

## Informe Final

### *“Prevalencia de malaria asintomática en donantes de Bancos de Sangre de Colombia, 2012”*

**Código CTIN (Nº y año):** CTIN-34-2011

**Fecha de inicio de ejecución:** 20 de junio de 2012

**Duración en meses:** 24 meses

**Nombre de la entidad ejecutora del investigador principal y demás entidades participantes:**

Entidad	Nombre	Dependencia
Instituto Nacional de Salud	Mauricio Beltrán Durán	Investigador Principal- Coordinación Red Nacional de Bancos de Sangre
Instituto Nacional de Salud	Sandra Milena Barrera A	Investigadora Principal - Grupo Bioquímica y Biología Celular
Instituto Nacional de Salud	Olga Maritza Berrio Pérez	Co-Investigador Coordinación Red Nacional de Bancos de Sangre
Instituto Nacional de Salud	Nohora Elizabeth González	Co-Investigador -Parasitología Red
ESE Hospital Antonio Roldan Betancur	Dora Inés Restrepo	Banco de Sangre
Hospital General de Medellín	Marta Pinto	Banco de Sangre
Banco de Sangre. E.S.E: Hospital San Jerónimo	Teresita Uribe Puche	Banco de Sangre
Banco de Sangre de Córdoba	Nohora Cristancho	Banco de Sangre
Hospital Departamental Villavicencio	Marlene Galindo	Banco de Sangre
Hospital San Jorge -Pereira	Yolanda Celis	Banco de Sangre
Hemocentro del Otún	Zacarías Mosquera	Banco de Sangre

#### Informe técnico del proyecto:

**Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011**

## TABLA DE CONTENIDO

INDICE DE TABLAS.....	4
INDICE DE FIGURAS.....	5
RESUMEN ABREVIADO.....	6
<b>1. RESUMEN EJECUTIVO: .....</b>	<b>7</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN: .....</b>	<b>8</b>
<b>3. OBJETIVOS: .....</b>	<b>10</b>
3.1 OBJETIVO GENERAL: .....	10
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	10
<b>4. METODOLOGÍA: .....</b>	<b>10</b>
4.1 TIPO DE ESTUDIO: .....	10
<b>4.1.2 TAMAÑO DE LA MUESTRA:.....</b>	<b>11</b>
<i>Análisis de Variables:.....</i>	<i>13</i>
4.2 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS: .....	13
<b>4.2.1 Anonimización de las muestras de donantes de sangre: .....</b>	<b>13</b>
<b>4.2.2 Toma de la muestra de sangre para láminas de gota gruesa: .....</b>	<b>13</b>
<b>4.2.3 Toma de la muestra de sangre en papel filtro:.....</b>	<b>14</b>
4.3 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS .....	15
<b>4.3.2 Control de calidad indirecto a láminas de gota gruesa:.....</b>	<b>15</b>
<b>4.3.3 Procesamiento de muestras de papel filtro por técnicas moleculares: para diligenciamiento de Sandra Barrera .....</b>	<b>16</b>
<b>5 RESULTADOS: .....</b>	<b>21</b>
<b>5.2 OBJETIVO 1. DETECTAR LA PRESENCIA DE <i>PLASMODIUM (P. FALCIPARUM, P. VIVAX, P. MALARIAE)</i>, EN DONANTES, PROVENIENTES DE CINCO BANCOS DE SANGRE, APLICANDO GOTA GRUESA.</b>	<b>21</b>
5.2.1 TAMIZAJE DE LAS GOTAS GRUESAS EN LOS BANCOS DE SANGRE:.....	22
5.2 OBJETIVO 2. DETECTAR INFECCIONES ASINTOMÁTICAS POR <i>P. FALCIPARUM, P. VIVAX, P. MALARIAE</i> O INFECCIONES MIXTAS, POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE PCR EN MUESTRAS DE DONANTES DE LOS BANCOS DE SANGRE SELECCIONADOS PARA EL ESTUDIO .....	23
5.3 OBJETIVO 3. EVALUAR LA UTILIDAD DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA EL DIAGNÓSTICO DE MALARIA ASINTOMÁTICA, COMPARÁNDOLA CON EL EXAMEN MICROSCÓPICO, EN DONANTES DE SANGRE DE LOS BANCOS DE SANGRE SELECCIONADOS PARA EL ESTUDIO. ....	31
<b>5.4 OBJETIVO 4. DESCRIBIR LAS CARACTERÍSTICAS SOCIO-DEMOGRÁFICAS DE DONANTES DE SANGRE ACEPTADOS EN EL ESTUDIO: .....</b>	<b>31</b>
<b>5 DISCUSIÓN:.....</b>	<b>38</b>
6 CONCLUSIONES:.....	42
<b>8. CONFORMACIÓN DEL EQUIPO DE INVESTIGACIÓN:.....</b>	<b>44</b>
<b>9. PRODUCTOS Y RESULTADOS .....</b>	<b>45</b>
<b>10. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>45</b>

Informe técnico del proyecto:  
Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Tamaño muestral.....	13
Tabla 2	Tamaño positivo de la banda de ADN correspondiente a cada especie.....	21
Tabla 3.	Resultados de tamizaje por gota gruesa para malaria.....	23
Tabla 4.	Resultados Evaluación Externa del Desempeño Indirecto a Gotas Gruesas por Departamento, errores técnicos.....	24
Tabla 5.	Total muestras ingresadas y procesadas por PCR.....	25
Tabla 6.	Resultados obtenidos al tamizaje por gota gruesa y pruebas moleculares.....	32
Tabla 7.	Distribuciones donantes de sangre departamento de nacimiento y de donación....	36
Tabla 8.	Casos positivos por PCR y secuenciación.....	39
Tabla 9.	Conformación del equipo de investigación.....	45
Tabla 10.	Resultados de Conocimiento y su aplicabilidad.....	46

**Informe técnico del proyecto:**  
**Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011**

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de recolección en papel filtro .....	14
Figura 2. Almacenamiento muestras en Papel Filtro.....	15
Figura 3. Muestra inadecuada en papel filtro.....	16
Figura 4. PCR Universal (amplificación del gen ssr RNA 18s).....	17
Figura 5. PCR nested (amplificación del gen ssr RNA 18s).....	17
Figura 6. PCR anidada, iniciadores rVIV1/rVIV2 (P. vivax).....	18
Figura 7. PCR anidada, iniciadores rMAL1/rMAL2 (P. malariae).....	19
Figura 8. Límite de detección.....	19
Figura 9. Productos de amplificación en la PCR universal con cebadores rPLU6 y rPLU5 (Gel de Agarosa al 2%, teñido en bromuro de etidio y visualizado bajo U.V).....	21
Figura 10. Productos de amplificación en la PCR anidada con cebadores específicos de especie (Gel de agarosa al 2%, teñido en bromuro de etidio y visualizado bajo U.V).....	21
Figura 11. Resultados evaluación Externa del Desempeño Indirecto (EEID) a Gotas Gruesas por Departamento, errores técnicos.....	23
Figura 12. Muestras positivas por PCR.....	24
Figura 12. Total muestras procesadas por PCR.....	25
Figura 14. Muestras positivas Meta.....	25
Figura 15. Muestras positivas por PCR.....	26
Figura 16. Ubicación de los departamentos, de los bancos de sangre del estudio.....	32
Figura 17. Distribución de muestras colectadas en el estudio por departamento.....	32
Figura 18. Distribución donantes de sangre aceptados en el estudio por departamento y sexo....	33
Figura 19. Donantes de sangre por grupo etario.....	33
Figura 20. Distribución de donantes de sangre aceptados en el estudio por sexo y edad.....	34
Figura 21. Distribución de donantes de sangre por departamento y actividad económica.....	36
Figura 22. Distribución de tipo de donante por departamento de donación.....	37
Figura 23. Malaria asintomática en donantes de sangre, por departamento de colecta.....	38

**Informe técnico del proyecto:**  
**Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011**

**Informe técnico del proyecto:  
Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de  
sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011**

**Informe técnico del proyecto:  
Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011**

## RESUMEN ABREVIADO

En las regiones de alta y moderada transmisión de malaria como en algunos países de África, es frecuente encontrar casos de infección asintomática. En Colombia, los estudios publicados reportan diferentes prevalencias, que varían de acuerdo al tipo de técnica diagnóstica utilizada, teniendo prevalencias de diagnóstico de malaria asintomática por gota gruesa entre 4,2% y 38,5%, en contraste con métodos moleculares que presenta reportes que van entre 10,6 y 64,8% [1-3].

La transmisión normalmente ocurre a través de la picadura de un mosquito, pero se han reportado casos de MTT (malaria transmitida por transfusión) de donadores asintomáticos, la cual constituye una vía relativamente poco frecuente y de baja mortalidad [4]. Diferenciar casos de MTT, de las infecciones naturales es muy difícil en zonas endémicas, porque la malaria que ocurre después de una transfusión, puede ser el resultado de la infección natural por medio de la picadura de mosquito, en lugar de la transmitida por transfusión [5]. El objetivo del estudio fue “estimar la prevalencia de malaria asintomática en donantes de sangre de bancos de sangre de Antioquia (Medellín y Apartadó), Córdoba, Risaralda y Meta” para detectar la presencia de *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*), utilizando gota gruesa y PCR de acuerdo con los protocolos estandarizados en el grupo de Bioquímica y Biología Celular. Se calculó un tamaño de muestra de 750 casos, lográndose recolectar 681 muestras de donantes correspondientes (Antioquia 201, Córdoba 274, Meta 171 y Risaralda 82 muestras. Los donantes aceptados firmaron el consentimiento informado y se realizó toma de muestra tanto para diagnóstico por gota gruesa, como para papel filtro para PCR. No se aceptaron muestras que no fueron recolectadas correctamente en papel filtro. Las gotas gruesas recolectadas fueron leídas en el grupo de Parasitología del Instituto Nacional de Salud, las pruebas moleculares fueron realizadas en el grupo de Bioquímica y Biología Celular y para la verificación de las muestras positivas se empleó el método de secuenciación, inicialmente se procesaron algunas muestras en el grupo de Fisiología molecular en el INS y las otras se enviaron a CORPOGEN, para establecer la confirmación respectiva.

Los resultados obtenidos en los 2 componentes nos permitieron establecer la utilidad de las pruebas moleculares para la detección de parásitos de la malaria en donaciones de sangre, así como establecer el límite de detección de la PCR, lo que nos permitió determinar la presencia de donantes asintomáticos para Malaria

**Informe técnico del proyecto:**  
**Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011**

## 1. RESUMEN EJECUTIVO:

**Objetivo:** Estimar la prevalencia de malaria asintomática en donantes de sangre de bancos de sangre de Antioquia (Medellín y Apartadó), Córdoba, Risaralda y Meta

### **Materiales y métodos:**

Entre agosto de 2012 y julio de 2014 se desarrolló un estudio prospectivo transversal, para estimar la prevalencia de malaria asintomática en donantes aceptados de bancos de sangre ubicados en cuatro departamentos de país, Antioquia (Medellín y Apartadó), Córdoba, Risaralda y Meta; Se realizó tamizaje por gota gruesa, control de calidad externo indirecto del desempeño y tamizaje por PCR y secuenciación a las muestras de sangre en papel filtro que resultaron positivas a la PCR. Todos los métodos fueron revisados y aprobados por los comités institucionales técnico y de ética del Instituto Nacional de Salud.

**Resultados:** se colectaron un total de 681 muestras de donantes, todas resultaron negativas a la lectura por gota gruesa, con concordancia del 100% en la evaluación externa indirecta del desempeño, siete (1,03%) muestras resultaron positivas para *Plasmodium falciparum* por PCR, dos de Antioquia, dos de Risaralda y tres de Villavicencio, muestras que también fueron secuenciadas.

**Conclusión:** Los datos obtenidos en el presente estudio, evidencian la presencia de malaria asintomática en donantes de sangre de tres departamentos.

**Palabras Clave:** Malaria asintomatica, tamizaje, donantes de sangre

Informe técnico del proyecto:  
Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011

## 2. INTRODUCCIÓN:

La estrategia actual de la exclusión de posibles donantes de sangre sobre la base únicamente de una encuesta es contraproducente desde la perspectiva de la disponibilidad de sangre. A pesar de los problemas inherentes con el enfoque actual, cualquier cambio en los criterios existentes debe contrarrestarse con medidas para mantener o mejorar los actuales niveles de seguridad de la sangre y prevenir la malaria transmitida por transfusión (MTT).

Varios países europeos aplazan los donantes de 4 a 6 meses o más después de su regreso de las zonas endémicas, tiempo que permite el desarrollo de anticuerpos, si el donante ha sido infectado; cumplido este tiempo los individuos con pruebas serológicas negativas son aceptados como elegibles, si están libres de síntomas.

En la mayoría de los casos, los donantes implicados en casos de MTT son los residentes de las zonas endémicas, que habían tenido uno o más episodios de malaria. Los donantes con exposición repetida pueden ser en realidad semi-inmunes y representan el mayor riesgo para la transmisión de la infección. Aunque los casos de MTT no son comunes en áreas no endémicas, la malaria es un problema importante, no obstante, en varias de esas áreas y un problema potencial en las demás. Esto se debe a que la malaria es una enfermedad que se está difundiendo en términos del número de personas expuestas. La parasitosis invade a nuevos ámbitos y de retorna a las zonas de las que ya había sido erradicada, igualmente cada vez hay más viajeros a zonas palúdicas. Así, el número de donantes que tienen un "riesgo de malaria" es cada vez mayor.

No tenemos claro cuál es la manera correcta y eficaz para identificar a los individuos con "riesgo de malaria", puesto que los donantes que comúnmente la transmiten por lo general no presentan síntomas (malaria asintomática) y se asocia con la administración intermitente de niveles subterapéuticos de antimaláricos, la resistencia a los medicamentos, la intensidad de la transmisión existente en un área determinada y la inmunidad adquirida después de múltiples exposiciones al parásito.

**Informe técnico del proyecto:**  
**Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011**



Teniendo en cuenta que hasta el momento no hay información que permita establecer el comportamiento actual de la malaria asintomática y la posible malaria transmitida por transfusión en Colombia, el objetivo de este proyecto fue estimar la prevalencia de malaria asintomática en donantes de sangre de bancos de sangre de Antioquia (Medellín y Apartadó), Córdoba, Risaralda y Meta. Este estudio proporcionará información clave para iniciar la vigilancia de MTT y para evaluar la utilidad de las pruebas para la detección de parásitos de la malaria en donaciones de sangre. Se compara el desempeño de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) con la microscopía de rutina (estándar de oro).

**Informe técnico del proyecto:**  
**Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011**

### 3. OBJETIVOS:

#### 3.1 *Objetivo General:*

- Estimar la prevalencia de malaria asintomática en donantes de sangre de bancos de sangre de Antioquia (Medellín y Apartadó), Córdoba, Risaralda, Meta.

#### 3.2 *Objetivos Específicos:*

- Detectar la presencia de *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*), en donantes, provenientes de bancos de sangre, aplicando gota gruesa.
- Detectar infecciones asintomáticas por *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* o infecciones mixtas, por medio de la técnica de PCR en muestras de donantes de los bancos de sangre seleccionados para el estudio.
- Evaluar la utilidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico de malaria asintomática, comparándola con el examen microscópico, en donantes de sangre de los bancos de sangre seleccionados para el estudio.
- Describir las características socio-demográficas de donantes de sangre aceptados en el estudio.

### 4. METODOLOGIA:

#### 4.1 *Tipo de estudio:*

Entre agosto de 2012 y julio de 2014 se desarrolló un estudio prospectivo transversal, para estimar la prevalencia de malaria asintomática en donantes aceptados de bancos de sangre ubicados en cuatro departamentos de país, Antioquia (Medellín y Apartadó), Córdoba, Risaralda y Meta. Todos los métodos, procedimientos y los formularios de consentimiento

**Informe técnico del proyecto:**  
**Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011**

informado y de recolección de información fueron revisados y aprobados por los comités institucionales técnico y de ética del Instituto Nacional de Salud, quienes le dieron el aval respectivo al protocolo planteado.

Dado que el estudio se planteó en población de donantes de sangre y no en población general, para la selección de los departamentos y los bancos de sangre que participaron en el mismo, se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros:

- El departamento seleccionado debía tener banco de sangre abierto.
- El banco de sangre debía realizar tamizaje para malaria por gota gruesa a las unidades de sangre o en caso de no realizarse en la rutina, comprometerse a realizar el mismo a los donantes que aceptaran participar en el estudio.
- Los reportes de SIVIGILA para malaria, en los años previos
- Los informes de gestión realizado por la Coordinación Red Nacional de Bancos de sangre, específicamente en lo relacionado con unidades de sangre captadas y tamizadas, así como los datos que se tenían de muestras positivas para gota gruesa en años anteriores al inicio del proyecto.

#### 4.1.2 Tamaño de la muestra:

Para el cálculo del tamaño de muestra se tuvo en cuenta los reportes de SIVIGILA para malaria, en los años previos de los departamentos seleccionados, además de los informes de gestión realizado por la Coordinación Red Nacional de Bancos de sangre, específicamente en lo relacionado con unidades de sangre captadas y tamizadas, así como los datos que se tenían de muestras positivas para gota gruesa en años anteriores al inicio del proyecto.

La muestra total estaba compuesta por donantes aceptados, distribuidos de la siguiente forma:

- **Donantes aceptados:** El tamaño de muestra se calculó en 750 donantes aceptados, teniendo en cuenta los datos de prevalencia de infección por malaria en donantes de sangre reportada por los bancos de sangre al INS en los últimos 3 años que es aproximadamente 0,4%, esperando encontrar al menos 3 casos.

**Informe técnico del proyecto:**  
**Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011**

Para el cálculo se utilizó el programa, Epi-Info 6.04, teniendo en cuenta los siguientes parámetros estadísticos, prevalencias estimadas (0,4%- 0,57%), un nivel de Confianza de 95% y poder 80%. La distribución del tamaño de muestra, se estableció así:

Tabla 1. Tamaño muestral

Departamento	Banco de sangre	Unidades de Sangre Obtenidas	%	Donantes aceptados
Antioquia	Banco de sangre	4.194	9,94	75
Antioquia	Banco de sangre	12.562	29,76	222
Córdoba	Banco de sangre	10.161	24,07	181
Meta	Banco de sangre	5.694	13,49	101
Risaralda	Banco de sangre	9.600	22,74	171
Total		42.211	100	750

Con el fin de distribuir este valor de forma proporcional, ajustó de acuerdo a la captación de cada banco de sangre y se obtuvo un tamaño de muestra para cada entidad participante:

- Banco de sangre de Apartadó: 75
- Banco de sangre de Medellín: 222
- Banco de Sangre de Villavicencio: 101
- Bancos de Sangre de Córdoba: 181
- Bancos de Sangre Risaralda: 171

### Criterios de inclusión

Los donantes de sangre hubieran sido declarados aptos para realizar su donación en los respectivos bancos de sangre que estuviera participando en el estudio.

### Consentimiento Informado

A todos los participantes en el estudio, se les pidió autorización y consentimiento para participar en el mismo, para ello se utilizó un lenguaje claro y sencillo y quienes estaban de acuerdo en participar fueron informados de los riesgos, beneficios y derechos de la participación; a estos individuos, se les entregó una copia con la información resumida del estudio, que incluía los datos de los investigadores principales, en caso de que requirieran información adicional. Luego se les proporcionó un ejemplar del consentimiento Informado para ser diligenciado y firmado.

**Informe técnico del proyecto:**  
**Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011**

Se realizó análisis de las variables demográficas como: departamento de donación, edad, género, actividad o empleo, procedencia del donante, resultado serológico, entre otras. La variable ocupación fue unificada en las bases de datos de acuerdo a la "Metodología de la Clasificación Internacional Uniforme de Ocupaciones (CIUO) [6]. Los municipios fueron unificados de acuerdo al listado de Codificación de municipios y centros poblados del DANE 2009 [7]. El tipo de donante, fue unificado de acuerdo a los criterios establecidos en la Guía para la selección y atención de donantes de sangre y hemocomponentes en Colombia [8].

#### **4.2 Recolección de muestras:**

##### **4.2.1 Anonimización de las muestras de donantes de sangre:**

Todos los datos recolectados se manejaron con la mayor confidencialidad, por lo cual a cada uno de los bancos de sangre participantes les fue asignado un código de participante que facilitara la anonimización de las muestras de los donantes de sangre. Las muestras se codificaron teniendo en cuenta, adicionar la letra M, seguida del número que equivale al código asignado al banco participante y seguido del número consecutivo que asignó el banco de sangre al donante de sangre partiendo del número uno, de la siguiente forma:

- |                       |            |
|-----------------------|------------|
| • Antioquia –Apartado | M01- (___) |
| • Antioquia-Medellín  | M02- (___) |
| • Córdoba -Montería   | M03- (___) |
| • Córdoba -Montería   | M04. (___) |
| • Meta- Villavicencio | M05- (___) |
| • Pereira- Risaralda  | M06- (___) |
| • Pereira- Risaralda  | M07- (___) |

La confidencialidad fue responsabilidad de los diferentes bancos de sangre y del Instituto Nacional de Salud de Colombia, según las prácticas y los estándares actuales.

##### **4.2.2 Toma de la muestra de sangre para láminas de gota gruesa:**

Los donantes fueron entrevistados acorde con los protocolos de los bancos de sangre para seleccionar los donantes, teniendo en cuenta los lineamientos establecidos en la guía unificada de selección de donantes [8] y de aceptar participar en el estudio, se procedió a la realización de los procedimientos de rutina en el banco de sangre y a la toma de las muestras para el estudio.

#### **Informe técnico del proyecto:**

**Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011**

En el momento de realizar la toma de muestra por punción dactilar, para medir la hemoglobina, se realizó la toma de las gotas de sangre para elaborar las láminas de gota gruesa de acuerdo a los parámetros establecidos para este fin y a los lineamientos dados en las capacitaciones realizadas para unificar dicha metodología en los diferentes bancos de sangre.

Una vez dichas muestras estuvieron secas, se procedió a realizar la coloración de acuerdo al protocolo establecido que fue socializado con los bancos de sangre en las capacitaciones realizadas, con la coloración de Romanowsky modificado.

#### **4.2.1 Lectura de láminas:**

Las gotas gruesas, fueron consideradas como negativas cuando no se encontraron formas parasitarias al examinar microscópicamente las dos gotas gruesas, con objetivo de 100X. En caso de tener alguna muestra positiva en la lectura, se realizaría la respectiva identificación de la especie parasitaria y su recuento.

Los procedimientos de toma de muestra, elaboración de gotas gruesas, coloración y lectura de las mismas, fueron realizados al 100% de las muestras colectadas en los bancos de sangre y estos remitieron el resultado de la lectura, al momento de realizar la remisión de las láminas.

#### **4.2.3 Toma de la muestra de sangre en papel filtro:**

Se efectuó de acuerdo al protocolo establecido en cada banco de sangre, sin realizar un proceso de punción adicional al donante; posterior a la colecta de la unidad de sangre, en el momento del corte del piloto, se realizó la toma de muestra correspondiente para impregnar los ocho círculos demarcados en el papel filtro, de tal forma que a la caída libre de las gotas de sangre, el papel se impregnará completamente por las dos caras (figura 1.)



**Paso 1. Caída libre de la muestra desde el piloto.**



**Paso 2. Muestra impregnada correctamente en los 8 círculos**



**Paso 3. Vista parte posterior del papel filtro.**

**Informe técnico del proyecto:**  
**Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011**

**Figura 1. Proceso de recolección en papel filtro.**

Una vez fueron tomadas las muestras, se procedió a dejarlas secar en un lugar fresco y seco a temperatura ambiente del banco de sangre (que poseen aire acondicionado que mantiene la temperatura alrededor de 16°C), las muestras fueron almacenadas de forma individual en bolsas plásticas de cierre hermético y fueron conservadas a temperatura ambiente (figura 2 ), y fueron enviadas al Instituto Nacional de Salud, en donde se realizó el procesamiento para las pruebas de detección de *Plasmodium* por PCR.



**FIGURA 2. Almacenamiento muestras en papel filtro**

#### **4.3 Procesamiento de las muestras**

##### **4.3.1 Ingreso y remisión de muestras**

En el Instituto Nacional de Salud, se realizó recepción de las muestras en el Coordinación Red Nacional de Bancos de sangre y servicios de transfusión, en donde se realizó el ingreso de las mismas y su respectiva remisión de acuerdo a los compromisos adquiridos: la sangre en papel filtro fue direccionada al grupo de Bioquímica, para el procesamiento de PCR para *Plasmodium* y las muestras de gota gruesa fueron remitidas al grupo de parasitología Red, con el fin de realizar el control de calidad indirecto del desempeño al 10% de las muestras que fueron remitidas.

##### **4.3.2 Control de calidad indirecto a láminas de gota gruesa:**

Una vez las láminas de gota gruesa fueron recibidas en el grupo de parasitología del INS, fueron leídas e informadas: concordancia en el resultado reportado (lectura de positividad o

#### **Informe técnico del proyecto:**

**Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011**



negatividad) y ocho tipos de errores técnicos 8 que podrían detectarse: espesor (gruesa o delgada), distribución (tocando bordes o irregular), coloración (deshemoglobinización, coloración inadecuada, contaminación y precipitados), identificación inadecuada. De acuerdo a las evaluaciones realizadas se realizaron las recomendaciones de mejora.

#### 4.3.3 Procesamiento de muestras de papel filtro por técnicas moleculares: para diligenciamiento de Sandra Barrera

##### 4.3.3.1. Extracción de ADN mediante Kit comercial

Se recibieron las muestras provenientes de cada Banco de sangre con la muestra impregnada en papel filtro en el grupo de Bioquímica y Biología Celular, donde se verificó la calidad de la muestra y se mantuvieron criterios de aceptación o rechazo de muestras por ser inapropiadas (figura 3).

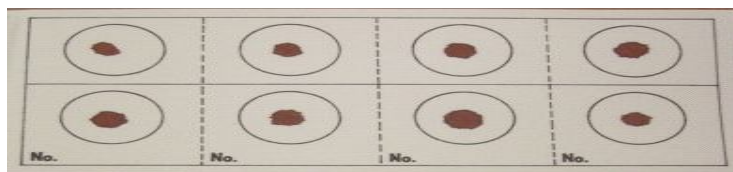


Figura 3: Muestra inadecuada en papel filtro

La extracción de las muestras se realizó mediante el kit de Quiagen QIAamp® DNA Micro Kit siguiendo las instrucciones del fabricante, al realizar las respectivas extracciones, se realizó un control de la reacción para hacer *verificación* del ensayo. Este procedimiento permitió obtener un ADN libre de proteínas, DNAsas y otras impurezas que interfieren con la acción de las polimerasas.

##### 4.3.3.2. PCR universal y anidada

Para la detección de parásitos del género *Plasmodium* por PCR, se realizó una PCR que en la primera fase amplificó la secuencia de género, y en la segunda fase, se realizó la amplificación de especie, de acuerdo a los protocolos establecidos por el grupo de Bioquímica del INS (MEN-RO3.000.3010-002). Los iniciadores utilizados en los ensayos de PCR fueron diseñados centrados en la multicopia de la subunidad conocida como 18SrRNA, que se encuentra en todas las especies de *Plasmodium*.

**Informe técnico del proyecto:**  
**Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011**



**4.3.3.2.1. PCR UNIVERSAL.** La primera reacción de PCR, se emplearon iniciadores específicos para determinar género (figura 4)



Figura 4: PCR Universal (amplificación del gen ssr RNA 18s). Tomado de Snounou, G., et al (1993)

#### 4.3.3.2.1.1 Controles PCR Universal

- Control de reactivos: Mezcla de PCR universal + 1 µL de H<sub>2</sub>O.
- Control positivo: ADN de *Plasmodium falciparum*, cepa de referencia (3D7), *Plasmodium vivax* y *Plasmodium malariae*.
- Control de extracción: ADN humano obtenido a partir de sangre venosa de individuos sanos.

**4.3.3.2.2. PCR ANIDADA.** Posteriormente se procedió a realizar una PCR anidada con iniciadores específicos de especie (figura 5)

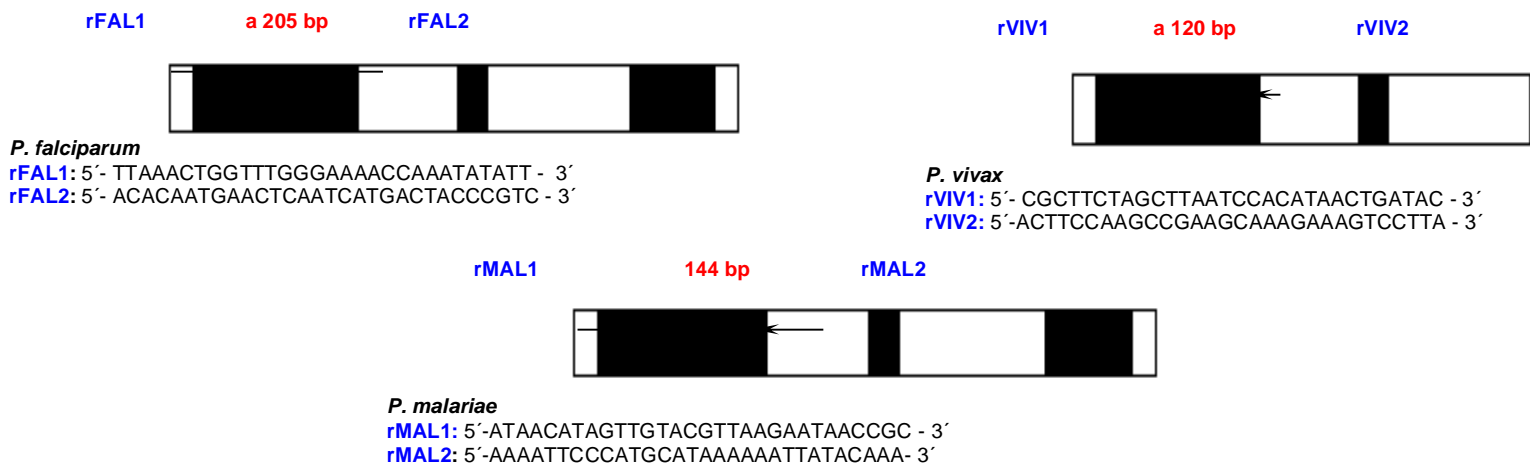


Figura 5: PCR Nested (amplificación del gen ssr RNA 18s). Tomado de Snounou, G., et al (1993)

Tomado de Snounou, G., et al (1993)

Informe técnico del proyecto:  
Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011

#### 4.3.3.2.1. Controles PCR Anidada

Reacción usando los cebadores rFAL1 y rFAL2: amplifica la especie *P. falciparum*

- Control positivo: amplificado del universal ADN de *P. falciparum*.
- Control negativo: amplificado del universal de ADN de *P. vivax*, *P. malariae* y sangre venosa de individuos sanos.
- Control de reactivos: mezcla de PCR anidada + H<sub>2</sub>O.
- Control del sistema: mezcla de PCR anidada + solución proveniente del tubo control de reactivos preparado durante la PCR universal.

Reacción usando los cebadores rVIV1 y rVIV2: amplifica la especie *P. vivax* (figura 6)

- Control positivo: amplificado del universal de ADN de *P. vivax*.
- Control negativo: amplificado del universal de ADN de *P. falciparum*, *P. malariae* y sangre venosa de individuos sanos.
- Control de reactivos: mezcla de PCR anidada + H<sub>2</sub>O.
- Control del sistema: mezcla de PCR anidada + solución proveniente del tubo control de reactivos preparado durante la PCR universal.

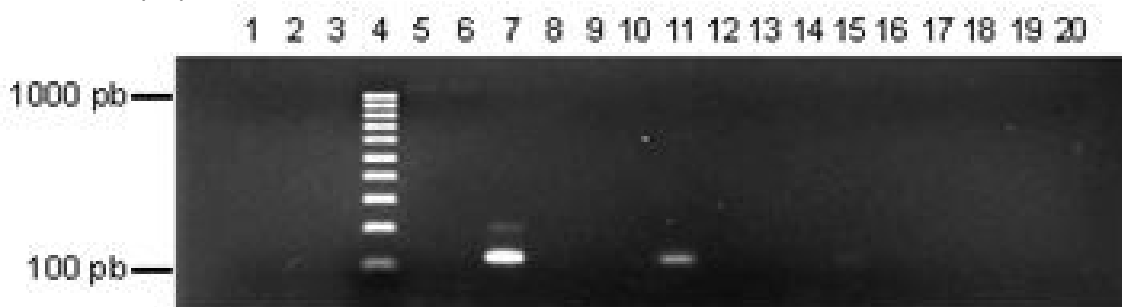


Figura 6. PCR anidada, iniciadores rVIV1/rVIV2 (*P. vivax*). Carril 1) control negativo de la reacción, carril 2) control negativo de la PCR universal, carril 3) ADN humano, carril 4) marcador de peso molecular de 100 pb, carril 5 y 6 ADN *P. falciparum* (cepa 3D7) y control interno respectivamente, carril 7) control positivo ADN de *P. vivax*, carril 8) ADN de *P. malariae*, carriles 9-20) ADN extraído a partir de muestras de papel filtro provenientes del departamento de Antioquia.

Reacción usando los cebadores rMAL1 y rMAL2: amplifica la especie *P. malariae* (figura 7)

- Control positivo: amplificado del universal de ADN de *P. malariae*.
- Control negativo: amplificado del universal de ADN de *P. falciparum*, *P. vivax* y sangre venosa de individuos sanos.
- Control de reactivos: mezcla de PCR anidada + H<sub>2</sub>O.
- Control del sistema: mezcla de PCR anidada + solución proveniente del tubo control de reactivos preparado durante la PCR universal.

#### Informe técnico del proyecto:

Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011

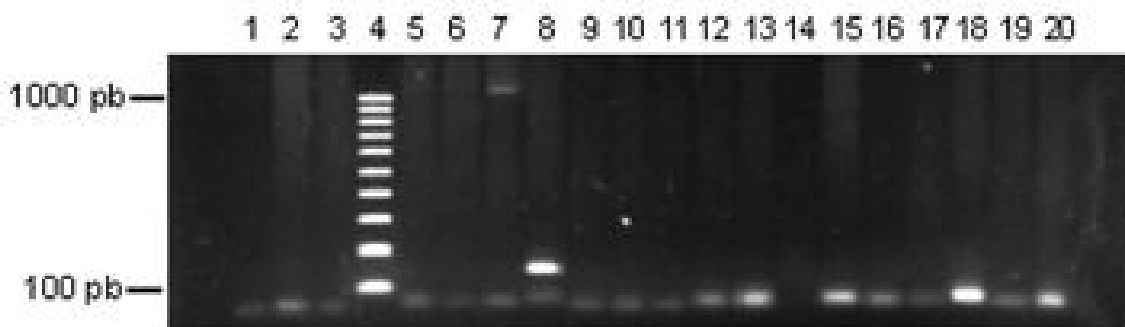


Figura 7. PCR anidada, iniciadores rMAL1/rMAL2 (*P. malariae*). Carril 1) control negativo de la reacción, carril 2) control negativo de la PCR universal, carril 3) ADN humano, carril 4) marcador de peso molecular de 100 pb, carril 5 y 6) ADN *P. falciparum* (cepa 3D7) y control interno respectivamente, carril 7) ADN de *P. vivax*, carril 8) control positivo ADN de *P. malariae*, carriles 9-20) ADN extraído a partir de muestras de papel filtro provenientes del departamento de Antioquia.

#### 4.3.3.3. Límite de Detección

Se realizó el límite de detección, usando la cepa de laboratorio que se tiene FCB-1, con base en el cálculo de ADN por parásito (200fg) (Mendoza, N. 1999) y se llegó a definir el límite de detección en número de parásitos para *P. falciparum*, de 3 parásitos por microlitro (figura 6).

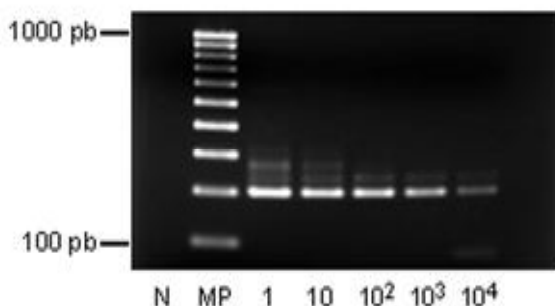


Figura 8. Límite de Detección. Amplificación de diluciones en serie a partir de un ADN puro de *P. falciparum* (cepa FCB-1 6ng/μl); control de reactivos (N), marcador de peso molecular de 100pb (MP).

#### 4.3.3.4. Análisis de los productos de PCR

Los productos de PCR para las dos reacciones fueron resueltos por electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido en solución acuosa de bromuro de etidio 1 μg/mL y visualizados sobre luz UV. Los resultados se registraron en un analizador de imágenes (figura 9).

**Informe técnico del proyecto:**  
**Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011**

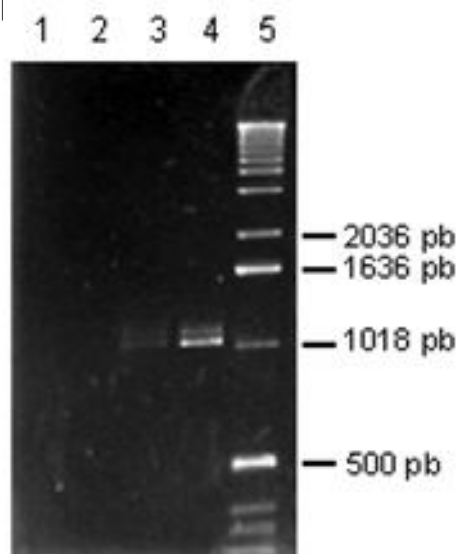


Figura 9. Productos de amplificación en la PCR universal con cebadores rPLU6 y rPLU5. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido en bromuro de etidio y visualizado bajo luz UV. Carriles 1 y 2 control de reactivos, carriles 3 y 4 ADN de *Plasmodium* y carril 5 marcador de peso molecular de 1Kb

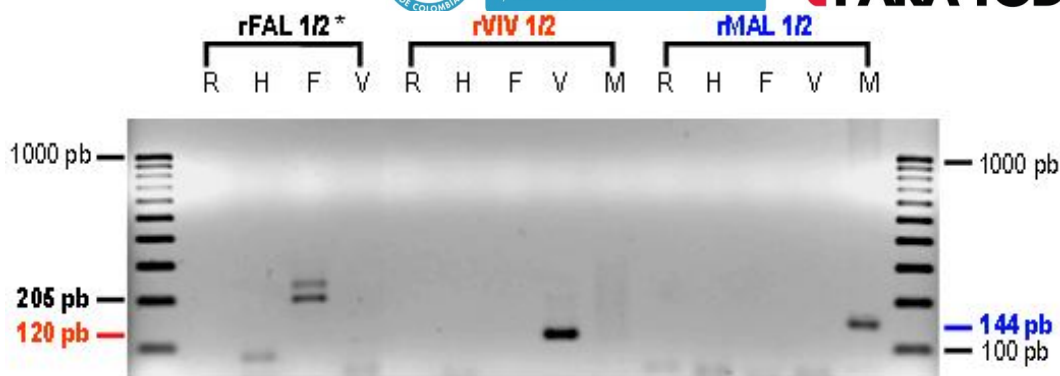
#### 4.3.3.5. Interpretación de los resultados

De acuerdo a la amplificación esperada, por parte de los iniciadores y sus respectivos tamaños (figura 10), la tabla 2, indica el tamaño positivo de la banda de ADN correspondiente a cada especie

ESPECIE	INICIADORES	TAMAÑO PRODUCTO	DEL
<i>P. falciparum</i>	rFAL1/rFAL2	205 bp.	
<i>P. vivax</i>	rVIV1 y rVIV2	117 pb.	
<i>P. malariae</i>	rMAL1 y rMAL2	144 pb	

Tabla 2. Tamaño positivo de la banda de ADN correspondiente a cada especie

**Informe técnico del proyecto:**  
**Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011**



**Figura 10. Productos de amplificación en la PCR anidada con cebadores específicos de especie (Gel de agarosa al 2%, teñido en bromuro de etidio y visualizado bajo U.V). Control de reactivo = R; Control ADN humano = H; Control positivo *P. falciparum* = F; Control Positivo *P. vivax* = V; Control Positivo *P. malariae* = M**

## 5 RESULTADOS:

Para el estudio se tenía establecida la colecta de 750 muestras de donantes, sin embargo fueron remitidas por los bancos de sangre un total de 725, de ellas 44 muestra no fueron tenidas en cuenta en términos de análisis, dado que eran inadecuadas para su procesamiento por criterios de calidad (muestras de sangre en papel filtro).

Se procesaron en total de 681 muestras de donantes, todas resultaron negativas a la lectura por gota gruesa, con concordancia del 100% en la evaluación externa indirecta del desempeño.

Siete muestras (1,03%) resultaron positivas para *Plasmodium falciparum* por PCR, dos de Antioquia, dos de Risaralda y tres de Meta, muestras a las que también se les realizó el proceso de secuenciación para corroborar la presencia del *Plasmodium*. Es de anotar que pese a que no se colectó el total de muestras establecido en el protocolo, la muestra faltante es menor al 10% del total calculado. Por tanto, esta es una muestra amplia (681 muestras), lo cual no debe preocupar entorno a la representatividad y que esta reducción no influye en la decisión de incluir o no a un donante o en cambiar las decisiones de respuesta a las variables objeto de estudio.

### 5.2 Objetivo 1. Detectar la presencia de *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*), en donantes, provenientes de cinco bancos de sangre, aplicando gota gruesa.

**Informe técnico del proyecto:**

**Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011**

El objetivo 1 se cumplió completamente, para ello los bancos de sangre realizaron el tamizaje de cada muestra por gota gruesa, con la respectiva remisión de los resultados, así mismo se realizó control de calidad indirecto del desempeño en el grupo de parasitología, resultados que se describe a continuación:

### 5.2.1 Tamizaje de las Gotas gruesas en los bancos de sangre:

Cada uno de los bancos participantes realizó tamizaje por gota gruesa a cada una de las muestras provenientes de donantes de sangre que aceptarán participar en el estudio, resultando negativas a la lectura en microscopio el 100% de las muestras colectadas en el marco de la investigación, en los bancos de sangre, como se muestra en la ( tabla 3).

**Tabla 3. Resultados de tamizaje por gota gruesa para malaria**

Departamento de donación	Número de donantes	Número gotas Gruesas leídas	Gota Gruesa			
			Positivos		Negativos	
			n	%	n	%
Antioquia	186	186	0	0	186	100
Córdoba	249	232	0	0	232	100
Meta	166	166	0	0	166	100
Risaralda	80	71	0	0	71	100
Total general	681	655	0	0	655	100

### 5.1.2 Control de Calidad Indirecto del Desempeño de las Gotas Gruesas:

De acuerdo a lo establecido en el protocolo de investigación aprobado por el CTIN, se realizaría control de calidad indirecto del desempeño al 10% de las muestras recibidas, sin embargo en el grupo de parasitología del INS se realizó control de calidad al 96,2% de las gotas gruesas recibidas, en total se controló la calidad de 655 muestras. Con respecto a la concordancia en el resultado de la lectura, se presentó 100% de concordancia entre lo reportado por los bancos de sangre y la lectura realizada en el Laboratorio de parasitología del INS, aun para los casos de las muestras positivas por PCR.

En lo relacionado con los ocho tipos de errores técnicos 8 que podrían detectarse por lámina de gota gruesa: espesor (gruesa o delgada), distribución (tocando bordes o irregular), coloración (deshemoglobinización, coloración inadecuada, contaminación y precipitados),

**Informe técnico del proyecto:**  
**Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011**

identificación inadecuada, se tendría un total de 5240 errores técnicos probables para el tamaño muestral leído en nuestro estudio, de la siguiente forma:

Se presentaron 203 errores de espesor (gruesa o delgada), seis de distribución (tocando bordes o irregular), 798 de coloración (deshemoglobinización, coloración inadecuada, contaminación y precipitados) y 7 de identificación inadecuada, lo que evidencia que aunque se presentaron algunos errores técnicos, en su mayoría 80,6% la muestra fue adecuada (figura 11). Con respecto a los errores técnicos que se presentaron, en su mayoría están relacionados con coloración y aunque podrían demorar un poco más la lectura, no impiden la realización de las mismas.

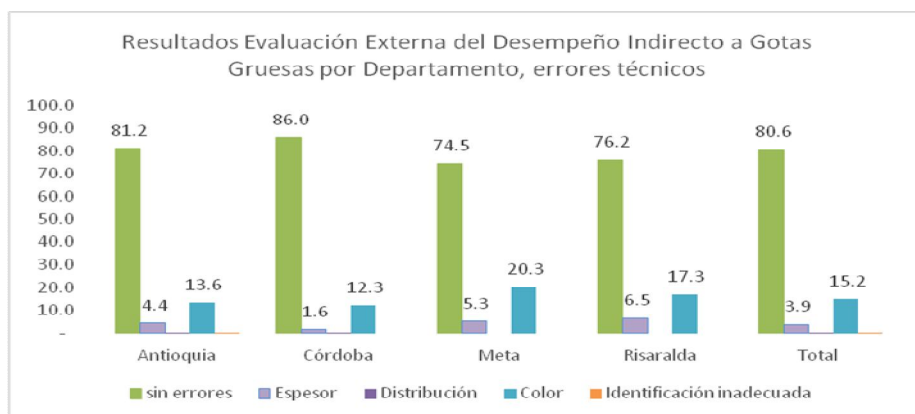


Figura 31. Resultados evaluación Externa del Desempeño Indirecto (EEID) a Gotas Gruesas por Departamento, errores técnicos.

Se presentaron 5 láminas de gota gruesa que fueron remitidas con lectura negativa, a las cuales no se les pudo realizar control de calidad debido a que las muestras recibidas estaban demasiado densas.

## 5.2 Objetivo 2. Detectar infecciones asintomáticas por *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* o infecciones mixtas, por medio de la técnica de PCR en muestras de donantes de los bancos de sangre seleccionados para el estudio.

El objetivo planteado se cumplió, el grupo de Bioquímica y Biología Celular recibió 728 de las cuales se rechazaron 47 muestras, por insuficiencia de muestra en los papeles filtro 45 muestras (figura 3) y 2 muestras por que llegaron los papeles filtro sin muestra. Se procesaron 681 muestras procedentes de Antioquia (186), Córdoba (248), Meta (167), Risaralda (80) (Tabla 5).

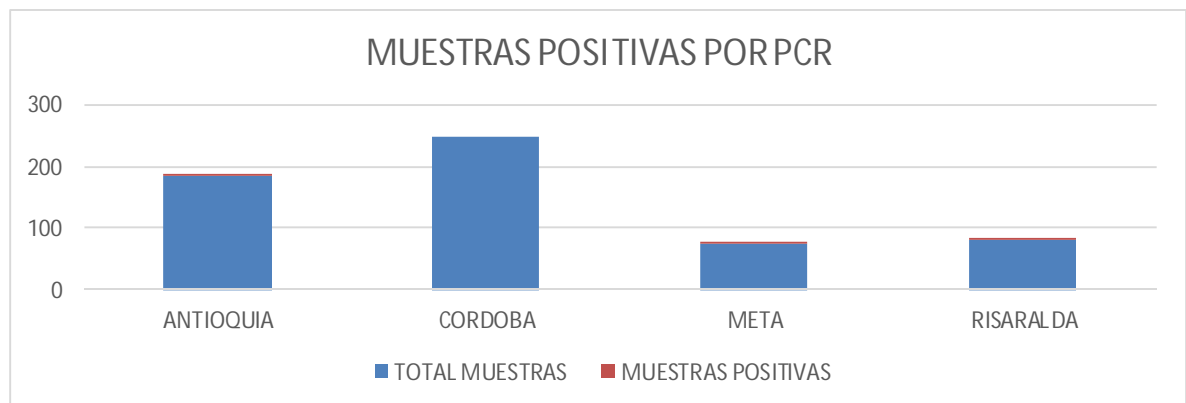
Informe técnico del proyecto:  
Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011



Departamentos	Total Muestras	Muestras Rechazadas	Muestras Procesadas
Antioquia	201	15	186
Córdoba	274	26	248
Meta	171	4	75
Risaralda	82	2	80

**Tabla 5. Total muestras ingresadas y procesadas por PCR.**

De las 681 muestras procesadas para prueba de PCR, 7 (1,03%) muestras resultaron positivas para *Plasmodium falciparum* por PCR, dos de Antioquia, dos de Risaralda y tres de Meta (figura 12).



**Figura 12. Muestras positivas por PCR**

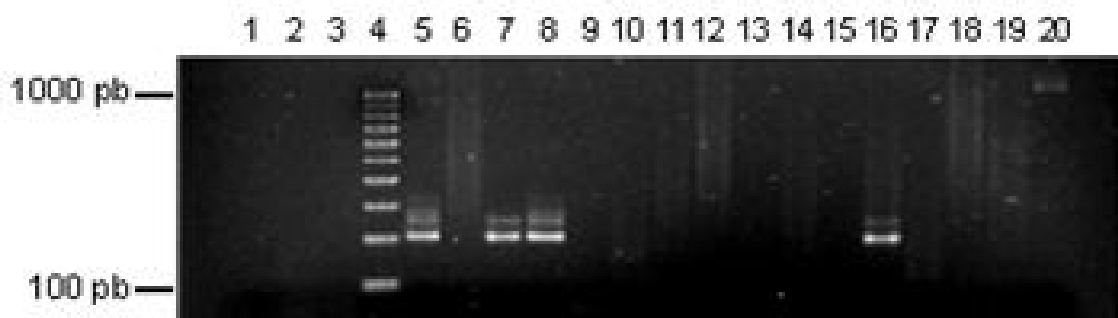


Las siete muestras positivas por PCR para *Plasmodium falciparum* (figura 10), fueron procesadas por secuenciación para confirmar su positividad. Las demás muestras 674/681 fueron negativas para la prueba de PCR (figura 13).



**Figura 14. Total muestras procesadas por PCR**

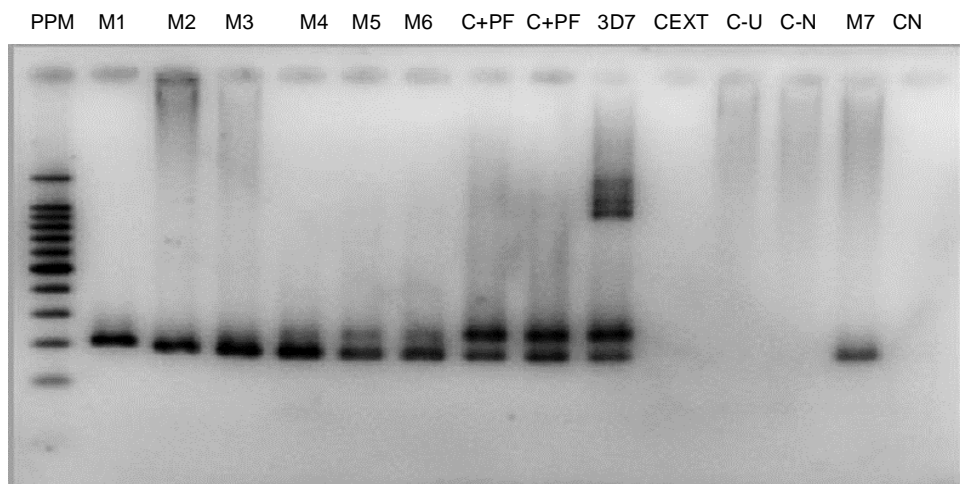
Se muestra el gel de agarosa las primeras 3 muestras positivas correspondientes al departamento de Meta (Figura 14).



**Figura 14. Muestras positivas Meta. Gel de bromuro de etidio teñido al 2.5% de las muestras positivas de Meta. En los carriles del 1-3 (controles negativos); carril 4 (ladder de 100-1000pb); carriles 5, 7, 8 (muestras positivas); carril 16 (control positivo *P. falciparum*); carriles 9-15, 17, 18, 19, 20 (muestras negativas)**

**Informe técnico del proyecto:**  
**Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011**

Esta figura muestra los resultados del gel de agarosa donde se evidencian las 7 muestras positivas por PCR (figura 15).



**Figura 15.** Muestras positivas por PCR. Carril 1: marcador de peso molecular; carril 2 muestra positiva 1 (Medellín M02-29); carril 3 muestra positiva 2 (Medellín M02-30); carril 4 muestra positiva 3 (Meta M05-06); carril 5 muestra positiva 4 (Meta M05-13); carril 6 muestra positiva 5 (Meta M05-16); carril 7 muestra positiva 6 (Pereira M07-05); carril 8 (control positivo para *P. falciparum*); carril 9 (control positivo par *P. falciparum*); carril 10 (cepa de referencia 3D7, positiva para *P. falciparum*); carril 11 (Control negativo de la extracción); carril 12 (Control negativo del Universal); carril 13 (Control negativo del nested); carril 14 muestra positiva 7 (Pereira M06-02); carril 15 (control negativo de la reacción).

### Secuenciación de muestras

De acuerdo a los resultados positivos obtenidos en las PCR, en el diagnóstico de *Plasmodium falciparum*, se decidió realizar secuenciación a estas muestras para confirmarlas y así poder realizar el respectivo informe a los bancos de sangre correspondientes. Las muestras, secuenciadas en el INS, fueron comparadas con *P. falciparum* 18S ribosomal RNA not in asexual parasites. En color, se señala el resultado de la comparación de las secuencias obtenidas con las secuencias reportadas en el NCBI, empleando la herramienta Blastn. Así mismo se secuenciaron tanto la cepa de referencia que se tiene para *P. falciparum*, como una muestras positiva para *P. falciparum* obtenido de estudios previos que se usa como control y los controles negativos (muestra de paciente negativo para malaria).

**Informe técnico del proyecto:**  
**Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011**

Los controles positivos empleados en esta prueba de secuenciación mostraron resultados esperados identificando *P. falciparum*

**P.falciparum 18S ribosomal RNA not in asexual parasites**

LOCUS: PFARGE2040 bp DNA linear INV 16-JUL-1996

DEFINITION: *P. falciparum* 18S ribosomal RNA not in asexual parasites.

ACCESSION: M19173

AACCTGGTTGATCTTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCACAGATTAAGCCATGCAAGTGAAAGT  
ACATATGTAAGTAATATATTGAACTGCGAACGGCTCATTAAACAGTTATAATCTACTTGATGT  
TTTTAATATAAGGATAACTACGGAAAATCTGTAGCTAATACTTGTGAAAATACCTTTTGATATATA  
CATATGTATGTATCATTAAAGGTATGTATTTGTTAGATATAAGAATAAAATAAATATAATTGAATTA  
TAACAAAGAAGAAACACATAAAATATGTGTATTATCAATCGAGTATCTGACCTATCAGCTTTTGA  
TGTTAGGGTATTGACCTAACATGGCTATGACGGGTAACGGGGAATTAGAGTTTCGATTCCGGAG  
AGGGAGCCTGAGAAATAGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCAATTC  
TAAAAAAGAGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAATATCGAAAAATGATTTTGAATTGGAAT  
GATAGGAATTTACAAGGTTCTTAGAGAAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGC  
GGTAATTCCAGCTCCAATAGCATATA **TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG** TTCGTAGTTGAATATT  
AAAGAATCCGATGTTTCATTTAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATTATATTTTGCTTTGTT  
CAAAATAAGGTTTTCTAATAAATTATGTTTTATCAGATATGACAGAATCTTTTTTAAATCTCTTC  
AATATGCTTTTATTGCTTTGAGAGGTTTGTACTTTGAGTAAATTAAGTGTTCATAACAGAC  
GGGTAGTCATGATTGAGTTCATTGTGTTTGAATACTACAGCATGGAATAACAAATATGAATAAG  
CTAATTATTTTTTTTTTCTATTATTTTTTGTATTTCTTATTAGCTTAGTTACGATTAATAGGAGTA  
GCTTTGGGGGCATTTCGTATTCAGATGTCAGAGGTGAAATTCTAAGATTTTCTGGAGACGGACTA  
CTGCGAAAGCATTTCCTAATCTATTTCCATTAAATCAAGAACGAAAGTTAAGGGAGTGAAGACG  
ATCAGATACCGTCGTAATCTTAACCATAAACTATACCGACTAGGTGTTGGATGAATATAAAAAAT  
ATATAAATATGTAGCATTTCTTAGGGAATGTTGATTTTATATTAGAATTGCTTCCTTCAGTACCTT  
ATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGCAGTATTCGCGCAAGCGAGAAAGTTAAAAGAA  
TTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGAGCTTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAAC  
TCACTAGTTTAAGACAAGAGTAGGATTGACAGATTAATAGCTCTTTCTTGATTTCTTGATGGTG  
ATGCATGGCCGTTTTAGTTTCGTGAATATGATTTGTCTGGTTAATTCCGATAACGAACGAGATC  
TTAACCTGCTAATTAGCGGTAAGTACACTATATTTTATTTGAAATTGAATATAGGTAATTATACA  
TGTTTATTCAGTGTTCAAATTAGGATATTTTTTATTAATAATTCTTTTCCCTGTTTTACTAATA  
ATTTGTTTTTTTTTACTCTATTTCTCTCTCTTTAAGAATGTAAGTTGCTTGATTAAATAAAGCTTC  
TTAGAGGAACAGTGTGTATCTAACACAAG **GAGTTTAAGGCAACAACAGG** TCTGTGATGTCCTT  
AGATAAACTAGGCTGCACGCGTGCTACAATGATATATAACAAGTTGTTAAAAATGTACTTATA  
AATAAGTGTGTACAATTTTCTGTACTGAAAAGTATAGGTAATCTTTATCAGTATATATCGTAAT  
TGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTGAACGAGGAAGCCCGTCGCTCCTACCGATTGAAAG  
ATATGATAAATTGTTTGGATATGAATTAATAAATAAGTTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAA  
CCTGCGGAAGGATCATTAAATATATGAAACG

**rPLU6: 5' - TTA AAA TTG TTG CAG TTA AAA CG -3'**

**rPLU5: 5' - CCT GTT GTT GCC TTA AAC TTC -3'**  
**3' - GGA CAA CAA CGG AAT TTG AAG -5'**

**Informe técnico del proyecto:**

**Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011**

A continuación se evidencia el informe de secuenciación obtenido tanto para las muestras positivas (7 muestras).

1. **Muestra positiva 1 (Medellín M02-29).** Para esta muestra se le realizó la secuenciación en corpogen. (**Plasmodium falciparum 18S ribosomal RNA gene**)

>M02-29 FAL

AAATAAGGTTTTCTAATAAATTATGTTTTATCAGATATGACAGAATCTTTTTAAAATCTCTT  
CAATATGCTTTTATTGCTTTTGAGAGGTTTTGTTACTTTGAGTAAAAT

2. **Muestra positiva 2 (Medellín M02-30).** Esta muestra fue secuenciada en corpogen. (**Plasmodium falciparum 18S ribosomal RNA gene**)

>M02-30 FAL

TAAGGTTTTCTAATAAATTATGTTTTATCAGATATGACAGAATCTTTTTAAAATCTCTTCAAT  
ATGCTTTTATTGCTTTTGAGAGGTTTT-GTTACTTTGAGTAAAA-TAAG--GTTCA-A-

3. **Muestra positiva 3 (Meta M05-06).** Esta muestra fue procesada en el grupo de Fisiología molecular, por la Doctora Mary Luz Gunturiz.

MUESTRA 06 (META) PRIMER FA-2. MARZO 28 DE 2014. GRUPO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA CELULAR Y RED NACIONAL DE BANCOS DE SANGRE (**Plasmodium falciparum 18S ribosomal RNA gene**)

TGTTATGACCTTATTTTACAAACGTACAAACCTCTCAAAGCAATAAAAGCATATTGAAGAGA  
TTTTAAAAAAGATTCTGTCATATCTGATAAAAACATAATTTATTAGAAAACCTTATTTTGAACA  
AAGCAAAATATATAATATATTTGGTTTTCCCAAAACCAGTTTAA

4. **Muestra positiva 4 (Meta M05-13).** Esta muestra fue procesada en el grupo de Fisiología molecular, por la Doctora Mary Luz Gunturiz

MUESTRA 13 (META). PRIMER FA-1. GRUPO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA CELULAR Y BANCO DE SANGRE. ABRIL 4 DE 2014 (**Plasmodium falciparum 18S ribosomal RNA gene**)

**Informe técnico del proyecto:**  
**Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011**

ATATTTTGCTTTGTTCAAATATGGTTTTCTAATAAATTATGTTTTATCAGATATGACAGAATCT  
TTTTAAAATCTCTTCAATATGCTTTTATTGCTTTTGAGAGGTTTTGTTACTTTGAGTAAAATTAA  
GTGTTTCATAACAGACGGGTAGTCATGATTGAAGTTCATTGTGTA

5. **Muestra positiva 5 (Meta M05-16).** Esta muestra fue procesada en el grupo de Fisiología molecular, por la Doctora Mary Luz Gunturiz

MUESTRA 16 (META). PRIMER FA-1. GRUPO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA CELULAR Y BANCO DE SANGRE. MARZO 31 DE 2014 (*Plasmodium falciparum* 18S ribosomal RNA gene)  
ATTATTTTGCTTTGTTCAAACAAGGCTTTCTAATAAATTATGTTTTATTAGATATGACAGAAT  
CTTTTTAAAATCTCTTCAATATGCTTTTATTGCTTTTGAGAGGTTTTGTTACTTTGAGTAAAA  
TTAAGTGTTTCATAACAGACGGGTAGTCATGATTGAAGTTCATTGTGTA

6. **Muestra positiva 6 (Pereira M07-05).** Esta muestra fue procesada en el grupo de Fisiología molecular, por la Doctora Mary Luz Gunturiz

MUESTRA 05 (PEREIRA) PRIMER FA-2. MARZO 28 DE 2014. GRUPO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA CELULAR Y RED NACIONAL DE BANCOS DE SANGRE (*Plasmodium falciparum* 18S ribosomal RNA gene)

CGCATATTGAAGAGATTTTAAAAAGATTCTGTCATATCTGATAAAAACATAATTTATTAGAA  
AACCTTATTTTGAACAAAGCAAAATATATAATATATTTGGTTTTCCCAAACAGTTTAA

7. **Muestra positiva 7 (Pereira M06-02).** Esta muestra fue procesada en el grupo de Fisiología molecular, por la Doctora Mary Luz Gunturiz

MUESTRA 02 (PEREIRA). PRIMER FA-1. GRUPO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA CELULAR Y BANCO DE SANGRE. MARZO 31 DE 2014 (*Plasmodium falciparum* 18S ribosomal RNA gene)

TTTTGCTTTGTTCAAATAAGGTTTCTAATAAATTATGTTTTATTAGATATGACAGAATCTTTTT  
TAAAATCTCTTCAATATGCTTTTATTGCTTTTGAGAGGTTTTGTTACTTTGAGTAAAATTAAG  
TGTTTCATAACAGACGGGTAGTCATGATTGAGTTCATTGTGTA

**Informe técnico del proyecto:**  
**Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011**

**Control positivo. Muestra positiva para *Plasmodium falciparum*.** Esta muestra fue procesada en el grupo de Fisiología molecular, por la Doctora Mary Luz Gunturiz

CONTROL POSITIVO *Plasmodium falciparum* PRIMER FA-2. MARZO 28 DE 2014. GRUPO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA CELULAR Y RED NACIONAL DE BANCOS DE SANGRE (*Plasmodium falciparum* 18S ribosomal RNA gene)

TGTTATGACCTTATTTTACCAAAGTAACAAAACCTCTCAAAGCAATAAAAGCATATTGAAGAGA  
TTTTAAAAAGATTCTGTCATATCTGATAAAAACATAATTTATTAGAAAACCTTATGTTTGAACAG  
AGCAGAATATATAATATATTTGGTTTTCCCAAACCAGTTTAAA

9. **Control positivo. Cepa de referencia 3D7** Esta muestra fue procesada en el grupo de Fisiología molecular, por la Doctora Mary Luz Gunturiz

CONTROL CEPA DE REFERENCIA 3D7 PRIMER FA-2. MARZO 28 DE 2014. GRUPO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA CELULAR Y RED NACIONAL DE BANCOS DE SANGRE (*Plasmodium falciparum* 18S ribosomal RNA gene)

TGTTATGACCTTATTTTACTAAAAGTAACAAAACCTCTCAAAGCAATAAAAGCATATTGAAGAGA  
TTTTAAAAAGATTCTGTCATATCTGATAAAAACATAATTTATTAGAAAACCTTATTTTGAACAAA  
GCAAAATATATAATATATTTGGTTTTCCCAAACCAGTTTAAA

10. **Controles negativos:** no presentaron ningún problema en la secuenciación.

### 5.3 Objetivo 3. Evaluar la utilidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico de malaria asintomática, comparándola con el examen microscópico, en donantes de sangre de los bancos de sangre seleccionados para el estudio.

De acuerdo a los resultados planteados anteriormente, todas las muestra resultaron negativas al tamizaje por gota gruesa en los bancos de sangre y este resultado fue concordante con el control de calidad indirecto al desempeño de las gotas gruesas realizadas, sin embargo 7 muestras fueron reportadas como positivas por pruebas moleculares PCR y secuenciación para *P. falciparum* para el presente estudio, como se describe en la tabla 6.

La PCR para detección de malaria en donantes mostro su utilidad, dado que todas las muestras fueron procesadas por gota gruesa en los bancos de sangre y se les realizó control de calidad al 96,2% de las muestras colectadas y ambos análisis mostraron concordancia del 100%, para resultado negativos en la lectura de gota gruesa.

Tabla 6. Resultados obtenidos al tamizaje por gota gruesa y pruebas moleculares.

Departamento de donación	Número de donantes	Gota gruesa				Pruebas moleculares PCR <i>P. falciparum</i> y secuenciación.			
		positivos		Negativos		Positivos		Negativos	
		N	%	n	%	n	%	N	%
Antioquia	186	0	0	186	100	2	1,08	184	98,9
Córdoba	249	0	0	249	100	0	-	249	100
Meta	166	0	0	166	100	3	1,81	163	98,2
Risaralda	80	0	0	80	100	2	2,50	78	97,5
Total general	681	0	0	681	100	7	1,03	674	98,9

### 5.4 Objetivo 4. Describir las características socio-demográficas de donantes de sangre aceptados en el estudio:

La base de datos fue sometida a control de calidad al proceso de digitación y fueron depuradas para los municipios del país de acuerdo a la lista de municipios del DANE [7] y las ocupaciones de acuerdo al documento de [6]

Informe técnico del proyecto:  
Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011



La descripción de características de los donantes corresponde a los 681 incluidos en el estudio provenientes de donantes de sangre figura 16, distribuidas de la siguiente forma: 186 muestras de Antioquia, (provenientes de dos bancos de sangre uno en Medellín y el otro en Apartadó), 166 de Meta, 249 de Córdoba (provenientes de dos bancos de sangre) y 80 de Risaralda Figura 17.



Figura 16. Ubicación de los departamentos, de los bancos de sangre del estudio. Mapa elaborado en [http://education.nationalgeographic.com/education/mapping/outline-map/?map=Colombia&ar\\_a=1](http://education.nationalgeographic.com/education/mapping/outline-map/?map=Colombia&ar_a=1), fecha de consulta: 12/10/2014



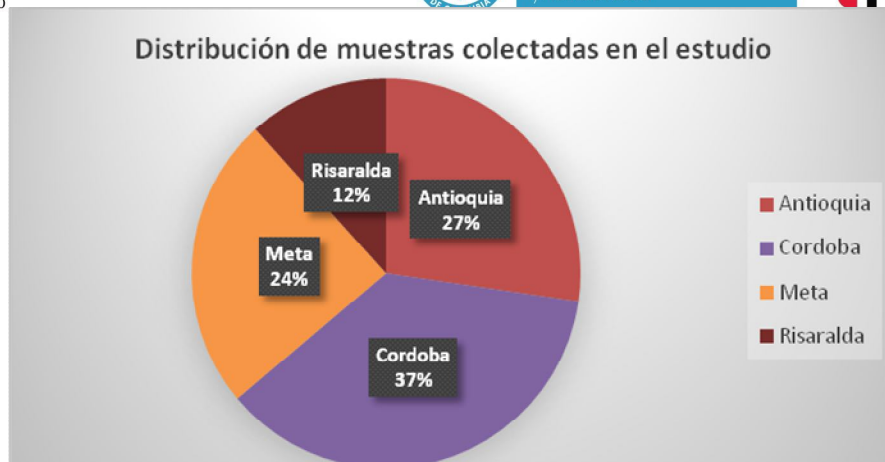


Figura 17. Distribución de muestras colectadas en el estudio por departamento.

- **Distribución de donantes de sangre aceptados en el estudio por departamento y sexo:**

Con respecto a los donantes de sangre que fueron aceptados en el estudio el 26,1% fueron de sexo femenino y el 74,3% fueron de sexo masculino. Se observa que para los departamentos de Risaralda y Meta más del 92,6%, de los donantes pertenecen al sexo masculino, contrastado con el departamento de Córdoba en el cual el porcentaje de similar entre los dos sexos. Figura 18.

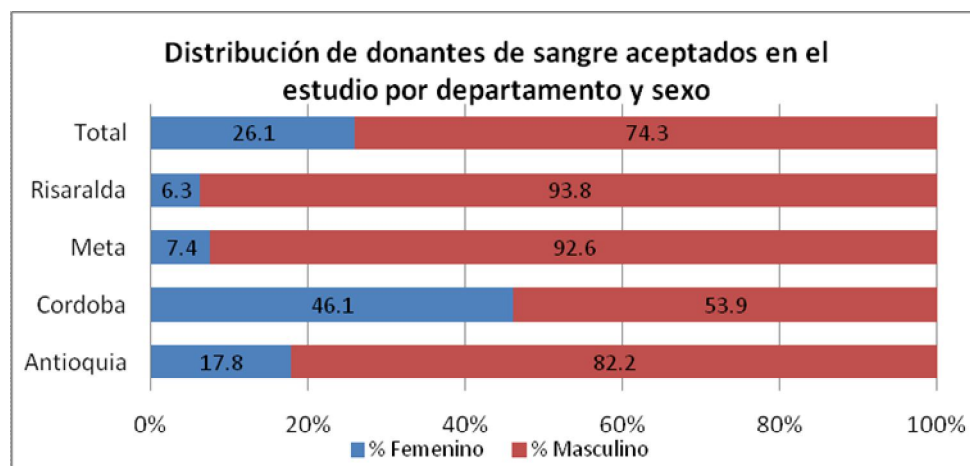


Figura 18. Distribución de donantes de sangre aceptados en el estudio por departamento y sexo

- **Distribución de donantes de sangre aceptados en el estudio por grupo etario:**

La edad promedio para ambos sexos fue de 34,7 años y la mediana de 33 rango de 18 a 65 años; Con respecto a la distribución por grupo etario, se observa que el 68% de los

**Informe técnico del proyecto:**

**Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011**

donantes de sangre están en el rango de edad de 18 a 40 años de edad, 40,4% pertenecen al grupo etario entre 18- y 30 años, seguidos por el 27,8 que tienen rango de edad entre 31 y 40 años figura 19.

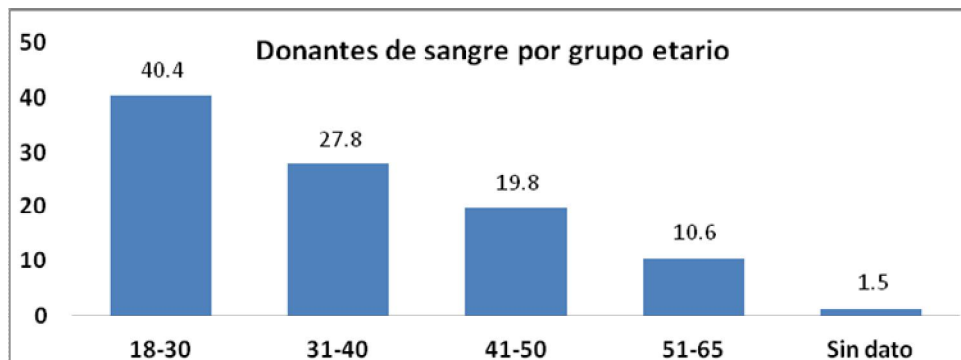


Figura 19. Donantes de sangre por grupo etario

- Distribución de donantes de sangre aceptados en el estudio por sexo y edad:**  
 Con respecto a la distribución por sexo y edad se observa que la distribución entre los dos sexos por rango de edad es similar, es decir que entre la población de donantes, aunque se observa un mayor número de donaciones del sexo masculino, se evidencia que entre los diferentes grupos etarios el porcentaje de donantes es similar por rangos de edad, observándose el mayor porcentaje de donaciones entre 18 y 30 años de edad (entre el 43,5% y 39,3% de las donaciones pertenecen a hombres y mujeres respectivamente), figura 20

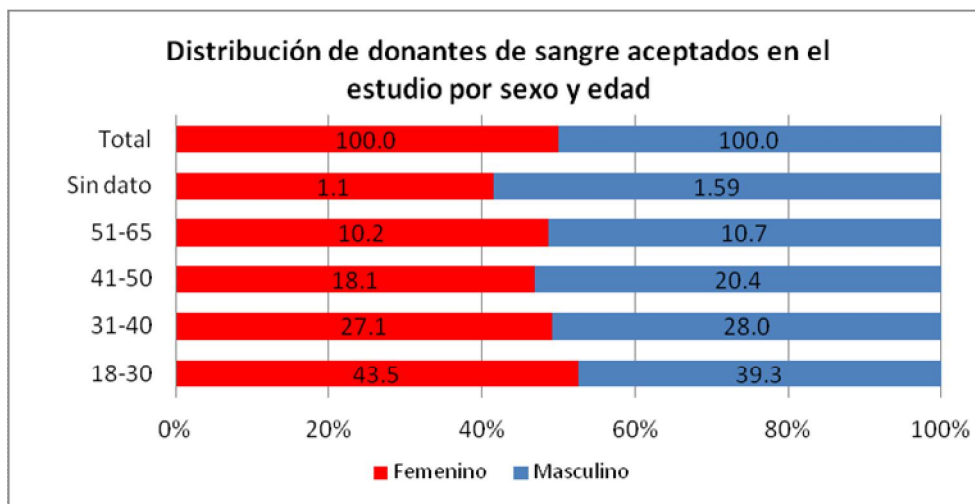


Figura 20. Distribución de donantes de sangre aceptados en el estudio por sexo y edad

- Distribución de donantes de sangre aceptados en el estudio por departamento de procedencia:**

**Informe técnico del proyecto:**  
**Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011**

En cuanto a procedencia, se observa que de los individuos que realizaron su donación en alguno de los bancos de sangre ubicados en los cuatro departamentos del estudio, procedían de algún municipio del mismo departamento en la siguiente proporción 82,8%, 84,7%, 68,8% y 59,6%, procedentes de Antioquia, Córdoba, Risaralda y Meta respectivamente. Sin embargo se observa que existen migraciones entre los individuos que donaron y procedían de 27 departamentos del país; así mismo se observa que se presentó la donación de tres extranjeros procedentes de Argentina, Estados Unidos y Venezuela, las dos primeras en Antioquia y la última en Córdoba Tabla 7.

Departamento de nacimiento	Lugar de donación				
	Antioquia	Córdoba	Meta	Risaralda	Total
Antioquia	82,8	3,2	2,4	2,5	24,7
Arauca	-	-	1,2	-	0,3
Atlántico	0,5	2,0	-	-	0,9
Bogotá	1,6	0,8	6,6	-	2,3
Bolívar	1,1	2,0	-	-	1,0
Boyacá	0,5	-	1,8	-	0,6
Caldas	1,1	-	0,6	8,8	1,5
Caquetá	0,5	-	1,2	-	0,4
Casanare	-	-	1,2	-	0,3
Cauca	-	-	-	1,3	0,1
Cesar	-	0,8	-	-	0,3
Choco	2,2	-	0,6	-	0,7
Córdoba	2,7	84,7	0,6	-	31,9
Cundinamarca	-	-	10,8	2,5	2,9
Guaviare	-	-	2,4	-	0,6
Huila	-	-	2,4	-	0,6
La Guajira	-	0,4	-	-	0,1
Magdalena	0,5	0,4	-	-	0,3
Meta	-	-	59,6	-	14,5
Norte Santander	0,5	-	-	-	0,1
Quindío	0,5	-	-	-	0,1
Risaralda	1,1	-	-	68,8	8,4
San Andrés Islas	-	0,4	-	-	0,1
Santander	0,5	-	0,6	1,3	0,4
Sucre	-	2,4	-	-	0,9
Tolima	-	0,4	3,6	-	1,0
Valle del Cauca	2,7	1,2	3,6	10,0	3,2
Sin Dato	-	0,8	0,6	5,0	1,0
Argentina	0,5	-	-	-	0,1
EEUU	0,5	-	-	-	0,1
Venezuela	-	0,4	-	-	0,1
Total General	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

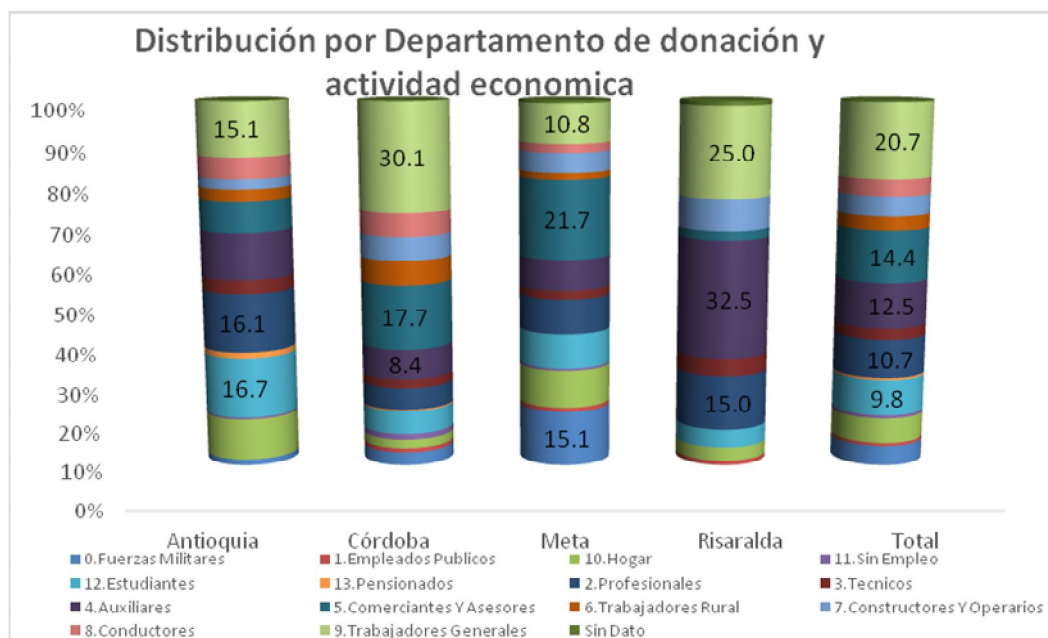
**Tabla 7.** Distribución de donantes de sangre por departamento de nacimiento y de donación

**Informe técnico del proyecto:**  
**Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011**

• **Distribución de donantes de sangre aceptados en el estudio por departamento y ocupación:**

Con respecto a la distribución de ocupaciones, el 20,7% de los donantes se dedican como trabajadores generales, 14,4 a actividades de comerciantes, 12,5% a actividades de oficina (secretarías, mensajeros, etc), 9,8% son estudiantes y 10,7% profesionales.

En general las ocupaciones de los donantes varían por Departamento, en Antioquia los dos principales grupos de ocupación se distribuyen entre estudiantes y profesionales (16,7% y 16,1% respectivamente), en Córdoba entre trabajadores generales y comerciantes (30,1% y 17,7%), en Meta Comerciantes y fuerzas militares (21,7% y 15,1%) y en Risaralda Trabajadores Generales y Auxiliares (25,0 y 32,5), como se observa en la figura 21.



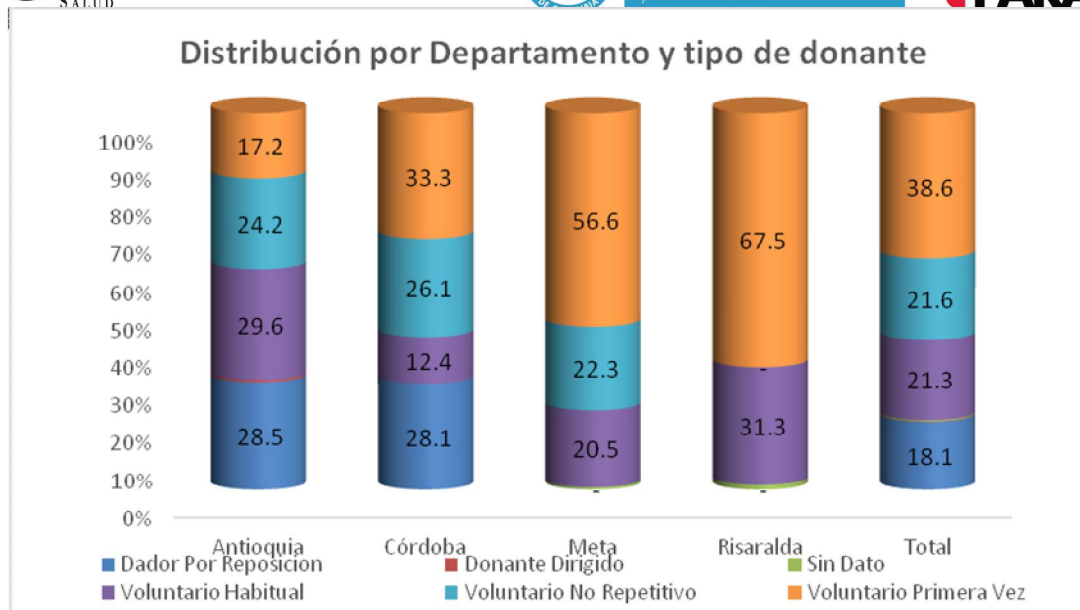
**Figura 21.** Distribución de donantes de sangre por departamento de donación y actividad económica, de acuerdo a categorización según Metodología Clasificación Internacional Uniforme de Ocupaciones Adaptada para Colombia (CIUO) [6].

• **Frecuencia por tipo de donante:**

Con respecto a la frecuencia por tipo de donante y departamento de donación, el donante voluntario de primera vez es el más frecuente que equivale al 38,6%, seguido del donante voluntario no repetitivo 21,6%, voluntario habitual 21,3% y 18,1% donante de reposición.

**Informe técnico del proyecto:**

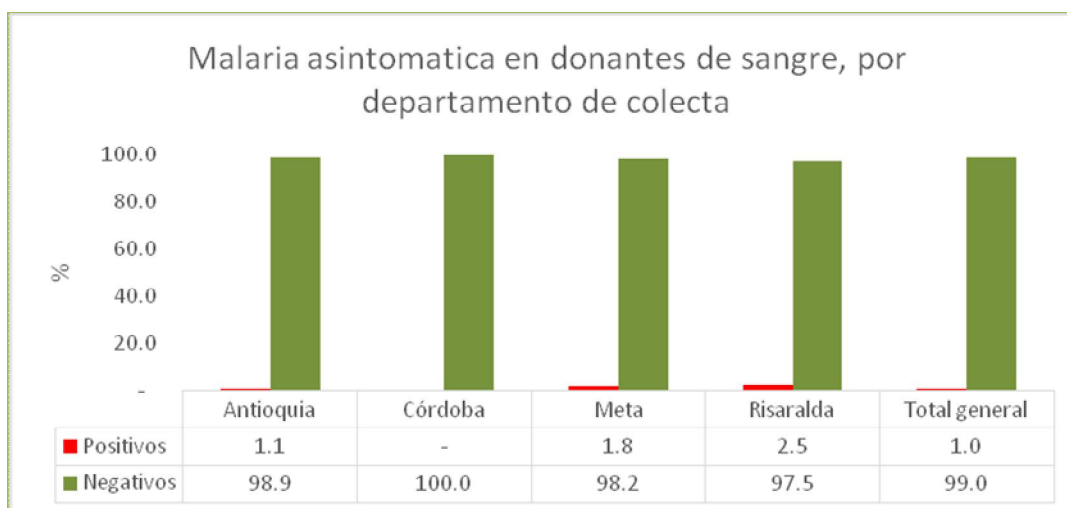
**Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011**



**Figura 22.** Distribución de tipo de donante por departamento de donación

- **Con respecto a los casos que resultaron positivos a PCR y secuenciación:**

De las 681 muestras que fueron aceptadas en el estudio, siete resultaron positivas por PCR y Secuenciación para *P. falciparum*, distribuidos: dos de donantes del banco de sangre de Antioquia (1,1%), dos (2,5%) de Risaralda y tres (1,8%) de Villavicencio figura 23.



**Figura 23.** Malaria asintomática en donantes de sangre, por departamento de colecta

**Informe técnico del proyecto:**  
**Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011**

De los donantes positivos, tres correspondieron a donantes que realizaron su donación de sangre en el banco del departamento del Meta, sin embargo los tres tienen diferentes sitios de nacimiento (Ibagué, Bogotá y Villavicencio).

De los dos positivos de los bancos de sangre de Risaralda uno nació en Valle del Cauca y el otro llama la atención ya que proviene y nació en la Virginia, zona de alta endemividad para Malaria en dicho departamento. De los dos que donaron en Antioquia, ambos nacieron en el mismo departamento, uno en Envigado y otro en Medellín.

De los donantes positivos cuatro (57,1%) corresponden a sexo femenino y tres (42,9%) a sexo masculino. En cuanto a distribución por tipo de donante, cuatro provenían de donantes de sangre de primera vez (57,1%), dos (28,6%) a donantes habituales y uno era voluntario no repetitivo. En cuanto a ocupación el 57,1% corresponden a estudiantes (Tabla 8).

Casos positivos	Lugar de Nacimiento		Procedencia		edad	Sexo	Ocupación	
	Municipio	Dto	Municipio	Dto				
M05-06	Ibagué	Tolima	Villavicencio	Meta	41	Femenin	Comerciante	Vol. Primera vez
M05-13	Bogotá	Bogotá	Villavicencio	Meta	18	Masculin	Estudiante	Vol. Primera vez
M05-16	Meta	Meta	Villavicencio	Meta	59	Femenin	hogar	Vol. habitual
M07-05	La	Risarald	La Virginia	Risaralda	33	Masculin	Coordinador	Vol. Primera vez
M06-02	Cartago	Valle del	Pereira	Risaralda	22	Femenin	Estudiante	Vol. habitual
M02-29	Envigado	Antioqui	Medellín	Antioquia	22	Masculin	Estudiante	Voluntario no
M02-30	Medellín	Antioqui	Medellín	Antioquia	28	Femenin	Estudiante	Vol. Primera vez

Tabla 8. Casos positivos por PCR y secuenciación

## 5 DISCUSIÓN:

El estudio incluyó un total de 681 muestras de donantes de sangre, lo cual permite inferir que la representatividad de la muestra es pertinente, dado que permite conocer las variables relacionadas con el problema que estudio, que es la casuística de malaria en donantes de sangre; así mismo, se tienen datos de malaria en donantes desde la tamización y datos poblacionales que permiten comparar los resultados obtenidos; lo anterior, permite considerar como relevantes los hallazgos del estudio para la población de donantes de sangre.

De otro lado y considerando que por motivos de modificación de los bancos a participar y de su cantidad de muestras no permite estimar un valor específico para cada departamento participante, pero si indicar la posibilidad de presentación de casos como se evidencia y podrían presentarse considerando que la población de donantes es de manera general similar en los departamentos y que por la dinámica de su colecta de sangre el número muestras a analizar puede ser superior a

**Informe técnico del proyecto:**  
**Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011**



los valores establecidos como base del muestreo. En tal sentido, estos datos permiten inferir que existe un riesgo probable de infección transfusional (ITT) dados los hallazgos de casos positivos de malaria en donantes de sangre que fueron aceptados, particularmente en departamentos donde se tiene un índice parasitario IPA superior a 3 y prevalencia de malaria superior a 3 [9], o donde se notifiquen de manera regular malaria poblacional, como es el caso de los departamentos de Antioquia, Córdoba, Risaralda y Meta, [9]; así mismo, que este riesgo puede ser variable en los diferentes departamentos dependiendo de esta prevalencia.

Todas las especies de *Plasmodium*, pueden transmitirse por transfusión de componentes celulares, como los glóbulos rojos, ya que el parásito puede sobrevivir hasta a 4°C hasta por 20 días [10]; los donantes implicados en malaria transmitida por transfusión (MTT), usualmente son semi-inmunes, presentan densidades parasitarias por debajo del límite de detección de los ensayos.

La seguridad de los componentes sanguíneos depende de múltiples factores, entre ellos los criterios de selección de donantes, pruebas serológicas utilizadas para tamización de agentes infecciosos transmitidos por transfusión y demás estrategias o filtros que se establezcan con el fin de disminuir la probabilidad de que individuos con riesgo de infección o unidades de sangre con estándares de calidad no adecuados lleguen a ser transfundidos; dentro de estos filtros, las pruebas de tamización con sensibilidad adecuada tienen un papel muy importante en la reducción de la transmisión de agentes patógenos.

El riesgo de malaria transmitida por transfusión sanguínea (MTT), se ha incrementado como consecuencia del aumento en las migraciones de zonas endémicas a no endémicas [11]. No hay normas universalmente aceptadas para prevenir la malaria transfusional [12, 13] en algunos países, se difiere de acuerdo a preguntas específicas en las encuestas de selección de donantes y en otros países, adicionalmente se aplican algunas pruebas de laboratorio establecidas para detección de *Plasmodium*, a donantes provenientes de zonas endémicas.

Para la disminución del riesgo transfusional por malaria en Colombia, se aplican criterios de diferimiento a las personas que hayan padecido malaria y hayan recibido tratamiento completo, sin resistencia ni recaídas y se difieren por 3 años; si el donante presentó recaídas o resistencia se

difiere por 5 años después del último episodio y se difiere de forma permanente a aquellos que no completaron el tratamiento antimalárico [8]. Adicionalmente a lo mencionado, por norma se realiza

**Informe técnico del proyecto:**  
**Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011**

gota gruesa en zonas que tienen endémicidad como lo establece el decreto 1571 de 1993 y la resolución 901 de 1996 [14, 15].

La gota gruesa es la técnica “*estándar de oro*”, tiene una sensibilidad de 70% en las mejores condiciones para su lectura, pero es una prueba operador dependiente que requiere un entrenamiento adecuado para su ejecución, lo cual sugiere que al menos 30% de los casos de lectura por gota gruesa podrían tener resultados falsos negativos.

Según reportes la sensibilidad de la gota gruesa varía dependiendo de la experticia del microscopista, en manos de expertos la sensibilidad puede variar entre 5 - 50 parásitos por  $\mu\text{L}$  [16], otros reportes hablan de incluso entre 10-30 parásitos [17], pero en la vida práctica la mayoría de los laboratorios de rutina logran una sensibilidad menor, que puede ser de alrededor de 500 parásitos/ $\mu\text{L}$  [16, 18, 19], por lo descrito anteriormente la aplicación de gota gruesa de forma masiva en donantes de sangre no es aplicable, por el volumen de unidades a tamizar y requerimientos de destreza en dicho tamizaje, en el personal que realizar la lectura de dichas láminas en los bancos de sangre, como se aplica para otros agentes infecciosos mediante el uso de plataformas tipo inmunoensayo que facilitan la realización de un número de pruebas importante de manera simultánea.

## Objetivo 2

De las 681 donaciones provenientes de donantes de sangre distribuidas de la siguiente forma: 186 muestras de Antioquia, 166 de Meta, 249 de Córdoba y 80 de Risaralda, resultaron positiva 1,03%, este hallazgo sorprende, debido a que los donantes de sangre sufren un proceso de selección que evalúa factores de riesgo para diversos eventos de riesgo transfusional, incluido malaria.

A nivel de nuestro país, se han realizado tres estudios que pretendían detectar infección con *Plasmodium* en donantes de sangre:

El primero fue publicado en 1982, pretendían realizar una detección de anticuerpos contra *Plasmodium* mediante inmunoensayo (ELISA *in house*), en una población de 3114 donantes de sangre del Hospital Militar de Bogotá, se encontró que un 8,6% por mil fueron positivos para anticuerpos anti-maláricos utilizando antígenos de *P. falciparum*, así mismo en el mismo estudio detectaron 3 casos de malaria transmitida por transfusión [20]. El segundo, en el Hospital San Vicente de Paul en Medellín, en 392 donantes de sangre procedentes de diferentes lugares del departamento de Antioquia, a quienes se les realizó detección de anticuerpos de tipo IgG por IFI

**Informe técnico del proyecto:**  
**Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011**



(inmunofluorescencia indirecta), encontrando una seropositividad del 1,8% [21]. El tercer estudio se realizó en Cali publicado en 2005, a 286 donantes de sangre se les aplicó detección mediante inmunoensayo (ELISA) y PCR para la detección de *Plasmodium*, sin encontrar casos positivo [22].

### Objetivo 3.

Un estudio realizado por Scopel demostró que las muestras de sangre total recolectadas sobre papel filtro proporcionan un ADN de buena calidad, comparado con el obtenido a partir de gotas gruesas coloreadas [23]. La recolección de muestras en papel de filtro es un método muy útil y conveniente para el desarrollo de estudios de epidemiología molecular, debido a que la muestra mantiene sus características, además de ser un método simple y económico.

Una desventaja de la PCR son sus altos costos, lo cual hace difícil implementar esta prueba como método de tamizaje de rutina; sin embargo, en los centros de referencia es de gran utilidad en situaciones especiales como el esclarecimiento de infecciones nosocomiales y en bancos de sangre ó en unidades de trasplantes de órganos [24]. Lo encontrado en el estudio en cuanto al límite de detección de la PCR, en número de parásitos para *Plasmodium falciparum* fue de 3 parásitos/ $\mu$ L de sangre, lo cual es de importancia ya que según el límite reportado para gota gruesa, varía entre 10-30 parásitos/ $\mu$ L de sangre y la sensibilidad del método depende de muchos factores, como la experiencia del microscopista, la calidad de la coloración, el mantenimiento del microscopio y el tiempo disponible para examinar cada muestra [17].

### Objetivo 4.

El hallazgo de un 1,04% de muestras positivas, nos indica que se deben agudizar aún más los criterios de diferimiento para a través de la encuesta y la entrevista, poder afinar un poco más la selección de los mismos, a fin de reducir el riesgo de malaria transmitida por transfusión.

Con respecto a la distribución por grupo etario, se observa que el 68% de los donantes de sangre están en el rango de edad de 18 a 40 años de edad, con un promedio de edad de 34,7 años y de los que resultaron positivos para *P. falciparum* fue de 32 años, lo que evidencia que la población de donantes para este estudio es de población de donantes de sangre jóvenes, dato que coherente con el comportamiento de donantes de sangre a nivel nacional, siendo el grupo de donantes de sangre entre 18-30 años el que está en la base de la pirámide poblacional de donantes, seguido de los donantes de 31-40 años [25].

**Informe técnico del proyecto:**  
**Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011**

En cuanto a procedencia, se observa que de los individuos que realizaron su donación en alguno de los bancos de sangre ubicados en los cuatro departamentos del estudio, procedían de algún municipio del mismo departamento en la siguiente proporción 82,8%, 84,7%, 68,8% y 59,6%, de Antioquia, Córdoba, Risaralda y Meta respectivamente. Sin embargo se observa que existen migraciones entre los individuos que donaron y procedían de 27 departamentos del país; el aumento de las migraciones por los viajes y por el aumento de las migraciones de áreas endémicas a no endémicas (Elghouzzi, Senegas et al. 2008), generan inquietud sobre el afinamiento de las medidas para selección de donantes y el indagar a fondo sobre la procedencia o migraciones de los donantes de sangre, con el fin de reducir los riesgos por patógenos relacionados a diferentes zonas del país. Se encontró en el presente estudio la donación efectiva de tres extranjeros procedentes de Argentina, Estados Unidos y Venezuela, las dos primeras en Antioquia y la última en Córdoba.

Los hallazgos de posibles migraciones desde diferentes zonas del país, ratifica la importancia de continuar con la estrategia de tamizaje por gota gruesa a todas las unidades de sangre para este marcador a nivel nacional, agudizando aún más en los criterios de selección de donantes incluidos en la guía unificada de selección de donante de sangre del Instituto Nacional de salud.

## 6 CONCLUSIONES:

- Existe un riesgo de ITT probable como se demostró con el hallazgo de 7 casos de malaria por PCR en donantes aceptados.
- La PCR utilizada en el estudio, presentó especificidad en el diagnóstico de presencia del parásito y mostró un límite de detección para *P. falciparum* de 3 parásitos/ $\mu$ l.
- La PCR es una técnica útil para estudios epidemiológicos en los que es necesario el procesamiento de una gran cantidad de muestras, es una herramienta útil para el diagnóstico de malaria en casos especiales como la detección de parasitemias que se encuentra por debajo del umbral de detección de la microscopía, para establecer la prevalencia real y la dinámica de transmisión en áreas en donde se presentan infecciones con parasitemias bajas, usualmente no detectables por el diagnóstico de rutina que, aunque no dan origen a una sintomatología si permite la persistencia de la transmisión, sin embargo no es aplicable al tamizaje de rutina en bancos de sangre.
- A la fecha a nivel nacional esta es la primera aproximación a conocer la prevalencia de malaria asintomática en donantes de sangre del país, sin embargo, se puede concluir que

**Informe técnico del proyecto:**  
**Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011**

la técnica estándar de oro es la gota gruesa que se ve impactada por la experticia del lector y la carga parasitaria el individuo que puede estar afectado por el patógeno.

- La PCR ha mostrado alta sensibilidad para la detección de malaria asintomática, sin embargo su aplicación para el tamizaje de rutina no es viable, debido a la infraestructura y capacitación que necesita el personal que realiza estos montajes, adicional a los costos son demasiado altos para su aplicación en población de donantes de sangre. Es útil para reconocimiento de riesgo de ITT como se demostró aquí con las 7 muestras evidenciadas confirmadas por secuenciación y que permitieron evidenciar la positividad de malaria; Es importante resaltar la utilidad de este estudio ya que permite fortalecer las otras medidas de control como encuesta selección etc.

## 7. ACTIVIDADES REALIZADAS POR CADA UNO DE LOS ACTORES QUE PARTICIPARON EN EL PROYECTO:

Actividad      Actor

### **Bancos de sangre de los diferentes departamentos**

Acceso a los donantes, selección, socialización del proyecto, obtención de consentimiento informado, toma de muestras, lectura de gotas gruesas y remisión de las mismas.

### **Nohora González -Grupo de Parasitología Red**

Capacitación del personal de los bancos de sangre en tamización para malaria. Análisis del 10 % de las muestras remitidas por control de calidad y remisión de resultados. Análisis de resultados del control de calidad indirecto del desempeño y apoyo al análisis de resultados objetivo 1.

### **Sandra Barrera -Grupo Bioquímica**

Procesamiento de muestras de sangre en papel filtro por PCR para Plasmodium, secuenciación en los casos en que aplicara y análisis de resultados de pruebas moleculares PCR, secuenciación, remisión de resultados, generación de informe objetivos 2, discusión objetivos 3 , redacción resumen presentación trabajo y dirección tesis de pregrado, generación informe final.

### **Coordinación Red Nacional de Bancos de Sangre y Servicios de Transfusión. Mauricio Beltrán – Maritza Berrio Pérez:**

Coordinación de acceso a los bancos de sangre, coordinación logística para capacitación del personal, capacitaciones, socialización del protocolo a los bancos de sangre participantes,

#### **Informe técnico del proyecto:**

**Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011**

coordinación para remisión de materiales, reactivos y muestras, remisión de muestras y distribución a los grupos del INS, retroalimentación de resultados a los bancos de sangre, ingreso de información demográfica proveniente de las fichas remitidas a la base de datos del proyecto, cargue de resultados en base de datos, análisis de resultados, análisis de resultados objetivos 1, 3 y 4, generación de informe final.

#### 8. CONFORMACIÓN DEL EQUIPO DE INVESTIGACIÓN:

Nombres y apellidos	Institución	Función en el proyecto
Mauricio Beltrán Durán	Instituto Nacional de Salud, Coordinación Red Nacional de Bancos de Sangre	Investigador principal
Sandra Milena Barrera	Instituto Nacional de Salud	Investigadora principal
Olga Maritza Berrio Pérez	Instituto Nacional de Salud, Coordinación Red Nacional de Bancos de Sangre	Co-Investigador
Nohora Elizabeth González	Instituto Nacional de Salud-Parasitología Red	Co-Investigador

Tabla 9. Conformación equipo de investigación.

**Informe técnico del proyecto:**  
**Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011**

## 9. PRODUCTOS Y RESULTADOS

Otros productos y resultados	cantidad del compromiso o adquirido	logros (se deben informar los datos completos que evidencien el cumplimiento)	Evidencia soporte referencia completa con la normas vancouver / apa. (adjuntar evidencias)
Formación de recurso humano	1 tesis de pregrado	Se está desarrollando tesis de bacteriología, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, quien el 9 de mayo del presente año entregó su propuesta de anteproyecto titulada "Diagnóstico de Plasmodium mediante PCR en donantes de tres bancos de sangre, para descartar malaria asintomática en Colombia ". De la misma manera el 17 de octubre entregó el proyecto a la Universidad	Trabajo de tesis, se anexa carta de entrega de anteproyecto y proyecto de tesis en la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca (anexo, 1-2)
Capacitación al tesista en el manejo de técnicas moleculares (PCR) para el desarrollo de su tesis	1 entrenamiento en procesos relacionados con extracción de DNA, montajes por PCR anidada entre otros	Se realizó entrenamiento y capacitación de la estudiante de pregrado en procesos relacionados con extracción de DNA, PCR Universal, PCR anidada para Plasmodium, electroforesis entre otros temas, con el fin de que ella desarrolle su tesis de pregrado en el marco del proyecto de investigación.	Registro de asistencia a los seminarios (anexo, 3) Cuaderno de experimentos del proyecto, al interior del grupo de Bioquímica y Biología Celular (anexo 4.)
Cursos organizados por el grupo, relacionados con el proyecto	5 cursos a la red de bancos de sangre	<i>Productos generados, no establecidos en el protocolo de investigación:</i> - Se realizaron 6 cursos en el marco del proyecto de investigación, con el fin de actualizar al personal de los bancos de sangre en aspectos relacionados con detección de Plasmodium por gota gruesa. - Los cursos fueron realizados en 5 ciudades del país, Montería, Medellín, Villavicencio, Apartadó y Pereira, se capacitaron 65 profesionales de los bancos de sangre y se realizó un curso adicional en el cual participaron profesionales del Laboratorio de Salud Pública y laboratorios clínicos de Pereira.	Registros de asistencia a las capacitaciones realizadas, agendas de los cursos (anexo 5). Se describe al detalle en la tabla No. 3
Publicaciones divulgativas (especificar)	1 artículo Científico	Pendiente sometimiento de artículo científico.	Pendiente
Participación en eventos científicos	1 presentación en evento científico	Se envió trabajo para participar en el 14º congreso Internacional de Bacteriología, el cual fue aceptado el 1 de octubre, para participar en modalidad de poster.	Se anexa carta de aceptación de congreso, junto con la ubicación del respectivo trabajo (anexo 6 y 7)

**Tabla 10.** Resultados de Conocimiento

## 10. BIBLIOGRAFIA

- Gonzalez JM, Olano V, Vergara J, Arevalo-Herrera M, carrasquilla G, et al., *Unstable, low level transmission ohf malaria on the colombian pacific coast*. Ann Trop Med Parasitol, 1997. **91**: p. 349-358.
- Osorio, L., J. Todd, and D. Bradley, *[Absence of asymptomatic malaria in schoolchildren of Quibdo, Choco]*. Biomedica, 2004. **24**(1): p. 13-9.

### Informe técnico del proyecto:

**Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011**

- Suarez-Mutis MC, *Epidemiología da malária em comunidades do rio Padauri, medio rio Negro, uma area de extrativismo vegetal da piacaba no estado do Amazonas, Brasil* in Instituto Oswaldo Cruz. 2007: Rio de Janeiro.,
4. Barba Evia JR, *Transfusión de sangre y sus componentes: riesgos, beneficios e indicaciones*. Rev Mex Patol Clin, 2004 **51**(2): p. 97-118.
  5. Singh, G. and R. Sehgal, *Transfusion-transmitted parasitic infections*. Asian J Transfus Sci, 2010. **4**(2): p. 73-7.
  6. Departamento Administrativo Nacional de Estadística DANE. *Metodología de la Clasificación Internacional Uniforme de Ocupaciones (CIUO)*. 2009 1/10/2014 [cited 2014 25/09/2014]; Available from: [https://www.dane.gov.co/files/sen/nomenclatura/ciuo/CIUO\\_ocupaciones\\_2009.pdf](https://www.dane.gov.co/files/sen/nomenclatura/ciuo/CIUO_ocupaciones_2009.pdf).
  7. Departamento Administrativo Nacional de Estadística DANE. *Códificación Municipios y Centros Poblados 2012*,. 2012 [cited 2014 25/09/2014]; Available from: [https://www.dane.gov.co/Divipola/archivos/Listado\\_2012.xls](https://www.dane.gov.co/Divipola/archivos/Listado_2012.xls).
  8. Instituto Nacional de Salud. *Guía para la Selección de donantes de sangre en Colombia - Instructivo para diligenciamiento de la encuesta*. 2012 [cited 2014 23/01/2014]; Instituto Nacional de Salud:[Available from: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Red-Nacional-Laboratorios/Publicacio/Gu%C3%ADa%20para%20Selecci%C3%B3n%20de%20Donantes%20de%20Sangre%20en%20Colombia%202013.pdf>].
  9. Instituto Nacional de Salud -Grupo Funcional Enfermedades Transmisibles por Vectores, *Boletín Epidemiológico De La Malaria En Colombia (Semana Epidemiologica 36 de 2014)*. 2014.
  10. Garraud, O., A. Assal, B. Pelletier, B. Danic, A. Kerleguer, et al., *Overview of revised measures to prevent malaria transmission by blood transfusion in France*. Vox Sang, 2008. **95**(3): p. 226-31.
  11. Elghouzzi, M.H., A. Senegas, T. Steinmetz, P. Guntz, V. Barlet, et al., *Multicentric evaluation of the DiaMed enzyme-linked immunosorbent assay malaria antibody test for screening of blood donors for malaria*. Vox Sang, 2008. **94**(1): p. 33-40.
  12. **Chin R, Beltran M, and Nicholls S**, *Malaria o Paludismo en Donantes de bancos de sangre de seis seccionales de salud*, 1997. Informe Quincenal Epidemiologico Nacional - IQEN, 1998. **3**(10): p. 132-134.
  13. Beltran M, *Malaria Transfusional*. Informe Quincenal Epidemiologico Nacional, 1999. **4**: p. 279-281.
  14. Ministerio de Salud - República de Colombia, *Decreto 1571 de 1993*. 1993.
  15. Ministerio de Salud- Republica de Colombia, *Resolucion 901 de 1996*. 1996.
  16. Nansseu, J.R., J.J. Noubiap, S.T. Ndoula, A.F. Zeh, and C.G. Monamele, *What is the best strategy for the prevention of transfusion-transmitted malaria in sub-Saharan African countries where malaria is endemic?* Malar J, 2013. **12**: p. 465.
  17. Perandin, F., N. Manca, A. Calderaro, G. Piccolo, L. Galati, et al., *Development of a real-time PCR assay for detection of Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, and Plasmodium ovale for routine clinical diagnosis*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(3): p. 1214-9.
  18. Milne, L.M., M.S. Kyi, P.L. Chiodini, and D.C. Warhurst, *Accuracy of routine laboratory diagnosis of malaria in the United Kingdom*. J Clin Pathol, 1994. **47**(8): p. 740-2.
  19. Moody, A., *Rapid diagnostic tests for malaria parasites*. Clin Microbiol Rev, 2002. **15**(1): p. 66-78.
  20. Olaya P and Espinal C, *Deteccion de anticuerpos antiplasmodium por ELISA en donantes de sangre*. Biomédica, 1982. **2**(2): p. 57-62.
  21. Ortiz, J., Humanez J, Pabón Adriana, and Blair S, *Prevalencia de anticuerpos antimaláricos en donantes del banco de sangre del Hospital Universitario San Vicente de Paúl de Medellín, Colombia* Biomédica, 1999 **19**(4) : p. 303-10.

#### Informe técnico del proyecto:

Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011



- Castillo, C.M. and C. Ramírez, *[Malaria screening in blood donors in Cali, Colombia]*. Biomedica, 2005. **25**(2): p. 203-10.
23. Scopel, K.K., C.J. Fontes, A.C. Nunes, M.F. Horta, and E.M. Braga, *Low sensitivity of nested PCR using Plasmodium DNA extracted from stained thick blood smears: an epidemiological retrospective study among subjects with low parasitaemia in an endemic area of the Brazilian Amazon region*. Malar J, 2004. **3**: p. 8.
24. Di Santi, S.M., K. Kirchgatter, K.C. Brunialti, A.M. Oliveira, S.R. Ferreira, et al., *PCR -- based diagnosis to evaluate the performance of malaria reference centers*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2004. **46**(4): p. 183-7.
25. Instituto Nacional de Salud-Coordinación Red Nacional de Bancos de Sangre y Servicios de Transfusión (2013) *Informe Nacional de Indicadores Red Nacional Bancos de Sangre Y Servicios de Transfusion -1 de enero a 31 de diciembre de 2013 Volume,*

**Informe técnico del proyecto:**  
**Prevalencia de malaria asintomática en donantes de bancos de sangre de Colombia, 2012. CTIN 34-2011**