

# ASPECTOS PRÁCTICOS DEL DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO Y PROFILAXIS DE LA MALARIA

M<sup>a</sup> Carmen Turrientes y Rogelio López-Vélez  
Unidad de Medicina Tropical y Parasitología Clínica. Hospital Ramón y Cajal. Madrid

La malaria es una enfermedad causada por parásitos del género *Plasmodium*, siendo cuatro las especies que pueden parasitar al hombre: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* y *Plasmodium malariae*. Desde que se describiera por primera vez en 1880, el diagnóstico de esta enfermedad se ha realizado mediante la observación de las distintas formas del parásito en el examen microscópico de extensiones de sangre periférica teñidas con diversos colorantes. Hoy día, 120 años después, esta técnica sigue siendo el método de referencia. Sin embargo, la laboriosidad que precisa el entrenamiento de un buen microscopista y la dificultad que entraña observar parasitemias bajas ha impulsado el desarrollo de nuevas técnicas más sencillas. Diagnosticar a tiempo una malaria puede ser vital para el enfermo, ya que la aparición de complicaciones está muy relacionada con la demora de la instauración del tratamiento. El objetivo de esta pequeña revisión es el proporcionar al microbiólogo una visión general de las ventajas e inconvenientes de las distintas técnicas disponibles para el diagnóstico de esta enfermedad. A modo de resumen (ver también tablas 1 y 2), el examen microscópico de muestras de sangre teñidas sigue siendo el método de elección, las técnicas de fluorescencia o de detección antigénica comercializadas pueden resultar de utilidad cuando el microscopista no tenga experiencia suficiente y la PCR es una técnica muy sensible pero que no está disponible en todos los laboratorios. Se complementa la revisión con algunas ideas prácticas sobre la profilaxis antipalúdica en la actualidad.

## DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

### Examen de muestras de sangre periférica

**Realización del frotis y de la gota gruesa.** La toma de muestra se realiza mediante la punción con una lanceta estéril, normalmente en la yema del dedo. Se recoge una gota de sangre en un portaobjetos y con otro se realiza la extensión en capa fina. Para la gota gruesa se recogen 3 ó 4 gotas sobre un portaobjetos y con la esquina de otro se unen en movimientos rápidos, extendiéndose en una capa gruesa y uniforme. La gota gruesa permite analizar una mayor cantidad de sangre, facilitando la detección de parasitemias bajas y un ahorro de tiempo en el examen, aunque al romperse los eritrocitos resulta difícil la identificación de especie.

Tinciones de sangre periférica. Son muchas las tinciones que se aplican para el diagnóstico del paludismo, desde las convencionales de Giemsa, May-Grünwald-Giemsa, Field y Leishman hasta las fluorescentes con naranja de acridina o el sistema QBC.

La tinción de **Giemsa**, es la técnica diagnóstica de referencia. Este colorante sirve tanto para la gota gruesa como para el frotis. La necesidad de emplear agua tamponada a pH 7,2 (tanto en la dilución del colorante como en los lavados) se debe a que, con otro pH, puede verse alterada la morfología del parásito, impidiendo la observación de las granulaciones de Schüffner, tan importantes para la diferenciación de la especie. Esta tinción tiene buena sensibilidad (92-98%) y especificidad (85-99%). Nuestra recomendación para la tinción de la gota gruesa es la siguiente: a) no fijar con metanol, b) teñir con colorante de Giemsa al 3% durante 30 min, y c) lavar en agua tamponada a pH 7,2. Para los frotis recomendamos: a) fijar con metanol durante 5 min, b) teñir con colorante de Giemsa al 10% durante 10 min, y c) lavar en agua tamponada a pH 7,2. Si se utiliza el colorante de May-Grünwald-Giemsa se fija con metanol, se tiñe con el colorante May-Grünwald diluido en un volumen igual de agua tamponada durante 5 min y después se procede con el colorante de Giemsa como se ha referido.

La tinción de **Field** (colorantes A y B de Field) sirve tanto para la gota gruesa como para el frotis. Debido a su rapidez y sencillez, es la preferida por los laboratorios de los hospitales tropicales que analizan gran número de muestras. Sin embargo, no siempre permite observar el punteado de Schüffner presente en *P. vivax* y *P. ovale*. La tinción de la gota gruesa supone: a) inmersión en el colorante A de Field durante 3-5 seg, b) lavado en agua durante 5 seg, c) inmersión en el colorante B de Field durante 3 seg, y d) lavado con agua durante 5 seg. Para los frotis, la técnica es: a) fijar con metanol durante 1 min, b) teñir con mezcla de colorantes A y B durante 1 min, y c) lavar con agua tamponada a pH 7,2.

El método de **Leishman** incluye metanol por lo que sólo puede utilizarse para el frotis. Para realizarla se sigue lo siguiente: a) teñir con el colorante de Leishman durante 2 min, b) añadir sobre el frotis el doble de volumen de agua tamponada y dejar teñir durante 5-7 min, c) lavar en agua tamponada durante 2 min.

La tinción con **naranja de acridina** descrita por Kawamoto se utiliza para el frotis, ya que precisa una fijación previa con metanol antes de teñir y observar en un microscopio de fluorescencia. La sensibilidad es del 77-96% y la especificidad del 81-98%.

El sistema de **QBC** (*Quantitative Buffy Coat System*®, Becton Dickinson) se basa en la concentración por gradiente de densidad de los eritrocitos parasitados mediante la centrifugación de un capilar impregnado de heparina y naranja de acridina, al que se añade un flotador. Se necesita, por tanto, capilares y una centrífuga especiales, así como un acoplador de microscopio y un sistema de epifluorescencia con lente especial, lo que encarece la técnica sin aportar mucho al frotis y gota gruesa (sensibilidad del 88-98% y especificidad del 58-90%). A veces es difícil el reconocimiento del parásito, no permite diferenciar las distintas especies y tiene el inconveniente de trabajar con sangre fresca.

### Detección de antígenos parasitarios

Son pruebas muy fáciles de realizar, rápidas, sensibles y no precisan microscopio. Los sistemas comerciales (*dipstick*, "jabonera") son estables a temperatura ambiente, lo que permite el transporte al trópico, y constituyen una importante ayuda para el diagnóstico

de malaria en los laboratorios con poca experiencia en la microscopía. De ninguna forma sustituyen al frotis y la gota gruesa, ya que tienen falsos negativos y no son cuantitativos. Así, pueden pasar por alto casos de malaria, retrasando el diagnóstico. Además, al no distinguir el grado de parasitemia, muy relacionado con la gravedad, impiden al clínico la adopción de las medidas terapéuticas oportunas, con la consiguiente morbilidad y mortalidad que ello entraña.

Además del valor que estas técnicas pudieran tener para los laboratorios de microbiología occidentales, se ha propuesto que podrían ser de utilidad, a modo de autodiagnóstico, para el propio viajero a zonas de baja endemia y con estancias prolongadas, que decide no hacer profilaxis antipalúdica y que sufre un ataque febril durante su estancia. Esta idea, en principio atractiva, no ha dado los resultados esperados debido a la dificultad de interpretación por los viajeros, especialmente en los casos de moderada o baja parasitemia.

**Detección del HRP-2.** La proteína-2 rica en histidina (HRP-2) se secreta por *P. falciparum* a la sangre, lo que permite su detección mediante la captura antigénica con anticuerpos específicos y técnicas de inmunocromatografía. Con posterioridad se han desarrollado otros métodos que detectan tanto el antígeno HRP-2 de *P. falciparum* como el antígeno panmalárico que se expresa en las fases sanguíneas de *P. falciparum* y *P. vivax* y, probablemente, también de *P. ovale* y *P. malariae*. Tienen una sensibilidad general del 90-92% y una especificidad del 96-98%. Para *P. vivax* son inferiores, del 75% y 95% respectivamente. Son técnicas ideales para los laboratorios con poca experiencia en el diagnóstico microscópico y siempre que se requiera un diagnóstico rápido, pero presentan desventajas que les impide reemplazar al frotis y la gota gruesa: no detectan parasitemias bajas (<0,1%), presentan falsos negativos, tantos más cuanto más baja es la parasitemia, y falsos positivos, especialmente en presencia del factor reumatoide. Además, no permiten estimar el grado de parasitemia y no diferencian las distintas especies de *Plasmodium*, ni las parasitemias mixtas. Por último persisten positivas durante varios días a pesar de un tratamiento correcto, lo que impide predecir las posibles resistencias.

**Detección de la lactato deshidrogenasa (LDH) parasitaria.** Se basa en la detección de esta enzima parasitaria, común a las cuatro especies de *Plasmodium*. La especificidad es similar a las técnicas que detectan HRP-2, pero la sensibilidad es un poco inferior (88-90%), disminuyendo ésta a medida que la parasitemia baja (hasta el 39% si hay <50 parásitos/ $\mu$ l). Las ventajas e inconvenientes son similares a la detección de HRP-2.

### Técnicas moleculares

Se utiliza una técnica de PCR múltiple que permite la detección del DNA genómico de las cuatro especies parasitarias. La amplificación por PCR permite incluso la detección de 3-4 parásitos/ $\mu$ l (parasitemias de 0,0005 a 0,0015%), así como la determinación de infecciones mixtas. Al ser una técnica potencialmente cuantitativa, permite controlar la eficacia del tratamiento, prediciendo las resistencias a los antipalúdicos. 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. Por el momento, hay que reservar esta técnica para validar los resultados de la microscopía o de la detección antigénica.

### Serología

La detección de anticuerpos anti-*P. falciparum* en el suero de los pacientes tiene una baja sensibilidad para el diagnóstico de malaria. Se utiliza en determinados casos en los que la microscopía es negativa por la toma de medicación, o en los bancos de sangre. La técnica habitual es una inmunofluorescencia (*Falciparum*-spot IF, bioMérieux). Más recientemente se ha introducido un ensayo inmunoenzimático (Malaria IgG Celisa, BMD).

### PROFILAXIS ANTIPALÚDICA

Es muy importante instar al viajero a que utilice las medidas barrera que eviten el contacto con el vector, como los repelentes de insectos, las telas mosquiteras impregnadas con insecticidas residuales, etc., así como elegir una quimioprofilaxis correcta que incluya un análisis racional de la necesidad o no de la medicación, la importancia de educar al paciente para que cumpla con la pauta establecida, la adecuada elección de fármacos, dosis, duración, efectos secundarios, así como la posibilidad de autotratamientos. En la actualidad, disponemos de un variado arsenal de fármacos, unos ya establecidos como la cloroquina, cloroquina-proguanil, doxiciclina y mefloquina; y otros en estudio como la atovaquona-proguanil, tafenoquina y azitromicina. Sabemos también que hay drogas que no son útiles en la profilaxis, como la halofantrina (baja actividad, riesgos de arritmia), los derivados de la artemisina (vida media muy corta, desarrollo de resistencias) y las quinolonas (poca eficacia). Como norma, se advertirá al viajero que ninguna profilaxis es 100% eficaz y que, en el caso de un posible paludismo ha de buscarse asistencia médica inmediata, ya que el riesgo de complicaciones aumenta con la demora del diagnóstico y el consiguiente retraso en iniciar el tratamiento. El régimen profiláctico ha de comenzar una o dos semanas antes de la salida (un día antes si se trata del proguanil y la doxiciclina), continuar durante todo el tiempo que se permanezca en la zona palúdica, y prolongarlo durante cuatro semanas después de su retorno. Los viajeros de estancias cortas y muy frecuentes, como los periodistas, negociantes, tripulaciones de líneas aéreas, etc. pueden beneficiarse más de seguir las medidas de protección y autotratamiento que de una profilaxis reglada. Por el contrario, aquellos viajeros de larga estancia (meses), como los misioneros, cooperantes o expatriados, deben ser instruidos acerca de la sintomatología y de los riesgos, así como de las diferentes posibilidades de tratamiento. El uso prolongado durante años de cloroquina-proguanil se tolera bien, aunque existe el riesgo de retinopatía por cloroquina pasados cinco años de toma continuada de 300 mg semanales. La mefloquina puede tomarse durante muchos meses seguidos, pero su inocuidad a largo plazo no ha sido suficiente documentada. La doxiciclina se tolera peor, por lo que no se recomienda durante períodos prolongados, aunque haya sido bien tolerada en militares durante un año. Los antiguos inmigrantes procedentes de zonas palúdicas que vuelven a sus países de origen pasados unos años, para visitar a sus familiares, son también viajeros de riesgo, ya que pierden la semiinmunidad adquirida, y muy especialmente sus hijos nacidos en el país de adopción. Estos últimos son, probablemente, los viajeros de mayor riesgo por no ser inmunes y estar sometidos a una elevada exposición.

Según el riesgo de aparición de resistencia a los antipalúdicos, la OMS ha establecido diversas áreas geográficas, denominadas A, B y C (figura 1). La zona A comprende áreas palúdicas que están libres de resistencia a la cloroquina. Los países incluidos en la zona B son aquéllos donde sí se ha descrito esta resistencia. Por último, la zona C se refiere a áreas con multiresistencia a los

antipalúdicos. La OMS recomienda cloroquina para la zona A, cloroquina-proguanil para la zona B y mefloquina, cloroquina-proguanil o doxiciclina (en la frontera de Tailandia-Camboya-Myanmar) para la zona C (Figura 1). El CDC recomienda cloroquina para la zona A, mefloquina para la zona B y mefloquina o doxiciclina (en la frontera de Tailandia/Camboya/Myanmar) para la zona C. En cualquiera de las zonas donde el riesgo de transmisión sea muy bajo (urbes de América central y de sur y Asia) no se recomienda ninguna profilaxis. Es rara la presencia de *P. falciparum* multirresistente fuera de la frontera antes mencionada. Se ha descrito *P. vivax* resistente a cloroquina en Papúa- Nueva Guinea, Irian Jaya, Vanuatu, Myanmar y Guayana. Existe un fuerte debate entre las recomendaciones americanas y las europeas, abogando claramente por la mefloquina o la doxiciclina sobre la cloroquina-proguanil los primeros, mientras que los europeos tienen otro sentir.

## BIBLIOGRAFÍA

- Anónimo. Organización Mundial de la Salud. Métodos básicos de laboratorio en parasitología médica. Ginebra, 1992.
- Funk M, Schalagenhauf P, Tschopp A, Steffen R. MalaQuick versus ParaSight F as a diagnostic aid in travellers' malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; 93:268-272.
- Iqbal J, Sher A, Hira PR, Al-Owaish R. Comparison of the OptiMal test with PCR for diagnosis of malaria in immigrants. *J Clin Microbiol* 1999; 37:3644-3646.
- Kawamoto F. Rapid diagnosis of malaria by fluorescence microscopy and interference filter. *Lancet* 1991; 337:200-202.
- Lema OE, Carter LY, Nagelkerke N, Wangal MW, Kitenge P, Gikunda SM *et al.* Comparison of five methods of malaria detection in the outpatient setting. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60:177-182.
- Rubio JM, Benito A, Berzosa PJ, Roche J, Puente S, Subirats M *et al.* Usefulness of seminested multiplex PCR in surveillance of imported malaria in Spain. *J Clin Microbiol* 1999; 37:3260-3264.
- Tham JM, Hee Lee S, Tan TMC, Ting RCY, Kara UAK. Detection and species determination of malaria parasites by PCR: Comparison with microscopy and with ParaSight-F and ICT Malaria Pf tests in a clinical environment. *J Clin Microbiol* 1999; 37:1269-1273.
- Tijtra E, Suprianto S, Kyer M, Currie BJ, Anstey NM. Field evaluation of the ICT Malaria P.f/P.v immunochromatographic test for detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in patients with a presumptive clinical diagnosis of malaria in Eastern Indonesia. *J Clin Microbiol* 1999; 37:2412-2417.

**Tabla 1. Características morfológicas de los parásitos palúdicos en extensiones sanguíneas finas (según OMS).**

	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. falciparum</i>
<b>Glóbulo rojo infectado</b>	Tamaño aumentado; puntos de Schüffner presentes	Tamaño aumentado; puede ser oval con fimbrias; puntos de Schüffner presentes	Tamaño normal o menor de lo normal	Tamaño normal; pueden observarse hendiduras de Maurer
<b>Fase de anillo</b> (trofozoito precoz)	Bastante grande; uno o dos puntos de cromatina; puede haber dos anillos por eritrocito	Compacto; raramente dos anillos por eritrocito	Compacto; raramente dos anillos por eritrocito	Pequeño y delicado; a menudo dos puntos de cromatina; a menudo dos o más anillos por eritrocito; formas adheridas frecuentes
<b>Trofozoito tardío</b>	Grande; ameboide; pigmento en forma de bastones finos	Pequeño; no ameboide; pigmento granuloso	Pequeño; compacto; a menudo en forma de banda; pigmento granuloso	Tamaño moderado; generalmente compacto; pigmento en gránulos
<b>Esquizonte maduro</b>	Grande; merozoítos grandes (12-24); pigmento coalescente	Más pequeño que <i>P. vivax</i> ; merozoítos (6-12 merozoítos); pigmento más oscuro que en <i>P. vivax</i>	Pequeño; merozoítos grandes (6-12); aspecto de "margarita" característico; pigmento granuloso	Raro en la sangre periférica; merozoítos pequeños (8-26); masa única de pigmento
<b>Gametocitos</b>	Esféricos; compactos; núcleo único; pigmento difuso y granuloso	Parecidos a <i>P. vivax</i> , pero más pequeño	Parecidos a <i>P. vivax</i> pero más pequeños, menos numerosos y sin puntos de Schüffner	En forma semilunar, núcleo único

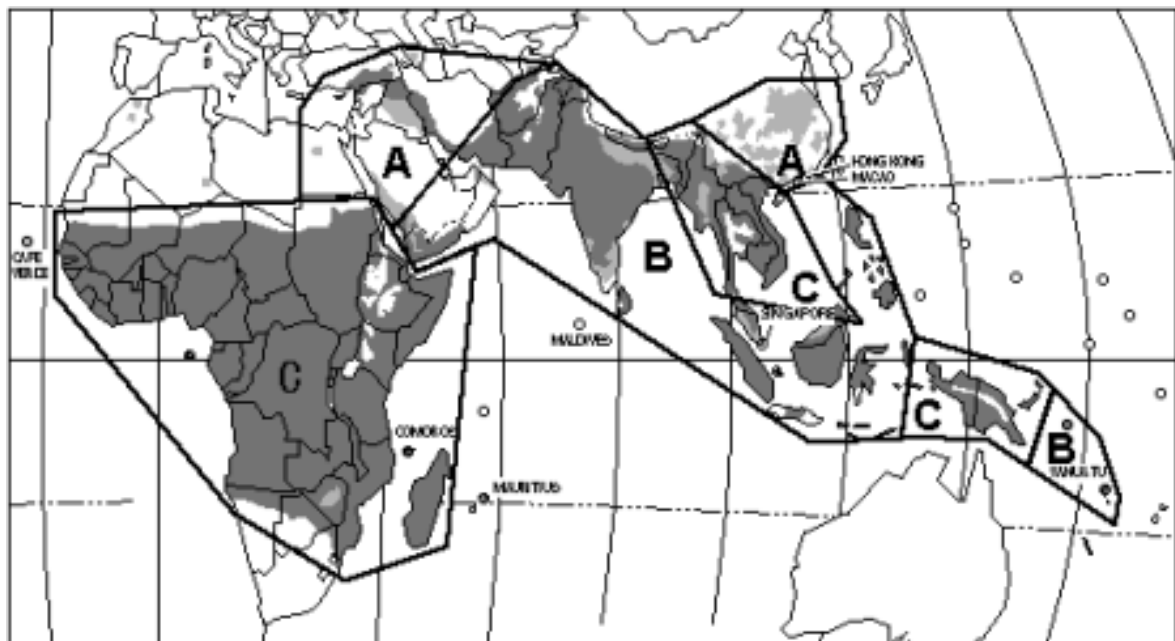
**Tabla 2. Técnicas diagnósticas: ventajas e inconvenientes.**

	Tipo de técnica	Ventajas	Inconvenientes	Técnica comercial
<b>Frotis/Gota</b>	Tinción	Fácil realización Barata Diferenciación de las especies Cuantitativa	Personal experto No detecta parasitemias bajas Difícil detección de parasitemias mixtas	

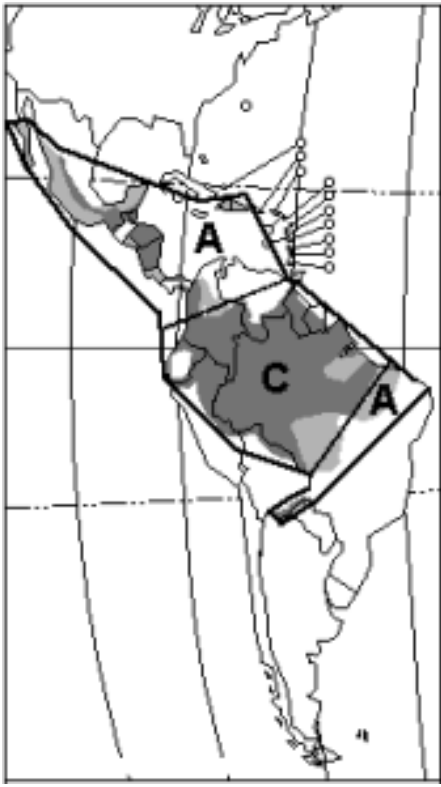
<b>QBC</b>	Centrifugación-Tinción con naranja de acridina	Fácil realización No requiere personal especializado Util cuando microscopía negativa y alta sospecha clínica de malaria	Precisa de equipo adecuado  Precisa sangre fresca  No incrementa la sensibilidad  No diferencia las especies	QBC (Quantitative Buffy Coat System; Becton Dickinson)
<b>Detección de HRP-2</b>	Dipstick de <i>P.falciparum</i>  ICT Malaria ( <i>P. falciparum</i> o <i>P. falciparum</i> + <i>P. Vivax</i> ) por inmunocromatografía	Fácil realización  No requiere personal especializado.  Util cuando la microscopía es negativa y existe una alta sospecha clínica de malaria	Baja sensibilidad con bajas parasitemias  Falsos positivos con factor reumatoide  No es cuantitativa  Persiste positiva post-tratamiento	ParaSight-F (Becton Dickinson)  PaluQuick (ICT Diagnostics)  PaluQuick-Kombi (AMRAD-ICT)  MalaQuick (Standby Diagnostics)  PATH Falciparum malaria IC Strip
<b>Detección de LDH</b>	Inmunocromatografía	Id que HRP-2	Baja sensibilidad con bajas parasitemias	OptiMal (Flow Inc)
<b>PCR</b>	Detección genómica por PCR múltiple	Detección de parasitemias bajas e infecciones mixtas.  Control del tratamiento	Precisa de equipo adecuado y personal especializado	No comercial

FIGURA 1. Distribución geográfica y áreas de riesgo de la malaria.

a



b



Fuente: Organización Mundial de la Salud. International travel and health 2000. Ginebra, 2000