

Efecto de la infección submicroscópica o policlonal de *Plasmodium falciparum* sobre la madre y el producto de la gestación. Revisión sistemática

Effect of submicroscopic or polyclonal Plasmodium falciparum infection on mother and gestation product. Systematic review

Eliana Arango

Amanda Maestre

Jaime Carmona-Fonseca

Grupo Salud y Comunidad. Facultad de Medicina. Universidad de Antioquia.

Financiación: Este trabajo fue financiado por la Universidad de Antioquia y Colciencias a través del proyecto "Malaria gestacional y placentaria en Urabá antioqueño, 2008-2009", código 111540820495.

Correspondencia: Grupo Salud y Comunidad, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Carrera 51D 62-29, oficina 336, Medellín, Colombia - E-mail: emarango@gmail.com

Resumen

Antecedentes: La malaria gestacional es causa importante de morbi-mortalidad materno-infantil y puede transcurrir con parasitemias no detectadas con microscopía; además, por la diversidad genética parasitaria, es común encontrar infecciones policlonales. **Objetivos:** Conocer la frecuencia de infecciones submicroscópicas (ISM) y/o policlonales (IP) durante la gestación y analizar el impacto que tienen en la presentación clínica y el desarrollo de inmunidad y sus consecuencias en la madre y el producto de gestación. **Metodología:** Se hizo búsqueda en Medline con los términos (MeSH) "pregnancy", "malaria", "PCR", "microscopy", "genotype", "clones". Se seleccionaron los estudios que diagnosticaron la infección por microscopía y PCR. **Resultados:** Se incluyeron 16 estudios, todos realizados en África. El promedio ponderado (PP) de ISM en el total de mujeres fue del 36% y según fuese la infección microscópica (IM), submicroscópica o negativa, los PP de anemia materna y bajo peso al nacer (BPN) fueron 51%, 42% y 33% y 19%, 16% y 11%, respectivamente. Con referencia al grupo sin infección, los riesgos (OR) fueron: a) para anemia materna 2,12 en IM y 1,48 en ISM; b) para BPN 1,89 en IM y 1,56 en ISM. El PP de IP fue 75% y el promedio de clones por muestra fue tres. **Conclusiones:** Las ISM y policlonales con *P. falciparum* son muy comunes durante la gestación, pero poco estudiadas y su impacto debe evaluarse en cada región, porque depende de la intensidad y estabilidad de la transmisión, la edad y paridad maternas, entre otras variables, que son influenciadas por las condiciones socioeconómicas y ambientales específicas.

Palabras Clave: Embarazo. Complicaciones del embarazo. Malaria. *Plasmodium falciparum*. Parasitemia. Genotipo.

Abstract

Background: Malaria in pregnancy causes substantial maternal and infant morbidity-mortality, even at submicroscopic parasite levels. In addition, the presence of polyclonal infections secondary to high parasite genetic diversity is a common finding.

Objectives: To determine the frequency of submicroscopic and/or polyclonal plasmodial infection during pregnancy and to establish their impact on clinical presentation, immunity acquisition, and consequences on mother and gestation product. **Methods:** A search on Medline was performed using key words (MeSH): pregnancy, malaria, PCR, microscopy, genotype, and clones. Studies on plasmodial infection diagnosed by microscopy and PCR were selected. **Results:** A total of 16 studies were included, all carried out in Africa. The weighted mean (WM) of submicroscopic infection was 36%. According to type of infection (microscopic, submicroscopic or negative), the WM of maternal anemia and low birth weight (LBW) were 51%, 42%, 33%, and 19%, 16%, 11%, respectively. Risks (OR), using the negative group as reference, were: a) for maternal anemia 2.12 in microscopic infection and 1.48 in submicroscopic; b) for LBW 1.89 in microscopic and 1.56 in submicroscopic infection. The WM of polyclonal infection was 75% and the mean number of clones by sample was three. **Conclusions:** Submicroscopic and polyclonal *P. falciparum* infections during pregnancy are very common, but have been little studied and their impact must be assessed in each specific region because they depend on malaria transmission intensity and stability, maternal age and parity, among other variables, which are influenced by environmental and socio-economic conditions of each region.

Keywords: Pregnancy. Pregnancy complications. Malaria. *Plasmodium falciparum*. Parasitemia. Genotype.

Introducción

La malaria durante la gestación es una importante causa de morbilidad materno-infantil, puede producir anemia a la gestante, parto prematuro y bajo peso al nacer, que constituyen los principales factores de riesgo para la mortalidad materna e infantil; se estima que anualmente más de 50 millones de mujeres en el mundo están en riesgo de contraer malaria gestacional y que esta enfermedad causa entre 75 mil y 200 mil muertes neonatales cada año¹.

Desai y colaboradores, en 2007, encontraron que aproximadamente una de cada cuatro gestantes en zonas de transmisión estable en África presentan malaria en el momento del parto y para las zonas de baja e inestable transmisión, tanto dentro como fuera de África, esta prevalencia varía entre 6,2 y 13,7%. Los autores resaltan que esas prevalencias pueden estar subestimadas debido a que se midieron sólo en el momento del parto y la herramienta diagnóstica fue la microscopía, que no detecta parasitemias muy bajas, las que sólo son reveladas por técnicas de amplificación del ADN parasitario¹.

Uneke, en 2008, coincidió con estas afirmaciones al encontrar en su revisión que la prevalencia de parasitemia en sangre periférica de gestantes procedentes de diferentes regiones africanas varió entre 7,3 y 29% cuando se usó la microscopía, mientras que con PCR (reacción en cadena de la polimerasa) varió entre 6,7 y 85%. En forma similar, la detección de la parasitemia en la placenta varió entre 1,7 y 35% con microscopía y entre 41,7 y 59% con PCR². Esto demuestra que, igual a lo que se ha informado en niños y adultos no gestantes³, la infección por *P. falciparum* con parasitemia por debajo del nivel de detección microscópico (submicroscópica: negativo por microscopía y positivo por PCR u otra técnica) es muy común en las gestantes de regiones africanas de alta y baja transmisión malárica.

En América y Colombia son muy pocas las publicaciones que indican la frecuencia

de malaria durante la gestación. En 2005-2007 se halló en Colombia, con microscopía, una prevalencia de malaria gestacional de 10,39% en 1927 mujeres de la región del Urbá antioqueño⁴ y en el momento del parto de 92 mujeres de esta misma región, se encontró que 19% tenían infección plasmodial según la gota gruesa y según la PCR la frecuencia de infección fue de 30% (datos sin publicar).

Las infecciones plasmodiales submicroscópicas durante la gestación pueden tener un papel importante en la adquisición de inmunidad contra malaria gestacional y, además, pueden contribuir con el desarrollo de los efectos adversos, como anemia materna y bajo peso al nacer^{5,6}.

Adicionalmente, debido a la alta diversidad genética de *P.falciparum*, los pacientes con frecuencia presentan infecciones con varios clones a la vez, conocidas como infecciones múltiples o policlonales. La relación entre estas infecciones y la clínica de la enfermedad es compleja y depende de factores como la edad, la intensidad de transmisión y la inmunidad previa^{7,8}.

En este contexto, esta revisión sistemática analiza los artículos científicos que informan sobre mujeres con infección malárica durante la gestación o en el momento del parto, con parasitemia por debajo del nivel de detección microscópico (parasitemia submicroscópica) y/o con diferentes genotipos parasitarios (infecciones policlonales), con el fin de conocer la frecuencia de este tipo de infecciones y analizar y discutir el impacto que pueden tener en la presentación clínica y el desarrollo de la inmunidad contra la malaria gestacional y las consecuencias que pueden causar en la madre y el producto de la gestación.

Metodología

La búsqueda de los artículos se hizo en la base de datos Medline, a través de Pubmed, con las palabras clave (Medical Subject Headings MeSH) “pregnancy”, “malaria”, “PCR” (Polymerase Chain Reaction), “microscopy”, “genotype” y “clones”. Las combinaciones de palabras utilizadas fueron: a) pregnancy

and malaria and PCR, b) pregnancy and malaria and microscopy, c) pregnancy and malaria and genotype y d) pregnancy and malaria and clones. No se hizo restricción de fecha ni de idioma. También se revisaron las referencias bibliográficas de cada artículo y se buscaron aquellas referencias que no se habían obtenido con las búsquedas en Pubmed. El objetivo de esta revisión era conocer la frecuencia de infección plasmodial submicroscópica y/o policlonal en gestantes y explorar la asociación de este tipo de infecciones con alteraciones como la anemia materna, el bajo peso al nacer y el parto prematuro.

Los criterios para incluir los estudios fueron: a) el diagnóstico de la infección plasmodial en las gestantes fue hecho tanto con microscopía como con alguna técnica de detección del ADN parasitario (diagnóstico molecular); b) dichas pruebas diagnósticas fueron aplicadas en muestras de sangre periférica materna tomadas en cualquier momento de la gestación (en controles prenatales generalmente) o en muestras de sangre periférica o placentaria tomadas durante el parto. Se incluyeron estudios con cualquier tipo de diseño metodológico (descriptivo, casos-controles, cohortes) que evaluaron mujeres de cualquier edad, paridad y grupo étnico, residentes en cualquier continente, país o región, con cualquier nivel de endemia malárica. El criterio de exclusión fueron los trabajos sobre presentación de caso clínico. No se aplicó ningún criterio de exclusión referente al tipo y calidad del estudio porque la escasez de artículos no lo permitió y porque esos estudios fueron hechos para alcanzar objetivos muy diferentes a los que analiza la presente revisión (Tabla 1).

Se construyó una base de datos en Excel® con las siguientes variables de cada estudio: sitio del estudio, intensidad de transmisión malárica, tipo de estudio y objetivo, número de mujeres evaluadas, número de primíparas y de múltiparas, métodos de diagnóstico (microscopía, PCR, etc.), número de mujeres con y sin infección malárica, proporción de mujeres con infección

Tabla 1 - Características generales de los estudios analizados.**Table 1** – General characteristics of the studies analyzed.

| Sitio | Trans [‡] | Tipo [‡] | Objetivo | Mujeres [‡] | | | Diagnóstico [§] | Frecuencia de infección [#] | Ref. |
|--|--------------------|-------------------|--|----------------------|-------|-------|--------------------------------------|--------------------------------------|------|
| | | | | Total | Primi | Multi | | | |
| Grupo 1: estudios que analizaron sólo muestras de sangre periférica materna | | | | | | | | | |
| Ghana | Ho | T | Medir la frecuencia de infección plasmoidal microscópica y submicroscópica y su asociación con paridad, quimioprofilaxis, anemia, fiebre e inflamación. | 530 | 130 | 400 | PCR-a gen 18S ARN | 63% | 9 |
| Ghana | Ho | T | Medir la frecuencia de infección multiclonal y su asociación con morbilidad en gestantes de diferente paridad. | 332 | 93 | 239 | PCR-a gen 18S ARN | 100% | 7 |
| Mozambique | Hi | T | Medir la prevalencia de infección plasmoidal y de anemia en gestantes durante diferentes períodos de transmisión. | 686 | 206 | 480 | PCR-a gen msa-2 | 23% | 10 |
| Senegal | I-A | LR | Medir infecciones multiclonales y distribución alélica de <i>P. falciparum</i> en primi, secundi y multigrávidas y compararlas antes, durante y después de la gestación. | 20 | 8 | 12 | PCR-a genes msp-1 y msp-2 | 85% | 11 |
| Sudán | I-B | T | Medir la prevalencia de infección submicroscópica en gestantes y su asociación con anemia. | 142 | 36 | 106 | PCR-a gen 18S ARN | 40% | 12 |
| Grupo 2: estudios que analizaron muestras de sangre periférica de la gestante y sangre placentaria | | | | | | | | | |
| Ghana | Ho | T | Evaluar el rendimiento de PCR en malaria placentaria vs microscopía e ICT; medir efecto de infecciones submicroscópicas en anemia materna. | 596 | ni | ni | ICT, PCR-a gen 18S ARN | 56% | 14 |
| Ghana | Ho | T | Medir prevalencia y consecuencias clínicas de infecciones con <i>P. falciparum</i> en sangre periférica y placenta por microscopía, HRP2 y PCR. | 839 | 304 | 535 | ICT, PCR-a gen 18S ARN | 53% | 15 |
| Malawi | Hi | CC | Caracterizar y comparar genotipos de <i>P. falciparum</i> de sangre periférica, placenta y cordón; cuantificar las infecciones policlonales. | 131 | 81 | 50 | PCR-a gen 18S ARN | 50% | 16 |
| Kenia | Hi | T | Determinar si PCR en tiempo real es mejor que otras pruebas para predecir el resultado clínico de la malaria. | 554 | 143 | 411 | HRP, LDH, PCR-a y PCR-TR gen 18S ARN | 58% | 17 |
| Camerún | Hi | T | Explorar relación entre edad y paridad con infecciones submicroscópicas, por más de una especie y multiclonales en sangre periférica y placenta. | 278 | 63 | 215 | PCR-a gen 18S ARN | 82% | 5 |

Tabla 1 - Características generales de los estudios analizados. (cont.)

Table 1 – General characteristics of the studies analyzed. (cont.)

| Sitio | Trans [‡] | Tipo [†] | Objetivo | Mujeres [‡] | | | Diagnóstico [§] | Frecuencia de infección [#] | Ref. |
|--|--------------------|-------------------|---|----------------------|-------|-------|---------------------------------|--------------------------------------|------|
| | | | | Total | Primi | Multi | | | |
| Grupo 2: estudios que analizaron muestras de sangre periférica de la gestante y sangre placentaria | | | | | | | | | |
| Burkina Faso | Hi | T | Evaluar el rendimiento de HRP2 vs. microscopía para diagnosticar infección en placenta y en sangre periférica. | 853 | ni | ni | HRP2, PCR-a gen 18S ARN | 29% | 18 |
| Gabón | Hi | T | Comparar los genotipos parasitarios presentes en sangre periférica materna, placenta y cordón umbilical. | 37 | ni | ni | HRP2, PCR-a genes msp-1 y msp-2 | 100% | 19 |
| Gabón | Hi | T | Caracterizar genotipos de <i>P. falciparum</i> en sangre periférica, placenta y cordón umbilical según paridad e infección submicroscópica | 184 | 62 | 122 | PCR-a gen msp-2 | 45% | 20 |
| Gabón | Hi | T | Evaluar efecto de infección submicroscópica sobre el peso al nacer; medir efecto de inflamación sobre el resultado de la gestación. | 145 | 29 | 71 | PCR-TR gen 18S ARN | 31% | 6 |
| Senegal | I-B | T | Cuantificar los genotipos presentes en sangre periférica, placenta y cordón umbilical. | 281 | ni | ni | PCR-a gen 18S ARN | 21% | 21 |
| Senegal | I-B | T | Caracterizar los genotipos de <i>P. falciparum</i> en sangre periférica y placenta; comparar infecciones multiclonales y distribución alélica en ambos tejidos. | 58 | 18 | 40 | ICT, PCR-a genes msp-1 y msp-2 | 100% | 22 |
| Resumen | | | | 5666 | 1173 | 2681 | Mediana: 56% Promedio: 59% | | |

* Trans. Transmisión: Ho holoendémica (alta, continua e invariable durante todo el año, prevalencia de parasitemia >70%), Hi hiperendémica (alta pero con algunos períodos sin transmisión, prevalencia de parasitemia 50-70%), I-A inestable y alta (variable en el año, prevalencia de parasitemia 50-70%), I-B inestable y baja (variable en el año, prevalencia de parasitemia <10%)¹³.

* Trans. Transmission: Ho holoendemic (high, continuous and invariable throughout the year, prevalence of parasitemia >70%), Hi hiperendemic (high but with some periods without transmission, prevalence of parasitemia 50-70%), I-A unstable and high (variable in the year, prevalence of parasitemia 50-70%), I-B unstable and low (variable in the year, prevalence of parasitemia <10%)¹³.

[†] Tipo: tipo de estudio. T transversal, CC casos y controles, LR longitudinal retrospectivo.

[‡] Tipo: type of study. T Cross-sectional CC cases and controls, LR longitudinal retrospective.

[§] Primi: primípara (ningún embarazo anterior), multi: multipara (uno o más embarazos anteriores), ni: no informado en el artículo.

[#] Primi: primiparous (no previous pregnancy), multi: multiparous (one or more previous pregnancies), ni: not informed in the article.

[§] Métodos de diagnóstico, diferentes a la microscopía, utilizados para el diagnóstico de la infección malarica. PCR-a: PCR anidada para tales genes. PCR-TR: PCR en tiempo real para tales genes.

[§] Different non microscopic diagnostic method, used for the diagnosis of the malaria infection. PCR-a: anid PCR for such genes. PCR-TR: real time PCR for such genes.

[#] Infección plasmodial microscópica o submicroscópica. Aparece el resultado obtenido con la prueba que más casos detectó.

[#] Microscopic or submicroscopic plasmodium infection. The result attained is the one of the test that detected most cases.

microscópica y submicroscópica, frecuencia de anemia materna, bajo peso al nacer (si, no) en cada grupo de mujeres divididas según el tipo de infección (microscópica, submicroscópica y negativa), promedio de clones por muestra, número de mujeres con infección policlona, cantidad de mujeres con clones completamente iguales o dife-

rentes en placenta y en sangre periférica, número de mujeres que presentaban clones compartidos en ambas muestras.

Los estudios se clasificaron en dos grupos: los que tomaron muestra de sangre periférica de la gestante solamente en algún control prenatal, pero no en el parto, ni estudiaron la placenta; y los que tomaron

muestra de sangre periférica de la gestante en el parto y además tomaron muestra de placenta.

El cálculo de las medidas de resumen como la mediana y el promedio aritmético ponderado y la construcción de tablas y gráficos se hizo con la ayuda del programa Excel®. Se usó el programa EpiInfo 6,04 para comparar proporciones con la prueba Ji cuadrado y para calcular los valores de la razón apuestas (*odds ratio* OR) y sus intervalos de confianza de 95%. La ponderación de los promedios aritméticos se hizo multiplicando la proporción de cada medida reportada en los estudios (anemia, bajo peso al nacer, infección submicroscópica, infección policlonal, etc.) por el número total de muestras evaluadas en cada uno (n, que podía corresponder a gestantes, neonatos o placentas) y con la suma de esos productos se calculó la media con respecto a la muestra total (sumatoria de n de todos los estudios).

Resultados

En total se incluyeron 16 trabajos: un 31% (5/16) analizó solamente muestras de sangre periférica de la gestante tomadas en algún control prenatal (grupo 1) y un 69% (11/16) analizó muestras de sangre periférica y placentaria tomadas en el momento del parto (grupo 2). En la tabla 1 se muestran las características generales de los estudios, organizados de acuerdo con la intensidad de transmisión malárica de la zona estudiada. Ninguno de los trabajos fue ejecutado en zonas maláricas de Asia o América; todos fueron realizados en regiones de alta y baja transmisión del África subsahariana y fueron publicados entre 2000 y 2006. Solamente un trabajo tuvo un diseño de casos y controles, los otros 15 fueron estudios descriptivos (14 transversales y uno longitudinal retrospectivo).

El método de diagnóstico molecular usado en 62% (10/16) de los estudios fue el descrito por Snounou y colaboradores en 1993²³, que consiste en una PCR anidada para la amplificación de una fracción del

gen de la subunidad pequeña del ribosoma; en un estudio (6%)⁶ se hizo PCR en tiempo real de ese mismo gen y en 31% (5/16) hicieron diagnóstico con PCR anidada de genes que codifican las proteínas MSP-1 y MSP-2. Adicionalmente, un 37% (6/16) usó métodos de diagnóstico rápido que detectan proteínas parasitarias, como HRP2 y LDH. Todos los 16 informes fueron considerados comparables en cuanto a que confrontaron el resultado de la microscopía con el de la PCR anidada.

En 75% (12/16) de los estudios se pudo calcular la frecuencia de infección submicroscópica, la cual varió entre 7 y 59%; en 10 de los 12 estudios (83%) esa frecuencia fue mayor a 20% e incluso en 58% (7/12) de los trabajos ese tipo de infección fue más frecuente que la infección microscópica. El promedio ponderado de la frecuencia de infección submicroscópica en el total de mujeres fue de 36% y en aquellas en las que el diagnóstico de la infección plasmodial se hizo con PCR fue del 52% (Tabla 2).

La asociación entre infección submicroscópica y anemia materna fue explorada en 7 de los 12 trabajos (58%), mientras que la asociación con bajo peso al nacer fue explorada en 25% (3/12) (Tabla 3). En cuatro estudios, los respectivos autores reportaron asociación significativa entre la parasitemia submicroscópica y la disminución del nivel de hemoglobina y/o la frecuencia de anemia materna^{6,9,14,15} y en dos de los que no encontraron esa asociación estadística se observó la tendencia a tener más anemia o menor hematocrito cuando hubo infección submicroscópica que cuando no hubo infección^{5,10}. Adicionalmente, tres estudios calcularon OR para la variable anemia en los grupos de mujeres con infección plasmodial microscópica y submicroscópica, con referencia al grupo sin infección^{5,9,15} y todos encontraron que la infección microscópica aumentaba el riesgo de tener anemia materna (OR > 2; p < 0,05) uno de ellos detectó este riesgo también con la infección submicroscópica (OR 2,2 [IC95%:1,6 – 3,1]; p < 0,0001)⁵.

Nuestro análisis estadístico, reuniendo el conjunto de datos de los diferentes artí-

Tabla 2 - Frecuencia (%) de infección submicroscópica en África, 2000-2006.**Table 2** – Frequency (%) of submicroscopic infection in Africa, 2000-2006.

| Ref. | Submicroscópica | | Microscópica | |
|-----------|-----------------|------|-----------------|------|
| | % | n | % | n |
| 11 | 59 | 101* | 29 | 49* |
| 5 | 55 [†] | 153 | 28 [†] | 78 |
| 9 | 49 | 164 | 51 | 172 |
| 15 | 34 | 285 | 19 | 159 |
| 12 | 32 | 40 | 12 | 17 |
| 17 | 29 | 151 | 9 | 49 |
| 18 | 28 [‡] | 247 | 23 [‡] | 188 |
| 22 | 24 [‡] | 14 | 76 [‡] | 44 |
| 14 | 24 [‡] | 143 | 32 [‡] | 191 |
| 6 | 23 | 30 | 10 | 15 |
| 10 | 20 | 36 | 41 | 75 |
| 16 | 7 | 9 | 56 | 57 |
| Mediana: | 29% | | 29% | |
| Promedio: | 36% | | 33% | |
| Suma: | | 1373 | | 1094 |

* Número de muestras con ese resultado, en total se analizaron 171 muestras durante el seguimiento de 20 gestantes / * Number of samples with this result; a total number of 171 samples were analyzed during the followup of 20 pregnant women.

[†] Infección en sangre periférica, en placenta o en ambos tejidos / [†] Infection in peripheral blood, placenta or both.

[‡] Infección placentaria únicamente / [‡] Only placenta infection.

Tabla 3 - Frecuencia de anemia materna y de bajo peso al nacer (BPN) y promedio de hemoglobina de la gestante y de peso corporal del neonato, según el tipo de infección plasmodial reportada en África, 2000-2006.**Table 3** – Frequency of maternal anemia and low birth weight (BPN) and mean of hemoglobin in pregnant women and body weight of newborn, according to type of plasmodial infection reported in Africa, 2000-2006.

| Ref. | % Anemia, [media de hemoglobina en g/dL] y % BPN [media de peso en gramos] según el tipo de infección plasmodial | | | | | | | | |
|-----------|--|-------------|-----|-----------------|-------------|------|-------------|------------|------|
| | Microscópica | | | Submicroscópica | | | Negativa | | |
| | Anemia | BPN | n | Anemia | BPN | n | Anemia | BPN | n |
| 12 | - | - | 17 | 72,5 [9,97] | - | 40 | 77,6 [9,90] | - | 85 |
| 9 | 73 [10,1]* | - | 172 | 49 [10,9]* | - | 164 | 41 [11,9]* | - | 194 |
| 15 | 44,7* | 17 | 159 | 43* | 17,9 | 285 | 25,6* | 14,2* | 395 |
| 5 | 41,3* | - | 78 | 34,2 | - | 153 | 26,6 | - | 47 |
| 14 | 40 [11,1]* | - | 191 | 30 [11,4]* | - | 143 | 25 [11,9]* | - | 262 |
| 6 | [9,6]* | 47*[2806] | 15 | [10,4]* | 23*[2962] | 30 | [10,7]* | 4*[3103] | 100 |
| 10 | Hto: 28,4%* | - | 75 | Hto: 30,4% | - | 36 | Hto: 30,7% | - | 70 |
| 17 | - | 16,3*[2885] | 49 | - | 10,2*[2926] | 151 | - | 8,1*[3092] | 328 |
| Promedio: | 51% | 19% | | 42% | 16% | | 33% | 11% | |
| Suma: | | | 756 | | | 1002 | | | 1481 |

* Con diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los tipos de infección (microscópica, submicroscópica o negativa), según los respectivos autores del artículo.

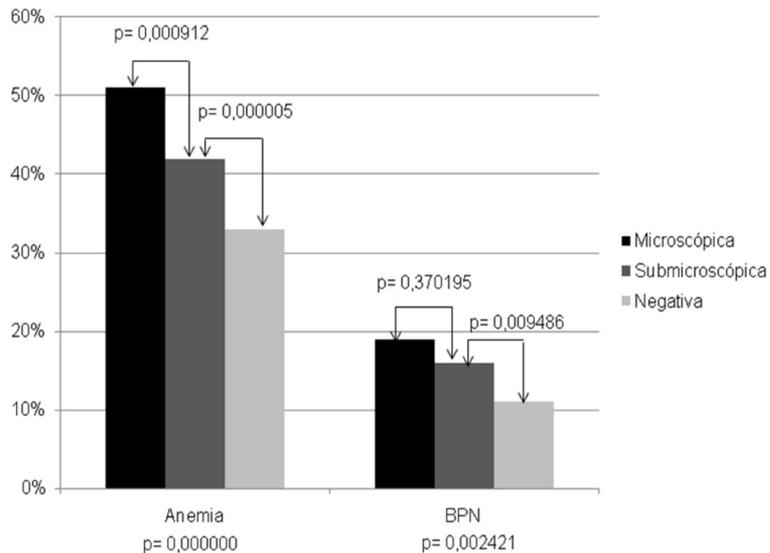
* Significant difference ($p < 0,05$) between types of infection (microscopic, submicroscopic or negative) according to the respective authors of the papers.

Hto: hematocrito / hematocrit

culos y comparando los promedios ponderados de frecuencia de anemia en cada uno de los grupos de infección (microscópica: 51%; submicroscópica: 42%; negativa: 33%), indica que hay una diferencia altamente significativa entre los tres grupos ($\chi^2 = 5139$; $gl = 2$; $p = 0,000000$); es de resaltar que la diferencia entre el grupo de parasitemia submicroscópica y el grupo sin infección también fue altamente significativa ($\chi^2 = 15,43$; $gl = 1$; $p = 0,000912$). Los valores de OR y su intervalo de confianza de 95% indican que la presencia de parasitemia microscópica implica un riesgo de 2,12 veces de tener anemia materna, comparado con ausencia de parásitos, mientras que la parasitemia submicroscópica conlleva un riesgo de 1,48 veces (Tabla 3, Figura 1).

En dos de los tres estudios (67%) que evaluaron la asociación entre el tipo de infección plasmodial (negativa, microscópica o submicroscópica) y el bajo peso al nacer, los respectivos autores encontraron

diferencias significativas entre los tres grupos; la frecuencia más alta de bajo peso al nacer se obtuvo en el grupo de mujeres con infección microscópica, seguida por la infección submicroscópica y la menor frecuencia se obtuvo en las mujeres negativas^{6,17} (Tabla 3). Dos estudios calcularon OR para bajo peso al nacer de los dos grupos con infección plasmodial (microscópica y submicroscópica) con respecto al grupo sin infección (grupo de referencia) y en uno de ellos se reportó que tanto la infección plasmodial microscópica como la submicroscópica fueron factores de riesgo para el bajo peso al nacer (microscópica: OR = 21 [IC95%: 5 - 87], $p = 0,0001$; submicroscópica OR = 7,3 [IC95%: 1,9 - 27], $p = 0,003$)⁶. Al reunir los datos de los tres estudios, nuestro análisis estadístico indica que existe diferencia significativa en la frecuencia de bajo peso al nacer en los tres grupos de infección plasmodial (microscópica: 19%; submicroscópica: 16%; negativa: 11%;



| Comparación | OR (IC95%) | |
|----------------------------------|--------------------|--------------------|
| | Anemia | BPN |
| Microscópica vs. Negativa | 2,12 (1,72 - 2,61) | 1,89 (1,27 - 2,82) |
| Submicroscópica vs. Negativa | 1,48 (1,21 - 1,79) | 1,56 (1,12 - 2,17) |
| Microscópica vs. Submicroscópica | 1,44 (1,16 - 1,78) | 1,21 (0,80 - 1,84) |

Figura 1 - Frecuencia promedio y OR para anemia y bajo peso al nacer (BPN) según el tipo de infección plasmodial, en África, 2000-2006.

Figure 1 – Mean frequency and OR for anemia and low birth weight (BPN) according to type of plasmodial infection in Africa, 2000-2006.

$\chi^2 = 12,05$; $gl = 2$; $p = 0,002421$), y también existió diferencia entre el grupo de infección submicroscópica y el grupo negativo ($\chi^2 = 673$; $gl = 1$; $p = 0,009486$). Los valores de OR y su intervalo de confianza de 95% indican que la presencia de parasitemia microscópica implica un riesgo de 1,89 veces de que el neonato tenga bajo peso, comparado con ausencia de parásitos, mientras que la parasitemia submicroscópica conlleva un riesgo de 1,56 veces (Tabla 3, Figura 1).

Solamente en un trabajo se evaluó la relación de la parasitemia submicroscópica con el parto prematuro y se encontró que la infección detectada exclusivamente por PCR no se asoció con este parámetro, pero aquellas mujeres cuya gota gruesa fue negativa y la prueba de detección de la proteína parasitaria HRP2 (ICT malaria) fue positiva tuvieron significativamente mayor frecuencia de parto prematuro que las demás¹⁵.

La complejidad de la infección plasmoidal (cantidad de clones presentes) en la sangre periférica de la gestante y en la placenta fue medida en 50% (8/16) de los estudios. En la tabla 4 se muestra la frecuencia de infecciones con múltiples clones que

se encontró en las gestantes evaluadas, el número de clones presentes en cada muestra y las diferencias genotípicas entre estos. Todos los estudios usaron las fracciones variables de los genes de las proteínas MSP-1 y/o MSP-2 para genotipificar y cuantificar los clones. Tanto en sangre periférica como en placenta, el número promedio de clones detectados fue mayor a 1 y en algunos casos se detectaron hasta 12 clones en una misma muestra. Entre 32 y 99% de las muestras analizadas presentaron infecciones policlonales. El promedio ponderado de la frecuencia de infecciones policlonales fue de 75% y el del número de clones por muestra de sangre periférica y de placenta fue de 2,9 y 3,1, respectivamente (Tabla 4).

En la comparación de los alelos detectados en las muestras de sangre periférica y placenta obtenidas de cada gestante se observa que en algunos casos ambos compartimentos tienen exactamente los mismos alelos de cada gen; en otros, los alelos son completamente distintos entre compartimentos y en la mayoría de los casos se encuentran algunos alelos iguales y otros que son exclusivos de un comparti-

Tabla 4 - Infección policlonal y diferencias genotípicas entre los parásitos de sangre periférica y de placenta en gestantes de África positivas por PCR, 2000-2006.

Table 4 – Polyclonal infection and genotypic differences between peripheral and placental parasites in African pregnant women PCR positives, 2000-2006.

| Genes usados | Promedio de clones por muestra (rango) | | | | Comparación de genotipos entre compartimentos (# de muestras) | | | Infección policlonal (%) | n* | Ref. |
|---------------|--|---------|-------------|---------|---|------------------|--------------------|--------------------------|------|------|
| | Sangre periférica | | Placenta | | Alelos iguales | Alelos distintos | Alelos compartidos | | | |
| | # alelos | n | # alelos | n | | | | | | |
| msp-1 y msp-2 | 6,1 (3-9) | 39/60 | 5,63 (1-10) | 60/60 | 4 | 17 | 18 | 99 | 60 | 21 |
| msp-1 y msp-2 | 2,8 (1-5) | 58/58 | 2,6 (1-6) | 58/58 | 6 | 8 | 43 | 96 | 116 | 22 |
| msp-1 y msp-2 | 3,4 (1-9) | 138/278 | 3,5 (1-8) | 125/278 | 0 | ni | ni | 84 | 263 | 5 |
| msp-1 y msp-2 | 2,7 (1-5) | 37/37 | 2,7 (1-5) | 37/37 | 9 | 9 | 18 | 82 | 74 | 19 |
| msp-1 | 2,9 (1-12) | 332/332 | - | - | - | - | - | 68 | 332 | 7 |
| msp-2 | 1,7 (1-4) | 34/184 | 1,65 (1-5) | 70/184 | 5 | 10 | 13 | 32 | 115 | 20 |
| msp-1 y msp-2 | 2,4 (1-5) | 55/66 | 2,41 (1-6) | 54/66 | 15 | 34 | 34 | ni | 131 | 16 |
| msa-2 | 1,7 (ni) | 107/181 | - | - | - | - | - | ni | 107 | 10 |
| Promedio: | 2,9 (1-12) | | 3,1 (1-10) | | | | | 75% | | |
| Suma: | 800/1196 | | 404/683 | | | | | | 1198 | |

* número total de muestras (sangre periférica y placenta) / total number of samples (peripheral and placenta blood)

ni: no informado / not informed

mento, es decir, que están o en la placenta o en la sangre periférica pero no en ambos. Solamente en un estudio esto no se cumplió y no se encontró ningún caso con todos los alelos iguales en la placenta y en la sangre periférica⁵.

Solamente tres trabajos exploraron la asociación entre las infecciones con múltiples clones y la anemia materna y dos de ellos indicaron que tener infecciones policlonales no se asoció con la anemia^{5,10} mientras que en el otro informe encontraron que las infecciones policlonales eran un factor de riesgo independiente de anemia materna, pues las mujeres infectadas con cuatro o más clones presentaban 2,3 veces (IC95%: 1,2 – 4,5) mayor probabilidad de ser anémicas que las mujeres infectadas con un sólo clon (monoinfección), pero esta asociación fue estadísticamente significativa sólo en el grupo de mujeres con menos de cuatro embarazos; en este grupo las mujeres infectadas con cuatro o más clones tuvieron 3,1 veces (IC95%: 1,4 – 7,0) mayor probabilidad de ser anémicas que las monoinfectadas, mientras que en aquellas con una paridad mayor o igual a cuatro la razón de apuestas calculada fue de 1,2 (IC95%: 0,4 – 2,5)⁷.

Discusión

Con esta revisión se confirma, igual que lo hizo Uneke en 2008², que la infección por *P. falciparum* durante la gestación es muy frecuente (59% promedio de infección en esta revisión, ver Tabla 1) y que una gran parte de esas infecciones no es detectada con la gota gruesa, que es la prueba estándar para el diagnóstico de la malaria (36% promedio de infección submicroscópica en esta revisión, ver Tabla 2); sin embargo, como se pudo comprobar con este trabajo, son pocos los estudios que han evaluado los efectos que estas infecciones pueden tener en la madre y en el producto de la gestación.

Es importante resaltar también que todos los estudios analizados aquí, así como los analizados por Uneke², fueron realizados en África y con *P. falciparum*, y que aunque tenga zonas de alta y baja

transmisión, esa intensidad de transmisión es, en promedio, más alta que la de América Latina; por tanto, se desconoce completamente lo que sucede con nuestras gestantes que también están expuestas a la infección malarica, no solamente por *P. falciparum*, sino también por *P. vivax*, que es la especie predominante y con la cual se ha demostrado que la infección en la gestación causa consecuencias como anemia materna y bajo peso al nacer^{24,25}.

La frecuencia de infección submicroscópica en las gestantes de Colombia se desconoce, excepto por un estudio reciente en el que se tomó muestra de sangre periférica en el momento del parto a 92 mujeres de la región del Urabá antioqueño y se encontró una frecuencia de infección plasmoidal de 19% con la gota gruesa (17 de 90: 11 por *P. vivax* y 6 por *P. falciparum*), mientras que con la PCR anidada (gen 18S ARN) esa proporción subió a 30% (28 de 92: 20 por *P. vivax* y 8 por *P. falciparum*) (datos sin publicar), lo cual indica que en nuestro medio también son comunes (11%) las infecciones submicroscópicas en la gestación, causadas mayoritariamente por *P. vivax*.

Aunque no en todos los estudios aquí analizados los autores hallaron asociación estadísticamente significativa entre la parasitemia submicroscópica y la anemia, es clara la tendencia a tener más anemia cuando se tienen parásitos, así sea en densidades submicroscópicas, que cuando se es negativo; además, el análisis efectuado al conjunto de artículos muestra que existe una clara y fuerte asociación entre infección submicroscópica y anemia materna (Tabla 3, Figura 1), lo que indica que la infección plasmoidal es una importante fuente de anemia, que es una de las principales causas de morbi-mortalidad materna e infantil¹, y muestra la necesidad de complementar la gota gruesa con pruebas más sensibles, como la PCR, para no subestimar la frecuencia de infección durante el embarazo, tal y como lo sugirieron Mayengue y colaboradores²⁰.

La edad y la paridad, variables que generalmente presentan un comportamiento

colineal porque su variación es paralela y sus efectos se superponen, influyen tanto la frecuencia y el tipo de infección plasmoidal durante la gestación como sus consecuencias. Varios estudios encontraron que a mayor edad y/o paridad, menor frecuencia de infección y parasitemia más baja^{5,9-11}. La parasitemia submicroscópica fue más común en multíparas y tanto la anemia como la densidad parasitaria y la frecuencia de infección fueron mayores en primíparas y mujeres menores de 20 años^{9,10}; sin embargo, en dos estudios que se realizaron en zonas de transmisión baja e inestable, ni la edad ni la paridad se asociaron con anemia o con infección submicroscópica^{12,22}. Esto indica que la intensidad de transmisión de la zona y el nivel de inmunidad adquirido durante el embarazo modifican la frecuencia y el impacto de las infecciones submicroscópicas, de tal manera que en las regiones de baja transmisión estas infecciones se presentan en mujeres de todas las paridades y edades y son una causa importante de anemia.

Solamente tres de los estudios analizados midieron la relación de la parasitemia submicroscópica con el bajo peso al nacer^{6,15,17} y ellos indicaron que, tal como sucede con la anemia materna, la infección plasmoidal durante la gestación constituyó un factor de riesgo para nacer con bajo peso. El análisis del conjunto de datos de los tres estudios indica que la parasitemia submicroscópica causa una proporción de bajo peso al nacer similar a la que causa la parasitemia microscópica y confirma que la infección con *P. falciparum*, así sea con parasitemia tan baja que no se detecta con la microscopía, es una fuente importante de bajo peso al nacer (Tabla 3, Figura 1).

Schleiermacher y colaboradores en 2001¹¹ siguieron 20 mujeres antes, durante y después de la gestación y encontraron que durante el embarazo las mujeres presentaron mayor frecuencia de infección con *P. falciparum* y parasitemia más elevada, así como mayor número de clones parasitarios; además, estas tres medidas disminuyeron con el aumento en la edad y la paridad. Esa

disminución en la complejidad de la infección con el aumento de la paridad también fue reportada en otro estudio⁷; sin embargo, otros autores no obtuvieron ese mismo hallazgo^{5,20,22}, lo cual podría deberse a las diferencias en la intensidad y estabilidad de la transmisión de las regiones estudiadas. Adicionalmente, todos los estudios que genotipificaron los clones presentes en sangre periférica de la gestante o en la placenta, encontraron alta frecuencia de infecciones policlonales en ambos tejidos (Tabla 4). Todo esto demuestra el mayor riesgo de infección malárica que presentan las gestantes, incluso con múltiples cepas, lo que concuerda con su estado de inmunosupresión, y además explica que se va adquiriendo algún grado de inmunidad específica con los subsecuentes embarazos y la sucesiva exposición al parásito. De este modo, las mujeres con pocos embarazos previos no poseen los mecanismos inmunes para eliminar las cepas más prevalentes en el área, mientras que las que han tenido muchos embarazos han adquirido inmunidad antiparasitaria eficaz contra la mayoría de las cepas.

En Camerún encontraron que las infecciones con múltiples clones fueron más comunes en las mujeres con infección microscópica (98%) que en aquellas con infección submicroscópica (72%); además, el promedio de clones hallados en las gestantes con infección detectada por gota gruesa fue de 4,1, mientras que en las gestantes a quienes sólo se les detectó la infección por PCR fue de 2,7⁵. Esa relación directa entre la densidad parasitaria y la multiplicidad de infección también fue reportada por Beck y colaboradores en Ghana; ellos encontraron que las mujeres con parasitemia mayor a 1000 parásitos por microlitro tenían 8 veces mayor probabilidad de tener infecciones policlonales que las mujeres con infección submicroscópica⁷. Sin embargo, en otros estudios no se halló esa correlación positiva entre la parasitemia y las infecciones multiclonales^{10,21}, lo que puede sugerir que la inmunidad adquirida permite mantener la densidad parasitaria en niveles submi-

croscópicos, aun cuando la infección esté compuesta por varios clones.

Aunque en todos los estudios revisados y que analizaron las diferencias de genotipos en las poblaciones parasitarias de sangre periférica y de placenta, se halló que la mayoría de los alelos se presentaban en ambos tejidos; también se encontraron algunos genotipos que se detectaban en un tejido y en el otro no (Tabla 4). Esto puede deberse a las diferencias en la capacidad de citoadherencia de las diferentes cepas presentes en cada tejido, puesto que ya se ha demostrado que los parásitos que se adhieren a receptores como CSA en la placenta no lo hacen con receptores como CD36 o ICAM que permiten la citoadherencia a otros tejidos²⁶. Estas diferencias también pueden explicarse por la presencia de cepas con crecimiento altamente sincrónico que tendrían todas sus formas circulando como anillos o secuestradas como formas maduras¹⁴. En general, estos datos indican que las poblaciones parasitarias de placenta y sangre periférica presentan alta homología según los marcadores msp-1 y msp-2.

Con esta revisión se puede concluir que en las infecciones gestacionales con *P. falciparum* son muy comunes tanto las parasitemias submicroscópicas, como las infecciones policlonales y ambas contribuyen significativamente a las manifestaciones (anemia) y consecuencias (bajo peso al nacer) de la enfermedad, así como al desarrollo de inmunidad. Sin embargo, han sido poco estudiadas y su impacto debe ser evaluado en cada zona malárica específica, porque es evidente que éste depende de la intensidad y estabilidad de la transmisión malárica, la edad y la paridad maternas, entre otras variables, que a su vez están influenciadas por las condiciones socioeconómicas y ambientales particulares de cada región endémica.

La totalidad de trabajos analizados se hizo en África y se refirió a *P. falciparum*, que no es la especie más frecuente en América ni en la mayoría de las zonas

endémicas colombianas, lo que impone una limitación en el momento de tratar de aplicar los hallazgos y las conclusiones a nuestro contexto. Es necesario investigar en el medio malárico colombiano la relación que pueda existir entre las infecciones submicroscópicas y policlonales con *P. vivax* y *P. falciparum* en la gestación y eventos como la anemia materna, el bajo peso al nacer y otros.

Preocupa que las infecciones submicroscópicas contribuyan a la anemia y al bajo peso al nacer casi tanto como las infecciones microscópicas, según esta revisión, porque señalan que no basta el diagnóstico de la infección con microscopía y resulta claro que, al menos para este grupo poblacional (gestantes), se requiere que con urgencia se adopte una prueba diagnóstica con más sensibilidad, como alguna de las que se basan en el análisis de ácidos nucleicos parasitarios, pero que no están disponibles en las zonas maláricas por razones de costo y de exigencias operativas.

Ante este panorama (alta frecuencia de infección submicroscópica, efectos frecuentes y nocivos en la madre y el producto gestacional, pruebas diagnósticas “supersensibles” no disponibles en el medio malárico) podría pensarse en adoptar en esas zonas el tratamiento intermitente preventivo (TIP) con alguno de los antimaláricos apropiados para ello, con el fin de suministrarlo periódicamente a las embarazadas durante su gestación, y convertir esto en una política de atención prenatal, como sucede con el suministro de hierro, minerales y vitaminas, o con la práctica de exámenes para sífilis y VIH, entre otras. En este mismo sentido, corresponde insistir en la necesidad de aplicar la gota gruesa a todas las gestantes que asisten a la consulta prenatal, independientemente de que tengan o no síntomas, tal como se prevé en las normas colombianas pero que, en general y hasta donde sabemos, poco se cumple en las regiones palúdicas.

Referencias

1. Desai M, ter Kuile FO, Nosten F, McGready R, Asamoia K, Brabin B, et al. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet Infect Dis* 2007; 7: 93-104.
2. Uneke CJ. Diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in pregnancy in sub-Saharan Africa: the challenges and public health implications. *Parasitol Res* 2008; 102: 333-42.
3. Bottius E, Guanzirolli A, Trape JF, Rogier C, Konate L, Druilhe P. Malaria: even more chronic in nature than previously thought; evidence for subpatent parasitaemia detectable by the polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996; 90: 15-9.
4. Carmona-Fonseca J, Maestre A. Incidencia de la malaria gestacional, congénita y placentaria en Urabá (Antioquia, Colombia), 2005-2007. *Rev Colomb Obstet Ginecol* 2009; 60: 12-26.
5. Walker-Abbey A, Djokam RR, Eno A, Leke RF, Titanji VP, Fogako J, et al. Malaria in pregnant Cameroonian women: the effect of age and gravidity on submicroscopic and mixed-species infections and multiple parasite genotypes. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 72: 229-35.
6. Adegnika AA, Verweij JJ, Agnandji ST, Chai SK, Breitling LP, Ramharter M, et al. Microscopic and submicroscopic *Plasmodium falciparum* infection, but not inflammation caused by infection, is associated with low birth weight. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 75: 798-803.
7. Beck S, Mockenhaupt FP, Bienzle U, Eggelte TA, Thompson WN, Stark K. Multiplicity of *Plasmodium falciparum* infection in pregnancy. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65: 631-6.
8. Färnert A, Rooth I, Svensson, Snounou G, Björkman A. Complexity of *Plasmodium falciparum* infections is consistent over time and protects against clinical disease in Tanzanian children. *J Infect Dis* 1999; 179: 989-95.
9. Mockenhaupt FP, Rong B, Till H, Eggelte TA, Beck S, Gyasi-Sarpong C, et al. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* infections in pregnancy in Ghana. *Trop Med Int Health* 2000; 5: 167-73.
10. Saute F, Menendez C, Mayor A, Aponte J, Gomez-Olive X, Dgedge M, et al. Malaria in pregnancy in rural Mozambique: the role of parity, submicroscopic and multiple *Plasmodium falciparum* infections. *Trop Med Int Health* 2002; 7: 19-28.
11. Schleiermacher D, Rogier C, Spiegel A, Tall A, Trape JF, Mercereau-Puijalon O. Increased multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections and skewed distribution of individual msp1 and msp2 alleles during pregnancy in Ndiop, a Senegalese village with seasonal, mesoendemic malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 64: 303-9.
12. Adam I, A-Elbasit IE, Salih I, Elbashir MI. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* infections during pregnancy, in an area of Sudan with a low intensity of malaria transmission. *Ann Trop Med Parasitol* 2005; 99: 339-44.
13. Shiff C. Malaria Epidemiology. Johns Hopkins University. School of Public Health. <http://ocw.jhsph.edu/courses/malariology/PDFs/lecture3.pdf> [Consultado: 30 de enero de 2009]
14. Mockenhaupt FP, Ulmen U, von Gaertner C, Bedu-Addo G, Bienzle U. Diagnosis of placental malaria. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 306-8.
15. Mockenhaupt FP, Bedu-Addo G, von Gaertner C, Boyé R, Fricke K, Hannibal I, et al. Detection and clinical manifestation of placental malaria in southern Ghana. *Malar J* 2006; 5: 119.
16. Kamwendo DD, Dzinjalama FK, Snounou G, Kanjala MC, Mhango CG, Molyneux ME, et al. *Plasmodium falciparum*: PCR detection and genotyping of isolates from peripheral, placental, and cord blood of pregnant Malawian women and their infants. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96: 145-9.
17. Malhotra I, Dent A, Mungai P, Muchiri E, King CL. Real-time quantitative PCR for determining the burden of *Plasmodium falciparum* parasites during pregnancy and infancy. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3630-5.
18. Singer LM, Newman RD, Diarra A, Moran AC, Huber CS, Stennies G, et al. Evaluation of a malaria rapid diagnostic test for assessing the burden of malaria during pregnancy. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 70: 481-5.
19. Kassberger F, Birkenmaier A, Khattab A, Kreamsner PG, Klinkert MQ. PCR typing of *Plasmodium falciparum* in matched peripheral, placental and umbilical cord blood. *Parasitol Res* 2002; 88: 1073-9.
20. Mayengue PI, Rieth H, Khattab A, Issifou S, Kreamsner PG, Klinkert MQ, et al. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* infections and multiplicity of infection in matched peripheral, placental and umbilical cord blood samples from Gabonese women. *Trop Med Int Health* 2004; 9: 949-58.
21. Jafari-Guemouri S, Ndam NT, Bertin G, Renart E, Sow S, Le Hesran JY, et al. Demonstration of a high level of parasite population homology by quantification of *Plasmodium falciparum* alleles in matched peripheral, placental, and umbilical cord blood samples. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2980-3.
22. Schleiermacher D, Le Hesran JY, Ndiaye JL, Perraut R, Gaye A, Mercereau-Puijalon O. Hidden *Plasmodium falciparum* parasites in human infections: different genotype distribution in the peripheral circulation and in the placenta. *Infect Genet Evol* 2002; 2: 97-105.

23. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 61: 315-20
24. Nosten F, McGready R, Simpson JA, Thwai KL, Balkan S, Cho T, et al. Effects of *Plasmodium vivax* malaria in pregnancy. *Lancet* 1999; 354: 546-9.
25. Poespoprodjo JR, Fobia W, Kenangalem E, Lampah DA, Warikar N, Seal A, et al. Adverse pregnancy outcomes in an area where multidrug-resistant plasmodium vivax and *Plasmodium falciparum* infections are endemic. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 1374-81.
26. Fried M, Duffy PE. Adherence of *Plasmodium falciparum* to chondroitin sulfate A in the human placenta. *Science* 1996; 272: 1502-4.

Recebido em: 21/08/09
Versão final reapresentada em: 02/06/10
Aprovado em: 21/06/10