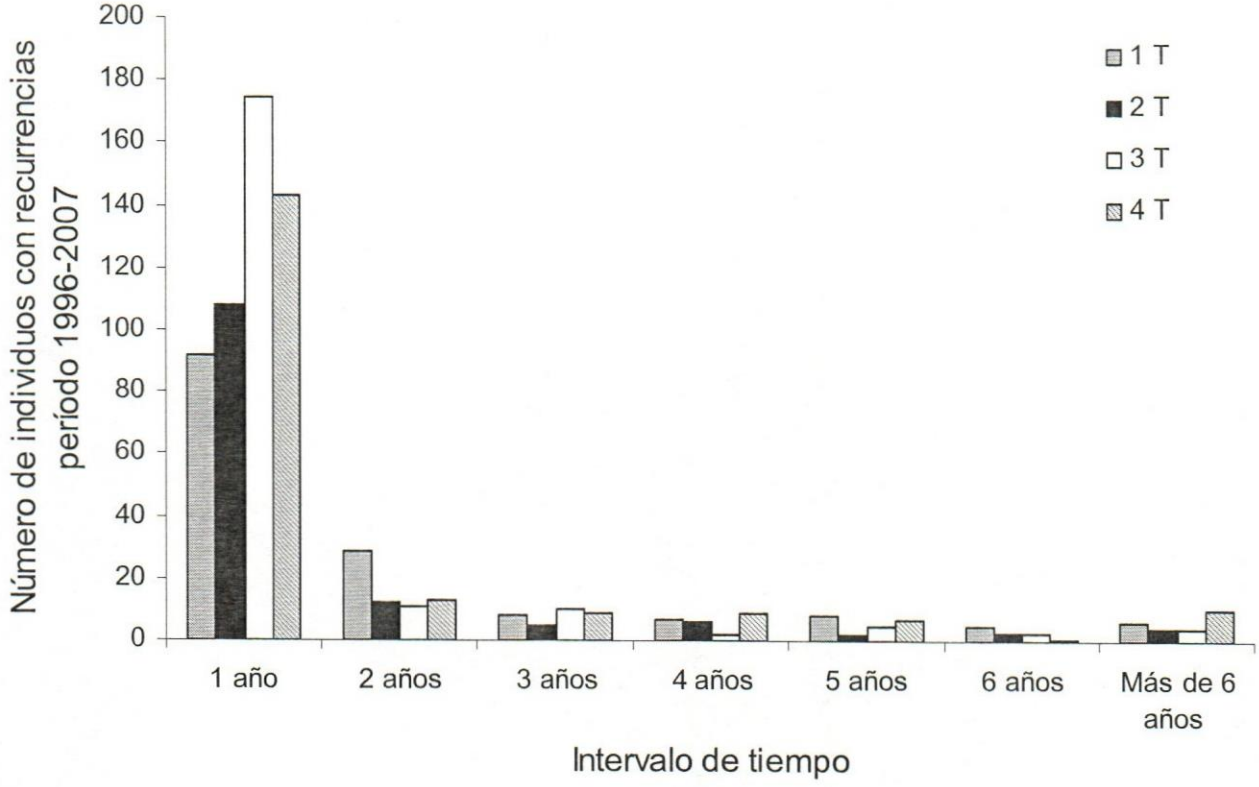
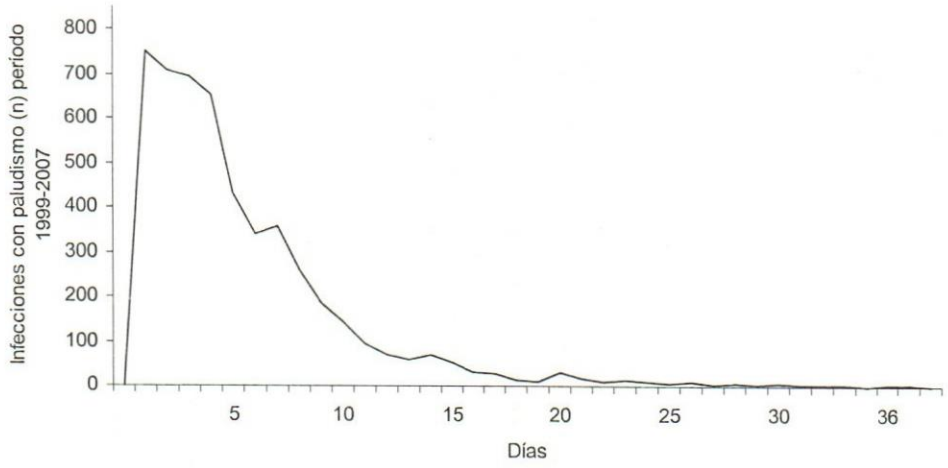
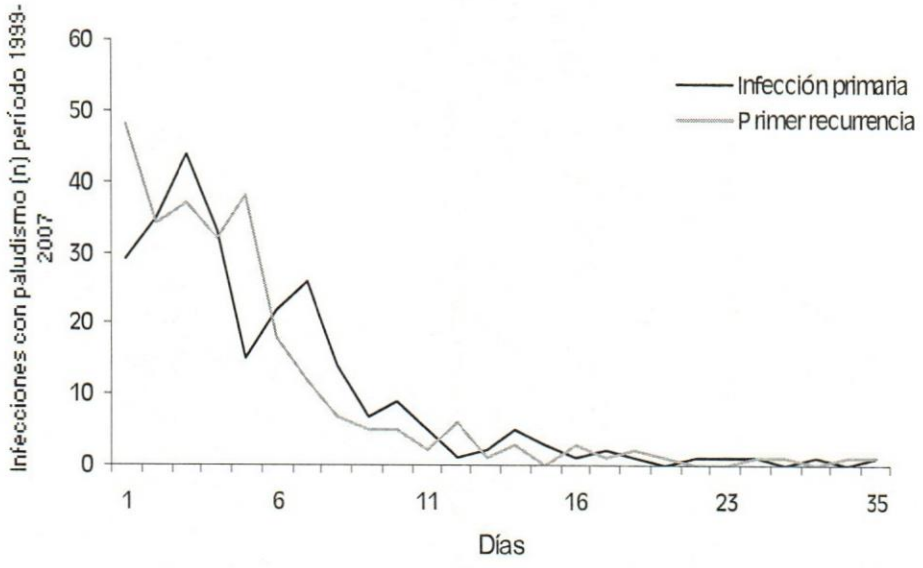


Figura 8. Distribución de las recurrencias producidas por *P. vivax* con respecto a la infección primaria agrupadas por trimestres en la zona del Soconusco, Chiapas, México del período 1996-2007. 1T, primer trimestre; 2T, segundo trimestre; 3T, tercer trimestre; 4T, cuarto trimestre .

A


Infecciones con paludismo (n) período 1999-2007
800
700
600
500
400
300
200
100
0
5
10
15
20
25
30
36
Días

B


Infecciones con paludismo (n) período 1999-2007
60
50
40
30
20
10
0
1
6
11
16
23
35
Días
Infección primaria
Primer recurrencia

C

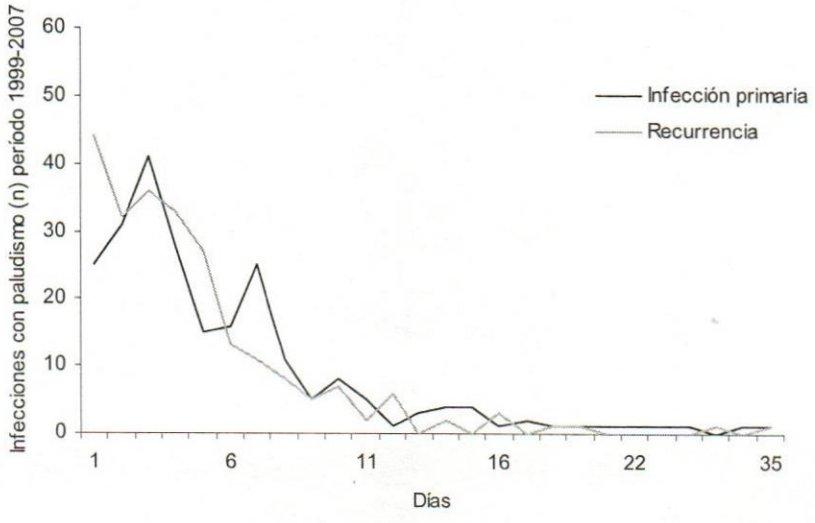
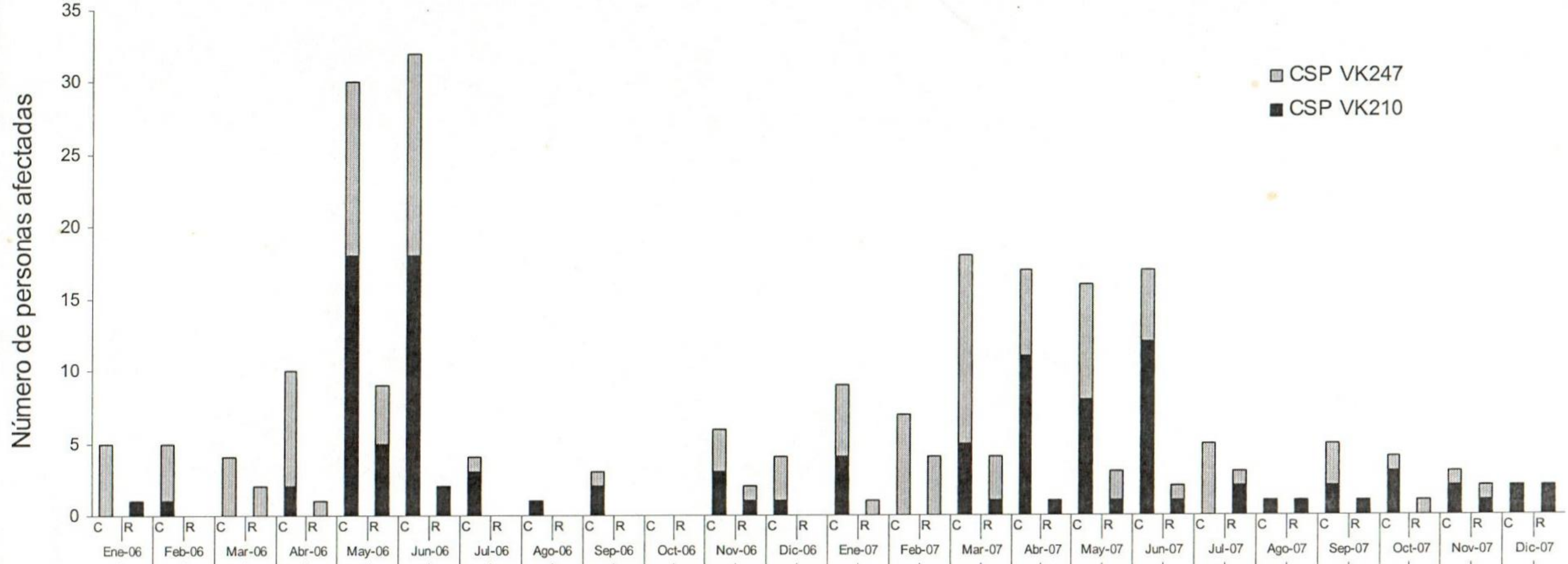

Infecciones con paludismo (n) período 1999-2007
60
50
40
30
20
10
0
1
6
11
16
22
35
Días
Infección primaria
Recurrencia

Figura 9. Comparación del número de días con síntomas previo a la detección de la infección primaria y recurrente. Distribución del tiempo en días entre el inicio de síntomas referido por el paciente y la búsqueda de diagnóstico parasitológico de los años de 1999 a 2007. A) Se indican los días que los pacientes con casos primarios mencionaron haber tenido síntomas previos a la búsqueda de atención (n=5097). B) Del grupo de pacientes con registro de los días de síntomas para su caso primario por *P. vivax* (n=259) y al menos un caso recurrente posterior a la IP. C) Un subgrupo de pacientes con registro de días de síntomas de su caso primario y su primer caso recurrente (n=233) que ocurrió únicamente dentro de los 12 meses después de la IP.



	Ene-06 C	Ene-06 R	Feb-06 C	Feb-06 R	Mar-06 C	Mar-06 R	Abr-06 C	Abr-06 R	May-06 C	May-06 R	Jun-06 C	Jun-06 R	Jul-06 C	Jul-06 R	Ago-06 C	Ago-06 R	Sep-06 C	Sep-06 R	Oct-06 C	Oct-06 R	Nov-06 C	Nov-06 R	Dic-06 C	Dic-06 R
CSP VK247	5	0	4	0	4	2	8	1	12	4	14	0	1	0	0	0	1	0	0	0	3	1	3	0
CSP VK210	0	1	1	0	0	0	2	0	18	5	18	2	3	0	1	0	2	0	0	0	3	1	1	0

	Ene-07 C	Ene-07 R	Feb-07 C	Feb-07 R	Mar-07 C	Mar-07 R	Abr-07 C	Abr-07 R	May-07 C	May-07 R	Jun-07 C	Jun-07 R	Jul-07 C	Jul-07 R	Ago-07 C	Ago-07 R	Sep-07 C	Sep-07 R	Oct-07 C	Oct-07 R	Nov-07 C	Nov-07 R	Dic-07 C	Dic-07 R
CSP VK247	5	1	7	4	13	3	6	0	8	2	5	1	5	1	0	0	3	0	1	1	1	1	0	0
CSP VK210	4	0	0	0	5	1	11	1	8	1	12	1	0	2	1	1	2	1	3	0	2	1	2	2

Figura 11. Distribución de los fenotipos del gen CSP VK210 y VK247 de *P. vivax* en casos primarios (C) y recurrencias (R) ocurridas por mes para los años de 2006 y 2007.

N total de pacientes registrados con Infección por *P. vivax* (casos)

	2006											2007											
ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC
21	27	35	113	209	159	36	15	15	2	9	10	57	70	129	107	101	66	26	9	17	13	18	28

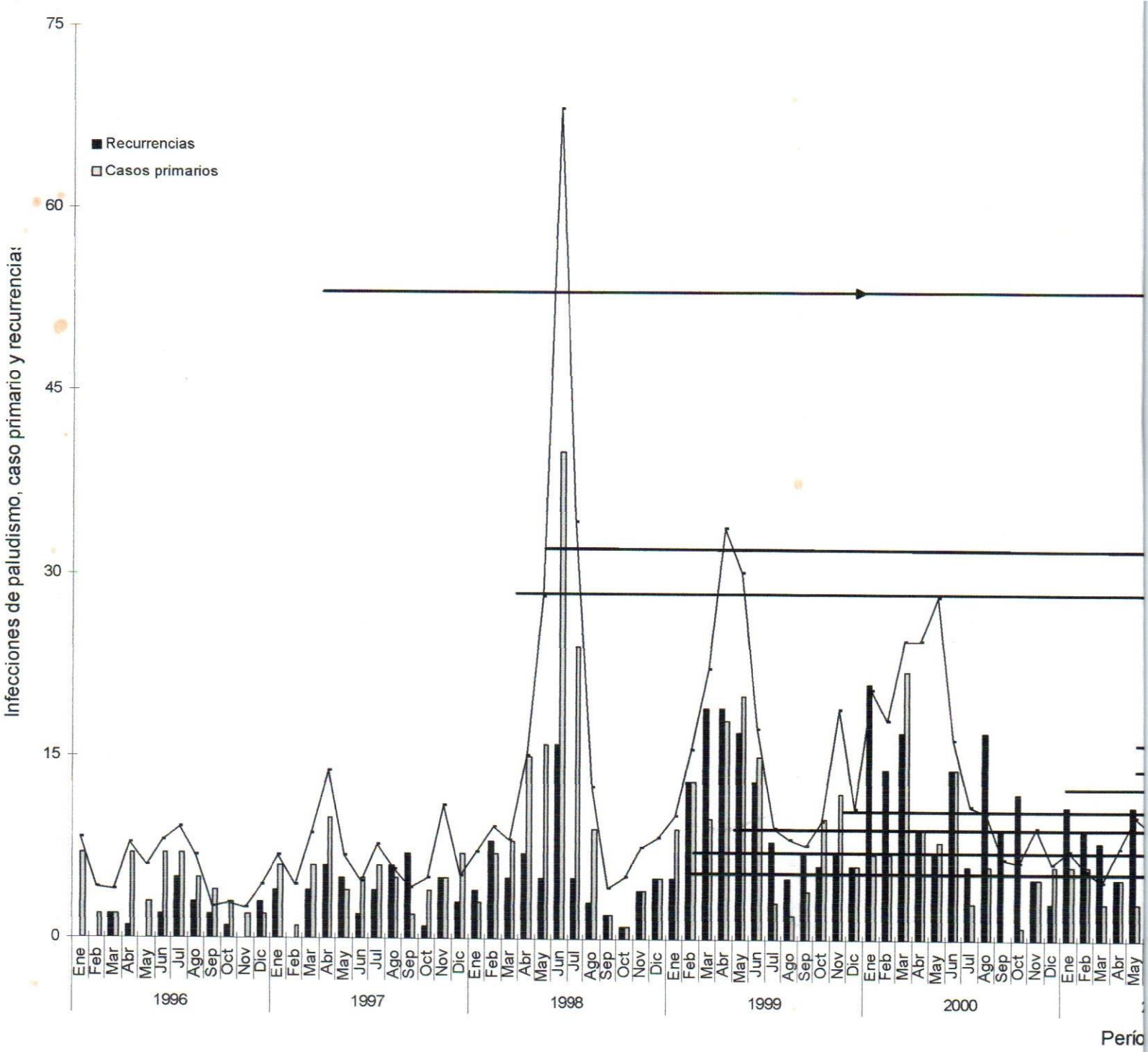
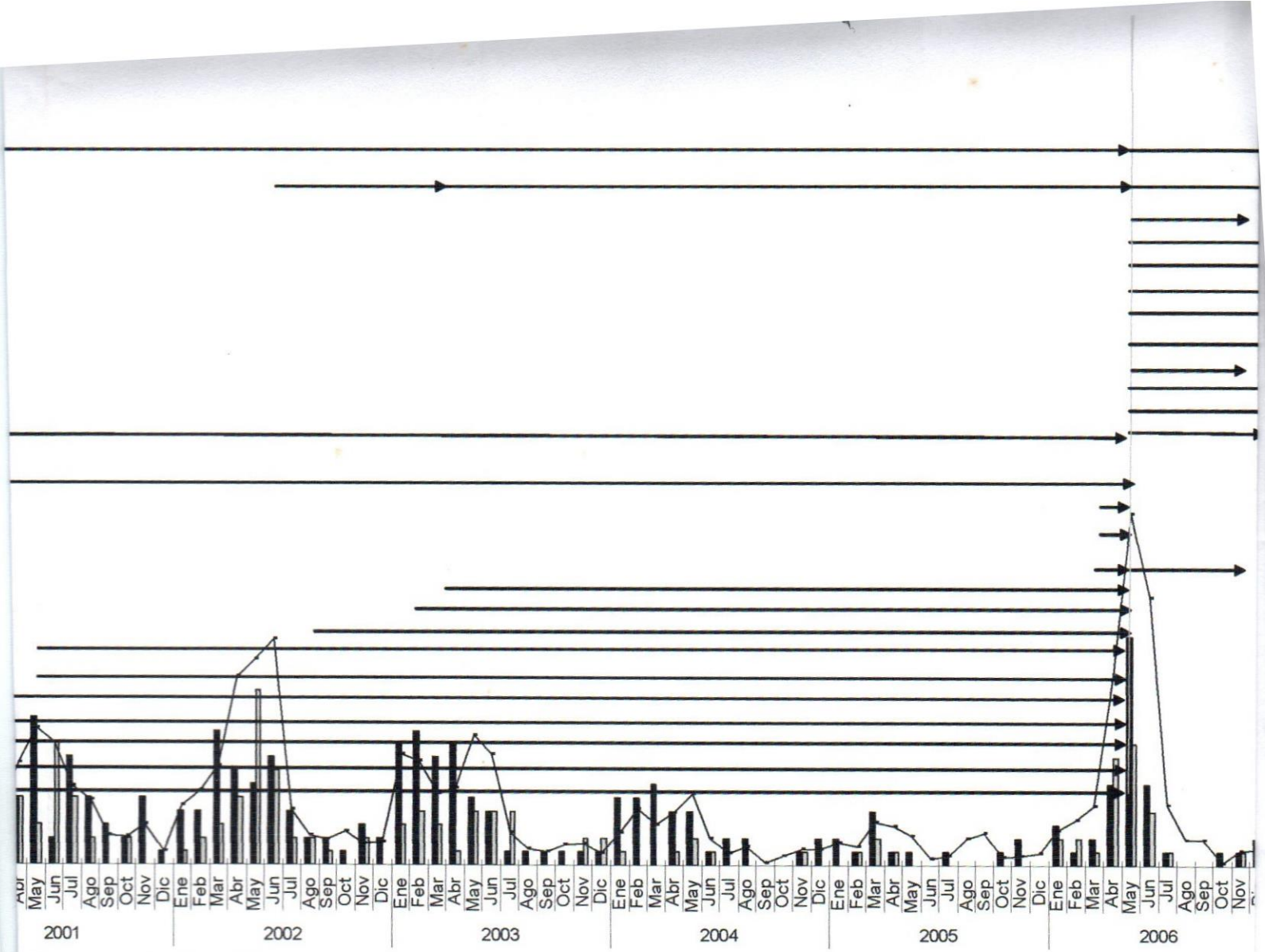


Fig.12 Distribución mensual de los casos de paludis
de Chiapas para el período 1996 - 2007. Las bar
únicamente de pacier
Ejemplo A , asociación de los casos recurrentes ó
previos ó posteriores epis



eríodo de tiempo (1996 - 2007)

dismo por Plasmodium vivax concentrados en la Jurisdicción Sanitaria VII
barras negra y gris indican el número de casos primarios y recurrentes
ientes detectados con más de un episodio.
ó primarios que ocurrieron en mayo de l 2006 (pico de transmisión) con
isodios de paludismo en las mismas personas.

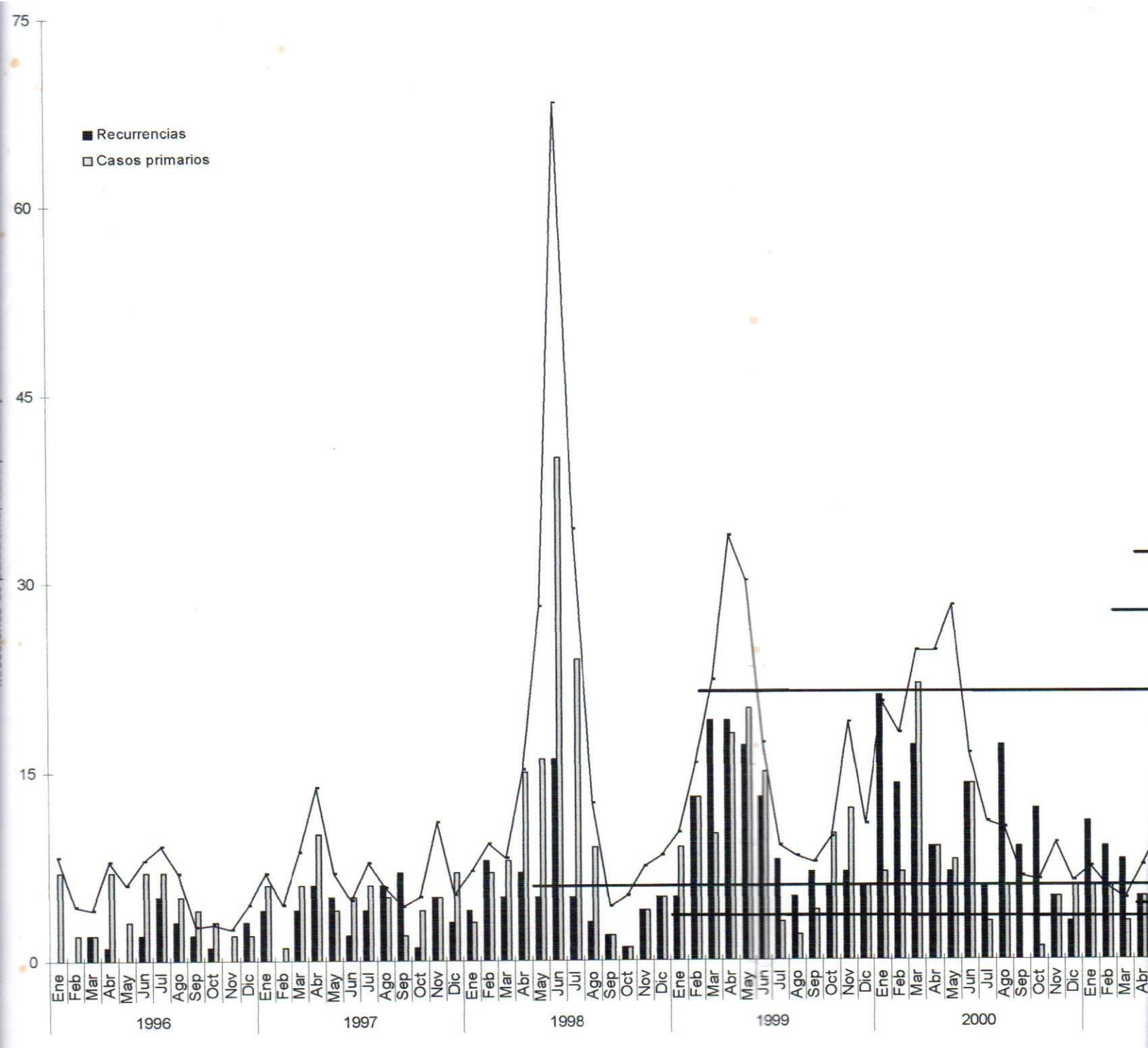
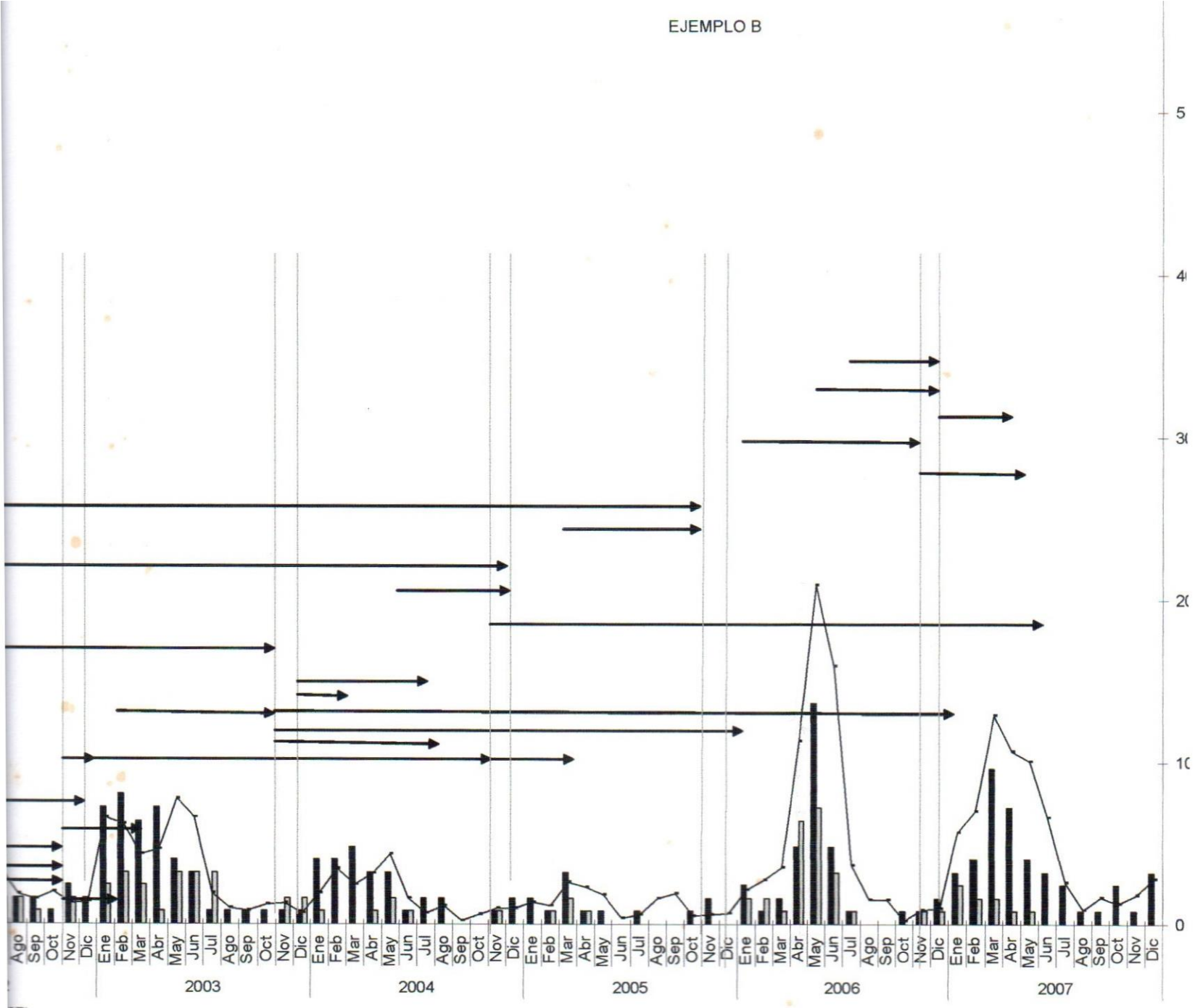


Fig.12 Distribución mensual de los casos de pa
Chiapas para el período 1996 - 2007. Las barras
de pacien
Ejemplo B, asociación de los casos recurrente
2002-2006 con previos ó p

EJEMPLO B



07)

n vivax concentrados en la Jurisdicción Sanitaria VII de
úmero de casos primarios y recurrentes únicamente
de un episodio.
eron en distintos momentos de baja transmisión del
paludismo asignado por persona.

VII. DISCUSIÓN

Las recurrencias por *P. vivax* pueden deberse a recaídas o re-infecciones, esta relación varía según la intensidad de la transmisión (Chen *et al.,* 2007; Imwong *et al.,* 2007), la temporalidad y frecuencia con que se presentan las recaídas depende de la región y efectividad de los tratamientos utilizados (OMS, 2010). En México incluyendo la zona del Soconusco, desde 1999 los tratamientos utilizados constan de dosis únicas mensuales intermitentes por 3 años, 3x3x3 (NOM2002 y 2010) como parte de la estrategia focalizada del control que aplicada con otras medidas para el control del vector han mostrado ser eficientes pero sin evidencia de su eficacia; en años recientes la transmisión ha disminuído de forma importante y se le considera zona hipoendémica donde es probable que las personas afectadas reciban un piquete infectivo al año (Mason,1975; Imwong et al., 2007) . Bajo estas condiciones, la presencia de casos recurrentes dentro de un año tienen mayor probabilidad de ser recaídas, de hecho la OMS indica un consenso global, que la mayoría de las recaídas ocurren entre 5-45 semanas.

En Centro América se ha sugerido que las recaídas de largo tiempo reinician cada ciclo de transmisión (Mason, 1975). Además de que observamos que los casos recurrentes están al inicio de la transmisión, muchos casos recurrentes fueron ubicados durante la transmisión activa, incluso a lo largo del año de 2004 cuando se registró el menor número de casos. Es posible que los casos recurrentes por recaídas hayan contribuido a la persistencia de la transmisión previo a la dispersión que se observó en el 2006-2007, denotado por el incremento de casos reportados, las intensas lluvias del fenómeno natural el huracán Stan que azotó a la región del Soconusco en 2005 contribuyó con este aumento así como también el huracán Paulina lo hizo en el año de 1998.

Un estudio de recaídas con análisis molecular ha sugerido que muchos casos recurrentes por recaídas ocurren principalmente dentro de 12 meses (González-Ceron et al., manuscrito en preparación), por lo que con los registros de casos se analizó la frecuencia y temporalidad de los casos recurrentes de pacientes del Sur de Chiapas. Los resultados indicaron que los casos recurrentes

en el Soconusco fueron más numerosos dentro de los 12 meses después de la infección primaria (80%), y distribuidos en todos los meses, aunque un gran número fueron de entre 6-9 meses, adecuado para cruzar la brecha entre ciclos de transmisión cada año. Coincide con algunos resultados de América Central (Contacos y col.,1972; Mason, 1975) e India (Adak, 1998). En un estudio en Irán concluyeron que la tasa de recaídas por *P. vivax* era baja entre los primeros 3 meses después del ataque primario y también después de los 18 meses (Haghdoost et al.,2006). Pero también se han descrito algunos casos de recurrencias con tiempo de latencia largo como el caso de un paciente proveniente de Camerún analizado en Italia con latencia de 4 años (Durante Mangoni et al., 2003). La detección de posibles recaídas en tiempos más largos de un año fue imposible porque la distribución de las recurrencias de ≥12 meses fue constante lo que sugiere que la mayoría son posibles re-infecciones.

En esta región prevalecen principalmente las especies de mosquitos, *Anopheles albimanus* en la región costa donde proliferan y alcanzan un máximo de densidad durante finales de la temporada lluviosa; mientras que para *An. pseudopunctipennis* la mayor densidad de estos mosquitos es durante la época de seca (Diciembre a Abril) y el inicio de la temporada de lluvias en las colinas y zona montañosa baja (Rodriguez et al., 2000). Los aislados de *P. vivax* de las muestras de pacientes con recurrencia a la infección provienen de dos regiones: región costa y región pie de montaña, de características climatológicas definidas de tipo tropical y templado respectivamente. La presencia y distribución de los genotipos de CSP de *P. vivax* ha sido demostrada en muchas regiones endémicas en el mundo y la prevalencia de estos genotipos varía geográficamente. Los genotipos CSP del parásito VK210 y VK247 ya previamente reportados presentes en la región y con distinta biología (Gonzalez-Ceron et al., 1999; Rodriguez et al., 2000; Gonzalez-Ceron et al., 2010) fueron ambos encontrados en parásitos recurrentes, capaces de ocasionar recaídas en el 2006 y 2007. Los parásitos VK247 sólo son transmitidos en la región montañosa mientras que para la población VK210 pueden provenir de ambas regiones (Gonzalez-Ceron et al., 2010). El uso único

de este marcador molecular en el presente estudio podría describir parcialmente la procedencia geográfica del parásito (región costa o pie de montaña) aunque más estudios moleculares son necesarios para definir el origen.

La presencia de recurrencias en las personas de distinta edad y sexo son congruentes con la epidemiología de la región, a que la mayoría se infectan una o pocas veces en su vida (Imwong et al., 2007; Mason, 1975), distinto a lo que se observa en zonas de alta transmisión y exposición constante a una picadura infectiva, donde los niños y personas jóvenes se enferman más que los adultos por el desarrollo de inmunidad clínica o protectora (Erhart et al., 2005; Camargo et al.,1994 y 1996), a diferencia de las personas de edad adulta que están continuamente expuestas como es el caso de las zonas rurales de África y Amazonas con exposición continua relativamente estable en áreas de paludismo Meso endémico (Ladeia-Andrade et al., 2009).

A pesar de que un gran grupo de personas afectadas con paludismo buscan atención en los primeros 10 días de iniciado los síntomas, otro grupo no menos importante buscan atención después de 10 días. La respuesta en días para la búsqueda de atención resultó ligeramente más corta conforme los pacientes experimentaban más infecciones de paludismo. Las zonas más afectadas son rurales y las personas enfrentan necesidades cotidianas, muchos residentes saben que ahí están los notificantes y que los trabajadores de la campaña llegan a la localidad con medicamentos y muchos de ellos no buscan la atención inmediata, incluso después de haber tenido un episodio previo; pero la exposición previa reciente si influye en la prontitud con que se busca atención.

Es difícil interpretar si en la recurrencia la parasitemia es realmente mayor o menor que la infección primaria, debido a que sólo cuenta con un punto en el tiempo, pero de forma constante y sobretodo en eventos cercanos, la infección primaria muestra mayor parasitemia que la recurrencia indicando posible limitación por la respuesta inmune secundaria que puede variar de acuerdo a cada persona, su edad, estado nutricional, exposiciones previas, días de infección.

En paciente afectados por *P. vivax*, un 5-80% pueden albergar hipnozoitos después de la infección primaria (Baird et al., 2004). En la actualidad existe un grupo limitado de compuestos que tienen acción sobre los plasmodios en estado latente, los hipnozoitos (que producen las recaídas) y formas que se desarrollan en el hígado, la única empleada en la práctica clínica, es la primaquina (PQ). Para la cura radical de paludismo por *P. vivax* (fase hepática) la OMS recomienda el uso del tratamiento a 14 días que consiste en la administración de un total de 210 y hasta 420 mg de PQ, calculado para una persona de 60 kg. (OMS. 2010). Es importante conocer si la persona tiene deficiencia a la G6PD ya que puede provocar hemólisis por lo que se recomienda en estas personas otro régimen terapéutico con PQ y bajo estricta supervisón médica. Los datos sugieren que las recurrencias identificadas en este estudio son posibles recaídas, debido a la poca efectividad de las dosis únicas en el esquema 3x3x3 que se ha administrado en la región de estudio.

Estos resultados ofrecen una forma de poder estimar la temporalidad y frecuencia de las recurrencias para esta zona ya que las recaídas constituyen un reservorio y una oportunidad para el parásito de reproducirse contribuyendo en el mantenimiento de la transmisión de esta enfermedad parasitaria, por lo que debiera considerarse en las zonas con paludismo realizar estudios que evalúen la efectividad de la primaquina y dar seguimiento continuo para conocer si el esquema de tratamiento actual es efectivo para esta zona.

VIII. CONCLUSIONES

1.- La mayoría de las infecciones recurrentes (74.3%) que siguieron a un primer ataque de paludismo por *P. vivax* y que ocurrieron dentro de doce meses se sugiere corresponden a recaídas.

2- La temporalidad de las infecciones recurrentes (es el intervalo de tiempo entre la infección primaria y la recaída) sugieren la presencia de los dos patrones de latencia conocidos: tipo tropical y de tipo templado (corta y larga latencia) en la región de estudio.

3- Bajo las condiciones de tratamiento antipalúdico de la zona de estudio, se detectó de forma más frecuente la presencia desde uno hasta tres infecciones recurrentes.

4- Las infecciones recurrentes por recaídas inician la transmisión pero cuando ocurren durante la transmisión activa contribuyen a la generación de diversidad parasitaria.

5- Los parásitos productores de infección de paludismo por *P. vivax* presentes en las infecciones recurrentes sugeridas como recaídas fueron causados por los dos fenotipos del gen CSP, VK210 Y VK247.

6- No se observó una relación entre los grupos de edad y sexo y la presencia de infecciones recurrentes.

7- Estas observaciones son de importancia ya que los parásitos responsables de la recaídas son un reservorio que permite el mantenimiento de la transmisión de la infección de paludismo por lo que se sugieren realizar estudios que evalúen la efectividad del tratamiento con PQ que aunado con estrategias de control de vectores conduzcan en un futuro no lejano a la eliminación de este parásito.

IX. REFERENCIAS

1- Adak T, Sharma VP, Orlov VS: **Studies on the *Plasmodium vivax* relapse pattern in Delhi,India**. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1998,* 59:175-179.

2- Adak T, Valecha N, Sharma VP: ***Plasmodium vivax* polymorphism in a clinical drug trial**. Clin Diagn Lab Immunol 2001, 8:891-894.

3- Alecrim MC, Alecrim W, Macedo V: ***Plasmodium vivax* resistance to chloroquine (R2) and mefloquine (R3) in Brazilian Amazon region**. *Revista da Sociedade Brasiliera de Medicina Tropical* 1999, 32:67–68.

4- Alving AS, Craige B, Jones R, Whorton CM, Pullman TN, Eichelberger L: **Pentaquine (SN-13,276) a therapeutic agent effective in reducing the relapse rate in vivax malaria**. J Clin Invest 1948, 27:25-33.

5- Arnot DE, Barnwell JW, Tam JP, Nussenzweig V, Nussenzweig RS, Enea V: **Circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax* : gene cloning and characterization of the immunodominant epitope**. Science 1985, 230: 815-818.

6- Baird JK, Hoffman SL: **Primaquine Therapy for Malaria.** Clin Infect Dis 2004, 30: 1336-45.

7- Bianco AA, Saunders GM, Levine AS, Cohn RV: **Long term observation of *Plasmodium vivax* malaria**. US Naval Med Bull 1947, 47:550.

8- **Boletín del Paludismo y otras enfermedades transmitidas por vector**. Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud, 1990-2005.

9- Bonilla JA, Validum LI, Cummings R and Palmer CJ: **Genetic diversity of *Plasmodium vivax* PvCSP and PvMSP1 in Guyana, South America**. Am J Trop Med Hyg 2006, 75(5): 830-835.

10-Bunnag D, Karbwang J, Thanavibul A, Chittamas S, Ratanaponjse Y, Chalermrut K, Bangchang K, & Harinasuta T: **High Dose of primaquine in primaquine resistant vivax malaria**. Transactions of Royal Society of Tropical Medicine 1994, 88:218-219.

11-Brasil P, de Pina Costa A, Saraiva Pedro R, da Silveira Bressan C, da Silva S, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT: **Unexpectedly long incubation period of *Plasmodium vivax* malaria, in the absence of chemoprophylaxis, in patients diagnosed outside the transmission area in Brazil**. Malar J 2011, 10:122.

12-Bruce-Chwat LJ, Black RH, Canfielf C, Clyde DF, Peters W and Wernsdorfer WH. **Chemotherapy of Malaria**. Segunda edición. World Health Organization 1986. Ginebra Suiza. 260 pp.

13-Camargo LM, Ferreira MU, Krieger H, De Camargo EP, Da Silva LP: **Unstable hypoendemic malaria in Rondonia (western Amazon region, Brazil): epidemic outbreaks and work-associated incidence in an agroindustrial rural settlement**. *Am J Trop Med Hyg* 1994, 51:16-25.

14-Camargo LM, Dal Colleto GM, Ferreira MU, et al. : **Hypoendemic malaria in Rondonia (Brazil, western Amazon region, Brazil): seasonal variation and risk groups in an urban locality**. *Am J Trop Med Hyg* 1996, 55:32-38.

15-Cedillos RA, Warren M, Jeffery GM: **Field evaluation of primaquine in the control of *Plasmodium vivax*.** Am J Trop Med Hyg 1978, 27:466-472.

16-**Center for Disease Control and Prevention. Malaria**. Biology. CDC; 2012. Disponible en http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/

17-Coatney GR, Cooper WC, Young MD: **Studies in human malaria. XXX. A summary of 204 induced-sporozoite infections with the Chesson strains of *Plasmodium vivax***. J Natl Malar Soc 1950, 9:381-96.

18-Cogswell FB: **The hypnozoite and relapse in primate malaria**. Clinical Microbiology Rewiews1992, p. 26-35.

19-Collins WE, Jeffery GM: **Primaquine resistance in *Plasmodium vivax***. Am J Trop Med Hyg 1996, 55:243-249.

20-Contacos PG, Collins WE, Jeffery GM, Krotoski WA and Howard WA: **Studies on the characterization of *Plasmodium vivax* strains from Central America**. Am. J. Trop. Med. Hig 1972; 21(5) pp. 707-712.

21-Chen N, Auliff A, Rieckmann K, Gatton M, Cheng Q: **Relapses of *Plasmodium vivax* infection result from clonal hypnozoites activated at predetermined intervals**. J Infect Dis 2007, 195:934–41.

22-Craig AA, Kain KC. **Molecular analysis of strains of *Plasmodium vivax* from paired primary and relapse infections**. J Infect Dis 1996; 174: 373–9.

23-Danis R, Rodríguez MH, Betanzos A, Hernández JE, González –Cerón L, Mendez JF, Velazquez OJ, & Tapia R : **Individual risk factors for *Plasmodium vivax* infection in the residual malaria transmission focus of Oaxaca, Mexico**. *Salud Pública de México* 2007, Vol.49 No.3: 199-209.

24-Del Portillo HA,Longacre S, Khouri E, David PH: **Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species**. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991,88:4030-4034.

25-Dirección General de Epidemiología (DGEPI). **Panorama epidemiológico en Chiapas** (Número de casos). [Consultado 2009 julio - agosto] Disponible en: www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/indicepor sem.epidemiologicas

26-Durante Mangoni ED, Severini C, Menegon M, Romi R, Ruggiero G, and Majori G: **Case report: an unusual late relapse of *Plasmodium vivax* malaria**. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 2003, 68(2):159-160.

27-Edgcomb JH, Arnold J, Yount EH, Alving AS, Eichelberger L, Jeffery G, Eyles D, Young MD: **Primaquine, SN 13272, a new curative agent in vivax malaria; a preliminary report**. J Natl Malar Soc 1950, 9:285-292.

28-Erhart A, Thang ND, Hung NQ, Toi LV, Hung LX, Tuy TQ , Cong LD, Speybroeck N , Coosemans M , D'Alessandro U: **Forest malaria in Vietnam: a challenge for control** . Am J Trop Med Hyg 2005 , 70 : 110 – 118 .

29-Eyles DE, Young MD: **Studies on imported malarias the parasitological pattern of relapsing *Plasmodium vivax* in military patients**. J Natl Mal Soc 1948, 7:23-37.

30-Findlay GM: Recent advances in chemotherapy Malaria. The Blakiston Company, Philadelphia; 1951, Vol.2.

31-Gascon J, Gomez Arce JE, Menendez C, Valls ME and Corachan M : **Poor response to primaquine in two cases of *Plasmodium vivax* malaria from Guatemala**. Trop Geogr Med 1994, 46 :32-33.

32-Gogtay NJ, Desai S, Kadam VS, Kamtekar KD, Dalvi SS, Kshirsagar NA: **Relapse pattern of *Plasmodium vivax* in Mumbai: a study of 283 cases of vivax malaria**. J Assoc Phys India 2000, 48:1085-1086.

33-Goller JL, Jolley D, RingWald P and Biggs BA : **Regional differences in the response of *Plasmodium vivax* to primaquine as anti-relapse therapy.** Am J Med Hyg 2007, 76(2) : 203-207.

34-Gonzalez-Ceron et al. manuscrito en preparación.

35-Gonzalez-Ceron L, Rodriguez MH, Nettel J, Villarreal C, Kain KC, y Hernandez JAE : **Differential susceptibility of *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis* to infections with coindigenous *Plasmodium vivax* variants VK210 y VK247 in southern Mexico**. Infection and Immunity 1999, 67:410-412.

36-Gonzalez-Ceron L, Rodriguez MH, Santillan F, Chavez B, Nettel JA, Hernandez-Avila JE and Kain KC : ***Plasmodium vivax*: ookinete destruction and oocyst development arrest are reponsible for *Anopheles albimanus* resistance to circumsporozoite phenotype VK247 parasites**. Exp Parasitol 2001, 98:152-61.

37-Gonzalez-Ceron L, Alvarado Delgado A, Martinez Barnetche E, Rodriguez MH, Ovilla Muñoz M, Perez F, Hernandez Avila JE, Sandoval MA, Rodriguez MC, Villarreal Treviño C : **Sequence variation of ookinete surface proteins Pvs25 y Pvs28 of *Plasmodium vivax* isolates from Southern Mexico and their association to local anphelines infectivity.** Elsevier 2010, 10 :645-654.

38-Goller JL, Jolley D, Ringwald P, Biggs B : **Regional differences in the response of *Plasmodium vivax* malaria to primaquine as anti-relapse therapy**. Am J Trop Med Hyg 2007, 76(2): 203–207.

39-Hagdoost AA, Mazhari S and Bahaadini K : **Estimating the relapse risk of *Plasmodium vivax* in Iran under national chemotherapy scheme using a novel method**. J Vect Borne Dis 2006, 43: 168-172.

40-Hankey DD, Jones R Jr, Coatney OR, Alving AS, Coker WO, Garrison PL, Donovan WN: **Korean vivax malaria. I. Natural history and response to chloroquine**. Am J Trop Med Hyg 1953, 2:958-969.

41-Hanna JN, Ritchie SA, Eisen DP, Cooper RD, Brookes DL, Montgomery BL : **An outbreak of *Plasmodium vivax* malaria in Far North Queensland, 2002.** Med J Aust 2004, 180:24–8.

42-Hill DR, Baird JK, Parise ME, Lewis LS, Ryan ET and Magill Aj: **Primaquine report from CDC expert meeting on malaria chemoprophylaxis I**. Am J Trop Med Hyg 2006, 75(3): 402-415.

43-Hulden L, Hulden L: **Activation of the hypnozoite: a part of *Plasmodium vivax* life cycle and survival**. Malar J 2011, 10:90.

44-Imwong M, Pukrittayakamee S, Gruner AC, et al.: **Practical PCR genotyping protocols for *Plasmodium vivax* using Pvcs and Pvmsp1**. Malar J 2005, 4:20.

45-Imwong M, Snounou G, Pukrittayakamee S, Tanomsing N, Kim JR, et al.: **Relapses of *Plasmodium vivax* infection usually result from the activation of heterologous hypnozoites**. J Infect Dis 2007, 195: 927–933.

46-Joy DA, Gonzalez-Ceron L, Carlton JM, Gueye A, Fay M, McCutchan TF and Xin-zhuan Su: **Local adaptation and vector-mediated population structure in *Plasmodium vivax* malaria**. Mol Biol Evol 2008, 25(6) 1245-1252.

47-Jung-Ryon K, Imwong M, Nandy A, Chotivanich K, Nontprasert A, Tonomsing N, Maji A, Addy M, Day NPJ, White NJ, Pukrittayakamee S: **Genetic diversity of *Plasmodium vivax* in Kolkata,India**. Malaria Journal 2006, 5:71.

48-Kain KC, Webster HK, Wirtz RA, Keystone JS, Rodriguez MH, Kinahan J, Rowland M and Lanar DE : **Circumsporozoite genotyping of global isolates of *Plasmodium vivax* from dried blood specimens**. J Clin Microbiol 1992, 30: 1863-66.

49-Khusmith S, Tharavanij S, Bunnag D. **Antigenic disparity of Plasmodium vivax causing initial symptoms and causing relapse**. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1998, 29:519–24.

50-Kirchgatter K,del Portillo HA: **Molecular analysis of *Plasmodium vivax* relapses using the MSP1 molecule as a genetic marker**.*J Infect Dis 1998, 177:*511-515.

51-Knell AJ : Malaria. **The Welcome Trust**. 1991. Oxford University Press .

52-Krotoski WA, Krotoski DM, Garnham PCC, Bray RS, Killick-Kendrick R, Draper CC, Targett GAT & Guy MW: **Relapses in primate malaria: Discovery of two populations of exoerytrocytic stages. Preliminary note**. Br Med J 1980, 1:153-154.

53-Krotoski WA: **Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse**. Trans R Soc Trop Med Hyg 1985, 79:1-11.

54-Ladeia-Andrade, Urbano Ferreira M, Carvalho ME, Curado I and Rodriguez Coura J : **Age-Dependent Acquisition of Protective Immunity to Malaria in Riverine Populations of the Amazon Basin of Brazil**. Am J Trop Med Hyg 2009, 80(3):452-459.

55-Laveran A: **Nouveau parasite du sang**. Bull Acad Natl Med 1980, 9:1235-1236.

56-Leclerc MC , Menegon M, Cligny A. , Noyer JL. , Mammadov S. , Aliyev N. , Gasimov E, Majori G and Severini C: **Genetic diversity of *Plasmodium vivax* isolates from Azerbaijan.** *Malaria Journal* 2004, 3:40.

57-Leslie T, Mayan I, Mohammed N, Erasmus P, Kolaczinski J, Whitty CJM and Rowland M: **A randomized trial of an eight-week, once weekly primaquine regimen to prevent relapse of *Plasmodium vivax* in Northwest frontier province, Pakistan**. Plos One 2008, 6;3(8):e2861.

58-Lim CS, Kim SH, Kwon SI, Song JW, Song KJ, and Lee KN: **Analysis of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 gene sequences from resurgent Korean isolates**. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 2000, Vol 62, Issue 2, 261-265.

59-Mason J: **Patterns of *Plasmodium vivax* recurrences in a high incidence coastal area of El Salvador, CA**. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1975, 24(4):581-585.

60- Moon SU, Lee HW, Kim JY, Na BK, Cho SH, Lin K, Sohn WM and Kim TS: **High frecuency of genetic diversity of *Plasmodium vivax* isolates in Myanmar**. Acta Trop 2009, 109: 30-6.

61-Most H: **Clinical trials of anti-malarial drugs**. Internal Medicine in World War II 1963, 2:525-598, Infectious diseases. Office of the Surgeon General, Department of the Army.

62-Myoung-Don, Hyungshik, Donghyun Shin, Uiseok Kim, Sunhee Lee, Namjoong Kim, Min-Ho Choi, Jong-Yil Chai and Kangwon Choe: **Clinical Features of Vivax Malaria.** Am J Trop Med Hyg 2001, pp-143-146.

63-**NAAIS** (**Núcleo de Acopio y Análisis de Información en Salud**) Programa de Acción: Enfermedades Transmitidas por Vector. [Consultado 2010 octubre-noviembre] Disponible en: http://sigsalud.insp.mx/naais/index.html

64-**Norma Oficial Mexicana.** NOM-032-SSA2-2002, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector.Disponible:http://cenavece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/nom_032_ssa2_2002_norma_petv.pdf

65-**Norma Oficial Mexicana**. NOM-032-SSA2-2010, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector.Disponible:http://cenavece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/nom_032_ssa2_2010_norma_petv.pdf

66-Orjuela Sanchez P, Santos Da Silva N, da Silva Nunes M and Urbano Ferreira M: **Recurrent parasitemias and population dynamics of *Plasmodium vivax* polymorphisms in rural Amazonia.** Am J Trop Med Hyg 2011, 81(6): 961-968.

67-Perez HA: **El paludismo por *Plasmodium vivax* y los desafíos del 58-tratamiento adecuado y oportuno.** Boletin de Malariologia y Salud Ambiental 2004, Vol. XLIV No.1: 1-8.

68-Premawansa S, Snewin VA, Khouri E, Mendis KN, David PH: ***Plasmodium vivax*: recombination between potential allelic types of the merozoite surface protein MSP1 in parasites isolated from patients**. *Exp Parasitol* 1993, 76:192-199.

69-Pukrittayakamee S, Imwong M, Chotivanich K, Singhasivanon P, Day NPJ and White NJ: **A comparison of two short-course primaquine regimens for the treatment and radical cure of *Plasmodium vivax* Malaria in Thailand.** Am J Trop Med Hyg 2010, 82(4):542-547.

70-Rajgor DD, Gogtay NJ, Kadam VS, Kamtekar KD, Dalvi SS, Chogle AR, Aigal U, Bichile LS, Kain KC, & Kshirsagar NA: **Efficacy of a 14-day primaquine regimen in preventing relapses in patients with *Plasmodium vivax* malaria in Mumbai , India**. 2003, 438-440

71-Rosenberg R, Wirtz RA, Lanar DE, Sattabongkot J, Hall T, Waters AP, Prasittisuk C: **Circumsporozoite protein heterogeneity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax***. Science 1989, 245(4921):973-97.

72-Rodríguez MH y Loyola EG. **Situación Epidemiológica actual y perspectivas de Investigación Entomológica del Paludismo en México**. En Memorias del IV Simposio Nacional de Entomología Médica y Veterinaria, Oaxtepec, Mor., México, 1989.p.p. 15-40.

73-Rodríguez MH y Loyola EG. Malaria **in Mexico. Annual Conference of the california mosquito and vector control association, Inc**., January 28 thru January 31. 49-52.

74-Rodríguez MH, González-Cerón L, Hernández JE, Nettel JA, Villarreal C, Kain KC, y Wirtz RA: **Different prevalences of *Plasmodium vivax* variants VK210 and VK247 are associated with the distribuction of *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis* in México**. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 2000a, 62:122 –127.

75-Schwartz E, Regev-Yochay G and Kurnik D: **Short report : a consideration of primaquine dose adjustment for radical cure of *Plasmodium vivax* malaria**. Am J Trop Med Hyg 2000, pp- 393-395.

76-Shute PG, Lupascu G, Branzei P, et al. **A strain of Plasmodium vivax characterized by prolonged incubation: the effect of numbers of sporozoites on the length of the prepatent period**. Trans R Soc Trop Med Hyg 1977, 70:474–81.

77-Singh N, Mishra SS, Sharma VP: **Seasonality of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* ihn tribal villages in central India (1987-1995).** Ann Trop Med Parasitol 2000, 94:101-112.

78-Tauil PL, Luz FC, Oliveira AP, Deckers FA, Santos JB: **Vivax malaria with long incubation period, detected in the Federal District: three case reports**. Rev Soc Bras Med Trop 2010, 43:213-214.

79-Taylor WRJ et al: **Assessing drug sensitivity of *Plasmodium vivax* to halofantrine or chloroquine in southern,central Vietnam using an extended 28-day *in vivo* test and polymerase chain reaction genotyping**. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 2000, 62:693 –697.

80-World Health Organization: *Guidelines for the treatment of malaria (second edition)* 2010. Disponible en: http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241547925/en/index.html

81-WHO 2009: Organización Mundial de la Salud. Temas de Salud.Paludismo. Disponible en:http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2009/mal2009_summary_and_keypoints_es.pdf

82-WHO 2010: Organización Mundial de la Salud. Guía para el Tratamiento de Paludismo.Disponible://new.paho.org/hq/dmdocuments/2011/WHO_Treatment_Guidelines_Olumense.pdf

83-Vanderval T, Paulton R: **Malaria in the Limber River valley of northern Haiti: a hospital-based retrospective study, 1975-1997**. Rev Panam Salud Publica 2000, 7(3):162-167

84-Zakeri S, Dinparast Djadid N, Zeinali S: **Sequence heterogeneity of the merozoite surface protein-1 gene (MSP-1) of *Plasmodium vivax* wild isolates in southeastern Iran**. Acta Trop 2006, 88: 91-97.

X. APÉNDICE

OBTENCION DEL ADN GENOMICO DE *Plasmodium vivax*

A) De paquete globular (QIAamp DNA Blood Mini kit cat. 51106 Qiagen)

En un vial de 1.5 mL depositar 100 μL de paquete globular recién descongelado y 100 μL de agua ultrapura (GIBCO) y agregar 20 μL de proteasa Qiagen . Añadir 200 μL de Buffer AL a la muestra y mezclar por vortex por 15 seg e incubar por 10 min a 56°C . Centrifugar brevemente para remover las gotas de la tapa del vial. Agregar 200 μL de etanol (200proof sigma) a la muestra. Mezclar con vortex por 15 seg y después centrifugar brevemente para remover las gotas de la tapa del vial. Depositar la mezcla (620 μL) cuidadosamente a una columna (en un vial de recolección de 2 mL) sin mojar la membrana, cerrar la tapa y centrifugar a 8000 rpm por un minuto. Poner la columna en otro vial limpio y descartar el tubo que contiene el filtrado. En el caso que después de centrifugar, no haya pasado el total de la mezcla por la columna se puede volver a centrifugar a máxima velocidad, hasta que la columna quede vacía. Abrir cuidadosamente la columna y agregar 500 μL de buffer AW1 sin tocar la membrana, cerrar la tapa y centrifugar a 8000 g por 1 min. Poner la columna en otro vial de recolección y descartar el vial que contiene el filtrado. Abrir cuidadosamente la columna y agregar 500 μL de buffer AW2 sin tocar la membrana, cerrar la tapa y centrifugar a 14,000g por 3 min. y descartar el vial que contiene el filtrado. Poner la columna en otro vial de recolección y centrifugar a 14000g por 1 min. Poner la columna en otro vial de recolección . Abrir la columna y agregar 200 μL de agua ultrapura GIBCO (cat.10977-015), incubar a temperatura ambiente por 5 min., centrifugar a 8000g por 1 min. La elusión obtenida contiene el ADN . Guardar la muestra en el congelador a –20° C para efectuar la observación del ADN por electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1x.

B) De sangre impregnada en círculos sobre papel filtro (QIAamp DNA Blood Mini kit cat. 51106)

Colocar medio círculo de papel filtro impregnado con sangre infectada en un vial de 1.5 mL y resuspender en 50 μL de agua. Añadir 180 μL de buffer ATL e incubar a 85°C por 10 min. Centrifugar para bajar las gotitas de tapa del vial. Añadir 20 μL de proteinasa K , vortexear por 30 seg e incubar 56°C por 1 h; centrifugar brevemente. Añadir 200 μL de buffer AL, vortexear bien por 1 min. , incubar a 70°C por 10 min. y centrifugar brevemente. Añadir 200 μL de etanol (200 proof), vortexear por 30 seg. ,centrifugar brevemente. Llevar la mezcla obtenida y pasarla a una columna ,centrifugar a 8000 rpm por 1 min. Poner la columna en un vial nuevo de 1.5 mL y agregar 500 μL de buffer AW1, centrifugar a 8000 rpm por 1min. Colocar la columna en vial nuevo de 1.5 mL y añadir 500 μL de buffer AW2, centrifugar a 14000 rpm por 3 min. Poner la columna en un vial nuevo de 1.5 mL , agregar 100 μL de Agua GIBCO (cat.10977-015) dejar incubar por 2 min. a temperatura ambiente y centrifugar a 8000 rpm por 1 min. Guardar el ADN obtenido a -20°C hasta su uso.

ANÁLISIS POR PCR-RFLP DE LA REGIÓN REPETIDA DEL GEN CSP DE *P. vivax*

C) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El gen CSP fue amplificado usando los iniciadores (primers) denominados CSP-1(5'cgcactgcgggcacaatgtagatc3) y CSP-2 (5'ggttacactgcatggagtcc3') que amplifican la región N-terminal a la región II tanto en CSP variante VK210 como en CSP variante VK247. La amplificación por PCR se realizó con un volumen final de 50 μL de reacción. 2 μL de sangre infectada conteniendo el ADN del parásito (aprox. 100 ng), 10 μL Buffer de polimerasa 1X GoTaqFlexi (Promega M8295), 4μL de cloruro de magnesio 2 mM (Promega), 1μL trifosfato de desoxinucleótidos (dNTP's) 0.2 mM (Invitrogen, 10297018) , los primers: 1 μL CSP-1 10 uM y 1μL CSP-2 10 uM , 1μL de taq polimerasa (5 U/μL GoTaq Flexi ADN de Promega, Madison WI.), 30 μL de agua estéril libre de nucleasas (GIBCO Invitrogen, Grand Island,NY. Cat. 10977-015. El programa de PCR fue: desnaturalización a 95°C por 3 min. seguido por 35 ciclos de 30 seg. a 95°C, 40 seg. a 58°C, un minuto a 72°C seguido por 10 min. a 72°C para la extensión final usando un termociclador DNA MyCycler Biorad Hercules CA .

Para confirmar el producto de la amplificación se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se preparó gel de agarosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. Cat. A-9539) y se disolvió en solución amortiguadora TAE 1X por calentamiento a un volumen de 150 mL; se agregó 15 μL de bromuro de etidio a una concentración de 2 mg/mL (Research Organics Inc. Cleaveland, OH. Cat. 3016E) y se vació a la cámara horizontal de electroforesis (sub-cell GT,Biorad Hercules, CA. Cat. 1704482) usando peine para 20 carriles. Cuando el gel estaba solidificado se colocó dentro de la cámara y añadió buffer TAE 1X ; en el primer carril se colocó 1μL de marcador de 100 pb (Roche Applied Science, Nonnenwald, Germany. Cat. 1721933) más 3 μL de buffer de carga (azul de bromofenol), en los siguientes carriles se agregaron 2 μL del producto amplificado con de 3 μL buffer de carga y el último carril para el control de reactivos.