

Estado actual del diagnóstico del Paludismo: Experiencia del Laboratorio de Referencia del Centro Nacional de Microbiología

Agustín Benito¹
José Miguel Rubio²
Aída de Lucio¹

¹Laboratorio de Referencia de Paludismo. Servicio de Parasitología Centro Nacional de Microbiología Instituto de Salud Carlos III
²Centro Nacional de Medicina Tropical Instituto de Salud Carlos III

Correspondencia:
Agustín Benito
Laboratorio de Paludismo
Servicio de Parasitología
Centro Nacional de Microbiología.
Instituto de Salud Carlos III
Ctra. Majadahonda-Pozuelo
Km 2, 28220 Majadahonda,
Madrid
E-mail: abenito@isciii.es

Resumen

Una de las funciones del Laboratorio de Referencia de Paludismo del Centro Nacional de Microbiología es la de desarrollar herramientas diagnósticas nuevas que faciliten la labor en la realización de la vigilancia de paludismos importados además de facilitar el diagnóstico y/o confirmación de aquellos casos sospechosos procedentes del Sistema Nacional de Salud y en concreto de las Comunidades Autónomas. Además, desde 1997 hasta la actualidad se han realizado estudios comparativos con las principales pruebas de diagnóstico rápido existentes en el mercado. En el presente artículo se hace una revisión sobre el estado actual de los métodos diagnósticos de paludismo bajo la visión propia que da la experiencia como laboratorio de referencia, dando a la vez ciertas pautas interesantes sobre los distintos métodos diagnósticos a usar: a) métodos de diagnóstico directo (microscopía en gota gruesa y extensión teñidas con colorante de Romanowsky, microscopía óptica de fluorescencia, pruebas rápidas de diagnóstico basadas en captura antigénica o en detección de actividad enzimática y finalmente el uso de técnicas de amplificación de ADN ya sea nested o multiplex PCR o PCR en tiempo real); b) además se valoran los métodos indirectos basados en pruebas serológicas convencionales. En el Laboratorio de Referencia de Paludismo del Centro Nacional de Microbiología se han detectado una media de 200 casos anuales (diagnóstico y/o confirmación) desde el segundo semestre de 1997 hasta la actualidad y gracias al uso de la multiplex-PCR se han podido detectar dos paludismos inducidos (transfusionales), dos casos de paludismo congénito, cinco casos de detección de posibles donantes de riesgo que fueron descartados y el primer caso de transmisión local de *Plasmodium ovale* conocido en un paciente de 75 años de edad de la localidad de Alcalá de Henares en Madrid.

Palabras clave: Paludismo. Métodos diagnósticos.

Summary

One of the functions of the Reference Malaria Laboratory of the National Center of Microbiology is to develop new diagnostic tools that facilitate the work in the accomplishment of the surveillance of imported malaria besides facilitating diagnosis and /or confirmation of the

suspicious cases coming from the National Health System and in concrete of the Autonomous Communities.

In addition, from 1997 to present several studies have been conducted comparing the main commercial fast diagnosis tests. The present article revises the present status of the malaria diagnostic methods from the experience gained as the reference laboratory, giving also some interesting guidelines on the use of the different diagnostic methods: a) methods of direct diagnosis of thick smear and Romanowsky dyed optical microscopy of fluorescence, fast diagnostic tests based on antigenic capture or on detection of enzymatic activity and finally techniques of DNA amplification nested or multiplex PCR or RT-PCR (realtime-PCR); b) indirect methods based on conventional serology tests.

In the Malaria Reference Laboratory of the National Center of Microbiology an average of 200 cases per year (diagnosis and/or confirmation) have been detected from the second semester of 1997 to present. Thanks to the use of the multiplex-PCR it has been possible to detect two transfusional malaria cases, two cases of congenital malaria, five cases of possible risk donors who were discarded, and the first known case of local transmission of *Plasmodium ovale* in a patient of 75 years of age from Alcalá de Henares in Madrid.

Palabras clave: Malaria. Diagnostics methods.

Introducción

El paludismo es un grave problema de salud pública a nivel mundial ya que están afectados un centenar de países y más de la mitad de la población del planeta vive en áreas donde existe transmisión. Aunque hay zonas de Asia y de Sudamérica donde el paludismo es un problema de salud importante, es en el África subsahariana donde se presenta mayor problema: entre 275 y 300 millones de personas infectadas de una población total de 500 millones, con más de 100 millones de casos clínicos y más de un millón de muertes, sobre todo entre la población infantil. Además es en este continente donde al menos ocurren el 90% de las muertes por

paludismo de todo el planeta. Estas cifras africanas representan el 80% de todos los casos de paludismo en el mundo, alrededor del 10% de las admisiones en los hospitales y entre el 20% y el 30% de las consultas¹.

En Europa, al igual que en la mayor parte de lo que conocemos como mundo desarrollado, el paludismo fue erradicado durante la primera mitad del siglo pasado como resultado de los cambios en el uso del terreno, del incremento en la agricultura acompañado por el uso de fertilizantes e insecticidas, de la modernización de los países acompañada del gran desarrollo en la construcción y, en conclusión, del gran desarrollo económico experimentado por los países que componen estos territorios. El uso del DDT dentro del programa mundial de erradicación como insecticida residual en la década de 1950 y 1960 hizo que tanto los países desarrollados como aquellos en vías de desarrollo redujeran el número de casos y la mortalidad del paludismo de manera sustancial. Este hecho, junto al desarrollo de la cloroquina como antipalúdico, hizo que se tuvieran esperanzas en la erradicación, pero la aparición de resistencias a ambos, insecticida y antipalúdico, hizo que se cambiara el término erradicación por el de control.

Recientemente, la situación del paludismo en el mundo se ha deteriorado considerablemente y la mortalidad se ha incrementado debido a diversos factores, entre los que destacan las guerras, que han causado corrientes migratorias y desplazamiento de poblaciones de áreas palúdicas a otras donde el paludismo estaba medianamente controlado, los factores de cambio climático (ej. fenómeno periódico "El Niño"- "La Niña") y sobretodo la deteriorada situación económica de la gran parte de países afectados cuyo nivel de pobreza ha aumentado, lo que conlleva a una limitación en el acceso al diagnóstico y al tratamiento.

Las dos directrices a la hora de controlar el paludismo son: el diagnóstico rápido y correcto y un tratamiento efectivo. El grado de desarrollo y la intensidad del paludismo en los países está relacionado con el modelo básico de diagnóstico a utilizar. Desde que Alphonse Laveran publicó la primera descripción de los parásitos del paludismo en 1880, la observación al microscopio de los parásitos invadiendo los glóbulos rojos mediante el uso de colorantes que tenían el ADN parasitario ha sido la técnica por excelencia para el diagnóstico del paludismo. Esta técnica continúa siendo la de referencia, sobre todo en los países con una gran morbi-mortalidad que coinciden con una elevada intensidad de transmisión. Es urgente la necesidad

de desarrollar pruebas rápidas y baratas de detección que permitan la realización de un diagnóstico rápido y eficaz para tratar el paludismo, tanto importado como autóctono. En la actualidad, y siendo realistas, tanto las técnicas de diagnóstico rápido (basadas en la inmunocromatografía), como aquellas basadas en la amplificación del material genético parasitario, son difíciles de utilizar. Las primeras por su alto coste, bajo grado de determinación de especies y por la pérdida de sensibilidad en parasitaciones por debajo de los 100 parásitos por microlitro de sangre. Las segundas por su elevado coste y dificultades de desarrollo en la mayoría de los laboratorios de países pobres. Por tanto, aunque la gota gruesa y la extensión teñidas con giemsa son el método menos costoso y el mejor aplicado a países endémicos, en países no endémicos es necesario valorar los métodos que mejor se adaptan para diagnosticar el paludismo importado.

El incremento del turismo, la cooperación con países en vías de desarrollo, el incremento de empresas que invierten en estos países y finalmente los movimientos poblacionales forzados por la guerra o por factores socioeconómicos hacen que se haya incrementado el número de casos de paludismo importados por inmigrantes y viajeros. Además de estos datos, un factor a añadir consistente en el cambio climático (aumento de las temperaturas medias anuales) hace que el paludismo sea considerado en nuestro país y en otros territorios donde está erradicado como una enfermedad re-emergente. Por todo ello, cualquier sistema de vigilancia de paludismo en España deberá estar basado fundamentalmente en la detección de casos importados con técnicas diagnósticas sensibles (vulnerabilidad) y en el estudio de las poblaciones de anofelinos autóctonos para valorar la receptividad de éstos frente a las poblaciones de parásitos importados.

Al margen del problema diagnóstico en países endémicos nos encontramos con el aumento en el número de casos anuales de paludismo importados en los países donde el paludismo fue erradicado. Así pues, todos los años aparecen casos de paludismo importados en Europa y los Estados Unidos, que hacen que la mortalidad sea elevada en éstos, como es el caso del 0,8% en UK² y Alemania³, debido principalmente a diagnósticos tardíos o incorrectos. De esta manera, entre 1976 y 1997 fueron publicados 22 casos en Europa de paludismo catalogados como crípticos (de aeropuerto), inducidos, e introducidos⁴. Todos estos hechos ponen de interés la importancia de un diagnóstico rápido y especializado.

Microscopía óptica

La tinción con colorante de Romanowsky de una gota gruesa y extensión fina es el método más sencillo y el más utilizado para diagnosticar cualquier paludismo. El método consiste en la observación de los estadios sanguíneos del parásito mediante tinción del material genético del parásito. De esta forma, se pueden observar trofozoítos en forma de anillo, en banda, gametocitos e incluso esquizontes, estos últimos principalmente para *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* y *Plasmodium malariae*.

El método consiste en la obtención de sangre periférica por pinchazo con una lanceta en la yema del dedo del paciente (lóbulo de la oreja o talón en menores de 6 meses) y colocación en el mismo portaobjetos de dos gotas. En una de ellas con la punta de otro portaobjetos se realizan movimientos circulares a modo de movimientos concéntricos (para realizar la gota gruesa) y en la otra se realiza una extensión fina al tocar con el borde de otro portaobjetos y extendiendo la sangre con una inclinación de unos 45° hasta formar una lengüeta en forma de U tal y como se representa en la Figura 1.

Una vez realizadas las extensiones se dejan secar al menos media hora a 37°C y ya se puede realizar el proceso de tinción con Field Stain o con Giemsa entre 10 y 30 minutos, dependiendo de la concentración del colorante (entre el 10% y el 3%). La gota gruesa no se fija mientras que la extensión fina se fija con metanol durante 5 minutos. El diagnóstico comienza con la observación de la gota gruesa, lo que permite realizar un diagnóstico fácil como *Plasmodium spp.*, basado en la presentación de formas parasitarias asexuales y sexuales ya que se produce una concentración parasitaria. La gota gruesa permite detectar entre 10 y 20 parásitos por microlitro de sangre. Un microscopista experto incluso puede llegar en ésta a la determinación de especie, pero lo ideal es que, una vez vistos los parásitos en la gota gruesa, pasemos a la observación de la extensión fina para determinar la especie. El recuento de parásitos por microlitro de sangre se puede realizar mediante el siguiente proceso: a) elegimos una zona de la gota gruesa con parásitos y células blancas bien teñida; b) observando con el objetivo de inmersión contamos 100 células blancas, contando a la vez el número de parásitos (formas asexuales) encontrados en cada campo; c) tomando como que un individuo posee unas 4.000 células blancas/ μ l, la fórmula será:

$4.000 \text{ células blancas} \times \text{parásitos contados frente a } 100 \text{ células blancas} / 100$

En la Tabla 1 aparecen las características principales que nos pueden ayudar al diagnóstico del paludismo mediante gota gruesa y extensión fina.

Microscopía de fluorescencia

Quantitative Buffy Coat- QBC® Becton-Dickinson: Esta prueba en capilar teñida con naranja de acridina se basa en tinción en rojo del ADN y de verde del ARN de los parásitos cuando los observamos con un microscopio que posee una fuente de luz ultravioleta (excitación a longitudes de onda de 470 a 490 nm). El método necesita el equipamiento de una microcentrífuga de capilar y la fuente de luz ultravioleta. Además necesita un objetivo especial (Paralens) para poder observar directamente sobre los capilares. Estos capilares son de un diámetro especial, haciendo que la centrífuga también lo sea. Además para la observación es necesaria la utilización de un flotador de plástico que va en el interior del capilar y comprime el buffy coat, permitiendo la observación de la capa fina que queda entre las paredes del flotador y las del interior del capilar. El capilar lleva en un extremo heparina y la naranja de acridina. Se toman entre 25 y 45 microlitros de sangre por muestra y la sensibilidad es similar al de la gota gruesa. Nuestro laboratorio de referencia lo probó en condiciones de terreno⁵ demostrando una excelente sensibilidad pero una baja especificidad, ya que es muy difícil diferenciar las especies de plasmodios. Dentro de las conclusiones de nuestro estudio⁵ podemos indicar que puede ser bueno para el seguimiento posttratamiento de los pacientes en las pruebas de evaluación de la eficacia terapéutica, pero no permite diferenciar bien las especies.

Método de Kawamoto-AO: Sistema diseñado por Kawamoto⁶ que requiere un filtro de interferencia especialmente diseñado para el fluorocromo naranja de acridina. En la actualidad existe un filtro para utilizar en microscopios de luz solar con lo que es interesante para trabajos de campo o en condiciones de laboratorios mal dotados como los existentes en

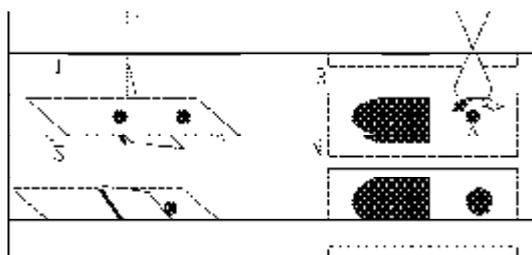


Figura 1.

Tabla 1.

Plasmodium falciparum	Plasmodium vivax
<ul style="list-style-type: none"> - Distribución amplia en los Trópicos - Normalmente altas parasitemias - Sólo se observan anillos y gametocitos en forma de banana <p>Trofozoítos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - anillos pequeños - amenudo anillos con doble punto de cromatina. - formas accolé (unidos a la membrana del glóbulo rojo) <p>Esquizontes:</p> <ul style="list-style-type: none"> - son muy raros, sólo en algunos casos de infecciones muy graves - normalmente 2 o 4 merozoítos y pigmento <p>Gametocitos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - forma de banana - algunos pueden estar redondeados si secamos demasiado rápido las láminas <p>Glóbulos rojos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - a menudo contienen multiparasitaciones - los parasitados contienen puntos malvas-rojos de Maurer irregulares <p>Los glóbulos rojos parasitados son del mismo tamaño que los no parasitados</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Distribución amplia en trópicos y áreas atemperadas - Raramente contienen más del 2% de glóbulos rojos infectados - Se pueden observar trofozoítos, esquizontes y gametocitos <p>Trofozoítos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - grandes y ameboides - el citoplasma fragmentado en la gota gruesa - pigmento malárico fino <p>Esquizontes:</p> <ul style="list-style-type: none"> - grandes, redondeados o en forma irregular - contienen hasta 24 merozoítos o más <p>Gametocitos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - grandes, con membrana irregular - pigmento disperso <p>Glóbulos rojos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - más grandes los parasitados que los no parasitados y de forma irregular - a pH 7,1 presenta puntos de Schuffner observados alrededor de los parásitos en la gota gruesa. - a veces se observan varios parásitos en un mismo glóbulo rojo
Plasmodium malariae	Plasmodium ovale
<ul style="list-style-type: none"> - Baja prevalencia en trópicos y subtropicos - muy raro parasitaciones mayores del 1% - se pueden observar trofozoítos, esquizontes y gametocitos <p>Trofozoítos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - claros y densamente teñidos - pigmento malárico de coloración amarillo-marrón - se pueden observar típicas formas en banda a través de todo el glóbulo rojo - ocasionalmente se pueden observar formas típicas de anillo en ojo de pájaro. <p>Esquizontes:</p> <ul style="list-style-type: none"> - pequeños, claros y con hasta 12 merozoítos - pigmento amarillo-marrón <p>Gametocitos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - pequeños, redondos u ovales (pueden ser difíciles de diferenciar de trofozoítos tardíos - con pigmento amarillento-marrón <p>Glóbulos Rojos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - de igual tamaño parasitados y no parasitados - predilección por parasitar glóbulos rojos viejos 	<ul style="list-style-type: none"> - Bajas prevalencias, principalmente en África del Oeste aunque también en otros sitios - Muy raro con parasitaciones mayores del 2% - Se pueden observar trofozoítos, gametocitos y esquizontes <p>Trofozoítos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pequeños y compactos (se pueden asemejar a P. malariae en la gota gruesa) - Pigmento malárico en pequeñas cantidades <p>Esquizontes:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pequeños y compactos - Contienen hasta 12 merozoítos <p>Gametocitos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pequeños y redondos - difíciles de diferenciar de trofozoítos tardíos <p>Glóbulos Rojos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - alrededor del 20%-30% de los glóbulos rojos parasitados aparecen ovales con bordes deflecados en su extremo final - predominan los puntos de Schuffner a pH 7,1 y se pueden ver indistintamente rodeando a los parásitos en la gota gruesa

numerosos países en vías de desarrollo. Consiste en añadir una gota de solución salina o solución Tris-clorídrico pH 7,4 a un portaobjetos con una gota

gruesa y extensión sanguínea. La sensibilidad y especificidad son las mismas que las de la gota gruesa teñidas con colorante de Romanowsky.

Pruebas inmunocromatográficas de diagnóstico rápido (Rapid Diagnostic Tests-RDTs)

El principio de estas técnicas es la inmunocromatografía. Son técnicas basadas en la migración de líquidos a través de la superficie de una membrana de nitrocelulosa. Todas están basadas en la captura de un antígeno parasitario a partir de una muestra de sangre periférica usando anticuerpos monoclonales preparados contra dicho antígeno o diferentes familias antigénicas, conjugando a ambos un liposoma que contiene selenio como colorante o partículas de oro coloidal en fase móvil. Posteriormente se aplica un segundo o tercer anticuerpo monoclonal a una tira de nitrocelulosa que actúa como fase inmóvil. La migración del complejo antígeno-anticuerpo en la fase móvil a través de la tira facilita que sea capturado el antígeno marcado por el anticuerpo monoclonal que está situado en la fase inmóvil. Esta unión produce una coloración en forma de tira o línea en la tira. La migración depende de varias características físicas de los reactivos que lo componen, como la porosidad de la membrana que controla el flujo y los componentes de la solución usada para transportar el complejo antígeno-anticuerpo en la muestra de sangre que ha sido lisada.

Existen dos tipos de pruebas rápidas, según estén basadas en la captura del antígeno proteína rica en histidina 2 (HRP2) o en la medida de la actividad del enzima lactato deshidrogenasa del parásito (LDHp). En la Tabla 2 se presentan las distintas pruebas comerciales que se utilizan y las empresas que los comercializan.

Las conclusiones que se obtienen de los estudios y ensayos realizados con estas pruebas señalan que en individuos con parasitaciones por debajo de 100 p/μl de sangre disminuyen drásticamente su sensibi-

lidad, quedando por debajo del diagnóstico microscópico tradicional mediante gota gruesa y extensión. Este hecho tiene gran importancia en el diagnóstico de aquellos casos importados en población semi-inmune (inmigrantes procedentes de áreas endémicas) incluidos los individuos asintomáticos⁷. También puede presentarse baja sensibilidad en viajeros con sospecha de paludismo que están recibiendo quimioprofilaxis, principalmente en resistencias de grado I y II, haciendo en muchos casos que las parasitemias estén por debajo de los 100 p/μl debido a la actuación del antipalúdico⁷. En cuanto a la especificidad, aquí podemos indicar que la mayoría de las pruebas son específicas para detectar *P. falciparum* o en algún caso *P. vivax*, no pudiéndose detectar infecciones mixtas. En general todas ellas son capaces de detectar *Plasmodium spp.* pero no las diferentes especies. Con respecto a la posibilidad de utilización en el seguimiento postratamiento y valoración de las pruebas de eficacia *in vivo* frente a antimaláricos, debemos reseñar que en un estudio comparativo realizado por nuestro laboratorio se ha comprobado que más de la mitad de los individuos tratados permanecen positivos después de 10 días o de 17 días según la prueba e incluso un paciente presentó positividad con una prueba el día 28⁷.

En definitiva, son pruebas que podrían ser utilizadas de manera rutinaria (algunos kits se han preparado para ser utilizados por viajeros cuyos resultados han sido reprobados por varios estudios retrospectivos) pero en cualquier caso necesitan confirmación de la especie y pueden presentar falsos negativos debido a su menor sensibilidad con respecto a la microscopía óptica⁸. Además, se observan positivities en individuos sin paludismo pero con desórdenes inmunológicos y/o presencia de factor reumatoide, al margen de que se ha observado que ciertas poblaciones de parásitos poseen una expresión muy baja de la HRP2. Estas pruebas rápidas, por el

Organismo	Nombre de la prueba	Comercial y Distribuidor*	Tipo de prueba
Plasmodium	Malaria-Ag	Cellabs	EIA
	Optimal	Flow	Rápido (LDH)
	MAKROmed malaria	MAKROmed Manufacturing LTD	Rápido (HRP2)
	Paracheck Pf	Orchid	Rápido (HRP2)
	Visitect Malaria Pf	Omega Diagnostics LTD	Rápido (HRP2)
	ICT Malaria Pf/Pv	Binax	Rápido (HRP2)
	ParaSight-F Kit	Becton-Dickinson	Rápido (HRP2)

Tabla 2.

*Cellabs, PO Box 421, Brookvale, NSW 2100, Australia. Flow, Inc., 6127 SW Corbett, Portland, OR 97201; *MaKROmed Manufacturing, LTD, PO Box 28928, Kensington 2101, South Africa; *Orchid, 4390 US Route One North, Princeton, NJ 08540; *Omega Diagnostics, LTD, Omega Hense, Carsebridge Court, Whins Road, Alloa, FK10. 3LQ, Scotland, United Kingdom; *Binax Inc, 317 Road Street Portland ME 04103. En España lo comercializa Durbiz SA. *Becton-Dickinson LTD

momento, deberían utilizarse con precaución y esperar a que futuras pruebas con mayor sensibilidad y especificidad aparezcan en el mercado. De hecho, su uso no está indicado para el diagnóstico de la infección palúdica en la mayoría de las presentaciones del paludismo (sirva por ejemplo que el Departamento de Salud y Servicios Humanos-Food and Drug Administration de los Estados Unidos no ha autorizado el uso de éstas para diagnóstico y sí para uso en estudios de investigación). Finalmente, comentar que estas pruebas no son utilizables por el momento en países en vías de desarrollo con moderada o elevada intensidad de transmisión. Esto es debido al mayor coste con respecto al diagnóstico microscópico y porque en estas áreas hasta un 80% de los menores de 10 años presentan parásitos en sangre, siendo la gran mayoría asintomáticos.

Pruebas diagnósticas basadas en la amplificación del ADN

En la actualidad han sido y están siendo utilizados numerosos métodos basados en la amplificación de ADN para la detección del paludismo⁹⁻¹². La primera necesita cinco PCRs para diferenciar las cuatro especies⁹ mientras la segunda usa una segunda PCR multiplex¹⁰. Todas están basadas en el uso de la

técnica "reacción en cadena de la polimerasa" mediante amplificación sencilla o múltiple del ADN, bien sea de genes que codifican para antígenos o proteínas concretas de *P. falciparum* (circumsporozoíto, proteína de superficie del merozoíto, genes STEVOR, etc.) o en amplificación del gen ADNr. Los más utilizados son los basados en la subunidad pequeña (18s) del ADNr ribosómico. La secuencia de bases de este ADNr es muy similar en todos los organismos aunque hay zonas cuya secuencia de bases es específica de cada plasmodio. Esta dualidad "secuencias específicas/secuencias comunes" permite el diseño de oligonucleótidos (*primers*) con diversos niveles de especificidad (*primers* universales, con especificidad de género, con especificidad de especie, etc.) y usarlos en un sistema denominado "Multiplex PCR" o detección de las cuatro especies en un único proceso de amplificación. Este sistema consiste en una primera amplificación para detectar al nivel de género (Plasmodium) y una "Multiplex PCR" a partir de ésta que nos va a permitir diferenciar las cuatro especies por el tamaño de los fragmentos obtenidos¹⁰. Actualmente es el método más sensible de detección, detectando con facilidad infecciones mixtas. En la Figura 2 se presenta el esquema de funcionamiento de la multiplex PCR.

En la primera PCR se utilizan dos pares de oligos: a) uno PLF "forward" y otro universal UNR "reverse" y, b) un oligo "forward" que amplifica universalmente los ADNr de humano y mamíferos HUF y el mismo universal UNR como "reverse". Este segundo par se utiliza para comprobar que la reacción no se ha inhibido, es decir funciona como control interno de la PCR.

En la segunda PCR se incluye el mismo oligo "forward" PLF y cuatro oligos "reverse" cada uno a diferente distancia del primero en el gen y que permiten diferenciar en un gel de agarosa los cuatro fragmentos correspondientes para cada especie de plasmodio.

En la Figura 3 se representa un gel de agarosa con los fragmentos obtenidos de muestras clínicas de pacientes con paludismo.

Dependiendo de las especies involucradas en la infección, el producto de amplificación, obtenido en esta segunda reacción, será de diferente tamaño: 250pb para *P. malariae*, 399pb para *P. falciparum*, 450pb para *P. ovale* y 500pb para *P. vivax*. En caso de infecciones mixtas se obtendrán diferentes fragmentos de amplificación en la misma muestra correspondientes a las especies involucradas.

Las ventajas de este método de diagnóstico son su sensibilidad y su especificidad, entre otros, y su

Figura 2.

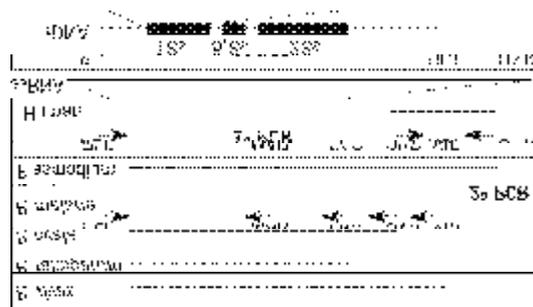
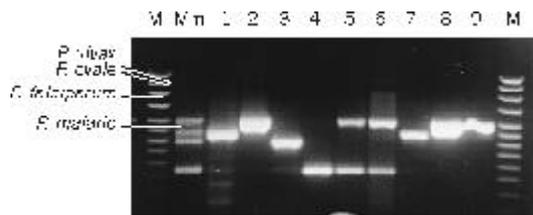


Figura 3.



M: Marcador (100pb); Mm: Marcador de malaria; 1 y 7 *P. ovale*; 2,8 y 9 *P. vivax*; 3 *P. falciparum*; 4 *P. malariae*; 5 y 6 Infecciones mixtas *P. vivax-P. malariae*

desventaja radica en la infraestructura necesaria y el tiempo en que se emite el diagnóstico, aunque éste queda mitigado por el amplio número de muestras que se pueden analizar al mismo tiempo.

Utilidad de la Multiplex PCR en un Laboratorio de Referencia

Basándonos en nuestra experiencia, podemos concretar que la incorporación de esta técnica de referencia y su conocimiento dentro del panorama comunitario español ha supuesto un incremento espectacular de muestras sospechosas, estando en la actualidad en unas 3000 las muestras que se prevén recibir durante el año 2002.

El uso de esta técnica ha representado un aumento del 15% de las muestras positivas en nuestro laboratorio así como de un 32% de controles postratamiento. En la Tabla 3 se puede observar el incremento de diagnósticos positivos realizados por nuestro laboratorio de referencia hasta el 2001.

Hay que destacar el aumento de la sensibilidad en el diagnóstico al utilizar la PCR (algo más de un 10% con respecto a la microscopía) y el incremento de infecciones mixtas detectadas (no detectadas por microscopía).

Desde que la técnica se ha incorporado en el laboratorio se está utilizando además en la vigilancia de donantes de riesgo en el Hospital de Donantes de la Cruz Roja en Madrid con un protocolo de colaboración que ha servido para analizar unas 750 sangres, habiendo detectado 5 muestras positivas frente a *P. falciparum*¹³.

Durante este tiempo, la PCR ha sido utilizada en la confirmación de dos paludismos inducidos-postransfusionales¹⁴, dos casos de malaria congénita¹⁵ y la primera infección descrita transmitida localmente causada por *P. ovale*¹⁶.

Para el futuro, se continúa con el desarrollo de las pruebas rápidas diagnósticas basadas en la inmunocromatografía y en la RT-PCR o PCR en tiempo real. Esta última, además de reducir el tiempo en las amplificaciones, es una técnica cuantitativa y se puede aplicar a la cuantificación de ADN y ARN¹⁷. Esta técnica combina la amplificación del ADN con la visualización directa mediante utilización de intercaladores de ADN como el "SYBR green", uso de sondas que producen hidrólisis, uso de sondas pareadas, "molecular beacons" o primers que se pueden unir a la secuencia de ADN presentando una

	1997	1998	1999	2000	2001
Nº Muestras	72	350	600	1123	1680
MICRO +	32	107	102	196	284
PCR +	47	163	189	281	344
	1997	1998	1999	2000	2001
<i>P. falciparum</i>	33	108	96	200	266
<i>P. malariae</i>	4	20	27	28	14
<i>P. ovale</i>	3	12	17	22	32
<i>P. vivax</i>	7	10	30	20	21
Mixtas	0	13	19	11	11

Tabla 3.

cadena intermedia en forma de anillo no unida ("sunrise primers" y "scorpion primers"). Todos ellos emiten fluorescencia cuando son excitados a una determinada longitud de onda. Esta tecnología está avanzando notablemente y será el futuro del diagnóstico microbiológico, pero de momento sólo podrán ser utilizadas en laboratorios muy especializados.

Finalmente, señalar que las pruebas serológicas (diagnóstico indirecto), sólo son útiles en bancos de donantes de riesgo y para viajeros no inmunes que hayan viajado a un área endémica.

Bibliografía

- Greenwood B, Mutabingwa T. Malaria in 2002. *Nature* 2002;(415)Feb 7:670-2.
- Bradley DJ, Warhust CD, Blaze M, Smith V, Williams J. Malaria imported into the United Kingdom in 1996. *Eurosurveillance* 1998;3:40-2.
- Apitzsch L, Rasch G, Kiehl W. Malaria imported into Germany in 1996. *Eurosurveillance* 1998;3:35-6.
- Machin I, Martín AM. Paludismo en países no endémicos. Revisión de la situación actual. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2001;19:270-2.
- Benito A, Roche J, Molina R, Amela C, Alvar J. Application and evaluation of QBC malaria diagnosis in a holoendemic area. *Applied Parasitology* 1994; 35:266-72.
- Kawamoto F. Rapid diagnosis of malaria by fluorescence microscopy with light microscope and interference filter. *Lancet* 1991;337:200-2.
- Rubio JM, Buhigas I, Subirats M, Baquero M, Puente S, Benito A. Limited level of accuracy provided by available rapid diagnosis test for malaria enhances the need for PCR-based reference laboratories. *Journal of Clinical Microbiology* 2001;July,39(7):2736-7.
- Witty CJM, Armstrong M, Behrens RH. Self-testing for falciparum malaria with antigen-capture cards by

- travellers with symptoms of malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2000;63:295-7.
9. Snounou G. Detection and identification of the four malaria species infecting humans by PCR amplification. In: *Species Diagnostics Protocols: PCR and other Nucleic Acid Methods*. Clapp, J.P. (editor), Totawa N.J.: Humana Press Inc, Methods in Molecular Biology, 1995,50:263-91.
 10. Rubio JM, Benito A, Roche J, Alvar J. Semi-nested Multiplex-PCR in detection of human malaria parasites and evidence of *Plasmodium vivax* infection in Equatorial Guinea (West Africa). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1999;60(2):183-7.
 11. Rubio JM, Benito A, Berzosa PJ, Roche J, Puente S, Subirats M, López-Velez R, García L, Alvar J. Usefulness of Seminested Multiplex PCR in Surveillance of Imported Malaria in Spain. *Journal of Clinical Microbiology* 1999;Oct, 37(10):3260-4.
 12. Humar A, Ohrt C, Harrington MA, Pillai D, Kain KC. Parasight (F test compared with the polymerase chain reaction and microscopy for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in travelers. *American Journal of Tropical Medicine And Hygiene* 1997; 56(1):44-8.
 13. Benito A, Rubio JM. The usefulness of the Seminested Malaria-PCR to screen blood donors at risk in Spain. *Emerging Infectious Diseases* 2001;7(6):1068.
 14. Benito A, Rubio JM. Paludismo posttransfusional causado por *Plasmodium falciparum*. Casos de Microbiología Clínica, SEIMC, Francisco Soria SA. Vol IV, caso 2000-2001;182:42-4.
 15. Rubio JM, Roche J, Berzosa PJ, Moyano E, Benito A. The potential utility of the Semi-Nested Multiplex PCR technique for the diagnosis and investigation of congenital malaria. *Diagnostic Microbiology & Infectious Diseases* 2000;38:233-6.
 16. Cuadros J, Segura J, Benito A, Arévalo J, Calero MA, Calvente MJ, Rubio JM. *Plasmodium ovale* Malaria Acquired in Central Spain, 2002. *Emerging Infectious Diseases*, Volume 8, Number 12, December (en prensa)
 17. Bell AS, Ranford-Cartwright LC. Real-time quantitative PCR in parasitology. *Trends in Parasitology* 2002; 18(8):337-42.