

Artículos originales cortos

Hibridación con sondas de ADN para la detección y monitoreo terapéutico de la infección con *Plasmodium falciparum* en individuos provenientes de áreas endémicas

I. MOLEÓN,¹ M. VERA² y L. FONTE¹

¹ Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Apartado 601. La Habana 13, Cuba.

² Centro de Investigaciones de Paludismo. Ave. 6 A, Norte y Calle 19 Poniente, anexo al hospital civil "Carmen de Acebo" Tapachula, Chiapas, CP 30700, México.

Recibido en agosto de 1991

Aprobado en marzo de 1992

RESUMEN

El desarrollo de los métodos de hibridación con sondas complementarias de ADN ha permitido disponer de una novedosa modalidad para el diagnóstico de las enfermedades parasitarias. En el presente trabajo se evalúa el diagnóstico del *Plasmodium falciparum* utilizando la hibridación en manchas, con la sonda de ADN pRepHind, en un grupo de individuos (n=51) procedentes de áreas endémicas de la enfermedad y su valor con el monitoreo terapéutico después de siete días de tratamiento con cloroquina.

El método demostró tener un nivel de detección de parasitemia de 0,0001% para 100 μ L de sangre y corroboró la especificidad señalada por otros investigadores. El diagnóstico parasitológico de la enfermedad se realizó utilizando el examen directo por microscopía, el cual identificó 33 individuos infectados con *P. falciparum*, dos con *P. vivax* y otros dos con *P. ovale*.

Al comparar los resultados obtenidos por el método de hibridación con los del examen microscópico, encontramos que el mismo tuvo una sensibilidad de 90,9% y una especificidad de 92,9%. Al séptimo día de tratamiento a los individuos enfermos, se encontró que la hibridación en manchas presentó una sensibilidad de 85,7% y una especificidad de 97,2%. El porcentaje de coincidencia entre la hibridación en manchas y el examen directo por microscopía fue de 93,3%. El método resulta adecuado para el

diagnóstico poblacional o de vigilancia epidemiológica, y no excluimos su valor para el monitoreo terapéutico de la enfermedad.

SUMMARY

Development of hybridization methods employing complementary DNA probes has allowed to diagnose parasitary diseases. In the present work, the diagnosis of *Plasmodium falciparum* using dot blot hybridization with the pRepHind DNA probe was evaluated in a group of individuals (n=51) from endemic areas of malaria disease, as well as therapeutic follow up after seven days of treatment. A parasitaemic detection level of 0.0001% in 100 μ L of blood was obtained. The specificity of the pRepHind DNA probe was the same described by others. Positive diagnosis of malaria disease was confirmed by direct microscopy examination, identifying 33 individuals with *P. falciparum*, two with *P. vivax* and two with *P. ovale*. When compared to the results obtained by dot blot hybridization, a 90.9% of sensitivity and 92.9% of specificity were found. At seventh days of treatment, a 85.7% of sensibility and 97.2% of specificity were obtained. Both methods showed a 93.3% of coincidences.

Dot blot hybridization with the pRepHind DNA probe results valid for population screening or epidemiological surveillance and may be improved in combination with a second line direct microscopy examination. We can not exclude its value for therapeutic monitoring of the disease.

INTRODUCCION

La malaria es una enfermedad producida por la infección con protozoarios del género *Plasmodium*. En el humano la especie *P. falciparum* es la más virulenta y puede estar asociada con una evolución fatal de la enfermedad; sin embargo, si se realiza el diagnóstico durante el estadio temprano de la infección, esta es susceptible de curación con los métodos convencionales.

El método tradicional utilizado para el diagnóstico de la infección con *Plasmodium*, consiste en la inspección directa en el microscopio de muestras de sangre donde se identifica directamente la presencia del parásito. Este método tiene como inconvenientes que necesita un entrenamiento especializado y un largo tiempo de examen por cada muestra, lo que constituye un serio problema para los muestreos masivos en poblaciones donde la infección es endémica.

El desarrollo del método de hibridación molecular utilizando sondas compuestas por secuencias complementarias de ADN, ha permitido disponer de una novedosa modalidad diagnóstica para confirmar la presencia de una variedad de agentes infecciosos virales, bacterianos y parasitarios (Lerman, 1986).

Recientemente se ha descrito este método diagnóstico para la detección de *P. falciparum*. Una de las sondas más estudiadas en este sentido consiste en un fragmento de ADN imperfectamente repetitivo en secuencias de 21 pares de bases (pRepHind), los cuales constituyen el 1% del genoma de *P. falciparum* (Franzen *et al.*, 1984). El ensayo de hibridación en manchas con esta sonda, cuando se compara con el examen directo por

microscopia, ha demostrado tener una especificidad de 96,9% y una sensibilidad de 90,9% (Buesing *et al.*, 1987), aunque la sensibilidad puede variar en dependencia del tiempo de lectura de cada lámina en el microscopio (Holmberg *et al.*, 1986).

Además, esta determinación tiene una capacidad de detección de 0,001% del nivel de parasitemia en 50 μ L de sangre utilizando una sonda de ADN (Franzen *et al.*, 1984), y de 0,0001% del nivel de parasitemia en 100 μ L de sangre, cuando se utiliza una sonda de ARN (Holmberg *et al.*, 1986).

En los estudios que han utilizado la hibridación en manchas con la sonda de ADN pPF14 (Barker *et al.*, 1986) para el diagnóstico de *P. falciparum*, se obtuvo una sensibilidad de 82% y una especificidad de 99%, así como una concordancia con los resultados por microscopia de 96% (Barker *et al.*, 1989). También se ha demostrado la utilidad del método de hibridación con la sonda de ADN PFR1 para evaluar la resistencia a la cloroquina de pacientes con malaria (McLaughlin *et al.*, 1988).

En el presente trabajo nos propusimos comparar el método de hibridación en manchas, utilizando la sonda de ADN pRepHind, con el examen directo por microscopia (gota gruesa) para la detección y monitoreo terapéutico de la infección por *P. falciparum* en individuos procedentes de áreas endémicas de la enfermedad.

MATERIALES Y METODOS

Examen directo por microscopia

Se utilizó el método convencional de gota gruesa empleando la coloración de Giemsa. El número de parásitos fue determinado en relación con el número de leucocitos, asumiendo que existen 10^4 leucocitos/ μ L (Franzen *et al.*, 1984). Las especies de parásitos y su estadio de desarrollo fueron

identificadas por un microscopista experto en diagnóstico de malaria, empleando al menos 40 min en la lectura de cada lámina. Se examinó un mínimo de 100 campos antes de declarar la muestra como negativa.

Cultivo del parásito

La cepa F32 de *P. falciparum* fue mantenida en nuestro laboratorio, en cultivo continuo con glóbulos rojos (Jensen y Trager, 1976) hasta que alcanzaron niveles de parasitemia de 10%. Se realizó un lavado con solución salina tamponada con fosfato pH 7,2 (SSTF) y se realizaron diluciones sucesivas en igual tampón hasta obtener niveles de parasitemia de 0,0001%. Los niveles de parasitemia se determinaron por examen directo por microscopía.

En nuestro estudio incluimos también muestras de sangre de ratones infectados con *P. yoelii* y *P. berghei*.

Individuos estudiados

Se estudiaron 51 individuos provenientes de áreas endémicas (Angola y Mozambique) de infección por *Plasmodium* al momento de entrar en el estudio y siete días después de haber recibido tratamiento específico contra la malaria, según el esquema y dosis convencional aceptados por la OMS. A cada uno se le extrajo, en el momento del estudio, un mililitro de sangre venosa recogida en tubos heparinizados (50 U/ml) para la extracción del ADN.

Ensayo de hibridación en manchas

Se realizó el método descrito por Holmberg *et al.* (1986) con algunas variaciones. Se utilizó como sonda de ADN el pRepHind (Franzén *et al.*, 1984), la cual se marcó con $\alpha^{32}\text{PdATP}$ según el método de *nick translation* (Rigby *et al.*, 1977), obteniéndose una actividad específica de 3×10^8 cpm/ μg de ADN.

Se incubaron 100 μL de sangre heparinizada con una solución de proteinasa K (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y 1% de SDS en SSTF, durante 30 min a 37°C. El ADN se extrajo con fenol y se desnaturalizó según el método descrito por Franzén *et al.* (1984). Las muestras fueron inmovilizadas en un filtro de nitrocelulosa, utilizando un equipo para esos propósitos (Minifold) y se incubó a 80°C durante dos horas. El filtro fue prehibridado durante dos horas a 65°C con 6X SSC (1X = NaCl 0,15 M, citrato de sodio 0,15 M), solución de Denhart 5X (solución de Denhart 1X = albúmina bovina 0,02%, polivinilpirrolidona 0,02%, ficoll 0,02%), SDS al 0,5% y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ADN desnaturalizado de esperma de salmón.

La hibridación se realizó con 1×10^5 cpm de sonda pRepHind marcada con $\alpha^{32}\text{PdATP}$, durante toda la noche a 65°C. Se lavó el filtro con 2X SSC y SDS 0,5%, durante 15 min a 65°C, repitiéndose este lavado cinco veces más. Se realizó la autorradiografía durante toda la noche utilizando una placa de rayos X de alta sensibilidad (Fuji).

En nuestro estudio, para demostrar la especificidad de la sonda pRepHind, utilizamos ADN extraído de cultivo *in vitro* de *P. falciparum* con un nivel de parasitemia del 5%; ADN extraído de ratones infestados con *P. yoelii* y *P. berghei* con un nivel de parasitemia del 15%, respectivamente; y 1 μg total de ADN humano.

RESULTADOS

Entre los individuos estudiados por gota gruesa, encontramos que 33 de ellos estaban infestados por *P. falciparum*, dos con *P. vivax* y otros dos con *P. ovale*.

En el estudio de especificidad de la sonda pRepHind con preparaciones de ADN de diferentes orígenes, la señal fue superior para el ADN de *P. falciparum* que para el ADN humano, y de *P. yoelii* y *P. berghei*, aun cuando las concentraciones de ADN utilizadas en estos dos últimos fueron superiores (3 X) a las del primero.

En el estudio realizado con diluciones de los glóbulos rojos infectados *in vitro* con *P. falciparum*, se demostró que la hibridación en manchas con la sonda pRepHind logra detectar niveles de parasitemia del 0,0001% en 100 μL de muestra (figura 1).

En los resultados obtenidos en el estudio inicial dentro del grupo de individuos con infección por *P. falciparum* se encontró que el ensayo de hibridación en manchas diagnosticó 30/33, lo cual corresponde con 90,9% de sensibilidad. Existieron 3/33 (9,1%) falsos negativos y 1/14 (7,1%) fueron falsos positivos. En este estudio inicial, la hibridación en manchas mostró una especificidad de 92,9%, ya que identificó 13 individuos negativos de los 14 existentes (tabla 1).

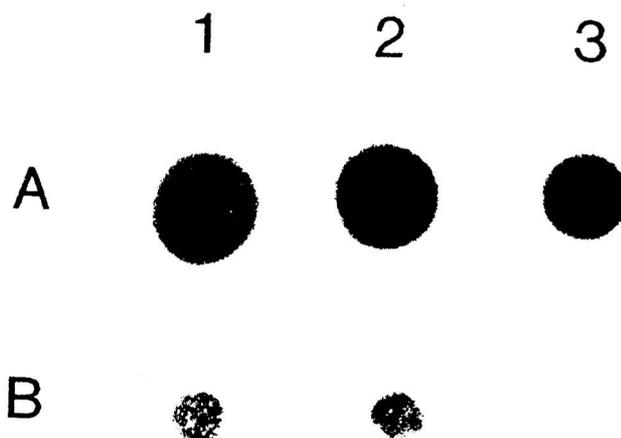


FIG. 1. Demostración del límite de detección de la hibridación en manchas (porcentaje de parasitemia) en diluciones de cultivo de sangre infestada con *P. falciparum* A1) 1%; A2) 0,1%; A3) 0,01%; B1) 0,001%; B2) 0,0001%; B3) 0,00001%.

Al séptimo día de evolución de los individuos, el ensayo de hibridación en manchas demostró tener una sensibilidad de 85,7% (6/7) y una especificidad de 97,2%. Existieron 1/7 (14,3%) falsos negativos y 1/36 (2,8%) falsos positivos (tabla 2).

Tabla 1

DETECCION DE *P. FALCIPARUM* UTILIZANDO LA HIBRIDACION EN MANCHAS CON LA SONDA pRepHind. EVALUACION INICIAL EN INDIVIDUOS CON INFECCION O SIN ELLA

	INDIVIDUOS CON INFECCION ^a (n = 33)	INDIVIDUOS SIN INFECCION (n = 14)
POSITIVOS	30/33 (90,1%%)	1/14 (7,1%%)
NEGATIVOS	3/33 (9,1%)	13/14 (92,9%)

^{a)} La infección se determinó por examen directo en el microscopio.

Tabla 2

DETECCION DE *P. FALCIPARUM* UTILIZANDO LA HIBRIDACION EN MANCHAS CON LA SONDA pRepHind. EVALUACION A LOS SIETE DIAS DESPUES DEL TRATAMIENTO CON CLOROQUINA EN INDIVIDUOS CON INFECCION Y SIN ELLA

	INDIVIDUOS CON INFECCION ^a (n = 7)	INDIVIDUOS SIN INFECCION (n = 36)
POSITIVOS	6/7 (85,7%)	1/36 (2,8%)
NEGATIVOS	1/7 (14,3%)	35/36 (97,2%)

^{a)} La infección se determinó por examen directo en el microscopio.

El porcentaje de coincidencia entre la hibridación en manchas y el examen directo al microscopio para todas las determinaciones realizadas fue de 93,3% (84/90).

DISCUSION

Estudios previos han reportado la utilización de la hibridación en manchas para la detección de niveles bajos de *P. falciparum* en sangre periférica (Franzen et al., 1984; Holmberg et al., 1986; Zolg et al., 1988; Barker et al., 1989). En el presente trabajo nos propusimos evaluar el comportamiento de la técnica de hibridación en manchas en un grupo de individuos diagnosticados con infección por *Plasmodium* o libres de enfermedad, por examen directo en el microscopio.

En las determinaciones realizadas al inicio del estudio de cada individuo, nosotros encontramos que los resultados en relación a la sensibilidad y especificidad del método de hibridación en manchas con la sonda pRepHind fueron similares a los reportados en otros estudios (Barker et al., 1989a; 1989b). La sonda pRepHind en las condiciones técnicas utilizadas en nuestro trabajo, no presentó reactividad cruzada con *P. vivax*, *P. ovale*, *P. berghei* y *P. yoelii*, ni tampoco con el ADN humano, lo cual denota su alta especificidad para *P. falciparum*, tal y como ha sido demostrado anteriormente (Franzen et al., 1984; Holmberg et al., 1986).

Los falsos negativos con la hibridación en manchas encontrados en nuestro estudio, pueden deberse a la retención prolongada del ADN en los eritrocitos, la cual trae como consecuencia un bajo rendimiento en la obtención del ADN y, por lo tanto, una disminución en la sensibilidad del método (Tsang et al., 1982).

Actualmente está muy discutido el problema de la sensibilidad del método de hibridación en manchas. Está demostrado que en condiciones ideales cuando un microscopista analiza pocas muestras obtiene mayor sensibilidad que el método de hibridación con sondas de ADN (Lanar et al., 1988).

Holmberg et al. (1986), obtuvieron una sensibilidad superior a la del examen microscópico, cuando el tiempo de observación de las muestras fue de 10 min solamente, sin embargo, cuando este tiempo de observación se alargó a 40 min, el examen microscópico resultó tener mayor sensibilidad que la hibridación en manchas con sondas de ADN; por esa razón, nosotros utilizamos en nuestro estudio esta última condición de trabajo para poder garantizar el diagnóstico de los individuos incluidos en el mismo.

Cuando analizamos la sensibilidad y especificidad de la hibridación en manchas con la sonda pRepHind en los individuos después de siete días de haber comenzado su tratamiento con cloroquina, encontramos que la sensibilidad fue ligeramente inferior y la especificidad ligeramente superior a la encontrada en el estudio inicial, lo cual denota la utilidad del método para el monitoreo terapéutico de los pacientes infectados. En esta parte del estudio, el paciente "aparentemente" falso positivo resultó evolucionar tórpidamente con su enfermedad y se demostró posteriormente que continuaba con la infección a pesar del tratamiento recibido. Nosotros relacionamos este comportamiento con una posible resistencia a la cloroquina durante el tratamiento en este paciente. Recientemente se han realizado estudios de la resistencia a drogas en la infección por *P. falciparum*, en particular la

resistencia a la pirimetamina y se ha relacionado con una mutación puntual en el ADN del parásito, la cual puede ser identificada mediante la técnica de amplificación del ADN, permitiendo diferenciar entre cepas resistentes y sensibles (Zolg *et al.*, 1989, 1990).

Por otra parte, ha sido demostrado, utilizando la sonda PFR1 para el diagnóstico de *P. falciparum*, que es posible identificar a través de la hibridación en manchas, la resistencia o no al tratamiento con cloroquina en pacientes enfermos (McLaughlin *et al.*, 1988).

El examen directo al microscopio aún se considera como el método de elección para el diagnóstico de la enfermedad, pero tiene la dificultad que requiere de microscopistas expertos bien entrenados y que solamente pueden evaluar un número limitado de muestras cada día; esto constituye una dificultad para los estudios poblacionales o en los sistemas de vigilancia epidemiológica, donde se requiere evaluar cientos de muestras en poco tiempo. Nosotros consideramos que la forma más adecuada de optimizar el diagnóstico poblacional en áreas endémicas de la infección por *P. falciparum*, podría ser la utilización combinada de la hibridación en manchas (por ejemplo, con métodos no radioactivos) como muestreo, y en aquellos casos que sean negativos, realizarle el examen directo por microscopía. De esta forma se garantizaría que no se escapen los individuos infectados durante el chequeo.

La hibridación en manchas utilizada por nosotros diagnosticó un nivel de parasitemia de 0,0001% en 100 μ L de sangre, lo cual le confiere al método una adecuada sensibilidad para el diagnóstico. Recientemente se ha reportado que la utilización del método de amplificación de

una secuencia de ácidos nucleicos a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ha brindado excelentes resultados para el mejoramiento de la sensibilidad del diagnóstico de diferentes enfermedades infecciosas (Savva *et al.*, 1990; Shibata *et al.*, 1988; Rayfield *et al.*, 1988).

Otro método que promete ser superior a los anteriores para el diagnóstico de *P. falciparum*, es la utilización de sondas para RNA ribosomal, ya que esta representa el 85-90% del RNA del parásito, permitiendo detectar hasta 0,00046% del nivel de parasitemia (Lal *et al.*, 1989). Una posibilidad más para garantizar el diagnóstico en los estudios poblacionales o de vigilancia epidemiológica, sería la realización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para sondas del parásito o la utilización de sondas de RNA, en aquellos individuos que aun son negativos por los dos métodos anteriores.

Uno de los factores más importantes que influyen en la reproducibilidad y la exactitud del método, es la unión inespecífica de las sondas utilizadas con los componentes de la sangre, lo cual produce altos fondos en los resultados. Actualmente, uno de los aspectos que aún quedan por mejorar en la técnica de hibridación en manchas para el diagnóstico de la infección por *P. falciparum*, son las condiciones de almacenamiento de las muestras de sangre antes de ser procesadas, pues usualmente se produce la degradación del ADN; este problema puede resolverse con la utilización de trifluoroacetato de cesio para almacenar las muestras, el cual disminuye la unión inespecífica al reducir el contenido de proteínas de las muestras (Zolg *et al.*, 1988). En nuestro trabajo no confrontamos

graves problemas de uniones inespecíficas, a causa de que trabajamos con muestras de sangre fresca.

El método de hibridación utilizando sondas de ADN constituye una novedosa tecnología que será necesario validar en estudios futuros para evaluar su importancia en el diagnóstico, el monitoreo terapéutico y probablemente la identificación de resistencia a drogas de diferentes enfermedades parasitarias.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Dra. Lena Franzen, Dept. Medical Genetics, Biomedical Center, Uppsala, Suecia, por haber donado gentilmente la sonda pRepHind utilizada en el presente estudio, y a la técnica Marta Barrero por su excelente trabajo técnico en la lectura de las preparaciones de gota gruesa.

REFERENCIAS

- BARKER, R.H.; L. SUEBSAENG; W. ROONEY; G.C. ALECRIM; H.V. DOURADO y D.F. WIRTH (1986). Specific DNA probe for the diagnosis of *P. falciparum* malaria. *Science* **231**: 1434-1436.
- BARKER, R.H.; A.D. BRANDLING-BENNETT; D.K. KOECH; M. MUGAMBI; B. KHAN; R. DAVID; J.R. DAVID y D.F. WIRTH (1989a). *Plasmodium falciparum*: DNA probe diagnosis of malaria in Kenya. *Exp. Parasitol.* **69**: 226-233.
- BARKER, R.H.; L. SUEBSAENG; W. ROONEY y D.F. WIRTH (1989b). Detection of *Plasmodium falciparum* infection in human patients: A comparison of the DNA probe method to microscopic diagnosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **41**: 266-272.
- BUESING, M.; P. GUERRY; C. DEISANTI; E. FRANKE; G. WATT; M.A. RAB; C.N. OSTER; J.P. BURANS y P.L. PERINE (1987). An oligonucleotide probe for detecting *Plasmodium falciparum* and analysis of clinical specimens for six countries. Concise Communications. *J. Inf. Dis.* **155**: 1315-1318.
- FRANZEN, L.; G.WESTIN; R. SHABOP; L. ASLUND; H. PERLMANN; T. PERSSON; H. WIGSELL y V. PETERSSON (1984). Analysis of clinical specimens by hybridization with probe containing repetitive DNA from *Plasmodium falciparum*. *Lancet* **1**: 525-528.
- HOLMBERG, M.; A. BJÖRKMAN; L. FRANZEN; L. ASLUND; M. LEBBAD; U. PETERSSON y H. WIGSELL (1986). Diagnosis of *Plasmodium falciparum* infection by spot hybridization assay: specificity, sensitivity and field applicability. *Bull. WHO* **64**: 579-585.
- JENSEN, J.B. y W. TRAGER (1976). Human malaria parasites in continuous culture. *Science* **193**: 673-675.
- LAL, A.; S. CHANGKASIRI; M.R. HOLLINGDALE y T.F. McCUTCHAN (1989). Ribosomal RNA-based diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria. *Mol. Biochem. Parasitol.* **36**: 67-72.
- LANAR, D.E.; G.L. MCGLAUGHLIN; D.F. WIRTH; R.H. BARKER; J.W. ZOLG y J.D. CHULAY (1988). Comparison of thick films, in vitro culture and DNA probes for detecting *Plasmodium falciparum* malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **40**: 3-6.
- LERMAN, S.L. (1986). DNA Probes. In Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- McLAUGHLIN, G.L.; P.H. DELORON; A.Y. HUONG; C. SEZIBERA y G. CAMPBELL (1988). DNA hybridization for assessment of response of *Plasmodium falciparum* to chloroquine therapy. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 1704-1707.
- RAYFIELD, M.; K. DE COCK; W. HEYWARD; L. GOLDSTEIN; J. KREBS; S. KWOF; S. LEE; J. MCCORMICK; J.M. MOREAU; K. ODEHOURI; G. SCHOCHETMAN; J. SNINSKY y CH-Y. OU (1988). Mixed human immunodeficiency virus (HIV) infection in an individual: Demonstration of both HIV type 1 and type 2 proviral sequences by using polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.* **158**: 1170-1176.
- RIGBY, P.W.J.; M. DIECKMAN; C. RHODES y P. BERG (1977). Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* **113**: 237-251.
- SAVVA, D.; J.C. MORRIS; J.D. JOHNSON y R.E. HOLLIMAN (1990). Polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii*. *J. Med. Microbiol.* **32**: 25-31.

- SHIBATA, D.K.; N. ARNHEIN y W.J. MARTIN (1988). Detection of human papilloma virus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. *J. Exp. Med.* 167: 225-230.
- TSANG, H.; H. MOLLENHAUER y G.M. IHLER (1982). Entrapment of proteins, viruses, bacteria and DNA in erythrocytes during endocytosis. *J. Appl. Biochem* 4: 8-35.
- ZOLG, J.W.; E.D. SCOTT y M. WENDLINGER (1988). High salt lysates: a simple method to store blood samples without refrigeration for subsequent use with DNA probes. *Am J. Trop. Hyg.* 39: 33-40.
- ZOLG, J.W.; J.R. PLITT; G.-X. CHEN y S. PALMER (1989). Point mutations in the dihydrofolate reductase-thymidilate synthase gen as the molecular basis for pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 36: 253-262.
- ZOLG, J.W.; G.-X. CHEN y J.R. PLITT (1990). Detection of pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* by mutation-specific polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.* 37: 257-266.