



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO DE FIN DE GRADO  
INMUNODIAGNÓSTICO DE LA MALARIA**

Autor: Ana Barbadillo Ruiz

Tutor: Mercedes Martínez Grueiro

Convocatoria: junio 2019

## ÍNDICE

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| RESUMEN.....                     | 3  |
| ABSTRACT.....                    | 3  |
| INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES..... | 3  |
| OBJETIVOS.....                   | 7  |
| MATERIAL Y MÉTODOS.....          | 7  |
| DISCUSIÓN Y RESULTADOS.....      | 7  |
| CONCLUSIONES.....                | 19 |
| BIBLIOGRAFÍA.....                | 20 |

## RESUMEN

La malaria o paludismo es una enfermedad parasitaria que provoca la muerte de cientos de miles de personas al año en todo el mundo. Con el fin de evitar estos fatales desenlaces, es primordial llevar a cabo un diagnóstico seguro y acertado. Siendo la microscopía el patrón áureo del diagnóstico de la malaria, tiene ciertas limitaciones, por lo que actualmente su uso se combina con otras técnicas de inmunodiagnóstico. Entre estas últimas destacan los test de diagnóstico rápido (RDT) detectores de antígenos. Sin embargo, la sensibilidad y especificidad de las técnicas inmunodiagnósticas varía considerablemente de unos casos a otros, por lo que no puede ser empleada como valoración única. Por tanto, es necesario continuar con la investigación relativa al inmunodiagnóstico de la malaria para, en un futuro, conseguir convertir en método de referencia este conjunto de pruebas más rápidas, sencillas y baratas que la microscopía tradicional.

**Palabras clave:** malaria, *Plasmodium*, microscopía, inmunodiagnóstico, RDT, ELISA, IFI.

## ABSTRACT

Malaria is an infectious parasitic disease that causes hundreds of thousands of deaths each year worldwide. In order to avoid these fatal outcomes, making a safe and accurate diagnosis becomes a primordial matter. Although microscopy is still the gold standard method when it comes to diagnosis of malaria, it presents some limitations. As a consequence, nowadays a combination of microscopy and other immunodiagnostic techniques are the order of the day. Among the latter are rapid diagnostic tests (RDT), consisting of antigen detectors. However, the sensitivity and specificity of immunodiagnostic techniques vary considerably from one case to another, so it cannot be used as a single assessment. Hence, the continuation of research regarding immunodiagnosis of malaria is key in order to, someday, turn this set of faster, simpler and cheaper tests into the reference method.

**Key words:** malaria, *Plasmodium*, microscopy, immunodiagnosis, RDT, ELISA, IFI.

## INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El paludismo, o malaria, es una de las enfermedades parasitarias de mayor impacto e incidencia en el mundo debido a su elevada morbilidad y mortalidad. Se trata de una enfermedad causada por parásitos que se transmiten al ser humano por la picadura de mosquitos hembra del género *Anopheles* previamente infectados<sup>1</sup>. Dichos parásitos pertenecen a cinco especies del género *Plasmodium*: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium knowlesi* y *Plasmodium falciparum*; siendo esta última la responsable de la presentación clínica más grave y de mayor incidencia en casos de desenlace fatal<sup>2</sup>. Afecta particularmente a las áreas tropicales y subtropicales

en vías de desarrollo entre las que destacan África Subsahariana, Centro y Sudamérica y el Sudeste Asiático.

En 2017, se estima que se dieron 219 millones de casos de malaria en todo el mundo, en comparación con 217 millones de casos en 2016 y 239 millones de casos en 2010. Aunque hubo aproximadamente 20 millones menos de casos de malaria en 2017 que en 2010, los datos para el período 2015-2017 ponen de manifiesto que no se lograron avances significativos en la reducción de los casos de malaria en este período. La mayoría de los casos de malaria en 2017 fueron en la Región de África de la OMS (200 millones o 92%), seguidos por la Región de Asia Sudoriental de la OMS (5%) y la Región del Mediterráneo Oriental de la OMS (2%)<sup>3</sup>.

En cuanto a las muertes, en 2017 se han estimado 435 000 fallecimientos por malaria en todo el mundo, en comparación con 451 000 muertes estimadas en 2016 y 607 000 en 2010. Los niños menores de 5 años de África Subsahariana son el grupo más vulnerable afectado por la malaria y en 2017 representaron el 61% (266 000) de todas las muertes a nivel mundial<sup>3</sup>. También es un proceso potencialmente mortal en viajeros sin ningún grado de inmunidad, en pacientes con VIH y en mujeres gestantes<sup>4</sup>.

Además de estos efectos, la enfermedad trae consigo devastadoras consecuencias económicas. Se ha calculado que la financiación total de las medidas de control que persiguen la eliminación del paludismo alcanzó en 2016 una cifra 2700 millones de dólares. La contribución de los gobiernos de los países endémicos ascendió a 800 millones de dólares, que representan el 31% de los fondos<sup>3</sup>.

Por todo esto, la malaria continúa siendo un grave problema de salud pública mundial; se ha convertido en una de las causas pendientes más urgentes para los Organismos Internacionales, que continúan implicados en tratar de conseguir su erradicación.

El hombre adquiere la infección cuando la hembra del mosquito le produce la picadura y le inyecta esporozoítos, las formas infectivas del parásito, que se encuentran en sus glándulas salivales. Éstas van a parar a la corriente sanguínea y viajan hasta los hepatocitos en los que tiene lugar una primera reproducción asexual (esquizogonia hepática), formándose un número variable de merozoítos que son liberados a sangre tras la ruptura de las células hepáticas. Estos merozoítos invaden los glóbulos rojos, se transforman en trofozoítos y vuelven a multiplicarse asexualmente (esquizogonia intraeritrocitaria), dando lugar a nuevos merozoítos que, tras la ruptura de los eritrocitos, invaden nuevos glóbulos rojos. *P. ovale* y *P. vivax* parasitan sólo los hematíes más jóvenes, *P. malariae* los glóbulos rojos maduros y *P. falciparum* tiene capacidad de parasitar todos los glóbulos rojos<sup>4</sup>. Tras varias esquizogonias intraeritrocíticas algunos trofozoítos inmaduros se transforman en gametocitos, formas sexuadas infectantes para el vector tras otra picadura. En el mosquito tiene lugar la reproducción sexual del parásito y un proceso de reproducción asexual (esporozoitogénesis) que origina los esporozoítos, las formas infectantes para el hombre, que se localizarán en las glándulas salivales del insecto.

La fase inicial de la infección (esquizogonia hepática) no produce síntoma alguno; las manifestaciones clínicas se deben solo a las sucesivas esquizogonias intraeritrocíticas. En función de la especie, la duración de las esquizogonias es de unas 24h (*P. knowlesi*), 48 h (*P.falciparum*, *P. vivax* y *P.ovale*) ó 72h (*P.malariae*), lo cual determina la

periodicidad de los paroxismos febriles, característicos de la malaria, que se desencadenan cuando éstas concluyen.

Las manifestaciones clínicas dependen del parásito y del hospedador. *P. falciparum* destaca por su capacidad de inducir fenómenos de citoadherencia entre los eritrocitos que invade y otras células sanguíneas o del endotelio vascular, lo que dará lugar a una clínica grave que la convierte en la especie más peligrosa.

En cuanto al hospedador, el grado de semi-inmunidad, innata o adquirida, que éste pueda presentar influye en las manifestaciones del paludismo<sup>4</sup>. La resistencia o semi-inmunidad adquirida aparece gradualmente a partir de los 4-5 años de vida en personas de áreas endémicas que hayan sufrido y sobrevivido a infecciones reiteradas y se caracteriza por parasitemias bajas y pacientes asintomáticos o con síntomas leves. Sin embargo, ésta desaparece rápidamente cuando abandonan el área endémica durante más de seis meses. La resistencia o semi-inmunidad innata es debida a una serie de factores genéticos protectores y no se ve atenuada.

La malaria esta convenientemente separada en dos presentaciones de la enfermedad: la no complicada y la grave<sup>5</sup>. Los síntomas de la malaria no complicada no son muy específicos y pueden incluir picos de fiebre, temblores, malestar general, tos, diarrea, trombocitopenia, anemia y esplenomegalia.

Por otro lado, entre las manifestaciones clínicas de la malaria grave, ocasionada mayoritariamente por *P.falciparum*, destacan el daño renal, síndrome de dificultad respiratoria aguda, acidosis metabólica, anemia grave y la denominada malaria cerebral<sup>5</sup>.

La malaria cerebral tiene lugar debido a que, como consecuencia de las modificaciones inducidas por el parásito en la membrana del glóbulo rojo, aquellos eritrocitos que contienen trofozoítos maduros y esquizontes pueden quedar retenidos en la microvasculatura cerebral. Este proceso se desencadena por los fenómenos de citoadherencia previamente mencionados, como la unión del eritrocito infectado al endotelio de los vasos sanguíneos (secuestro), la adhesión a glóbulos rojos no infectados (formación de rosetas) y la adhesión a plaquetas (aglutinación). El diagnóstico de esta encefalopatía es signo de mal pronóstico y requiere una actuación médica inmediata<sup>5</sup>.

Para tratar de disminuir la incidencia del paludismo cobran especial importancia las medidas preventivas, en cuya primera línea destacan los mosquiteros, tratados con insecticidas de larga duración, para dormir para evitar las picaduras y el uso de ropa de protección y repelentes contra los insectos<sup>6</sup>.

Además, los viajeros internacionales deben hacer uso de la quimioprofilaxis si el riesgo a infectarse es elevado en el país al que viajan. No es 100% eficaz, pero junto con el resto de medidas preventivas las posibilidades de infectarse son mínimas<sup>7</sup>. La quimioprofilaxis se hace cada vez más compleja debido al aumento de la resistencia de *P. falciparum* a los antimaláricos. La mefloquina, cloroquina y proguanil no proporcionan la debida eficacia y seguridad frente a esta especie, por lo que ha sido necesario el desarrollo de nuevos fármacos para prevenir y combatir la enfermedad<sup>8</sup>.

En la actualidad, se cuenta con una combinación de dos antimaláricos, la atovacuona y el hidroclicloruro de proguanilo, que resulta muy eficaz para la prevención de la malaria, incluida la causada por *P.falciparum*. La profilaxis debe iniciarse uno o dos días antes de dirigirse a una zona donde la malaria sea endémica, debe mantenerse la

administración diaria mientras el paciente esté expuesto y siete días después de abandonar la zona endémica<sup>8</sup>. Al margen de esta combinación, cualquier medicamento utilizado como quimioprofilaxis antimalárica debe administrarse antes, durante y después del viaje sin olvidar ninguna dosis para asegurar su efectividad.

Para proteger a las mujeres gestantes en áreas de alta y moderada transmisión de malaria en África, la OMS recomienda "tratamiento preventivo intermitente en el embarazo" (TPI) con sulfadoxina-pirimetamina. En cuanto a los niños, 15 millones fueron protegidos en 2016 mediante programas de quimio-prevención estacional del paludismo (QEP)<sup>3</sup>.

Una vez instaurada la sospecha de infección por malaria es imprescindible llevar a cabo un diagnóstico rápido, certero y fiable. De esta manera, se puede encontrar el mejor tratamiento y administrarlo cuanto antes para evitar el agravamiento de la sintomatología del paciente. Desde el inicio del siglo pasado hasta nuestros días, el estándar de oro para el diagnóstico parasitológico de la malaria consiste en buscar el parásito en sangre utilizando las técnicas de la gota gruesa, más sensible, y el frotis fino<sup>9</sup>.

El examen microscópico de la gota gruesa, que requiere microscopistas expertos y un estricto control de calidad, permite detectar densidades de hasta 5-20 parásitos/ $\mu$ l (0,0001%), determinar qué formas parasitarias se encuentran en sangre (trofozoítos, esquizontes, gametocitos) y la respuesta al tratamiento. La identificación de la especie infectante es difícil en la gota gruesa, por lo que se debe realizar la extensión sanguínea<sup>10</sup>.

La técnica del frotis o extensión fina es treinta veces menos sensible que la gota gruesa y no debe considerarse como prueba única en el diagnóstico de la malaria. Sin embargo, es más específica que la gota gruesa, ya que permite identificar con más facilidad la especie infectante y las parasitemias mixtas<sup>10</sup>.

Entre las tinciones más empleadas de encuentra la de Giemsa, que permite observar las granulaciones de Schüffner, muy relevantes para la distinción de especies. También destaca la de Field, aunque con ella no es tan fácil apreciar las granulaciones. Otras coloraciones son las de naranja de acridina o la de Leishman.

A pesar de esto, en algunas zonas de riesgo no siempre se dispone de electricidad, material o personal cualificado que pueda llevar a cabo la microscopía. En estos casos se puede recurrir a un test de diagnóstico rápido (RDT) como prueba inicial de cribado. No obstante, no es recomendable sustituir la microscopía por el RDT.

Los denominados RDT son métodos de bajo costo basados en la inmunocromatografía que detectan antígenos del *Plasmodium* en sangre periférica en aproximadamente 15-20 minutos. Los RDTs han mostrado una sensibilidad y especificidad de aproximadamente 77% a 100% y 83% a 100%, respectivamente<sup>2</sup>.

Otro tipo de diagnóstico inmunológico son las técnicas detectoras de anticuerpos anti *P. falciparum*. Las más relevantes son la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el enzimoimmunoensayo (ELISA). Sin embargo, su sensibilidad es mucho menor y es una técnica diagnóstica de segunda línea debido a las continuas reinfecciones que se producen en áreas endémicas.

Por último, la detección por medio de PCR tiene la mayor especificidad y sensibilidad para el diagnóstico de malaria. El método consiste en la amplificación de segmentos conocidos y específicos de ADN de cada *Plasmodium*, dependiendo de los *primers* utilizados. El método de PCR en tiempo real es rápido (<2 horas) pero es mucho más costoso y complejo de hacer que una gota gruesa<sup>2</sup>. Podría ser la técnica de referencia por su altísima sensibilidad y especificidad, pero, aparte de no estar comercializada, no está al alcance de todos los laboratorios y no se adapta al diagnóstico de urgencia individualizado<sup>11</sup>. Esta es la única técnica que permite discernir y confirmar la parasitemia por *P.knowlesi*.

## **OBJETIVOS**

El objetivo de este trabajo es profundizar en las técnicas de diagnóstico inmunológico de la malaria, centrando el foco, por tanto, en las pruebas detectoras de antígenos basadas en la inmunocromatografía o test de diagnóstico rápido (RDT) y en las pruebas detectoras de anticuerpos mediante enzimoensayos (ELISA) o inmunofluorescencia indirecta (IFI). Así, se procede a explicar el funcionamiento de estas técnicas, sus características de sensibilidad, especificidad y consecuente fiabilidad y su relevancia en el ámbito diagnóstico. Como base del trabajo se quiere transmitir la necesidad y la trascendencia de llevar a cabo un diagnóstico rápido, seguro y certero para evitar a toda costa nuevos fallecimientos.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Para la elaboración este trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica de artículos científicos obtenidos a través de bases de datos electrónicas como PubMed, ScienceDirect, IME y Google académico. Además, se han consultado publicaciones de páginas web de Organismos Internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y de Organismos Oficiales como el Centers for Disease Control and Prevention (CDC).

La búsqueda se limitó a los años 1999-2019 y emplearon publicaciones de acceso libre o accesibles para el personal de la UCM. Por último, se excluyeron aquellas fuentes que no estuvieran escritas en inglés, francés o español.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Pruebas de inmunodiagnóstico directo: RDT**

Las pruebas de inmunodiagnóstico directo detectan directamente la presencia del parásito mediante la captura de antígenos de este durante la infección.

Los test de diagnóstico rápido detectan, mediante inmunocromatografía, antígenos específicos de *Plasmodium* en la sangre de personas infectadas. Para ello se hace uso de una tira de nitrocelulosa reactiva que contiene bandas de anticuerpos monoclonales específicos<sup>12</sup>. La presencia de antígenos en sangre da lugar a un cambio de coloración en las bandas, indicando así un resultado positivo de la prueba.

La tira reactiva se encuentra en el interior de una carcasa de plástico que contiene tres ventanas. La primera se emplea para añadir la solución tamponada, la segunda para

añadir la gota de sangre, que será arrastrada a lo largo de la tira de nitrocelulosa gracias al tampón y la tercera para observar los resultados de la prueba, apareciendo o no coloración en la banda de la muestra.

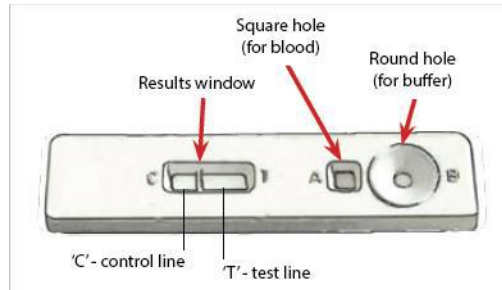


Figura 1: RDT cassette. How malaria RDTs work. World Health Organization WHO. 2018

La tira reactiva contiene una serie de anticuerpos monoclonales. En el extremo inicial de la misma se encuentran anticuerpos libres marcados, que se unirán específicamente a los antígenos que se tratan de identificar, dando lugar a complejos antígeno-anticuerpo marcado. En la ventana de resultados existen dos bandas: una banda control y la banda de la muestra. En la banda control se hallan fijados anticuerpos específicos, bien frente al anticuerpo libre marcado o bien frente al complejo antígeno-anticuerpo marcado; mientras que en la banda de la muestra se disponen, también fijados, anticuerpos específicos únicamente frente al complejo antígeno-anticuerpo marcado.

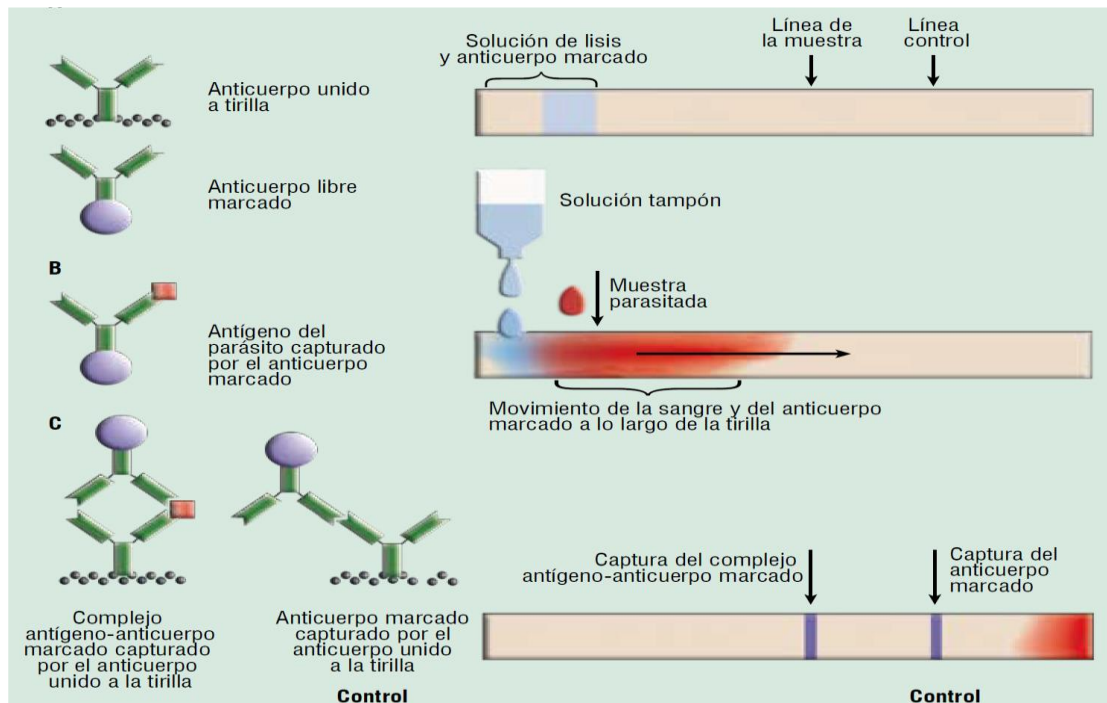


Figura 2: Fundamento de la inmunocromatografía. Campuzano-Zuluaga G, Blair-Trujillo S. Malaria: consideraciones sobre su diagnóstico. Medicina & Laboratorio 2010; 16: 311-354.



El test comienza cuando se dispone la gota de sangre y posteriormente la solución amortiguadora en el dispositivo. El movimiento de la solución tampón por la superficie de nitrocelulosa por efecto de capilaridad, transporta el complejo antígeno-anticuerpo marcado a través de la tira reactiva<sup>2</sup>. Al llegar a las bandas, el complejo podrá ser capturado por los anticuerpos específicos presentes en ambas mostrando un cambio de color.

La banda control captura, además, los anticuerpos marcados que han quedado libres. De esta manera, siempre debe presentar coloración al finalizar la prueba, aun no habiendo antígenos de *Plasmodium* en sangre. Si esta banda no revela un cambio de color, esto es indicativo de error y la prueba no puede considerarse válida.

La banda de la muestra, por tanto, solo indica un resultado positivo si existen en la sangre los antígenos blanco que se procuran hallar, produciendo una línea coloreada visible.

A pesar de ser técnicas sencillas, baratas y rápidas, las pruebas de inmunodiagnóstico no se utilizan como único método diagnóstico debido a una alta incidencia de falsos negativos, sobre todo en malaria no-falciparum.

Además, estos métodos son pobres en la información que proveen sobre gravedad y pronóstico; algunos no diferencian la especie de *Plasmodium* infectante y al ser técnicas no cuantitativas, el grado de parasitemia continúa siendo una incógnita, por lo que prácticamente no se obtiene información relativa a la gravedad de la infección. Poseen también una baja capacidad de discriminar parásitos viables de aquellos no viables, lo que limita su uso para el seguimiento de los pacientes que han recibido tratamiento o para el diagnóstico de pacientes que han tomado medicación<sup>2</sup>. Por todo ello, los RDT son empleados únicamente como prueba inicial de cribado, lo cual es ratificado posteriormente mediante microscopía.

La sensibilidad aportada por los RDT de la malaria depende de diversos factores, como son la especie del parásito, el grado de parasitemia, el estado del dispositivo, la correcta ejecución de la prueba e interpretación de los resultados obtenidos, la viabilidad de los parásitos o la variación en la estructura y expresión del antígeno<sup>12</sup>.

En óptimas condiciones, algunos test pueden alcanzar una sensibilidad similar a la que se obtiene habitualmente con la microscopía (~100 parásitos/ $\mu$ l). La sensibilidad puede diferir de un producto a otro, pero se recomienda unas cifras de  $\geq 95\%$  con  $\geq 100$  parásitos/ $\mu$ l en el caso de *P. falciparum*<sup>12</sup>.

Existen 3 principales dianas de los RDT: la proteína rica en histidina 2 de *P. falciparum* (PfHRP-2) y dos enzimas de la vía glucolítica del parásito, la lactato deshidrogenasa (pLDH) y la aldolasa.

### ***PfHRP-2***

La mayoría de estas pruebas de diagnóstico rápido detectan la PfHRP-2, del inglés *Histidine Rich Protein* de *P. falciparum*. Se trata de una proteína cuya composición es un 35% de histidina, 40% de alanina y 12% de aspartato, aunque estas cifras pueden variar ligeramente. Presenta alto grado de estabilidad y se ha comprobado que existe una correlación positiva entre su concentración en sangre y la biomasa del parásito. Se han identificado tres proteínas ricas en histidina, siendo las más relevantes para el ámbito diagnóstico la PfHRP-2 y PfHRP-3. La primera de ellas está presente en todos los glóbulos rojos infectados, mientras que la segunda tiene en su secuencia regiones

repetidas ricas en histidina que son reconocidas por los anticuerpos monoclonales de los RDT destinados a detectar PfHRP-2<sup>13</sup>, por lo que también son útiles con ese fin.

La PfHRP-2 se encuentra en la vacuola digestiva o en el citoplasma del parásito y cumple una función clave en el metabolismo de *P. falciparum*. Esta proteína facilita activamente la polimerización del grupo hemo tóxico, resultante de la degradación de la hemoglobina del hospedador, para formar un pigmento de la malaria, la hemozoína, que ya no es tóxica<sup>14</sup>.

Cabe destacar, además, que PfHRP-2 se expresa en gametocitos y todos los estadios eritrocíticos de *P. falciparum*<sup>15</sup>. La proteína se libera tras la ruptura de los esquizontes y, por lo tanto, se encuentra en la sangre de los individuos infectados por estos parásitos. De esta manera, aun cuando las formas secuestradas de *P.falciparum* no puedan hallarse por microscopía, sí podrá detectarse en sangre la presencia de PfHRP2 y con ello se contribuirá a establecer un diagnóstico positivo.

Sin embargo, los dispositivos de inmunocromatografía que detectan la PfHRP-2 presentan una serie de limitaciones. En primer lugar, no son capaces de determinar infecciones por otras especies de *Plasmodium*, lo cual limita las posibilidades de diagnóstico. En segundo lugar, los RDT que detectan PfHRP-2 no son útiles para hacer un seguimiento del tratamiento antimalárico. Esto es debido a la persistencia del antígeno en la circulación sanguínea periférica aun después de la eliminación del parásito, pudiendo dar lugar a falsos positivos<sup>16</sup>.

Otro problema más llamativo es el hecho de que existen, a lo largo de todo el planeta, cepas de *P. falciparum* que expresan variaciones genéticas en la secuencia de aminoácidos de la proteína. A partir del año 2000, diversas investigaciones revelaron diferencias significativas en las secuencias de PfHRP-2 y PfHRP-3.

Un estudio en concreto buscó variaciones genéticas en la proteína rica en histidina en 75 aislamientos de *P. falciparum* de 19 países. Cuando se tradujo en secuencias de aminoácidos, PfHRP2 consistió en números variables de repeticiones de 9, 6 y 3 aminoácidos. Se identificaron un total de 14 repeticiones de aminoácidos diferentes a partir de las secuencias de PfHRP-2. La composición, el número y el orden de los tipos de repetición en PfHRP2 diferían entre los parásitos individuales.

Se detectaron 56 secuencias únicas de PfHRP2; 43 se vieron solo una vez, mientras que las 13 secuencias restantes se vieron en más de un parásito aislado. Nueve de estas 13 secuencias compartidas fueron compartidas por aislamientos del mismo país, mientras que 4 fueron compartidas por aislamientos de diferentes países.

Todas las distintas secuencias de PfHRP2 comenzaron con la repetición de tipo 1 (AHHAHHVAD) y terminaron con la repetición de tipo 12 (AHHAAAHHEAATH).

Un motivo de repetición relativamente conservado de los tipos 7, 8, 2 y 7 descritos en este estudio estaba presente en la región central de la secuencia en el 87,8% (65/74) de los aislamientos secuenciados. De los 9 aislamientos que no tenían este motivo, 7 (9,5%) carecían solo de la primera o última repetición de tipo 7<sup>17</sup>.

Otro reciente estudio con los mismos objetivos se llevó a cabo en Kenia empleando 244 aislamientos. La diversidad de PfHRP2 y PfHRP3 se describió en función de la frecuencia, la aparición y la organización de los tipos de repeticiones de aminoácidos en las proteínas ricas en histidina. En esta investigación se observó un patrón de distribución único de repeticiones de aminoácidos tanto en PfHRP-2 como en PfHRP3.

Se identificaron 228 y 124 diferentes secuencias de aminoácidos de PfHRP-2 y 3, respectivamente. De estas, 214 (94%) secuencias de PfHRP-2 y 81 (65%) de PfHRP-3 estaban presentes solo una vez. Se identificaron treinta y nueve nuevos PfHRP2 y 20 nuevos tipos de repeticiones de aminoácidos de PfHRP-3. Además, se comprobó que estructuralmente PfHRP-3 poseía menor grado de variabilidad genética que PfHRP-2<sup>18</sup>.

Por tanto, la existencia de variabilidad genética en las proteínas ricas en histidina puede dar lugar a falsos negativos en los resultados del diagnóstico con PfHRP-2 RDT.

Se han encontrado, también, casos aislados de poblaciones de parásitos que incluso no producen esta proteína o no lo hacen en concentraciones detectables, imposibilitando el diagnóstico. Este descubrimiento fue el resultado de un estudio en la selva amazónica de Perú, que reveló la ausencia de los genes *PfHRP-2* y 3 en los parásitos de esa zona geográfica concreta<sup>19</sup>. Otro ejemplo de ello surgió tras otro estudio una región de la India, que también detectó la ausencia de dicha proteína en los parásitos<sup>20</sup>.

Uno de los artículos más recientes acerca de este hecho trata una investigación llevada a cabo en Honduras, Nicaragua y Guatemala con un total de 158 muestras de sangre infectada por *P. falciparum*<sup>21</sup>.

El 25,8% de los aislamientos no presentaban la región de codificación parcial entre el exón 1 y 2 (intrón 1) de *PfHRP-2* y el 91,4% de los aislamientos carecía de la región homóloga de *PfHRP-3*. Los parásitos de los tres países mostraron deleciones de una o ambas regiones genéticas que codifican para estas proteínas.

La mayor proporción de deleciones del exón 1-2 en *PfHRP-2* se encontró en Nicaragua (30.9%), mientras que los aislamientos de Guatemala revelaron el número más bajo de deleciones (14.3%). Los parásitos recolectados en Honduras mostraron la mayor proporción de la eliminación del exón 1-2 en *PfHRP-3* (96.2%). Un resultado relevante fue el hallazgo de 27 (21%) aislamientos doble negativos (PfHRP-2 negativo y PfHRP-3 negativo). La mayoría de los parásitos doble negativos se detectaron en Honduras 13/52 (25%), seguidos de Nicaragua 11/55 (20%) y Guatemala 3/21 (14.3%)<sup>21</sup>.

Estos resultados indican la necesidad de emplear microscopía o RDT que detecten antígenos distintos.

Además, se ha determinado que la sensibilidad de los PfHRP-2 RDT se ve influenciada por la presencia o no de factor reumatoide, ya que parecen originar una reacción cruzada<sup>2</sup>. Existen estudios que han probado cómo pacientes con factor reumatoide pero no enfermos de malaria daban positivo en estos RDT. Sin embargo, cuando el factor reumatoide era absorbido y se repetía la prueba, el resultado era negativo<sup>22</sup>. Algunos autores sugieren que este hecho está relacionado con el tipo de anticuerpo utilizado en la RDT. De esta manera, existe reacción cruzada y falso positivo si se emplea IgG, pero esto no ocurre si se emplea IgM, que no se une al factor reumatoide<sup>23</sup>.

Por último, es relevante comentar la relación entre la detección de Pf-HRP-2 y el efecto prozona. El efecto prozona consiste en la obtención de falsos negativos en pruebas inmunológicas, debido a un exceso de antígenos o anticuerpos. En el caso de los RDT detectores de PfHRP-2, estudios han confirmado que unas parasitemias elevadas de *P.falciparum* pueden causar el mencionado efecto dando lugar a falsos negativos<sup>24</sup>.

A pesar de estos inconvenientes, 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 África<sup>25</sup>. Además, los métodos basados en detección de HRP-2 tienen una sensibilidad entre 77% y 100%, y una especificidad entre 83% y 93% con parasitemias >100 parásitos/ $\mu$ L, por lo que en muchos casos es un método comparable a la microscopía para diagnosticar malaria por *P. falciparum*<sup>2</sup>.

Otros datos obtenidos acerca de la calidad diagnóstica de los PfHRP-2 RDT son los presentados en un estudio hecho en Nigeria. En él, se compararon los resultados del RDT detector de PfHRP-2 con los resultados de microscopía llevada a cabo por expertos. Las muestras de sangre empleadas para el estudio pertenecían a 295 niños con síntomas febriles, menores de 5 años. De entre todas las muestras de sangre, el 11.9% (35/295) dio positivo con RDT en comparación con el 10.5% (31/295) por microscopía. Las cifras de sensibilidad y especificidad, fueron del 100% y 98,5%, respectivamente. La sensibilidad a la RDT no se vio afectada por la temporada de transmisión, la densidad del parásito en sangre (parasitemia) y la edad. La especificidad disminuyó ligeramente durante la temporada de alta transmisión (97.5%). En general, el rendimiento de esta prueba RDT se consideró altamente satisfactorio<sup>26</sup>.

Gracias a esto, se puede emplear como técnica única en aquellos países endémicos con menos recursos económicos, ya que en ellos predominan las infecciones por *P.falciparum*. Así, aunque no se disponga ni del material necesario ni del personal experto requerido para la microscopía, los RDT pueden servir para confirmar aquellos casos con previa sospecha clínica e iniciar el tratamiento antimalárico cuanto antes.

Por último, es relevante mencionar que la estimación cuantitativa de PfHRP-2 puede ser de interés como indicador de parasitemia. Dos importantes estudios se han desarrollado con relación a esta hipótesis. Cantidades variables de eritrocitos infectados que contienen trofozoítos maduros y esquizontes quedan atrapados en la microcirculación cerebral y, por el momento, no ha sido posible medir estas cantidades in vivo. Por tanto, las formas maduras de *P.falciparum* en los glóbulos rojos pueden estar subrepresentados en muestras de sangre de pacientes con paludismo falciparum. Como todos los parásitos excretan PfHRP-2, se ha cuantificado la producción y la liberación de esta proteína en las distintas etapas del ciclo vital de *Plasmodium*. De esta manera, se puede tratar de predecir la biomasa secuestrada, así como el grado de parasitemia de cada individuo.

En la primera de las investigaciones se estudiaron cuatro aislamientos de *P.falciparum* procedentes del Sudeste Asiático. En ellos, el contenido medio de PfHRP2 (rango) fue de 2.0 fg (0.5-4.3 fg) para un eritrocito infectado en etapa de anillo joven y 5.4 fg (2.1-10.2 fg) para la etapa de esquizontes. La cantidad de PfHRP2 en los eritrocitos parasitados aumentó más durante el desarrollo hasta la etapa de trofozoíto maduro. La cantidad mediana (rango) de PfHRP2 secretada por parásito por cada ciclo eritrocítico completo fue de 5.2 fg (1.1-13.0 fg). Una mediana del 89% del total de PfHRP2 se excreta en el momento de la ruptura de los esquizontes.

Por tanto, esta evaluación de la liberación de PfHRP2 dependiente de la etapa puede ser un requisito previo esencial para futuros estudios destinados a estimar la masa total de parásitos del paciente a partir de la concentración de PfHRP2 en sangre<sup>27</sup>.

El segundo estudio tuvo un tamaño de muestra mayor: 337 pacientes adultos con malaria falciparum en distintos estadios de gravedad de un hospital de Tailandia. En él se midieron las concentraciones plasmáticas de PfHRP-2, utilizando un ensayo inmunoabsorbente (ELISA directo) cuantitativo para la captura de antígeno. El mecanismo de estos kits está basado en anticuerpos monoclonales específicos para *P. falciparum* y detectan el antígeno PfHRP-2 producido por el parásito.

Las estimaciones de la carga total de parásitos derivada de las concentraciones plasmáticas de PfHRP-2 estuvieron dentro del rango esperado y se correlacionaron bien con la gravedad de la enfermedad.

El estudio demostró que el número calculado de parásitos secuestrados aumentó con la gravedad de la enfermedad y fue mayor en pacientes con estadios de desarrollo tardíos de *P. falciparum* presentes en frotis de sangre. Por otro lado, en pacientes con malaria no complicada, las etapas circulantes estaban representadas en exceso, lo que sugiere que la esquizogonia y la reacción del hospedador a la misma probablemente precipiten el ingreso hospitalario. Esto también es apoyado por el predominio de parásitos de la etapa de anillo joven que se observa comúnmente en los frotis de sangre de hospital de admisión.

Al igual que en el caso anterior, los investigadores afirman que cuantificar las concentraciones de PfHRP-2 puede ser útil como una herramienta de investigación para estratificar a los pacientes por su carga parasitaria<sup>28</sup>.

### **pLDH**

El segundo prototipo importante de prueba de detección rápida se basa en la detección de la enzima lactato deshidrogenasa de *Plasmodium* (pLDH). La LDH es esencial en la producción de energía, ya que es la última enzima en la vía glucolítica del parásito. Debido a que ni en el plasmodio ni en el glóbulo rojo existe un ciclo del ácido cítrico completo que aporte ATP mitocondrial, el metabolismo anaeróbico de la glucosa en el que interviene la LDH es crucial para obtener energía<sup>29</sup>. Esta enzima es soluble y se produce tanto en la etapa sexual como en la asexual de los parásitos, incluidos los gametocitos maduros de las cinco especies humanas de *Plasmodium*<sup>13</sup>.

Todas las secuencias de LDH malárica comparten epítomos comunes, por lo que el empleo de RDT que detecten pLDH, utilizando anticuerpos monoclonales específicos para estos epítomos, son capaces de detectar todas las especies de *Plasmodium* que afectan al ser humano<sup>30</sup>. Esto representa un avance respecto a los RDT que manifestaban la presencia de PfHRP-2 ya que, de esta manera, el espectro diagnóstico es mucho más amplio y disminuyen los falsos negativos por malaria no-falciparum. Además, estos RDT también pueden detectar infecciones mixtas en sangre circulante, siendo la más común la producida entre *P.falciparum* y *P.vivax*.

Es relevante destacar que 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 monoclonales frente al epítomo específico de cada especie<sup>31</sup>. Así se crean RDT específicas para diferenciar las enzimas de ambas especies, PfLDH y PvLDH, respectivamente. También existen muchos RDT que combinan la detección de la LDH presente en todos los plasmodios con la PfHRP-2 o la aldolasa.

Como principal inconveniente, los tests de diagnóstico rápido detectores de pLDH parecen funcionar peor cuando el grado de parasitemia es bajo. Diversos estudios han demostrado una correlación positiva entre los niveles de pLDH y la parasitemia, lo cual

afecta directamente a la calidad de la prueba<sup>13</sup>. Un ejemplo de ello es la comparación que se llevó a cabo en Mozambique entre los resultados que ofrecían dos tipos de RDT: una detectora de pLDH y otra de PfHRP-2. La primera de ellas mostraba una especificidad del 88,3% y una sensibilidad del 88%; sin embargo, la sensibilidad disminuía al 45,7% cuando se detectaban menos de 1000 parásitos/ $\mu$ l. En cambio, la RDT asociada a PfHRP-2 obtuvo una especificidad del 94% y una sensibilidad del 70,9%, pero solo caía al 69,9% cuando disminuía al mismo nivel el grado de parasitemia<sup>32</sup>.

Por otro lado, los RDT detectores de pLDH presentan numerosas ventajas. Al contrario que los que detectan PfHRP-2, la enzima lactato deshidrogenasa no persiste en la sangre una vez los parásitos han sido eliminados<sup>28</sup>. Esto puede ser de utilidad clínica para el seguimiento de pacientes en tratamiento antimalárico o que ya lo hayan finalizado. De esta manera, como su detección es proporcional a la parasitemia, realizar estos RDT ayuda a monitorizar las respuestas del parásito al tratamiento y a predecir fallos en el mismo<sup>33</sup>.

Además, en contraposición a los PfHRP-2 RDT, la secuencia aminoacídica de la enzima pLDH no sufre variaciones<sup>34</sup> y siempre está presente, lo cual hace que estos RDT no resulten en falsos negativos. Comparándolo de nuevo con los PfHRP-2 RDT, encontramos que en los tests detectores de lactato deshidrogenasa no tiene lugar el efecto prozona y, por tanto, tampoco se obtienen falsos negativos por esta vía<sup>24</sup>.

En cambio, los falsos positivos sí pueden aumentar, ya que la pLDH es expresada también por los gametocitos maduros, que no causan enfermedad. Los antimaláricos no siempre consiguen la eliminación de estos gametocitos, por lo que podrían obtenerse resultados de falso positivo en caso de que estuvieran presentes en la sangre.

### ***Aldolasa***

El tercer y último prototipo de prueba de diagnóstico rápido es el que detecta la enzima aldolasa. Se trata de una enzima glucolítica que se encuentra en numerosos tejidos en el hospedador y en el parásito de la malaria, donde cataliza la formación de fosfato de dihidroxiacetona y fosfato de gliceraldehído-3 a partir de la fructosa 1,6-bisfosfato<sup>13</sup>. La aldolasa de *P.falciparum* comparte un 61–68% de su secuencia con las aldolasas eucariotas y las secuencias de aminoácidos de las distintas especies de *Plasmodium* han demostrado estar bien conservadas<sup>35</sup>.

Existen pocas investigaciones acerca de RDT que detecten únicamente aldolasa y cuyos resultados sean posteriormente comparados con las pruebas basadas en hallar PfHRP2 y pLDH. En su lugar, los RDT que detectan aldolasa suelen ser tests combinados que presentan a la vez anticuerpos anti-aldolasa y anti-Pf-HRP-2 o pLDH. Se liberan bajas concentraciones de aldolasa del parásito y, por lo tanto, es probable que el nivel de sensibilidad de las RDT basados en aldolasa dependa, como ocurría con los pasados en pLDH, del grado de parasitemia<sup>13</sup>.

El RDT que detecta de manera conjunta PfHRP-2 y aldolasa ha sido utilizado para tratar de diagnosticar malaria falciparum y no-falciparum, pero no ha obtenido buenos resultados en el segundo de los casos<sup>13</sup>. Ejemplo de ello es un estudio con personas que habían viajado a áreas endémicas que consiguió una sensibilidad del 100% y 48,1% para PfHRP-2 y aldolasa, respectivamente, al identificar *P.falciparum*. Además, se observó que la sensibilidad para la aldolasa de *P.falciparum* aumentaba hasta un 80% si

la parasitemia era elevada (40.000 parásitos/ $\mu$ l), lo que parece confirmar la hipótesis antes mencionada. Sin embargo, a la hora de detectar la aldolasa de *P.vivax*, la sensibilidad era de 37,5% y para *P.ovale* o *P.malariae*, la aldolasa ni siquiera pudo detectarse<sup>36</sup>.

Otro estudio algo más esperanzador que empleaba un RDT basado en aldolasa y PfHRP-2 fue llevado a cabo en Etiopía. En él, se reveló una sensibilidad del 85% y una especificidad del 92% para *P.falciparum* y *P.vivax*, respectivamente. Una vez más, se puso de manifiesto como la sensibilidad a la aldolasa de *P.vivax* caía a un 66,7% si las parasitemias eran inferiores a 500 plasmodios/ $\mu$ l<sup>37</sup>.

Si bien los RDT basados en aldolasa no parecen haber tenido el mejor resultado en los estudios mencionados anteriormente, la aldolasa sigue siendo un antígeno que merece la pena considerar y que se debe seguir investigando como diana diagnóstica<sup>13</sup>.

| Characteristic   | HRP2                      | pLDH   | Aldolase                               |
|--|---------------------------|--|--|
| Species detected   | <i>P. falciparum</i> only | <i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i> , <i>P. ovale</i> ,<br><i>P. malariae</i> | <i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i> |
| Persistence after parasite clearance (days)                              | >28                       | <10  | <10                                    |
| Genetic variation  | Yes                       | None to date   | None to date*                          |
| Repeat epitopes  | Yes                       | None   | None                                   |
| Sensitivity for <i>P. falciparum</i> (%)                                 | 95†                       | 93.2†  | 48–80‡                                 |
| Sensitivity for <i>P. vivax</i> 2000 parasites $\mu$ l <sup>-1</sup> (%) | Not present               | 78.9–98.8‡   | 15–83‡                                 |
| Specificity (%)  | 95.2§                     | 98.5§  |  |
| Monitor parasite clearance   | No                        | Yes  | Potential                              |
| Monitor drug efficacy  | No                        | Yes  | Potential                              |
| Prozone effect   | Yes                       | No   | No                                     |
| Predict progression to severe malaria#                                   | Potential                 | Not tested   | Not tested                             |
| Diagnose severe malaria#   | Potential                 | Not tested   | Not tested                             |

Figura 3: Características principales de los actuales RDT. Mouatcho J, Goldring J. Malaria rapid diagnostic tests: challenges and prospects. Journal of Medical Microbiology. 2013; 62(10):1491-1505.

## Comparación RDT y microscopía

Siendo la microscopía la indudable mejor alternativa diagnóstica en escenarios clínicos, se debe considerar los RDT como valiosa segunda opción, o incluso primera en las zonas endémicas con menos recursos. La capacidad de poder discernir la especie de *Plasmodium*, además de poder cuantificar el grado de parasitemia hacen de la microscopía el método más eficaz. Sin embargo, la sencillez y rapidez de los RDT distan bastante de este estándar de oro: en tan solo unos minutos, un personal con un entrenamiento básico puede depositar la gota de sangre del paciente en el dispositivo y efectuar su diagnóstico.

En cambio, para llevar a cabo técnicas microscópicas se precisa de equipos complejos, electricidad y de personal cualificado, lo cual no siempre es fácil en países endémicos del tercer mundo. Además, los RDT son pruebas muy estables, y su funcionamiento no se ve afectado por condiciones de temperatura o humedad altas, como ocurre en los trópicos.

En los últimos 10 años el uso de RDTs para el diagnóstico de la malaria ha experimentado un crecimiento exponencial en el sur de África<sup>3</sup> y otras muchas regiones. Concretamente en el año 2017, este método ya se usaba tres veces más que la microscopía<sup>3</sup>. Esto pone de manifiesto la relevancia que están tomando las pruebas de

diagnóstico rápido en los países con mayor incidencia de malaria y menos medios económicos a su alcance.

|                                  |                            | Microscopía (Frotis de sangre)        | Prueba rápida                             |
|----------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|---|
| <b>Requisitos</b>                | 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  |
| <b>Desempeño</b>                 | Duración de la prueba      | Mínimo una hora                       | 15 minutos                                |
|                                  | Intensidad laboral         | Alta                                  | Baja                                      |
| <b>Especificaciones técnicas</b> | Detect. todas las especies | Sí                                    | Sí  |
|                                  | Cuantificación             | Posible                               | No es posible                             |

Figura 4: Comparación entre microscopía y RDTs. Una forma rápida, precisa de Diagnóstico de Malaria. Standard Diagnostics, INC.

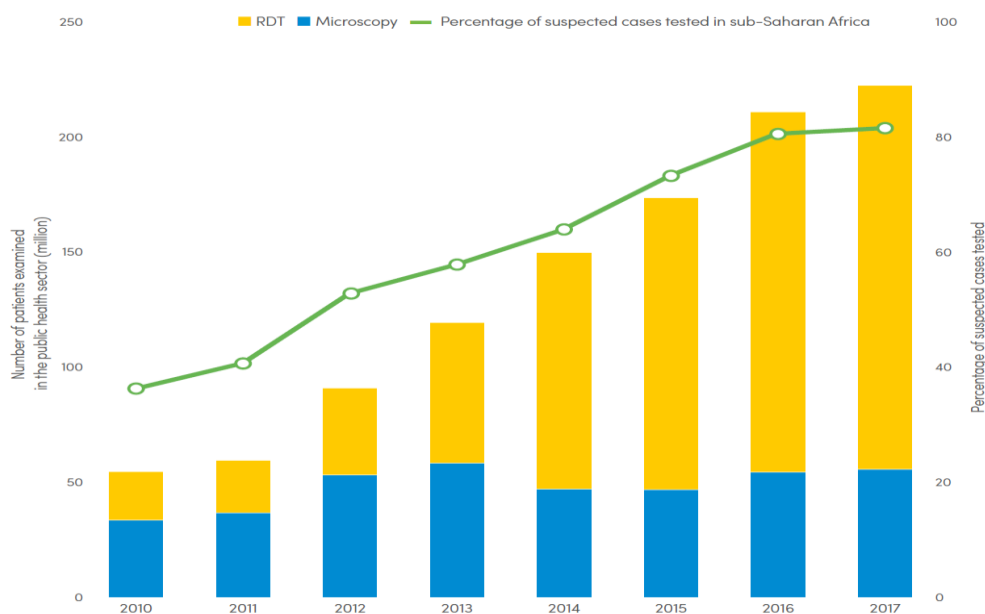


Figura 5: Pacientes de malaria examinados empleando RDTs y microscopía en África Subsahariana; porcentaje de casos sospechosos comprobados en establecimientos sanitarios. World Health Organization (WHO). World Malaria Report, 2018

Un último detalle a tener en cuenta es el coste de ambos tipos de técnicas. UNICEF afirma que el precio medio de un RDT descendió de 0,60 dólares en 2011 a 0,44 dólares en 2015, de manera que se están volviendo cada vez más asequibles<sup>38</sup>.

Aunque el desembolso en microscopios y demás instalaciones y personal cualificado puede ser elevado en un principio, la calidad de los mismos puede mantenerse a lo largo de muchos años. Esto implica que la relación número de diagnósticos certeros-coste, es mayor que en el caso de los RDT.



Sin embargo, hay estudios que afirman que, aunque los RDT traigan consigo un diagnóstico más caro, pueden acarrear una disminución de los gastos para tratamientos. Esto es debido a que un diagnóstico rápido y eficaz mediante RDT puede hacer que se comience con la medicación adecuada para ese paciente cuanto antes, evitándose tratamientos desafortunados y la sobremedicación de la población, que puede favorecer la aparición de cepas resistentes<sup>39</sup>.

## PCR

La detección por medio de PCR tiene la mayor especificidad y sensibilidad para el diagnóstico parasitológico de malaria. El método consiste en la amplificación de segmentos conocidos y específicos de cada *Plasmodium*, dependiendo de los *primers* utilizados. El método de PCR en tiempo real es rápido (<2 horas) pero es mucho más costoso y complejo de hacer que una gota gruesa. Además, la PCR permite la identificación de cepas de *Plasmodium* con polimorfismos genéticos asociados a resistencia a antimaláricos, y la realización de la prueba en muestras almacenadas por varias semanas, permitiendo así el envío a laboratorios especializados<sup>2</sup>. A pesar de que es una técnica muy empleada en investigación, su elevado costo, requerimientos de estandarización, tiempo de ejecución y personal entrenado hacen que su uso sea muy reducido en escenarios clínicos.

La PCR podría tener uso clínico en situaciones muy particulares, como en el diagnóstico en pacientes con sospecha de malaria y múltiples gotas gruesas negativas, (por ejemplo, pacientes con parasitemias submicroscópicas); en la confirmación de especie de *Plasmodium*; en la sospecha de malaria mixta por fallo terapéutico (cobertura incompleta de quimioterapia); y, en el monitoreo de la respuesta al tratamiento (por ejemplo, en áreas con resistencia conocida a múltiples antimaláricos)<sup>2</sup>. El único método que en la actualidad permite detectar con exactitud la presencia de malaria mixta es la PCR, difícil de implementar en la práctica clínica rutinaria<sup>3</sup>.

## Pruebas de inmunodiagnóstico indirecto

Los métodos de diagnóstico indirecto detectan fundamentalmente anticuerpos que se producen en respuesta al estímulo antigénico durante la infección de *Plasmodium* y su desarrollo biológico en el hospedador vertebrado<sup>40</sup>. Esta respuesta inmune hace posible el inmunodiagnóstico. Los métodos serológicos basados en este fundamento son la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la prueba de ELISA indirecta.

Debido al tiempo requerido para el desarrollo de anticuerpos y también a la persistencia de los anticuerpos, las pruebas serológicas no son útiles para el diagnóstico de rutina de la malaria. Sin embargo, la detección de anticuerpos puede ser práctica para:

- Examinar a los donantes de sangre que participan en casos de malaria inducida por transfusión cuando la parasitemia del donante puede estar por debajo del nivel detectable del examen microscópico de sangre.
- Examinar a un paciente, generalmente de un área endémica, que ha tenido infecciones crónicas de malaria para una afección conocida como síndrome de esplenomegalia tropical.

- Examinar a un paciente que ha sido tratado recientemente por malaria, pero en el que se cuestiona el diagnóstico<sup>41</sup>.

Su interés en la práctica clínica, por tanto, es bastante limitado y sus cifras de sensibilidad no son lo suficientemente elevadas como para considerarlas métodos diagnósticos eficaces<sup>10</sup>.

## **IFI**

Esta prueba se considera de referencia en el serodiagnóstico y seroepidemiología de la malaria y sirve para detectar anticuerpos en los sueros, determinar los títulos de éstos y seguir el curso de su producción.

Las pruebas de especies específicas están disponibles para tres de las especies que afectan a humanos: *P. falciparum*, *P. vivax* y *P. malariae*. Los antígenos de *P. ovale* no siempre están disponibles y, por lo tanto, las pruebas de anticuerpos no se realizan de manera rutinaria. Las reacciones cruzadas ocurren a menudo entre las especies de *Plasmodium* y *Babesia*<sup>41</sup>.

Para llevar a cabo esta técnica se necesitan antígenos de *Plasmodium*, que se obtienen de cultivos continuos o sangre de personas que tienen una infección primaria activa. Estos antígenos son fijados en láminas portaobjetos sobre las que se agrega el suero del paciente. Este suero contiene anticuerpos contra el agente etiológico (anticuerpo primario) que se unirán al antígeno. Esta unión se podrá visualizar mediante un microscopio de fluorescencia utilizando una anti-inmunoglobulina humana marcada con fluoresceína (anticuerpo secundario)<sup>40</sup>. Cuando se examina el portaobjetos con un microscopio de fluorescencia, si los parásitos emiten fluorescencia de un color verde manzana, se ha producido una reacción positiva<sup>41</sup>. Por inmunofluorescencia se pueden determinar anticuerpos IgM e IgG<sup>9</sup>.

La inmunofluorescencia es especialmente útil en zonas endémicas de malaria. Gracias a esta técnica es posible para medir el grado de la endemidad, verificar la presencia o ausencia de infecciones por malaria, delimitar zonas maláricas, detectar cambios estacionales de transmisión y evaluar actividades antimaláricas<sup>40</sup>. Además, también puede emplearse para seleccionar donantes de sangre en zonas no endémicas de malaria.

Es importante mencionar que los antígenos homólogos detectan títulos de anticuerpos en niveles más elevados que los antígenos heterólogos y además proveen información retrospectiva sobre la población.

Las láminas de inmunofluorescencia que contienen la suspensión antigénica se pueden preservar, sin pérdida de la actividad inmunológica, con un agente desecador por tiempos prolongados a temperatura ambiente. Rutinariamente, las láminas procesadas para observación fluorescente deben ser examinadas al término de la ejecución de la técnica. La reacción fluorescente debe observarse sólo en el suero control positivo en presencia del antígeno y en los sueros a ensayar que también resulten positivos. Como título del suero se considera la mayor dilución que presente fluorescencia. El suero es negativo cuando no hay fluorescencia<sup>40</sup>.

Cabe destacar que la probabilidad de tener reacciones cruzadas es menor al de otros ensayos como ELISA. Además, su sensibilidad es de 80% y su especificidad de 99%<sup>2</sup>.

La principal limitación para llevar a cabo este ensayo es la disponibilidad de equipos especializados como microscopios de epifluorescencia e incubadora de CO<sub>2</sub> para cultivo de cepas de *P. falciparum*, con objeto de cultivar antígenos parasitarios para preparación de las láminas<sup>40</sup>.

## **ELISA INDIRECTO**

Se trata de una técnica de inmunoensayo en la cual al antígeno de *Plasmodium* fijado al soporte se unen los anticuerpos específicos que se encuentran en el suero del paciente. A este primer inmunocomplejo se unen anti-anticuerpos marcados con una enzima, generándose un producto detectable. Los inmunoensayos enzimáticos también se han empleado como una herramienta para evaluar a los donantes de sangre, pero tienen una sensibilidad limitada. Esto se debe a que solo se puede emplear el antígeno de *Plasmodium falciparum* en lugar de los antígenos de varias especies<sup>41</sup>.

La cantidad de enzima enlazada indica la cantidad de anticuerpos en el suero y puede ser medida por la degradación de su sustrato. No obstante, debe tenerse en cuenta que su correlación con los ensayos in vivo se afecta cuando la concentración de anticuerpos es baja, ya que el ELISA indirecto tiende a sobrestimar los sueros de bajos títulos. Esto se debe probablemente a la presencia de inmunoglobulinas inespecíficas o anticuerpos de baja afinidad<sup>42</sup>.

Este método es el de elección para detectar anticuerpos de clase IgG o IgA. Los ensayos indirectos presentan una alta detectabilidad que depende de la densidad de epítomos de relevancia diagnóstica presentes en la fase sólida<sup>42</sup>.

El método de ELISA indirecto tiene una incidencia relativamente alta de reacciones cruzadas y su sensibilidad es notablemente inferior a la de los ensayos hechos con IFI. Por tanto, es una técnica de tercera línea para el diagnóstico de la malaria.

## **CONCLUSIONES**

La malaria o paludismo es una de las enfermedades parasitarias con mayor nivel de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Con el fin de evitar complicaciones clínicas y de reducir el número de fallecimientos, es necesario dar con el tratamiento más adecuado lo antes posible. Por esta razón cobra un papel primordial el llevar a cabo un diagnóstico certero de manera rápida, segura y eficaz.

A pesar de que la microscopía es la técnica diagnóstica idónea, la realidad es que en áreas endémicas raramente se dispone de las instalaciones, material y personal requerido para poder llevarla a cabo. De manera similar, la técnica de PCR precisa de una instrumentación y de un equipo de especialistas difíciles de conseguir en los países con menos recursos económicos.

En estas situaciones son especialmente útiles los RDT, pruebas diagnósticas basadas en la inmunocromatografía que detectan antígenos de *Plasmodium* en la sangre del paciente. El RDT más empleado actualmente es el detector de la proteína PfHRP-2. A pesar de sus ventajas, como la capacidad de diagnosticar malaria *falciparum* de manera sencilla y en tan solo unos minutos, tiene como inconveniente que la sensibilidad de la prueba puede verse afectada por diversos factores. Entre ellos destacan la variabilidad o delección de los genes que codifican para la proteína, las reacciones cruzadas por la presencia del factor reumatoide o el fenómeno prozona.

Como tercera línea diagnóstica se encuentran las pruebas serológicas (IFI y ELISA indirecto), que detectan anticuerpos en el suero del paciente sintetizados como respuesta a la presencia de antígenos de *Plasmodium*. Sus valores de sensibilidad y especificidad son muy inferiores a los demás métodos.

Por todo ello es necesario continuar investigando nuevos y mejorados métodos de diagnóstico con el fin de conseguir una técnica asequible, rápida y efectiva. Un estudio en profundidad de posibles nuevas dianas para RDT podría transformar a esta técnica en el método de referencia, dejando atrás la microscopía.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Paludismo. Organización Mundial de la Salud. 2018. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/es/>
2. Campuzano-Zuluaga G, Blair-Trujillo S. Malaria: consideraciones sobre su diagnóstico. *Medicina & Laboratorio*. 2010; 16: 311-354.
3. World Health Organization (WHO). World Malaria Report, 2018.
4. Puente S., García-Benayas T., Seseña G., & González-Lahoz J. M. Malaria: conceptos clínicos y terapéuticos. *Enfermedades Emergentes*. 2005; 7(1), 34-39.
5. Ashley E, Phyo A.P, Woodrow C. Malaria Review. *Lancet*. 2018; 391: 1608–21
6. Paludismo: información para viajeros. Organización Mundial de la Salud. 2017. Available from: <http://www.who.int/malaria/travellers/es/>
7. Malaria. Centro Nacional de Medicina Tropical - Consejos generales sobre cómo viajar. Instituto de Salud Carlos III. 2017.
8. Carretero M. Quimioprofilaxis de la malaria. *Offarm: farmacia y sociedad*. 2003; 22(8), 136-138.
9. López Antuñano F. J. La malaria y su sombra: III. Diagnóstico y tratamiento. *Revista de la Facultad de Medicina*, 2002: 44(003).
10. Muñoz J., Rojo-Marcos G., Ramírez-Olivencia G., Salas-Coronas J., Trevino B., Arellano J. & López-Vélez, R. Diagnóstico y tratamiento de la malaria importada en España: recomendaciones del Grupo de Trabajo de Malaria de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEM-TSI). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2015; 33(6), e1-e13.
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. 2002; 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. Mouatcho J, Goldring J. Malaria rapid diagnostic tests: challenges and prospects. *Journal of Medical Microbiology*. 2013; 62 (10):1491-1505.
14. Sullivan D. J., Gluzman I. Y. & Goldberg D. E. Plasmodium hemozoin formation mediated by histidine-rich proteins. *Science*. 2006; 1, 219–222.
15. Hayward R. E., Sullivan D. J. & Day K. P. Plasmodium falciparum: histidine-rich protein II is expressed during gametocyte development. *Exp Parasitol*. 2000; 96, 139–146.
16. Mayxay M., Pukrittayakamee S., Chotivanich K., Looareesuwan S. & White N. J.. Persistence of Plasmodium falciparum HRP-2 in unusual protein of Plasmodium falciparum: histidine-rich protein II. *Mol Biochem Parasitol*. 2001; 35, 149–160.
17. Baker J., McCarthy J., Gatton M., Kyle D. E., Belizario V., Luchavez J., Bell, D. & Cheng, Q. Genetic diversity of Plasmodium falciparum histidine-rich protein 2 (PfHRP2) and its effect on the performance of PfHRP2-based rapid diagnostic tests. *The Journal of Infectious Diseases*. 2005. 192, 5, 1, 870–877
18. Nderu D., Kimani F.T., Thiong'o K., Karanja E., Akinyi M., Too E.K., Chege W., Nambati E.A., Meyer C.G., & Velavan T.P. Plasmodium falciparum histidine-rich protein (PfHRP2 and 3) diversity in Western and Coastal Kenya. *Nature, Scientific Reports*. 2019
19. Gamboa D., Ho M. F., Bendezu J., Torres K., Chiodini P. L., Barnwell J. W., & Cheng Q. A large proportion of P. falciparum isolates in the Amazon region of Peru lack pfhrp2 and pfhrp3: implications for malaria rapid diagnostic tests. *PloS one*, 2010; 5(1), e8091.
20. Kumar N., Pande V., Bhatt R. M., Shah N. K., Mishra N., Srivastava B & Anvikar A. R. Genetic deletion of HRP2 and HRP3 in Indian Plasmodium falciparum population and false negative malaria rapid diagnostic test. *Acta tropica*. 2013; 125(1), 119-121.
21. Fontecha G., Pinto A., Escobar D., Matamoros G., & Ortiz B. Genetic variability of Plasmodium falciparum histidine-rich proteins 2 and 3 in Central America. *Malaria journal*. 2019; 18(1), 31.
22. 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.
23. 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.
24. Gillet P., Mori M., Van Esbroeck M., Van den Ende J. & Jacobs, J. Assessment of the prozone effect in malaria rapid diagnostic tests. *Malar J*. 2009; 8, 271.
25. Una forma rápida, precisa de Diagnóstico de Malaria. Standard Diagnostics, INC. Available from: [http://www.ctr.com.mx/pdf\\_ctr/2.pdf](http://www.ctr.com.mx/pdf_ctr/2.pdf)
26. Ajumobi O., Sabitu K., Nguku P., Kwaga J., Ntadom G., Gitta S., Poggensee G. Performance of an HRP-2 rapid diagnostic test in Nigerian children less than 5 years of age. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2015; 92(4), 828-833.
27. Desakorn V., Dondorp A. M., Silamut K., Pongtavornpinyo W., Sahassananda D., Chotivanich K., Pitisuttithum P., Smithyman A. M., Day N. P. & White N. J. Stage-dependent production and release of histidine-rich protein 2 by Plasmodium falciparum. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2005. 99, 517–524.

28. Dondorp A. M., Desakorn V., Pongtavornpinyo W., Sahassananda D., Silamut K., Chotivanich K & Da, N. P. Estimation of the total parasite biomass in acute falciparum malaria from plasma PfHRP2. *PLoS medicine*, 2005; 2(8), e204.
29. Vaidya, A. B. & Mather, M. W. Mitochondrial evolution and functions in malaria parasites. *Annu Rev Microbiol.* 2009; 63, 249–267
30. Hurdal R., Achilonu I., Choveaux D., Coetzer T. H. T. & Dean Goldring, J. P. Anti-peptide antibodies differentiate between plasmodial lactate dehydrogenases. *Peptides.* 2010; 31, 525–532.
31. Piper R. C., Buchanan I., Choi Y. H. & Makler M. T. Opportunities for improving pLDH-based malaria diagnostic tests. *Malar J* 2011; 10, 213.
32. Hendriksen I. C. E., Mtove G., Pedro A. J., Gomes E., Silamut K., Lee S. J., Mwambuli A., Gesase, S., Reyburn H. Evaluation of a PfHRP2 and a pLDH-based rapid diagnostic test for the diagnosis of severe malaria in 2 populations of african children. *Clinical infectious diseases.* 2011; 52(9), 1100-1107.
33. Fogg C., Twesigye R., Batwala V., Piola P., Nabasumba C., Kiguli, J., Mutebi F., Hook C., Guillerm M. Assessment of three new parasite lactate dehydrogenase (pan-pLDH) tests for diagnosis of uncomplicated malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008; 102, 25–31.
34. Talman A. M., Duval L., Legrand E., Hubert V., Yen S., Bell D., Le Bras J., Arie F. & Houze S. Evaluation of the intra- and inter-specific genetic variability of Plasmodium lactate dehydrogenase. *Malar J.* 2007; 6, 140.
35. Cloonan N., Fischer K., Cheng Q. & Saul, A. Aldolase genes of Plasmodium species. *Mol Biochem Parasitol.* 2001; 113, 327–330.
36. Richter J., Gobels K., Muller-Stover I., Hoppenheit B. & Haussinger D. Co-reactivity of plasmodial histidine-rich protein 2 and aldolase on a combined immuno-chromographic malaria dipstick (ICT) as a potential semi-quantitative marker of high Plasmodium falciparum parasitaemia. *Parasitol Res.* 2004; 94, 384–385.
37. Ashton R. A., Kefyalew T., Tesfaye G., Counihan H., Yadeta D., Cundill B., Reithinger R. & Kolaczinski J. H. Performance of three multi-species rapid diagnostic tests for diagnosis of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax malaria in Oromia Regional State, Ethiopia. *Malar J.* 2010; 9, 297.
38. Malaria Rapid Diagnostic Tests Market & Supply Update. UNICEF. 2016. Available from: [https://www.unicef.org/supply/files/mRDTs\\_January2016.pdf](https://www.unicef.org/supply/files/mRDTs_January2016.pdf)
39. Diagnóstico, nuevos métodos para detectar enfermedades como la malaria, el dengue o el Zika. EL ESPAÑOL. Available from: <http://reportajes.espanol.com/diagnosico/malaria-sepalo-cinco-minutos/>
40. Técnicas, Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de Malaria. 2003; Instituto Nacional de Salud. Lima.
41. Malaria Diagnostic Tests CDC: centers for disease control and prevention. Available from: [https://www.cdc.gov/malaria/diagnosis\\_treatment/diagnosis.html](https://www.cdc.gov/malaria/diagnosis_treatment/diagnosis.html)
42. Ochoa R. Técnicas inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos. *La Habana: Finlay Ediciones.* 2012.