

Malaria: consideraciones sobre su diagnóstico

Germán Campuzano Zuluaga¹, Silvia Blair Trujillo²

Resumen: la malaria ha afectado la especie humana y por varios milenios y aún continúa siendo una de las enfermedades que más morbilidad y mortalidad causan, particularmente en las regiones tropicales de países en desarrollo. Es la infección parasitaria más importante, causando más de un millón de muertes al año en el mundo. La malaria es producida por cinco especies de *Plasmodium* que infectan al hombre: *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. knowlesi* y *P. falciparum*; esta última es la que mayor riesgo tiene para los pacientes por su capacidad de infectar eritrocitos de todas las edades, quedar atrapado en la microcirculación y por su resistencia a los antimaláricos. Debido al aumento de la resistencia de los parásitos a los agentes antimaláricos y al incremento de los viajes internacionales, entre otros factores, la malaria continúa siendo un importante problema de salud pública. En este módulo se describen los aspectos más importantes del parásito y de la enfermedad, incluyendo el ciclo de vida, la epidemiología y las manifestaciones clínicas asociadas. Por último, se hace especial énfasis en las diferentes pruebas diagnósticas, sus indicaciones y su disponibilidad.

Palabras clave: malaria, *Plasmodium*, epidemiología, clínica, diagnóstico.

Campuzano-Zuluaga G, Blair-Trujillo S. Malaria: consideraciones sobre su diagnóstico. *Medicina & Laboratorio* 2010; 16: 311-354.

Módulo 1 (La clínica y el laboratorio), número 81. Editora Médica Colombiana S.A., 2010®.

Recibido el 5 de agosto, 2010; aceptado el 20 de agosto, 2010.

La malaria es la infección parasitaria de mayor impacto e incidencia en el mundo. La infección es causada por parásitos protozoarios pertenecientes al género *Plasmodium* que invaden inicialmente el hígado y luego los eritrocitos. La enfermedad se caracteriza por la aparición súbita de fiebre, que se puede acompañar de cefalea, escalofrío y sudoración profusa. Estos síntomas son intermitentes y generalmente aparecen 10 a 15 días después de la picadura del mosquito vector género *Anopheles* infectado con *Plasmodium*. Cuatro especies causan la mayoría de las infecciones humanas: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, y *P. ovale*, de las cuales *P. falciparum* es la responsable de la presentación clínica más grave y de mayor incidencia en casos de desenlace fatal [1]. *P. knowlesi* infecta principalmente a primates no humanos pero se conocen de casos de transmisión a humanos [2].

¹ Médico General. Grupo Malaria, Universidad de Antioquia, Sede de Investigación Universitaria SIU. Calle 62 No 52-59, Laboratorio 610. Laboratorio Clínico Hematológico, Carrera 43C No. 5-33. Medellín, Colombia. E-mail: german-cz81@gmail.com

² Médica General, MSc. Profesora, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Directora Grupo Malaria, Universidad de Antioquia. Sede de Investigación Universitaria SIU, Calle 62 No 52-59, Laboratorio 610. Medellín, Colombia. E-mail: sblair@quimbaya.udea.edu.co

El diagnóstico parasitológico preciso y oportuno es un requisito para el manejo adecuado de los pacientes con malaria. Esto ha hecho que el diagnóstico parasitológico sea una estrategia costo-eficiente para el manejo de la malaria [3]. En el año 2009, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció que el diagnóstico parasitológico, por medio de microscopía y las pruebas rápidas de diagnóstico (RDTs, del inglés *Rapid Diagnostic Tests*), sean una condición necesaria para el manejo de la malaria y determina que el tratamiento empírico sólo se debe hacer en condiciones donde esta práctica no esté disponible [3-4]. Hay estudios que sugieren que en algunas zonas de alta endemicidad en África, con bajos recursos, se justifica dar tratamiento a niños menores de 5 años sólo con diagnóstico clínico [5]; sin embargo, el consenso internacional con vocería en la OMS no avala actualmente esta estrategia [3]. Es importante resaltar que el retraso en el diagnóstico se asocia a un aumento de las complicaciones y mortalidad en pacientes con malaria. Por ejemplo, en Estados Unidos, de 185 casos de malaria importada hubo 18 pacientes que nunca recibieron terapia y de éstos, 12 fueron diagnosticados en la autopsia [6].

Historia reciente de la malaria

Hacia mediados del siglo pasado la erradicación de la malaria del mundo parecía posible [7]. Entre 1955 y 1967, la OMS puso en marcha una campaña de erradicación de la malaria, a través de programas de fumigación con DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) para eliminar vectores *Anopheles* spp. La erradicación fue exitosa en zonas subtropicales, pero falló en gran medida en el resto del mundo tropical [1]. Con la introducción de la cloroquina hacia mediados del siglo XX, se produjo un descenso dramático en la mortalidad por malaria [8]. Infortunadamente, hacia finales de la década de los 60 y en décadas posteriores comenzaron a surgir cepas de *P. falciparum* resistentes a cloroquina, lo cual llevó a un aumento en la mortalidad asociada a malaria [8]. El fenómeno ha obligado al desarrollo de nuevas estrategias de manejo para malaria, como dar tratamientos combinados basados en derivados de artemisinina y la implementación de RDTs. Recientemente, a raíz de la implementación de programas de control a gran escala recomendados por la OMS, y la colaboración internacional, junto con las herramientas de diagnóstico y tratamiento actualmente disponibles, hacen que pensar en erradicar la malaria sea una meta posible en las próximas décadas [1, 9-10]. Como parte de los Objetivos de Desarrollo del Milenio propuestos por la Organización de las Naciones Unidas, está el hacerle frente al problema de la malaria y se están destinando recursos para esto. Además, varias estrategias como Roll Back Malaria [11], la Iniciativa Multilateral para la Malaria [12] y el Programa Global para la Malaria de la OMS [13] vienen coordinando esfuerzos para lograr el control de la enfermedad. Se estima que se requiere de aproximadamente 6.180 billones de dólares para 2010 y luego 5.126 billones de dólares anuales en promedio entre los años 2011 y 2020 para lograr controlar la malaria [14]. Sin embargo, aún estamos lejos de lograr las metas propuestas: para el año 2007, se invirtió sólo 1.107 billones de dólares, con una brecha entre lo invertido y lo requerido de 4.266 billones de dólares [14]. La OMS ha propuesto como metas para el control de la malaria, entre otras, una disminución de casos por cada 1.000 habitantes de más del 50% para el 2010 y de más del 75% para el 2015, en comparación con los casos del año 2000 (ver **figura 1**).

Epidemiología

Actualmente hay 108 países con malaria, con aproximadamente 3.300 millones de personas expuestas a la malaria mundialmente, con 247 millones de casos y 881.000 muertes anuales, 85% de éstas en niños menores de 5 años [1, 14]. La malaria lleva a la disminución en la productividad, ausentismo laboral, muerte prematura y a altos costos médicos [15]. El costo de manejo de la malaria asciende a 12 billones de dólares anuales y tiene un impacto de 35,4 millones de Años de Vida Ajustados por Discapacidad (AVAD) perdidos sólo en África subsahariana [14]. En la región de América hay transmisión de malaria en 21 países, con aproximadamente 77% de los casos por *P. vivax*; sin embargo, hay regiones de alta endemicidad para *P.*

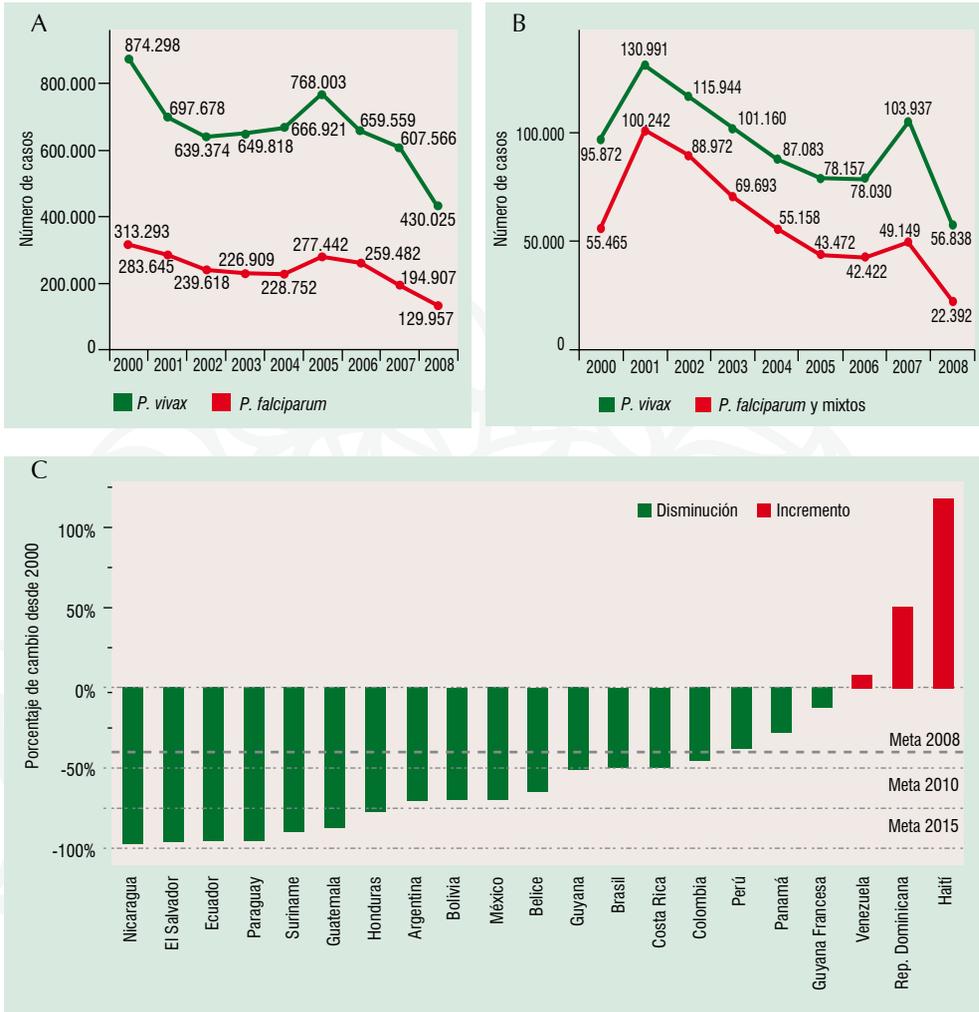


Figura 1. (A) Número de casos anuales por especie en la región de las Américas entre los años 2000 a 2008. (B) Número de casos anuales por especie en Colombia entre los años 2000 a 2008. (C) Porcentaje de cambio en el número de casos de malaria en el año 2008 comparado con el año 2000 para los países que integran la región de las Américas (Latinoamérica y el Caribe), en relación a las metas establecidas para el control y erradicación de la malaria. Tomado de **Organización Panamericana de la Salud**. Informe de la Situación del Paludismo en las Américas, 2008.

falciparum donde los casos alcanzan casi el 100%, como en Haití y en República Dominicana (ver **tabla 1**) [3]. La región de América Latina y el Caribe representan aproximadamente el 1,1% de los casos de malaria en el mundo y registran 3.000 muertes anuales [14].

Colombia es el segundo país con más malaria en Sur América con 18 millones de personas expuestas [16], 107.189 casos en el año 2007 [17] y 84.525 casos (7,3 casos por 1.000 habitantes) de malaria en el 2009, el 73,5% producidos por *P. vivax* [18]. La distribución de la malaria por departamentos se puede ver en la **figura 2**. Aunque *P. vivax* predomina en Colombia, hay departamentos donde la infección por *P. falciparum* representa un alto porcentaje del total de casos de malaria: Chocó (36,6%), Magdalena (48,1%), Valle del Cauca (49,8%), Nariño (81,7%) y Cauca (93,2%) [18]. La infección por *P. malariae* es la tercera en frecuencia en Colombia, con 34 casos reportados para el 2009 [18]. En Colombia, la tasa de positividad para la gota gruesa es de 24,3% en pacientes con sospecha de malaria (es decir, 1 de cada 4 gotas gruesas solicitadas es positiva) [17].

Tabla 1. Número de casos de malaria por especie para cada país en Sur América y El Caribe en el año 2008. Tomado de **Organización Panamericana de Salud**. Informe de la Situación del Paludismo en las Américas. Programa de Paludismo de Enfermedades Transmisibles; 2008.

País	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	Total
Brasil	49.181	266.371	315.630
Colombia	22.392	56.838	79.230
Perú	4.492	37.722	42.214
Haití	36.769	6	36.774
Venezuela	5.540	26.437	32.037
Guyana	5.741	5.920	11.815
Bolivia	836	8.912	9.748
Honduras	610	7.615	8.225
Guatemala	50	7.148	7.198
Ecuador	491	4.495	4.986
Guyana francesa	1.105	2.149	3.264
México	0	2.357	2.357
República Dominicana	1.839	1	1.840
Surinam	838	639	1.490
Costa Rica	0	966	966
Nicaragua	61	701	762
Panamá	4	740	744
Belice	0	538	538
Paraguay	7	333	341
Argentina	0	106	106
El Salvador	1	31	33
Total	129.957	430.025	560.298

Ciclo de vida del parásito

La malaria es transmitida principalmente al humano por la picadura de mosquitos hembra de género *Anopheles*, quienes introducen la forma infectante del parásito al torrente sanguíneo. El ciclo de vida del parásito está representado en la **figura 3** e inicia con el ingreso de los esporozoítos a la circulación luego de la picadura por el mosquito [19-21].

El vector

El vector de la transmisión es el mosquito hembra de género *Anopheles* (ver **figura 4**), perteneciente a la familia Culicidae. El ciclo de vida del mosquito es de cuatro estadios: huevo, larva, pupa y adulto; los tres primeros transcurren en el agua. Es muy importante reconocer sus hábitos de alimentación (nocturna o diurna), sus fuentes de alimento (el humano, otros primates, otros mamíferos) y hábitat usual (intra o extra domiciliario) [1, 22]. Dentro del género *Anopheles* se han descrito cerca de 400 especies, y de éstas, un poco más de 20 transmiten el parásito, con una eficiencia variable. En Colombia los principales vectores son *A. albimanus*, *A. neivai* (pacífico), *A. pseudopunctipennis*, *A. nuñezovari* (Orinoquía y Amazonía) y *A. darlingi* (Amazonía) [23]. Históricamente el control vectorial ha sido la estrategia más barata y de mayor éxito en el control de la malaria, enfocándose en dos objetivos: bajar la densidad vectorial y evitar las picaduras infecciosas [19, 24]. Los primeros programas trataron de destruir el hábitat de las larvas de mosquitos y los humedales de drenaje, pero los mosquitos pueden reproducirse en cuerpos pequeños de agua que no se pueden eliminar. La otra estrategia

de reducción de la densidad del mosquito se basa en la eliminación de adultos con insecticidas químicos y con agentes biológicos de control como nemátodos y hongos [25]. Por otra parte, la implementación de mosquiteros impregnados con insecticida en la actualidad es la estrategia que mayor impacto ha logrado en regiones de alta endemicidad y tiene dos ventajas: protege a las personas de enfermedades infecciosas y reduce las picaduras de las poblaciones de vectores [26]. Una desventaja del uso de los insecticidas, es la capacidad que tienen los mosquitos de desarrollar resistencia a los mismos [27]. Otra estrategia novedosa es la liberación de mosquitos genéticamente manipulados que no permiten el desarrollo del parásito en su sistema digestivo [25, 28-29].

Fisiopatología de la malaria

La fisiopatología de la malaria y las manifestaciones clínicas están estrechamente ligadas a la especie de parásitos y su ciclo de vida (ver **figura 5**) y a la inmunidad del hospedero con malaria. Los síntomas clásicos de la malaria corresponden con la ruptura del gran número de esquizontes circulantes que liberan merozoítos a la sangre, y después de varios ciclos eritrocíticos aumenta la concentración del Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α) [30-31]. Se ha encontrado que con la salida de los merozoítos del esquizonte se liberan múltiples moléculas con capacidad de activar macrófagos. La molécula del parásito con mayor potencial para estimular macrófagos, entre algunas otras poco comprendidas, son los fragmentos de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) del parásito [32]. La estimulación de los macrófagos por esta molécula induce la producción de citoquinas proinflamatorias y altas concentraciones de TNF- α , que generan un estado de inflamación sistémica produciendo los síntomas clásicos de la malaria [32-33].

P. falciparum es la especie de *Plasmodium* que más produce secuestro de parásitos en la microcirculación, debido a la expresión de moléculas de adherencia en su membrana y a las alteraciones que causa en los eritrocitos que parasita [34]. El secuestro de *P. falciparum* lleva a la caída del aporte de oxígeno y glucosa, a acidosis y disfunción celular, que son claves para explicar muchas de las manifestaciones y complicaciones de la infección [35]. El secuestro de *P. falciparum* evita que éste sea depurado por el bazo, favorece su multiplicación en grandes cantidades [36], y aumenta su sobrevivencia en las vénulas poscapilares donde hay menor presión de oxígeno, y en consecuencia menor estrés oxidativo [37].

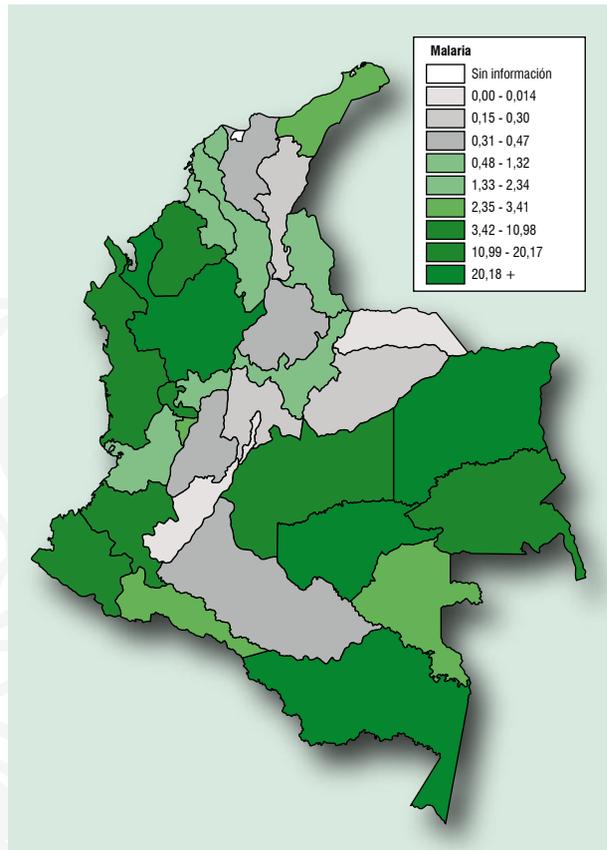


Figura 2. Incidencia anual (casos por cada 1.000 habitantes) de malaria por departamentos en el año 2009. **Ministerio de la Protección Social República de Colombia.** Cuadros de Indicadores Salud Pública, Tasa de incidencia de malaria en población a riesgo Bogotá; 2009. Mapa elaborado con Epi Info™ 3.5.1. Centers for Disease Control and Prevention (CDC).

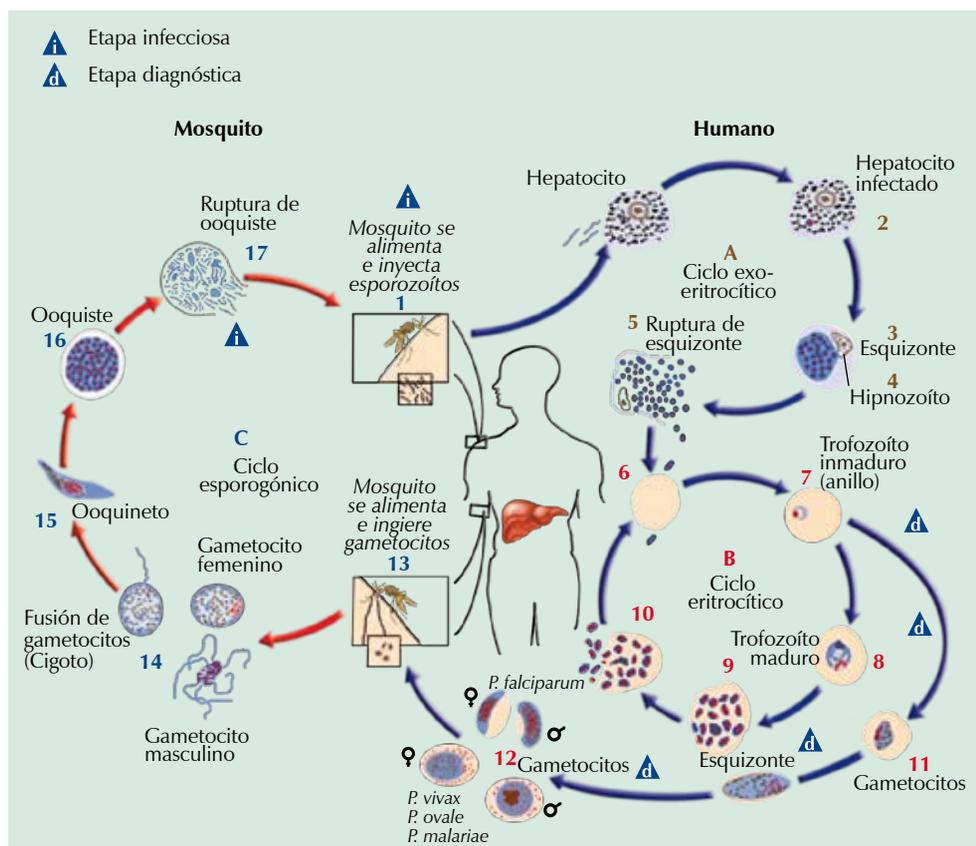


Figura 3. Ciclo de vida de *Plasmodium*. El ciclo de vida del parásito posee dos fases, una asexual que se da en el hospedero humano (flechas azules) y una sexual que se da en el vector *Anopheles* spp. (flechas rojas). En el humano, el ciclo empieza con la fase exoeritrocítica (A) cuando por la picadura de mosquitos hembra del género *Anopheles*, se introduce la forma infectante del parásito (**esporozoítos**) al torrente sanguíneo (1). Luego los esporozoítos migran al hígado en aproximadamente 30 minutos, donde logran evadir la respuesta inmune de los macrófagos de Kupffer e infectan los hepatocitos (2). Una vez dentro del hepatocito maduran, aproximadamente en 4 semanas (tiempo de incubación) a **esquizontes tisulares** (3). Además, en las especies de *P. vivax* y *P. ovale* existe otra forma del parásito, el **hipnozoíto** (4), donde el parásito persiste en forma latente dentro del hepatocito y es el responsable del fenómeno de recaída meses después de la infección primaria. Con la ruptura de los esquizontes tisulares se liberan **merozoítos** al torrente sanguíneo (5), iniciando la fase eritrocítica del ciclo (B), en la cual los parásitos se adhieren e invaden los eritrocitos (6). En los eritrocitos se desarrolla el estado de **trofozoítos** que pasa por un proceso de maduración, acumulando progresivamente hemozoína, pasando por las formas de **trofozoítos anulares** (7), **trofozoítos maduros** (8) y **esquizontes** (9). El esquizontes eritrocítico acumula **merozoítos** y luego se rompe (10) liberando merozoítos que invadirán otros eritrocitos para continuar con la etapa de reproducción asexual eritrocítica del parásito. La liberación periódica de merozoítos de los esquizontes eritrocíticos produce los paroxismos de la malaria posteriores al primer paroxismo. Durante la fase eritrocítica, algunos trofozoítos se diferencian (11) a la forma sexual del parásito o **gametocito masculino** (microgametocito) o **gametocito femenino** (macrogametocito) (12). Los gametocitos circulantes son capturados cuando el mosquito pica al hospedero durante la alimentación (13) y una vez en el intestino del mosquito, los gametocitos se fusionan para formar cigotos (14) e iniciar la parte sexual del ciclo en el mosquito (C). El cigoto se desarrolla a ooquinetos invasores (15) que atraviesan el intestino medio y se transforman en un ooquiste (16), que a través de divisiones mitóticas sucesivas, en 10 a 14 días producen miles de esporozoítos que luego son liberados del quiste (17) y que migran a las glándulas salivales, desde donde pueden infectar al humano para reiniciar el ciclo (1).

El secuestro de parásitos se puede explicar por los siguientes procesos: 1) citoadherencia del eritrocito infectado al endotelio activado [38]; 2) formación de rosetas (unión de eritrocitos infectados y no infectados) [39]; 3) disminución de la maleabilidad del eritrocito [40]; y, 4) en el caso de la malaria placentaria, colección de parásitos en la matriz de proteoglicanos en la superficie de la placenta [41]. El fenómeno de citoadherencia se produce a través de puntos de unión llamados protuberancias o “knobs”, que corresponden a zonas en la membrana del eritrocito infectado con alta concentración de la proteína PfEMP-1 o proteína de membra-

na eritrocitaria 1 de *P. falciparum* [38]. La PfEMP-1 es la proteína involucrada en la patogenicidad de *P. falciparum*, es codificada por una familia de 60 genes var, responsables de la variación antigénica y de la citoadherencia de los eritrocitos parasitados a las células endoteliales y a las células del sincitiotrofoblasto de la placenta [42, 43]. Usualmente, una variante de PfEMP-1 se expresa mientras las otras permanecen silentes.



Figura 4. Fotografía que muestra una hembra *Anopheles albimanus* alimentándose del hospedero. Nótese la disposición “en aguja” característica que adopta el mosquito al picar. Cortesía James Gathany. CDC, Atlanta.

Los parásitos que causan la malaria severa tienden a expresar un pequeño subconjunto de estas proteínas, que difieren de las expresadas por los parásitos que causan infecciones no complicadas [44]. Las moléculas de PfEMP-1 se adhieren principalmente a CD36, ICAM-1, trombospondina, PECAM/CD31 [45] y condroitín sulfato A (CSA) [4], en diferentes lechos vasculares, dependiendo de la afinidad de la PfEMP-1 por diferentes moléculas de adhesión celular expresadas por el endotelio en diferentes órganos. La afinidad de la variante de PfEMP-1 por cada una de estas moléculas de adhesión explica la variabilidad en las manifestaciones clínicas y el espectro de la severidad de la enfermedad. Por ejemplo, el desarrollo de malaria cerebral parece estar asociado con una cepa de *P. falciparum* que expresa PfEMP-1 con alta afinidad al ICAM-1 en la vasculatura cerebral [6, 46]. En el caso de la malaria placentaria, la PfEMP-1 presenta gran afinidad por el CSA expresado en el sincitiotrofoblasto [41]. La PfEMP-1 también es un importante mediador en la formación de rosetas [47].

Para las otras especies de *Plasmodium*, el fenómeno de citoadherencia no parece jugar un papel tan importante. De hecho, hay estudios que sugieren que los eritrocitos infectados con parásitos de *P. vivax* presentan mayor maleabilidad que un eritrocito normal, lo cual le permite evadir la destrucción por el bazo [48].

Diagnóstico clínico de malaria

Los casos de malaria no complicados suelen presentarse como cualquier síndrome febril no diferenciado. Los síntomas más frecuentes en cualquier tipo de malaria son fiebre con escalofríos, diaforesis, cefalea y mialgias [49]. Después que los esquizontes tisulares en el hígado maduran, se rompen liberando merozoítos que invadirán los eritrocitos en sangre periférica. A partir de este momento y durante liberaciones masivas de merozoítos en ciclos eritrocíticos subsecuentes, se inician los síntomas de la malaria (ver **figura 5**) [31, 50-51]. Al periodo comprendido entre la picadura del vector con inoculación de parásitos y la culminación de una o varias esquizogonias eritrocíticas que lleva a la iniciación de síntomas de la malaria se le denomina periodo de incubación y varía para cada especie de *Plasmodium* (ver **tabla 2**). El periodo de incubación depende principalmente de la especie parasitaria, de la carga de parásitos que ingresa al hospedero y del estado de inmunidad del hospedero [37]. La concentración de parásitos en sangre necesaria para producir síntomas se conoce como “umbral pirogénico” [51]. El primer paroxismo malárico suele tener un menor umbral pirogénico que los subsecuentes episodios [51-52].

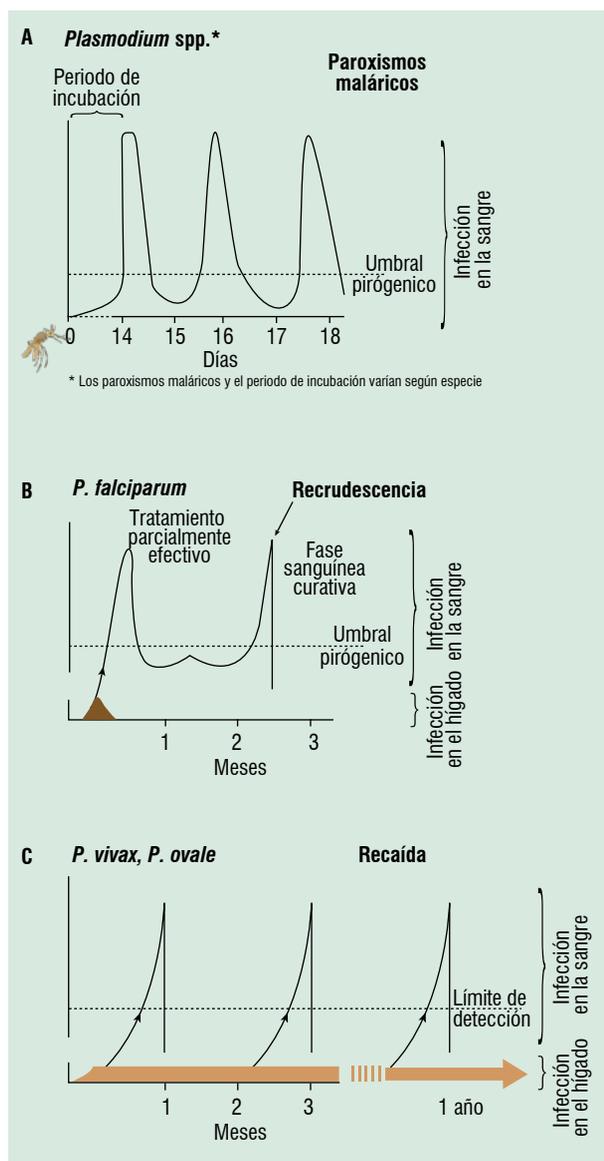


Figura 5. Relación entre las manifestaciones clínicas y las etapas en el ciclo de vida de *Plasmodium*. (A) Paroxismos maláricos. Patrón cíclico en la aparición de síntomas causada por la liberación masiva de merozoítos al finalizar cada esquizogonia eritrocítica. (B) Recrudescencia. Fenómeno visto principalmente con especies como *P. falciparum* (corto plazo) y *P. malariae* (largo plazo), que resulta después de un tratamiento inadecuado, donde persiste el ciclo eritrocítico con parasitemias inferiores al umbral pirogénico y luego por alguna razón, usualmente disminución en la inmunidad del paciente, se aumenta la parasitemia por encima del umbral pirogénico, produciendo síntomas. Nótese que las formas hepáticas sólo se presentan al principio de la enfermedad y desaparecen luego de que se inicia la fase eritrocítica del ciclo. (C) Recaida. Fenómeno propio de especies con hipnozoítos como *P. vivax* y *P. ovale*, que luego de una eliminación efectiva de todas las formas sanguíneas y resolución de los síntomas, se produce una recaída de la enfermedad por la reactivación de las formas hepáticas latentes, varios meses después de la infección primaria [37].

El periodo de incubación para *P. falciparum* es típicamente de 8 a 25 días (1 a 4 semanas) [53], pero se puede prolongar si el paciente ha recibido medicación quimioproláctica con disminución de la parasitemia por debajo del umbral pirogénico [54], o en pacientes con algún grado de inmunidad que requieren mayor parasitemia para producir síntomas [53]. Para las demás especies, el periodo de incubación suele ser más prolongado y el diagnóstico puede ser difícil y demorado, especialmente si el paciente lleva varios meses o años sin haber viajado a una zona endémica y no se sospecha el diagnóstico por esta razón. En el caso de *P. vivax* y *P. ovale*, el fenómeno de latencia del hipnozoito, puede hacer que los periodos de incubación tarden varios meses o presentarse con recaídas meses después de un tratamiento inicial [55]. Para *P. vivax* los periodos de incubación cortos suelen ser de 26 días (aproximadamente un mes) y los periodos de incubación largos de 48,2 semanas (aproximadamente 1 año) [56], pero en algunos casos pueden llegar a ser de más de 5 años de incubación [53]. Para *P. malariae* el periodo de incubación puede llegar a ser de décadas [57]. Por esto, es de vital importancia interrogar sobre viajes a zona endémica para malaria en todo paciente con síndrome febril, y se debe considerar malaria si éste ha viajado a zona endémica en los últimos 3 meses, e incluso más tiempo para especies diferentes a *P. falciparum*. También se debe considerar el fenómeno raro de “malaria de aeropuerto”, donde el hospedero es picado por un mosquito proveniente de zona endémica en un aeropuerto de zona no endémica [58].

Tabla 2. Características de los paroxismos maláricos según especie de *Plasmodium* infectante. tomado de Cunha CB, Cunha BA. Brief history of the clinical diagnosis of malaria: from Hippocrates to Osler. J Vector Borne Dis 2008; 45: 194-199.

Especie de <i>Plasmodium</i>	Descripción clínica de la malaria	Periodo de incubación (latencia en días)	Periodicidad de paroxismos febriles (horas)	Duración en horas de crisis febril	Edad de glóbulo rojo parasitado	Hipnozoitos, con periodo de latencia
<i>P. falciparum</i>	Maligna terciaria	8 a 25	48	40	Cualquier edad	-
<i>P. vivax</i>	Benigna terciaria	21 a 32	48	11	Reticulocitos	+
<i>P. ovale</i>	Benigna terciaria	Similar a <i>P. vivax</i>	48	11	-	+
<i>P. malariae</i>	Quartana, cotidiana	Meses	72	9	Senescentes	-
Mixta	No aplica	No aplica	Continuo	Continuo	No aplica	No aplica

Los paroxismos clásicos de la malaria se describen como la aparición abrupta de fiebre con escalofríos, seguidos de sudoración profusa, luego fatiga extrema y finalmente, somnolencia. La duración de los periodos varía con la especie de *Plasmodium* infectante, como se observa en la **tabla 2** [59]. La presencia de varias subpoblaciones de parásitos puede generar patrones de periodicidad variados e incluso continuos en el caso que hayan varias poblaciones de *P. falciparum* asincrónicas en un hospedero [53]. Aunque la presencia del patrón cíclico característico de los paroxismos maláricos y algunos hallazgos de laboratorio son sugestivos de la enfermedad [60], su ausencia no excluye la malaria. Un estudio sobre manifestaciones clínicas de *P. vivax* mostró que sólo el 68,3% de los pacientes desarrollaron el patrón característico de fiebre terciaria benigna [61]. Los síntomas reportados en orden de frecuencia en un grupo de pacientes con malaria importada, (no inmunes, 68% con infección por *P. falciparum*), que suelen tener manifestaciones más floridas, se muestran en orden de frecuencia en la **figura 6** [49]. Desde el punto de vista clínico, todo paciente con fiebre o malestar general, independiente de los síntomas, con historia de viaje a una zona endémica dentro de los tres meses previos a la consulta, como mínimo debe ser evaluado para malaria con un método parasitológico de diagnóstico.

Las manifestaciones clínicas de la malaria son expresión de la carga de parásitos en la sangre y del estado de inmunidad del paciente, siendo el primero promotor y el segundo mitigador de los síntomas o desencadenante de malaria grave [37]. El fenómeno de inmunidad a la malaria es complejo e involucra inmunidad innata e inmunidad adaptativa, a través de mecanismos humorales y celulares. Como mecanismo humoral, se produce IgG contra varios antígenos de *Plasmodium*, en tanto que la inmunidad celular está mediada por una interacción compleja entre células *natural killer* (NK), linfocitos CD4+ TH y más adelante en la infección, por linfocitos T CD8+. La inmunidad se ve afectada por la edad de hospedero, el fenómeno de variación antigénica de *Plasmodium* y el estadio en el ciclo en que se encuentre el parásito [62]. En humanos se considera que hay varios tipos de inmunidad adquirida, clínicamente relevante, contra la malaria y se han definido así: 1) inmunidad contra las manifestaciones clínicas de la malaria que altera la severidad de los síntomas; 2) inmunidad contra los parásitos, que altera la densidad de parásitos; y, 3) premonición, que confiere protección contra nuevas infecciones al mantener una parasitemia asintomática de bajo grado [62]. Los pacientes sin inmunidad previa tienen un umbral pirogénico menor y suelen presentar mayor número de síntomas y cuadros más típicos de la enfermedad, y más del 80% presentan al menos un síntoma (ver **figura 6**) [49].

Un estudio en *P. vivax* mostró que al examen físico se puede encontrar palidez, hepatoesplenomegalia, rara vez con ruptura de bazo [61]. Se encontró que el bazo y el hígado fueron

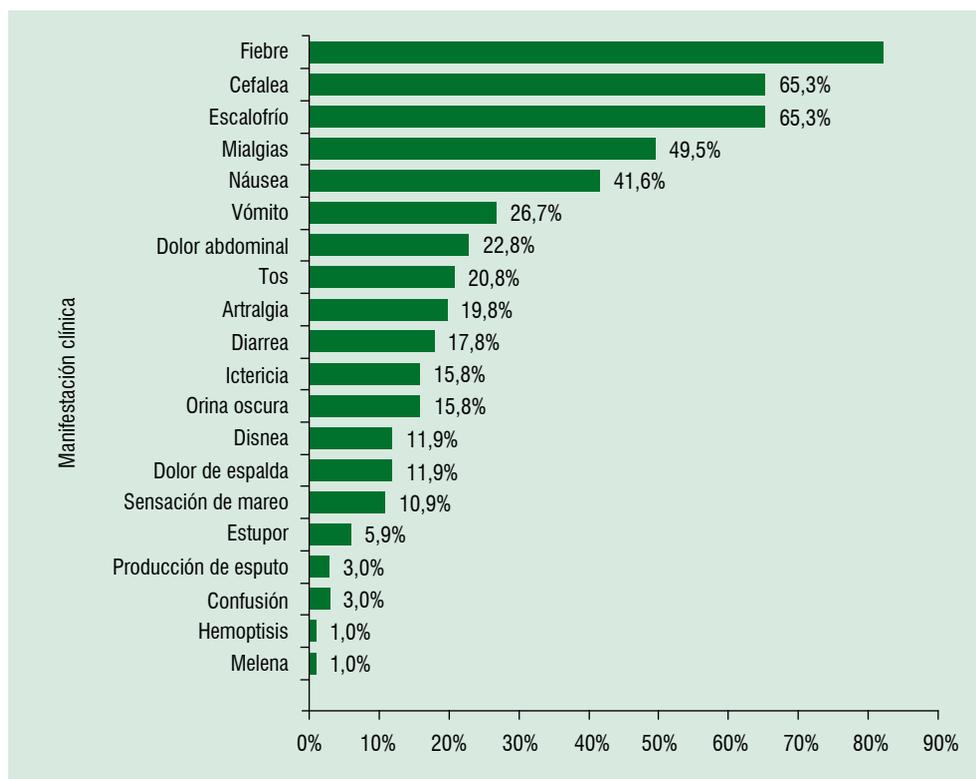


Figura 6. Frecuencia relativa de los síntomas de la malaria en población no inmune [57].

palpables en 42% y 15,8% de los pacientes, respectivamente, y el 8,9% refirió dolor en el cuadrante superior derecho del abdomen [61]. También se reportó inyección conjuntival en 4,0%, petequias en 3,0%, manifestaciones cutáneas en 2,0% y reactivación de herpes labial en 1,0% de los pacientes [61]. La retinopatía asociada a malaria puede indicar malaria severa [63]. Las adenopatías no son características y su presencia puede alertar la presencia de otra enfermedad como linfoma [53]. Puede haber hallazgos pulmonares, pero la consolidación no es una característica y se debe pensar en neumonía [53]. Hay además una serie de hallazgos físicos que junto con algunas características de laboratorio constituyen los “signos de peligro” de la malaria (ver **tabla 3**) y los pacientes con estos síntomas deben ser sometidos a vigilancia médica más estrecha por la posibilidad del desarrollo de malaria severa (ver **tabla 4**) [64].

La malaria causada por *P. falciparum* puede en algunas ocasiones llevar a malaria severa y se debe estar alerta a cualquier signo de peligro o manifestación de severidad. La severidad de la malaria depende de la densidad parasitaria, del aumento en la tasa de multiplicación parasitaria y aumento en la biomasa parasitaria, y del estado inmune del paciente [65-66]. Las manifestaciones de la malaria severa son más frecuentes en personas no inmunes como viajeros, personas expuestas a malaria por temporadas (estacionales), y en niños y mujeres en embarazo. Los criterios para malaria severa han sido revisados y establecidos por la OMS y utilizan variables clínicas y de laboratorio (ver **tabla 4**) [67-68]. Los pacientes con malaria severa requieren un manejo especial intrahospitalario, con medicación antimalárica intravenosa, y en ocasiones (por ejemplo con malaria cerebral o síndrome de dificultad respiratoria agudo) pueden requerir manejo en una unidad de cuidado intensivos [68-69].

P. falciparum puede infectar eritrocitos desde su etapa de reticulocitos hasta que son senescentes, lo cual puede hacer que esta especie genere una mayor carga parasitaria, a di-

Tabla 3. Signos de peligro de la malaria [49]

Signo clínico o parasitológico	Observaciones para su valoración
Debilidad extrema	Incapacidad para ponerse de pie, sentarse, caminar, beber o lactar
Alteraciones de la conciencia y psicosis	Delirio, letargo o inconciencia, trastornos de comportamiento (irritable, agresivo)
Convulsiones en las últimas 24 horas	Ha tenido al menos una sola convulsión, focal o generalizada
Signos de dificultad respiratoria y taquipnea:	Buscar alteración del patrón respiratorio (aleteo nasal, retracciones subcostales, alargamiento de la excursión respiratoria, tos).
<ul style="list-style-type: none"> ▪ 50 en niños de 2 a 11 meses, ▪ 40 en niños de 1 a 4 años, ▪ 25 en niños de 5 a 7 años, ▪ 24 en mayores de 7 años y adultos 	Contar la frecuencia respiratoria durante 1 minuto en ausencia de fiebre (tiempos menores resultan en un recuento incorrecto)
Variaciones extremas en la temperatura corporal:	Dejar el termómetro al menos por tres minutos.
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hiperpirexia, temperatura axilar $\geq 39,5^{\circ}\text{C}$ ▪ Hipotermia, temperatura axilar $\leq 35,5^{\circ}\text{C}$ 	Si se toma temperatura rectal, estos valores aumentan en un grado: hiperpirexia $40,5^{\circ}\text{C}$, hipotermia $36,5^{\circ}\text{C}$
Vómito persistente	Interrogar al paciente si ha presentado cinco o más episodios en las últimas 24 horas
Diarrea persistente	Interrogar al paciente si ha presentado cinco o más episodios en las últimas 24 horas
Signos de deshidratación grave	Ojos húmedos, llora sin lágrimas, pérdida de turgencia de piel (signo de pliegue abdominal positivo: más de dos segundos), alteración de la eliminación urinaria (anuria, oliguria), o alteración neurológica en el niño con diarrea (letárgico, inconsciente, no puede beber)
Llenado capilar lento en lecho ungueal: tres o más segundos	Hacer presión con un dedo por tres segundos sobre el lecho ungueal y medir el tiempo de recuperación del color. El llenado capilar puede variar por la presencia de edema, características de la piel del paciente, temperatura ambiental y cantidad de presión aplicada
Ictericia	Color amarillo en escleróticas, conjuntivas, mucosas (debajo de la lengua) o piel. Valorar con luz natural o luz blanca
Orina oscura	Color oscuro de la orina. Tomar muestra de orina y hacer pruebas con tirilla reactiva para confirmar presencia de sangre o hemoglobina
Palidez intensa: palidez definitiva	Valorar en palmas, conjuntivas y lecho ungueal. Clasificar en palidez definitiva, probable y sin palidez
Sangrado espontáneo de mucosas, tubo digestivo o piel	Valorar e interrogar por sangrado espontáneo en mucosas, tubo digestivo o piel: mucosa oral y nasal, encías, presencia de equimosis y petequias en piel o mucosa, deposiciones negras o vómito con sangre
Hiperparasitemia	Recuento ≥ 50.000 formas asexuales/ μL de <i>P. falciparum</i>
Esquizontemia	Presencia de esquizontes de <i>P. falciparum</i> en la gota gruesa. Un solo esquizonte es suficiente.

ferencia de *P. vivax* que es relativamente selectivo para reticulocitos [70]. Gran parte de las manifestaciones de la malaria severa se han explicado por el fenómeno de secuestro del parásito en circulación periférica; sin embargo, otros factores como la respuesta inmune y la liberación de citoquinas proinflamatorias con alteraciones en la regulación del endotelio, parecido a lo sucedido en la sepsis, pueden explicar muchos de los hallazgos [53]. Además, las manifestaciones de severidad se pueden encontrar también en la malaria por *P. vivax* donde el secuestro de parásitos no es importante [71].

La malaria por *P. vivax* y *P. ovale* se consideran similares desde el punto de vista clínico y aunque no suelen causar malaria severa, los pacientes pueden desarrollar algunas complicaciones como síndrome de dificultad respiratoria agudo [72] y ruptura esplénica [73]. Esta última complicación se puede presentar en pacientes infectados por cualquier especie de *Plasmodium*; sin embargo, es más frecuente en infecciones por *P. vivax* que tienden a ser más crónicas, permitiendo así el mayor crecimiento del bazo. La baja mortalidad producida por *P. vivax* puede ser explicada por la afinidad de estos parásitos a infectar predominantemente

Tabla 4. Criterios de severidad para malaria por *P. falciparum* según la OMS. Se requiere uno o más de los siguientes hallazgos [67]

Características clínicas

- Postración, paciente con debilidad generalizada e imposibilidad para caminar o sentarse
- Cese de ingesta de comida o líquido
- Alteración de la conciencia, difícil de despertar, coma
- Malaria cerebral: coma, Glasgow ≤ 9
- Dificultad respiratoria, respiración acidótica
- Convulsiones repetitivas generalizadas: >2 episodios en un día
- Colapso circulatorio o choque: presión arterial sistólica <70 mmHg en adultos o <50 mmHg en niños, frialdad distal
- Edema de pulmón (radiológico) con síndrome de dificultad respiratoria agudo
- Sangrado anormal espontáneo o coagulación intravascular diseminada: sangrado o evidencia de laboratorio
- Complicación hepática: ictericia más evidencia de disfunción de otro órgano
- Hemoglobinuria macroscópica o fiebre de aguas negras: por hemólisis no asociada a deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

Características de laboratorio

- Anemia normocítica severa: hematocrito $\leq 15\%$ o hemoglobina ≤ 5 g/dL con más de 10.000 parásitos/ μ L
- Hipoglucemia: glucemia ≤ 40 mg/dL
- Acidosis metabólica (pH $<7,35$), bicarbonato <15 mmol/L
- Hiperlactatemia (>5 mmol/L)
- Falla renal: diuresis <400 mL/día, creatinina $>3,0$ mg/dL (265 μ mol/L)
- Hemoglobinuria
- Hiperlactatemia
- Hiperparasitemia $>2\%$ eritrocitos parasitados o >100.000 parásitos/ μ L en zona de baja transmisibilidad, o $>5\%$ eritrocitos parasitados o >250.000 parásitos/ μ L en zonas de transmisibilidad alta y estable*

* En Colombia se considera hiperparasitemia >50.000 parásitos/ μ L [73]

reticulocitos, siendo las parasitemias menores que en la infección por *P. falciparum*, y también a que no manifiestan propiedades tan marcadas de citoadherencia y secuestro en microvasculatura como *P. falciparum*. Como parte del manejo es muy importante explicarle al paciente el riesgo de ruptura esplénica e indicarle evitar cualquier tipo de actividad física de contacto, por lo menos durante varias semanas después del tratamiento y hasta que se tenga seguridad de que no hay esplenomegalia.

En la malaria por *P. malariae*, las manifestaciones clínicas suelen ser más leves y la periodicidad de la fiebre es de 72 horas (cuartana). En niños que viven en zonas endémicas, la infección por *P. malariae* puede producir síndrome nefrótico [74] al parecer mediado por complejos inmunes, e histológicamente la mayoría muestran glomerulonefritis membrano-proliferativa y nefropatía asociada a malaria cuartana [75].

El juicio clínico guía la solicitud de exámenes que confirman o descartan la enfermedad. La sospecha clínica de malaria va a estar influenciada por la combinación de síntomas, la presencia de paroxismos cíclicos y por el antecedente de viaje a zona endémica. En zonas de alta endemia, es frecuente solicitar gota gruesa a todo paciente con malestar general o síndrome febril. Sin embargo, en zonas no endémicas el umbral para solicitar un examen parasitológico es mayor corriendo el riesgo de hacer diagnósticos tardíos [76]. En zonas no endémicas el diagnóstico dependerá de la historia de viaje a zona endémica, de una historia clínica completa y de la detección de alteraciones de laboratorio como anemia o trombocitopenia. Una estrategia para la detección oportuna de pacientes evaluados en regiones no endémicas con menor experiencia en el diagnóstico, es la implementación de alarmas para malaria en los autoanalizadores de hematología, como se comentará más adelante [77-78].

Diagnóstico diferencial

Dado que la malaria se presenta como un síndrome febril no diferenciado, el diagnóstico diferencial incluye múltiples infecciones frecuentes en zonas endémicas para malaria como: hepatitis viral, influenza, infecciones respiratorias, dengue, fiebre amarilla, leptospirosis, gastroenteritis, meningitis y encefalitis, entre otras; y enfermedades que pueden tener manifestaciones similares como eclampsia, falla renal aguda y linfoma en el caso de presentar organomegalia [53, 79].

Características del hospedero: “la hipótesis malárica”

La malaria por *P. falciparum*, y probablemente también por *P. vivax*, ha sido un fuerte modelador del genoma humano [8]. A continuación se describen las alteraciones genéticas más importantes asociadas a malaria y que pueden tener relevancia desde el punto de vista del laboratorio clínico.

Hemoglobina S

La presencia de hemoglobina S se da por la sustitución del aminoácido glutamato por valina en la posición 6 de la cadena β de la globina. Esta sustitución se encuentra principalmente en población africana y en sus descendientes, y concuerda con la distribución geográfica de *P. falciparum* [80]. El estado heterocigoto (hemoglobina AS) es el que confiere mayor beneficio (rasgo falciforme) y puede ascender aproximadamente a un cuarto de la población en algunas áreas de África [81]. Esta mutación hace que la hemoglobina se polimerice, deformando la célula a una apariencia en hoz. Parece que esta alteración es desfavorable para el crecimiento de *Plasmodium*.

Hemoglobinas E y C

Las hemoglobinas E (HbE) y C (HbC) también se producen por mutaciones puntuales en el gen de la cadena β de la globina; en la HbE, se intercambia un aminoácido de glutamato por lisina en la posición 26, y en la HbC intercambia un glutamato por lisina en la posición 6. Las HbE y HbC se encuentran predominantemente en Asia y África occidental, respectivamente. Ambas hemoglobinopatías han mostrado protección contra la malaria, y estudios *in vitro* han mostrado menor multiplicación del parásito en los eritrocitos con estas hemoglobinas [82-83]. Existe evidencia que la HbE confiere protección principalmente contra *P. vivax* [8].

Talasemias

Las talasemias se producen por anomalías en la síntesis de las cadenas α o β de la hemoglobina [84]. Son condiciones heterocigotas y benignas que producen anemia microcítica, hipocrómica, y usualmente son asintomáticas. Se encuentran principalmente en el área del mediterráneo y sus descendientes (América Latina), África, Oriente cercano, Sureste Asiático y Oceanía, las zonas donde se estima que la malaria fue endémica hasta hace por lo menos 2.000 años [8]. Las talasemias son protectoras para malaria y existen en la forma de polimorfismos balanceados en la población [85]. Se ha mostrado crecimiento *in vitro* reducido de *P. falciparum*, especialmente cuando hay mayor estrés oxidativo [86]; además, la mayor concentración de HbF en pacientes con talasemia puede contribuir a la protección [87].

Deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

La deficiencia de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), codificada en el cromosoma X, es la deficiencia genética enzimática más frecuente en el mundo y es causada por más de 300 polimorfismos alélicos que generan una actividad enzimática variable [53, 88]. La G6PD es una enzima importante para la regeneración del cofactor de la glutatión peroxidasa (GSHPX) en los procesos de neutralización de radicales libres y se ve disminuido en infecciones por malaria [89]. Los parásitos de *Plasmodium* son susceptibles al estrés oxidativo y la disminución o ausencia del mecanismo de detoxificación mediado por la GSHPX dependiente de la G6PD parece ser la causa para que pacientes con deficiencia de la enzima G6PD sean menos susceptibles a la infección [90]. Estudios epidemiológicos han mostrado que la protección para malaria severa en hombres homocigóticos y mujeres heterocigóticas es de 58% y 46%, respectivamente [88].

Ovalocitosis

En la ovalocitosis, predominante en el Sureste Asiático, se produce una alteración en la proteína de membrana eritrocitaria Banda-3, disminuyendo la maleabilidad del eritrocito [53]. Aparte de una disminución en la invasión a los eritrocitos y de menor parasitemia, también se ha encontrado una reducción dramática de malaria cerebral que es casi inexistente en esta población [91].

Antígeno Duffy

El antígeno Duffy es el receptor en el eritrocito para la invasión del merozoito de *P. vivax* [5], y en consecuencia, los eritrocitos que carecen del antígeno Duffy (Fy(a- b-)) son resistentes a la infección por *P. vivax*. Esta condición es altamente prevalente en el Oeste Africano y como resultado, la malaria por *P. vivax* en esta región es extremadamente escasa [92].

Diagnóstico de laboratorio

En 1880, Alphonse Laveran observa por primera vez al parásito en un extendido de sangre periférica de un paciente que acababa de morir por malaria, posibilitando desde entonces el diagnóstico parasitológico [93]. Poco tiempo después, Dimitri Romanoski en 1891 logra diferenciar el núcleo y citoplasma usando una tinción de eosina y azul de metileno oxidado, lo cual sirvió para posteriores desarrollos en las tinciones para sangre. Gustav Giemsa en 1904 logra obtener una mezcla estable derivada de la tinción de Romanoski. La tinción de Giemsa y algunos otros derivados de la tinción de Romanoski (por ejemplo, tinción de Field) fueron desarrollados posteriormente, y se usan para colorear las placas de gota gruesa y el extendido delgado de sangre periférica [94].

Desde mediados del siglo pasado se han introducido nuevos métodos de detección del parásito como la detección por fluorescencia en el año 1939 [95] y más recientemente, hacia la década de 1980, surgen los métodos de detección rápida (RDTs) basados en inmunocromatografía, que han ganado gran acogida en los últimos años dada la necesidad de un diagnóstico para dar tratamiento en zonas donde no hay acceso a microscopía [5, 96]. También, se han desarrollado métodos de diagnóstico molecular, como la reacción en cadena de polimerasa (PCR) que actualmente se podría considerar el “estándar de oro” para diagnóstico parasitológico en investigación, debido a su alto rendimiento diagnóstico que supera la microscopía. También hay métodos de detección por citometría de flujo con detección de fluorescencia (*cell sorters*) y dispersión de luz láser (autoanalizadores de hematología). Se considera que una prueba es útil si presenta una sensibilidad $\geq 95\%$, con un límite inferior de detección de 100 parásitos/ μL [97-98].

Microscopía

El diagnóstico parasitológico de la enfermedad se realiza en el laboratorio de manera rutinaria mediante la observación de las distintas formas del parásito en el examen microscópico de la sangre mediante técnicas de gota gruesa y de extendidos de sangre periférica, teñidos con diversos colorantes. Las coloraciones más frecuentes son los métodos de Giemsa o Field para la gota gruesa y Wright para el extendido delgado; estas coloraciones usan la eosina como colorante ácido y el azul de metileno como colorante básico, y tiñen los componentes celulares acidófilos y basófilos, respectivamente. En el caso de *Plasmodium*, el citoplasma se colorea azul y la cromatina se colorea roja. El estandarizar estas condiciones mejora la calidad de las placas y repercute directamente sobre el éxito del diagnóstico de la malaria.

El diagnóstico microscópico mediante gota gruesa y del extendido de sangre periférica continúa siendo el “estándar de oro” para el diagnóstico parasitológico en la práctica clínica [96]. Sin embargo, su desempeño es variable y depende de la sospecha clínica inicial, la experiencia del microscopista, la parasitemia del paciente, la especie de *Plasmodium* infectante y el tiempo dedicado para su análisis [96, 99]. La gota gruesa es un procedimiento que permite la identificación del parásito aun en condiciones de parasitemias bajas, lo cual la hace una prueba sensible. Esto lo logra al concentrar capas de eritrocitos aproximadamente 40 veces más de lo normal, facilitando la visualización de parásitos a menores concentraciones y optimizando la sensibilidad analítica del método. Debido a que el método causa la lisis de los eritrocitos, los parásitos son visualizados por fuera de los eritrocitos [100]. La sensibilidad analítica (límite inferior de detección) en condiciones óptimas puede ser tan bajo como de 4 a 20 parásitos/ μL con una sensibilidad diagnóstica por encima de 95% [96]. Sin embargo, la sensibilidad analítica en condiciones de trabajo de campo es de 50 a 100 parásitos/ μL , con una sensibilidad diagnóstica inferior al 80% [96, 101]. Es posible que las sensibilidades analíticas y diagnósticas sean aún menores en centros médicos urbanos con pocos casos anuales de malaria en función de la menor experiencia en visualizar parásitos [76]. La gota gruesa debe ser preparada y leída inmediatamente por personal experimentado cuando se presente un paciente con historia de viaje a zona endémica y con clínica compatible. El método para preparar una placa de gota gruesa se describe detalladamente en la **figura 7**.

El recuento de parásitos en pacientes con *P. falciparum* es de gran importancia para el manejo y toma de decisiones clínicas. El recuento de parásitos no se requiere en la práctica clínica para las otras especies de *Plasmodium*. Para estimar la parasitemia en una muestra de gota gruesa, se puede usar el recuento real de leucocitos del paciente (si no se tiene el dato, se asume un recuento promedio de 8.000 leucocitos/

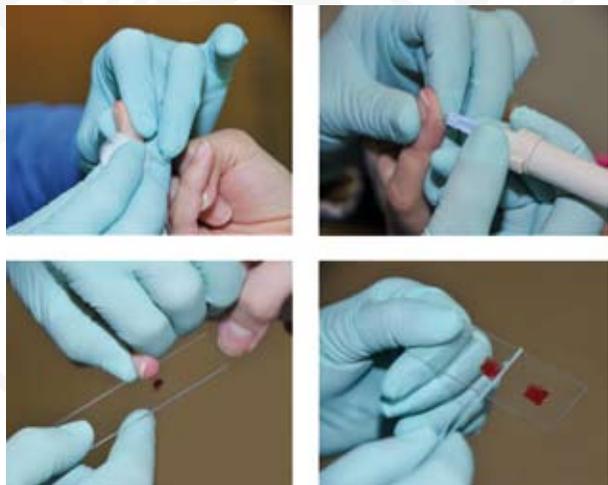


Figura 7. Se punciona con una lanceta estéril la parte lateral del 4to dedo, previa limpieza con alcohol. Se exprime una gota de sangre por cada gota gruesa y se hacen dos gotas por placa. La sangre se extiende en forma de “Z” para formar un cuadrado con la sangre, de aproximadamente 1 a 1,2 cm². Se deja secar la gota gruesa a temperatura ambiente aproximadamente 30 a 60 minutos, dependiendo de la humedad en la zona. Algunos recomiendan agregar algo de calor. Se debe cuidar que la sangre seca no presente grietas. Se colorean las placas. Para la gota gruesa se utiliza el colorante de Field, Giemsa o la coloración de Leishman. Se deja secar la placa y luego se lee a 1.000X con objetivo de inmersión.

μL). Se procede a contar el número de parásitos y de leucocitos en campos diferentes hasta completar 200 leucocitos. Para estimar la parasitemia en una muestra de extendido delgado, se localiza una porción del extendido en que los campos contengan cantidades similares de eritrocitos. Luego se cuentan simultáneamente los eritrocitos parasitados y los campos, hasta llegar a 33 campos, equivalentes a un estimado de 10.000 eritrocitos. Los eritrocitos infectados por más de un parásito se cuentan como uno. El número de eritrocitos parasitados en el total de los 33 campos, dividido por 100, dará el resultado en porcentaje. Para una estimación más precisa, se deben contar los eritrocitos que hay en un campo para saber el número de campos necesarios para llegar a los 10.000 eritrocitos.

En la **fórmula 1** se observa cómo calcular el número de parásitos por microlitro, y en la **fórmula 2** se observa cómo se puede calcular el porcentaje de eritrocitos parasitados. No se recomienda utilizar el sistema de cruces para cuantificar la parasitemia. La densidad de parásitos se asocia con la severidad de la malaria y se debe hacer monitoreo de ésta al principio y durante el tratamiento para garantizar la resolución de la infección [102]. Pacientes con recuentos ≥ 50.000 parásitos/μL se consideran en alto riesgo de desarrollar malaria severa. La hiperparasitemia (≥ 250.000 parásitos/μL en zonas endémicas) se asocia con anemia severa, coagulopatía, hipoglucemia, malaria cerebral y falla renal [68]. Se debe tener presente que individuos no inmunes pueden desarrollar malaria severa aun con parasitemias bajas [37].

Fórmula 1. Cálculo de la parasitemia por microlitro de sangre.

$$\text{Parásitos}/\mu\text{L} = \frac{\text{Número de leucocitos del paciente}/\mu\text{L}^*}{\text{Número de leucocitos contados}} \times \text{Número de parásitos en la gota gruesa}$$

* En caso de no contar con el recuento de leucocitos del paciente, se puede asumir una concentración promedio de 8.000 leucocitos/μL.

Para mejor comprensión, se presenta un ejemplo: se realiza el recuento de parásitos en una muestra de un paciente con un número total de leucocitos de 8.500/μL, y se registran los parásitos que se encuentren al contar 200 leucocitos, en este caso fueron 50 parásitos.

$$\text{Parásitos}/\mu\text{L} = \frac{8.500/\mu\text{L}}{200} \times 50$$

$$\text{Parásitos}/\mu\text{L} = 2.125 \text{ parásitos}/\mu\text{L}$$

Fórmula 2. Cálculo del porcentaje de eritrocitos parasitados.

$$\% \text{ Eritrocitos parasitados} = \frac{\text{Eritrocitos parasitados en 33 campos}}{100}$$

* En caso de no contar con el recuento de eritrocitos del paciente, se puede asumir una concentración promedio de 4×10^6 eritrocitos/μL.

La parasitemia puede no ser detectable hasta varios días después de que el paciente comienza a presentar síntomas, especialmente si el paciente es inmune y en consecuencia su umbral pirogénico es muy bajo para ser detectado por la gota gruesa (< 100 parásitos/μL). También, en el caso de malaria por *P. falciparum* se debe considerar la posibilidad de no haber parasitemia detectable si la mayoría de parásitos se encuentran en estado maduro (trofozoítos y esquizontes) secuestrados en la microcirculación. Con relación a esto, la visualización de un esquizonte de *P. falciparum* en circulación periférica debe alertar a una elevada carga parasitaria y riesgo de malaria severa [53]. En caso de sospecha de malaria con un examen inicial de

gota gruesa negativo, se debe continuar haciendo como mínimo otras dos gotas gruesas cada 12 a 24 horas, hasta poder descartar el diagnóstico de malaria con seguridad. Además, antes de clasificar una gota gruesa como negativa, se recomienda examinar por lo menos 200 a 500 campos de alto poder (1.000X con objetivo de inmersión), y hay quienes recomiendan leer la placa por lo menos 20 minutos antes de declarar la muestra como negativa [53, 99].

El extendido de sangre periférica se prepara con un volumen menor de sangre que la gota gruesa y se utiliza principalmente para determinar la especie de *Plasmodium* infectante, haciendo del extendido delgado una prueba más específica. En la mayoría de los casos, la gota gruesa hecha por personal experimentado, permite la determinación de especie. Sin embargo, es de vital importancia que para el diagnóstico de la malaria se hagan ambos procedimientos cuando la especie o especies de *Plasmodium* infectantes no son claras. Especificar el tipo de *Plasmodium* infectante es una condición necesaria e importante para administrar un tratamiento apropiado [52]. El extendido de sangre periférica también puede servir para identificar otros parásitos como *Babesia spp.* que pueden confundirse en ocasiones con malaria [103] y casos de malaria mixta.

El extendido de sangre periférica también permite identificar la presencia de leucocitos cargados de hemozoína [104]. En el proceso de digestión de hemoglobina, el parásito para evitar la oxidación del grupo hemo, lo neutraliza a una molécula cristalina conocida como hemozoína o pigmento malárico. La hemozoína se acumula a lo largo del ciclo de vida del parásito, por lo que es más abundante en las formas maduras. Durante la esquizogonia eritrocitaria, estos cristales son liberados y fagocitados. La concentración de leucocitos cargados de hemozoína se relaciona con la carga parasitaria [105] y además, se asocia con la presencia de malaria grave por *P. falciparum* [104, 106-107]. Los cristales de hemozoína son fácilmente distinguibles por microscopía de luz convencional (ver **figura 8**) como puntos de color ámbar de diferentes tonalidades o como cristales birrefringentes por microscopía de luz polarizada. El recuento de células con hemozoína, se presenta como un porcentaje de cada tipo de célula analizada. Para predecir malaria severa se ha mostrado que es útil ≥ 4 neutrófilos con pigmento (sensibilidad de 73% y especificidad de 77%) o ≥ 5 monocitos con pigmento (sensibilidad de 70% y especificidad de 64%) [104].

En la **figura 8** se muestran los principales componentes morfológicos del parásito visualizados por microscopía, y en las **figuras 9 a 50** se observan diferentes formas y estadios de *Plasmodium* en gota gruesa y en extendido de sangre periférica.

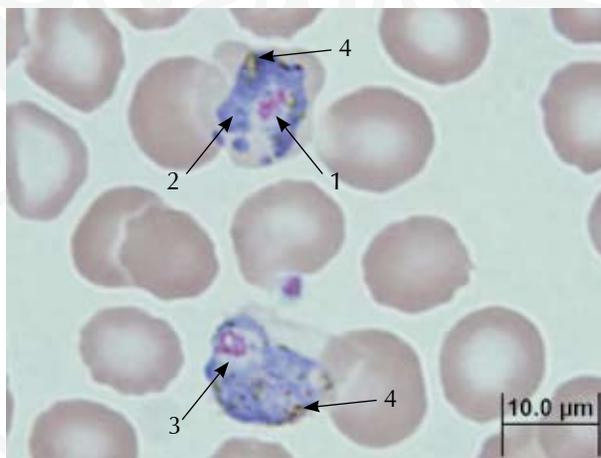


Figura 8. Extendido delgado con trofozoítos maduros de *P. vivax* en diferentes estadios de maduración. En ambos, la gota gruesa y el extendido de sangre periférica, se pueden visualizar cuatro componentes del parásito que ayudan a diferenciar la especie y estadio: (1) Cromatina: tiñe con eosina de color rosado y dependiendo del estadio del parásito estará condensada (trofozoítos, esquizontes y merozoítos) o laxa (gametocitos). (2) Citoplasma: tiñe azul (basófilo) y se encuentra en todos los estadios en diferente proporción. El citoplasma puede empezar a separarse en los esquizontes para formar merozoítos individuales. (3) Vacuola: puede ser visualizada como un área de menor coloración del citoplasma del parásito. Corresponde al centro en los trofozoítos anulares de todas las especies de *Plasmodium*. (4) Hemozoína: el pigmento malárico se observa como cristales de color pardo a negro y tiende a acumularse en la medida que el parásito madura, por lo cual está ausente en los anillos y presente en cantidad abundante en gametocitos y esquizontes.

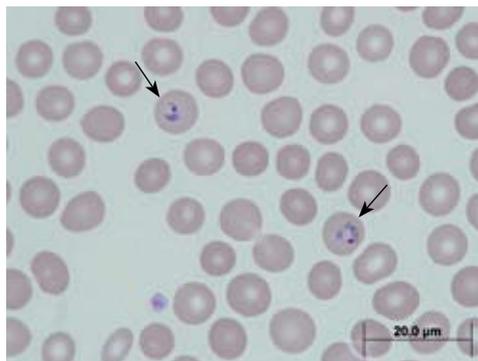


Figura 9. Extendido delgado con trofozoítos anulares de *P. vivax* en diferentes estadios de maduración, 1.000X.

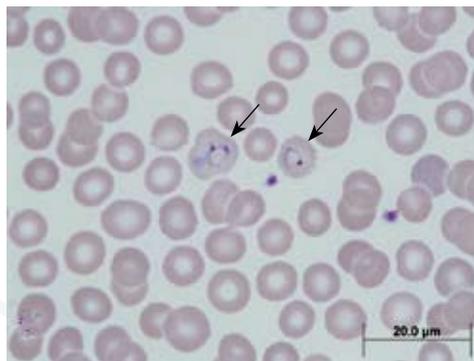


Figura 10. Extendido delgado con trofozoítos anulares de *P. vivax* en diferentes estadios de maduración, 1.000X.

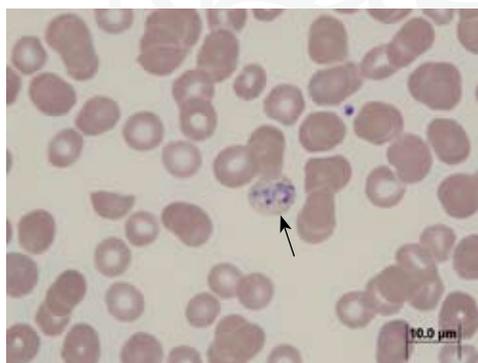


Figura 11. Extendido delgado con glóbulo rojo parasitado con dos trofozoítos anulares de *P. vivax*, 1.000X.

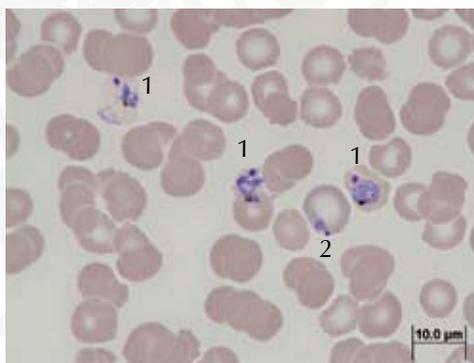


Figura 12. Extendido delgado con trofozoítos maduros (1) y un trofozoito anular (2) de *P. vivax*, 1.000X.

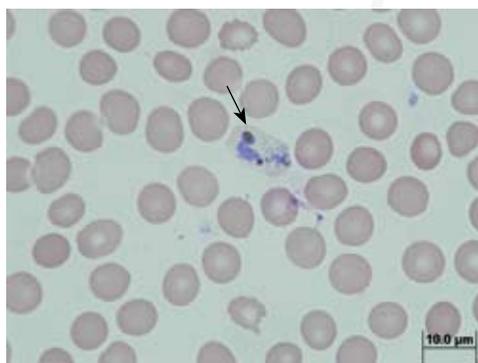


Figura 13. Extendido delgado con trofozoito maduro de *P. vivax*, 1.000X.

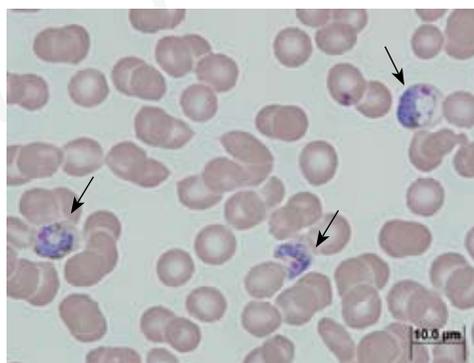


Figura 14. Extendido delgado con trofozoítos maduros de *P. falciparum* en diferentes estadios de maduración, 1.000X.

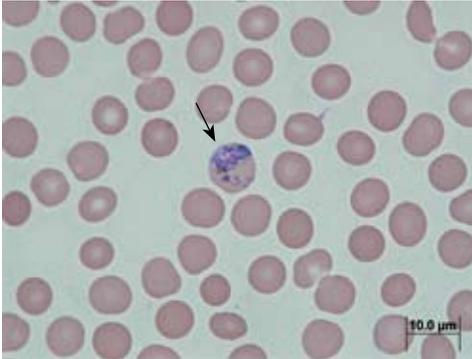


Figura 15. Extendido delgado con trofozoito maduro de *P. vivax*, 1.000X.

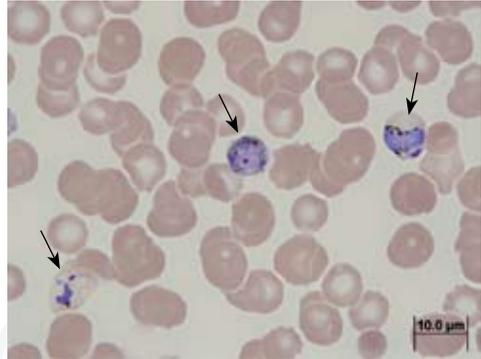


Figura 16. Extendido delgado con trofozoitos maduros de *P. vivax*, 1.000X.

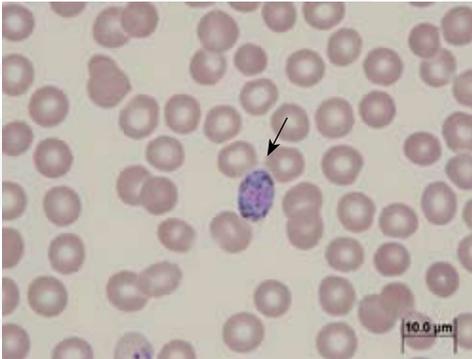


Figura 17. Extendido delgado con gametocito de *P. vivax*, 1.000X.

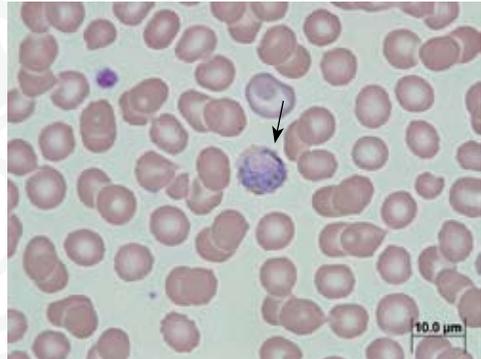


Figura 18. Extendido delgado con gametocito de *P. vivax*, 1.000X.

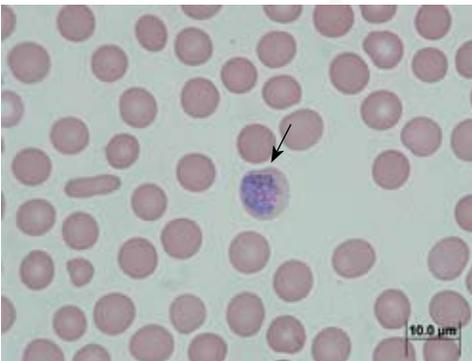


Figura 19. Extendido delgado con gametocito de *P. vivax*, 1.000X.

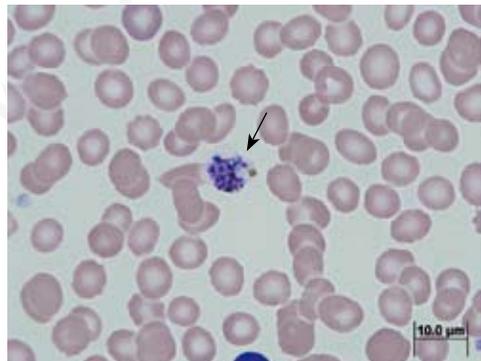


Figura 20. Extendido de sangre periférica con esquizonte de *P. vivax*, 1.000X.



Figura 21. Extendido delgado con esquizonte presegmentado de *P. vivax*, 1.000X.



Figura 22. Extendido delgado con esquizonte presegmentado de *P. vivax*, 1.000X.

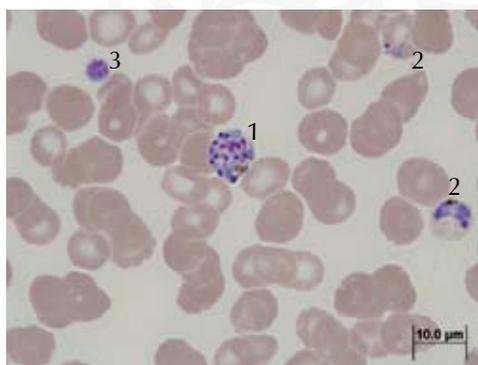


Figura 23. Extendido delgado con esquizonte (1) y dos trofozoitos maduros (2) de *P. vivax*. Note el macrotrombocito (3) en el extremo superior izquierdo, 1.000X.

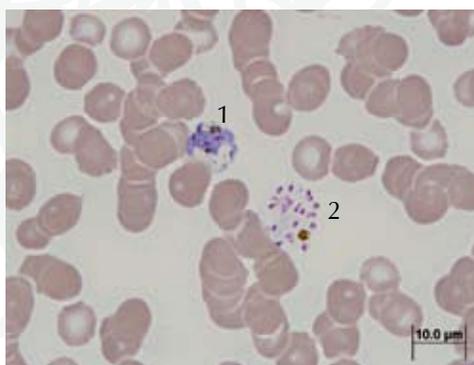


Figura 24. Extendido delgado con trofozoito maduro (1) y esquizonte (2) en proceso de liberación de merozoitos de *P. vivax*, 1.000X.

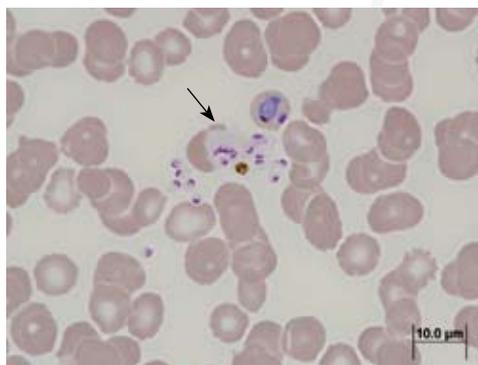


Figura 25. Ruptura de esquizonte de *P. vivax* con liberación de múltiples merozoitos, 1.000X.

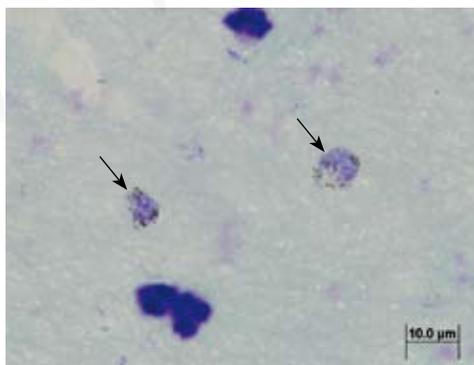


Figura 26. Gota gruesa con gametocitos de *P. vivax*, 1.000X.

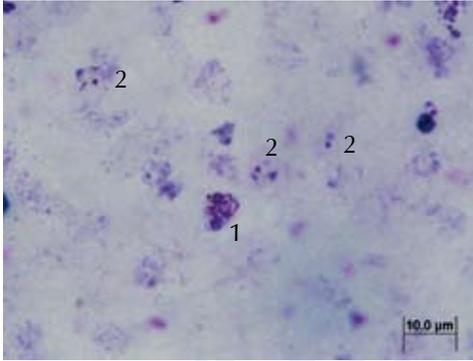


Figura 27. Gota gruesa con trofozoito maduro (1) y trofozoitos anulares (2) de *P. vivax*, 1.000X.

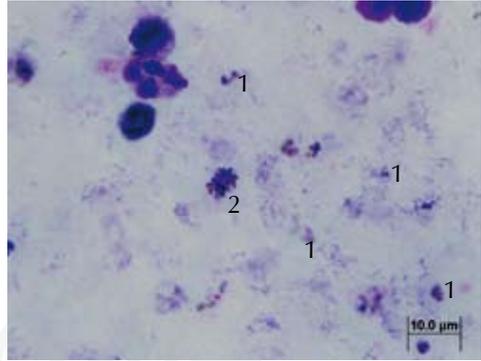


Figura 28. Gota gruesa con trofozoitos anulares (1) y un esquizonte (2) de *P. vivax*, 1.000X.

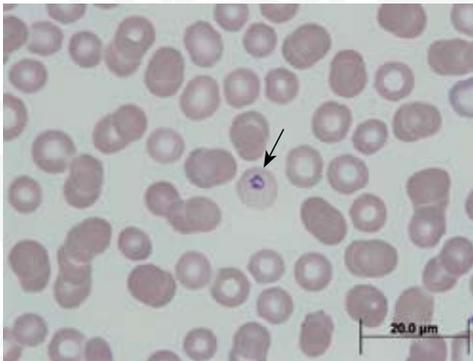


Figura 29. Extendido delgado con trofozoito anular de *P. falciparum*, 1.000X.

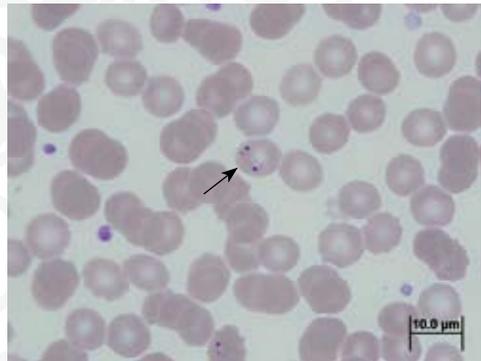


Figura 30. Extendido delgado donde se observa un eritrocito infectado con dos trofozoitos anulares de *P. falciparum*, 1.000X.

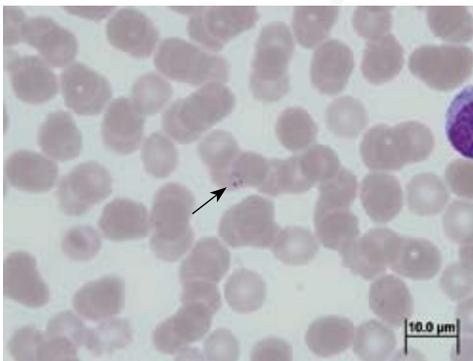


Figura 31. Extendido delgado con trofozoito anular de *P. falciparum*. Note los dos fragmentos de cromatina, 1.000X.

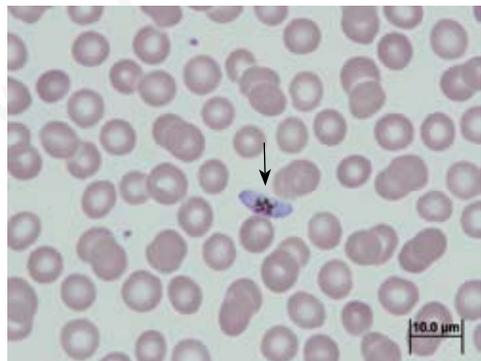


Figura 32. Extendido delgado con gametocito de *P. falciparum*. Cromatina laxa vista en gametocitos, fenómeno común en todas las especies. Las formas maduras suelen concentrar hemozoína, 1.000X.

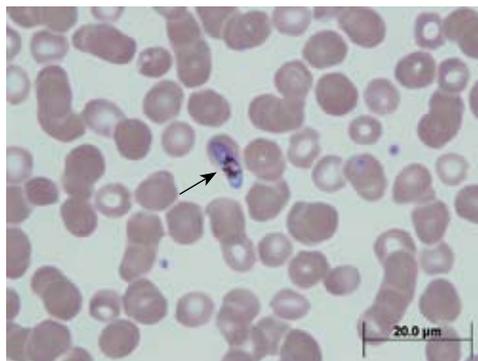


Figura 33. Extendido delgado con gametocito de *P. falciparum*. Las formas maduras suelen concentrar hemozina, 1.000X.

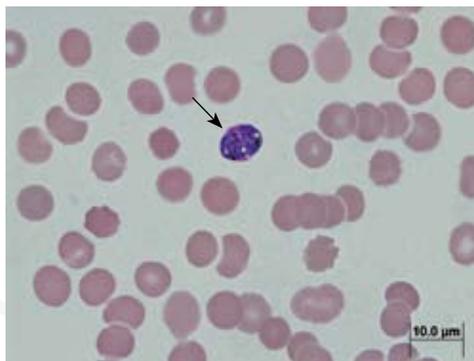


Figura 34. Extendido delgado con esquizonte de *P. falciparum*, 1.000X.

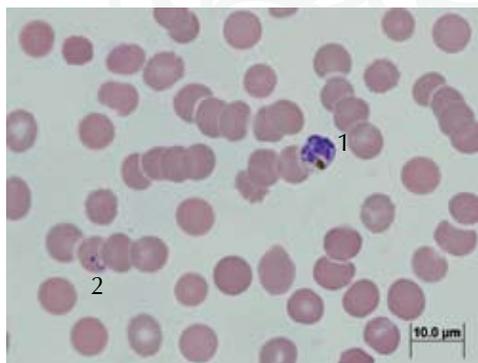


Figura 35. Extendido delgado con esquizonte (1) y trofozoito anular (2) de *P. falciparum*, 1.000X.

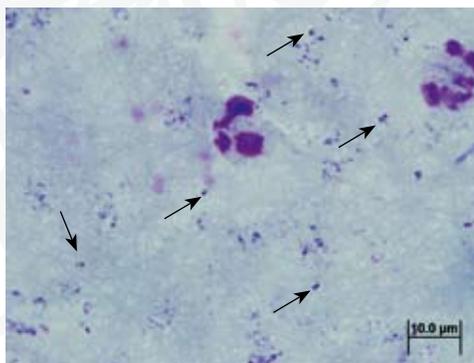


Figura 36. Gota gruesa con trofozoitos anulares de *P. falciparum*, 1.000X.

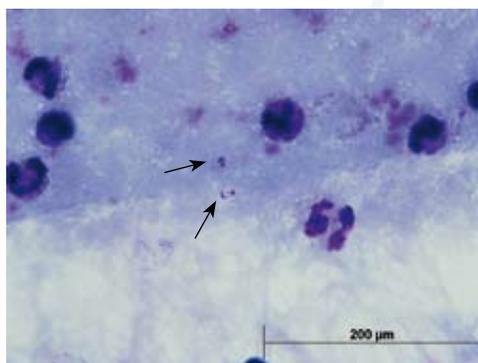


Figura 37. Gota gruesa con trofozoitos anulares de *P. falciparum* con cromatina condensada y citoplasma, 1.000X.

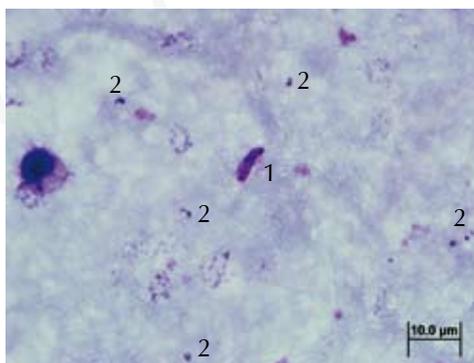


Figura 38. Gota gruesa con gametocito (1) y trofozoitos (2) de *P. falciparum*, 1.000X.

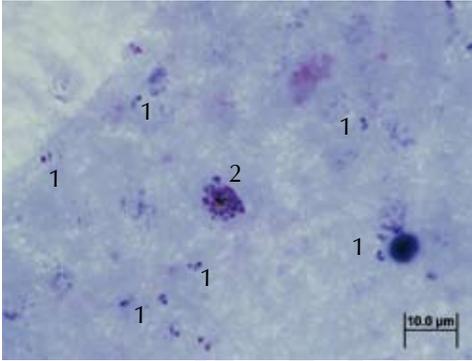


Figura 39. Gota gruesa con múltiples trofozoítos anulares (1) y un esquizonte (2) de *P. falciparum*, 1.000X.

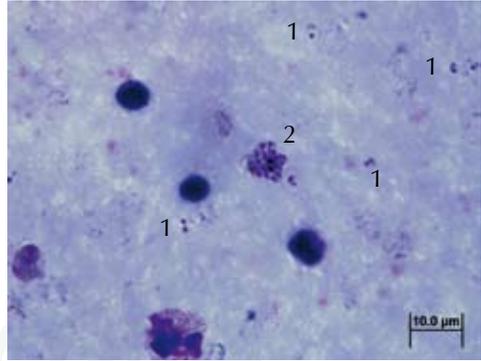


Figura 40. Gota gruesa con múltiples trofozoítos anulares (1) y un esquizonte (2) de *P. falciparum*, 1.000X.

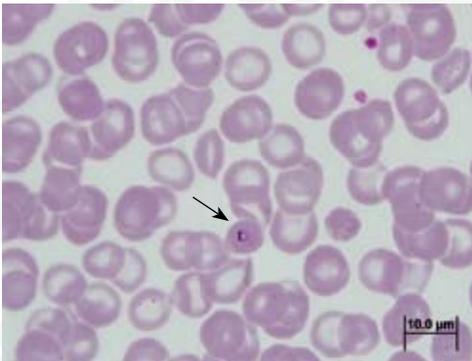


Figura 41. Extendido delgado que muestra trofozoito anular de *P. malariae*, 1.000X.

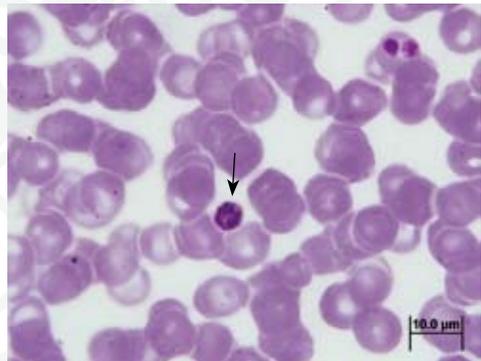


Figura 42. Extendido delgado con esquizonte (pre-segmentado) de *P. malariae*, 1.000X.

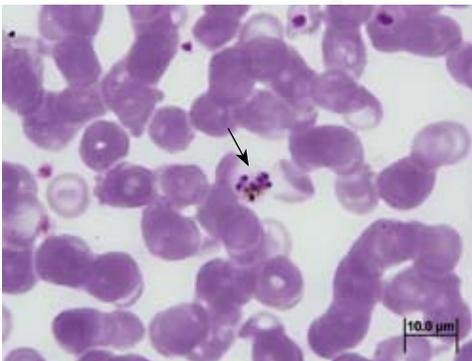


Figura 43. Extendido delgado con esquizonte de *P. malariae*, 1.000X.

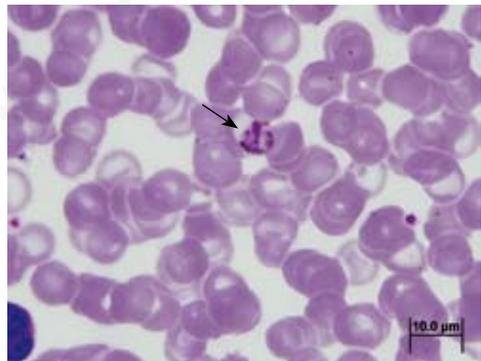


Figura 44. Extendido delgado que muestra gametocito de *P. malariae*, 1.000X.

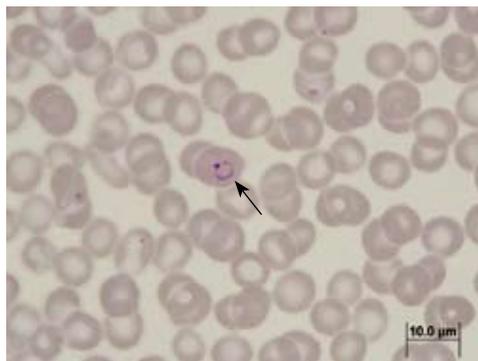


Figura 45. Extendido delgado con trofozito anular de *P. ovale*, 1.000X.

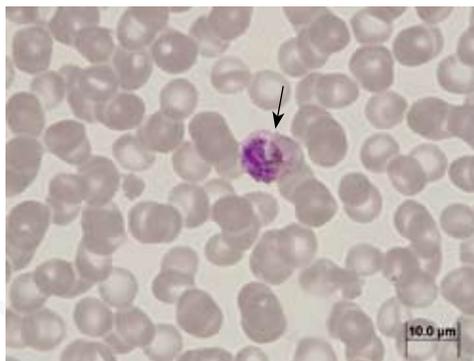


Figura 46. Extendido delgado con gametocito de *P. ovale*, 1.000X.

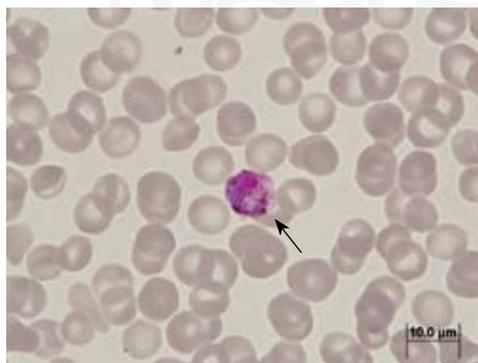


Figura 47. Extendido delgado con gametocito de *P. ovale*. Note las granulaciones de Schüffner, 1.000X.

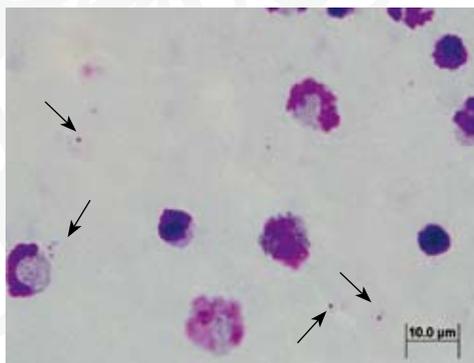


Figura 48. Gota gruesa con anillos de *P. ovale*, 1.000X.

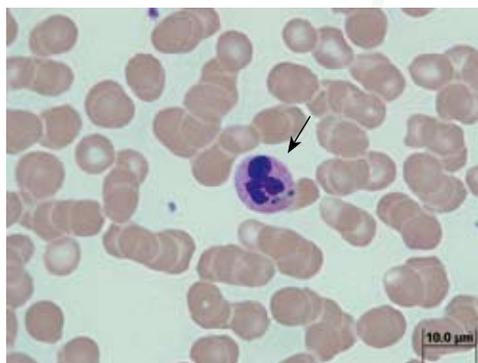


Figura 49. Extendido delgado con neutrófilo cargado con cristales de hemozoína, 1.000X.

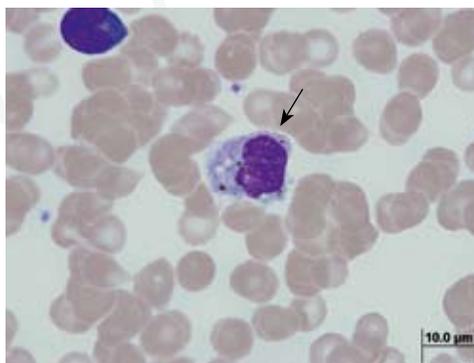


Figura 50. Extendido delgado con monocito cargado con cristales de hemozoína, 1.000X.

Métodos rápidos (RDTs) por inmunocromatografía

El fenómeno de resistencia a las quinolinas y la implementación de terapias combinadas con derivados de la artemisinina han incrementado los costos del tratamiento para malaria [66]. Los análisis costo-beneficio han mostrado que el diagnóstico parasitológico previo al inicio de tratamiento es la mejor estrategia, pues se evita iniciar un tratamiento costoso en pacientes que no lo requieren [5]. Hacia finales del siglo pasado se desarrollaron la RDTs basadas en inmunocromatografía para el diagnóstico de malaria, que dan resultados entre 15 a 20 minutos [97, 108]. En zonas donde no se tiene acceso a microscopía, especialmente en algunas regiones de África, se han convertido en una importante estrategia de bajo costo para diagnosticar malaria [96]. En varios ensayos clínicos, las RDTs han mostrado una sensibilidad y especificidad de aproximadamente 77% a 100% y 83% a 100%, respectivamente [53].

Estos métodos se basan en la detección de antígenos del parásito usando inmunocromatografía de flujo lateral, con anticuerpos monoclonales contra diferentes antígenos de *Plasmodium* presentes en la sangre de individuos infectados [108]. La capacidad de detectar el antígeno depende de su concentración en sangre y la carga de parásitos total, y no se ve afectada por el fenómeno de falsos negativos por el secuestro de parásitos como la microscopía. Los anticuerpos pueden ser específicos para *P. falciparum*, contra antígeno pan-malárico (todas las especies) o para antígenos de especies diferentes a *P. falciparum*. Otro tipo de anticuerpo monoclonal es usado como la fase inmóvil de la cromatografía para capturar los anticuerpos solubles sólo cuando éstos se unen al antígeno de *Plasmodium* (figura 51) [108]. Sin embargo, estos métodos son pobres en la información que proveen sobre severidad y pronóstico, algunos no diferencian la especie de *Plasmodium* infectante, y la cuantificación de la parasitemia sigue siendo un problema con estos métodos. Además, su poca capacidad de discriminar parásitos viables de aquellos no viables limita su uso para el seguimiento de los pacientes que han recibido tratamiento o para el diagnóstico de pacientes que han tomado medicación [108].

Aunque hay decenas de pruebas rápidas comerciales, tres prototipos han sido las más importantes y representativas. El primero está representado por el ParaSight F® (IgG) y la ICT Malaria Pf® (IgM) que detectan la proteína rica en histidina 2 (HRP-2, del inglés *Histidine Rich Protein*) de *P. falciparum* [109]. 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/ μ L, para diagnosticar malaria por *P. falciparum* comparado con la gota gruesa [53]. Las principales limitaciones de los dispositivos de inmunocromatografía que detectan la HRP2 son su poca utilidad para hacer seguimiento al tratamiento por persistencia de la HRP-2 hasta 7 días después de haberse iniciado el tratamiento en un 68% de los pacientes, y 28 días en un 27% [110]. Otro problema son las cepas de *P. falciparum* que expresan variaciones de la proteína [111] o que no producen la proteína en concentraciones detectables [108, 112]. Se ha determinado que la ParaSight F presenta reacción cruzada con factor reumatoide [113].

El segundo prototipo importante de prueba de detección rápida se basa en la detección de la enzima lactato deshidrogenasa de *Plasmodium* (pLDH) y está representada por la prueba OptiMal [114]. La pLDH se expresa en diferentes isoformas en los estadios asexuales de todas las especies de *Plasmodium* que infectan humanos. La prueba comercial OptiMAL® usa un panel con tres anticuerpos monoclonales [115]: dos pan-específicos y uno específico contra pLDH de *P. falciparum*. La prueba tiene un desempeño diagnóstico semejante a las basadas en la HRP-2, aunque puede ser un poco menor para *P. ovale* y *P. malariae* [53]. Un estudio en Colombia comparó la prueba OptiMAL® con la gota gruesa para diagnóstico de malaria en 107 pacientes con síndrome febril agudo y 82 pacientes con malaria. Para *P. falciparum* se encontró una sensibilidad de 40% y una especificidad de 98%, y para *P. vivax*

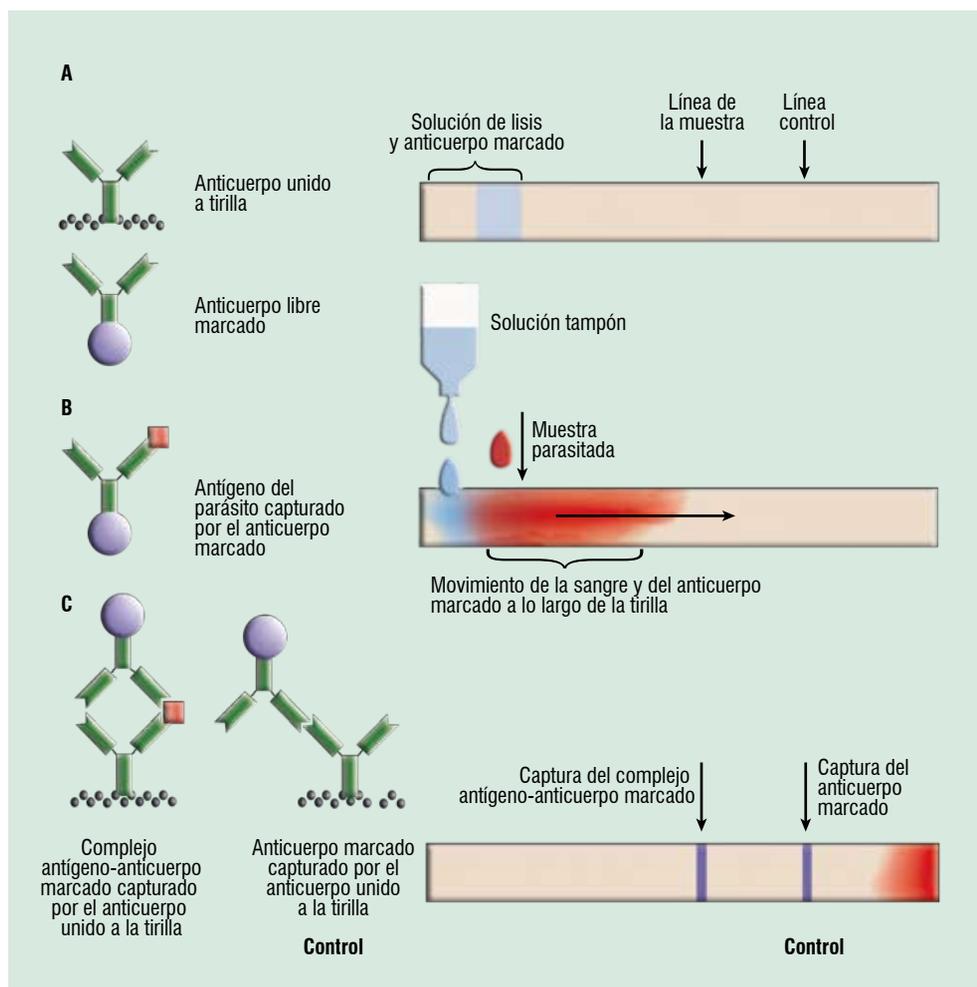


Figura 51. Esta prueba se basa en la captura del antígeno parasitario que está en la sangre periférica, utilizando anticuerpos monoclonales conjugados con una coloración de selenio u oro en una solución tampón. El movimiento de la solución tampón por la superficie de nitrocelulosa (tirilla) por efecto de capilaridad, transporta el complejo antígeno- anticuerpo a través de la tirilla. En la tirilla se encuentra fijo (en la línea de la muestra y en la línea de control) otro anticuerpo que captura el complejo antígeno-anticuerpo que se viene desplazando a lo largo de la tirilla, produciendo una línea visible en caso de se positiva la muestra.

mostró una sensibilidad de 97% y una especificidad de 89% [116]. Otro estudio mostró una sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de *P. vivax* y *P. falciparum* de 94% y 88%, y de 100% y 99%, respectivamente [117]. La actividad de la pLHD depende de la viabilidad del parásito, lo cual puede ser de utilidad clínica para el seguimiento de pacientes postratamiento en infecciones por *P. falciparum* y *P. vivax* [115], y su detección es proporcional a la parasitemia [116], permitiendo hacer seguimiento del tratamiento.

El tercer prototipo utilizado es la prueba que detecta la aldolasa de *Plasmodium* que se expresa principalmente en trofozoítos [108]. Los anticuerpos contra la aldolasa son pan-específicos. Se han implementado pruebas que combinan la detección de HRP-2 y aldolasa, encontrando en un estudio con 560 pacientes con sospecha de malaria, una sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de 95%, 75%, 50% y 98%, respectivamente [118]. La detección de aldolasa también parece estar influenciada por la parasitemia viable y puede ser útil para el seguimiento [119].

Otras aplicaciones de las RDTs basadas en inmunocromatografía son: centros sin microscopía o sin microscopista entrenado disponible; centros en regiones con baja prevalencia donde la calidad de la microscopía puede ser menor por la poca experiencia del personal de laboratorio; horas de trabajo extremas; diagnóstico en personal que trabaje en áreas remotas de manera temporal (investigadores, compañías mineras); investigación de brotes o epidemias donde la evaluación por microscopía no da abasto; auto-diagnóstico por personal entrenado que esté realizando trabajo de campo en zonas endémicas donde no hay microscopía; apoyo diagnóstico en pacientes con microscopía negativa y alta sospecha de malaria [120]; y, en el diagnóstico de malaria mixta, entre otras.

Otros métodos de detección

Se han desarrollado múltiples métodos de diagnóstico para malaria diferentes a la microscopía y a la detección de antígenos por inmunocromatografía. Estos métodos son utilizados principalmente en investigación o en situaciones especiales como el diagnóstico de malaria en sangre utilizada para transfusiones o en situaciones donde no se dispone de microscopista experto para malaria.

Microscopía de fluorescencia

Los parásitos se pueden visualizar usando ciertos fluorocromos que se intercalan en los ácidos nucleicos del parásito y emiten luz al ser excitados con luz ultravioleta. Los fluorocromos más utilizados son la naranja de acridina (NAC) [95] y la benzotiocarboxipurina (BCP) [121]. Ambos se excitan a 490 nm y emiten luz verde o amarilla, como se observa en la **figura 52**. Otros fluorocromos utilizados, principalmente en investigación, son la 4',6-diamino-2-fenilindol-propidio (DAPI-PI) [122], el SYBR Green I, el YOYO-I [123] y la rodamina-123 [108]. El límite de detección de la microscopía de fluorescencia es aproximadamente 100 parásitos/ μL , y su principal limitación es la dificultad para diferenciar la especie de *Plasmodium*.

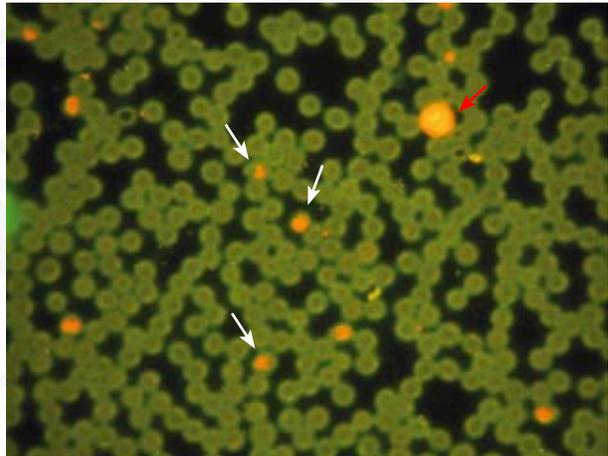


Figura 52. Parásitos de *Plasmodium* marcados con naranja de acridina (flechas blancas) dentro de los eritrocitos. Nótese como los leucocitos (flecha roja) también toman la coloración de naranja de acridina por su contenido de DNA. Fotografía por cortesía de FIND.

El método de *Buffy Coat* Cuantitativo (QBC, del inglés *Quantitative Buffy Coat*) es un método automatizado para la detección y cuantificación de parásitos que usa naranja de acridina (NAC) como fluorocromo (ver **figura 53**). Consiste en la centrifugación de una muestra de 55 μL a 65 μL de sangre obtenida en capilares que contienen NAC, y la posterior cuantificación de la intensidad de la fluorescencia emitida por los parásitos, la cual es proporcional a la parasitemia [124-125]. Si hay infección, la NAC se adhiere al DNA de los parásitos, emitiendo fluorescencia en el estrato correspondiente a los eritrocitos. Por el contrario, el estrato que contiene eritrocitos no infectados, no emite fluorescencia [125]. Causas de falsos positivos son la detección de ácidos nucleicos y material de desecho de células destruidas que captan la NAC o restos de cromatina como los cuerpos de Howell-Jolly [108]. La técnica permite dar un resultado negativo en un minuto y uno positivo usualmente en menos de 15 minutos. El límite

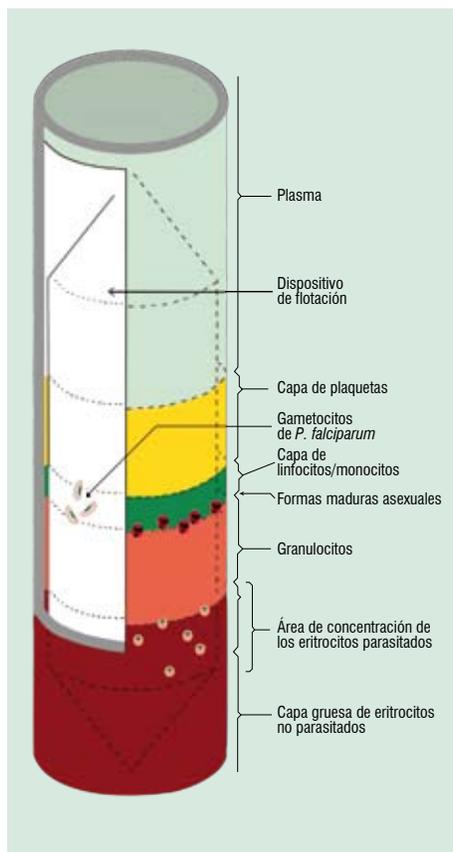


Figura 53. La sangre es recogida en capilares con naranja de acridina que son centrifugados. Los eritrocitos en la sangre son desplazados hacia la pared del capilar con la ayuda de un dispositivo de flotación cilíndrico, que amplifica unas 10 veces el área superior de los eritrocitos. Para la visualización se requiere un objetivo de 60X que transmita luz ultravioleta (ParaLens).

inferior de detección es <100 parásitos/ μL , su sensibilidad es de 41% a 73% [126] y su especificidad hasta de 93% para *P. falciparum* [127]. En infecciones por *Plasmodium* diferentes a *P. falciparum*, con abundantes formas maduras de los parásitos, la especificidad cae a 52% [108].

Serología para malaria

La serología para malaria detecta la presencia de IgG o IgM contra antígenos del parásito. Este método de detección no es de uso rutinario para el estudio y diagnóstico clínico del paciente con malaria. Su principal uso es en estudios seroepidemiológicos donde se requiere conocer el estado de inmunidad a la malaria de una población [128] y en el tamizaje para malaria en algunos bancos de sangre [129]. La aparición de anticuerpos comienza en pocos días y aumenta de manera significativa en pocas semanas, y persiste por meses o inclusive años en pacientes semi-inmunes que habitan zonas endémicas [37]. La inmunofluorescencia de anticuerpos en la sangre son desplazados hacia la pared del capilar con la ayuda de un dispositivo de flotación cilíndrico (IFAT) se considera la prueba serológica estándar para malaria; sin embargo, es difícil de hacer rutinariamente en escenarios clínicos, y es más de 60X que transmita luz ultravioleta (ParaLens) sensible para detectar *P. falciparum* [130]. Otro método utilizado es el ELISA para malaria con indicaciones similares a la IFAT. Para pruebas que combinan antígenos de *P. falciparum* y *P. vivax*, la sensibilidad y especificidad de la IFAT es de 70,5% y 99,6% respectivamente, y para el ELISA es de 84,2% y 99,6%, respectivamente [130].

Diagnóstico de malaria con autoanalizadores de hematología

Los autoanalizadores de hematología cuantifican y caracterizan los diferentes componentes de la sangre por medio de una combinación de métodos: análisis químicos; detección de conductancia eléctrica; radiofrecuencia; y citometría de flujo con detección de dispersión de luz láser y fluorescencia en múltiples ángulos. Son de amplio uso en la práctica clínica incluyendo en pacientes febriles con sospecha de malaria. La detección de alteraciones específicas para malaria puede ser especialmente útil en contextos clínicos donde hay baja sospecha de malaria y tienen el potencial de convertirse en un mecanismo de detección a prueba de fallas en los autoanalizadores comerciales a través de alarmas que indiquen la necesidad de una evaluación parasitológica de muestras sospechosas [131].

Los autoanalizadores de la serie Cell-Dyn de Abbott son los más estudiados para el diagnóstico de malaria. El instrumento detecta eventos anormales generados por el efecto que tiene la hemozoína dentro de los glóbulos blancos sobre los patrones de dispersión de luz láser utilizada para categorizar los glóbulos blancos (ver **figura 54**) [128]; trece estudios han

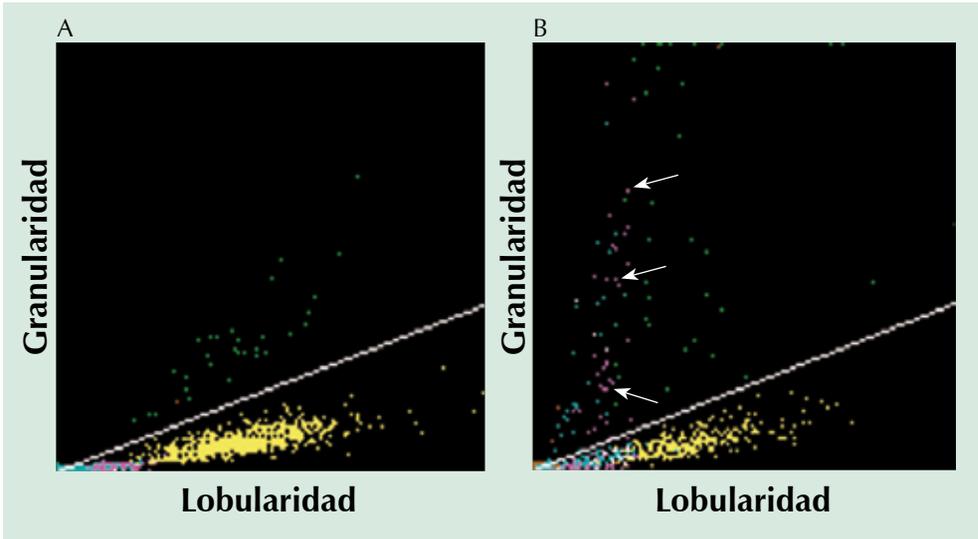


Figura 54. Dispersograma que muestra separación de leucocitos según características de granularidad (dispersión de luz a 90°; eje Y) y lobularidad (dispersión de luz a 10°; eje X) en una muestra de un individuo sano (A), y de un paciente con malaria por *P. falciparum* (B). Los eventos en color azul son linfocitos, magenta son monocitos, verde son eosinófilos y naranja son neutrófilos. Los monocitos presentan valores bajos de granularidad. Nótese en el Panel B (flecha) los eventos codificados como monocitos (magenta) con valores elevados y anormales de granularidad dados por la hemozoina presente en éstos. Imágenes por cortesía del Dr. Thomas Häscheid del Instituto de Microbiología y del Instituto de Medicina Molecular, Facultad de Medicina de Lisboa, Portugal; y del Dr. Martin P. Grobusch del Departamento Enfermedades Infecciosas, Medicina Tropical, HIV/AIDS, Amsterdam Medical Center, Universidad de Amsterdam, Holanda.

mostrado rangos de sensibilidad y especificidad entre 48,6% a 100%, y entre 25,3% a 100%, respectivamente [128, 132-144]. Para los hemogramas de los autoanalizadores Gen.S y LH750 de Coulter, dos estudios calcularon un “factor malárico” que utiliza la desviación estándar del volumen de monocitos y linfocitos, con una sensibilidad y especificidad de 96,9% a 98%, y de 82,5% a 94%, respectivamente, para el diagnóstico de malaria [145-146]. Otras alteraciones incluyen picos extra en los histogramas de reticulocitos de los Cell-Dyn [147], y en el histograma de leucocitos de los autoanalizadores Coulter [145]. La utilidad clínica de los hallazgos en los histogramas no ha sido estudiada lo suficiente.

Para el Sysmex XE-2100 se han descrito múltiples hallazgos en muestras infectadas con *P. vivax* en los dispersogramas DIFF, WBC-BASO, RET-EXT (ver **figura 55**), y en las variables numéricas dadas por el autoanalizador. Además, varios estudios han mostrado que el recuento de eosinófilos se eleva erróneamente hasta en un 20% (pseudoeosinofilia) en presencia de parásitos de *P. vivax* [78]. Las anomalías en la región de granulocitos del dispersograma DIFF, con o sin pseudoeosinofilia, han mostrado sensibilidades y especificidades entre 46,2% a 69,4% y entre 99,7% a 100%, respectivamente para el diagnóstico de *P. vivax* [148-149]. Dada la gran cantidad de variables alteradas en muestras con *P. vivax* se ha propuesto la creación de modelos que utilicen las variables que en conjunto logren predecir con mayor exactitud la presencia de la enfermedad y permitan crear alarmas para el autoanalizador [78]. Varios modelos basados en regresión logística para el diagnóstico de *P. vivax* logran sensibilidades y especificidades entre 94,3% a 96,8% y entre 95,1% a 96,8%, respectivamente, e incluyen variables de trombocitopenia, aumento en la diferencia del recuento de leucocitos total y el canal DIFF (parásitos erróneamente contados como leucocitos), aumento de los valores de LYMPH-Y (eventos en el eje Y de fluorescencia en el canal DIFF, ver **figura 55**), y recuento de píxeles azul oscuro en la porción inferior del dispersograma WBC-BASO (ver **figura 55**) [78]. En muestras infectadas con *P. falciparum* el desempeño diagnóstico es menor [78]. Para la implementación de estos modelos se remite a textos más especializados [78].

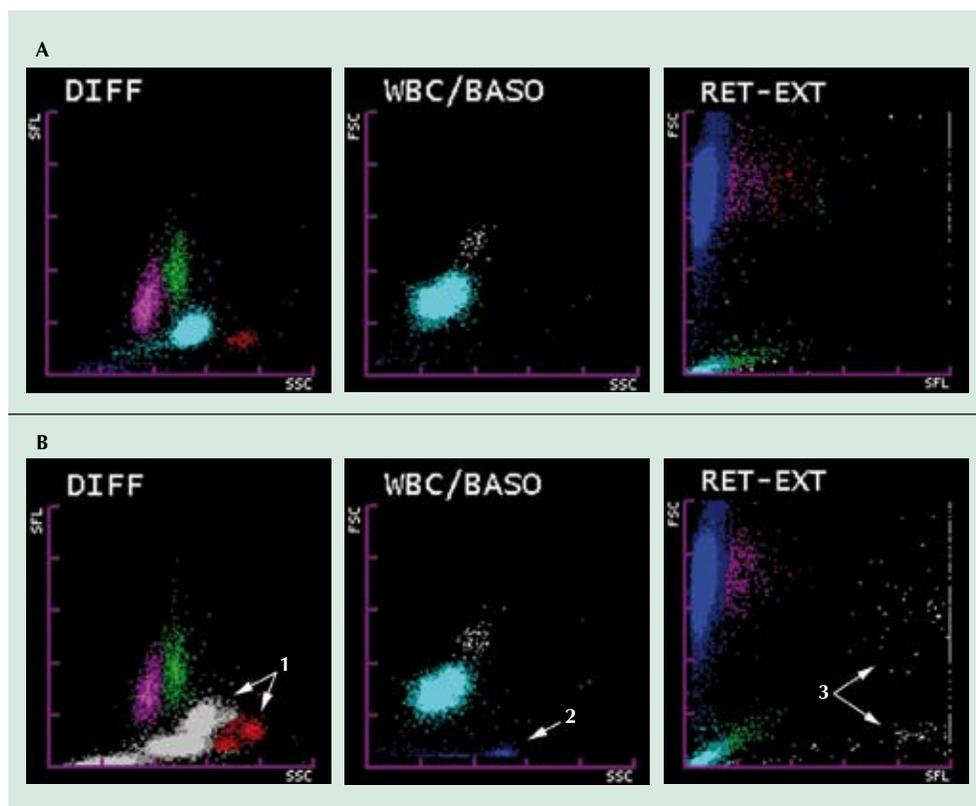


Figura 55. Dispersogramas DIFF, WBC/BASO y RET-EXT del autoanalizador Sysmex XE-2100 en un paciente sin malaria (Panel A) y en un paciente con malaria por *P. vivax* (Panel B). En el dispersograma DIFF (fluorescencia [SFL] dada por la cantidad de ácidos nucleicos versus valores de dispersión lateral [SSC] dados por granularidad de la célula), el color verde son monocitos, el magenta son linfocitos, el azul cielo son neutrófilos y basófilos juntos, el rojo son eosinófilos y el azul oscuro son “células fantasma” que corresponden a glóbulos rojos lisados. Nótese la tendencia a formar dos grupos extra en los granulocitos (neutrófilos y eosinófilos), la tendencia a fusionarse de neutrófilos y eosinófilos, y el cambio de color a gris (eventos no identificados) (1). En el dispersograma WBC/BASO (valores de dispersión frontal [FSC] dados por el tamaño celular versus valores de SSC), el grupo azul cielo son todos los leucocitos excepto basófilos, y los eventos grises son basófilos. Nótese en el Panel B la aparición de un grupo de eventos azules oscuros en la zona inferior (2). Más de 7 eventos en esta zona tiene una sensibilidad y especificidad de 97% y 94%, respectivamente, para el diagnóstico de *P. vivax* [62]. En el dispersograma RET-EXT (FSC versus SFL) los eventos azules oscuros con progresión al rojo son eritrocitos y reticulocitos, respectivamente, los eventos azul claro con progresión al verde son plaquetas y plaquetas inmaduras, respectivamente, y los eventos grises usualmente son fragmentos de leucocitos ricos en ácidos nucleicos (alto valor de fluorescencia). En la muestra con *P. vivax*, nótese la aparición de eventos con alta fluorescencia (ácidos nucleicos) de tamaño similar a eritrocitos o plaquetas (3).

Reacción en cadena de la polimerasa (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 [150]. Además, la PCR permite la identificación de cepas de *Plasmodium* con polimorfismos genéticos asociados a resistencia a antimaláricos [29], y la realización de la prueba en muestras almacenadas por varias semanas, permitiendo así el envío a laboratorios especializados [151]. Aunque es utilizada ampliamente en investigación, su uso en un escenario clínico se dificulta por costo, requerimientos de estandarización, personal entrenado y tiempo de ejecución [151]. La PCR podría tener uso clínico en situaciones muy particulares, como en el diagnóstico en pacientes con sospecha de malaria y múltiples gotas gruesas negati-

vas, (por ejemplo, pacientes con parasitemias submicroscópicas); en la confirmación de especie de *Plasmodium*; en la sospecha de malaria mixta por falla terapéutica (cubrimiento incompleto de quimioterapia); y, en el monitoreo de la respuesta al tratamiento (por ejemplo en aéreas con resistencia conocida a múltiples anti-maláricos (ver figura 56) [151].

Pruebas de laboratorio complementarias

La malaria puede producir un gran número de alteraciones en las pruebas de laboratorio que pueden ser solicitadas para complementar el estudio de malaria o como parte de un diagnóstico diferencial (ver figura 57). Para la evaluación del paciente con sospecha de malaria, se sugiere solicitar un hemograma completo para detectar anemia o trombocitopenia.

Aproximadamente la mitad de pacientes con malaria presentan anemia normocítica, normocrómica [49] y suele ser más frecuente en las infecciones por *P. falciparum* [152]. La presencia de microcitos sugiere deficiencia de hierro [53]. La causa de la anemia es multifactorial e incluye hemólisis, eliminación de la circulación de los eritrocitos infectados por parte del bazo, exceso de eliminación de eritrocitos no parasitados hasta 90% por senescencia acelerada, supresión de hematopoyesis, disminución en la eritropoyetina, y aumento de la actividad eritrofagocítica [53]. La aparición de trombocitopenia en *P. vivax* puede llegar a 55% [61], y puede presentarse con <70.000 plaquetas/ μ L en infecciones por *P. falciparum* [53]. La concentración de leucocitos suele estar relativamente disminuidos, y en caso de encontrarse una elevación significativa se debe evaluar la posibilidad de una co-infección bacteriana [68]. En pacientes con síntomas que sugieran sepsis, se deben solicitar hemocultivos para descartar bacteriemia [53].

Los pacientes pueden presentar hiponatremia secundaria a un síndrome de secreción inadecuada de hormona antidiurética, vómito y pérdida urinaria [153]. Se debe solicitar un citoquímico de orina para evaluar la presencia de hemoglobinuria en el caso de desarrollo de la llamada "fiebre de aguas negras", que se manifiesta como orina oscura como una bebida de "cola". También se deben solicitar pruebas de función renal para evaluar la presencia de falla renal prerrenal (hipovolemia o choque) o intrarrenal secundaria a la hemoglobinuria [53]. En pacientes con infección por *P. malariae* se debe evaluar la posibilidad de síndrome nefrótico cuantificando la proteinuria en 24 horas [74]. A todo paciente con diagnóstico de malaria y criterios de severidad, se debe solicitar análisis de pH y gases arteriales para determinar la gravedad de la acidosis láctica que se presenta hasta en el 85% de los pacientes con infección por *P. falciparum* [53]. La disminución del aporte y extracción de oxígeno a los tejidos como consecuencia de la anemia, el secuestro de eritrocitos en la microvasculatura y la hipovolemia producida por la disminución en la ingesta contribuyen con la acidosis. Esto

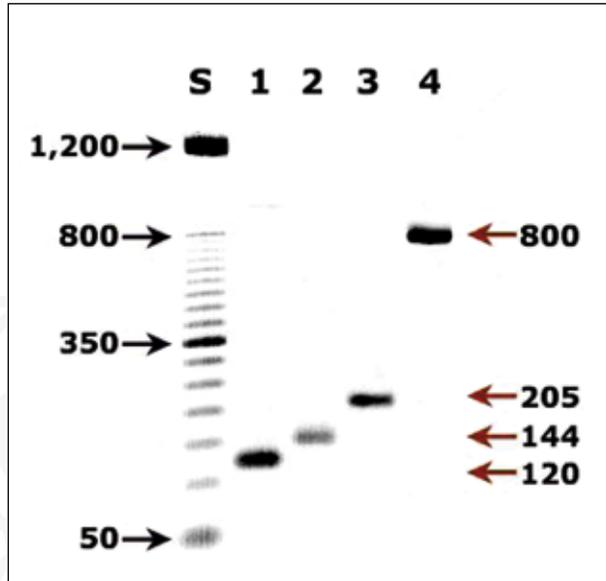


Figura 56. Análisis en gel de agarosa al 2% de una prueba diagnóstica de PCR que identifica el DNA de las diferentes especies de *Plasmodium*. El carril S muestra el marcador de tamaño molecular. En el carril 1 se observa la banda de 120 pares de bases (bp) que representa *P. vivax*, en el carril 2 se observa la banda de 144 bp que representa *P. malariae*, en el carril 3 se observa la banda de 205 pares de bases que representa *P. falciparum* y en el carril 4 se observa la banda de 800 pares de bases que representa *P. ovale*.

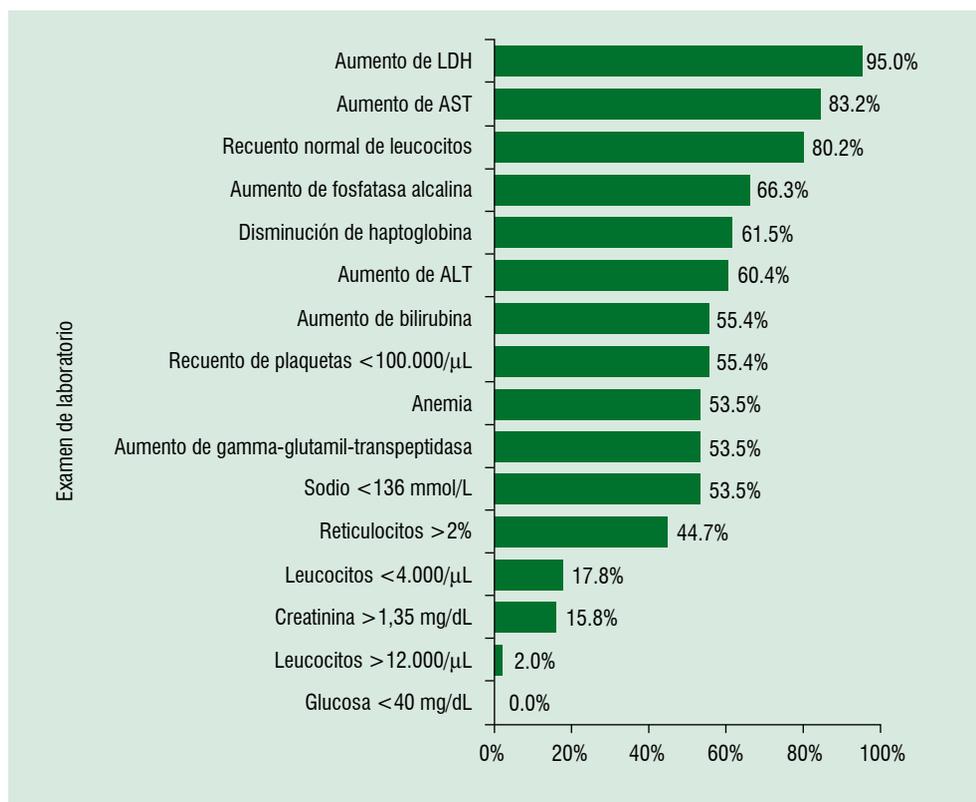


Figura 57. Pruebas de laboratorio y hallazgos frecuentes en la práctica clínica que muestran alteraciones en pacientes no inmunes con malaria [59]. Convenciones: LDH: deshidrogenasa láctica; AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanino aminotransferasa.

produce un cambio de metabolismo aerobio a anaerobio con la consecuente acumulación de lactato. Otros factores que parecen contribuir con la producción de lactato incluyen el metabolismo anaerobio del parásito [154], la disminución de la depuración hepática de lactato por disminución del flujo y la disfunción renal [53].

También se debe solicitar mediciones de glucemia periódicamente, especialmente en niños con malaria severa por *P. falciparum* y en pacientes que estén recibiendo quinina como tratamiento por el riesgo de estos medicamentos de producir hipoglucemia [53]. La fisiopatología de la hipoglucemia difiere entre niños y adultos; en niños se produce por gluconeogénesis hepática alterada y aumento de consumo de glucosa por parte de órganos periféricos hipermetabólicos [155], en tanto que en adultos es causada por hiperinsulinemia, que resulta de la estimulación directa a la célula β pancreática por parte de factores derivados del parásito, y/o terapia parenteral con quinina [69, 156]. Se debe considerar también la posibilidad de embarazo en toda paciente con malaria y edad reproductiva, no sólo por las implicaciones que la infección tiene sobre la madre y el feto, sino también porque estas pacientes deben recibir un tratamiento diferente libre de primaquina [69].

Recaída versus recrudescencia versus reinfección

El término “recaída” toma un significado especial cuando se aplica a la malaria y se debe distinguir de una simple recurrencia o fenómeno de recrudescencia (ver **figura 5**). Además, diferenciar entre recaída, recrudescencia y reinfección, aunque difícil, resulta de gran im-

portancia para el manejo de la malaria. Cuando la eliminación de los estadios sanguíneos del parásito es incompleta, ya sea por falla terapéutica o por estado de semi-inmunidad del hospedero, el paciente puede presentar síntomas de la enfermedad tiempo después de las manifestaciones iniciales. Cuando el paciente asintomático con una parasitemia por debajo del umbral pirogénico, presenta síntomas una vez se sobrepasa el umbral, se considera que tiene una **recrudescencia** (ver **figura 5**) [50]. Ésta es más frecuente a corto plazo con *P. falciparum* [50] y puede ocurrir a largo plazo con *P. malariae* [157].

La **recaída** específicamente se refiere a la reaparición de síntomas y parasitemia después de la eliminación total y efectiva de todos los estadios sanguíneos del parásito (ciclo eritrocítico) [50]. Se define como la reaparición de parasitemia en una infección inducida inicialmente por esporozoítos después de una terapia contra esquizontes sanguíneos efectiva [158]. El fenómeno se produce entre 2 a 12 meses después de las manifestaciones iniciales de la enfermedad tratada, donde permanecen estadios latentes o hipnozoítos de *P. vivax* o *P. ovale* en el hígado, que al reactivarse liberan nuevamente merozoítos a la sangre y se inicia una nueva esquizogonia eritrocitaria (ver **figura 5**) [50]. Una verdadera recaída malarica siempre es de origen exoeritrocítico; una infección adquirida por transfusión de sangre, por ejemplo, sólo tiene ciclo endoeritrocítico y por esto no puede haber recaída [50].

En la práctica resulta casi imposible diferenciar una recaída de una recrudescencia, y esta última de una falla terapéutica, e incluso de un reinfección. Una recaída usualmente se presenta después del primer mes postratamiento en un paciente con *P. vivax*. Si el paciente tuvo malaria por *P. falciparum* y presenta síntomas durante el primer mes postratamiento, se debe considerar una falla terapéutica y seguir un protocolo de tratamiento acorde [69]. Se debe aclarar también que falla terapéutica no equivale a resistencia de *Plasmodium* a los antimaláricos, aunque algunos casos pueden ocurrir por resistencia, otros ocurren por circunstancias diversas como subdosificación, interacciones farmacocinéticas de los antimaláricos y no adherencia al tratamiento [69]. Cuando el paciente retorna a zona endémica y es diagnosticado con malaria nuevamente, se debe considerar la posibilidad de una **reinfección**. En este caso, si es por *P. falciparum*, ésta se da usualmente después del primer mes postratamiento y puede ser difícil diferenciarla de una recrudescencia. En el caso de *P. vivax*, una reinfección puede ser difícil de diferenciar de una recaída. Para determinar esto, se podría recurrir a métodos moleculares de diagnóstico; sin embargo, en la práctica, estos pacientes se les suele dar tratamiento antimalárico convencional.

Malaria mixta

La presencia de múltiples especies de *Plasmodium* en un huésped es un fenómeno relativamente frecuente y que ofrece grandes dificultades para su diagnóstico. Una revisión sobre el tema muestra la magnitud del problema de subdiagnóstico de malaria mixta, con sólo de 0% a 3,4% de infecciones mixtas identificadas por microscopia, comparado con 5% a 65% detectadas por PCR [120]. Usualmente estas infecciones son causadas por *P. vivax* y *P. falciparum*; sin embargo, pueden ser causadas por cualquier combinación y número de especies. Se tiene evidencia que la infección concurrente tiene efectos supresores mutuos para las especies implicadas; sin embargo, aún pueden causar manifestaciones severas en niños [159]. El diagnóstico de la malaria mixta es difícil en la práctica clínica y usualmente no son reconocidas por varios motivos: 1) la dificultad en diferenciar los anillos jóvenes de las cuatro especies de *Plasmodium*; 2) una de las especies infectantes puede tener densidades por debajo del nivel de detección de la microscopia (por ejemplo, <50 parásitos/ μ L); 3) el microscopista, una vez identifica una especie, puede desistir de la búsqueda de otra especie críptica que se encuentra en menor concentración; y, 4) la sangre puede estar libre de parásitos, pero el hígado puede tener estadios latentes que producirán síntomas semanas después [120].

En la actualidad no se cuenta con criterios explícitos o claros para el diagnóstico de la malaria mixta. Las manifestaciones clínicas de la malaria mixta son como las descritas previamente; sin embargo, estos pacientes pueden presentar fiebres más altas independiente de la parasitemia, y los patrones cíclicos de fiebre tienden a desaparecer o volverse más complejos por la presencia de dos o más ciclos simultáneos y asincrónicos de multiplicación en el huésped [160]. El diagnóstico por microscopía de la malaria mixta tiene muy bajo rendimiento y usualmente depende de la capacidad y experiencia del microscopista en detectar este tipo de infecciones. Su diagnóstico por microscopía depende de la detección de formas del parásito características para cada especie, siendo la más clásica la detección de gametocitos de *P. falciparum* concomitante con formas de otra especie como *P. vivax*. No obstante, no siempre es posible visualizar los gametocitos característicos de *P. falciparum*, y la diferenciación usando otras formas puede ser más difícil [161]. Para la diferenciación adecuada de las formas del parásito presente en la muestra se recomienda hacer uso del extendido delgado. La proporción de anillos en la muestra puede ayudar a detectar una infección mixta. La mediana del porcentaje de anillos en muestras con *P. falciparum* se acerca a 100% de las formas visualizadas, comparado con 36,5% en *P. vivax* [162]. En consecuencia, se puede considerar la posibilidad de malaria mixta en muestras con *P. vivax* que presenten una proporción alta de anillos, aproximadamente >40-50% de todas las formas parasitadas. También se debe sospechar malaria mixta en el caso que un paciente inicialmente tratado para una infección, usualmente *P. vivax*, presente pocas semanas después del tratamiento una especie críptica diferente, usualmente *P. falciparum*, no susceptible a cloroquina que se manifiesta una vez la infección por *P. vivax* es suprimida [163]. Aun con estas pautas y con microscopía hecha por personal experto, la posibilidad de fallar en detectar una infección mixta sigue siendo alta. Para casos selectos donde el diagnóstico de malaria mixta no se logre por microscopía, se puede recurrir a la utilización de una combinación de microscopía (que detecte *Plasmodium* diferentes a *P. falciparum*), con una prueba de inmunocromatografía que utilice HRP-2 específica para *P. falciparum* [163]. 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 [163-164]. Desde el punto de vista del manejo, siempre que se tenga la sospecha de que el paciente tenga una infección concomitante con *P. falciparum*, se debe dar tratamiento efectivo contra éste dadas las consecuencias de no tratar esta infección adecuadamente, y teniendo en cuenta que un tratamiento efectivo para *P. falciparum* será efectivo para la fase eritrocítica de todas las otras especies. La posibilidad de dejar una infección latente por *P. vivax* o *P. ovale*, cuando esta especie no se identifica y sólo se da tratamiento para *P. falciparum*, también se debe considerar, especialmente si el paciente presenta síntomas semanas después.

Malaria en el embarazo

Durante la gestación normal, el volumen sanguíneo que irriga el útero aumenta hasta en un 80% al término del embarazo y puede alcanzar valores de 600 µL/minuto. La sangre materna ingresa al lecho placentario y el flujo disminuye notablemente causando que los eritrocitos permanezcan por más tiempo en este espacio [165]; en el caso de una mujer en embarazo y con malaria, este evento fisiológico favorece que el tiempo de estancia de los eritrocitos infectados aumente, y que a su vez aumente la adhesión de éstos al tejido placentario. La malaria durante el embarazo puede tener como resultado bajo peso al nacer, parto pretérmino, retardo en el crecimiento intrauterino y mortalidad perinatal [166]. La malaria placentaria involucra con mayor frecuencia cepas de *P. falciparum* que expresan PfEMP-1 con afinidad para el CSA expresado en el tejido placentario, a diferencia de cepas que se adhieren a la microvasculatura periférica a través de PfEMP-1 con afinidad por el CD36 del endotelio vascular [4]. El fenómeno de secuestro placentario puede ser de gran magnitud y producir parasitemias bajas (submicroscópicas) que dificultan el diagnóstico utilizando microscopía convencional [143]. Se ha propuesto para la detección de malaria en las pacientes gestantes la utilización de RDTs y de la PCR que no se ven influenciadas por el fenómeno de secuestro, pues el antígeno soluble se encuentra en sangre periférica [167].

Malaria adquirida por transfusión sanguínea

En la malaria adquirida por transfusión, el agente infectante es el merozoíto, a diferencia del esporozoíto que infecta con la picadura del mosquito. Por esta razón, no se da ciclo hepático y en consecuencia, para *P. vivax* y *P. ovale* no se esperaría el fenómeno de recaída producida por reactivación de los hipnozoítos [50]. Dado que el ciclo sanguíneo se inicia inmediatamente con la transfusión, las manifestaciones clínicas son rápidas sin periodo significativo de latencia, y usualmente severas, especialmente en población no inmune, dependiendo de la carga de parásitos transfundida. La dosis infectiva de sangre es de aproximadamente 1 a 10 parásitos por unidad de sangre [129]. En zonas no endémicas, las donaciones de individuos con factores de riesgo para malaria o que hayan estado en zona endémica en los últimos 3 años, son rechazadas para evitar la transmisión de la enfermedad [129]. Sin embargo, en zonas de alta endemia, los donantes pueden ser semi-inmunes y no presentar síntomas al momento de una donación de sangre, y por esta razón, además de interrogar al donante, se debe contar con métodos de tamización como visualización de parásitos o detección de anticuerpos, antígenos o DNA del parásito en los bancos de sangre, que permita identificar donaciones potencialmente infectadas [168]. En Colombia, para evitar el contagio se excluyen donantes que hayan estado en zona malaria en los últimos 6 meses [169]. La mayoría de los casos de transmisión de malaria por transfusión viene de donantes semi-inmunes que tienen parasitemias submicroscópicas o tan bajas que no son detectadas por los métodos de laboratorio utilizados en la tamización [129]. Esto hace que los métodos de detección de anticuerpos por ELISA para excluir sangre de pacientes semi-inmunes tengan acogida como método de tamización [170-171].

Conclusiones

En conclusión, se propone un algoritmo para la utilización de los diferentes métodos de diagnóstico para malaria (ver **figura 58**). La sospecha clínica para malaria va estar influenciada por la endemia del sitio donde se presente el caso, y de las manifestaciones clínicas e historia de viaje del paciente. En zonas de alta endemia, el enfoque diagnóstico es sencillo y cualquier paciente con síndrome febril usualmente es evaluado con una gota gruesa, o en regiones remotas, con inmunocromatografía. En contextos de baja probabilidad preprueba se debe indagar sobre antecedentes de viajes a zonas endémicas en el último años por la posibilidad de latencias prolongadas con *P. vivax*, y observar hallazgos de laboratorio, usualmente en el hemograma, que pueden orientar al diagnóstico, y según esto, solicitar la gota gruesa. En un futuro es probable que se desarrollen alarmas para malaria en los autoanalizadores de hematología que permitan hacer un diagnóstico oportuno de la enfermedad. La sospecha clínica siempre debe ir acompañada de una prueba parasitológica que permita excluir la enfermedad o confirmarla identificando el parásito y guiando el manejo apropiado. El diagnóstico debe ser rápido y oportuno para evitar complicaciones. La primera prueba parasitológica que se debe hacer en nuestro medio es la gota gruesa, y el extendido de sangre periférica en el caso de tener dificultad para identificar la especie. Se debe recordar que una gota gruesa negativa no descarta el diagnóstico y se puede tratar de un resultado falso negativo debido a una parasitemia baja (menor de 100 parásitos/ μ L), secuestro de parásitos o a una muestra mal coloreada o insuficiente. Por esto se deben hacer hasta dos nuevas gotas gruesas cada 12-24 horas (tres gotas gruesas en total), aun si el paciente no presenta síntomas, antes de descartar el diagnóstico de malaria. En los casos positivos, usualmente la especie es fácilmente diferenciable; sin embargo, si hay duda sobre la presencia *P. falciparum* o malaria mixta, es importante hacer todo lo posible por diferenciar la especie pues esto guiará el tratamiento. Para diferenciar la especie o si se tiene duda sobre la posibilidad de una malaria mixta, inicialmente se debe consultar con el personal de microscopía con mayor experiencia y enviar las

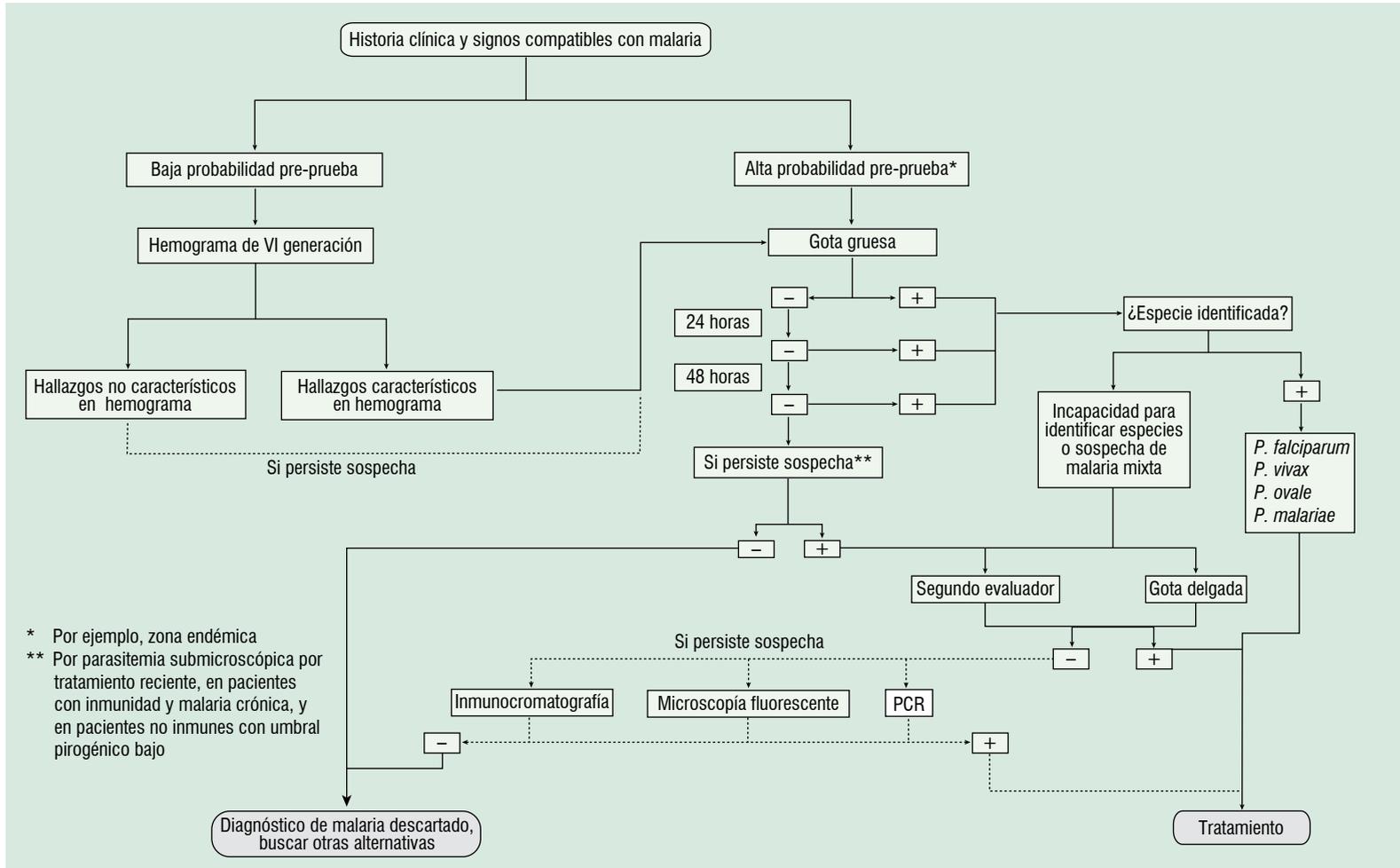


Figura 58. Algoritmo que muestra el proceso diagnóstico para la malaria.

placas para su evaluación. Adicionalmente, se debe hacer un extendido de sangre periférica y en casos selectos, combinar varias pruebas como la inmunocromatografía con la microscopía, o acudir a pruebas más sensibles y específicas como la PCR, aunque esto es difícil en nuestro medio.

Agradecimientos

A la bacterióloga Gloria Elcy Escobar Gallo y al Doctor Germán Campuzano Maya del Laboratorio Clínico Hematológico, por las microfotografías que documentan este módulo. A los Doctores Thomas Häscheid y Martin P. Grobusch por suministrar las imágenes de los dispersogramas del autoanalizador del Cell-Dyn.

Abstract: Malaria has afflicted the human species for millennia and continues to be one of the diseases that cause high morbidity and mortality, particularly in tropical areas in developing countries. Malaria is the most important parasitic infection, accounting for more than a million deaths per year worldwide. Malaria is caused by one of the four species of *Plasmodium* that infect humans: *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malaria* and *P. falciparum*, the latter posing the greater risk for patients due to its ability to infect erythrocytes of all ages, sequestration in microcirculation and its resistance to antimalarial drugs. Because of the increasing parasite resistance to antimalarial drugs and the increasing international travel, among other factors, the incidence of malaria continues to rise. This module describes the most important aspects of the parasite and the disease, including the life cycle, epidemiology and associated clinical manifestations. Finally, special emphasis is made on the various diagnostic tests, their indications and availability.

Key words: Malaria, *Plasmodium*, epidemiology, clinic, diagnosis.

Campuzano-Zuluaga G, Blair-Trujillo S. Malaria: Diagnostic considerations. *Medicina & Laboratorio* 2010; 16: 311-354.

Module 1 (Clinic and laboratory), number 81. Editora Médica Colombiana S.A., 2010®.

Received on August 5, 2010; accepted on August 20, 2010.

Bibliografía

1. **World Health Organization.** Malaria; Key facts. Vol. 2010. Geneva: WHO; 2010.
2. **Lee KS, Cox-Singh J, Singh B.** Morphological features and differential counts of *Plasmodium knowlesi* parasites in naturally acquired human infections. *Malar J* 2009; 8: 73.
3. **WHO.** World malaria report 2009 (ed 3). Geneva: World Health Organization; 2009.
4. **D'Acremont V, Lengeler C, Genton B.** Stop ambiguous messages on malaria diagnosis. *BMJ* 2007; 334: 489.
5. **Lubell Y, Reyburn H, Mbakilwa H, Mwangi R, Chonya S, Whitty CJ, et al.** The impact of response to the results of diagnostic tests for malaria: cost-benefit analysis. *BMJ* 2008; 336: 202-205.
6. **Newman RD, Parise ME, Barber AM, Steketee RW.** Malaria-related deaths among U.S. travelers, 1963-2001. *Ann Intern Med* 2004; 141: 547-555.
7. **Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI.** The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 2005; 434: 214-217.

8. **Carter R, Mendis KN.** Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 564-594.
9. **Guerra CA, Gikandi PW, Tatem AJ, Noor AM, Smith DL, Hay SI, et al.** The limits and intensity of *Plasmodium falciparum* transmission: implications for malaria control and elimination worldwide. *PLoS Med* 2008; 5: e38.
10. **Roll Back Malaria WHO, UNICEF.** 2005. World malaria report 2005. <http://rbm.who.int/wmr2005>.
11. **Xu WY.** [Mechanism of protective immunity induced by irradiation-attenuated sporozoites and its implication for pre-erythrocytic malaria vaccine research]. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi* 2009; 27: 70-74.
12. **Putrianti ED, Silvie O, Kordes M, Borrmann S, Matuschewski K.** Vaccine-like immunity against malaria by repeated causal-prophylactic treatment of liver-stage *Plasmodium* parasites. *J Infect Dis* 2009; 199: 899-903.
13. **Robinson LJ, D'Ombain MC, Stanisic DI, Taraika J, Bernard N, Richards JS, et al.** Cellular tumor necrosis factor, gamma interferon, and interleukin-6 responses as correlates of immunity and risk of clinical *Plasmodium falciparum* malaria in children from Papua New Guinea. *Infect Immun* 2009; 77: 3033-3043.
14. **Roll Back Malaria.** Key malaria facts; 2010.
15. **Sachs J, Malaney P.** The economic and social burden of malaria. *Nature* 2002; 415: 680-685.
16. **Pan American Health Organization.** PAHO Basic Health Indicator Data Base: Colombia. Vol. 2008: World Health Organization; 2003.
17. **Pan American Health Organization.** 2008. 142nd Session of the executive committee. <http://www.paho.org/English/GOV/CE/ce142-16-e.pdf>.
18. **Instituto Nacional de Salud.** Boletín epidemiológico semana 51. In: *Sivigila* ed. Bogotá: boletín epidemiológico semana 51 2009, ; 2009.
19. **Greenwood BM, Bojang K, Whitty CJ, Targett GA.** Malaria. *Lancet* 2005; 365: 1487-1498.
20. **Cowman AF, Crabb BS.** Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell* 2006; 124: 755 - 766.
21. **Aly AS, Vaughan AM, Kappe SH.** Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host. *Annu Rev Microbiol* 2009; 63: 195-221.
22. **Centers for Disease Control and Prevention.** *Anopheles* mosquitoes; 2010.
23. **Organización Panamericana de Salud.** Informe de la Situación del Paludismo en las Américas, Sección Colombia. Programa de Paludismo de Enfermedades Transmisibles; 2008.
24. **Mabaso ML, Sharp B, Lengeler C.** Historical review of malarial control in southern African with emphasis on the use of indoor residual house-spraying. *Trop Med Int Health* 2004; 9: 846-856.
25. **Gatton ML, Cheng Q.** Evaluation of the pyrogenic threshold for *Plasmodium falciparum* malaria in naive individuals. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66: 467-473.
26. **McGuire W, D'Alessandro U, Stephens S, Olaleye BO, Langerock P, Greenwood BM, et al.** Levels of tumour necrosis factor and soluble TNF receptors during malaria fever episodes in the community. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998; 92: 50-53.
27. **Naik RS, Branch OH, Woods AS, Vijaykumar M, Perkins DJ, Nahlen BL, et al.** Glycosylphosphatidylinositol anchors of *Plasmodium falciparum*: molecular characterization and naturally elicited antibody response that may provide immunity to malaria pathogenesis. *J Exp Med* 2000; 192: 1563-1576.
28. **Karunaweera ND, Wijesekera SK, Wanasekera D, Mendis KN, Carter R.** The paroxysm of *Plasmodium vivax* malaria. *Trends Parasitol* 2003; 19: 188-193.
29. **Blair-Trujillo S, Alvarez G, Campuzano-Maya G.** Relación entre anemia y malaria en una población rural de Colombia. *Boletn de la Direccion de Malariologia Y Saneamiento Ambiental* 1997; 37.
30. **Pongponratn E, Riganti M, Harinasuta T, Bunnag D.** Electron microscopy of the human brain in cerebral malaria. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1985; 16: 219-227.
31. **Sherman IW, Eda S, Winograd E.** Cytoadherence and sequestration in *Plasmodium falciparum*: defining the ties that bind. *Microbes Infect* 2003; 5: 897-909.
32. **Chotivanich KT, Dondorp AM, White NJ, Peters K, Vreeken J, Kager PA, et al.** The resistance to physiological shear stresses of the erythrocytic rosettes formed by cells infected with *Plasmodium falciparum*. *Ann Trop Med Parasitol* 2000; 94: 219-226.
33. **Dondorp AM, Nyanoti M, Kager PA, Mithwani S, Vreeken J, Marsh K.** The role of reduced red cell deformability in the pathogenesis of severe

- falciparum malaria and its restoration by blood transfusion. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96: 282-286.
34. **Higgins MK.** The structure of a chondroitin sulfate-binding domain important in placental malaria. *J Biol Chem* 2008; 283: 21842-21846.
 35. **Chen Q, Fernandez V, Sundstrom A, Schlichtherle M, Datta S, Hagblom P, et al.** Developmental selection of var gene expression in *Plasmodium falciparum*. *Nature* 1998; 394: 392-395.
 36. **Yipp BG, Anand S, Schollaardt T, Patel KD, Looareesuwan S, Ho M.** Synergism of multiple adhesion molecules in mediating cytoadherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to microvascular endothelial cells under flow. *Blood* 2000; 96: 2292-2298.
 37. **Fairhurst RM, Wellem TE.** *Plasmodium* Species (Malaria) In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Vol. 2 (ed 6): Churchill Livingstone; 2005.
 38. **Reeder JC, Cowman AF, Davern KM, Beeson JG, Thompson JK, Rogerson SJ, et al.** The adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to chondroitin sulfate A is mediated by *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 5198-5202.
 39. **Turner GD, Morrison H, Jones M, Davis TM, Looareesuwan S, Buley ID, et al.** An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. Evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration. *Am J Pathol* 1994; 145: 1057-1069.
 40. **Newbold C, Warn P, Black G, Berendt A, Craig A, Snow B, et al.** Receptor-specific adhesion and clinical disease in *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 57: 389-398.
 41. **Chen Q, Barragan A, Fernandez V, Sundstrom A, Schlichtherle M, Sahlen A, et al.** Identification of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) as the rosetting ligand of the malaria parasite *P. falciparum*. *J Exp Med* 1998; 187: 15-23.
 42. **Baruch DI, Pasloske BL, Singh HB, Bi X, Ma XC, Feldman M, et al.** Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell* 1995; 82: 77-87.
 43. **Su XZ, Heatwole VM, Wertheimer SP, Guinet F, Herrfeldt JA, Peterson DS, et al.** The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell* 1995; 82: 89-100.
 44. **Scherf A, Lopez-Rubio JJ, Riviere L.** Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. *Annu Rev Microbiol* 2008; 62: 445-470.
 45. **Hemmer CJ, Vogt A, Unverricht M, Krause R, Lademann M, Reisinger EC.** Malaria and bacterial sepsis: similar mechanisms of endothelial apoptosis and its prevention in vitro. *Crit Care Med* 2008; 36: 2562-2568.
 46. **WHO.** The role of laboratory diagnosis to support malaria disease management. Report of a WHO technical Consultation. Geneva; 2006: 5-6.
 47. **Schofield L, Grau GE.** Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 722-735.
 48. **World Health Organization.** Parasitological confirmation of malaria diagnosis. Geneva; 2009.
 49. **Tobon A.** [Danger signs in the malaria patient]. *Biomedica* 2009; 29: 320-329.
 50. **Cogswell FB.** The hypnozoite and relapse in primate malaria. *Clin Microbiol Rev* 1992; 5: 26-35.
 51. **Pongponratn E, Viriyavejakul P, Wilairatana P, Ferguson D, Chaisri U, Turner G, et al.** Absence of knobs on parasitized red blood cells in a splenectomized patient in fatal falciparum malaria. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2000; 31: 829-835.
 52. **Schwartz E, Parise M, Kozarsky P, Cetron M.** Delayed onset of malaria--implications for chemoprophylaxis in travelers. *N Engl J Med* 2003; 349: 1510-1516.
 53. **Krotoski WA, Collins WE, Bray RS, Garnham PC, Cogswell FB, Gwadz RW, et al.** Demonstration of hypnozoites in sporozoite-transmitted *Plasmodium vivax* infection. *Am J Trop Med Hyg* 1982; 31: 1291-1293.
 54. **Nishiura H, Lee HW, Cho SH, Lee WG, In TS, Moon SU, et al.** Estimates of short- and long-term incubation periods of *Plasmodium vivax* malaria in the Republic of Korea. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007; 101: 338-343.
 55. **Tsuchida H, Yamaguchi K, Yamamoto S, Ebisawa I.** Quartan malaria following splenectomy 36 years after infection. *Am J Trop Med Hyg* 1982; 31: 163-165.
 56. **Thang HD, Elsas RM, Veenstra J.** Airport malaria: report of a case and a brief review of the literature. *Neth J Med* 2002; 60: 441-443.

57. **Kockaerts Y, Vanhees S, Knockaert DC, Verhaegen J, Lontie M, Peetermans WE.** Imported malaria in the 1990s: a review of 101 patients. *Eur J Emerg Med* 2001; 8: 287-290.
58. **Oh MD, Shin H, Shin D, Kim U, Lee S, Kim N, et al.** Clinical features of vivax malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65: 143-146.
59. **Hanscheid T, Pinto BG, Pereira I, Cristino JM, Valadas E.** Avoiding misdiagnosis of malaria: a novel automated method allows specific diagnosis, even in the absence of clinical suspicion. *Emerg Infect Dis* 1999; 5: 836-838.
60. **Campuzano-Zuluaga G, Alvarez-Sanchez G, Escobar-Gallo GE, Valencia-Zuluaga LM, Rios-Orrego AM, Pabon-Vidal A, et al.** Design of malaria diagnostic criteria for the Sysmex XE-2100 hematology analyzer. *Am J Trop Med Hyg* 2010; 82: 402-411.
61. **Chotivanich K, Udomsangpetch R, Simpson JA, Newton P, Pukrittayakamee S, Looareesuwan S, et al.** Parasite multiplication potential and the severity of *Falciparum* malaria. *J Infect Dis* 2000; 181: 1206-1209.
62. **Beare NA, Taylor TE, Harding SP, Lewallen S, Molyneux ME.** Malarial retinopathy: a newly established diagnostic sign in severe malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 75: 790-797.
63. **Simpson JA, Silamut K, Chotivanich K, Pukrittayakamee S, White NJ.** Red cell selectivity in malaria: a study of multiple-infected erythrocytes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; 93: 165-168.
64. **Amodu OK, Adeyemo AA, Olumese PE, Gbadejesin RA.** Intraleucocytic malaria pigment and clinical severity of malaria in children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998; 92: 54-56.
65. **Rogerson SJ, Carter R.** Severe vivax malaria: newly recognised or rediscovered. *PLoS Med* 2008; 5: e136.
66. **WHO.** Guidelines for the treatment of malaria. (ed 2). Geneva: World Health Organization; 2010.
67. **World Health Organization, Communicable Diseases Cluster.** Severe *falciparum* malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94: 1-90.
68. **Ministerio de la Protección Social República de Colombia.** Guía 19. Guía de atención de la malaria. In: pública Guías de Promoción de la Salud y Prevención de Enfermedades en la Salud Pública. Resolución 412, del año 2000. Bogota DC; 2005.
69. **Carlini ME, White AC, Jr., Atmar RL.** Vivax malaria complicated by adult respiratory distress syndrome. *Clin Infect Dis* 1999; 28: 1182-1183.
70. **Oscherwitz SL.** Chronic malaria with splenic rupture. *J Travel Med* 2003; 10: 64-65.
71. **Okoro BA, Okafor HU, Nnoli LU.** Childhood nephrotic syndrome in Enugu, Nigeria. *West Afr J Med* 2000; 19: 137-141.
72. **Abdurrahman MB, Aikhionbare HA, Babaoye FA, Sathiakumar N, Narayana PT.** Clinicopathological features of childhood nephrotic syndrome in northern Nigeria. *Q J Med* 1990; 75: 563-576.
73. **Cunha CB, Cunha BA.** Brief history of the clinical diagnosis of malaria: from Hippocrates to Osler. *J Vector Borne Dis* 2008; 45: 194-199.
74. **Casalino E, Le Bras J, Chaussin F, Fichelle A, Bouvet E.** Predictive factors of malaria in travelers to areas where malaria is endemic. *Arch Intern Med* 2002; 162: 1625-1630.
75. **Kain KC, Harrington MA, Tennyson S, Keystone JS.** Imported malaria: prospective analysis of problems in diagnosis and management. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 142-149.
76. **Spitler DK.** Malaria relapse; report of a case 36 years after original infection. *N Engl J Med* 1948; 238: 839.
77. **Coatney GR.** Relapse in malaria--an enigma. *J Parasitol* 1976; 62: 3-9.
78. **Molyneux M, Fox R.** Diagnosis and treatment of malaria in Britain. *BMJ* 1993; 306: 1175-1180.
79. **Chotivanich K, Udomsangpetch R, Pattanapanyasat K, Chierakul W, Simpson J, Looareesuwan S, et al.** Hemoglobin E: a balanced polymorphism protective against high parasitemias and thus severe *P falciparum* malaria. *Blood* 2002; 100: 1172-1176.
80. **Modiano D, Luoni G, Sirima BS, Simpre J, Verrea F, Konate A, et al.** Haemoglobin C protects against clinical *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 2001; 414: 305-308.
81. **Bank A.** The thalassemia syndromes. *Blood* 1978; 51: 369-384.
82. **Oppenheimer SJ, Hill AV, Gibson FD, Macfarlane SB, Moody JB, Pringle J.** The interaction of alpha thalassaemia with malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987; 81: 322-326.
83. **Senok AC, Nelson EA, Li K, Oppenheimer SJ.** Thalassaemia trait, red blood cell age and oxidant stress: effects on *Plasmodium falciparum* growth and sensitivity to artemisinin. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997; 91: 585-589.
84. **Luzzi GA, Merry AH, Newbold CI, Marsh K, Pasvol G.** Protection by alpha-thalassaemia against *Plasmodium falciparum* malaria: modified surface antigen expression rather than im-

- paired growth or cytoadherence. *Immunol Lett* 1991; 30: 233-240.
85. **Shear HL, Grinberg L, Gilman J, Fabry ME, Stamatoyannopoulos G, Goldberg DE, et al.** Transgenic mice expressing human fetal globin are protected from malaria by a novel mechanism. *Blood* 1998; 92: 2520-2526.
 86. **Ruwende C, Khoo SC, Snow RW, Yates SN, Kwiatkowski D, Gupta S, et al.** Natural selection of hemi- and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria. *Nature* 1995; 376: 246-249.
 87. **Golenser J, Miller J, Spira DT, Kosower NS, Vande Waa JA, Jensen JB.** Inhibition of the intraerythrocytic development of *Plasmodium falciparum* in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient erythrocytes is enhanced by oxidants and by crisis form factor. *Trop Med Parasitol* 1988; 39: 273-276.
 88. **Foo LC, Rekhraj V, Chiang GL, Mak JW.** Ovalocytosis protects against severe malaria parasitemia in the Malayan aborigines. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 47: 271-275.
 89. **Pabon A, Carmona J, Burgos LC, Blair S.** Oxidative stress in patients with non-complicated malaria. *Clin Biochem* 2003; 36: 71-78.
 90. **Horuk R, Chitnis CE, Darbonne WC, Colby TJ, Rybicki A, Hadley TJ, et al.** A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: the erythrocyte chemokine receptor. *Science* 1993; 261: 1182-1184.
 91. **Welch SG, McGregor IA, Williams K.** The Duffy blood group and malaria prevalence in Gambian West Africans. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1977; 71: 295-296.
 92. **WHO.** Towards quality testing of malaria rapid diagnostic tests: evidence and methods, 2006.
 93. **World Health Organization.** The use of malaria rapid diagnostic test (ed Second). Geneva: World Health Organization 2006.
 94. **Feischer B.** Editorial: 100 years ago: Giemsa's solution for staining of plasmodia. *Trop Med Int Health* 2004; 9: 755-756.
 95. **Laveran A.** Deuxième note relative a un nouveau parasite trouvé dans le sang des malades atteints de la fièvre paludisme. *Bulletin de l'Academie medicale* 1880; 2: 1346-1347.
 96. **Shute GT, Sodeman TM.** Identification of malaria parasites by fluorescence microscopy and acridine orange staining. *Bull World Health Organ* 1973; 48: 591-596.
 97. **Wongsrichanalai C, Barcus MJ, Muth S, Sutamihardja A, Wernsdorfer WH.** A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). *Am J Trop Med Hyg* 2007; 77: 119-127.
 98. **Bain B, Chiodini P, England J, Bailey J.** The laboratory diagnosis of malaria. *Clin Lab Haem* 1997; 19: 165-170.
 99. **Lema OE, Carter JY, Nagelkerke N, Wangai 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.
 100. **Gutman JD, Kotton CN, Kratz A.** Case records of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Case 29-2003. A 60-year-old man with fever, rigors, and sweats. *N Engl J Med* 2003; 349: 1168-1175.
 101. **Centers for Disease Control & Prevention (CDC).** Comparison of *Plasmodium* Species Which Cause Malaria in Humans. DPDx - Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. Vol. 2010. Atlanta: CDC; 2009.
 102. **Nguyen PH, Day N, Pram TD, Ferguson DJ, White NJ.** Intraleucocytic malaria pigment and prognosis in severe malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995; 89: 200-204.
 103. **Day NP, Pham TD, Phan TL, Dinh XS, Pham PL, Ly VC, et al.** Clearance kinetics of parasites and pigment-containing leukocytes in severe malaria. *Blood* 1996; 88: 4694-4700.
 104. **Lopez ML, Arango EM, Arias LR, Carmona-Fonseca J, Blair S.** Hemozoina intraleucocitaria como indicador de malaria complicada por *Plasmodium falciparum*. *Acta Med Colomb* 2004; 29: 80-87.
 105. **Lyke KE, Diallo DA, Dicko A, Kone A, Coulibaly D, Guindo A, et al.** Association of intraleucocytic *Plasmodium falciparum* malaria pigment with disease severity, clinical manifestations, and prognosis in severe malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 69: 253-259.
 106. **Moody A.** Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 66-78.
 107. **Beadle C, Long GW, Weiss WR, McElroy PD, Maret SM, Oloo AJ, et al.** Diagnosis of malaria by detection of *Plasmodium falciparum* HRP-2 antigen with a rapid dipstick antigen-capture assay. *Lancet* 1994; 343: 564-568.
 108. **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. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 56: 44-48.
 109. **Lee N, Baker J, Andrews KT, Gatton ML, Bell D, Cheng Q, et al.** Effect of sequence variation in *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein

- 2 on binding of specific monoclonal antibodies: Implications for rapid diagnostic tests for malaria. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2773-2778.
110. **Pabon A, Alvarez G, Yanez J, Cespedes C, Rodriguez Y, Restrepo A, et al.** [Evaluation of ICT malaria immunochromatographic Binax NOW ICT Pf/Pv test for rapid diagnosis of malaria in a Colombian endemic area]. *Biomedica* 2007; 27: 225-235.
 111. **Laferi H, Kandel K, Pichler H.** False positive dipstick test for malaria. *N Engl J Med* 1997; 337: 1635-1636.
 112. **Singh N, Valecha N, Sharma VP.** Malaria diagnosis by field workers using an immunochromatographic test. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997; 91: 396-397.
 113. **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: 109-118.
 114. **Londono B, Carmona J, Blair S.** [Comparison between OptiMAL and the thick smear tests for malaria diagnosis in an endemic area during a non-epidemic period]. *Biomedica* 2002; 22: 466-475.
 115. **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: 203-206.
 116. **Tjitra E, Suprianto S, Dyer M, Currie BJ, Anstey NM.** Field evaluation of the ICT malaria Pf/Pv 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.
 117. **Eisen DP, Saul A.** Disappearance of pan-malarial antigen reactivity using the ICT Malaria Pf/Pv kit parallels decline of patent parasitaemia as shown by microscopy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94: 169-170.
 118. **Makler MT, Ries LK, Ries J, Horton RJ, Hinrichs DJ.** Detection of *Plasmodium falciparum* infection with the fluorescent dye, benzothio-carboxypurine. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 44: 11-16.
 119. **Caramello P, Lucchini A, Savoia D, Giannini P.** Rapid diagnosis of malaria by use of fluorescent probes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1993; 17: 293-297.
 120. **Mayxay M, Pukrittayakamee S, Newton PN, White NJ.** Mixed-species malaria infections in humans. *Trends Parasitol* 2004; 20: 233-240.
 121. **Guy R, Liu P, Pennefather P, Crandall I.** The use of fluorescence enhancement to improve the microscopic diagnosis of *falciparum* malaria. *Malar J* 2007; 6: 89.
 122. **Pinto MJ, Rodrigues SR, Desouza R, Verenkar MP.** Usefulness of quantitative buffy coat blood parasite detection system in diagnosis of malaria. *Indian J Med Microbiol* 2001; 19: 219-221.
 123. **Delacollette C, Van der Stuyft P.** Direct acridine orange staining is not a 'miracle' solution to the problem of malaria diagnosis in the field. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994; 88: 187-188.
 124. **Wongsrichanalai C, Ponsilapapit J, Namsiripongpun V, Webster HK, Luccini A, Pansamdang P, et al.** Acridine orange fluorescent microscopy and the detection of malaria in populations with low-density parasitemia. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 44: 17-20.
 125. **Gaye O, Diouf M, Diallo S.** A comparison of thick smears, QBC malaria, PCR and PATH *falciparum* malaria test strip in *Plasmodium falciparum* diagnosis. *Parasite* 1999; 6: 273-275.
 126. **Grobusch MP, Hanscheid T, Kramer B, Neukammer J, May J, Seybold J, et al.** Sensitivity of hemozoin detection by automated flow cytometry in non- and semi-immune malaria patients. *Cytometry B Clin Cytom* 2003; 55: 46-51.
 127. **Seed CR, Kitchen A, Davis TM.** The current status and potential role of laboratory testing to prevent transfusion-transmitted malaria. *Transfus Med Rev* 2005; 19: 229-240.
 128. **Doderer C, Heschung A, Guntz P, Cazenave JP, Hansmann Y, Senegas A, et al.** A new ELISA kit which uses a combination of *Plasmodium falciparum* extract and recombinant *Plasmodium vivax* antigens as an alternative to IFAT for detection of malaria antibodies. *Malar J* 2007; 6: 19.
 129. **Hanscheid T, Valadas E.** Malaria diagnosis. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61: 179.
 130. **Mendelow BV, Coetzer TL.** Automated malaria detection. *Br J Haematol* 1999; 106: 257-258.
 131. **Hanscheid T, Melo-Cristino J, Pinto BG.** Automated detection of malaria pigment in white blood cells for the diagnosis of malaria in Portugal. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 64: 290-292.
 132. **Wever PC, Henskens YM, Kager PA, Dankert J, van Gool T.** Detection of imported malaria with the Cell-Dyn 4000 hematology analyzer. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4729-4731.
 133. **Fawzi ZO, Fakhro NA, Nabhan RA, Allouche A, Scott CS.** Differences in automated depolarization patterns of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* malaria infections defined by the Cell-Dyn

- CD4000 haematology analyser. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2003; 97: 71-79.
134. **Scott CS, van Zyl D, Ho E, Meyersfeld D, Ruivo L, Mendelow BV, et al.** Automated detection of malaria-associated intraleucocytic haemozoin by Cell-Dyn CD4000 depolarization analysis. *Clin Lab Haematol* 2003; 25: 77-86.
 135. **Suh IB, Kim HJ, Kim JY, Lee SW, An SS, Kim WJ, et al.** Evaluation of the Abbott Cell-Dyn 4000 hematology analyzer for detection and therapeutic monitoring of *Plasmodium vivax* in the Republic of Korea. *Trop Med Int Health* 2003; 8: 1074-1081.
 136. **Dromigny JA, Jambou R, Scott CS, Perrier-Gros-Claude JD.** Performance evaluation of automated depolarization analysis for detecting clinically unsuspected malaria in endemic countries. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2005; 99: 430-439.
 137. **Josephine FP, Nissapatorn V.** Malaria: the value of the automated depolarization analysis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2005; 36 Suppl 4: 68-72.
 138. **Padial MM, Subirats M, Puente S, Lago M, Crespo S, Palacios G, et al.** Sensitivity of laser light depolarization analysis for detection of malaria in blood samples. *J Med Microbiol* 2005; 54: 449-452.
 139. **de Langen AJ, van Dillen J, de Witte P, Mucheto S, Nagelkerke N, Kager P.** Automated detection of malaria pigment: feasibility for malaria diagnosing in an area with seasonal malaria in northern Namibia. *Trop Med Int Health* 2006; 11: 809-816.
 140. **Hanscheid T, Langin M, Lell B, Potschke M, Oyakhrome S, Kremsner PG, et al.** Full blood count and haemozoin-containing leukocytes in children with malaria: diagnostic value and association with disease severity. *Malar J* 2008; 7: 109.
 141. **Hanscheid T, Langin M, Codices V, Luty AJ, Adegnikaa AA, Kremsner PG, et al.** Automated detection of haemozoin-containing monocytes for the diagnosis of malaria in microscopically negative cases during pregnancy. *Acta Trop* 2009; 109: 245-246.
 142. **Rathod DA, Patel V, Kaur AA, Patel VD, Patel DD.** Diagnosis of acute malaria by laser based cell counter with comparison of conventional and recent techniques in Indian scenario. *Indian J Pathol Microbiol* 2009; 52: 185-188.
 143. **Briggs C, Da Costa A, Freeman L, Aucamp I, Ngubeni B, Machin SJ.** Development of an automated malaria discriminant factor using VCS technology. *Am J Clin Pathol* 2006; 126: 691698.
 144. **Fourcade C, Casbas MJ, Belaouni H, Gonzalez JJ, Garcia PJ, Pepio MA.** Automated detection of malaria by means of the haematology analyser Coulter GEN.S. *Clin Lab Haematol* 2004; 26: 367-372.
 145. **Huh HJ, Oh GY, Huh JW, Chae SL.** Malaria detection with the Sysmex XE-2100 hematology analyzer using pseudo eosinophilia and abnormal WBC scattergram. *Ann Hematol* 2008; 87: 755-759.
 146. **Yoo JH, Song J, Lee KA, Sun YK, Kim YA, Park TS, et al.** Automated detection of malaria-associated pseudo eosinophilia and abnormal WBC scattergram by the Sysmex XE-2100 hematology analyzer: a clinical study with 1,801 patients and real-time quantitative PCR analysis in vivax malaria-endemic area. *Am J Trop Med Hyg* 2010; 82: 412-414.
 147. **Farcas GA, Soeller R, Zhong K, Zahirieh A, Kain KC.** Real-time polymerase chain reaction assay for the rapid detection and characterization of chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in returned travelers. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 622-627.
 148. **Scott CS, Van Zyl D, Ho E, Ruivo L, Kunz D, Coetzer TL.** Patterns of pseudo-reticulocytosis in malaria: fluorescent analysis with the Cell-Dyn CD4000. *Clin Lab Haematol* 2002; 24: 1520.
 149. **Hanscheid T.** Current strategies to avoid misdiagnosis of malaria. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 497-504.
 150. **Hanscheid T, Grobusch MP.** How useful is PCR in the diagnosis of malaria? *Trends Parasitol* 2002; 18: 395-398.
 151. **Ustianowski A, Schwab U, Pasvol G.** Case report: severe acute symptomatic hyponatraemia in falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96: 647-648.
 152. **Vander Jagt DL, Hunsaker LA, Campos NM, Baack BR.** D-lactate production in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 1990; 42: 277-284.
 153. **Dekker E, Hellerstein MK, Romijn JA, Neese RA, Peshu N, Endert E, et al.** Glucose homeostasis in children with falciparum malaria: precursor supply limits gluconeogenesis and glucose production. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 2514-2521.
 154. **White NJ, Warrell DA, Chanthavanich P, Loareesuwan S, Warrell MJ, Krishna S, et al.** Severe hypoglycemia and hyperinsulinemia in falciparum malaria. *N Engl J Med* 1983; 309: 61-66.

155. **Sutton MG, Plappert T, Doubilet P.** Relationship between placental blood flow and combined ventricular output with gestational age in normal human fetus. *Cardiovasc Res* 1991; 25: 603-608.
156. **Steketee RW, Wirima JJ, Hightower AW, Slutsker L, Heymann DL, Breman JG.** The effect of malaria and malaria prevention in pregnancy on offspring birthweight, prematurity, and intrauterine growth retardation in rural Malawi. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 55: 33-41.
157. **Flint J, Harding RM, Boyce AJ, Clegg JB.** The population genetics of the haemoglobinopathies. *Baillieres Clin Haematol* 1993; 6: 215-262.
158. **Fleming AF, Storey J, Molineaux L, Iroko EA, Attai ED.** Abnormal haemoglobins in the Sudan savanna of Nigeria. I. Prevalence of haemoglobins and relationships between sickle cell trait, malaria and survival. *Ann Trop Med Parasitol* 1979; 73: 161-172.
159. **Genton B, D'Acromont V, Rare L, Baea K, Reeder JC, Alpers MP, et al.** *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. *PLoS Med* 2008; 5: e127.
160. **McKenzie FE, Smith DL, O'Meara WP, Forney JR, Magill AJ, Permpnich B, et al.** Fever in patients with mixed-species malaria. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 1713-1718.
161. **Gupta B, Gupta P, Sharma A, Singh V, Dash AP, Das A.** High proportion of mixed-species *Plasmodium* infections in India revealed by PCR diagnostic assay. *Trop Med Int Health* 2010; 15: 819-824.
162. **Russell B, Chalfein F, Prasetyorini B, Kenan-galem E, Piera K, Suwanarusk R, et al.** Determinants of in vitro drug susceptibility testing of *Plasmodium vivax*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 1040-1045.
163. **Mayxay M, Pukritrakamee S, Chotivanich K, Imwong M, Loareesuwan S, White NJ.** Identification of cryptic coinfection with *Plasmodium falciparum* in patients presenting with vivax malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65: 588-592.
164. **Campos Franco J, Llovo Taboada J, Lopez Rodriguez R, Mallo Gonzalez N, Cortizo Vidal S, Alende Sixto R.** [Mixed infection due to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium malariae*: diagnostic usefulness of molecular methods]. *An Med Interna* 2008; 25: 149-150.
165. **Mockenhaupt FP, Ulmen U, von Gaertner C, Bedu-Addo G, Bienzle U.** Diagnosis of placental malaria. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 306-308.
166. **Seed CR, Cheng A, Davis TM, Bolton WV, Keller AJ, Kitchen A, et al.** The efficacy of a malarial antibody enzyme immunoassay for establishing the reinstatement status of blood donors potentially exposed to malaria. *Vox Sang* 2005; 88: 98-106.
167. **Ministerio de la Protección Social República de Colombia.** Cuadros de Indicadores Salud Pública, Tasa de incidencia de malaria en población a riesgo Bogota; 2009.
168. **Trampuz A, Jereb M, Muzlovic I, Prabhu RM.** Clinical review: Severe malaria. *Crit Care* 2003; 7: 315-323.
169. **Freitas do Rosario AP, Muxel SM, Rodriguez-Malaga SM, Sardinha LR, Zago CA, Castillo-Mendez SI, et al.** Gradual decline in malaria-specific memory T cell responses leads to failure to maintain long-term protective immunity to *Plasmodium chabaudi* AS despite persistence of B cell memory and circulating antibody. *J Immunol* 2008; 181: 8344-8355.
170. **Chiodini PL, Hartley S, Hewitt PE, Barbara JA, Lalloo K, Bligh J, et al.** Evaluation of a malaria antibody ELISA and its value in reducing potential wastage of red cell donations from blood donors exposed to malaria, with a note on a case of transfusion-transmitted malaria. *Vox Sang* 1997; 73: 143-148.
171. **Suh KN, Kain KC, Keystone JS.** Malaria. *CMAJ* 2004; 170: 1693-1702.