



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO DE FIN DE GRADO

**PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO
RÁPIDO PARA MALARIA**

Autor: Almudena Muñoz Simón
Tutor: Mercedes Martínez Grueiro
Convocatoria: Febrero 2018

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	4
OBJETIVOS.....	7
MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
DISCUSIÓN Y RESULTADOS	8
Fundamentos de la técnica	8
Principales dianas de los RDT: PfHRP-2, PLDH y aldolasa.....	10
Problemas de los RDT que detectan PfHRP-2	13
RDT en embarazo	14
Otros usos y usos no recomendados	16
Ventajas de los RDT en comparación con la microscopía	16
RDT en el tratamiento de la malaria	17
Nuevas dianas	18
CONCLUSIONES.....	19
BIBLIOGRAFÍA	20

RESUMEN

La malaria es una enfermedad infecciosa que ocasiona gran cantidad de muertes a nivel mundial. Requiere un diagnóstico seguro y eficaz para poder controlarla y evitar complicaciones. La técnica de referencia para su diagnóstico es la microscopía, a pesar de los inconvenientes que presenta, aunque cada vez es más frecuente combinarla con técnicas complementarias como los test de diagnóstico rápido (RDT), que detectan antígenos del parásito presentes en la sangre mediante inmunocromatografía. A pesar de las numerosas ventajas y beneficios que ofrecen, su sensibilidad y especificidad varía en función de diversos factores que impiden su uso como técnica única. En algunas ocasiones, como ocurre en la malaria durante el embarazo, esta sensibilidad es superior a la de la microscopía. Existen diferentes dianas, como la HRP-2, la PLDH o la aldolasa, pero presentan una serie de limitaciones que hacen necesaria la búsqueda de nuevas dianas que permitan obtener resultados mejores que los obtenidos en microscopía para, algún día, poder utilizar los RDT como método de referencia.

Palabras clave: malaria, *Plasmodium*, *P. falciparum*, diagnóstico, RDT, pruebas de diagnóstico rápido, PfHRP-2.

ABSTRACT

Malaria is an infectious disease that causes a great number of deaths worldwide. It requires a safe and effective diagnosis to be able to control it and avoid complications. The technique of reference for its diagnosis is microscopy, despite the drawbacks it presents, although it is increasingly common to combine it with complementary techniques such as rapid diagnostic tests (RDT), which detect parasite antigens present in the blood by immunochromatography. Despite the numerous advantages and benefits they offer, their sensitivity and specificity vary depending on various factors that prevent their use as a single technique. Sometimes, as in malaria during pregnancy, this sensitivity is superior than microscopy. There are different targets, such as HRP-2, PLDH or aldolase, but they present some limitations that make it necessary to search for new targets that allow obtaining better results than those obtained in microscopy to, one day, be able to use RDTs as reference method.

Key words: malaria, *Plasmodium*, *P. falciparum*, diagnosis, RDT, rapid diagnostic test, PfHRP-2.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La malaria o paludismo es una enfermedad parasitaria de gran importancia a nivel mundial debido a su elevada morbilidad y mortalidad. Se encuentra de manera endémica en el área tropical y subtropical, concretamente en África Subsahariana, América Latina y Sudeste Asiático, donde las condiciones socioeconómicas son desfavorables. Afecta principalmente a niños menores de cinco años, mujeres embarazadas, lactantes, pacientes con SIDA y viajeros sin previa exposición^{1,2}.

Es causada por distintas especies del género *Plasmodium*, parásito unicelular que se transmite a los seres humanos por la picadura del vector, que es el mosquito hembra del género *Anopheles*, previamente infectado. Existen más de 100 especies de *Plasmodium*, pero solo cinco de ellas afectan al hombre: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* y *Plasmodium knowlesi*, siendo *P. falciparum* el que origina manifestaciones clínicas más graves y causa más muertes a nivel mundial y *P. vivax* el más prevalente fuera del continente africano. Hasta hace relativamente poco *P. knowlesi* se consideraba patógeno de los macacos de cola larga, pero gracias a la biología molecular se ha descubierto que afecta también a seres humanos y que está infradiagnosticado debido a su similitud con *P. malariae* en su observación microscópica³.

El paludismo es una enfermedad prevenible y curable que cursa con fiebre aguda y que puede provocar la muerte del ser humano infectado si no se trata de manera rápida y eficaz, por lo que es imprescindible el diagnóstico precoz para poder instaurar el tratamiento. Sus síntomas pueden confundirse con los de una gripe común y tardan en aparecer una semana desde la picadura del mosquito, por lo que pueden pasar desapercibidos para el paciente infectado.

Aunque la incidencia de la enfermedad ha descendido a nivel global, ya que la tasa de paludismo ha disminuido de 76 a 73 casos por cada 1.000 habitantes en riesgo entre 2010 y 2016⁴, sigue tratándose de una enfermedad con elevada mortalidad. En 2016 la mitad de la población mundial corría el riesgo de padecer paludismo, aunque esta distribución no es homogénea. Se estimaron 445.000 muertes por malaria en todo el mundo, lo que significa que murieron más de 1.200 personas al día o, dicho de otro modo, que murió casi una persona por minuto. El 91% de todos estos fallecimientos tuvieron lugar en África, donde la especie predominante es *P. falciparum*².

Las personas que viven en áreas endémicas y que sobreviven a las infecciones en los primeros cinco años de vida van creando gradualmente una inmunidad protectora que desaparece rápidamente cuando abandonan el área endémica durante más de seis meses⁵.

Para el control de la malaria son imprescindibles tanto la prevención como el tratamiento precoz con agentes antimaláricos eficaces⁶. En cuanto a la prevención, lo primordial es el control del vector, mediante el uso de mosquiteros tratados con insecticidas, repelentes de insectos en los hogares y el uso de ropa de protección para evitar la picadura⁷. En las zonas de transmisión alta la OMS recomienda proteger a las mujeres gestantes mediante el denominado “tratamiento preventivo intermitente (TPI)”, con la combinación sulfadoxina-pirimetamina. Para proteger a los niños se recomienda llevar a cabo programas de quimio-prevención estacional de paludismo (QEP)². También es importante la quimioprofilaxis en personas que viajan a zonas endémicas, mediante la administración de fármacos antimaláricos con el objetivo de reducir el riesgo de padecer malaria grave³.

La malaria es una enfermedad potencialmente mortal, sobre todo en pacientes no inmunes. Para evitar que un caso leve de malaria se convierta en grave o, incluso, en la muerte, es necesario que se lleven a cabo el diagnóstico y tratamiento oportunos.⁸ La OMS recomienda la confirmación del diagnóstico antes de iniciar el tratamiento, excepto aquellos casos en los que no sea posible llevarlo a cabo. En ese caso el diagnóstico se basará únicamente en la sintomatología¹, ya que las personas que presentan síntomas febriles en zonas endémicas suelen ser diagnosticados de malaria⁹.

El diagnóstico actual consiste en el uso combinado y secuencial de pruebas de diagnóstico rápido (RDT) y visualización del parásito en sangre mediante microscopía, excepto en el caso de *P. knowlesi*, que solo puede identificarse mediante técnicas de biología molecular, básicamente PCR. Los test rápidos se utilizan como prueba inicial de cribado, pero no sustituyen a la microscopía, y se deben realizar inmediatamente después de la sospecha clínica.¹⁰ La microscopía sigue siendo la técnica de referencia para el diagnóstico, ya que permite diferenciar la especie de *Plasmodium* observando las distintas formas del parásito en extensiones de sangre periférica teñidas con diversos colorantes. Las muestras de sangre se obtienen mediante una punción en el dedo con una lanceta estéril y se coloca en un portaobjetos para realizar o bien una extensión en capa fina, o bien una gota gruesa¹¹. Lo ideal sería preparar las extensiones en menos de una hora para evitar el deterioro de la morfología del parásito, en campanas de flujo laminar y con la debida

protección individual. También es necesario extremar las medidas de bioseguridad en el manejo de las muestras, indicando siempre la procedencia de las mismas¹⁰.

La extensión en capa fina permite visualizar bien los glóbulos rojos parasitados y las diferentes fases de crecimiento de los parásitos, por lo que facilita la identificación de la especie y las parasitemias mixtas. Tiene una sensibilidad 30 veces menor que la gota gruesa, por lo que no se puede emplear de manera aislada como diagnóstico.

La gota gruesa es la técnica de referencia para determinar la parasitemia y permite detectar densidades bajas, de hasta 5-20 parásitos/ μ l (0,0001%), ya que hay mayor cantidad de sangre. Al realizar las preparaciones se produce la rotura de los glóbulos rojos; esto permitirá detectar el parásito (trofozoíto, esquizonte o gametocito) e identificar, con más dificultad, la especie de *Plasmodium*. Además, permite controlar la eficacia del tratamiento y la aparición de resistencias si se realiza un estudio seriado^{8,11}.

Se pueden utilizar distintos tipos de tinción para diagnosticar malaria. La más frecuente es con Giemsa, ya que se puede usar tanto para la extensión fina como para la gota gruesa. Permite distinguir la morfología del parásito y observar granulaciones, como las de Schüffner, muy importante para la diferenciación de la especie. Tiene una sensibilidad de 92-98% y una especificidad de 85-99%.

Otra tinción muy utilizada es la de Field, que se usa sobre todo en los hospitales tropicales que analizan un elevado número de muestras, ya que es muy rápida y sencilla y se puede usar también para extensión fina y para gota gruesa. Tiene el inconveniente de que no siempre permite visualizar en punteado de Schüffner.

Existen otras tinciones, como la de Leishman o la de naranja de acridina (Kawamoto), que solo se pueden utilizar para el frotis¹¹.

A pesar de ser la técnica de diagnóstico de referencia, la microscopía presenta una serie de inconvenientes que impiden que se pueda usar tan a menudo como se debería. Se trata de una técnica muy laboriosa que requiere microscopistas expertos, con entrenamiento suficiente para poder detectar los parásitos en la sangre. Además, esta técnica se vuelve más compleja cuando la parasitemia es muy baja, ya que se requiere aún más destreza para poder visualizar los plasmodios. Otro problema importante es la necesidad de disponer de un microscopio y, en la mayoría de los casos, de electricidad, lo que no es tan

frecuente en las zonas endémicas, ya que son zonas subdesarrolladas cuyos hospitales y laboratorios no siempre cuentan con el material y equipos necesarios^{8,11}.

Todas estas desventajas han hecho que sea necesario el desarrollo de nuevas técnicas más sencillas, para poder confirmar el diagnóstico ante cualquier sospecha de malaria, ya que la detección rápida, exacta y accesible contribuye a la disminución de la morbimortalidad y promueve un uso racional de los fármacos en las zonas endémicas. Estas nuevas técnicas son las pruebas de diagnóstico rápido para la malaria (RDT), que se basan en la detección de distintos antígenos presentes en los parásitos. Permiten un diagnóstico certero a todas las poblaciones vulnerables, incluso a aquellas que no tienen acceso a microscopía de calidad. Son de gran importancia ya que un diagnóstico a tiempo es vital para evitar complicaciones¹².

Existen otras técnicas de diagnóstico, pero su uso es menos frecuente puesto que no están al alcance de todos los laboratorios. Por un lado, está la PCR múltiple, que permite la detección del DNA genómico de todas las especies. La amplificación por PCR permite detectar hasta 3-4 parásitos/ μ l y determinar infecciones mixtas. Es una técnica reservada para validar resultados de las otras técnicas. Por otro lado, está el inmunodiagnóstico, que detecta anticuerpos anti-*P. falciparum* en suero mediante inmunofluorescencia o enzimoimmunoensayo. Tiene baja sensibilidad y se usa cuando la microscopía es negativa por la toma de medicación¹¹.

OBJETIVOS

El objetivo de esta revisión es profundizar en las pruebas de diagnóstico rápido para malaria (RDT), explicando su funcionamiento, los antígenos que detectan, su sensibilidad y especificidad, y ventajas e inconvenientes, comparándolas con otras técnicas de diagnóstico como la microscopía, así como su importancia para detectar malaria durante el embarazo. Con todo ello se podrá poner de manifiesto la importancia de un diagnóstico rápido y veraz para poder disminuir los casos de esta enfermedad a nivel mundial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica de artículos científicos publicados en revistas de alta calidad que están recogidos en bases de datos como PubMed, Google académico y ScienceDirect. También se consultaron

webs oficiales, especialmente la página web de la Organización Mundial de la Salud (OMS), donde se obtuvo la información más actualizada.

En la búsqueda se excluyeron aquellas fuentes cuyo acceso no fuera gratuito o no estuvieran escritas en inglés o español.

DISCUSIÓN Y RESULTADOS

Las pruebas de diagnóstico rápido para malaria (RDT) son inmunocromatografías que, utilizando diferentes tipos de dispositivos, detectan antígenos producidos por el parásito que se encuentran en la sangre de las personas infectadas. La presencia de estos antígenos se manifiesta mediante un cambio de color en el soporte de nitrocelulosa en el que se desarrolla la prueba y sobre el que se ha dispuesto la muestra. Pueden presentarse en distintos formatos, como en cartucho o en tarjeta. La sensibilidad de estas pruebas depende de numerosos factores, tales como la especie de *Plasmodium*, la parasitemia, el antígeno que detectan, el estado de la RDT, la ejecución de la técnica, la correcta interpretación, la viabilidad de los parásitos o la variación en la estructura y expresión del antígeno¹².

Generalmente no se usan como única técnica diagnóstica, sino que se usa como prueba inicial de cribado, ya que el número de falsos negativos es muy elevado, sobre todo cuando se trata de una infección por *Plasmodium no falciparum*¹⁰ y cuando la parasitemia es muy baja (menor de 0,1%). No sustituyen al frotis y la gota gruesa puesto que no son pruebas cuantitativas y no estiman el grado de parasitemia, muy relacionado con la gravedad y con importante valor pronóstico¹¹. Esta relación entre la cantidad de plasmodios en sangre y gravedad varía en función de las poblaciones y los grupos de edad, pero generalmente cuanto mayor es la parasitemia, mayor es la gravedad⁸. Al no cuantificar los parásitos, se dificulta la adopción de medidas terapéuticas oportunas¹¹ y se impide la monitorización del tratamiento y la aparición de resistencias¹⁰. Por ello, las decisiones terapéuticas no deben basarse únicamente en los resultados de las pruebas de diagnóstico rápido y es necesario confirmar siempre el diagnóstico con microscopía¹².

Fundamentos de la técnica

El fundamento de la técnica se basa en la detección de antígenos palúdicos mediante inmunocromatografía en una tira de nitrocelulosa que contiene bandas de anticuerpos

monoclonales específicos⁸, apareciendo coloración en dichas bandas si el resultado de la prueba es positivo.

Estas tiras de nitrocelulosa se encuentran introducidas en una carcasa de plástico con distintos compartimentos, uno para añadir una gota de sangre, otro para añadir el tampón, que se encarga de arrastrar la sangre a lo largo de la tira de nitrocelulosa y, por último, uno para leer los resultados de la prueba, mediante la aparición o no de líneas coloreadas.

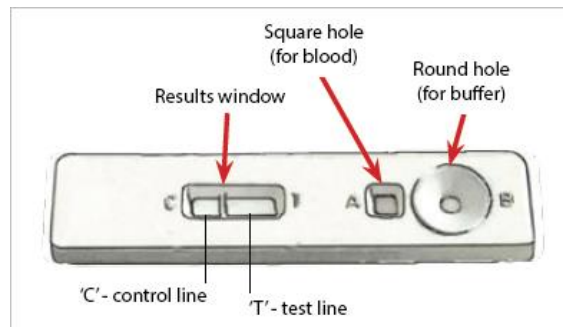


Figura 1: RDT cassette. How malaria RDTs work. World Health Organization WHO. 2018

En un extremo de la tira de nitrocelulosa, o bien en un pocillo, se sitúan anticuerpos libres específicos para el antígeno que se quiere detectar marcados con un colorante. Continuando a lo largo de la tira se encuentra la siguiente banda, que es la banda de prueba ya que contiene anticuerpos específicos para el antígeno, pero en este caso fijados a la tira. La última banda va a servir como control ya que en ella hay anticuerpos bien contra el anticuerpo marcado, o bien contra el antígeno. Siempre tiene que aparecer la línea de control para que el resultado sea válido, aunque esto no significa que el resultado sea preciso.

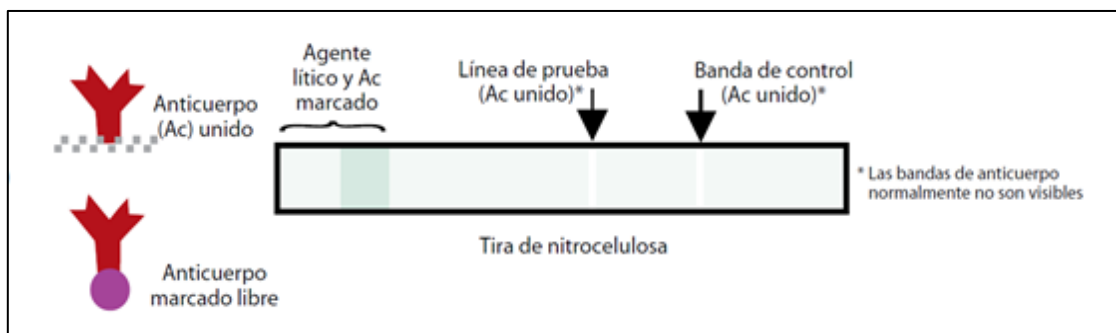


Figura 2: Fundamento de la técnica de inmunocromatografía. Uso de las pruebas en el diagnóstico rápido de la malaria. Organización Mundial de la Salud. Segunda Edición. 2006

Para comenzar el test se añade sangre y los reactivos necesarios, incluidos en el kit, en los compartimentos correspondientes, de modo que, al entrar en contacto con la tira, se

mezclan con los anticuerpos marcados libres y van a ir avanzando atravesando las bandas con los anticuerpos fijados. Si el antígeno está presente, se unirá al anticuerpo marcado libre y, al llegar a la banda de control donde hay un anticuerpo contra el antígeno, se unirá también a este, formándose un complejo entre el antígeno y los dos anticuerpos (fijo y libre-marcado), por lo que parte del anticuerpo marcado libre va a quedar atrapado en la banda de prueba. Otra parte del anticuerpo marcado va a quedar atrapado en la banda de control, ya que contiene anticuerpos contra el anticuerpo marcado o contra el antígeno¹².

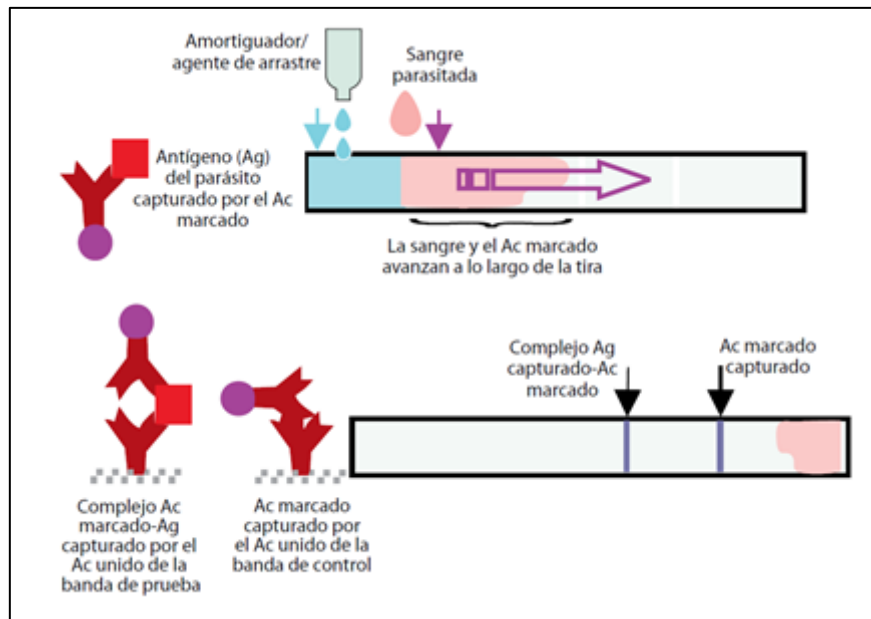


Figura 3: Fundamento de la técnica de inmunocromatografía. Uso de las pruebas en el diagnóstico rápido de la malaria. Organización Mundial de la Salud. Segunda Edición. 2006

Principales dianas de los RDT: PfHRP-2, PLDH y aldolasa

La mayoría de las pruebas de diagnóstico rápido detectan la proteína 2 rica en histidina (HRP-2 o PfHRP-2), que es una proteína producida por trofozoítos y gametocitos jóvenes, pero no maduros, de *P. falciparum*¹³. Se caracteriza por ser una proteína soluble en agua, estable a altas temperaturas, con una masa de 30 kDa. Contiene un 35% de histidina, 40% de alanina y un 12% de aspartato, aunque estos porcentajes pueden variar. Existe una correlación positiva entre su concentración en sangre y la biomasa del parásito.

Existen tres tipos de proteína rica en histidina (PfHRP), todas ellas producidas exclusivamente por *Plasmodium falciparum*. Las más importantes son la PfHRP-2 y la PfHRP-3, que tienen regiones repetidas de aminoácidos ricos en histidina, que son las

secuencias reconocidas por algunos anticuerpos que detectan HRP-2 en las pruebas rápidas de diagnóstico¹⁴.

La proteína HRP-2 interviene en el ciclo biológico de los plasmodios. Se encuentra en la vacuola parasitófora o en el citoplasma del parásito y facilita activamente la polimerización del grupo tóxico hemo, procedente de la degradación de la hemoglobina del hospedador, para formar el pigmento malárico o hemozoína, que no es tóxico¹⁶.

Al ser una proteína producida únicamente por la especie *Plasmodium falciparum*, los test rápidos basados únicamente en su detección sólo serán eficaces cuando ésta sea la causante de la enfermedad, pero no detectarán la infección si es producida por cualquiera de las otras especies. Por ello, un resultado negativo no significa ausencia de infección y hace necesaria la confirmación del mismo con microscopía⁸.

A pesar de este inconveniente, la detección de HRP-2 es el método más común de los RDT, ya que *Plasmodium falciparum* es la especie más letal y es la única especie significativa en grandes partes de África¹³. Además, la sensibilidad de estos test es muy elevada, comparable a la microscopía según numerosos estudios¹², ya que son capaces de detectar densidades de hasta 100 parásitos/ μ l. Esto permite que en los países endémicos de renta baja se puedan usar como única técnica, ya que la mayoría de los casos de malaria se deben a *P. falciparum*⁸. En numerosas ocasiones, cuando no se dispone de un microscopista experto pero la sospecha clínica es alta, se utilizan los test rápidos para descartar la infección por *P. falciparum* y poder poner en marcha las medidas terapéuticas necesarias¹⁰.

El hecho de que sólo sean capaces de identificar una especie hace que sea necesario la búsqueda de otras dianas para evitar un diagnóstico erróneo. Existen muchos RDT que combinan la detección de HRP-2 con otros antígenos presentes en todas las especies, como la enzima lactato deshidrogenasa (PLDH) o la aldolasa, de modo que distinguen la malaria falciparum de la no falciparum. También existen pruebas que detectan una lactato deshidrogenasa específica de *P. falciparum* (PfLDH) y de *P. vivax* (PvLDH)¹⁷. El hecho de que se pueda diferenciar también la infección por *Plasmodium vivax* es de gran importancia, puesto que es la especie que provoca más casos de malaria fuera de África y también porque la coinfección *P. falciparum*-*P. vivax* es la más común¹⁸.

La enzima lactato deshidrogenasa es esencial en la producción de energía, ya que es la última enzima de la ruta glucolítica del parásito. Es soluble y es producida por las formas sexuales y asexuales del parásito, incluyendo los gametocitos maduros. Ni en el plasmodio ni en el eritrocito existe el ciclo del ácido cítrico completo para poder producir ATP mitocondrial, por lo que dependen del metabolismo anaeróbico de la glucosa, en el que interviene la enzima, para poder producir energía.

El 26% de la secuencia de aminoácidos de la PLDH es igual que la LDH de los humanos y es donde se encuentran los residuos catalíticos para la actividad enzimática. Todas las especies de *Plasmodium* comparten más del 90% de su estructura y tienen epítomos comunes, por lo que las pruebas rápidas detectan la PLDH mediante el uso de anticuerpos frente a esos epítomos, permitiendo así la detección de todos los *Plasmodium* humanos (no sólo *P. falciparum*) y las infecciones mixtas¹⁹. Además, existen suficientes diferencias entre las secuencias de aminoácidos de la LDH de *P. falciparum* y de *P. vivax*, por lo que se pueden preparar anticuerpos frente al epítomo específico de cada especie. El hecho de poder detectar todas las especies que afectan al hombre supone una disminución en el número de falsos negativos en casos de malaria no falciparum²⁰.

Los RDT basados en la detección de LDH funcionan peor cuando la parasitemia es baja. Varios estudios demuestran que existe una correlación positiva entre el nivel de PLDH y la parasitemia, por lo que la sensibilidad del test disminuirá si la cantidad de plasmodios es baja.

Una de las ventajas que presenta frente a los RDT basados en la detección de HRP-2, es que la PLDH no persiste en sangre tras la muerte del parásito, por lo que se puede monitorizar la respuesta al tratamiento y predecir fallos y disminuir los falsos positivos cuando el tratamiento ha sido eficaz y se han eliminado los plasmodios. Contrariamente, los falsos positivos pueden aumentar ya que la PLDH es expresada también por los gametocitos maduros, que no causan enfermedad. Esto se debe a que los antimaláricos no siempre consiguen su eliminación, por lo que podrían obtenerse resultados erróneos en caso de que estos estuvieran presentes en la sangre¹⁴.

La otra enzima que se utiliza como diana de los RDT es la aldolasa, una enzima glucolítica que se encuentra en numerosos tejidos tanto del hospedador como del parásito, y se encarga de catalizar la transformación de fructosa-1,6-difosfato en dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído-3-fosfato. La aldolasa de *P. falciparum* comparte un 61-68% de

su secuencia de aminoácidos con la aldolasa eucariótica. Algunos estudios han investigado el uso o la detección de anticuerpos frente a la aldolasa como pruebas de diagnóstico rápido y lo han comparado con los RDT basados en la detección de HRP-2 y PLDH. Actualmente se usan en conjunto para distinguir *Plasmodium falciparum* de otras especies, pero con resultados más deficientes²¹. La baja sensibilidad de este método se debe a los niveles bajos de expresión del antígeno en los glóbulos rojos infectados y, también, al proceso de manufacturación de los RDT²².

Problemas de los RDT que detectan PfHRP-2

Como se ha mencionado previamente, la HRP-2 es la diana más frecuentemente usada en los RDT o los test de diagnóstico rápido de malaria, pero presenta una serie de limitaciones e inconvenientes que hay que tener en cuenta a la hora de realizar el test e interpretar los resultados.

La sensibilidad de una prueba es el porcentaje de resultados positivos entre el número total de positivos, mientras que la especificidad es el porcentaje de negativos en función del total de casos que realmente son negativos. En el caso de las RDT, se considera que el total de positivos o negativos es el que se detecta por microscopía o por PCR. Esta sensibilidad y especificidad se pueden ver modificadas por distintos factores, haciendo que aumente el número de falsos negativos y falsos positivos²³.

Algunos estudios demuestran la existencia de una variación genética en la secuencia de aminoácidos de PfHRP-2 entre algunos parásitos aislados de distintas localizaciones geográficas, de modo que no van a ser detectados por la RTD, disminuyendo su sensibilidad y dando lugar a resultados falsos negativos. Por ejemplo, un estudio con DNA de Pf-HRP-2 procedente de aislamientos de África y Sudamérica demostró una variación de secuencias extrema, pero concluyó que esta diversidad de proteínas no era la causa principal de la disminución de la sensibilidad²⁴. Sin embargo, otro estudio llevado a cabo en la región amazónica de Perú reveló la existencia de parásitos con ausencia del gen *Pf-HRP-2*, y por tanto del antígeno, lo que sí supuso una disminución en la sensibilidad de la prueba, exigiendo observación microscópica para la detección de la infección²⁵. Estos resultados fueron confirmados en otro estudio al probar que la falta del gen PfHRP-2 fue la causa del fallo del diagnóstico mediante RDT de dos viajeros franceses en la región amazónica de Brasil²⁶. Además de las zonas amazónicas, se ha

observado que el antígeno no se expresa en algunos aislamientos procedentes de India y Mali.

Otra situación que genera variaciones en la sensibilidad de las pruebas rápidas es la presencia o no de factor reumatoide. Un estudio demostró que varios pacientes con factor reumatoide, pero sin malaria, dieron positivo al realizar la prueba de diagnóstico rápido, pero cuando el factor reumatoide era absorbido, los resultados fueron negativos²⁷. Esto está relacionado con el tipo de inmunoglobulina que se usa para capturar el antígeno. Un estudio llevado a cabo en pacientes con factor reumatoide positivo sugiere que los test HRP-2 que utilizan IgG pueden dar reacciones cruzadas con el factor reumatoide, que se unen a estos anticuerpos, dando lugar a falsos positivos, mientras que si el anticuerpo es IgM esto no ocurre²⁸. La conclusión fue que el factor reumatoide no se une a las IgM anti PfHRP-2, aunque este resultado fue cuestionado por varios autores.

Los falsos positivos son causados también por la persistencia de PfHRP-2 en la sangre del paciente tras la administración de un tratamiento adecuado que elimina el parásito, lo que disminuye la sensibilidad de la prueba e impide controlar el tratamiento. Varios estudios han demostrado que HRP-2 permanece en sangre 28 días tras la muerte del parásito, por lo que esta diana no es la adecuada si ya se ha iniciado el tratamiento y habrá que confirmar el resultado con microscopía o utilizar RDT que detecten otro antígeno.

Se ha demostrado también que la edad del paciente, la intensidad de la transmisión y la falta de síntomas influyen en la sensibilidad y en la especificidad de los RDT, lo que puede desencadenar tanto en falsos positivos como en falsos negativos²³.

RDT en embarazo

La infección por malaria durante el embarazo es un importante problema de salud tanto en las regiones tropicales como en el mundo occidental. Puede tener una importante repercusión tanto en la mujer embarazada como en el feto²⁹. Es una de las principales causas de niños prematuros y con bajo peso al nacer. El cuadro clínico y de laboratorio es diferente al de la malaria en adultos debido a la presencia del feto y la placenta³⁰. Puede haber parasitemia o no, ya que durante el embarazo los parásitos quedan secuestrados en el tejido de la placenta, de modo que pueden ser detectados o no por microscopía. Por el contrario, las pruebas de diagnóstico rápido sí pueden detectar la infección puesto que los antígenos se encuentran en la sangre.

Un estudio en Camerún con mujeres embarazadas concluyó que la sensibilidad de la microscopía y de las RDT era similar en parasitemias mayores del 1%, pero que la inmunocromatografía era más sensible si la parasitemia era baja. También reveló que las RDT detectaron positivas el 49% de las muestras que habían sido negativas en microscopía al no detectarse plasmodios en sangre³¹.

En una zona endémica de Uganda se realizó un estudio en mujeres febriles y se concluyó que el uso de RDT para detectar malaria, tenía una sensibilidad del 96,8 % y una especificidad del 73,5%, y que el método más eficaz para diagnosticar malaria era la combinación de los RDT con la microscopía. Sus autores afirman que, aunque los RDT no son mejores que la microscopía, son una herramienta muy útil para evaluar la malaria en el embarazo³².

Otro estudio comparó la microscopía con las pruebas rápidas que detectan HRP-2 para diagnosticar malaria en sangre de placenta en el momento del parto y concluyó un acuerdo del 82,9% entre ambas técnicas ($p < 0,0001$), con discrepancias en parasitemias bajas (menos de 500 parásitos/ μ l) y en microscopía negativa. Los resultados confirmaron que las RDT son una buena alternativa a la microscopía para diagnosticar malaria placentaria en el momento del parto³³.

Por último, un estudio de cohortes prospectivo llevado a cabo en Burkina Faso y Uganda comparó los RDT basados en la detección de HRP-2 y PLDH y la microscopía con las técnicas de PCR, que fueron utilizadas como referencia, en mujeres embarazadas que no tenían VIH. Estas mujeres se inscribieron en el segundo o tercer trimestre del embarazo y fueron seguidas hasta el parto. En comparación con PCR, la sensibilidad de los HRP-2 RDT, PfLDH RDT y microscopía fue 75,7%, 60,1% y 69,7% en Uganda, y 55,8%, 42,6% y 55,8% en Burkina Faso, respectivamente. La especificidad fue superior al 96% en las tres pruebas. La comparación de la precisión usando la ecuación de estimación generalizada reveló que la prueba de detección rápida de HRP-2 fue la prueba más precisa en ambos entornos. Por ello, el estudio concluyó que los HRP-2 RDT son la prueba más apropiada para la detección de la infección durante el embarazo, especialmente en mujeres sintomáticas, aunque queden sin detectar algunas mujeres con PCR positiva³⁴.

Otros usos y usos no recomendados

El principal uso de las RDT es llevar a cabo un diagnóstico rápido de malaria. Son el método de elección cuando no hay acceso a la microscopía. En algunos casos, debido al método empleado, solo permitirá confirmar si la infección se debe a *P. falciparum* o no.

También permiten diagnosticar malaria en gestantes, ya que los HRP-2 RDT son más sensibles que la microscopía puesto que los parásitos quedan secuestrados en la placenta, por lo que pueden no ser visibles al microscopio^{8, 10}.

Otra utilidad es llevar a cabo un diagnóstico retrospectivo o remoto. La persistencia de HRP-2 en la sangre puede ser útil para confirmar un diagnóstico previo en personas tratadas empíricamente. Esto es posible hasta 14-21 días después de haber finalizado el tratamiento o tras la desaparición de los síntomas, tiempo aproximado que perdura el antígeno en la sangre tras la muerte de los parásitos⁸.

Contrariamente a lo que se podría pensar, el uso de los RDT no está recomendado para el autodiagnóstico de viajeros, ya que algunos estudios realizados con un número limitado de pacientes han obtenido resultados no satisfactorios. Esto se debe a que se requiere un entrenamiento adecuado para la preparación e interpretación de la prueba, y conocimientos sobre sus limitaciones, por lo que se recomienda que sea llevada a cabo por personal sanitario cualificado^{10, 12}.

Tampoco se pueden usar para controlar el tratamiento, puesto que se trata de una técnica cualitativa y no permite controlar si la parasitemia disminuye o no. Además, los antígenos HRP-2 pueden permanecer en sangre hasta cuatro semanas tras desaparecer los síntomas clínicos, por lo que el resultado se mantendría positivo. En el caso de la PLDH y la aldolasa, aunque disminuyen rápidamente con un tratamiento eficaz al eliminarse las formas asexuales del parásito, también pueden ser expresadas por los gametocitos que, dependiendo del tratamiento, pueden persistir una o dos semanas en circulación, por lo que también se mantienen positivos⁸.

Ventajas de los RDT en comparación con la microscopía

Aunque la microscopía es la técnica de referencia, ya que permite cuantificar la parasitemia y distinguir la especie de *Plasmodium*, los RDT presentan una serie de ventajas que les hacen imprescindibles para un diagnóstico veraz y precoz, sobre todo en

las zonas endémicas donde los casos de malaria son muy elevados. Al ser técnicas rápidas permiten el diagnóstico de muchas personas en muy poco tiempo. Son pruebas ideales para laboratorios con poca experiencia en diagnóstico microscópico, ya que son fáciles de realizar y no requieren más instrumental que una lanceta y una pequeña pipeta para recoger la gota de sangre. Además, son estables a temperatura ambiente incluso en el trópico, donde las temperaturas son más elevadas¹¹. En la Tabla 1 se recogen las principales diferencias entre la microscopía y las pruebas de diagnóstico rápido.

		Microscopía (Frotis de sangre)	Prueba rápida
Requisitos	Equipo	Microscopio	Ninguno
	Electricidad	Preferiblemente, no necesaria	Ninguno
	Suministro	Recolección de muestras, tintes, agua	Todos los suministros incluidos en el kit
	Entrenamiento	Microscopista bien entrenado	Se necesita sólo un entrenamiento mínimo
Desempeño	Duración de la prueba	Mínimo una hora	15 minutos
	Intensidad laboral	Alta	Baja
Especificaciones técnicas	Detect. todas las especies	Sí	Sí
	Cuantificación	Posible	No es posible

Tabla 1: Microscopía vs. Prueba Rápida¹³

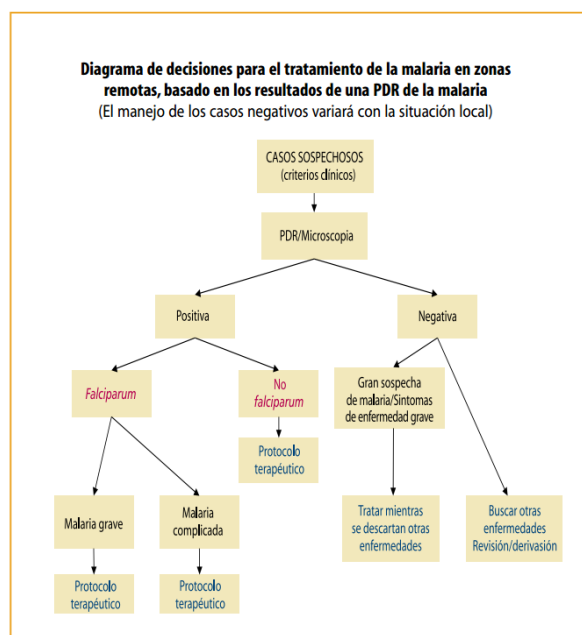
Otra diferencia a tener en cuenta es el coste de ambas técnicas. Según UNICEF, el precio medio de un RDT ha ido bajando progresivamente y se sitúa actualmente en 0,44 dólares²³, mientras que el coste del diagnóstico microscópico es menor en aquellas zonas donde existen instalaciones, material y personal adecuados³⁵. Existe un parámetro diferente al precio absoluto, que es el coste efectivo en relación a los resultados. En un estudio llevado a cabo en Uganda se concluyó que el precio efectivo de los RDT era de 5 dólares por cada caso correctamente diagnosticado y tratado, mientras que el de la microscopía era de 9,61³⁶. También hay estudios llevados a cabo en diferentes partes de África que demuestran la rentabilidad de los RDT, ya que permiten disminuir la administración de tratamientos inadecuados, lo que facilita el aprovechamiento de los recursos y evita la sobremedicación de la población que puede favorecer la aparición de cepas resistentes³⁵.

RDT en el tratamiento de la malaria

La precisión de los RDT depende de la atención y la pericia con la que se prepara y se interpreta. Además del resultado de la prueba, hay que tener en cuenta la evaluación clínica, incluidas la anamnesis y la exploración. En las zonas con elevada prevalencia la confirmación de la parasitemia no contribuye significativamente al tratamiento, ya que

puede existir parasitemia sin que haya enfermedad, es decir, sin que se presenten síntomas. El resultado hay que interpretarlo en función del estado clínico, teniendo en cuenta que puede fallar. Puede ser necesario repetir la prueba tras varios días si persisten o empeoran los síntomas.

Hay que establecer siempre un plan de manejo de los resultados que permita un tratamiento antimalárico de los casos graves, aunque el test salga negativo. En caso de fiebre con resultados negativos habrá que evaluar el posible fallo de la PDR o bien considerar la posibilidad de una enfermedad concomitante no malárica¹².



Esquema 1: Diagrama de decisiones para el tratamiento de la malaria en zonas remotas, basado en los resultados de una PDR de la malaria¹²

Nuevas dianas

Muchos estudios resaltan las dificultades del diagnóstico de la malaria basado en la detección de antígenos específicos por inmunocromatografía, lo que promueve la exploración de nuevas técnicas de detección más eficientes³⁷ y el uso de nuevos biomarcadores. Algunas dianas diagnósticas potenciales son: la proteína de choque térmico 70 (Hsp 70), la dihidrofolato reductasa (DHFR)- timidilato sintasa (TS), la proteína detoxificante de hemo (HDP), la proteína rica en glutamato, la hipoxantina fosforibosil transferasa o la fosfoglicerato mutasa. Estas proteínas se expresan durante todo el ciclo de la vida del parásito y sus genes son bien conservados.

Las proteínas de choque térmico (Hsp) se encuentran en todos los organismos vivos, incluido *Plasmodium*. Durante la infección, el parásito se somete a cambios de temperatura bruscos, desde temperatura ambiente cuando se encuentra en el mosquito, hasta incluso más de 40°C cuando se encuentra en el hospedador con fiebre. En respuesta a esta fiebre, el parásito aumenta la liberación de Hsp para poder sobrevivir, siendo la Hsp 70 la más abundante. Por ello, en el suero de pacientes infectados, aumentan los anticuerpos anti-PfHsp 70 en comparación con personas no infectadas²³.

Otro ejemplo es la glutamato deshidrogenasa (GDH), enzima omnipresente involucrada en la asimilación de amonio o en el catabolismo del glutamato. *P. falciparum* presenta tres isoenzimas GDH. En un estudio llevado a cabo en áreas hiperendémicas se concluyó que la PfGDH-1 puede ser utilizada para detectar la presencia del parásito mediante Western Blot³⁸.

En otro estudio se usaron anticuerpos monoclonales contra la PfGDH en combinación con oro coloidal para el diagnóstico de *P. falciparum* mediante un ensayo inmunocromatográfico, y se obtuvo una sensibilidad del 86,6% y una especificidad del 96,4% en comparación con la microscopía. Se concluyó que es una técnica rápida y precisa con potencial utilidad para el diagnóstico instantáneo de malaria³⁹.

CONCLUSIONES

La malaria es una enfermedad con elevada mortalidad a nivel mundial que requiere un diagnóstico seguro y eficaz, lo más rápido posible, para instaurar el tratamiento y evitar complicaciones.

Las pruebas de diagnóstico rápido (RDT) son una herramienta muy útil para el diagnóstico, pero siempre complementaria a la microscopía, que es el método de referencia. Se trata de una técnica de inmunocromatografía que detecta antígenos presentes en los plasmodios, siendo el más frecuente la proteína PfHRP-2.

La sensibilidad se ve modificada por múltiples factores, como alteraciones genéticas o ausencia de la PfHRP-2 o por la presencia de factor reumatoide en los test que utilizan IgG. Además, la persistencia del antígeno en la sangre tras la eliminación del parásito no solo modifica la sensibilidad, sino que también impide el control de la eficacia del tratamiento.

También se ha demostrado que la sensibilidad aumenta durante el embarazo, ya que los parásitos quedan retenidos en la placenta, pero los antígenos son liberados a la sangre.

Por último, es necesario la búsqueda de nuevas dianas para las pruebas de diagnóstico rápido que permitan obtener mejores resultados que los obtenidos en microscopía, para poder utilizar los RDT como método de referencia, ya que ofrecen numerosas ventajas y beneficios.

BIBLIOGRAFÍA

1. Paludismo. Organización Mundial de la Salud. 2017. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/es/>
2. World Health Organization (WHO). World Malaria Report, 2017
3. Capdevila J, Icart R. Profilaxis de la malaria en el viajero. *Revista Clínica Española*. 2010;210(2):77-83.
4. ¿Cuáles son los continentes con mayor presencia de malaria o paludismo? lamalaria.com. 2017. Available from: <http://lamalaria.com/consejos/continentes-presencia-malaria-paludismo>
5. Malaria. Centro Nacional de Medicina Tropical - Consejos generales sobre cómo viajar. Instituto de Salud Carlos III. 2017.
6. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria, 3rd edition, WHO, Ginebra, 2015. Available from: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241549127/en>
7. Paludismo: información para viajeros. Organización Mundial de la Salud. 2017. Available from: <http://www.who.int/malaria/travellers/es/>
8. Martín-Rabadán P, Martínez-Ruiz R, Cuadros J, Cañavate C. El laboratorio de microbiología ante las enfermedades parasitarias importadas. *Procedimientos en Microbiología Clínica SEIMC 2009*. Available from: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/>
9. Wilson M. Laboratory Diagnosis of Malaria: Conventional and Rapid Diagnostic Methods. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2013;137(6):805-811.
10. Torrús D, Carranza C, Manuel Ramos J, Carlos Rodríguez J, Rubio J, Subirats M et al. Diagnóstico microbiológico de la malaria importada. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2015;33:40-46.
11. Turrientes M.C., López-Vélez R. Aspectos prácticos del diagnóstico de laboratorio y profilaxis de la malaria. *Control Calidad SEIMC. Unidad de Medicina Tropical y Parasitología Clínica. Hospital Ramón y Cajal. Madrid*.
12. Uso de las pruebas en el diagnóstico rápido de la malaria. Organización Mundial de la Salud. Segunda Edición. 2006.
13. Una forma rápida, precisa de Diagnóstico de Malaria. Standard Diagnostics, INC. Available from: http://www.ctr.com.mx/pdf_ctr/2.pdf
14. Mouatcho J, Goldring J. Malaria rapid diagnostic tests: challenges and prospects. *Journal of Medical Microbiology*. 2013;62(Pt_10):1491-1505.
15. Fenómenos de citoadherencia asociados al paludismo falciparum. Becerra Aparicio F. M., Martínez Grueiro M. Trabajo de Fin de Grado. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. 2015.
16. Sullivan D, Gluzman I, Goldberg D. *Plasmodium* Hemozoin Formation Mediated by Histidine-Rich Proteins. *Science*. 1996;271(5246):219-222.
17. Chiodini P, Bowers K, Jorgensen P, Barnwell J, Grady K, Luchavez J et al. The heat stability of *Plasmodium* lactate dehydrogenase-based and histidine-rich protein 2-based malaria rapid diagnostic tests. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2007;101(4):331-337.
18. Mayxay M, Pukrittayakamee S, Newton P, White N. Mixed-species malaria infections in humans. *Trends in Parasitology*. 2004;20(5):233-240.
19. Hurdayal R, Achilonu I, Choveaux D, Coetzer T, Dean Goldring J. Anti-peptide antibodies differentiate between plasmodial lactate dehydrogenases. *Peptides*. 2010;31(4):525-532.
20. Piper R, Buchanan I, Choi Y, Makler M. Opportunities for improving pLDH-based malaria diagnostic tests. *Malaria Journal*. 2011;10(1):213
21. Cloonan N, Fischer K, Cheng Q, Saul A. Aldolase genes of *Plasmodium* species. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2001;113(2):327-330.

22. Maltha J, Gillet P, Jacobs J. Malaria rapid diagnostic tests in endemic settings. *Clinical Microbiology and Infection*. 2013;19(5):399-407.
23. Malaria Rapid Diagnostic Tests Market & Supply Update. UNICEF. 2016. Available from: https://www.unicef.org/supply/files/mRDTs_January2016.pdf
24. Baker J, Ho M, Pelecanos A, Gatton M, Chen N, Abdullah S et al. Global sequence variation in the histidine-rich proteins 2 and 3 of *Plasmodium falciparum*: implications for the performance of malaria rapid diagnostic tests. *Malaria Journal*. 2010;9(1):129.
25. Gamboa D, Ho M, Bendezu J, Torres K, Chiodini P, Barnwell J et al. A Large Proportion of *P. falciparum* Isolates in the Amazon Region of Peru Lack pfrp2 and pfrp3: Implications for Malaria Rapid Diagnostic Tests. *PLoS ONE*. 2010;5(1):e8091.
26. Houzé S, Hubert V, Le Pessec G, Le Bras J, Clain J. Combined Deletions of pfrp2 and pfrp3 Genes Result in *Plasmodium falciparum* Malaria False-Negative Rapid Diagnostic Test. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011;49(7):2694-2696.
27. Iqbal J., Sher A., Rab A. *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2-based immunocapture diagnostic assay for malaria: cross-reactivity with rheumatoid factors. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000;38(3): 1184–1186.
28. Mishra B., Samantaray J. C., Kumar A., Mirdha B. R. Study of false positivity of two rapid antigen detection tests for diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999;37(4): 1233.
29. Prieto L, Cortés M, Cabrillo E, González-González A. Malaria y embarazo. *Progresos de Obstetricia y Ginecología*. 2005;48(1):23-34.
30. Purizaca-Benitez M. Malaria Gestacional. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*. 2010;56: 193-201
31. Leke R. F. G., Djokam R. R., Mbu R., Leke R. J., Fogako J., Megnekou R., Metenou S., Sama G., Zhou Y. & other authors. Detection of the *Plasmodium falciparum* antigen histidine-rich protein 2 in blood of pregnant women: implications for diagnosing placental malaria. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999;37(9):2992–2996.
32. Kyabayinze D, Tibenderana J, Nassali M, Tumwine L, Riches C, Montague M et al. Placental *Plasmodium falciparum* malaria infection: Operational accuracy of HRP2 rapid diagnostic tests in a malaria endemic setting. *Malaria Journal*. 2011;10(1):306.
33. Aguilar R, Machevo S, Menéndez C, Bardají A, Nhabomba A, Alonso P et al. Comparison of placental blood microscopy and the ICT HRP2 rapid diagnostic test to detect placental malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2012;106(9):573-575.
34. Kyabayinze D, Zongo I, Cunningham J, Gatton M, Angutoko P, Ategeka J et al. HRP2 and pLDH-Based Rapid Diagnostic Tests, Expert Microscopy, and PCR for Detection of Malaria Infection during Pregnancy and at Delivery in Areas of Varied Transmission: A Prospective Cohort Study in Burkina Faso and Uganda. *PLOS ONE*. 2016;11(7):e0156954.
35. Diagnósis, nuevos métodos para detectar enfermedades como la malaria, el dengue o el Zika. EL ESPAÑOL. Available from: <http://reportajes.elespanol.com/diagnos/malaria-sepalo-cinco-minutos/>
36. Batwala V, Magnussen P, Hansen K, Nuwaha F. Cost-effectiveness of malaria microscopy and rapid diagnostic tests versus presumptive diagnosis: implications for malaria control in Uganda. *Malaria Journal*. 2011;10(1):372.
37. Jain P, Chakma B, Patra S, Goswami P. Potential Biomarkers and Their Applications for Rapid and Reliable Detection of Malaria. *BioMed Research International*. 2014;2014:1-20.
38. A. Rodríguez-Acosta, N. G. Domínguez, I. Aguilar, and M. E. Girón, "Characterization of *Plasmodium falciparum* glutamate dehydrogenase-soluble antigen," *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 31, pp. 1149–1155, 1998.
39. Y. Li, Y.-S. Ning, L. Li, D.-D. Peng, W.-Q. Dong, and M. Li, Preparation of a monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* glutamate dehydrogenase and establishment of colloidal gold-immunochromatographic assay, *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, vol. 25, no. 4, pp. 435–438, 2005.