

ARTÍCULO ORIGINAL

Concordancia entre gota gruesa, inmunocromatografía y reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de malaria

Astrid Elena Montoya¹, José Menco¹, Natalia Osorio², María Alejandra Zuluaga², Juliana Duque², Giovanni Torres¹, Marcos Restrepo¹

¹ Instituto Colombiano de Medicina Tropical-CES, Sabaneta, Colombia

² Facultad de Medicina, Universidad CES, Medellín, Colombia

Introducción. El diagnóstico oportuno y efectivo del paludismo, o malaria, son condiciones determinantes para hacer un tratamiento adecuado de la enfermedad y un control de la misma. **Objetivo.** Se evaluó la concordancia de la sensibilidad, especificidad, valor diagnóstico positivo y negativo de una prueba rápida y de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con la prueba estándar, la gota gruesa, para el diagnóstico de la malaria.

Materiales y métodos. Se analizó una población de 100 pacientes con signos y síntomas indicativos de paludismo, procedentes de las zonas de Urabá, Córdoba, Bajo Cauca y de otras regiones de Colombia, como Valle, Chocó y Vichada, todas áreas endémicas de la enfermedad. A cada paciente se le practicó una gota gruesa, la prueba rápida OptiMAL® y la amplificación a través de una PCR de secuencias de ADN específicas para género y para *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*.

Resultados. La sensibilidad de la prueba rápida frente a la gota gruesa, para el diagnóstico de ambas especies de *Plasmodium* fue de 93,85% (IC95% 87,23-100) y la especificidad de 94,29% (IC95% 85,17-100).

La PCR comparada con la gota gruesa mostró una sensibilidad de 100% (IC95% 99,23-100) y una especificidad de 97,14% (IC95% 90,19-100).

Conclusiones. Estos hallazgos muestran que la sensibilidad y especificidad de la prueba rápida y la PCR para el diagnóstico de malaria son comparables con el examen al microscopio de la gota gruesa, recomendada por su eficacia y bajo costo.

Palabras clave: *Plasmodium*, malaria/diagnóstico, técnicas y procedimientos diagnósticos, valor diagnóstico de las pruebas, sensibilidad y especificidad, reacción en cadena de la polimerasa.

Concordance between thick blood smear, immunochromatography and polymerase chain reaction for malaria diagnosis

Introduction. The rapid and effective diagnosis of malaria is the determining condition for an appropriate treatment and control of the disease.

Objective. The sensitivity, specificity and the positive and negative predictive values were evaluated in cases of suspected malaria in Colombia in a comparison of a rapid diagnostic test, the PCR test and the thick blood smear—the traditional 'gold standard.'

Materials and methods. A group of 100 patients with symptoms compatible with malaria, were included in the study. They were selected from the following Colombian regions: Urabá, Córdoba, lower Cauca, and relatively fewer from other malaria endemic areas of Colombia including the provinces of Valle, Chocó in the central west of Colombia and Vichada to the east. To each patient the following three tests were performed: the rapid OptiMAL® test, the PCR identification and the thick blood smear. The PCR amplified specific DNA sequences with primers designed to identify the genus *Plasmodium*, and the two species present in Colombia, *P. falciparum* and *P. vivax*.

Results. The sensitivity of the rapid test versus the thick smear, for the diagnosis of both species of *Plasmodium* was 93.9% (95% CI: 87-100%) and the specificity was 94.3% (95% CI:

85-100%). The PCR compared with the thick smear showed a sensitivity of 100% (95% CI: 99-100%) and a specificity of 97.1% (95% CI: 90-100%).

Conclusions. The sensitivity and specificity of the three tests did not present statistically significant differences. However, the thick blood smear was recommended as the standard test, mainly due to its low cost.

Key words: *Plasmodium*, malaria/diagnosis, diagnostic techniques and procedures, predictive value of tests, sensitivity and specificity, polymerase chain reaction.

La malaria, o paludismo, es una enfermedad parasitaria, a la cual están expuestos 2.600 millones de personas, sobre todo aquéllas que habitan las regiones tropicales del mundo, en territorios situados hasta los 1.600 metros sobre el nivel del mar, con lluvias escasas, una temperatura media de 25 °C o en zonas donde predomina la vegetación selvática (1,2). El 85% del territorio colombiano reúne las condiciones climáticas y geográficas que favorecen la transmisión de la enfermedad.

De las cuatro especies del parásito que causan la enfermedad, *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum* son responsables de casi la totalidad de los casos que se presentan en Colombia, donde la enfermedad es endémica con casos autóctonos de prevalencia estable.

En las localidades endémicas de Colombia se registraron 125.872 y 107.866 casos de paludismo para los años 2004 y 2005, respectivamente (3,4), cifras que demuestran que aun con acciones orientadas al diagnóstico y tratamiento oportuno del paludismo, la prevalencia de esta enfermedad no se ha modificado en los últimos años.

El diagnóstico oportuno y efectivo es determinante para hacer el tratamiento adecuado de la enfermedad y el control de la misma. La detección y la identificación por microscopía de las especies de *Plasmodium* en muestras de sangre coloreadas con Giemsa y otros colorantes, ha sido tradicionalmente el método de referencia y no ha tenido modificaciones desde el año 1903 (5,6).

La gota gruesa es una metodología sencilla de realizar, económica, rápida, que permite la

identificación de la especie del parásito. Bajo condiciones óptimas, la sensibilidad de la gota gruesa es de 10 a 30 parásitos por microlitro de sangre, lo que, aproximadamente, equivale a 0,001% de glóbulos rojos infectados (7). Por otra parte, requiere de insumos, equipos y personal capacitado, particularmente cuando las parasitemias son bajas o existe una infección mixta, además del control periódico de la calidad de los procesos y de la experiencia de los microscopistas (8).

Se han empleado métodos alternativos para la identificación de las especies de *Plasmodium* a partir de muestras de sangre, como las pruebas inmunocromatográficas y las moleculares.

Las pruebas inmunocromatográficas, o rápidas, denominadas así porque se pueden hacer junto al paciente, se basan en un inmunoensayo que incorpora un anticuerpo monoclonal, algunas de ellas contra la proteína II del parásito rica en histidina (HRP-2) útil para el diagnóstico de *P. falciparum* (9-14), cuyo antígeno permanece por más de dos semanas lo que da como resultado falsos positivos. Otra prueba rápida, el DiaMed OptiMAL® (Flow Inc., Portland, Oregon) detecta el antígeno lactato deshidrogenasa (pLDH), enzima metabólica del parásito que se expresa sólo en los parásitos vivos, incluidos los gametocitos, y se usa para el diagnóstico tanto de *P. falciparum* como de *P. vivax* (11,15-20).

Esta metodología permite hacer un diagnóstico rápido o de urgencia, y es muy útil en lugares apartados donde no se dispone de un microscopio o de una persona debidamente entrenada para el estudio de la gota gruesa. Tiene una sensibilidad de 97% en infecciones cuando existen más de 100 parásitos/μl. También, como en el caso de la gota gruesa, puede dar falsos negativos cuando la parasitemia es baja. Los inconvenientes de las pruebas rápidas radican en que no es posible hacer

Correspondencia:

Astrid Elena Montoya, Carrera 43ª N° 52 sur-99.
Teléfono: (574) 305 3500; fax: (574) 301 4258.
amontoya@ces.edu.co

Recibido: 18/09/07; aceptado: 15/02/08

un cálculo del número de parásitos y que en pacientes tratados, la presencia de gametocitos da una prueba positiva para *P. falciparum* (15-20).

Los métodos moleculares basados en la amplificación del ADN se han empleado desde finales de la década de los años 80 para el diagnóstico de la malaria (12). El valor de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), método para el cual se han descrito diferentes secuencias blanco de amplificación y condiciones de reacción, radica en la alta sensibilidad, puesto que detecta de tres a cuatro parásitos por μl de sangre (0,0005% a 0,0015% de glóbulos rojos infectados). Además, permite la diferenciación de las especies, cuando existen dificultades morfológicas o una infección mixta (10,16,21-25).

Este es un método poco práctico para un diagnóstico de urgencia y su uso está limitado a países donde el paludismo no es endémico. También, y como en el caso de la gota gruesa, requiere personas expertas para ejecutar la técnica e interpretar los resultados. En la práctica, es un método más costoso y puede generar confusiones por que detecta ADN de parásitos no viables.

En el presente estudio, se compararon el método de PCR y la prueba de captación inmunocromatográfica OptiMAL®, usando como método de referencia para el diagnóstico de *Plasmodium* spp. la gota gruesa, y se determinaron la sensibilidad, la especificidad, los valores diagnóstico positivo y negativo de las pruebas.

Materiales y métodos

Área y población de estudio

Se realizó un estudio descriptivo de concordancia de 100 muestras obtenidas del mismo número de pacientes, correspondiente a una muestra ampliada, que se calculó con base en una población de 107.866 casos de paludismo que se registraron en Colombia para el año 2005, una prevalencia del evento (sensibilidad de la prueba) de 95% y un nivel de confianza de 95%.

Se consideraron para el estudio pacientes mayores de dos meses, con signos y síntomas indicativos de la enfermedad, procedentes de las zonas de Urabá, Córdoba, Bajo Cauca y otras zonas de

Colombia, que consultaron a los puestos de las direcciones locales de salud de los municipios de las zonas mencionadas, y a las sedes del Instituto Colombiano de Medicina Tropical-CES de Apartadó y de Sabaneta, en Antioquia, y que dieron su consentimiento para participar en este trabajo.

Técnica de recolección

Las muestras de sangre para realizar la gota gruesa, impregnar un papel de filtro para la extracción de ADN y llenar una pipeta aforada con 10 μl para la prueba inmunocromatográfica, se obtuvieron por punción con lanceta del pulpejo del dedo medio de la mano.

Tanto la lectura de la gota gruesa como la prueba rápida se efectuaron una vez tomada la muestra. El papel de filtro impregnado con la sangre, así como la gota gruesa ya coloreada con azul de metileno fosfatado, se conservaron a temperatura ambiente (28 °C a 32 °C) en el sitio de toma de la muestra hasta su traslado al laboratorio del Instituto Colombiano de Medicina Tropical en Sabaneta, lugar en el cual se hizo la extracción de ADN a partir del papel de filtro impregnado con la sangre y el control de calidad de la lectura de la gota gruesa.

Procesamiento de las muestras

La gota gruesa, realizada por duplicado, se coloreó con azul de metileno fosfatado y luego se tiñó con el colorante de Romanowsky modificado. El diagnóstico fue hecho por una persona capacitada en la preparación, lectura e informe de la gota gruesa.

El conteo de los parásitos se hizo con base en 100 leucocitos y, para informar la parasitemia por mm^3 se empleó como valor de referencia 8.000 leucocitos. La muestra se consideró negativa cuando no se observaron formas del parásito en más de 200 campos microscópicos revisados.

Se informó paludismo mixto cuando en 100 parásitos se encontraron trofozoítos maduros, esquizontes, gametocitos de *P. vivax* y 40% o más de trofozoítos inmaduros o la presencia de gametocitos de *P. falciparum*.

El control de calidad de la lectura de la gota gruesa se hizo en el laboratorio del Instituto Colombiano de Medicina Tropical en Sabaneta.

Prueba de captura inmunocromatográfica

Se utilizó el método rápido de la tirilla DiaMED OptiMAL®. Los estuches correspondientes a los lotes 13300.59.10 y 13300.66.10, incluían un dispositivo con una tira reactiva, un pozo que contenía el conjugado y otro pozo de lavado. El estuche también contenía la tapa para los pozos, un recipiente con la solución tampón y la pipeta con la marca impresa de 10 µl.

Tanto el procedimiento como el diagnóstico diferencial con base en el número de bandas presente en la tirilla de reacción, se efectuaron siguiendo las instrucciones del fabricante (19).

Extracción de ADN

La extracción del ADN se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones descritas por Fischer (26). Una tira de tres mm de largo por dos de ancho del papel de filtro impregnado con, aproximadamente, 50 µl de sangre total y conservada a temperatura ambiente (22 °C a 24 °C), se depositó en un tubo de 1,5 ml. Luego, se lavó dos veces con 1 ml de Tween® (Merck) al 0,1% en solución amortiguada de fosfato salino (PBS) durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación permanente. La tira del papel de filtro se transfirió a un tubo de 1,5 ml y se le adicionaron 200 µl de resina Chelex 100® (Sigma), preparada al 5% en agua destilada. Después de someter la muestra a una temperatura de 60 °C durante 30 minutos y posterior ebullición a 100 °C por 30 minutos, se centrifugó por tres segundos a 12.000g para recuperar el sobrenadante, el cual se conservó a -20 °C hasta realizar la PCR.

Selección de cebadores o iniciadores

Los iniciadores empleados se muestran en el cuadro 1. Para determinar la especificidad de las secuencias de estos iniciadores, se hizo un análisis BLAST (*basic local alignment search tool*), en la página de internet del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) y se seleccionaron aquéllos que mostraron una alta identidad con las secuencias reportadas para *Plasmodium* sp., *P. falciparum* y *P. vivax*, y un valor E del alineamiento inferior a 0,5 (27). Este procedimiento consistió en realizar una comparación base a base entre los cebadores, o iniciadores, y las secuencias previamente reportadas en las bases de datos del GenBank.

Acceso al GenBank

Los números de accesos de los cebadores seleccionados corresponden a M76611 (*P. falciparum*), X13926 (*P. vivax*).

Reacción en cadena de la polimerasa

El ADN se amplificó en un termociclador (JM Research, Inc.) usando cebadores específicos para género, *P. falciparum* (24) y *P. vivax* (25), así como para el gen de la β-globina humana (28), que se empleó como control interno para garantizar la ausencia de inhibidores (cuadro 1). Las condiciones de la reacción relacionadas con los perfiles térmicos y el número de ciclos se llevaron a cabo siguiendo las indicaciones descritas por Morassin (29), como se muestra en el cuadro 2. Para *P. vivax* se emplearon las mismas condiciones, excepto la temperatura de alineamiento que fue de 53 °C.

Cuadro 1. Cebadores empleados para la PCR convencional.

Especificidad	Cebadores	Secuencia (5'-3')	Producto PCR
β-globina	BG07	GGT TGG CCA ATC TAC TCC CAGG	262pb
	BG08	TGG TCT CCT TAA ACC TGT CTT G	
<i>Plasmodium</i> sp.	L1	GAC CTG CAT GAA AGA TG	595pb
	L2	GTA TCG CTT TAA TAG GCG	
<i>P. falciparum</i>	Pf1	GGA ATG TTA TTG CTA ACA C	422 pb
	Pf2	AAT GAA GAG CTG TGT ATC	
<i>P. vivax</i>	Pv1	CAC CAT TAA GTA CAT CAC	871 pb
	Pv2	TGT TAA TAC AAC TCC AAT	

Cuadro 2. Condiciones de la PCR β -globina, género y *P. falciparum*.

Reactivo	[] final	Perfil térmico		
Solución tampón para PCR	1X	Calentamiento inicial	95 °C	7'
MgCl ₂	2,5 mM	Desnaturalización	94	1'
Cebador hacia adelante	0,4 μ M	Alineamiento	56	2'
Cebador inverso	0,4 μ M	Extensión	72	1'
dNTP	200 μ M	Extensión final	72	5'
Polimerasa de Taq	0,5 U			
ADN	5,0 μ l	40 ciclos		

Las muestras de ADN que se emplearon como controles positivos para la PCR, tanto de género como de *P. vivax* y *P. falciparum*, se obtuvieron de sangre total de pacientes que estaban infectados con una de las especies del parásito.

Productos de la PCR

La electroforesis de un gel de agarosa al 1,5% en presencia de bromuro de etidio (1 μ l por cada 10 ml de gel, 10 mg/ml), sometido a una corriente de 100 voltios por una hora, y la posterior visualización de las bandas obtenidas en un fotodocumentador (UVP- Biomaging Systems®), permitieron identificar la presencia o ausencia de los parásitos de malaria y de la especie correspondiente.

El tiempo requerido para el procedimiento de la PCR hasta observar la banda del producto amplificado en el gel, fue de siete horas.

Análisis de los datos

Los datos se analizaron en el programa Epi Info versión 6.0 (*Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA*). La evaluación de las pruebas diagnósticas se hizo mediante el cálculo de los porcentajes de los índices de sensibilidad, especificidad, valor diagnóstico positivo, valor diagnóstico negativo y la concordancia entre las pruebas diagnósticas a través del índice kappa (Epidat 3.1). Además, se determinó para cada uno de los indicadores un intervalo de confianza de 95%.

Aspectos éticos

Este estudio, considerado de riesgo mínimo (artículo 11 de la Resolución 008430 de 1993), fue revisado y aprobado por el Comité Técnico y

el Comité de Bioética del Instituto Colombiano de Medicina Tropical, Universidad CES.

Resultados

Se analizaron 100 muestras, de las cuales, 52 (52%) provenían de la región de Urabá, 35 (35%) de las regiones de Córdoba y del Bajo Cauca y 13 (13%) de otras zonas como Valle, Chocó y Vichada. Los resultados obtenidos coincidieron, en el 90% de las muestras, por los tres métodos empleados para el diagnóstico.

Gota gruesa

En 65 pacientes (65%), las dos preparaciones de la gota gruesa hicieron el diagnóstico para *Plasmodium* sp., de las cuales, 33 (50,76%) fueron positivas para *P. falciparum*, 29 para *P. vivax* (44,6%) y tres muestras se reportaron como infecciones mixtas (4,6%). El conteo de los parásitos en las muestras positivas fluctuó entre 240 y 38.000 formas del parásitos/mm³ de sangre.

Prueba rápida OptiMAL®

Mediante la prueba rápida OptiMAL®, se diagnosticaron 63 pacientes (63%) con paludismo (cuadro 3).

En 37 pacientes, 59% de los casos diagnosticados, se observaron en la tirilla de reacción las tres bandas (C, P y Pf) correspondientes para hacer diagnóstico de *P. falciparum*. En 26, 41% de las pruebas rápidas, la tirilla de reacción mostró las señales en la banda de control y en la banda P, lo cual indica una prueba positiva para *P. vivax*.

Los tres casos en los cuales se hizo diagnóstico de paludismo mixto por gota gruesa y PCR, presentaron las tres bandas en la tirilla de reacción

Cuadro 3. Comparación de los resultados entre la gota gruesa y Optimal®.

Optimal	Gota gruesa			Negativo	Total general
	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	Mixto		
<i>P. falciparum</i>	32			2	34
<i>Plasmodium</i> sp.*		26	3		29
Negativo	1	3		33	37
Total general	33	29	3	35	100

*Con base en el perfil epidemiológico en Colombia, sp. se toma como positivo para *P. vivax*.

de la prueba rápida, lo que indica una prueba positiva para *P. falciparum*.

Reacción en cadena de polimerasa

El 66% de las muestras fueron positivas para género cuando se empleó como método diagnóstico la PCR (cuadro 4); 50% de ellas fueron positivas para *P. falciparum* y 45,5% para *P. vivax*. Los tres pacientes con diagnóstico de infección mixta por la gota gruesa (4,5%), dieron positivo para la PCR específica, tanto de *P. falciparum* como de *P. vivax*.

En todas las muestras se obtuvo amplificación para el gen de la β -globina humana, descartando así la presencia de inhibidores de la PCR. En la figura 1 se observa el gel de la electroforesis con los productos obtenidos de la PCR para β -globina, género, *P. falciparum* y para *P. vivax*.

Sensibilidad, especificidad, valores diagnóstico positivo y negativo, y concordancia de las pruebas

Al comparar la prueba rápida de OptiMAL® con la gota gruesa para el diagnóstico de *P. falciparum*, se encontró una sensibilidad de 96,97%, una especificidad de 94,29% y un valor diagnóstico positivo y negativo de 94,12% y 97,06%, respectivamente, como se muestra en el cuadro 5. La concordancia se determinó con base en el índice kappa y el valor que se obtuvo fue de 91,78%.

La sensibilidad para *P. vivax* fue de 89,66%, la especificidad de 94,29%, el valor diagnóstico positivo de 92,86%, el negativo de 91,67% y la concordancia de 90,75%.

Para el total de los casos de paludismo, tanto por *P. falciparum* como por *P. vivax*, se obtuvo una

sensibilidad de 93,85%, una especificidad de 94,29% y una concordancia de 89,22% (cuadro 5).

La sensibilidad de la PCR frente a la gota gruesa para *P. falciparum*, así como, la especificidad y la concordancia, fueron del 100%. Para *P. vivax* se obtuvo la misma sensibilidad que para *P. falciparum*, una especificidad de 97,14% y concordancia de 97,01%. El total de las muestras reveló sensibilidad del 100%, especificidad de 97,14% y concordancia de 97,79% (cuadro 6).

Resultados discrepantes

En siete muestras se encontraron discrepancias entre las pruebas empleadas.

El diagnóstico de cuatro pacientes (4%), tres con *P. vivax* cuyas parasitemias estaban entre de 25.000 y 36.000 parásitos por mm³, y uno con *P. falciparum* con un conteo de 4.000 trofozoítos por mm³, se hizo con la gota gruesa y fue consistente con lo que se obtuvo en la PCR, pero la prueba rápida OptiMAL® fue negativa y mostró ser reactiva sólo la banda de control interno revelando que la prueba funcionaba, pero que era negativa para cualquier tipo de *Plasmodium*.

En dos casos la prueba rápida OptiMAL® fue positiva para *P. falciparum*; estas mismas muestras fueron negativas por gota gruesa y por PCR. En una de las muestras no se observaron parásitos en la gota gruesa y la prueba rápida también se reportó como negativa, pero por PCR se encontró la banda de amplificación que indicaba ADN de *P. vivax*.

Discusión

Desde tiempo atrás, en las áreas endémicas para paludismo en Colombia, como en muchos otros países del mundo donde la enfermedad es un

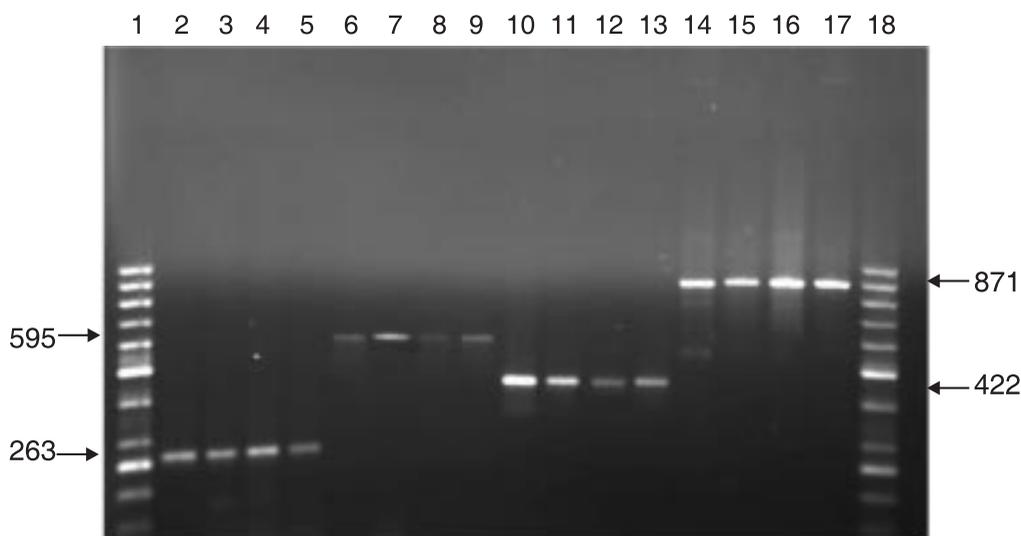


Figura 1. Gel de la electroforesis de los productos de la PCR; líneas 1 y 18: marcador de peso molecular (50 pares de bases); líneas 2 a 5: β -globina: control positivo y tres muestras de pacientes con malaria; líneas 6 a 9: control y muestras positivas para género *Plasmodium* sp., líneas 10 a 13: control y tres muestras positivas para *P. falciparum*; líneas 14 a 17: control y muestras positivas para *P. vivax*.

Cuadro 4. Comparación de los resultados entre la gota gruesa y la PCR.

Gota gruesa					
PCR	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	Mixto	Negativo	Total general
<i>P. falciparum</i>	33				33
<i>P. vivax</i>		29	1		30
Mixto			3		3
Negativo				34	34
Total general	33	29	3	35	100

Cuadro 5. Índices de sensibilidad, especificidad, valor diagnóstico positivo, valor diagnóstico negativo OptiMAL® Vs. gota gruesa (%).

	Sensibilidad	IC 95%	Especificidad	IC 95%	VDP	IC95%	VDN	IC 95%
<i>P. falciparum</i>	96,97	89,61-100	94,29	85,17 -100	94,12	84,74-100	97,06	89,91-100
<i>P. vivax</i>	89,66	76,85-100	94,29	85,17 -100	92,86	81,53-100	91,67	81,25-100
Total	93,85	87,23-100	94,29	85,17-100	96,83	91,70-100	89,19	77,83-100

Cuadro 6. Cálculo de los índices de sensibilidad, especificidad, valor diagnóstico positivo, valor diagnóstico negativo PCR Vs. gota gruesa.

	Sensibilidad	IC 95%	Especificidad	IC95%	VDP	IC 95%	VDN	IC 95%
<i>P. falciparum</i>	100	98,48-100	100	98,53-100	100	98,48-100	100	98,53-100
<i>P. vivax</i>	100	98,28-100	97,14	90,19-100	96,67	88,58-100	100	98,53-100
Total	100	99,23-100	97,14	90,19-100	98,48	94,78-100	100	98,53-100

problema de salud, el diagnóstico se hace a través de la observación al microscopio de la gota gruesa que se colorea con Giemsa o con Romanowsky modificado que, para el caso de Colombia, es el colorante más empleado. La sensibilidad y especificidad de este método están determinadas por la densidad de la parasitemia y por la experiencia del microscopista, con el riesgo de reportar falsos negativos o una especie del parásito diferente a la que está causando la infección.

Las muestras de este estudio provenían de zonas de Colombia donde el diagnóstico de malaria se realiza por microscopistas con un entrenamiento básico. Se evidenció que la observación al microscopio efectuada por ellos es acertada, orienta hacia el diagnóstico de especie y, por lo tanto, se puede hacer un tratamiento adecuado.

La prueba de captura OptiMAL® mostró ser muy sensible (96,97%) para la determinación de *P. falciparum*, hecho que concuerda con lo informado en un estudio previo (98,1%) realizado en Colombia (30) y similar a los resultados obtenidos en otros dos estudios (31,32), pero lejos de lo reportado por Londoño y colaboradores (33) quienes obtuvieron una sensibilidad de 40% en una población cuyo diagnóstico se hizo simultáneamente por gota gruesa y OptiMAL®. La sensibilidad para *P. vivax* fue inferior (89,66%) que para *P. falciparum* y es concordante con lo descrito en reportes previos (30,32).

La prueba rápida mostró ser muy específica tanto para el diagnóstico de *P. vivax* (94,29%) como para el de *P. falciparum* (94,29%), concordante con lo obtenido en trabajos previos llevados a cabo en Colombia (31,32).

Son contradictorias las razones para explicar los casos falsos positivos de *P. falciparum*. Por una parte, se menciona que la enzima metabólica lactato deshidrogenasa (pLDH) puede permanecer en la sangre hasta 10 días después de iniciada la terapia antipalúdica (34) y, por otra parte, que OptiMAL® no detecta antígeno a menos que los parásitos estén intactos y funcionales, de tal manera que los niveles de pLDH declinan simultáneamente con la disminución de los parásitos asexuados (35). Lo cierto es que no se observaron parásitos en la gota gruesa, ni se

obtuvo producto de amplificación para género y especie en estos dos casos.

Se ajusta lo encontrado en las pruebas que dan falso negativo, con lo informado por otros autores que han relacionado esta circunstancia con parasitemias altas (34), como las que en este caso se presentaron para *P. vivax*.

En este estudio, la PCR reveló una sensibilidad superior a la de la gota gruesa y una especificidad mayor que la de la prueba rápida, lo que permitió la detección de *Plasmodium* spp. en muestras con baja parasitemia y la identificación de ambas especies en las infecciones mixtas. La sensibilidad y especificidad de esta prueba son similares a lo reportado en estudios previos usando el mismo protocolo para la amplificación del ADN (21,22,24,25).

Con base en los resultados obtenidos en este estudio, la prueba rápida OptiMAL® y la PCR mostraron valores de sensibilidad y especificidad comparables con la gota gruesa, que es el método de referencia para el diagnóstico de malaria.

La prueba rápida, a pesar de ser una prueba cualitativa cuya sensibilidad es de 97% sólo cuando existen más de 100 parásitos/μl, de que no se puede diagnosticar un paludismo mixto ni hacer un cálculo del número de parásitos y de que en pacientes tratados la presencia de gametocitos da una prueba positiva para *P. falciparum* (15-20), es una herramienta útil para el diagnóstico de malaria, puesto que es de fácil interpretación y requiere un mínimo de entrenamiento para su empleo, sobre todo en lugares apartados que no cuentan con la infraestructura adecuada para el diagnóstico por microscopía y, además, las muestras se pueden conservar a temperatura ambiente en condiciones hasta de 30 °C sin menoscabo de su viabilidad.

El uso de cualquiera de estos métodos de diagnóstico requiere del seguimiento y acompañamiento por parte de los entes encargados de la calidad y manejo de los programas de control del paludismo.

La reacción en cadena de la polimerasa es el método más sensible y específico que existe hasta el momento, para el diagnóstico de malaria,

pero requiere de personal muy bien entrenado y de una tecnología apropiada, y frente a las otras dos pruebas resulta muy costosa. Tiene valor en pacientes con síntomas y gota gruesa negativa, para confirmar la especie en los casos en que existan dudas, en infecciones mixtas y para evaluar la respuesta al tratamiento.

La gota gruesa es el método de elección para el diagnóstico del paludismo; se debe seguir entrenando al personal de áreas afectadas por esta grave enfermedad en la lectura de las láminas.

Se proponen las pruebas de captura inmunocromatográfica como método de confirmación y se deben tener disponibles en las zonas afectadas por esta enfermedad por su alta sensibilidad, su fácil realización y su costo accesible.

Agradecimientos

A la Universidad CES por el soporte financiero, a Berta Nelly Restrepo por su colaboración en el análisis de los resultados, a David Botero por la revisión del artículo, a la microscopista Aleida Gutiérrez por la labor de campo y a los pacientes por acceder a participar en este trabajo.

Conflicto de interés

Los autores del artículo declaran no tener ningún tipo de compromiso con las casas comerciales que producen o distribuyen las pruebas inmunocromatográficas para el diagnóstico rápido del paludismo, ni los cebadores y demás elementos empleados para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa.

Financiación

Este estudio fue financiado por la Dirección de Investigación de la Universidad CES y por el Instituto Colombiano de Medicina Tropical-CES.

Referencias

1. **World Health Organization.** World Malaria Report. RBM/WHO/ UNICEF. Geneva: WHO; 2005.
2. **Hay SI, Guerra CA, Tótem AJ, Noor AM, Snow RW.** The global distribution and population at risk of malaria past, present and future. *Lancet Infect Dis.* 2004; 4:327-36.
3. **Dirección Seccional de Salud de Antioquia.** Eventos de vigilancia epidemiológica. *Revista Epidemiológica de Antioquia.* 2006;28:39-40.
4. **Instituto Nacional de Salud.** Tablas de notificación semanal obligatoria. Semana 52 de 2006. [Consultado: agosto de 2007]. Disponible en: http://www.ins.gov.co/pdf/vcsp/Tablas/2006/2006_semana_52.pdf
5. **Aron JL.** Malaria epidemiology and detectability. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1982;76:595-601.
6. **Ndao M, Bandyayera E, Kokoskin E, Gyorkos TW, MacLean JD, Ward BJ.** Comparison of blood smear, antigen detection, and nested-PCR methods for screening refugees from regions where malaria is endemic after a malaria outbreak in Quebec, Canada. *J Clin Microbiol.* 2004;42:2694-700.
7. **Perandin F, Manca G, Piccolo A, Calderaro A, Galati L, Ricci L, et al.** Identification of *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* and *P. malariae* and detection of mixed infection in patients with imported malaria in Italy. *New Microbiol.* 2003;26:91-100.
8. **Barat L, Chipipa J, Kolczak M, Sukwa T.** Does the availability of blood slide microscopy for malaria at health centers improve the management of persons with fever in Zambia? *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 60:1024-30.
9. **Garcia M, Marlborough D, Leafasia J, Rieckmann KH.** Immunochromatographic test for malaria diagnosis. *Lancet.* 1996;347:1549.
10. **Craig MH, Sharp BL.** Comparative evaluation of four techniques for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1997;91:279-82.
11. **Stow NW, Torrens JK, Walker J.** An assessment of the accuracy of clinical diagnosis, local microscopy, and a rapid immunochromatographic card test in comparison with expert microscopy in the diagnosis of malaria in rural Kenya. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999;93:519-20.
12. **Moody A.** Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15:66-78.
13. **Coleman RE, Maneechai N, Rachapaew N, Kumpitak C, Soyseng V, Mille RS, et al.** Field evaluation of the ICT Malaria Pf/Pv immunochromatographic test for the detection of asymptomatic malaria in a *Plasmodium falciparum/vivax* endemic area in Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66:379-83.
14. **World Health Organization.** Malaria rapid diagnosis, making it work meeting. Informal consultation on field trials and quality assurance on malaria rapid diagnostic test. 20-23 January 2003. World Health Organization, Regional Office for the Western Pacific. Geneva: WHO; 2003.
15. **Palmer CJ, Lindo JF, Klaskala WI, Quesada JA, Kaminsky R, Baum MK, et al.** Evaluation of the OptiMAL test for rapid diagnosis of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* malaria. *J Clin Microbiol.* 1998;36:203-6.

16. **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;37:3644-6.
17. **Piper R, Lebras J, Wentworth L, Hunt-Cooke A, Houze S, Chiodini P, et al.** Immunocapture diagnostic assays for malaria using *Plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH). *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 60: 109-18.
18. **Iqbal J, Muneer A, Khalid N, Ahmed MA.** Performance of the OptiMAL test for malaria diagnosis among suspected malaria patients at the rural health centers. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;68:624-8.
19. **Palmer CJ, Bonilla JA, Bruckner DA, Barnett ED, Millar NS, Haseeb MA, et al.** Multicenter study to evaluate the OptiMAL test for rapid diagnosis of malaria in U.S. hospitals. *J Clin Microbiol.* 2003;41:5178-82.
20. **Kolaczinski J, Mohammed N, Ali I, Ali M, Khan N, Ezard N, et al.** Comparison of the OptiMAL rapid antigen test with field microscopy for the detection of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*: considerations for the application of the rapid test in Afghanistan. *Ann Trop Med Parasitol.* 2004;98:15-20.
21. **Kain KC, Lanar DE.** Determination of genetic variation within *Plasmodium falciparum* by using enzymatically amplified DNA from filter paper disks impregnated with whole blood. *J Clin Microbiol.* 1991;29:1171-4.
22. **Kain KC, Brown AE, Mirabelli L, Webster HK.** Detection of *Plasmodium vivax* by polymerase chain reaction in a field study. *J Infect Dis.* 1993;168:1323-6.
23. **Roper C, Elhassan IM, Hviid L, Giha H, Richardson W, Babiker H, et al.** Detection of very low level *Plasmodium falciparum* infections using the nested polymerase chain reaction and a reassessment of the epidemiology of unstable malaria in Sudan. *Am J Trop Med Hyg.* 1996;54:325-31.
24. **Tan TM, Nelson JS, Ng HC, Ting RC, Kara UA.** Direct PCR amplification and sequence analysis of extrachromosomal *Plasmodium* DNA from dried blood spots. *Acta Trop.* 1997;68:105-14.
25. **Tham JM, Lee SH, Tan TM, Ting RC, Kara UA.** 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;37:1269-73.
26. **Fischer A, Lejczak C, Lambert C, Servais J, Makombe N, Rusine J, et al.** Simple DNA extraction method for dried blood spots and comparison of two PCR assays for diagnosis of vertical human immunodeficiency virus type 1 transmission in Rwanda. *J Clin Microbiol.* 2004;42:16-20.
27. **Altschul SF, Madden TL, Schaffer A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997;25:3389-402.
28. **Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al.** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for the diagnosis of sickle-cell anemia. *Biotechnology.* 1992;24:476-80.
29. **Morassin B, Fabre R, Berry A, Magnaval JF.** One year's experience of polymerase chain reaction as a routine method for the diagnosis of imported malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66:503-8.
30. **Mendoza NM, Montoya R, García M, Padilla JC, Bruzón LO, Mendoza E, et al.** Evaluación de campo de una prueba rápida para el diagnóstico de malaria. *Biomédica.* 2001;21:313-9.
31. **Ferro BE, González IJ, de Carvajal F, Palma GI, Saravia N.** Performance of OptiMAL® in the Diagnosis of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infection in malaria referral center in Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97:731-5.
32. **van den Broek I, Hill O, Gordillo F, Angarita B, Hamade P, Counihan H, et al.** Evaluation of three rapid tests for diagnosis of *P. falciparum* and *P. vivax* malaria in Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75:1209-15.
33. **Londoño B, Carmona J, Blair S.** Comparación de los métodos Optimal® y gota gruesa para el diagnóstico de malaria en una zona endémica sin epidemia. *Biomédica.* 2002;22:466-75.
34. **Humar A, Harrington MA, Pillai D, Kain KC.** ParaSight™-F test compared with the polymerase chain reaction and microscopy for the diagnosis of *P. falciparum* malaria in travelers. *Am J Trop Med Hyg.* 1997;56:44-8.
35. **Tjitra E, Suprianto S, McBroom J, Currie BJ, Anstey NM.** Persistent ICT Malaria Pf/Pv panmalarial and HRP2 antigen reactivity after treatment of *Plasmodium falciparum* malaria is associated with gametocytemia and results in false-positive diagnosis of *P. vivax* in convalescence. *J Clin Microbiol.* 2001;39:1025-31.