

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
ESCUELA DE BIOANÁLISIS

DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE LICENCIADO EN BIOANÁLISIS CLÍNICO

“CORRELACIÓN DE RESULTADOS ENTRE PRUEBA
RÁPIDA Y PRUEBA INMUNOENZIMÁTICA (ELISA) EN LA
DETECCIÓN DE ANTÍGENOS DE MALARIA EN
DONANTES DE SANGRE ASINTOMÁTICOS,
PROVENIENTES DE ZONAS ENDÉMICAS DEL
ECUADOR”

RAÚL ANDRÉS GONZÁLEZ RODRÍGUEZ

DIRECTORA: MST. ROSITA CHIRIBOGA

QUITO, 2013

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, RAÚL ANDRÉS GONZÁLEZ RODRÍGUEZ, CI. 1003233515 autor del trabajo de graduación titulado “CORRELACIÓN DE RESULTADOS ENTRE PRUEBA RÁPIDA Y PRUEBA INMUNOENZIMÁTICA (ELISA) EN LA DETECCIÓN DE ANTÍGENOS DE MALARIA EN DONANTES DE SANGRE ASINTOMÁTICOS, PROVENIENTES DE ZONAS ENDÉMICAS DEL ECUADOR”, previa a la obtención del grado académico de LICENCIADO EN BIOANÁLISIS CLÍNICO en la Escuela de Bioanálisis.

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior de entregar a la SENECYT en forma digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo y graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito

Raúl Andrés González Rodríguez

C.I. 1003233515

DEDICATORIA

A Dios, mi familia y amigos.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a Dios por no abandonarme y acompañarme en toda mi vida, por ser esa luz espiritual que ha guiado mi caminar especialmente durante mi carrera.

De manera muy especial quiero agradecer a mis padres, Raúl y Rocío por ser esa guía y ejemplo en toda mi vida. Gracias por enseñarme día a día las cosas que de verdad importan, gracias por su apoyo incondicional, gracias por todo. Sin ustedes no sería la persona que soy ahora, por ustedes y para ustedes es este trabajo. Gracias por confiar siempre en mí.

Quiero también agradecer a mis hermanos Vanessa, Alexis y Antonio por ser la razón para que siempre siga adelante. Gracias ñaños por siempre estar ahí apoyándome en todo, aunque a veces puedo parecer molesto y odioso quiero que sepan que quiero siempre lo mejor para ustedes. De todo corazón gracias por ser mi familia.

Gracias a mis abuelitos, tíos, primos, cuñados y a mis dos amores Valentina y Martín.

Además quiero darle las gracias a la Master Rosa Chiriboga por convertirse en el ejemplo personal y profesional a seguir. Gracias por los consejos, por toda la colaboración, dirección, por confiar en mí y sobre todo por la paciencia para poder obtener este título.

Gracias a mi amiga y compañera de trabajo Gaby y a todos mis compañeros del centro Carito, Cesitar, Anita, Sofí, Esteban. Además de manera muy especial al Dr. Mario Grijalva director del Centro de Investigaciones en Enfermedades Infecciosas y al Dr. Fabián Sáenz por su ayuda en este trabajo.

Mil gracias a todos mis amigos y amigas que siempre han estado ahí en las buenas y en las malas. Gracias 'mijines' por todas sus lecciones y todos los buenos momentos que hemos y seguiremos viviendo, gracias Tibe, Robin, Julian, David, Diego, Felipe, Javier, José. Gracias 'princesas' por aguantarme 4 años de su vida, millón gracias por todo Andre, Belén, Joha, Pepa, Anabel. Gracias 'princesos' por todo su apoyo y consejos Francho, Alejo, Álvaro, Carlos, Paúl, David, Micho, Pablo, Stalin, Adrián.

Gracias a la Escuela de Bioanálisis y a la Universidad Católica por darme la oportunidad de mejorar personal e intelectualmente.

Andrés González Rodríguez

RESUMEN

Correlación de resultados entre prueba rápida y prueba inmunoenzimática (ELISA) en la detección de antígenos de malaria en donantes de sangre asintomáticos, provenientes de zonas endémicas del Ecuador.

Introducción: El diagnóstico eficiente y preciso de la presencia de parásitos de malaria a nivel de donantes de sangre en zonas endémicas es de fundamental importancia para evitar la transmisión transfusional de estos parásitos. De acuerdo a la historia natural de la enfermedad las personas que viven en regiones endémicas de malaria y que sobreviven a la enfermedad en la infancia en ocasiones desarrollan un estado de inmunidad que mantiene una baja concentración de parásitos en sangre y por ende no presentan síntomas ni anticuerpos, volviendo a la enfermedad indetectable. Recientemente se han desarrollado nuevas metodologías, como las pruebas rápidas e inmunoenzimáticas (ELISA), que han aumentado la sensibilidad en la detección; sin embargo existe la presencia de resultados Falsos Positivos y Negativos. Por esta razón, el objetivo de este estudio fue correlacionar los resultados obtenidos, tanto en las pruebas rápidas como en ELISA y determinar si son una buena alternativa para la detección de donantes asintomáticos. **Materiales y Métodos:** Se analizó un total de 1120 muestras provenientes de 8 bancos de sangre ubicados en zonas endémicas, caracterizándolas tanto en prueba rápida como en ELISA y las muestras positivas se las confirmó mediante técnica molecular PCR. **Resultados:** Se determinó un 2,76% (31 muestras) de seropositividad de las muestras en ELISA, 93.4% de estas 31 muestras mostraron resultados falsos positivos confirmados por PCR. En la prueba rápida 0% de las muestras mostraron seropositividad. **Conclusiones y Recomendaciones:** Los resultados muestran una discrepancia entre las pruebas rápidas y ELISA y sugieren que las pruebas rápidas tienen una sensibilidad menor. Se recomienda reforzar la selección de donantes por medio de la entrevista cómo métodos de tamizaje más efectivos en malaria.

Palabras claves: malaria, donantes de sangre, ELISA, prueba rápida.

ABSTRACT

Correlation between rapid test and immunosorbent assay (ELISA) results for the detection of malaria antigens in asymptomatic blood donors, from endemic areas of Ecuador.

Summary: The efficient and accurate diagnosis of the presence of malaria parasites in blood donors in endemic areas is of paramount importance to prevent transfusion transmission of these parasites. According to the natural history of the disease for people living in malaria endemic regions and who survive childhood disease sometimes develop a state of immunity that maintains a low concentration of parasites in the blood and thus no symptoms and antibodies to the disease becoming undetectable. Recently developed new methodologies such as rapid testing and enzyme immunoassay (ELISA), which have increased sensitivity in the detection, but there is the presence of false positive and negative results. Therefore, the objective of this study was correlated the results obtained in both tests as if they are a good alternative for detecting asymptomatic donors. **Materials and Methods:** A total of 1120 samples from eight blood banks located in endemic areas, characterizing both rapid test and ELISA and positive samples were confirmed by PCR. **Results:** 2.76% (31 samples) of seropositive samples in ELISA, 93.4% of the 31 samples showed false positive results confirmed by PCR, 0% of the samples were seropositive in the rapid test. **Conclusions and Recommendations:** The results show a discrepancy between ELISA and rapid tests and suggest that rapid tests have a lower sensitivity. We recommend strengthen donor selection through interview.

Keywords: malaria, blood donors, ELISA, rapid test.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

LISTA DE TABLAS	4
LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE GRÁFICAS.....	6
LISTA DE FOTOGRAFÍAS	7
LISTA DE SIGLAS	8
INTRODUCCIÓN.....	9
CAPITULO I.....	13
1. JUSTIFICACIÓN.....	13
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
3. OBJETIVOS.....	21
3.1 OBJETIVO GENERAL	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4. HIPÓTESIS	21
CAPITULO II.....	22
MARCO TEÓRICO	22
5. ANTECEDENTES.....	22
5.1 Malaria.	22
5.2 Parásito.....	27
5.3 Centralización de Bancos de Sangre.....	40
5.4 Donantes.....	42
5.5 Diagnóstico en el laboratorio.	43
5.6 Pruebas para la detección de malaria.	46
5.7 Inmunidad.....	49
5.8 Problemas en la detección.....	54
CAPITULO III	57
MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
6. TIPO DE ESTUDIO.....	57
7. POBLACIÓN-AMBIENTE-PERÍODO.....	57

8.	CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	58
9.	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.	58
10.	MÉTODOLOGÍA DEL ESTUDIO.	59
11.	TAMAÑO DE LA MUESTRA.	61
12.	TÉCNICAS EMPLEADAS.....	62
12.1	Fundamento técnica inmunoenzimática (ELISA).....	63
12.2	Procedimiento.....	63
12.3	Limitaciones del test.....	64
12.4	Fundamento PDR.	66
12.5	Control de calidad del test.....	66
12.6	Interpretación de resultados.	66
12.7	Limitaciones del test.....	67
12.8	Realización de PCR.....	68
12.9	Fundamento.....	68
13.	OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES.	72
14.	MÉTODO ESTADÍSTICO.....	75
14.1	Métodos recolección de información.	75
14.2	Recolección de muestras.	75
15.	ASPECTOS ÉTICOS.	75
16.	MARCO CONCEPTUAL.	76
16.1	Trasfusión de sangre.....	76
16.2	Donación voluntaria.	76
16.3	Donantes asintomáticos.....	76
16.4	Sangre total.....	77
16.5	Concentrado de hematíes.	77
16.6	Plasma fresco congelado.	77
16.8	Hemocentro.	78
16.9	Reacción post-transfusional.	78
16.10	Pruebas Diagnóstico Rápido (PDR) para malaria.	79
16.11	Prueba de ELISA.....	79
16.12	ELISA de captura de antígenos.	79

16.13	PCR.....	80
16.14	Sensibilidad.	80
16.15	Especificidad.	80
CAPITULO IV		81
17.	RESULTADOS.	81
18.	CONCLUSIONES.	94
19.	RECOMENDACIONES.....	95
20.	DISCUSIÓN.	96
21.	ANEXOS	100
21.1	Anexo N° 1: Inserto Técnica ELISA (SD Malaria Antigen ELISA).	100
21.2	Anexo N° 2: Inserto Técnica Prueba Rápida (Malaria Total Quick Test).	101
21.3	Anexo N° 3: Protocolo extracción de ADN.....	102
21.4	Anexo N° 4: Protocolo PCR.	103
21.5	Anexo N° 5: Metodología del estudio.....	104
21.6	Anexo N° 6: Equipos utilizados.....	107
22.	BIBLIOGRAFÍA.	109

LISTA DE TABLAS

1. **Tabla N° 1:** Clasificación taxonómica Plasmodium.
2. **Tabla N° 2:** Cálculo del N.
3. **Tabla N° 3:** Tamaño muestra a ser analizadas en PDR y ELISA.
4. **Tabla N° 4:** Interpretación de resultados PDR.
5. **Tabla N° 5:** Volúmenes Master Mix.
6. **Tabla N° 6:** Operacionalización de variables.
7. **Tabla N° 7:** Total de muestras analizadas.
8. **Tabla N° 8:** Correlación entre resultados ELISA vs lugar de procedencia.
9. **Tabla N° 9:** Correlación entre PDR vs ELISA.
10. **Tabla N° 10:** Prueba Chi-cuadrado.
11. **Tabla N° 11:** Resultados obtenidos ELISA vs PCR.
12. **Tabla N° 12:** Correlación entre ELISA vs PCR.

LISTA DE FIGURAS

- 1. Figura N° 1:** Aparato conoidal del Phylum Apicomplexa.
- 2. Figura N° 2:** Proceso de invasión celular.
- 3. Figura N° 3:** Ciclo vital Plasmodium.
- 4. Figura N° 4:** Curva de sensibilidad para *P. vivax* en ELISA.
- 5. Figura N° 5:** Curva de sensibilidad para *P. vivax* en PDR.
- 6. Figura N° 6:** Curva de sensibilidad para *P. falciparum* en ELISA.
- 7. Figura N° 7:** Curva de sensibilidad para *P. falciparum* en PDR.
- 8. Figura N° 8:** Gel de agarosa-cuantificación de ADN.
- 9. Figura N° 9:** Distribución de la población de estudio por provincias.
- 10. Figura N° 10:** Gel de agarosa-confirmación de muestras positivas en ELISA.

LISTA DE GRÁFICAS

- 1. Gráfica N° 1:** Incidencia de malaria por especie parasitaria 1996-2010.
- 2. Gráfica N° 2:** Reporte de casos positivos confirmados de malaria por provincia.

LISTA DE FOTOGRAFÍAS

- 1. Fotografía N° 1:** Realización de curvas de sensibilidad.
- 2. Fotografía N° 2:** Recolección de muestras.
- 3. Fotografía N° 3:** Procesamiento de muestras.
- 4. Fotografía N° 4:** Prueba rápida / ELISA.
- 5. Fotografía N° 5:** Reactivos utilizados.
- 6. Fotografía N° 6:** Confirmación de muestras positivas en ELISA mediante PCR.
- 7. Fotografía N° 7:** Incubador de ELISA.
- 8. Fotografía N° 8:** Pipetas automáticas.
- 9. Fotografía N° 9:** Lavador de ELISA.
- 10. Fotografía N° 10:** Lector de ELISA.
- 11. Fotografía N° 11:** Centrífuga refrigerada.
- 12. Fotografía N° 12:** Cámara de electroforesis.
- 13. Fotografía N° 13:** Termociclador.

LISTA DE SIGLAS

- **ELISA:** Ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas.
- **PDR:** Prueba de Diagnóstico rápido.
- **LDH:** Lactato deshidrogenasa.
- **HRP-2:** Proteína 2 rica en histidina.
- **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.
- **ADN:** Acido Desoxirribonucleico.
- **ARN:** Acido Ribonucleico.
- **AMI:** Iniciativa para la erradicación de la malaria.
- **AMA-1:** Antígeno 1 de la membrana apical del merozoíto.
- **CLAG-9:** Proteína asexual de adherencia celular.
- **MESA:** Antígeno de superficie del eritrocito infectado.
- **MSP-1:** Proteína 1 de superficie del merozoíto.
- **Mb:** Megabases.
- **EIR:** Tasa de inoculación (Entomological inoculation rates).
- **CIEI:** Centro de Investigaciones en Enfermedades Infecciosas, PUCE.
- **CDC:** Centro de Control Enfermedades Infecciosas Atlanta, EUA.
- **AABB:** Asociación Americana de Bancos de Sangre
- **CoE:** Consejo de Europa
- **CRS:** Caribbean Regional Standards

INTRODUCCIÓN

En el año 2008, Ecuador alcanzó una disminución importante de casos de malaria de 106.641 que fueron detectados en el año 2001 a 1.158 (casos de *Plasmodium falciparum*) durante ese año (SNEM-RAVREDA/OPS, 2008), lo que fue reconocido por la Organización Panamericana de la Salud concediéndole el premio denominado “Campeones de la malaria en América” (OPS/OMS, 2009). A pesar de este gran avance, en el país la malaria sigue siendo considerada como una de las mayores causas de morbilidad a nivel de zonas endémicas, es por esta razón que la vigilancia de la transmisión de malaria por vía transfusional y especialmente el tamizaje de donantes de sangre constituye una de las prioridades en el Sistema Nacional de Salud. (SNEM-RAVREDA/OPS, 2008). Los estudios demuestran que las personas que viven en zonas endémicas pueden desarrollar una semi-inmunidad contra el parásito debido a las repetitivas infecciones a lo largo de su vida lo que les convierte en asintomáticos con baja parasitemia. (D. Noubouossie, 2011). (Doolan D. , Acquired Immunity to Malaria, 2009)

En el Ecuador, para el diagnóstico de malaria es comúnmente utilizada la técnica “gota gruesa” que constituye una técnica relativamente sencilla y es considerada como el método de referencia (Lee SH K. U., 2002), sin embargo el “factor humano” ocasiona que la calidad en la técnica sea variable y afecte a la obtención de los resultados (SNEM-RAVREDA/OPS, 2008); así aspectos como calidad de la toma de muestra, coloración y número de láminas examinadas por día afectan a la precisión de un resultado aun cuando este sea realizado por un experto analista. (SNEM-RAVREDA/OPS, 2008) (Lee SH K. U., 2002) (Bottius E, 1996)

A nivel de Ecuador se ha iniciado un proceso de centralización del tamizaje serológico lo que ha ocasionado que muestras de productos sanguíneos de zonas endémicas sean tamizados en la ciudad de Quito (región sierra), a pesar de que los donantes fueron seleccionados para malaria a través de la prueba de gota gruesa en sus centros de origen, se considera necesario realizar una prueba adicional para asegurarse de que la sangre esté libre de estos parásitos. Se debe considerar que muchos autores ponen de manifiesto la subjetividad en la lectura de las placas “factor humano” en parasitemias bajas especialmente en donantes asintomáticos. (Kitchen AD, 2006) (SNEM-RAVREDA/OPS, 2008) Esta situación ha llevado a realizar la presente investigación que permita establecer si se requiere incluir nuevas técnicas diagnósticas, siguiendo de esta manera las recomendaciones establecidas en los Estándares de Bancos de Sangre. (WHO, Recommendations on Screening of donated blood for transfusion transmissible in blood transfusion service, 2005)

Existen varios métodos para el diagnóstico de malaria como las pruebas rápidas y las inmunoenzimáticas (EIA), pruebas que detectan la (HRP-2) o proteína-2 rica en histidina secretada por el *P. falciparum* (Lee SH K. U., 2002) y la enzima metabólica intracelular lactato deshidrogenasa (LDH). (Lee SH K. U., 2002) Las pruebas comerciales disponibles en el país detectan simultáneamente la presencia de la proteína y de la enzima y están disponibles en presentaciones de ELISA y prueba rápida de captación de antígenos. Basándose en estas recomendaciones y considerando el número de donantes que son reclutados por provincias consideradas endémicas; así como también el alto porcentaje de donantes diferidos por haber permanecido varios días en la región costera, se establece la necesidad de investigar si es necesario implementar una prueba de detección de malaria en donantes.

En algunos países como España, Estados Unidos, una de las estrategias constituye la entrevista al donante que permite la exclusión de aquellos que podrían tener un contacto reciente con el parásito (Lee SH K. U., 2002); sin embargo en países donde la malaria es endémica y existe una alta probabilidad de que los donantes sean asintomáticos, se recomienda el uso de una técnica molecular que detecte parasitemias bajas de tal manera que se pueda reducir la transmisión de malaria, una de las pruebas considerada de alta sensibilidad es la detección molecular por PCR. (Bottius E, 1996) En todo caso la selección de la prueba depende no solo de las características de sensibilidad y especificidad sino también de la disponibilidad de adquirirla en el país.

Para incluir una nueva prueba de tamizaje en donantes se debe cumplir varios estándares, así en un análisis que realizó *Kitchen and Chiodini en 2006* sobre malaria y transfusión sanguínea, se enfatiza que la elección de una estrategia de “*screening*” debe considerar la diferencia entre zonas endémicas y no-endémicas, pues de esto depende la metodología a ser empleada. (Kitchen AD, 2006) Así la simple detección de anticuerpos no garantiza un efectivo indicador de infección ni tampoco que no esté infectado, ya que esto va a depender directamente del sistema inmune de la persona y la parasitemia; sin embargo existen casos de pacientes que han mantenido anticuerpos detectables por varios años. (Kitchen AD, 2006) *Singler et al*, concluyeron que los tests para detección de anticuerpos anti-maláricos tenían una baja sensibilidad y especificidad, acompañada de un bajo valor predictivo positivo. (Slinger R, 2001) La detección de antígenos de malaria constituye otra de las metodologías utilizadas cuyo objetivo primordial inicial fue reemplazar la técnica de gota gruesa (Kitchen AD, 2006), no obstante las pruebas rápidas basadas en este principio son poco sensibles, su rango de sensibilidad alcanza entre 100 a 1000 parásitos/ul, por lo que se recomienda la utilización de kits como pruebas rápidas inmunocromatográficas o ELISAS

para la detección de anticuerpos y antígenos que mejoren la sensibilidad de detección de malaria en tamizaje de donantes. (D. Noubouossie, 2011)

Recientemente se han realizado estudios que pueden establecer que la detección de ADN del parásito en sangre mediante la técnica de PCR es la forma más sensible y específica de determinar malaria en pacientes asintomáticos (Kitchen AD, 2006), no obstante su aplicación en el tamizaje de donantes tendría un costo elevado.

CAPITULO I

1. JUSTIFICACIÓN.

El diagnóstico eficiente y preciso de la presencia de parásitos de malaria a nivel de donantes de sangre provenientes de zonas endémicas es de fundamental importancia para evitar la transmisión pos transfusional de la enfermedad. (Arróspide N. , 2004) De acuerdo a la historia natural de la enfermedad, las personas que viven en regiones endémicas de malaria y que sobreviven a la enfermedad en la infancia en ocasiones desarrollan un estado de inmunidad que mantiene una baja concentración de parásitos en sangre y por ende con presencia mínima de síntomas y anticuerpos por lo que se vuelve indetectable. (Doolan D. , Acquired Immunity to Malaria, 2009)

El examen de laboratorio para confirmar la infección por *Plasmodium (falciparum o vivax)* más usado y considerado la “prueba de oro” por muchos años a nivel del país, constituye el examen microscópico de gota gruesa, (Gutierrez & Arróspide, 2003) de hecho en el banco de sangre de la ciudad de Guayaquil se mantiene esta práctica; en cambio a nivel de los otros bancos de sangre que colectan pintas de sangre y si estos pertenecen a zonas endémicas envían las muestras al laboratorio de referencia que en nuestro país es el “Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación” anteriormente llamado Instituto Nacional de Higiene Leopoldo Izquieta Pérez, organismo que emite este y otros resultados de enfermedades tropicales.

Uno de los inconvenientes detectados en el diagnóstico de malaria a través de los análisis de gota gruesa constituye el “factor humano” (SNEM-RAVREDA/OPS, 2008) relacionado con la experticia del técnico en el momento de identificar los parásitos, el número de

muestras a ser investigadas y la densidad de la parasitemia relacionada con la inmunidad del donante. Estos son los factores que pueden ocasionar la presencia de resultados falsos negativos en el examen de gota gruesa. (SNEM-RAVREDA/OPS, 2008) (Lee SH, 2002) Sin embargo, a nivel de bancos de sangre de la región sierra, no es obligatorio la realización de esta prueba debido a que no pertenecen a zonas endémicas y su riesgo es prácticamente nulo. La selección de donantes en estos servicios está basada únicamente en una entrevista en la cual se pregunta si el donante ha estado en zonas endémicas (costa u oriente) en los últimos 15 días y de ser así se lo difiere por un período de tiempo o se rechaza. (Organización Mundial de la Salud, 2009) A pesar de la existencia de estos filtros y la paulatina centralización de los procesos de fraccionamiento y tamizaje serológico a nivel de los servicios de sangre, mediante la creación del Hemocentro de Cruz Roja de Quito han crecido los factores de riesgo que podrían ocasionar una transmisión transfusional de malaria.

Es por esta razón, que en los Estándares de Trabajo de Bancos de Sangre (WHO, Recommendations on screening of donated blood for transfusion transmissible in blood transfusion service, 2005) se menciona que *“los Servicios de sangre establecerán y documentarán procedimientos para determinar las pruebas adicionales que se aplicarán a cada unidad de sangre donada tomando en cuenta la situación epidemiológica de la región geográfica, la sensibilidad y especificidad de las metodologías de laboratorio, y las características de los futuros receptores de sangre y de componentes sanguíneos”*. (WHO, Recommendations on screening of donated blood for transfusion transmissible in blood transfusion service, 2005)

Basándose en estos lineamientos y tomando en consideración las nuevas políticas de tamizaje serológico de sangre a nivel del país surge la necesidad de complementar a la

microscopía óptica (gota gruesa) con un prueba que mejore la sensibilidad y especificidad en la detección de malaria en los potenciales donantes voluntarios de sangre de zonas endémicas que aparentemente presentan un buen estado de salud. Dentro de las pruebas propuestas para realizar el tamizaje en donaciones de sangre se considera que la prueba de captura de antígenos es una buena opción para la detección de parasitemia baja, pruebas rápidas o inmunoenzimáticas (ELISA) (Castillo, 2005) (Arróspide N. , 2004), las que podrían incluirse a nivel del Hemocentro de Cruz Roja Ecuatoriana-Quito, lugar donde se está centralizando el tamizaje serológico desde el año 2009.

Este estudio tiene la finalidad de proporcionar información crítica y relevante al correlacionar los resultados obtenidos en las dos metodologías (rápida y ELISA) en población asintomática de zonas endémicas. Esta información ayudará a definir si las pruebas rápidas o ELISA pueden convertirse en una herramienta de tamizaje y un filtro para la detección de casos de malaria en personas asintomáticas.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La transfusión de sangre y sus derivados constituye un acto de responsabilidad legal y ética. (Asamblea Nacional, 2011) De acuerdo a la Ley Orgánica de Salud-Ecuador, “*La transfusión de sangre y sus componentes solo podrá practicarse luego de que se hayan realizado las pruebas de compatibilidad correspondientes y las serológicas para detectar la presencia de marcadores de infección, determinados en la reglamentación correspondiente de acuerdo con el perfil epidemiológico local, regional y nacional y los avances tecnológicos*”. (Asamblea Nacional, 2011) (WHO, Recommendations on screening of donated blood for transfusion transmissible in blood transfusion service, 2005)

La transfusión es una práctica frecuente en pacientes inmunodeprimidos, con problemas obstétricos o con pérdida masiva de sangre; el empleo de sangre puede salvar una vida, pero no está exenta de riesgos, de los cuales la transmisión de infecciones es uno de los más importantes, como el virus del HIV, Hepatitis B, Hepatitis C, HTLV1, Sífilis, Chagas y malaria. (Cruz Roja Ecuatoriana, 2010)

Las personas o donantes que poseen un alto riesgo de transmitir infecciones como malaria son aquellos que, por razones inmunológicas, por el uso de drogas profilácticas o bien por tratamientos incompletos, son portadores asintomáticos de *Plasmodium* por un tiempo mayor al habitual o presentan una malaria subclínica. (Westphal R, 1999) Estas personas pueden pasar inadvertidas en la evaluación clínica que se realiza a los donantes y su sangre. (Westphal R, 1999).

Existen varios criterios a nivel mundial para la exclusión temporal o definitiva de los donantes de sangre provenientes de zonas endémicas. (Organización Mundial de la Salud, 2009) Estos criterios en parte se basan en la disponibilidad de una prueba diagnóstica sea esta inmunológica o genómica.

De los estudios realizados en Estados Unidos en los años 80, se estimó una incidencia de casos de malaria postransfusional de 0,25 casos por millón de unidades sanguíneas colectadas (Guerrero IC, 1983); actualmente esta transmisión a disminuido drásticamente, sin embargo, aún constituye un problema de salud pública.

En Latinoamérica se logró reducir los casos de malaria en un 50% en los últimos 10 años, convirtiéndose en una iniciativa que los expertos aconsejan continuar. (Bajornas, 2012) Según AMI (Iniciativa en la Erradicación de malaria) en 21 países de la región donde la malaria es considerada endémica se ha logrado reducir un 52% la incidencia y un 69% las muertes, además en países como Ecuador el número de casos han disminuido en un 95%. (Bajornas, 2012) (OPS, 2012)

A través del tiempo se han introducido numerosas técnicas para diagnosticar malaria. (Kitchen AD, 2006). Con algunas se ha tratado de mejorar la sensibilidad y facilitar la realización de la microscopia óptica convencional, concentrando los parásitos en la muestra de sangre, o mejorando la visualización y detecciones mediante tinción con colorantes fluorescentes. (Moody, 2002) Todos estos métodos varían en complejidad y en requerimientos de equipos de tecnología, pero hasta la fecha ninguno ha mostrado tener una eficacia diagnóstica de malaria como el examen microscópico a nivel de muestras de sangre tratadas con colorante Giemsa. (Moody, 2002)

A pesar de que la técnica de gota gruesa, sigue siendo el método de referencia para todos los laboratorios que diagnostican malaria, esta es una técnica que requiere de experiencia y entrenamiento pues el diagnóstico se realiza al observar la presencia de los parásitos en sus diferentes estadios. (SNEM-RAVREDA/OPS, 2008) La limitación se presenta al realizar esta misma prueba dentro del proceso de tamizaje de donantes, ya que existen variables como el elevado número diario de muestras a ser analizadas, escaso personal capacitado especialmente en reconocer la presencia de parásitos en donantes asintomáticos con parasitemias bajas. (OMS/OPS, 2009)

Actualmente existe un auge de pruebas diagnósticas que prometen una mayor sensibilidad que la gota gruesa como son las inmunocromatográficas, que permiten un diagnóstico directo y más rápido (Cooke, 1999), las pruebas inmunoenzimáticas (ELISA) que detectan anticuerpos o antígenos y las más sensibles y específicas que son las pruebas moleculares de detección de ADN del parásito. (Kitchen AD, 2006)

Las pruebas serológicas como la inmunofluorescencia y ELISA pueden ser buenas para excluir donantes, pero se debe tener en cuenta que la presencia de anticuerpos no necesariamente indica la presencia de parasitemia. (Moody, 2002) Por lo que se introducen pruebas serológicas de captura de antígenos tanto rápidas y ELISA (Kitchen AD, 2006) que detectan la presencia de las fracciones parasitarias circulantes en sangre.

En las pruebas rápidas para diagnóstico de malaria se detecta el antígeno parasitario del género *Plasmodium* mediante reacción antígeno-anticuerpo y pueden ser de dos tipos: las que detectan la HRP-2 o proteína-2 rica en histidina y la que detecta la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) parasitaria. Ambas tienen ventajas y desventajas en su uso, por lo que la inclusión de una prueba de ELISA en conjunto puede ayudar a establecer una concordancia de los resultados obtenidos. (Arróspide, 2002)

Un estudio realizado en Cali, Colombia en el año 2005, acerca del tamizaje de malaria en donantes de zonas no endémicas encontraron que muchas de las personas que fueron rechazadas en base a la entrevista o por haber permanecido en zonas endémicas durante los últimos 6 meses, no presentaron antígenos parasitarios. En este sentido se comprobó que este criterio influye significativamente ya que los resultados en las pruebas inmunocromatográficas, ELISA y PCR fueron negativos. (Castillo, 2005)

En el Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana en Quito, se mantiene el mismo criterio que en Cali, constituyéndose en una de las principales causas de rechazo en donantes, especialmente en las épocas vacacionales o feriados produciendo un desabastecimiento de productos sanguíneos, pues las personas viajan a zonas endémicas en busca de descanso y buen clima y se cree tienen una alta posibilidad de contagiarse de malaria. (Castillo, 2005)

El criterio de diferir a las personas que han permanecido en zonas endémicas por un periodo de tiempo ha sido establecido en las normas internacionales de bancos de sangre, a fin de evitar el riesgo de transmisión pos transfusional, adicionalmente se considera que el examen microscópico de gota gruesa es obligatorio a todos los donantes de zonas endémicas pero no para los donantes de zonas “no” endémicas. (Castillo, 2005)

En ciudades de altitud como Quito, donde no hay transmisión vectorial de malaria, pero si un flujo constante de unidades de sangre, hemoderivados y personas desde y hacia las zonas endémicas no existe una prueba de laboratorio para la detección de malaria, lo que se convierte en un problema de salud en la posibilidad de transmisión de la enfermedad por vía transfusional.

En estos casos de manejo de sangre y transfusiones, el diagnóstico oportuno de malaria se debe realizar con una prueba accesible, confiable, eficaz y factible de ser instaurada en los bancos de sangre que realizan tamizaje de donantes, como la inmuno-detección de antígenos de malaria de mayor sensibilidad. (Morrasin, Fabre, Barry, & Magnaval , 2002) (Spielman, Perrone, & Levirene, 1998) (Arróspide N. , 2004)

3. OBJETIVOS.

3.1 OBJETIVO GENERAL.

- Establecer la correlación existente entre los resultados obtenidos en la prueba rápida y ELISA de captura de antígenos de malaria en donantes de sangre asintomáticos provenientes de zonas endémicas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Establecer el porcentaje de donantes de sangre asintomáticos que presentan seropositividad para malaria en las pruebas rápidas.
- Establecer el porcentaje de donantes de sangre asintomáticos que presentan seropositividad para malaria en la prueba ELISA.
- Establecer la existencia o no de falsos positivos y falsos negativos en las pruebas de ELISA.
- Establecer la existencia o no de falsos positivos y falsos negativos en las pruebas rápidas.
- Confirmar la presencia del parásito en las muestras presumiblemente reactivas en ELISA por medio de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

4. HIPÓTESIS

Ho: No existen diferencias significativas en la correlación de resultados entre la prueba rápida inmunocromatográfica (PDR) y el ELISA.

H1: Existe correlación entre los resultados obtenidos tanto en la prueba rápida como en ELISA.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

5. ANTECEDENTES.

5.1 Malaria.

La malaria es la enfermedad tropical, considerada como la más importante a nivel mundial por ser la principal causa de muerte en humanos a excepción de la tuberculosis. (OMS, 2005)

La malaria es causada por un parásito del género *Plasmodium*, y existen alrededor de más de 150 especies de *Plasmodium* que pueden infectar a diversas especies de vertebrados, de estas 150 especies solamente 4 infectan al hombre (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*). (OMS, 2005) En el Ecuador las dos especies más comunes son *P. falciparum* y *P. vivax*, siendo la segunda la de mayor prevalencia e incidencia en zonas endémicas. (MSP, 2011)

El *P. falciparum* es considerada la especie más agresiva que puede infectar el ser humano, ya que a medida que va evolucionando la enfermedad los síntomas se vuelven más severos y puede causar la muerte. (OMS, 2005)

Las otras especies de *Plasmodium* son menos agresivas y la presentación de la enfermedad varía por la carga parasitaria y el estado inmune del paciente. (OMS, 2005)

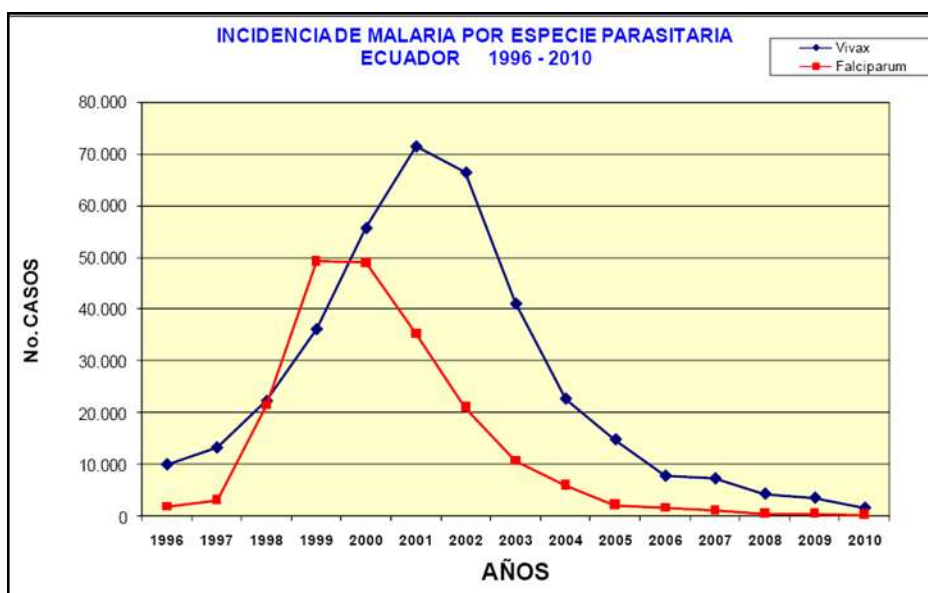
De las estadísticas reportadas a nivel mundial cada vez son más los países que han experimentado descensos en la cifra de casos confirmados de malaria o de ingresos y defunciones notificados desde el año 2000. (OMS, 2005)

Actualmente, el Ecuador posee una superficie territorial de 256.045 Km², con una población de 14'210.234, de los cuales el 63% de habitantes pertenecen a zonas urbanas y un 37% pertenecen a zonas rurales; según el MSP la población que se encuentra en riesgo para adquirir malaria es aproximadamente de 7'146.235 (MSP, 2011) y en especial los pobladores que viven en zonas rurales de la región costa. (WHO, World Malaria Report, 2010)

Durante el periodo 1996-2001, hubo un resurgimiento de malaria en el Ecuador, durante el cual el número de casos alcanzó un máximo de 100.000 en el año 2001, pero a partir de esto, la incidencia de malaria se redujo de forma radical (Gráfica N°1) y en la actualidad se conoce que únicamente un 5% de la población sigue siendo de alto riesgo. (WHO, World Malaria Report, 2010)

Gráfica N°1

Incidencia de malaria por especie parasitaria 1996-2010.



Fuente: MSP 2011

El gráfico N° 1 muestra el rebrote de malaria tanto de las especie de *P. falciparum* y *vivax* que existió en el periodo 1996-2001 y también la considerable disminución de a partir del 2001, además el cuadro nos explica las dos especies de *Plasmodium* que predominan en el Ecuador. (WHO, World Malaria Report, 2010)

En base a la disminución de casos de malaria, Ecuador fue el ganador del primer premio del concurso “*Campeones contra el Paludismo en las Américas 2009*”, organizado por la OPS/OMS, al reportar esa importante reducción de casos de malaria (MSP, 2007), sin embargo la malaria en el país continúa siendo considerada como una de las mayores causas de morbilidad en la población que vive en zonas endémicas. (OPS, 2009)

De acuerdo a las estadísticas del Ministerio de Salud Pública del Ecuador las provincias con mayor tasa de reporte de casos de paludismo son: El Oro 88,15 (536 casos); Esmeraldas 259,25 (1137 casos); Los Ríos 104,55(776 casos); Napo 1649,50 (1584 casos); Pastaza

471,09 (357 casos), así mismo los reportes de morbilidad indican a estas provincias como las que poseen mayor cantidad de casos. (OPS, 2009) (Gráfica N°2).

Gráfica N°2:

Reporte de casos positivos confirmados de malaria por provincias.



Fuente: MSP 2011

Gráfico N° 2: Se muestra la tasa de morbilidad diferenciada por provincias del Ecuador en el año 2010, mostrando las provincias con un mayor número de casos de malaria catalogadas como zonas que podrían ser consideradas endémicas.

Según la Organización Panamericana de la Salud en 1999, a nivel de Latinoamérica existía aproximadamente 818 millones de habitantes, de los cuales 299 millones (36,5%) vivían en zonas consideradas endémicas para la enfermedad de malaria. Debido a esta problemática 21 de los 35 países miembros de la OPS/OMS entre ellos Ecuador, han reestructurado sus programas de control de acuerdo a los lineamientos de la Estrategia Mundial para el Control de la Malaria (EMCM) adoptada en Ámsterdam en 1992. (PAHO, 2001)

La EMCM representó un cambio de estrategia y con este se abandonó el enfoque tradicional o lucha antivectorial y se centró más en la enfermedad, para esto se basó en cuatro principios: 1) diagnóstico temprano y tratamiento inmediato; 2) aplicación de medidas de protección y prevención para el individuo, la familia y la comunidad, incluyendo a la lucha antivectorial; 3) desarrollo de la capacidad para predecir y contener epidemias; 4) fortalecimiento de la capacidad local en investigación permitiendo la evaluación regular de la situación de la malaria de un país, teniendo en cuenta los factores ecológicos, sociales y económicos. (PAHO, 2001)

En el Ecuador, la malaria ha sido históricamente uno de los mayores problemas de salud pública a nivel de zonas tropicales, subtropicales y templadas del país. A pesar de los enormes esfuerzos y las cuantiosas inversiones financieras para el control, los ciclos endémicos y epidémicos de la enfermedad se repiten periódicamente, debido a varios factores como las crisis socioeconómicas, eventos climáticos, la expansión de la frontera agrícola en zonas de bosque tropical húmedo y la escasa capacidad de los servicios de salud. (MSP, 2011)

Los focos endémicos de alta transmisión de malaria se encuentran favorecidos en ciertas zonas por las condiciones ecológicas particulares que presentan como es el caso del norte de la Amazonía ecuatoriana y el norte del litoral. (MSP, 2011)

En el área endémica de malaria, habita aproximadamente el 60% de la población ecuatoriana, esta proporción no ha cambiado en los últimos años sustancialmente, y ha existido un incremento significativo de la población en estas zonas. (MSP, 2011)

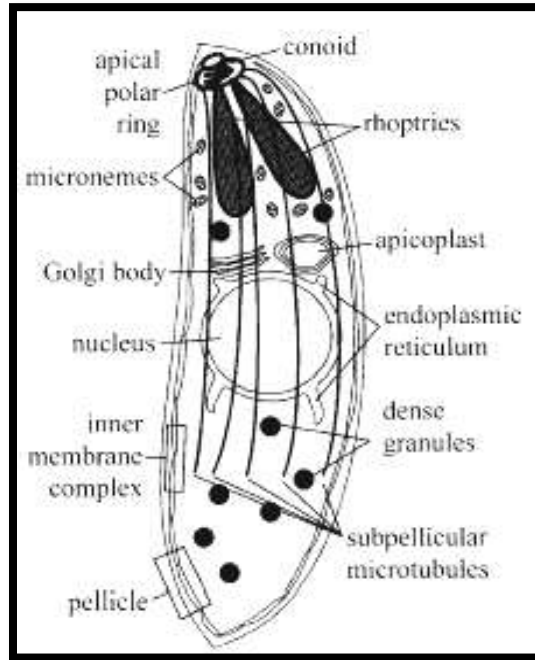
La malaria en el Ecuador tiene carácter predominantemente estacional, así a nivel de costa existe un incremento de transmisión después de la estación lluviosa, el principal vector es *Anopheles albimanus*. (MSP, 2011) En cambio a nivel de la amazonía la malaria tienen menor influencia estacional y su transmisión es más bien continua, los vectores de transmisión en estas zonas son: *A. nuñestovari*, *A. oswaldoi*, *A. triannulatus*, *A. punctimacula* y *A. rangeli*. En las zonas subtropicales y valles templados andinos de malaria el vector es *A. pseudopunctipennis* y la transmisión es continua. (MSP, 2011)

5.2 Parásito.

El parásito *Plasmodium* pertenece a la familia *Phylum Apicomplexa* que se caracterizan por ser parásitos intracelulares que invaden tanto a los eritrocitos como a los hepatocitos. (Guevara, 1997) Dentro de las características morfológicas comunes en este tipo de protozoarios es la presencia del aparato conoidal formado por un grupo de microtúbulos, que mantienen una relación bastante estrecha entre la invasión celular y el inicio de la división parasitaria. (Figura N°1) (Guevara, 1997)

Figura N° 1.

Aparato conoidal del Phylum Apicomplexa.



Fuente: www.higiene.edu.uy

La figura N° 1 muestra la distribución de los microtúbulos en el aparato conoidal, y las diferentes estructuras y organelos especializados en la secreción y que como función tienen la penetración de la célula blanco.

5.2.1 Clasificación Taxonómica.

Tabla N°1

Phylum	<i>Apicomplexa</i>
Clase	<i>Aconoidasida</i>
Orden	<i>Haemosporida</i>
Familia	<i>Plasmodiidae</i>
Genero	<i>Plasmodium</i>
Especies	<i>P. falciparum</i> <i>P. vivax</i> <i>P. ovale</i> <i>P. malariae</i>

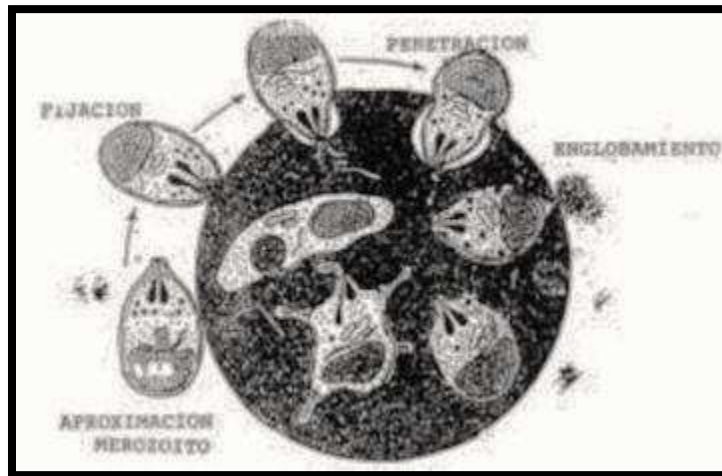
Fuente: docencia.udea.edu

El proceso de invasión celular del género *Plasmodium* se divide en 4 fases:

- 1ra y 2da fase: Ocurre la aproximación del aparato conoidal del parásito a los receptores que se encuentran en las células, seguidamente se produce la fijación de este aparato al receptor celular mediante un proceso selectivo y específico. (Guevara, 1997)
- 3ra fase: Se produce la penetración o formación de la vacuola denominada parasitófora; ésta ocurre por la invaginación de la membrana celular inducida por la presencia del parásito, y es un proceso muy común durante la fagocitosis como defensa celular. (Guevara, 1997)
- 4ta fase: Ocurre el cierre de la membrana celular, incluyendo en su interior al parásito dentro de la vacuola parasitófora. (Figura N°2) (Guevara, 1997)

Figura N°2.

Proceso de invasión celular



Fuente: (Guevara, 1997).

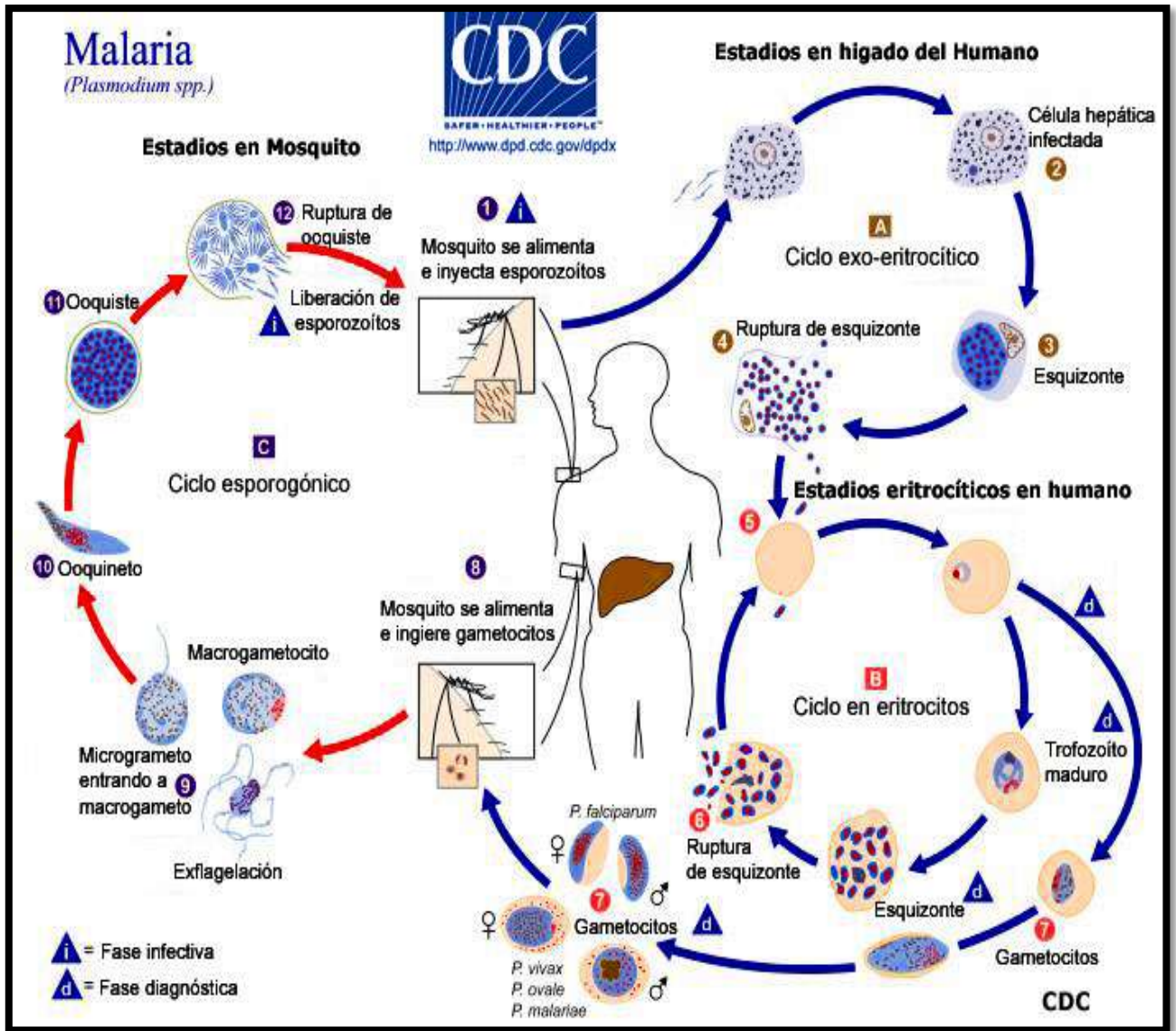
La figura N° 2 muestra la infestación del género Plasmodium a la célula hemática con receptores específicos.

5.2.2 Ciclo Vital del Parásito.

Los esporozoitos son transmitidos al hombre en el momento de la picadura e ingresan a través de los receptores de las células hepáticas en las que permanecen de 8 a 14 días (Calderón Juana del Carmen, 2006), luego maduran y son liberados al torrente sanguíneo como merozoitos para invadir los glóbulos rojos, después de 2 a 3 días explotan los eritrocitos infectados y se liberan nuevos merozoitos e infectan otros eritrocitos, esta parte es conocida como reproducción asexual, sin embargo en la sangre pueden pasar a estadios sexuales que son los gametocitos, los que son absorbidos por los mosquitos para empezar el ciclo de reproducción sexual. (Jiménez Judy Natalia, 2005) Figura N°3.

Figura N°3:

Ciclo vital del *Plasmodium*.



Fuente: www.dpd.cdc.gov

La figura N° 3 muestra el ciclo vital del *Plasmodium* una vez que ingresa al individuo.

5.2.3 Genética del parásito.

Uno de los mayores resultados científicos fue el estudio del genoma y la secuenciación del ADN del *Plasmodium* permitiendo el conocimiento de la funcionabilidad de las proteínas presentes en las diferentes fases del desarrollo del *Plasmodium* estableciendo los elementos moleculares y la expresión genética que estas desarrollan. (Castro & Rodríguez, 2009)

Se describieron 1289 proteínas específicas, de las cuales 714 corresponden a las fases asexuales, 931 a gametocitos y 64 a gametos. (Castro & Rodríguez, 2009) De las proteínas específicas tenemos AMA-1 (antígeno 1 de la membrana apical de merozoítos), una proteína del merozoíto que actúan en el proceso de invasión al eritrocito; CLAG-9 (proteína asexual de adherencia celular), relacionada con la adherencia celular; MESA (antígeno de superficie del eritrocito infectado con merozoítos); MSP-1 (proteína 1 de la superficie del merozoíto), otra proteína del merozoíto que facilita la invasión del eritrocito. (Castro & Rodríguez, 2009)

También se identificaron proteínas específicas de fases sexuales como Actina II, Pf-16 (antígeno específico de gametocitos), Pfs-48/45 (específicas de gametos relacionada con el proceso de fertilización), Pf-230 (específica de gametos). Son proteínas específicas que se expresan en la superficie de los gametos; estas actúan en forma de mensajeros citoplasmáticos y están relacionadas con la inhibición de la infectividad de los gametocitos hacia los mosquitos. (Castro & Rodríguez, 2009) (Contreras Ochoa & M. Ramsey Ph. D, 2004)

El genoma nuclear del *Plasmodium* específicamente del *P. falciparum* está compuesto de 22.8 megabases distribuidos a su vez en 14 cromosomas con una variación de tamaño de 0.6 a 3.3 megabases (Mb). (Gardner & al, 2002)

Los cromosomas varían ampliamente en longitud, y la mayor parte de sus variaciones se producen en las regiones subteloméricas. Estas regiones poseen un grado de conservación muy marcado dentro del genoma del *Plasmodium* que se puede deber a intercambios de las regiones subteloméricas entre los cromosomas. (Gardner & al, 2002)

Varios estudios publicaron que la expresión de los genes *var* y *rif* los cuales codifican para moléculas de superficie de los eritrocitos infectados permiten que se adhieran al endotelio vascular y son parte de la evasión de la respuesta inmune del hospedero vertebrado, también se expresan en los esporozoitos, lo que indica que dichos genes participan en procesos generales además de su especificidad con los eritrocitos. (Castro & Rodríguez, 2009) (Florens & et al, 2002)

La asociación (cluster) de los genes codificantes en los cromosomas del *P. falciparum* es un mecanismo de control para la expresión de proteínas, el cual es de gran ayuda para determinar la especificidad del estadio del *Plasmodium*. (Castro & Rodríguez, 2009)

Por otro lado el ADN nuclear del *Plasmodium vivax* se distribuye en 14 cromosomas lineales que tienen una variación de tamaño de 1,2 a 3,5 Mb. (Carlton, 1999) Un muestreo a gran escala de aproximadamente 20% del genoma de *P. vivax* (11.000 secuencias del genoma) han dado información importante sobre el potencial de codificación del parásito.

Un hallazgo significativo fue la identificación de varios genes de la familia denominada *vir*, dichos genes que al parecer se encuentran en las regiones subteloméricas de los cromosomas pueden jugar un papel en la interacción antigénica del parásito, y la evasión de la respuesta inmune del huésped. (Del Portillo, 2001).

Tomando en cuenta la información otorgada por el Army Malaria Institute de Australia, las secuencias recomendadas para la amplificación y posterior identificación de las especies de *Plasmodium* son:

Para *P. falciparum* **AAC AGA CGG GTA GTC ATG ATT GAG**

Para *P. vivax* **CGG CTT GGA AGT CCT TGT**. (Bain, 2011).

5.2.4 Transmisión.

La malaria se transmite principalmente por la picadura del mosquito hembra del género *Anopheles* al hombre, la cual posee un mecanismo especializado para penetrar la piel (Kakkilaya, 2009), una vez que el mosquito penetra la piel inyecta saliva para poder absorber la sangre, y es en el fluido salival donde se encuentra una combinación de enzimas antihemostáticas y antiinflamatorias que alteran el proceso de coagulación e inhiben la reacción de dolor. (Kakkilaya, 2009)

El lapso entre la picadura del mosquito infectante y la aparición de síntomas clínicos varía. Así en la infección por *P. falciparum* el cuadro clínico (síntomas) aparece entre 48-72 horas caracterizado por la presencia de escalofríos, fiebre y sudoración intensa. La enfermedad se considera grave por la cantidad de glóbulos rojos destruidos que provocan una anemia aguda llevando a la persona infectada hasta la muerte. (Organización Mundial de la Salud, 2010)

En los casos de paludismo por *P. vivax* u *P. ovale* es común los cuadros clínicos y recaídas que pueden ocurrir semanas o meses después de la infección inicial; estos nuevos episodios se deben a presencia de formas hepáticas "durmientes o latentes" del parásito, lo que no ocurre en los casos de *P. falciparum* y *P. malariae*, siendo necesario realizar un tratamiento especial dirigido contra esas formas hepáticas para lograr una curación completa. (Organización Mundial de la Salud, 2010)

5.2.4.1 Malaria congénita.

La malaria congénita ha sido definida como la presencia de formas del *Plasmodium* en sangre periférica o en la placenta de la madre embarazada, constituyendo un gran impacto tanto para la madre como para el feto. Se ha reportado una frecuencia del 0,3 al 3,6% a nivel de mujeres en zonas de endemicidad baja y del 10% en áreas de endemicidad alta. (Orozco, 1997) De las cuatro especies de *Plasmodium* solamente una de ellas puede escapar de la circulación periférica y ser secuestrada en la placenta, esto es el resultado de la citoadhesión del eritrocito infectado con *P. falciparum* a las células denominadas sincitiotrofoblasto (Pouvelle B, 2000); este fenómeno tiene importancia en la patogénesis de las formas severas de la enfermedad de la malaria que puede ocasionar daños graves en el feto. Dentro de la transmisión de malaria congénita deben considerarse los siguientes casos:

- a) *Las embarazadas no inmunes*: A nivel de mujeres que carecen de inmunidad la malaria o paludismo produce un porcentaje elevado de aborto (hasta un 60% en el caso de la infección por *P. falciparum*) y una mortalidad materna del 10% al 50%. (Organización Mundial de la Salud, 2010)
- b) *Las embarazadas semi-inmunes*: provenientes de zonas con alta transmisión de malaria, en esta circunstancia se produce abortos o bajo peso al nacer, especialmente durante los dos primeros embarazos. Se calcula que anualmente mueren 200.000 lactantes a consecuencia del paludismo adquirido durante el embarazo. (Organización Mundial de la Salud, 2010)
- c) *Las embarazadas semi-inmunes infectadas por el VIH* de zonas endémicas son las que tienen mayor riesgo de sufrir paludismo en todos sus embarazos.
- d) *Las mujeres con infección palúdica placentaria* tienen un mayor riesgo de transmitir la infección a sus hijos recién nacidos. (Organización Mundial de la Salud, 2010)

Generalmente se considera que mujeres que viven en zonas endémicas desarrollan un grado de inmunidad (Rogerson SJ, 2007), sin embargo durante su primer embarazo se vuelven susceptibles a la infección malárica; la malaria asociada al embarazo, compromete la circulación placentaria de manera que ocasiona un proceso similar al que ocurre durante la preeclampsia, de ahí la importancia de controlar y evitar la transmisión de malaria en mujeres en edad fértil. (Rogerson SJ, 2007)

5.2.4.2 Malaria transfusional.

La transmisión de malaria por vía transfusional fue descrita por primera vez en 1911, por Bruce-Chwatt y es considerada la causa más común de infección por transfusión sanguínea. Actualmente a nivel de zonas endémicas, se pueden encontrar donantes de sangre infectados con bajas cantidades de parásitos sin presentar sintomatología clínica evidente, además las especies de *Plasmodium* pueden vivir en estos donantes por varios años. (Hassanpour Gholamreza, 2011) Se ha documentado que el *Plasmodium malariae* ha persistido por 53 años, el *P. vivax* por 27 años y el *P. falciparum* por un período de 13 años después de la exposición (Sing B, 1999) (Elghouzzi MH, 2008), en base a estos datos se consideran que a nivel de zonas no endémicas como Estados Unidos el riesgo de contraer malaria transfusional es muy bajo (1 caso por cada 4.000.000), mientras que en zonas consideradas endémicas es mucho más alta (>50 casos por millón de unidades de donantes). (Kakkilaya, 2009)

A partir de una infección de malaria, el periodo en el cual el individuo puede permanecer infectante varía entre semanas, meses y hasta incluso años. Por tal razón, los donantes que han tenido episodios pasados de malaria deben esperar por lo menos 3 años para volver a donar y si son diagnosticados como asintomáticos o portadores no se les permite donar sangre. (Kakkilaya, 2009)

Uno de los factores para que exista este tipo de exclusión es si el donante ha permanecido más de 6 meses en una zona endémica. (Chauhan & al, 2009)

Debe recordarse que el tamizaje de malaria en donantes de sangre está basado en la selección del donante a través de la entrevista tratando de encontrar factores de riesgo como: evidencia clínica, diagnóstico anterior, lugar de residencia y todo lo que pueda incrementar la posibilidad de transmisión.

A nivel de Ecuador es común el uso de la técnica de gota gruesa en las regiones endémicas de malaria, que a pesar de ser útil y considerado el “gold estándar” existe el error humano que puede afectar al diagnóstico. (Elghouzzi MH, 2008)

Otro factor que puede ocasionar una transmisión de malaria es cuando se utiliza sangre fresca en una transfusión, y más aún si esta ha llevado menos de 5 días almacenados debido a la viabilidad del parásito. (Kakkilaya, 2009) Esto sugiere que incluso un número pequeño de parásitos pueden producir una infección por malaria. (Robert & al, 2001)

A su vez el riesgo disminuye cuando existe un fraccionamiento del producto sanguíneo por ejemplo en plasma y derivados carentes de células rojas, debido a que el parásito es intracelular y permanece mejor al interior de los glóbulos rojos.

Por todo esto, se ha convertido en una problemática para todos los servicios de sangre el poder identificar de manera precisa y temprana la presencia de malaria en productos sanguíneos. La gran mayoría de los donantes involucrados en dicha transmisión, son individuos semi-inmunes con cargas parasitarias muy bajas, estimando una dosis infecciosa de 1 a 10 parásitos por unidad de sangre. (Kakkilaya, 2009) (Castillo, 2005) Con esto es casi imposible que exista una óptima detección de parasitemias bajas por el método de frotis en sangre periférica (Gold Estándar). Sin embargo, la presencia de antígenos del parásito o anticuerpos del individuo en títulos altos que favorece a la identificación de malaria en productos sanguíneos y el desarrollo e investigación de las pruebas de tamizaje

han sido fundamentales en la búsqueda de ensayos complementarios a la técnica microscópica y obtener un mejor diagnóstico. (Kakkilaya, 2009)

La transmisión de malaria puede ser diferente de acuerdo a la zona en donde se produzca la transfusión, así debido a la exposición frente al parásito y el estado de inmunidad que pueden desarrollar las personas.

- **Zonas endémicas:**

En zonas endémicas existe más probabilidad del contagio de malaria por picadura del mosquito infectado que por causa de una transfusión recibida de donantes asintomáticos. (Kitchen AD, 2006). Es por esta razón que los donantes de estas zonas se encuentran en un alto riesgo de exposición a la malaria, el objetivo es evitar transfundir productos sanguíneos con bajas parasitemias al ser imperceptibles al diagnóstico microscópico.

Además se ha argumentado que habitantes de zonas endémicas pueden presentar autoinmunidad a la enfermedad solo por el hecho de convivir con el parásito y que no existiría ningún efecto si se les transfunde sangre de algún donante infectado. (Kitchen AD, 2006)

- **Zonas no endémicas:**

Para evitar la transmisión de malaria a nivel de zonas consideradas no endémicas, se utiliza un método considerado sencillo y acogido por varios países, el cual consiste en identificar y aplazar o diferir a los potenciales donantes de sangre que de alguna manera hayan estado expuestos a algún factor de riesgo de malaria. Sin embargo, esta solución tiene varios problemas, uno de ellos es realizar una entrevista adecuada al donante de tal manera que se tenga la seguridad de estar identificado a todos los donantes en riesgo y que la malaria se

está esparciendo a zonas en donde anteriormente se consideraban libres de esta enfermedad. (Kitchen AD, 2006) Esto ha generado que a nivel de regiones no endémicas se empiece a buscar nuevas estrategias para determinar estas infecciones emergentes y nuevas.

5.3 Centralización de Bancos de Sangre.

La centralización de los bancos de sangre a nivel nacional se ha dado posiblemente por la búsqueda de mejora y establecimiento de la calidad, oportunidad y costos del funcionamiento del sistema de sangre en el país. Así, al homologar los procedimientos como la donación, el procesamiento y el uso, se busca obtener un producto sanguíneo más óptimo y de mejor calidad todo esto bajo los estándares de los bancos de sangre y así satisfacer las necesidades de la sociedad. (Cruz Roja Ecuatoriana, 2010) (Astorga & Amaya, 2011)

Ecuador es el cuarto país latinoamericano que cuenta con un Hemocentro Nacional, este fue fundado en noviembre del 2009. Es un centro que cuenta con tecnología y procedimientos de la más alta garantía de calidad. (Cruz Roja Ecuatoriana, 2010)

La creación de este Hemocentro tiene como objetivo centralizar y unificar los exámenes serológicos e inmunológicos de los productos sanguíneos obtenido de donaciones voluntarias, por lo que los bancos de sangre provinciales y filiales de Cruz Roja no tendrían que realizar esta actividad. (Cruz Roja Ecuatoriana, 2010)

Dentro de sus instalaciones se implementó un laboratorio que realiza el tamizaje serológico a donantes de sangre provenientes de la mayor parte de provincias del país, para lo cual se utilizan reactivos de cuarta generación de ELISA y se detectan las cinco pruebas de

tamizaje obligatorio del país que son VIH/Sida, Hepatitis B y C, Enfermedad de Chagas y Sífilis.

Las medidas para asegurar la seguridad transfusional de la sangre y sus componentes incluyen: la utilización de donantes voluntarios, la selección del donante mediante cuestionarios e interrogatorio médico, la detección de marcadores serológicos de infecciones, el mantenimiento de registros de donantes rechazados, y más recientemente, la introducción de ensayos para detección de ácidos nucleicos. (MSP, 2007)

Existen varios beneficios que traen consigo la implementación de un Hemocentro y la centralización de los bancos de sangre que existen en las Juntas Provinciales de Cruz Roja Ecuatoriana. Estos beneficios son: contar con materia prima a disposición, manejo de información y conocimientos específicos, equipamiento de tecnología avanzada para el fraccionamiento de la sangre, posibilidad de operar con menos costos y en ciertos casos con mayor calidad y capacidad operativa, personal técnico calificado para este trabajo, condiciones favorables para garantizar la seguridad biológica en la toma de muestra, mejor tamizaje y análisis clínicos para los donantes y un mejor control de calidad. (Cruz Roja Ecuatoriana, 2010)

Sin embargo, al centralizar el proceso de serología se debe tomar en cuenta el perfil epidemiológico de cada región del país y dentro de ello se encuentra la presencia de malaria en donantes asintomáticos o con resistencia al tratamiento.

De acuerdo a los Estándares de Banco de Sangre de OPS/OMS cuando existe la probabilidad de que un nuevo agente infeccioso puede ocasionar inconvenientes para obtener sangre segura y libre de agentes infecciosos, se debe realizar una investigación que proporcione resultados que corroboren la necesidad de incluir un nuevo marcador serológico. (MSP, 2007)

Basándose en estas recomendaciones y considerando el número de donantes que son reclutados por las provincias consideradas endémicas; así como también el alto porcentaje de donantes diferidos por haber permanecido varios días en la región costera, se establece la necesidad de implementar una prueba complementaria a la detección microscópica de malaria como un segundo filtro en la seguridad de la sangre y sus derivados sanguíneos.

5.4 Donantes.

El estado inmune de los donantes varía según la zona en donde estos residen, así donantes pertenecientes a zonas endémicas están mas cercanos a una posible infección de malaria, estos individuos pueden sobrevivir a la enfermedad lo que hace que el organismo produzca una inmunidad o una semi-inmunidad que mantiene una baja concentración de parásitos con una presencia mínima de síntomas. (Doolan D. , Acquired Immunity to Malaria, 2009)

Lo que hace que sean difíciles de detectar y la probabilidad de provocar una infección pos transfusional sea más alta.

Por otro lado, el estado inmune de donantes pertenecientes a zonas no endémicas es evidente, así cuando existe una infección por malaria estos presentan altas concentraciones de parásitos y la sintomatología típica de esta enfermedad. (Kitchen AD, 2006), lo que hace que sean pacientes no idóneos para donar.

Para poder realizar una selección del donante más relevante se debe tomar muy en cuenta la historia clínica del mismo, notando aquí si es un donante perteneciente a zonas endémicas o que ha sufrido episodios pasados de esta enfermedad. (Kitchen AD, 2006)

A pesar de que la entrevista es una herramienta que facilita reconocer factores de riesgo en los donantes, los servicios de sangre/bancos de sangre tienen la obligación de comprobar si

los resultados de la entrevista concuerdan con los resultados a nivel del laboratorio, por tal razón el servicio de sangre debe detectar una infección a nivel de una donación utilizando metodologías y técnicas que detecten oportunamente la presencia de los agentes infecciosos. (Kitchen AD, 2006)

5.5 Diagnóstico en el laboratorio.

La prueba considerada “gold estándar” y de mayor utilización a nivel mundial es la prueba de gota gruesa con tinción de Giemsa, en donde se puede diferenciar y detectar la especie, cantidad y morfología del *Plasmodium*, ayudando de esta forma a la clasificación del grado de la enfermedad y a su rápido tratamiento. (Kitchen AD, 2006)

Adicionalmente existen otras técnicas que sirven para la detección directa del parásito de malaria como la técnica microscópica de fluorescencia a base de colorantes. Este tipo de metodología tiene sus limitaciones lo que hace que sus resultados sean poco confiables, poco sensibles y específicos debido a la dificultad en la diferenciación de especies por fluorescencias manchadas, restos celulares, entre otros. (Kitchen AD, 2006)

5.5.2 Diagnóstico inmunológico.

Al existir una infección por malaria a nivel de donantes, el organismo crea una acción protectora produciendo anticuerpos específicos contra los parásitos, y a pesar de que no es un indicativo de que existe parasitemia en el individuo es una herramienta muy útil para diagnosticar infecciones pasadas y donantes semi-inmunes. (Kitchen AD, 2006)

Los métodos de detección de antígenos son lo suficientemente sensibles se basan en la detección de las proteínas específicas de los parásitos de malaria como la proteína - 2 rica en histidina (HRP-2), lactato deshidrogenasa (LDH), utilizando sangre completa en sus formatos. (Kitchen AD, 2006)

Existen varios métodos inmunoserológicos que permiten detectar la inmunidad humoral y celular del huésped, esta metodología es suficientemente sensible y específica utilizada para detectar las infecciones cuando la parasitemia es baja, además de ayudar a diferenciar infecciones pasadas de la actual. (Gutierrez & Arróspide, 2003)

Entre las técnicas que se encuentran para el inmunodiagnóstico de malaria tenemos: inmunofluorescencia indirecta (IFI), ELISA, pruebas inmunocromatográficas (Dipstick), hemaglutinación, radioinmunoensayo, entre otras. La prueba de ELISA no es de mucha utilidad en el diagnóstico clínico de un paciente, su mayor aplicación es en estudios epidemiológicos. (Gutierrez & Arróspide, 2003)

En 1996, Quiñonez J. et al, realizó un estudio piloto en 100 personas residentes de la zona endémica de Zaragoza (Antioquia – Colombia), para la evaluación comparativa del método inmunocromatográfico de diagnóstico rápido de malaria Parasight F® que detecta la proteína – 2 rica en histidina con el método convencional de gota gruesa, y determinar su sensibilidad, su especificidad y sus valores predictivos. La metodología consistió en realizar exámenes de gota gruesa y la prueba rápida de Parasight F® concomitantemente a 67 pacientes positivos para malaria, 34 con *Plasmodium falciparum*, 33 con *P. vivax* y 33 personas clínicamente sintomáticas pero negativos por gota gruesa. (Jaime Ordoñez, et all, 1997)

Los resultados obtenidos fueron: para *P. falciparum* la prueba mostró sensibilidad, 94%; especificidad, 100%; valor predictivo positivo, 100%; y valor predictivo negativo, 97%. En

los pacientes con infección por *P. vivax* la prueba fue negativa, y confirmó su alta especificidad por *P. falciparum*. (Jaime Ordoñez, et al, 1997)

En este trabajo los resultados positivos del Parasight F® fueron realmente considerados positivos cuando la parasitemia fue mayor de 400 parásitos/ml; sin embargo, también fue capaz de descubrir la infección en individuos con parasitemias tan bajas como 67 parásitos/ml.

No obstante, la prueba fue negativa en dos enfermos con parasitemias de 446 y 1,407 parásitos/ml, en los que quizá no había suficiente concentración de HRP-2 para ser diagnosticada. (Jaime Ordoñez, et al, 1997)

En conclusión, este estudio demuestra que la utilización de una prueba rápida tiene mayor ventaja frente a la utilización de la prueba convencional de gota gruesa, ya que la prueba rápida inmunocromatográfica, detecta antígenos maláricos hasta en parasitemias bajas, en cambio la prueba de gota gruesa puede pasar desapercibidos y presentar resultados falsos negativos. (Jaime Ordoñez, et al, 1997)

La importancia de contar con una prueba de diagnóstico complementario a la gota gruesa para la detección de malaria es muy positiva para cualquier banco de sangre y más para el Ecuador por ser una zona considerada endémica, con esto se evitaría la morbilidad y mortalidad causadas por esta enfermedad, además de reducir el riesgo de transmisión y el impacto económico del país.

Para determinar si una prueba debe ser implementada o no dentro de un centro de tamizaje requiere cumplir varias condiciones y características, dentro de ellas se encuentra la efectividad, oportunidad y costo.

Las pruebas de malaria tanto rápidas como ELISA que van a ser utilizadas en la investigación han sido consideradas como efectivas para la detección de malaria producida por *Plasmodium falciparum* y *vivax* de acuerdo al fabricante.

Adicionalmente se analizó el documento publicado por Unicef y WHO en el que indica las guías de selección para test rápidas de diagnóstico en el 2007. Esta guía contiene los lineamientos del tipo de anticuerpo o sustancia que deben contener las membranas inmunocromatográficas, control de calidad, mantenimiento, manejo de muestras y reactivos, entre otros (Unicef, October 2007). Por lo tanto, el utilizar reactivos comerciales probados abre la posibilidad de complementar la detección de malaria en donantes aparentemente sanos.

5.6 Pruebas para la detección de malaria.

5.6.2 Microscopía.

Este tipo de metodología se basa en la observación de la morfología del parásito de malaria utilizando técnicas como la gota gruesa con tinción de Giemsa y el extendido de sangre periférica con tinción de Wright, tiñendo de manera específica el citoplasma y la cromatina del parásito. (Zuluaga & Trujillo, 2010)

Mediante este método se puede obtener el recuento de parásitos y determinar el grado de parasitemia, así como determinar los estadios, géneros y especie del parásito con lo que se pueden dar posteriores decisiones clínicas. (Zuluaga & Trujillo, 2010)

5.6.3 Métodos inmunológicos.

En estas técnicas se necesita una sustancia específica (que puede ser antígeno o anticuerpo) la cual debe estar presente en la sangre total de los supuestos donantes asintomáticos para malaria. (Arróspide, 2002)

Las pruebas rápidas para el diagnóstico de malaria, se basan en la detección de antígenos presentes en los parásitos del género *Plasmodium*, mediante reacciones antígeno-anticuerpo que se producen sobre tiras de nitrocelulosa (inmunocromatografía) y pueden ser de dos tipos:

- Las que detectan la proteína-2 rica en histidina (HRP-2) secretada por *P. falciparum* a la sangre y que posteriormente incrementaron su desempeño detectando tanto el antígeno HRP-2 del *P. falciparum* como el antígeno panmalárico que se expresa en las fases sanguíneas del *P. vivax* y probablemente también en el *P. ovale* y *P. malariae*. Tiene una sensibilidad general del 90-92% y una especificidad del 96-98%. Para *P. vivax* tanto la sensibilidad como la especificidad son inferiores del 75% y 95% respectivamente (Arróspide, 2002)

ELISA ha sido catalogada como una técnica ideal para laboratorios con poca experiencia en el diagnóstico microscópico, la desventaja es que no detectan parasitemia bajas y presentan falsos negativos y falsos positivos en presencia de factor reumatoide. (Arróspide, 2002)

- La detección de la lactato deshidrogenasa (LDH) parasitaria, la cual se basa en la detección de esta enzima parasitaria, común en las cuatro especies de *Plasmodium*.

La especificidad es similar a las técnicas que detectan (HRP-2), pero la sensibilidad es un poco inferior (88-90%) disminuyendo a medida que la parasitemia es baja. La ventaja es la obtención de resultados en 20 minutos, no se requiere visualización microscópica y los inconvenientes son similares a la anterior. (Arróspide, 2002)

La prueba inmunoenzimática (ELISA) utiliza el sistema tipo sándwich enzima-sustrato para la detección cualitativa de la presencia de lactato deshidrogenasa *Plasmodium* (pLDH), una enzima producida tanto en la reproducción sexual como asexual del parásito. El kit de Standar Diagnostics SD denominado ELISA para el antígeno de malaria está destinado para uso profesional, como una ayuda en el diagnóstico de la infección por malaria. La muestra positiva cuyo valor es superior al corte, siempre debe ser verificada con una prueba confirmatoria como el examen microscópico de frotis de sangre.

5.6.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Este método se basa en la amplificación de segmentos conocidos y específicos de cada especie de *Plasmodium*, y se considera una técnica con sensibilidad y especificidad muy alta. Además, es mucho más rápida que la gota gruesa siendo su tiempo de desempeño menor a dos horas; sin embargo es una técnica de mayor complejidad y mucho más alto costo. (Zuluaga & Trujillo, 2010)

En el presente estudio se utilizó el protocolo para PCR del Army Malaria Institute de Australia en donde es posible amplificar el fragmento de 276 pb para *P. falciparum* y 300 pb para *P. vivax* correspondientes a los genes del ssRNA del *Plasmodium spp.* (Bain, 2011). Para el procesamiento de las muestras, obtención del ADN y amplificación posterior de la secuencia específica el Army Malaria Institute posee procedimientos estandarizados para este tipo de estudios en donde la muestra de sangre total pasa por distintos buffers y soluciones a distintas concentraciones para lisar las células rojas, remover proteínas y así obtener una muestra pura de ADN. (Bain, 2011). Una vez obtenido el ADN, se realiza la PCR utilizando primers específicos para cada especie de *Plasmodium*.

5.7 Inmunidad.

La inmunidad específica contra la malaria depende del nivel de endemicidad de la infección en una población dada. Dicha inmunidad se hace evidente durante los primeros días de la segunda semana después de que la parasitemia puede ser detectada. (Maestre, 2011) La inmunidad después de un periodo de tiempo puede llevar la parasitemia a niveles bajos o indetectables, lo cual reduce la sintomatología de la misma. (Maestre, 2011)

De igual manera, el proceso de inmunidad contra la enfermedad se basa en el desarrollo de una respuesta inmune frente a antígenos parasitarios, pero no precisamente es una respuesta inmune capaz de eliminar los parásitos de la circulación del paciente.

Teniendo en cuenta la especificidad de la respuesta inmune adaptativa en relación con el estadio del parásito, las características de dicha respuesta frente a las formas pre-eritrocíticas (esporozoítos y formas hepáticas), formas asexuadas (merozoítos, esquizontes) y formas sexuadas (gametocitos), son variables. (Maestre, 2011) Existen dos tipos de respuesta inmune que puede presentar el organismo frente a una infección por malaria las cuales se detallan seguidamente.

5.7.2 Respuesta humoral.

Los gametocitos pueden desarrollar una respuesta humoral específica en el individuo ya que su estructura posee una composición interna altamente inmunogénica, pero al ser parásitos intraeritrocitarios la respuesta inmune es muy limitada. (Contrera & Ramsey, 2004)

En poblaciones humanas infectadas por vía natural vector – humano con *P. falciparum* se han producido anticuerpos de tipo IgG, subtipos IgG1 o IgG3 que actúan contra las proteínas Pfs230 y Pfs48/45 que son proteínas específicas de los gametos en las etapas

sexuales del parásito de malaria; estas actúan en forma de mensajeros citoplasmáticos y están relacionadas con la inhibición de la infectividad de los gametocitos hacia los mosquitos y que se expresan en la superficie de los gametos. (Contreras Ochoa & M. Ramsey Ph. D, 2004)

Además se ha manifestado, que existen anticuerpos del subtipo IgG obtenidos del suero a partir de pacientes hiperinmunes, los que tienen la capacidad de reconocer la superficie de los gametocitos en sus etapas tempranas (etapa I a II-A) pero no en etapas tardías como los trofozoitos y esquizontes.

Existen a su vez anticuerpos en contra de la proteína Pf11-1 la cual está encargada del proceso de lisis de los glóbulos rojos durante la gametogénesis. (Contreras Ochoa & M. Ramsey Ph. D, 2004)

Proceso muy similar ocurre cuando existe una infección por *P. vivax*, durante la fase aguda la mayoría de los pacientes desarrollan una inmunidad humoral que también al igual que la infección por *P. falciparum* suprime la infectividad de los gametocitos transmitidos hacia los mosquitos. (Contreras Ochoa & M. Ramsey Ph. D, 2004)

En un estudio en Sri Lanka en el 2004, se encontró que el suero de 48% de los pacientes infectados tenía actividad supresora demostrando así que dichos pacientes al desarrollar una respuesta inmune humoral producen un estado que suprime la infectividad de los gametocitos del *Plasmodium*. (Contreras Ochoa & M. Ramsey Ph. D, 2004)

5.7.3 Respuesta celular.

Durante la infección por *P. vivax* se han detectado niveles altos de factor necrosante tumoral alfa (TNF α) y de interferón gamma (IFN γ), fenómeno que coincide cuando existe la ruptura de parásitos asexuales de etapa de esquizontes.

De igual manera, se ha encontrado que durante esta etapa existe una relación entre la disminución de la infectividad de los gametocitos y el número de microgametocitos. (Contrera & Ramsey, 2004)

Además, se ha revelado la proliferación de células mononucleares circulantes (CMC) en respuesta a los gametocitos de *P. vivax* y *P. falciparum*.

La mayoría de estudios, in vitro se han realizado en CMC de donadores no palúdicos y se han reportado varios resultados, entre estos, que los linfocitos T que reaccionan contra los gametos de *P. falciparum* también reaccionan contra esquizontes, pero no contra eritrocitos no infectados, lo que nos sugiere que ambas etapas comparten estructuras comunes. (Contrera & Ramsey, 2004)

Dicho así, se ha demostrado que los gametocitos de *P. falciparum* activan a linfocitos CD4+, pero no a linfocitos $\gamma\delta$ +. En varias poblaciones humanas infectadas de manera natural por *P. falciparum* y *P. vivax* se ha detectado respuestas proliferativas, específicas y no específicas, dirigidas contra los gametocitos. (Contreras Ochoa & M. Ramsey Ph. D, 2004)

Durante su desarrollo el *Plasmodium* secreta del interior del eritrocito al medio extra celular una clase de proteínas conocidas como exoantígenos o antígenos solubles. Dichas proteínas están envueltas en procesos metabólicos y en la estimulación de la respuesta humoral y celular contra el parásito. La mayoría de los exoantígenos corresponden a las

etapas asexuales del parásito y tienen la capacidad de provocar proliferación de linfocitos y producción de IFN γ .

Estos exoantígenos secretados por los gametocitos de *P. vivax* y *P. falciparum* de manera específica estimularon la proliferación de linfocitos $\gamma\delta+$ y linfocitos CD8 + en volumen considerable, en cambio la expansión de linfocitos $\alpha\beta+$ y CD4+ fue mínima. (Contreras Ochoa & M. Ramsey Ph. D, 2004)

Los linfocitos $\gamma\delta+$ participan directamente en la eliminación del parásito, en colaboración de otras poblaciones celulares y que participan en cooperación para regular la respuesta inmune contra la infección mediante la producción de citocinas inflamatorias como: TNF α y β , IFN γ , IL-5, IL-6, IL-8 y linfotóxina. Se necesita de mucha más investigación para dilucidar el mecanismo de acción y regulación de dichas células y el origen de los antígenos que reconocen. (Contreras Ochoa & M. Ramsey Ph. D, 2004)

5.7.4 Inmunidad adquirida.

En 1980, Bruce Chwatt citó que la inmunidad a la malaria puede ser definida como el estado de resistencia a la infección la cual abarca todos los procesos desde la destrucción del parásito a la limitación de su multiplicación. (Doolan D. , Acquired Immunity to Malaria, 2009)

Existen varios tipos de inmunidad contra malaria como inmunidad natural la cual al ser innata en el huésped, demuestra la respuesta inmediata a la inhibición del accionar del parásito, sin depender de una infección previa, otra es la inmunidad adquirida un estudio de *Koch* en 1900 dedujo que la protección contra malaria es adquirida solo cuando existe una

exposición fuerte e ininterrumpida contra el parásito, y la especie y estadios del parásito son específicos esta clase de inmunidad puede ser activa o pasiva.

La inmunidad adquirida activa se define como la capacidad inmunológica del huésped como resultado a encuentros pasados con el parásito y la inmunidad adquirida pasiva se refiere a la inmunidad prenatal transferida desde la madre o por sustancia protectoras externas. (Doolan D. , Acquired Immunity to Malaria, 2009)

Además existen varios tipos de inmunidad adquirida que se pueden presentar antes, durante y después de una infección con malaria, así existe un estado denominado de “premonición” que es el estado de protección contra nuevas infecciones manteniendo un grado bajo de parasitemia asintomática, en la cual la protección esta relacionada con la disminución del riesgo. (Doolan D. , Acquired Immunity to Malaria, 2009)

Por ejemplo en África la mayoría de la población de uno u otro modo están infectados con *P. falciparum* pero ninguno presenta algún tipo de sintomatología, al contrario ellos aprendieron a convivir con la infección y llevar una vida cotidiana normal a pesar de los parásitos en su sangre. (Doolan D. , Acquired Immunity to Malaria, 2009)

5.7.5 Donantes semi-inmunes o asintomáticos.

La semi-inmunidad se produce por lo general en las personas que pertenecen a zonas endémicas para malaria en donde la tasa de inoculación o tasa de picaduras diarias durante un periodo de tiempo (EIR entomological inoculation rates) es muy elevada. En donde los donantes presentan un alto título de anticuerpos frente a una densidad parasitaria de tal manera que se presenta un equilibrio entre el sistema inmune y la parasitemia. (Kitchen AD, 2006)

5.8 Problemas en la detección.

Un estudio presentado por *Kitchen* en el 2006, habla sobre los cuatro objetivos específicos para la detección de malaria en donantes: los parásitos intracelulares, anticuerpos, antígenos y ADN del *Plasmodium*.

La prueba de gota gruesa es considerada la técnica gold estándar en la mayoría de países que sufren los estragos de la malaria, al otorgar un diagnóstico más específico como la densidad de la parasitemia, el estadio, género y especie del parásito, el tratamiento puede ser mucho más efectivo. Pero existen varios inconvenientes al momento de realizar esta prueba el más importante es la experticia del técnico al momento de diferenciar el parásito, lo que hace que el resultado sea mucho más subjetivo. (Kitchen AD, 2006)

Otro tipo de pruebas son las técnicas de detección de anticuerpos este tipo de herramientas detectan la presencia de anticuerpos producidos por el estado inmune del paciente en respuesta a los parásitos de malaria el inconveniente de este tipo de diagnóstico es saber verdaderamente si el donante posee parásitos de malaria ya que la inmunoglobulina contra la malaria puede ser detectable por varios años. (Kitchen AD, 2006) Un estudio publicado por *Slinger et al*, dice que la “*detección de anticuerpos para malaria carece de sensibilidad y especificidad*”, donde existirían valores predictivos demasiado bajos. (Slinger R, 2001)

Otra alternativa para el diagnóstico de malaria en donantes es la detección del antígeno de *Plasmodium* considerada una prueba más rápida y objetiva que la microscopía directa. Según *Kitchen* la sensibilidad de estas pruebas es menor comparándola a la gota gruesa. Lo que se ha propuesto la utilización de dos técnicas complementarias para elevar de algún modo la sensibilidad de la detección. (Kitchen AD, 2006)

Existe una prueba que posee relativamente mayores niveles de sensibilidad: la PCR ofrece un medio rápido y sensible para la detección del ADN del *Plasmodium* y evitar una posible infección pero existen varios aspectos que podrían producir una infección, como el tamaño de inóculo (grado de transmisión) lo que hace que si existieran parasitemias demasiado bajas como en zonas no endémicas aún es posible que los glóbulos rojos infectados pueden transmitir la enfermedad, además existen aspectos socio-económicos que hacen que esta técnica sea muy difícil de implementar. (Kitchen AD, 2006)

En el presente estudio se utilizaron dos técnicas inmunológicas que detectan el antígeno de *Plasmodium* en sangre total por las interacciones antígeno-anticuerpo, una de estas fue la prueba de diagnóstico rápido (PDR) inmunocromatográfica que detecta las enzimas HRP-2 y LDH. Según un estudio publicado por *Gillet* en el año 2011, las PDR son una excelente alternativa para diagnosticar malaria en zonas endémicas en donde la densidad parasitaria esta sobre los 100 parásitos por litro o mayor al 0.002% de glóbulos rojos parasitados. (Philippe Gillet, 2011) Pero *Gillet* presenta resultados falsos negativos que fueron reportados tanto en bajas como en altas parasitemias. Y atribuye esta complicación a varios factores como las variaciones genéticas de la enzima HRP-2 y el efecto prozona. (Philippe Gillet, 2011)

El fenómeno de la prozona se presenta cuando se añaden cantidades mayores de antígeno a cantidades constantes de anticuerpo, se alcanza una proporción para la cual no se presenta precipitación ni aglutinación. (Chávez, 2008)

A pesar de que la relación de este factor se puede explicar por alta concentración de la enzima HRP-2 el fenómeno prozona sigue siendo un aspecto poco común pero puede disminuir la precisión de la técnica desafortunadamente este estudio no fue diseñado para determinar los factores para esta complicación. (Philippe Gillet, 2011)

Otros factores que pueden interferir en la detección de antígenos de malaria por PDR son el secuestro capilar de parásitos de malaria durante la migración a través de la membrana de nitrocelulosa que posee el cassette de la técnica.

La otra prueba utilizada en este estudio fue la técnica inmunoenzimática ELISA, un estudio presentado por *Noedl* en el 2006, mostro el desempeño de la técnica que detecta la enzima HRP-2 mostrando una alta sensibilidad y especificidad donde el parásito fue detectado de forma fiable. (Noedl H, 2006). Pero existen varios factores que pueden afectar los resultados como el número de muestras que se procesan diariamente en los bancos de sangre y el problema de que solo existen ELISAS específicos para *P. falciparum* lo que hace que infecciones mixtas sean difíciles de detectar. (Noedl H, 2006)

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

6. TIPO DE ESTUDIO.

Esta investigación tiene un diseño descriptivo transversal y se realizó en el Hemocentro Nacional de Cruz Roja Ecuatoriana. Se llevó a cabo la recolección de muestras de donantes de sangre provenientes de bancos de sangre de zonas endémicas en las que se detectó la presencia o ausencia de antígenos parasitarios de malaria.

Esta investigación utilizó un muestreo aleatorio estratificado el cual se basa en la toma de una muestra representativa por subpoblaciones de la población total, tomando en consideración los siguientes parámetros: cantidad de donantes anuales, prevalencia de malaria y criterios de inclusión importantes para el estudio.

7. POBLACIÓN-AMBIENTE-PERIODO.

Población: Donantes asintomáticos pertenecientes a zonas consideradas endémicas en el Ecuador. Zonas endémicas como El Oro, Esmeraldas, Los Ríos, Milagro, Pastaza, y Santo Domingo de los Tsáchilas, de acuerdo a los datos proporcionados por las estadísticas del Ministerio de Salud Pública del Ecuador.

Muestras: Se recolectó una muestra de sangre total de cada una de las donaciones recibidas y se las sometió a la detección de antígenos de malaria en prueba inmunocromatográfica o prueba rápida y la de inmunoensayo conocida como ELISA. Aquellas muestras con resultados seropositivos se confirmaron mediante la técnica de PCR.

Todo este proceso se dio durante los meses de junio a diciembre del 2011.

Se debe aclarar que las muestras no fueron recolectadas directamente de los donantes, el Hemocentro Nacional y los diferentes bancos de sangre nos proporcionaron las muestras de sangre total en tubos con anticoagulante, en este estudio se tomo en cuenta varios criterios como los descritos a continuación.

8. CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

- Donantes provenientes de zonas endémicas para malaria.
- Donantes que cumplan los criterios de donación de sangre de acuerdo al documento de Elegibilidad del Donantes de la OMS. (WHO, 2012)

9. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

- Donantes que no cumplan con los criterios de aceptación para las donaciones de sangre.
- Donantes provenientes de zonas no endémicas.

10. MÉTODOLÓGÍA DEL ESTUDIO.

1. Como primera etapa de la investigación se realizaron curvas de sensibilidad tanto para la prueba rápida como para ELISA, utilizando dos cepas positivas para *P. falciparum* y *P. vivax*. El propósito de la realización de estas curvas de sensibilidad fue determinar la capacidad de detección que poseen las dos técnicas.
2. En el caso del *P. falciparum* se utilizó la cepa CIEI-001 obtenida de cultivos disponibles en el Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas-PUCE.
3. Para el *P. vivax* se obtuvo una muestra de una persona que presentó un caso de malaria proveniente de la ciudad de Guayaquil.
4. En la segunda etapa de la investigación se recolectó un total de 1120 muestras de sangre total provenientes de los donantes que cumplieron con los requisitos de donación de sangre, que además fueron, previamente tamizados para malaria mediante la prueba de gota gruesa, estos donantes pertenecen a los diferentes bancos de sangre ubicados en zonas consideradas endémicas 8 en total.
5. La tercera etapa de la investigación fue el procesamiento de las muestras mediante dos técnicas, una prueba rápida y una prueba inmunoenzimática (ELISA) de captura de antígenos.
6. La cuarta etapa se basó a partir de los resultados presuntivos que se obtuvieron tras el análisis de las muestras, se dio aviso a los bancos de sangre a fin de que las unidades de sangre y derivados que correspondían a las muestras presuntivas para malaria en los dos métodos sean separadas y no utilizadas.

7. En la quinta etapa de la investigación se realizó la confirmación de las muestras que dieron resultados presuntivos tanto en ELISA como en prueba rápida mediante la técnica molecular de PCR.
8. Se realizó la estandarización del ADN mediante la cuantificación del mismo utilizando el equipo Nanodrop ND100 efectuando diluciones seriadas para así encontrar la mejor y más útil dilución.
9. La sexta etapa del estudio fue el análisis de datos y la correlación de los resultados obtenidos entre la prueba rápida y el ELISA; además comparar los datos teóricos versus los datos prácticos y obtener conclusiones y respuestas objetivas al problema en el cual se basa esta investigación.

11. TAMAÑO DE LA MUESTRA.

Cálculo del N:

$$n = \frac{Z_{1-\alpha}^2 * p * q}{d^2}$$

Se calculó el N con un nivel de confianza del 95% y un erro del 0,05.

Con la siguiente formula se toma en cuenta los siguientes valores:

Tabla N° 2: Cálculo del N.

Error Alfa	0,05
Nivel de Confianza	95%
Z de (1-α)	1,96
Prevalencia de la Enfermedad	Según la provincia
Complemento de p	Según la provincia
Precisión	0,05

Tabla N° 3: Total de muestras a ser analizadas en pruebas rápidas y ELISA.

Provincia	Prevalencia-MSP	Cálculo N	Donantes Anuales	Número de muestras requeridas de acuerdo a la población
El Oro	54%	382	4373	301
Esmeraldas	66%	345	1318	223
Los Ríos	42%	374	806	205
Pastaza	37%	358	357	129
Pichincha	8%	113	1500	85
Santo Domingo	80%	246	2890	207
TOTAL		1818	11244	1150

La tabla muestra el cálculo del N de acuerdo a la estratificación de las muestras por provincia endémica.

12. TÉCNICAS EMPLEADAS.

Se utilizaron dos técnicas para la detección de antígenos de malaria:

- a) ELISA.
- b) Prueba Rápida.

Técnica: SD Malaria Antigen ELISA

Casa Comercial: Standard Diagnostics

Número de Lote: 213034

Fecha de Expiración: 15/03/2012

Inserto: Anexo (1)

12.1 Fundamento técnica inmunoenzimática (ELISA).

Es un ensayo inmunoenzimático para la detección cualitativa de antígenos de malaria *Plasmodium sp.* presente en sangre total. La técnica posee dos micro placas. Una sin recubrimiento que es utilizada para la lisis de sangre total y la otra esta precubierta con anticuerpos de ratón específicos para la enzima LDH de Plasmodium. (Diagnostics, 2010)

Después de la lisis de sangre total del donante, la enzima LDH presente en la sangre a estudiar, se une a los anticuerpos de ratón dirigidos contra isoformas de malaria y estos se unen a anticuerpos de cobayos de la enzima conjugada (conjugado) formando una reacción antígeno-anticuerpo de tipo sándwich. Después de una incubación de 90 minutos todas las sustancias que no se han unido son eliminadas mediante los procesos de lavado y secado (Diagnostics, 2010)

Por lo tanto, la actividad enzimática residual en los pocillos será directamente proporcional a la concentración pLDH en la sangre entera del paciente, lo que se evidenciará por la incubación con una solución de sustrato (TMB de trabajo) y la lectura colorimétrica se lleva a cabo utilizando un espectrofotómetro a 450 nm. (Diagnostics, 2010)

12.2 Procedimiento.

Se deben tomar diferentes precauciones en relación al manejo de muestras biológicas, estándares, los controles deben ser considerados potencialmente patógenos e infecciosos. Siguiendo las recomendaciones planteadas por el Centro de Control de Enfermedades Infecciosas (CDC) (Wilson & Chosewood, 2009). Se tomaron y conservaron las muestras hasta su procesamiento.

- Las muestras deben estar homogenizadas, colectadas en tubos con anticoagulante y almacenadas no más de 3 días a una temperatura de refrigeración de 2 a 8° C.
- Cada ensayo debe incluir 3 pocillos con control negativo, 2 pocillos con control positivo.
- Mezclar bien los controles y muestras utilizando la pipeta, este paso sirve para lisar correctamente los glóbulos rojos.
- Controlar la temperatura ambiente entre los 15 – 30 °C y la de incubación.
- Controlar el tiempo de incubación y los procesos de lavado.
- Leer las absorbancias utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm. La lectura se debe realizar en un lapso de 30 minutos después de detener la reacción.

12.3 Limitaciones del test.

- Un resultado negativo no excluye la posibilidad de infección de la malaria en el paciente. Si no se detecta pLDH malaria puede ser el resultado de factores tales como el muestreo inadecuada y / o la manipulación de la muestra.
- Asimismo, el no añadir espécimen en el procedimiento podría dar lugar a un resultado falso negativo. Se debe considerar repetir la prueba.
- La prueba no puede diferenciar entre las especies de Plasmodium y por lo tanto es útil como una técnica de screening solamente.
- Todos los reactivos se proporcionan en concentraciones fijas. El rendimiento de la prueba puede verse afectado si están concentraciones son modificadas o su emplea un almacenamiento inadecuado.

- La prueba se limita a la detección de antígeno de la malaria *Plasmodium sp.* pero podrían ocurrir falsos resultados por varios factores como la baja incidencia de la enzima LDH es por esto que se recomienda confirmar los resultados obtenidos con una prueba complementaria.

Además para seguir con el estudio y cumplir los objetivos trazados, se realizó la caracterización de todas las muestras testadas en ELISA, utilizando la técnica inmunocromatográfica rápida casa comercial CYPRESS DIAGNOSTICS como en la prueba de ELISA se eligió esta técnica porque detecta antígenos de malaria que en donantes de sangre seleccionados previamente pueden presentar asintomatología y parasitemias bajas, lo que haría difícil la detección de dicho parásito. (Doolan D. , Acquired Immunity to Malaria, 2009)

Técnica:	Malaria Total Quick Test
Casa Comercial:	Cypress Diagnostics
Número de Lote:	090107
Fecha de Expiración:	02/2013
Inserto:	Anexo (2)

12.4 Fundamento PDR.

Contienen una membrana en forma de tira, la cual esta recubierta con anticuerpos monoclonales de ratón y un anticuerpo policlonal en dos líneas separadas en una misma tira.

El anticuerpo monoclonal (Línea para P.f.) es específica para la enzima HRP-II del P.f. y el anticuerpo policlonal de ratón (Línea para Pan) es específica para la enzima LDH que se encuentra en todas las especies de Plasmodium. Cuando se coloca una muestra positiva los anticuerpos de la membrana reaccionan específicamente con los antígenos de malaria presentes causando una reacción antígeno-anticuerpo de tipo sándwich apareciendo una línea coloreada.

12.5 Control de calidad del test.

Esta prueba posee una línea de control la cual indica un apropiado procedimiento y la calidad de los reactivos.

Se recomienda utilizar controles externos, en este estudio se utilizaron 2 cepas control una para *P. falciparum* y la otra para *P. vivax*.

12.6 Interpretación de resultados.

El cassette contiene 2 líneas de resultado, una línea solamente detecta antígenos de *P. falciparum* y la otra línea detecta antígenos específicos para la enzima LDH presente en todas las especies de Plasmodium.

Un resultado reactivo es cuando una línea se vuelve visible juntamente con la línea C de control.

Tabla N° 4

Interpretación de resultados PDR	
Detección de P. falciparum	Presencia 2 líneas (Pf + Pan) Presencia línea control
Detección de P. vivax, ovale, malariae	Presencia de línea Pan Presencia línea control
Infección mixta	Presencia de 2 líneas (Pf. + Pan) Presencia línea control
Resultado negativo	Solo presencia línea control
Resultado inválido	No aparece línea control

Fuente: Inserto PDR.

12.7 Limitaciones del test.

- Esta prueba detecta HRP-II del P. falciparum o LDH específico de las especies de Plasmodium utilizada como una prueba de screening, resultados reactivos se los debe confirmar mediante una técnica de microscopía.
- La prueba esta limitada a la detección de antígenos de P. especies, lo que puede producir la aparición de falsos resultados tanto positivos como negativos, por lo que se recomienda utilizar una técnica complementaria.
- Existen varios factores que pueden producir interferencia con los resultados como: muestras hemolisadas, lipémicas, ictericas o con presencia de factor reumatoide.

12.8 Realización de PCR.

Después de correr todas las muestras y analizar los resultados se procedió con la confirmación de las muestras positivas mediante la técnica de PCR, teniendo en cuenta que antes se debe extraer el ADN de las muestras que serán estudiadas.

Para este procedimiento se siguió el protocolo de Army Malaria Institute de Australia.

12.9 Fundamento.

La PCR (reacción en cadena de la polimerasa) fue desarrollada por Kary Mullis en 1986. La técnica se basa en las características de la estructura química del ADN y su replicación. (Torres & Baca, 1995).

La PCR, se fundamenta en la amplificación enzimática de una o varias secuencias específicas de ADN rodeado por dos secuencias de oligonucleótidos que hibridan en la cadena complementaria de la molécula molde que se va a amplificar (cebadores o “primers”) y que son utilizados por un ADN polimerasa termoresistente para copiar la secuencia de la misma. (Biomedicas, 2008) (UNED, 2000).

La PCR es una reacción en cadena, porque las hebras de ADN de nueva síntesis sirven a su vez de molde para reacciones en ciclos posteriores, se utiliza una ADN polimerasa termoestable debido a que la reacción pasa por diferentes temperaturas en sus respectivos ciclos, (UNED, 2000) cada ciclo consta de 3 etapas:

- **Desnaturalización:** Para que la reacción pueda dar inicio es importante que las moléculas de ADN molde se encuentren en forma de cadena simple. Para esto se debe provocar la rotura de los enlaces puentes de hidrogeno intercatenarios mediante la exposición a temperatura de 90 a 95°C y así obtener la separación de

ambas cadenas. Si el ADN solo se desnatura parcialmente éste tenderá a renaturalizarse muy rápidamente dificultando con esto el proceso de hibridación. (Biomedicas, 2008).

- **Hibridación:** Una vez que se obtiene el ADN desnaturizado se disminuye la temperatura de la reacción hasta un rango comprendido entre los 40 y los 60°C para que se pueda producir la hibridación específica de los cebadores y así lograr que estos se unan a las secuencias que rodean el fragmento que se desea amplificar, la temperatura a la que se realiza esta etapa debe establecerse para cada reacción en función de la longitud de los cebadores y su secuencia. (Biomedicas, 2008).
- **Extensión:** En esta etapa el ADN polimerasa termoresistente cumple un papel muy importante al agregar nucleótidos en el extremo 3' del cebador utilizado como molde la cadena de ADN previamente desnaturizada. La temperatura a la que se realiza esta etapa de la reacción suele ser de 72°C ya que es la temperatura a la que la "Taq polimerasa" alcanza su máxima actividad. Normalmente una extensión de 20 segundos es suficiente para fragmentos menores de 500 pares de bases, y 40 segundos para fragmentos por encima de 1.2Kb. Al finalizar cada uno de los ciclos el número de copias obtenidas se duplica y después de 20 ciclos ya tenemos aproximadamente 1 millón de copias de cada una de las moléculas molde iniciales ADN. (Biomedicas, 2008).

12.9.1 Extracción de ADN a partir de sangre total fresca: Anexo (3).

- Diluir 100 ul de sangre con 900 ul de TKM 1 las células rojas se lisan añadiendo 10 ul de saponina al 10%. Mezclar la muestra varias veces hasta obtener una solución clara.
- Centrifugar por 5 minutos al máximo de velocidad para sedimentar los parásitos. Eliminar el sobrenadante.
- Añadir 1 ml de TKM1 al sedimento y resuspenderlo. Centrifugar de nuevo por 5 minutos al máximo de velocidad. Repetir este paso hasta que el sobrenadante sea incoloro.
- Resuspender el sedimento con 10 ul de TKM1. Añadir 0.4 ml de TKM2 y 25 ul de SDS al 40% y mezclar bien. Incubar por 15 minutos a ~55°C.
- Añadir 0.15 ml NaCl 6M y centrifugar por 5 minutos. (Paso para remover proteínas).
- Trasferir el sobrenadante a un tubo nuevo y añadir 1 ml de etanol al 100%, mezclar bien y centrifugar por 5 minutos para sedimentar el ADN.
- Decantar el sobrenadante. Añadir 0.5 ml de etanol al 75% al sedimento de ADN y centrifugar por 5 minutos. Decantar el sobrenadante y secar el sedimento por 5 minutos.
- Disolver el sedimento de ADN en 100ul de DDW. (Toma ~30 minutos re disolver el sedimento).

12.9.2 Reacción en cadena de la polimerasa PCR.

Para este estudio se siguió un protocolo de PCR estandarizado por Army Malaria Institute de Australia.

Primers secuencias:

- **Rev:** GTA TCT GAT CGT CTT CAC TCC C
- **Pf:** AAC AGA CGG GTA GTC ATG ATT GAG
- **Pv:** CGG CTT GGA AGT CCT TGT
- **Po:** CTG TTC TTT GCA TTC CTT ATG C
- **Pm:** CGT TAA GAA TAA ACG CCA AGC G

Controles:

Para este estudio se utilizaron 2 controles positivos internos la cepa CIEI-101 para *P. falciparum* y CIEI-102 para *P. vivax* traídos de Colombia por el área de investigación en malaria del Centro de Investigaciones en Enfermedades Infecciosas de la PUCE.

Master-Mix:

Para este estudio se realizó un master-mix teniendo en cuenta el número de muestras a evaluar y las condiciones del laboratorio.

Utilizando los siguientes volúmenes por muestra:

Tabla N° 5

Master Mix	12,5 ul
MgCl₂	2,5 ul
Primers	1 ul x 3
ADN	5 ul
H₂O molecular	2 ul

Control de calidad.

- Se utilizaron como controles internos de las pruebas dos muestras de sangre de pacientes con malaria producida por *vivax* y *falciparum*. Paciente-CIEI-01 y Paciente-CIEI-02
- También se utilizaron dos cepas de cultivos de *Plasmodium falciparum* y *vivax* provenientes de Colombia. Cepas CIEI-101 *falciparum* y CIEI-102 *vivax*.
- Adicionalmente, se realizó una curva de sensibilidad tanto en ELISA como en la prueba rápida utilizando las cepas de control interno.
- Se realizó una curva de estandarización de la PCR, cuantificando el ADN de los controles utilizando un NanoDrop ND100 y realizando diluciones seriadas dobladas.

13. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES.

Tabla N° 6
Operacionalización de las variables

OBJETIVO GENERAL	Establecer la correlación existente entre los resultados obtenidos en la prueba rápida y ELISA de captura de antígenos de malaria en donantes asintomáticos de sangre provenientes de zonas endémicas.		
VARIABLES DEPENDIENTES	DEFINICION	INDICADORES	INSTRUMENTO DE MEDIDA/ Medios de verificación.
PRESENCIA DE ANTÍGENOS DE MALARIA EN DONANTES ASINTOMÁTICOS	Antígenos de malaria presentes en pacientes que no presentan una sintomatología, como es el caso de donantes de sangre.	$\frac{\text{Total de donantes reactivos para antígenos de malaria}}{\text{Total de donantes analizados}}$	Pruebas de Laboratorio. Análisis de los resultados. Reporte de resultados
VARIABLES INDEPENDIENTES	DEFINICION	INDICADORES	INSTRUMENTO DE MEDIDA / Medios de Verificación
CORRELACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN PRUEBAS RAPIDAS, ELISA Y PCR	Hablamos de correlación cuando nos referimos a la relación existente entre dos variables, intensidad y su sentido (positivo o negativo).	Índice de concordancia Reproductibilidad de los resultados en ELISA	Análisis de los resultados obtenidos Registros de curvas de sensibilidad Cálculos de concordancia, Tablas de contingencia.
PRUEBAS RAPIDAS	Son pruebas que detectan antígenos específicos (proteínas) producidos por los parásitos de malaria.	$\frac{\text{Número de donantes reactivos para antígenos de malaria}}{\text{Total de donantes analizados}}$	Análisis de los resultados comparados con el uso de controles internos del Kit. Registro de reportes de resultados.
ELISA	Es una prueba enzimoimmunoanálisis de adsorción que detecta anticuerpos en sangre utiliza como antígeno la proteína circum esporozoítica del parasito malárico, midiendo la respuesta humoral de inmunógenos.	$\frac{\text{Total de donantes reactivos en ELISA}}{\text{Total de donantes analizados}}$	Reporte de absorbancia obtenidas. Registro de resultados. Análisis de resultados de acuerdo al punto de corte/cut off

<p>PCR</p>	<p>La PCR o "Reacción en Cadena de la Polimerasa" es una técnica biomédica que permite obtener grandes cantidades de secuencias moleculares de ADN o ARN replicados, a partir de muestras en muy pequeñas cantidades de estos ADN o ARN.</p>	<p>Porcentaje de muestras seropositivas con resultados positivos en PCR</p>	<p>Análisis de resultados Registro de reportes de resultados</p>
<p>LUGAR DE PROCEDENCIA DE DONANTES</p>	<p>Lugar donde nació o reside el paciente</p>	<p>Tiempo de permanencia o residencia en zonas endémicas como: El Oro, Esmeraldas Los Ríos Pastaza Pichicha y Sto. Domingo</p>	<p>Revisión de fichas del donante. Formularios de recepción de muestras.</p>

14. MÉTODO ESTADÍSTICO.

14.1 Métodos recolección de información.

Procesamiento estadístico de la información recogida: SPSS.

Al final: Se empleo de una PC Pentium III, con ambiente de Windows XP. Los textos se procesaron con Word XP, y las tablas y gráficos se realizaron con Excel XP y SPSS Vr. 16.

14.2 Recolección de muestras.

Se recolectó las muestras en el Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana de Esmeraldas, Babahoyo, Milagro, Portoviejo, Pastaza, y Santo Domingo además se recolecto muestras de la Cruz Roja de El Oro consideradas zonas endémicas para malaria, también se tomó en cuenta la provincia de Pichincha por ser en donde se ubica el Hemocentro nacional.

15. ASPECTOS ÉTICOS.

Para la recolección de las muestras se tomaron varias normas para obtener los permisos de utilización de estos productos sanguíneos, se realizaron diferentes oficios dirigidos a los directores de los bancos de sangre solicitando el permiso pertinente y su colaboración para el envío de muestras recordándoles que en forma que avance el proyecto se notificará cualquier tipo de observación de sus muestras y así puedan tomar las respectivas acciones.

16. MARCO CONCEPTUAL.

16.1 Trásfusión de sangre.

Una transfusión de sangre es la transferencia de sangre o componentes sanguíneos de un sujeto (donante) a otro (receptor). (OMS, WHO Expert Committee on Malaria, 2000)

16.2 Donación voluntaria.

Se considera donación voluntaria, altruista aquella que se hace por propia voluntad, sin recibir pago alguno, ya sea efectivo o en especie que pueda considerarse sustituto del dinero. Ello incluye el tiempo de ausencia en el trabajo por un lapso mayor que el razonablemente necesario para la donación y el desplazamiento. Los procedimientos rutinarios de atención a donantes deberán estimular y facilitar la donación voluntaria, altruista y repetida de sangre. (OPS, Estandares de Trabajo en Bancos de Sangre, 2007)

16.3 Donantes asintomáticos.

Son portadores crónicos de una infección transmisible con resultados persistentemente negativos de la pesquisa serológica negativa. Estas personas no presentan una sintomatología clara de la enfermedad. (Jimenez, 2006)

Productos sanguíneos:

16.4 Sangre total.

La unidad de sangre total es el producto que resulta de la adición de 63 mL de solución anticoagulante-conservadora a los 450 mL de sangre obtenida de un donante. Su almacenamiento se realiza a 4°C y durante el mismo las plaquetas y los leucocitos dejan de ser funcionales a los pocos días de la extracción así como los factores de la coagulación.

16.5 Concentrado de hematíes.

El concentrado de hematíes es el componente que se obtiene después de haber retirado 200 a 250 mL de plasma de una unidad de 450 mL de sangre total tras haber sido centrifugada.

16.6 Plasma fresco congelado.

Una unidad de plasma fresco congelado es el componente que se obtiene tras centrifugación de una unidad de 450 mL de sangre total en las seis horas que siguen a su obtención. Tiene un volumen que oscila entre 200-250 mL. (Secretaría de Salud Veracruz México, 2011)

16.7 Banco de Sangre.

Es el establecimiento autorizado para obtener, recolectar, conservar, aplicar y proveer sangre humana, así como para analizar y conservar, aplicar y proveer componentes de la misma.

La función del banco de sangre es determinar quién es el donador ideal y detectar las unidades infectantes. También es el encargado de recibir a los donantes, procesar, almacenar y distribuir la sangre y sus componentes. (Secretaria de Salud Veracruz México, 2011)

16.8 Hemocentro.

Un Hemocentro es una entidad que funciona como Banco de Sangre tipo A y puede funcionar como Banco de Sangre de referencia, ofrece un producto más seguro. La creación de un Hemocentro en el Ecuador fue en el año 2009 y permite producir y proveer productos sanguíneos de mayor calidad al país. (Cruz Roja Ecuatoriana, 2010)

16.9 Reacción post-transfusional.

En la transfusión sanguínea se administran componentes celulares o plasmáticos que contienen antígenos de grupos sanguíneos (ABO y Rh más frecuentes, pero no los únicos); el organismo produce receptores inmunocompetentes que producen anticuerpos y aquí se produce la reacción post-transfusional.

16.10 Pruebas Diagnóstico Rápido (PDR) para malaria.

Las pruebas de diagnóstico rápido de la malaria, detectan antígenos específicos (proteínas) producidos por los parásitos de malaria. (Organización Mundial de la Salud, 2006)

16.11 Prueba de ELISA.

El ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoabsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro. (Cultek, 2006)

16.12 ELISA de captura de antígenos.

Se trata de un ensayo muy empleado en el que se recubre el pocillo con un primer anticuerpo anti-antígeno. Después de lavar el exceso de anticuerpo se aplica la muestra problema en la que se encuentra el antígeno, que será retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo. Después de un segundo lavado que elimina el material no retenido se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado. Así pues cada molécula de antígeno estará unido a un anticuerpo en la base que lo retiene y un segundo anticuerpo, al menos, que lo marca. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo. (Fernández, 2007)

16.13 PCR.

La PCR o "Reacción en Cadena de la Polimerasa" es una técnica biomédica que permite obtener grandes cantidades de secuencias moleculares de ADN o ARN replicados, a partir de muestras en muy pequeñas cantidades de estos ADN o ARN.

16.14 Sensibilidad.

Es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo, es decir, la probabilidad de que para un sujeto enfermo se obtenga en la prueba un resultado positivo. La sensibilidad es, por lo tanto, la capacidad del test para detectar la enfermedad. (Pita Fernandez, et all., 2003)

16.15 Especificidad.

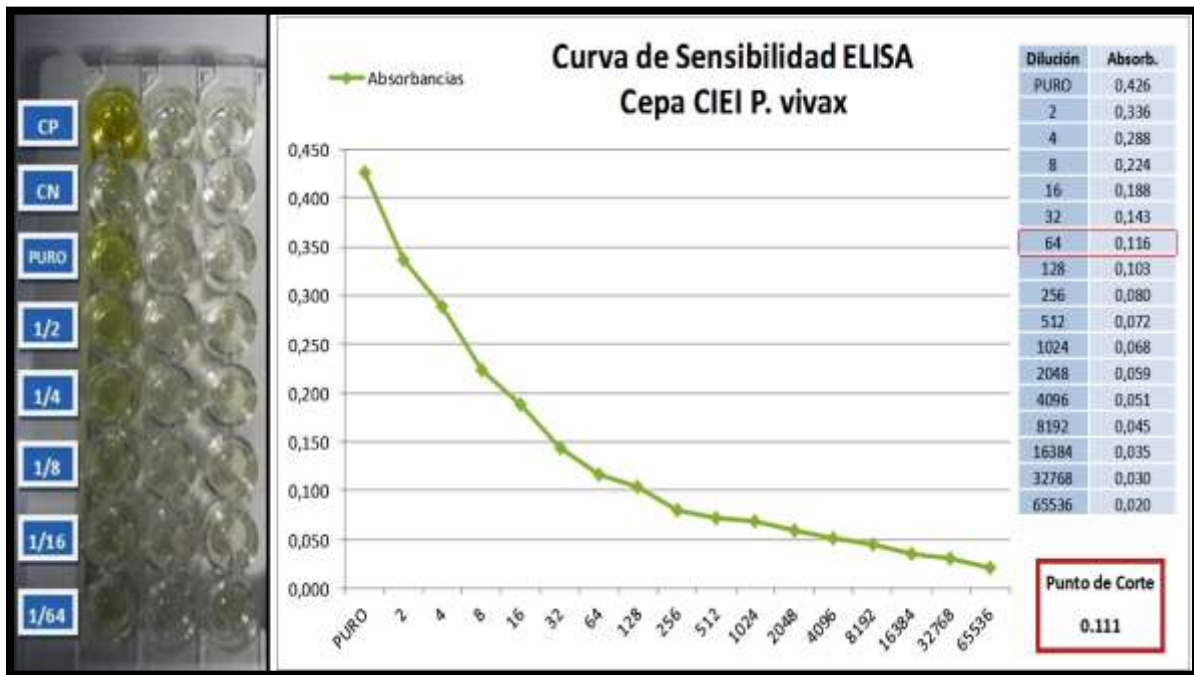
Es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano, es decir, la probabilidad de que para un sujeto sano se obtenga un resultado negativo. En otras palabras, se puede definir la especificidad como la capacidad para detectar a los sanos. (Pita Fernandez, et all., 2003)

CAPITULO IV

17. RESULTADOS.

Se realizó una curva de sensibilidad en la técnica de ELISA para *P. vivax* utilizando una cepa positiva de un paciente de la provincia de Guayas. Se observó reactividad hasta una dilución 1/64. (Figura N° 4)

Figura N° 4: Curva de sensibilidad para *P. vivax* en ELISA

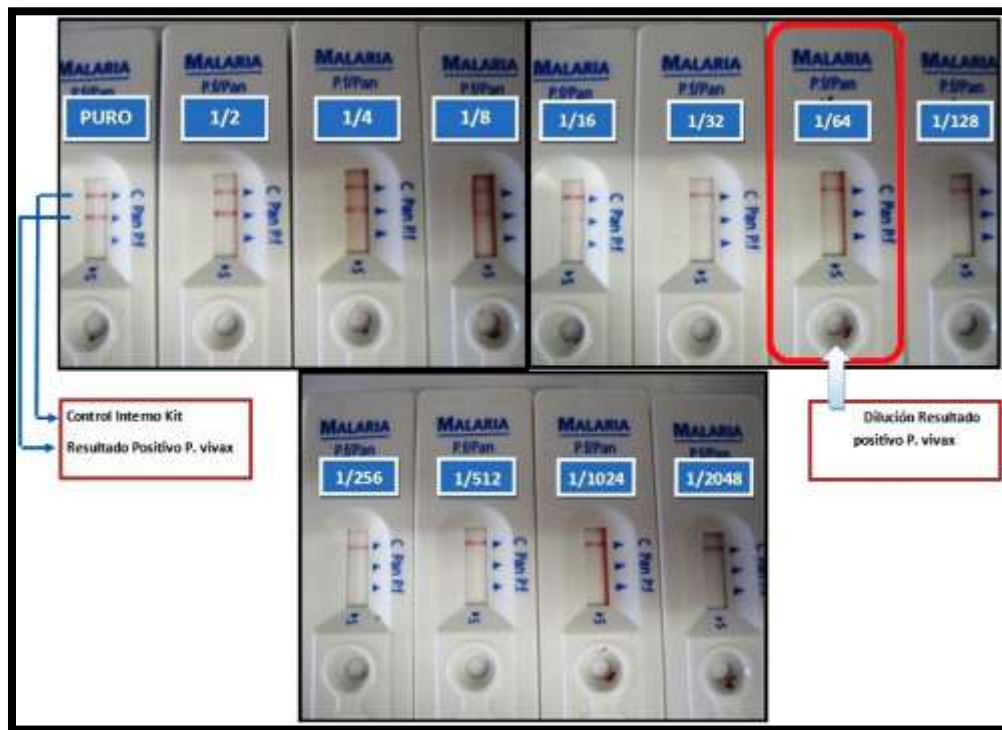


Fuente: Base datos CIEI

La figura muestra las diluciones que se realizaron en eje de las X y las absorbancias medidas en el eje de las Y. Señalando la última dilución en presentar reactividad.

Se realizó una curva de sensibilidad para la PDR, utilizando la misma cepa de *P. vivax* obtenida de un paciente de la provincia de Guayas, en donde se observó reactividad hasta una dilución 1/64. (Figura N° 5).

Figura N° 5: Curva de sensibilidad para *P. vivax* en PDR.

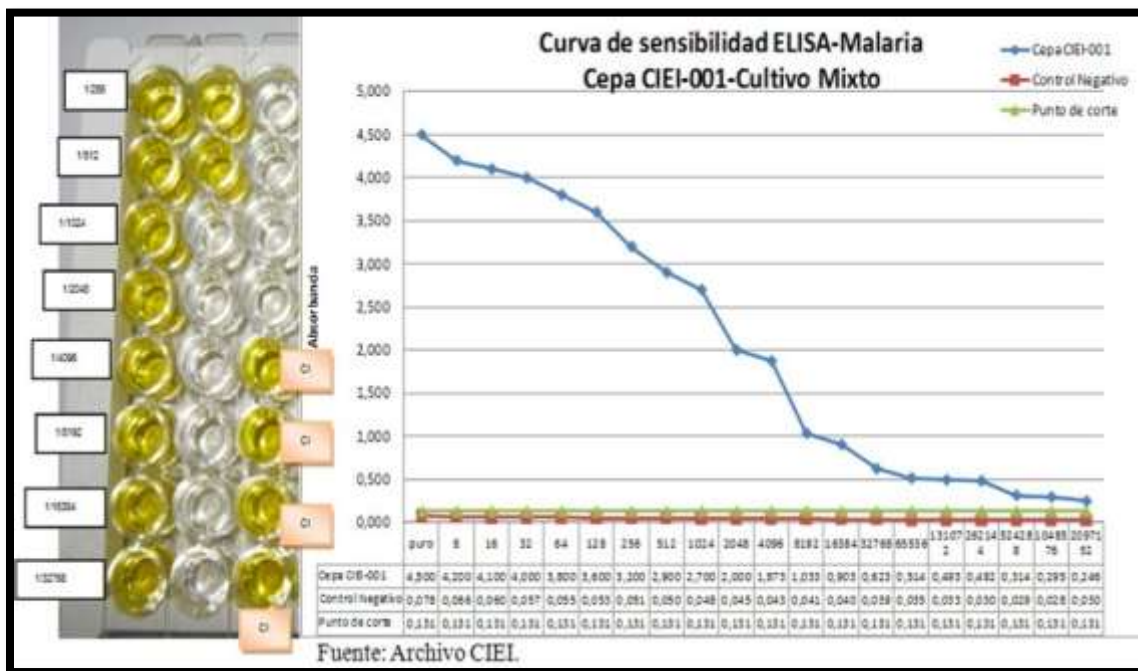


Fuente: Base datos CIEL.

La figura muestra las diluciones que se utilizó para realizar la curva de sensibilidad al igual que la última dilución en presentar reactividad.

Se realizó una curva de sensibilidad en la técnica de ELISA para *P. falciparum* utilizando una cepa positiva obtenida de cultivos disponibles en el CIEI. Se observó reactividad hasta una dilución 1/524288. (Figura N° 6).

Figura N° 6: Curva de sensibilidad para *P. falciparum* en ELISA.

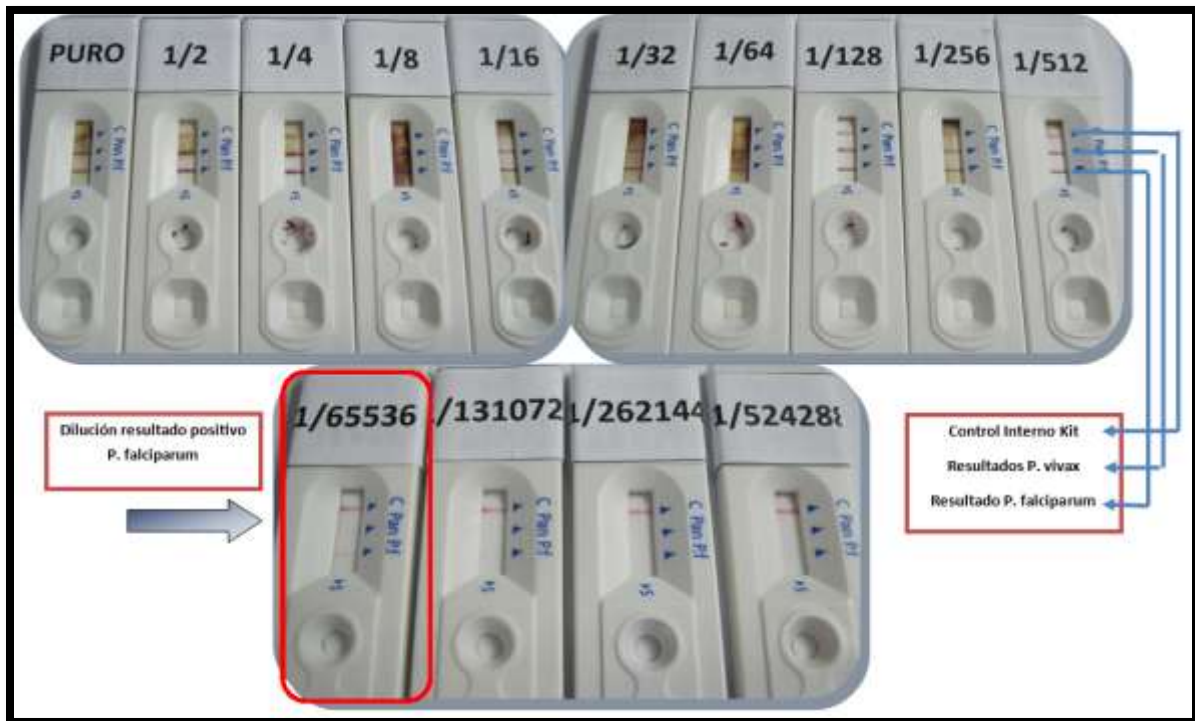


Fuente: Base datos CIEI

La figura muestra las diluciones que se realizaron en eje de las X y las absorbancias medidas en el eje de las Y, y la última dilución en presentar reactividad.

Se realizó una curva de sensibilidad para la PDR, utilizando la misma cepa de *P. falciparum* obtenida de cultivos disponibles en el CIEI, en donde se observó reactividad hasta una dilución 1/65536. (Figura N° 7).

Figura N° 7: Curva de sensibilidad para *P. falciparum* en PDR

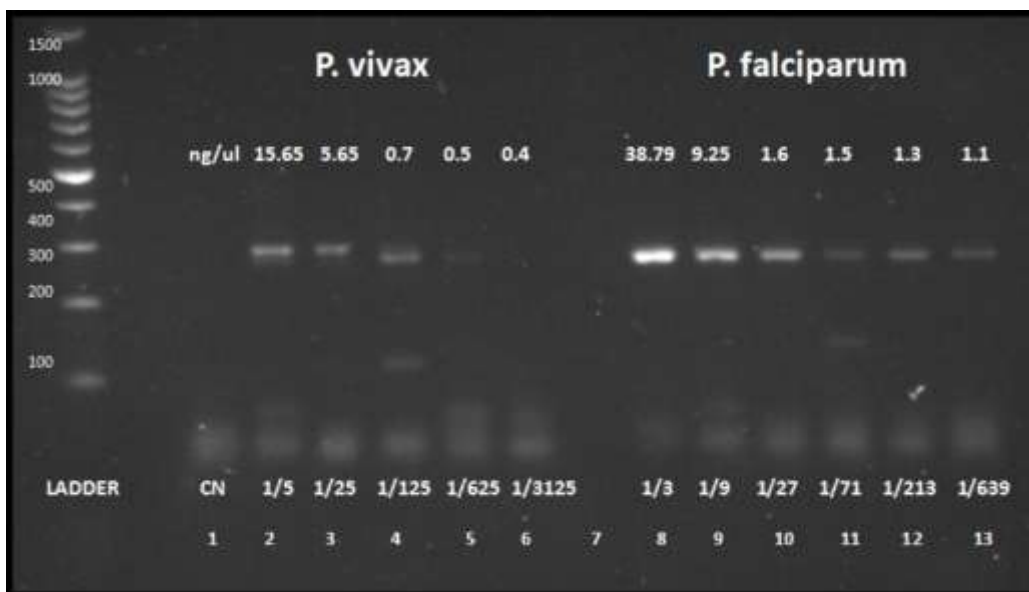


Fuente: Base datos CIEI

La figura muestra las diluciones que se utilizó para realizar la curva de sensibilidad al igual que la última dilución en presentar reactividad.

Se realizó la cuantificación de ADN tanto para *P. falciparum* como para *P. vivax*, utilizando el equipo Nanodrop ND100, encontrándose que la dilución más adecuada fue para *P. falciparum* 1:27 en la cual se encontró una cantidad de ADN de 1,6 ng/ul y para *P. vivax* la dilución más adecuada fue 1:125 con una cantidad de 0,7 ng/ul. (Figura N°10).

Figura N° 8: Gel de agarosa. Cuantificación de ADN *P. falciparum* y *P. vivax*



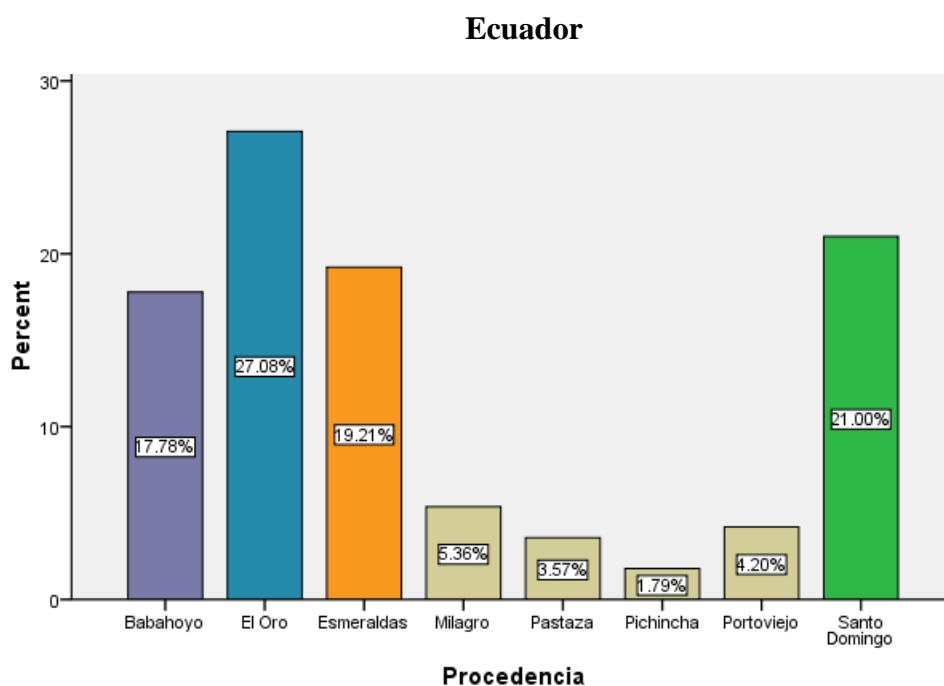
Fuente: Base datos CIEI

La figura muestra las diferentes diluciones realizadas y la cantidad de ADN presente en las especies de Plasmodium disponibles en el CIEI y utilizadas como controles en el estudio.

Se analizó un total de 1120 muestras de donantes provenientes de 8 provincias de Ecuador, 7 de las cuales son consideradas endémicas para malaria y una no endémica, esta última constituye la región en la que se centralizaran el tamizaje serológico. 30 fueron eliminadas por encontrarse hemolizadas.

La distribución de la población fue estratificada de acuerdo al número de donantes recolectados y la prevalencia de la enfermedad (Figura N° 9).

Figura N° 9: Distribución de la población de estudio por provincias.



Fuente: Base de datos CIEI-2011.

La figura muestra los porcentajes de la población en cada una de las provincias que intervinieron en el estudio.

Dentro del análisis de la frecuencia de muestras se encontró que las provincias de El Oro, Esmeraldas, Babahoyo y Santo Domingo son las que poseen menor número de donantes anuales pero mayor índice endémico de malaria de acuerdo a los reportes del MSP del 2011. (Tabla N° 7).

Tabla N° 7: Total de muestras analizadas

	Frecuencia	Porcentaje
Babahoyo	199	17.8
El Oro	303	27.1
Esmeraldas	215	19.2
Milagro	60	5.4
Pastaza	40	3.6
Pichincha	20	1.8
Portoviejo	47	4.2
Santo Domingo	236	21.0
Total	1120	100.0

Fuente: Base de datos CIEI

El mayor porcentaje de muestras se recolectaron a nivel de la provincia de El Oro y Santo Domingo por ser las que presentan una mayor prevalencia de malaria.

Se realizó la correlación entre los resultados obtenidos de ELISA vs el Lugar de procedencia encontrándose que existe un mayor porcentaje en las provincias reportadas con mayor índice endémico (Tabla N° 8).

Tabla N° 8. Correlación entre los resultados obtenidos en ELISA vs lugar de procedencia

		ELISA		Total
		Negativo	Reactivo	
Procedencia	Babahoyo	197 18.1%	2 6.5%	199 17.8%
	El Oro	291 26.7%	12 38.7%	303 27.1%
	Esmeraldas	208 19.1%	7 22.6%	215 19.2%
	Milagro	60 5.5%	0 .0%	60 5.4%
	Pastaza	33 3.0%	7 22.6%	40 3.6%
	Pichincha	20 1.8%	0 .0%	20 1.8%
	Portoviejo	47 4.3%	0 .0%	47 4.2%
	Santo Domingo	233 21.3%	3 9.7%	236 21.0%
	Total	1089 100.0%	31 100.0%	1120 100.0%

Fuente: Base de datos CIEI

La tabla muestra la relación entre muestras positivas para malaria y la procedencia, encontrándose que las provincias de El Oro, Esmeraldas y Pastaza presentan un mayor porcentaje, sin embargo esta relación no es significativa $p=0,867$. El total de donantes asintomáticos que presentan reactividad en la prueba de EIA fueron 31.

También se analizó la correlación entre las pruebas de ELISA y las pruebas inmunocromatográficas (Pruebas Rápidas), determinándose que no existe ninguna relación; de hecho únicamente se obtuvo un resultado dudoso a nivel de las pruebas rápidas mientras que se obtuvo 31 resultados reactivos en la pruebas de ELISA. (Tabla N° 9)

**Tabla N° 9. Correlación entre la prueba de ELISA
vs prueba rápida**

	ELISA		Total
	Negativo	Reactivo	
Prueba Rápida Dudoso	1	0	1
Negativo	1088	31	1118
Total	1089	31	1120

Fuente. Base de datos CIEI.

No existe correlación entre los resultados de ELISA y Prueba Rápida.

Al realizar las pruebas del Chi cuadrado se establece un $p= 0.567$, por lo que se acepta la hipótesis nula que establece que con un 95% de confianza y un 5% de error alfa al de que no existe correlación de resultados entre la prueba rápida inmunocromatográfica y el ELISA.

Tabla N° 10
Chi-Cuadrado

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	1.134 ^a	2	.567
Likelihood Ratio	1.779	2	.411
Linear-by-Linear Association	.977	1	.323
N of Valid Cases	40		

Fuente: Base de datos CIEI.

**Únicamente 2 (6,45%) de la muestras fueron positivas en PCR.*

Para establecer si los resultados reactivos obtenidos en ELISA correspondían a donantes asintomáticos e infectados se realizaron pruebas de PCR para determinar la presencia del ADN del parásito de malaria, encontrándose que dos muestras fueron positivas para el ADN del *Plasmodium vivax*. Estas muestras fueron enviadas desde Pastaza (Tabla N° 10).

Tabla N° 11. Resultados obtenidos

ELISA vs PCR.

		Resultados de PCR		Total
		Positivo	Negativo	
Resultados de EIA	Reactivo	2	24	26
	Dudoso	0	5	5
	Contaminado	0	9	9
Total		2	38	40

Fuente: Base datos CIEI.

La tabla muestra los resultados obtenidos entre ELISA vs la técnica molecular PCR.

También se analizó la correlación entre las pruebas de ELISA y la PCR, determinándose que no existe ninguna relación. (Tabla N° 12)

Tabla N° 12: Correlación entre ELISA vs PCR.

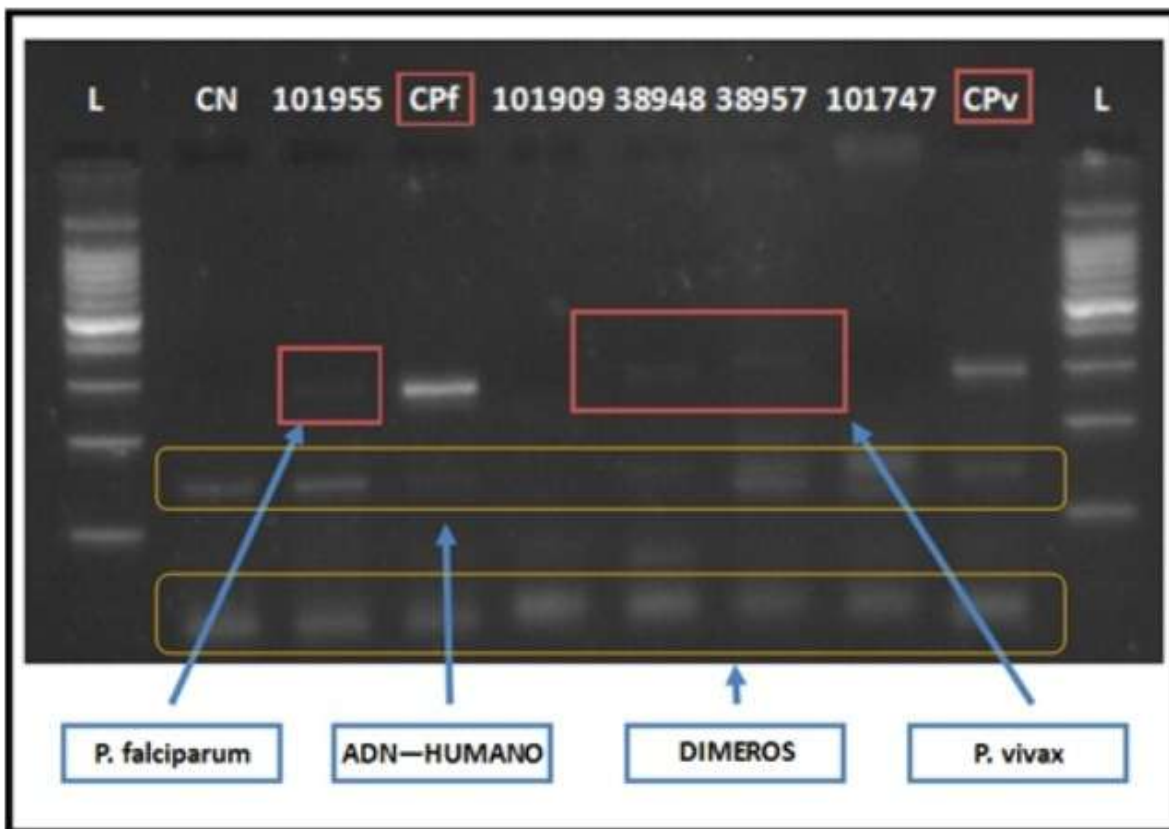
		Resultados de EIA	Resultados de PCR
Resultados de EIA	Pearson Correlation	1	.158
	Sig. (2-tailed)		.329
	N	1120	40
Resultados de PCR	Pearson Correlation	.158	1
	Sig. (2-tailed)	.329	
	N	40	40

Fuente: CIEI Base de datos

La tabla muestra un $p=0.329$ indicativo de que no existe correlación

El análisis de las muestras en la técnica molecular de PCR demostraron la presencia de la banda característica de *P. vivax* de 300 pb además se utilizaron control negativo, controles positivos provenientes de cepas de cultivos puros de los parásitos y un Ladder (L) de 1500 pb.

Figura N° 10: Gel de agarosa. Confirmación de muestras positivas en ELISA.



Fuente: Base de datos CIEI

*Se observa las dos muestras pertenecientes a la provincia de Pastaza (38948, 38957) que dieron verdaderamente positivas para el ADN de *P. vivax*.*

18. CONCLUSIONES.

- No existe una correlación entre los resultados obtenidos entre las pruebas rápidas y EIA, a pesar de ser consideradas sensibles y específicas.
- Existe la presencia de portadores sanos de malaria de acuerdo a los resultados encontrados en las pruebas de EIA de captura de antígenos, obteniéndose 2,76% (31) donantes reactivos.
- Se establece que las pruebas rápidas de captura de antígenos de malaria tiene poca sensibilidad de acuerdo a los resultados obtenidos en la curva de calibración y su correlación con las pruebas de EIA.
- De acuerdo a los análisis realizados las pruebas de EIA muestran una baja especificidad debido a la presencia de resultados falsos reactivos ya que el 93,4% de las 31 positivas en EIA fueron negativas en PCR.
- Las pruebas de PCR demostraron la presencia del ADN del Plasmodium vivax en 2 muestras (6,45%) de las 31 positivas en EIA. Lo que es indicativo de la probabilidad de transmisión de malaria si estos productos hubiesen sido utilizados en transfusiones sanguíneas.
- Debe considerarse la inmunidad adquirida en donantes asintomáticos que viven en zonas endémicas, la que puede neutralizar la presencia de los parásitos de malaria de tal manera que resulta difícil su detección a nivel de pruebas serológicas por la disminución en la cantidad circulante.

19. RECOMENDACIONES.

- Se debe enfatizar en la selección del donante, tomando muy en cuenta que la mejor herramienta para evitar transmisión de enfermedades infecciosas por vía sanguínea es realizar una buena entrevista, para esto se debe implementar nuevas estrategias que ayuden a la concientización de los posibles donantes. Para la aceptación de donantes provenientes o que residen en zonas endémicas debe seguirse las recomendaciones establecidas por los organismos regulares de cada país.
- Se recomienda seguir los parámetros de selección de donantes sugeridos por la OMS/OPS en su manual “Elegibilidad del donante” en caso de que las personas pertenezcan a zonas endémicas y no endémicas, el que manifiesta:

“Individuos que han viajado a zonas endémicas para malaria. AABB y CRS: Difieren hasta que se cumplan 12 meses de la partida del área endémica, siempre que no presente síntomas que no puedan explicarse por otra razón clínica.

Individuos procedentes de, o que han vivido por lo menos cinco años consecutivos en un país en que la malaria es considerada endémica. AABB y CRS: difieren a los donantes durante tres años luego de que partieran del área endémica.

CoE: las personas que han vivido en áreas endémicas dentro de sus primeros cinco años de vida pueden ser aceptadas como donantes después de seis meses de su última visita a la zona endémica, siempre y cuando los resultados de pruebas inmunológicas validadas o de biología molecular específicas resulten negativas” (OMS/OPS, 2009).

20. DISCUSIÓN.

En este estudio se compararon dos pruebas (ELISA y Prueba Rápida de captura de antígenos), también se utilizó la prueba molecular de PCR para determinar la presencia del ADN del parásito en aquellas muestras de donantes que fueron reactivas en una de las pruebas, en este caso todas las muestras que fueron detectadas en ELISA. Al igual que en Colombia en Ecuador se realizan pruebas de tamizaje únicamente a los donantes que viven o han permanecido en zonas endémicas de malaria. (Castillo, 2005) A partir del año 2009, se produjo la centralización del tamizaje a nivel del Hemocentro Nacional de Cruz Roja Ecuatoriana localizado en Quito, región de la sierra, lugar donde se reciben los productos sanguíneos provenientes de zonas costeras y la Amazonía consideradas endémicas de malaria, es por esta situación que se realizan estudios para asegurar la inocuidad de los derivados sanguíneos en relación a agentes infecciosos, pues han demostrado que los “*parásitos son transmitidos de forma eficiente por la sangre*”. (Pereira BI, 2011)

La prueba rápida utilizada en este estudio no detectó la presencia de los parásitos en sangre ya que todos los resultados fueron negativos, este resultado de acuerdo a las sugerencias dadas en el artículo publicado por Gillet, 2011 puede deberse a varias explicaciones una de ellas constituye el efecto prozona debido a la densidad parasitaria que presenta la muestra generalmente superior a 8% (Philippe Gillet, 2011), podría haber ocurrido en las dos muestras que fueron positivas en PCR; también puede deberse al secuestro capilar de parásitos durante la migración en la nitrocelulosa que compone el cassette de la prueba rápida o variaciones en la producción de antígenos; sin embargo este efecto no está bien claro; en contraste en el estudio de Arróspide et al, de Perú, afirman que la prueba rápida puede ser usada en el tamizaje de *Plasmodium falciparum* en bancos de sangre, por la

sensibilidad de un 98% y especificidad de 100%, a pesar de reportarse la presencia de resultados falsos positivos y negativos. (Arróspide N. , 2004) (Arróspide Nancy F. R., 2006)

Las pruebas de ELISA que detectan la proteína HRP-2 son consideradas de alta sensibilidad para la detección de *P. falciparum* de acuerdo al estudio realizado por *Noedl H et al, 2006*, obtuvo un valor predictivo positivo del 100% y un valor predictivo negativo del 99,8%, lo que le permitió recomendar como una prueba de alta confiabilidad, sin embargo el autor sugiere que esta prueba a pesar de su alta sensibilidad, especificidad y lo conveniente del procedimiento cuando se manipula un número grande de muestras su aplicación debe ser cuidadosamente considerada a nivel del tamizaje en bancos de sangre (Noedl H, 2006) . El ELISA utilizado en la presente tesis detectaba la enzima lactato deshidrogenasa (pLDH) enzima producida por las cuatro especies de *Plasmodium spp.* (Seed, 2005) y por constituir la enzima que se expresa mayormente durante los estadios eritrocitarios del parásito (Esthela, 2007), por lo que facilitaría el diagnóstico en donantes asintomáticos.

Las pruebas serológicas son utilizadas especialmente en laboratorios con poca experiencia o en zonas no endémicas, lugares donde el diagnóstico microscópico no se lo lleva a cabo (Turrientes Ma Carmen, 2000); en efecto a nivel de la ciudad de Quito no constituía una prueba obligatoria, sin embargo hoy en día con la centralización del tamizaje, la migración y nuevos perfiles endémicos constituye una nueva necesidad. Sin embargo, todas estas pruebas no presentan la efectividad y eficacia deseada por el banco de sangre así las pruebas de captura de antígenos son consideradas poco sensibles y la de anticuerpos puede indicar una exposición previa pero no activa (Kitchen AD, 2006) de igual manera la prueba

de PCR es costosa y no está disponible en todos los países endémicos a pesar de ser una de las mejores alternativas.

Se recomienda que las estrategias de tamizaje no solamente incluyan una prueba de alta sensibilidad y buena especificidad a nivel inmunológico o molecular, sino desde la selección del donante ya que con el interrogatorio inicial realizado a los posibles donantes, se podrá reducir el riesgo. (Kitchen AD, 2006), estas afirmaciones realizadas por el autor *Kitchen et al*, en 2006 concuerda con los resultados obtenidos en esta investigación la cual concluye que además de la falta de concordancia entre las pruebas, que ninguna de las ellas sea implementada en el tamizaje de donantes de sangre.

Otro aspecto a ser considerado constituye, el desperdicio de sangre y sus derivados que puede ocasionar el introducir una metodología inadecuada puede influenciar en la introducción de errores tanto técnicos como humanos en el tamizaje de donantes al aportar resultados falsos positivos y negativos, sin embargo debe considerarse que algunas unidades sí podrían estar contaminadas, el problema se centra en la cantidad de parásitos presentes en una unidad sanguínea que se estima esta entre 1 a 10 parásitos suficientes para su transmisión a través de una transfusiones, pero escasos para la detección a través del método de tamizaje más sensible e incluso el molecular PCR. (Clive R, 2005)

Del estudio realizado por *Clive et al*, 2005 mencionan que los donantes implicados en la transmisión de malaria a través de sangre contaminada con parasitemia baja son los “semi-inmunes” cuya detección en laboratorio fue infructuosa. (Clive R, 2005). El autor también menciona que la “*detección selectiva de donantes con riesgo*” constituye la mejor estrategia para evitar la transmisión como evidencia enfatiza que no existen casos documentados de malaria en Francia del 1983 al 2002.

Como mencionan los autores las pruebas de tamizaje no ofrecen los resultados más seguros pues van a depender de los antígenos /anticuerpos fabricados para su detección utilizados en los reactivos comerciales y especialmente de la inmunidad de los donantes. Los resultados de este estudio determinan que existe un 93% de donantes falsos positivos ya que únicamente se confirmaron 2 de las 31 muestras reactivas en ELISA. Por tanto, la introducción de una prueba de detección de malaria en el tamizaje puede o no aumentar la seguridad de las donaciones de sangre.

21. ANEXOS

21.1 Anexo N° 1: Inseto Técnica ELISA (SD Malaria Antigen ELISA).

Enzyme Immunoassay for the detection of Malaria antigen

SD Malaria Antigen ELISA

Explanation of the test
 (Introduction) Malaria is a serious, sometimes fatal, parasitic disease characterized by fever, chills, and anemia and is caused by a parasite that is transmitted from one human to another by the bite of infected Anopheles mosquitoes. There are four kinds of malaria that can infect humans: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, and *P. malariae*. In humans, the parasite (called sporozoites) migrates to the liver where they mature and release another form, the merozoites. The disease is a major health problem in much of the tropics and subtropics. More than 200 million people in the world have malaria. At the present, malaria is diagnosed by looking for the parasite in a drop of blood. Blood will be put onto a microscope slide and smeared so that the parasites will be visible under a microscope. The SD Malaria antigen ELISA is suitable for the detection of all infection species in a blood sample, indicating presence or absence of *Plasmodium sp.* (all species: *P. vivax*, *P. ovale*, and *P. malariae*).
 (Test Principle) The SD Malaria Antigen ELISA is a enzyme-linked immunosorbent assay for the qualitative detection of Malaria Plasmodium sp. antigen in human whole blood. The SD Malaria Antigen ELISA contains two microplates. One is uncoated for IgG of whole blood, the other is pre-coated with mouse Plasmodium lactate dehydrogenase (LDH) antibody on well.
 After IgG reaction of whole blood, LDH in patient whole blood is bound to mouse antibodies directed against isoforms of the enzyme on well and is bound to the mouse IgG antibodies directed against isoforms of the enzyme conjugate, by forming a "sandwich" during test incubation (30 minutes). Following this incubation, all unbound materials are removed by aspiration and washing. The residual enzyme activity found in the wells will thus be directly proportional to the pLDH concentration in patient whole blood and measured by measuring the color change with a substrate solution (working TMB). Colorimetric reading will be performed by using a spectrophotometer at 450 nm.

Intended Use, Purpose
 The SD Malaria Antigen ELISA kit is a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the qualitative detection of the presence of Plasmodium lactate dehydrogenase (LDH), an enzyme produced both in the asexual and sexual forms of parasite. SD Malaria Antigen ELISA kit is intended for professional use, as well as on the diagnosis of malaria infection. The positive sample whose value is greater than cut-off, should always be verified using a confirmatory test such as microscopic examination of the blood smear. This kit is for in-vitro diagnostic use only.

Active ingredients of materials and reagent provided

1. Coated microplate (5x12)	Concentration
One coated microplate well including: Mouse antibodies pan specific to pLDH of Malaria Plasmodium species. (antibody component)	Coupling conc: 0.96 x 0.18 µg/well
2. Uncoated microplate (5x12)	Concentration
One uncoated microplate well	
3. Enzyme conjugate (α 101 concentrated) (5x12)	Concentration
Goat anti mouse IgG pan specific to pLDH conjugated to horseradish peroxidase (as main component)	200 µg/ml
Thimerosal	0.01%
4. Lysis buffer (5x12)	Concentration
Iron N 100	2%
Tris	0.1%
Thimerosal	0.01%
5. Working TMB (5x12)	Concentration
Hydrogen peroxide	3%
Hydrochloric acid (HCl)	3%
6. Washing solution (α 10 concentrated) (5x12)	Concentration
Hydrochloric acid	2%
Tris	0.01%
Thimerosal	0.01%
7. Stopping solution (5x12)	Concentration
Hydrochloric acid	1%
8. Positive control (5x12)	Concentration
Recombinant pLDH (as main component)	1,600 ng/ml
Thimerosal	0.01%
9. Negative control (5x12)	Concentration
Normal human serum	0%
Thimerosal	0.01%

Material / reagent	Remark	Packaging Unit	
		5x12 Well	480 Well
Coated Microplate	96 wells/plate of each microwell (well) apart strips coated with mouse antibodies pan specific to pLDH. Keep uncoated wells at 2-8°C in the aluminum bag provided and sealed aseptically.	1 plate	5 plates
Uncoated microplate	96 wells/plate, to make a lysate of the red blood cell in whole blood.	1 plate	5 plates
Enzyme conjugate (α 101 concentrated)	Goat anti mouse IgG pan specific to pLDH conjugated to horseradish peroxidase (HRP) in HSA, ELISA and stabilizers. Preservative: Thimerosal (0.01%) Store uncoated enzyme conjugate at 2-8°C.	1 vial (0.4 ml vial)	1 vial (2 ml vial)
Lysis buffer	To make working conjugate and lysis of whole blood. Store uncoated lysis buffer at 2-8°C.	1 vial (30 ml vial)	2 vials (75 ml vial)
Working TMB	Hydrogen peroxide Tetraaminoethylenediamine (TMB)	1 vial (15 ml vial)	1 vial (75 ml vial)
Washing solution (α 10 concentrated)	RES-Stopbar 20. Store uncoated washing solution at 2-8°C.	1 vial (50 ml vial)	2 vials (100 ml vial)
Stopping solution	1 N Hydrochloric acid. Ready for use. Store stopping solution at 2-8°C.	1 vial (20 ml vial)	1 vial (100 ml vial)
Positive control	Human serum including recombinant pLDH. Preservative: Thimerosal (0.01%). Ready for use. Store uncoated positive control at 2-8°C.	1 vial (0.5 ml vial)	1 vial (2 ml vial)
Negative control	Normal human serum. Preservative: Thimerosal (0.01%). Ready for use. Store uncoated positive control at 2-8°C.	1 vial (0.5 ml vial)	1 vial (2 ml vial)
Adhesive plate sealer instructions for use			

Materials required but not provided

1. Precision micropipette and disposable tips
2. Waste disposal container with suitable filter disinfectant
3. Adhesive plate sealer (optional) or suitable equipment for washing 96-well plates
4. A spectrophotometer or ELISA plate reader able to read a 560 microplate plate of 8 microwell strips at an absorbance at 450 nm with an inference of 0.01 (optional)
5. Incubator capable of maintaining temperatures at 37 ± 1°C

Preparation, Storage and Re-use of kit components to ensure optimal kit performance it is important that uncoated kit components are stored according to the following instructions:

1. Coated microplate: Open the plate by cutting along the seal. Break off the required number of microwells and relocate them into the frame. Discard all unused microwells and strips the reusable plastic parts with the desiccant. Carefully reseal the pouch and store at 2-8°C. Microwells may be used for up to 6 weeks after initial opening, provided they are stored in this manner.
2. Enzyme conjugate: Provided 101 concentrate.
(Preparation of working enzyme conjugate)
Make 101 times dilution of enzyme conjugate (101x concentrated) with lysis buffer in a tube. (101x concentrated enzyme conjugate 0.2 ml x lysis buffer 20 ml). Prepare working conjugate as required on the day of use.
3. Washing solution: Provided 10 concentrated.
(Preparation of working washing solution)
Prior to use, take 50 ml of working solution (10x concentrated), and then fill up to 500 ml with distilled water. If undissolved crystals present in working solution, re-suspend the solution by placing the vial at 37°C for few minutes.

Precautions

1. In vitro diagnostic use. Enzyme performing an assay with this product must be trained in its use and must be experienced in laboratory procedures.
 - Safety precautions
 - The positive control contains recombinant plasmodium LDH which has been shown to be non-infectious in local suspension system. However, the positive and negative control must be handled and disposed of as though potentially infectious.
 - Stopping solution contains hydrochloric acid (1N). Avoid eye and skin contact by wearing protective clothing and eye protection.
 - Don't eat, drink, smoke, store or prepare food, or apply cosmetics within the designated work area.
 - Don't pipette materials by mouth.
 - Wear disposable gloves while handling clinical specimens and reagents. Always wash hands after working with infectious materials.
 - Observe all clinical specimens in accordance with local legislation.
 - SD Malaria Antigen ELISA reagents contain a properly anti-microbial agent which prevents non-hazard to the user if normal laboratory safety precautions are followed.
2. Technical precautions
 - Components must not be used after the expiry date printed on the labels. Do not mix or interchange different batches/lot numbers of reagents.
 - The reagents are provided at fixed working concentrations. Test performance will be affected if reagents are modified or stored under conditions other than those declared in Section 3.
 - Avoid contamination of reagents.
 - Observe all clinical specimens in duplicate (two) for each specimen, control or reagent in order to avoid cross contamination of other specimens, controls or reagents which could cause erroneous results.
 - Store desiccated or distilled water for dilution of concentrated reagent in clean containers.
 - Avoid contamination with metal ions and washing agents.
 - Protect working TMB from light.
 - Microwells cannot be reused.
 - Do not store obtained working washing solution for subsequent use. When not in use washing solution reagents should be stored in desiccated or distilled water and left to dry.
 - Manual or automated washing equipment and spectrophotometer or ELISA plate reader be correctly calibrated and maintained according to the manufacturer's instructions for use.
 - Working TMB and stopping solution should be handled with care. Avoid contact with skin, eyes and mucous membranes. In case of accident, rinse thoroughly with running water.

Specimen collection and storage

1. Collect the whole blood using the suitable anti-coagulant.
2. If specimens are not assayed immediately, they should be refrigerated at 2-8°C. If a storage period is greater than three days, freezing is recommended.
3. When whole blood specimens have been stored at 2-8°C, they should be used within three days. If specimens have been kept more than three days, they can cause non-specific results.
4. Specimens should be brought to room temperature prior to use.
5. Anticoagulants such as heparin, EDTA, and citrate do not affect the test result.

Assay procedure

General

1. Refer to section "Precautions" 2. Technical precautions, before performing test procedure.
2. Reagents and specimens should be brought to room temperature (15-30°C) before use.
3. Both reagents and specimens are added to the microwells using a precision pipette.

Test procedure

1. Prepare the coated microwells, and other components (including uncoated plate), and place them at room temperature.
2. Prepare working enzyme conjugate (Refer to section "Preparation, Storage and Re-use of kit components") 2.5x enzyme conjugate
3. Set up the strip of microwells in a microplate frame in order.
4. Pipette 200 µl of working enzyme conjugate into each well of positive control.
5. Add 50 µl of negative control or 2 wells, positive control into 2 wells and whole blood samples into each remaining well. Add then, one well using pipette tip or washing mixer. (This process is the first step of red blood cell in the specimen)
6. Incubate the microplate in room temperature (15-32°C) for 15 - 30 minutes.
7. Take 100 µl of above mixed solution in the uncoated microplate and then transfer into each well of the coated microplate.
8. Cover the microplate with adhesive plate sealer and incubate the wells at 37 ± 1°C for 90 minutes.
9. Wash the wells 5 times with 350 µl of diluted washing solution, going at least 10 seconds soak time for each wash and aspirate all liquid from the wells. (Before use, take one well (50ml) content of washing solution, and then fill up to 1000ml with distilled water). Do. Wash each well 5 times with diluted Washing Solution using an automatic washer.

9.1. Washing procedure

- a. Automated washer
 1. Completely aspirate all well.
 2. Fill all well (350 µl) of diluted Washing Solution during wash cycle.
 3. On completion of 5 washes, invert plate and tap firmly on absorbent paper towel to ensure all Washing Solution is removed.
- b. Manual washing
 1. Discard contents of plate in appropriate waste container.
 2. Fill wells with diluted Washing Solution. Avoid bubbling of Washing Solution on this may reduce wash efficiency. Discard Washing Solution from wells immediately.
 3. Repeat step 2 another four times. This will make a total of five washes with Washing Solution.
 4. After the final wash, discard contents of wells and tap the plate on absorbent paper towel to ensure all Washing Solution is removed.

10. Pipette 100 µl of working TMB into each well.
11. Cover the microplate with adhesive plate sealer and incubate the wells for 10 minutes at room temperature (15-32°C).
12. Pipette 100 µl of stopping solution into each well.
13. Read the absorbance of the wells with a calibrated spectrophotometer at 450 nm with reference wavelength at 420 nm. Reading must be completed within 30 minutes from the end of the assay.

Interpretation of results (Photometric reading)

1. Internal Assay Validation
 - The individual values of the absorbance for the control are used to calculate the mean value if $0.095 \leq \text{Avg} \leq 0.150$
 - $\Delta \text{Opt} \geq 1.500$
 - If one of the absorbance values of negative control is outside the specification, this value can be neglected.
 - Both absorbance values of the positive control must comply with the specification.
 - If these specifications are not met, the test is regarded as invalid.
2. Calculation of the cut-off
 - Calculate the mean absorbance of the negative controls, then calculate the cut-off value by adding 0.500.
 - $\text{Avg} \pm 0.050 = \text{cut-off value}$

Based on the criteria of the test, the samples are classified as follows:

Test results:

- LA (sample) < cut-off: Malaria antigen negative
- LA (sample) > cut-off: Malaria antigen positive

Samples with a test result, which is equal to or greater than the cut-off value, should first be retested in duplicate. If, on the retest, the mean absorbance is again equal to or greater than the cut-off, each sample should always be verified using a confirmatory test.

Performance Limitations

1. A negative result does not exclude the possibility of malaria infection in the patient. Failure to detect malaria pLDH may be a result of factors such as enzyme sampling and/or handling of the specimens. Also, failure to add reagents in the procedure could result in a falsely negative test. Repeating test should be considered for the suspicious samples of clinical infection.
2. SD Malaria Antigen ELISA test detect Plasmodium sp. specific LDH present in human blood specimen. The test can not be used to differentiate between Plasmodium sp. And thus is useful as a screening procedure.
3. All reagents are provided at fixed concentrations. Test performance may be adversely affected if reagents are modified or incorrectly stored.
4. The use is limited to the detection of antigen to Malaria Plasmodium sp. Although the test is very accurate in detecting pLDH, in low incidence of false results can occur. Other clinically available tests are required if questionable results are obtained. As with all diagnostic tests, a definitive clinical diagnosis should not be based on the results of a single test, but should only be made by the physician after all clinical and laboratory findings have been evaluated.

Kit storage and stability

1. Store at 2-8°C. This kit is stable through the expiration date printed in the package and in the label of each material / reagent or component.
2. Stability of cross opened materials / reagents

Material / reagent	State	Storage	Stability
Coated Microplate	Once opened	2-8°C, sealed	1 month
Enzyme conjugate	Once opened	2-8°C	1 month
Working conjugate	Once opened	2-8°C	1 day (1)
Negative Control	Once opened	2-8°C	3 months
Positive Control	Once opened	2-8°C	1 month
Working TMB	Once opened	2-8°C, shield container, protected from light	3 months
Washing solution	Once opened	2-8°C	Expiry date
Working Washing solution	Once opened	2-8°C/ Room temp	1 month/ 6 days
Stopping solution	Once opened	Room temp	Expiry date

(1) Within 30 minutes pipette 200 µl into the assay plate.
 (Note: If mixed working conjugate are not used immediately, they should be refrigerated at 2-8°C. They can be used within 1 day at 2-8°C.)

Expected values
 SD Malaria Antigen ELISA has been compared with microscopic examination. The overall accuracy is greater or equal to 90%.

Performance characteristics studies
 (Clinical Performance studies)
 The SD Malaria Antigen ELISA has tested with positive and negative clinical samples tested by microscopic examination of whole blood.

1. Malaria P-V evaluation results

SD Malaria Antigen ELISA	P-V positive confirmed specimens		Sensitivity
	Positive	Negative	
98	4	96/100 = 100% = 96%	
2. Malaria P-I evaluation results

SD Malaria Antigen ELISA	P-I positive confirmed specimens		Sensitivity
	Positive	Negative	
98	2	98/100 = 100% = 98%	
3. Malaria negative normal human specimen evaluation results

SD Malaria Antigen ELISA	Malaria-negative human specimens		Sensitivity
	Positive	Negative	
0	200	200/200 = 100% = 100%	

(Precision)
 Within-run, between-run and batch to batch precision have been determined by the testing 9 replicates of three specimens: a low positive, a medium positive and a strong positive. The CV (%) of low positive, medium positive and strong positive values were within 15% of the mean.

(Interferences & Cross reactivity studies)



1. None of the substances interfered in the assay at the blood containing common interfering like tested.
2. SD Malaria Antigen ELISA test showed no cross reactivity with other species antigen (LDH like toxoplasma LDH as well as human LDH).

Bibliography of suggested reading

1. Linton K, Bantz, Frederique Marquet, Michael M. Muller, and Jacques Le Gros.: Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax: Lactate Dehydrogenase Activity and Application for in vitro Drug Susceptibility Assay. Experimental Parasitology 80, 260-271 (1995)
2. Jarraud S, Al-Sher, Paronon R, Hien, and Suthi A: Malaria: Comparison of the Qx-MPL Test with PCR for Diagnosis of Malaria in Intermittent. New England J. Med. 1999; 341: 3544-3546
3. Robert Piper, Jacques Le Gros, Laura Wernworth, Angèle Huet-Goetz, Sandie House, Peter Chiodo, and Michael Muller.: Immunoenzyme Diagnostic Assays for Malaria Using Plasmodium Lactate Dehydrogenase (pLDH). Am. J. Trop. Med. Hyg. 62(1): 399-401, 1999
4. Jarraud S, Al-Sher, Paronon R, Hien, and Suthi A: Malaria: Diagnosis of Imported Malaria by Plasmodium Lactate Dehydrogenase (pLDH) and Histidine-Rich Protein 2 (HRP2)-Based Immunoenzyme Assays. Am. J. Trop. Med. Hyg. 64(1): 23-29(1), pp. 20-23.
5. David L. Vander Juyt, Lucy A. Hamaker and John L. Hetch: Partial Purification and Characterization of Lactate Dehydrogenase from Plasmodium falciparum. Molecular and Biochemical Parasitology 4 (1981) 355-364.

Disclaimer:
 Whilst every precaution has been taken to ensure the diagnostic ability and accuracy of this product, the product is used outside of the control of the Manufacturer and Distributor and the result may accordingly be affected by environmental factors and / or user error. A person who is the subject of the diagnosis should consult a doctor for further confirmation of the result.

Warning:
 The Manufacturer and Distributor of this product shall not be liable for any losses, liabilities, claims, costs or damages whether direct or indirect or consequential arising out of or related to an incorrect diagnosis, whether positive or negative, in the use of this product.





STANDARD DIAGNOSTICS, INC.
 15440 Ring Road, Chesham, Virginia 20159, USA
 Tel: +1-703-541-7171 Fax: +1-703-541-7171 www.standarddiagnostics.com


Authorized Representative:
NT Premed Consulting GmbH
 Althausstrasse 21 D-34484 PL Bight Germany
 Phone: +49 5695 08110 Fax: +49 5695 34121

21.2 Anexo N° 2: Inserto Técnica Prueba Rápida (Malaria Total Quick Test).

Code: 345 Malaria Total Quick Test
25 Individual poached cassettes
1 vial of assay diluent
25 capillary sample loops (5 µl)
25 sterile swabs
25 sterile lancets



**CYPRESS
DIAGNOSTICS**



Malaria Total Quick Test

For the qualitative detection of *Plasmodium falciparum* (P.f.), *Plasmodium vivax* (P.v.), *Plasmodium malariae* (P.m.) and *Plasmodium ovale* (P.o.) antigens in whole blood.

Intended use:
 The Cypress Diagnostics Malaria cassette test is a rapid, in vitro diagnostic test for the detection of circulating *Plasmodium falciparum* antigen (HRP-II) and an antigen (lactate dehydrogenase) that is common to all four species of malaria, *Plasmodium falciparum* (P.f.), *Plasmodium vivax* (P.v.), *Plasmodium malariae* (P.m.) and *Plasmodium ovale* (P.o.) in whole blood. This kit is intended for professional use, as an initial screening test and reactive samples should be confirmed by a supplemental assay such as microscopic examination of thin blood smear.

Test principle:
 Cypress Diagnostics Malaria Total Quick Test contains a membrane strip, which is pre-coated with a mouse monoclonal antibody and a mouse polyclonal antibody as two separate lines across a test strip. The monoclonal antibody (test line P.f.) is specific to the HRP-II of P.f. and the other polyclonal antibody (test line Pan) is pan specific to the lactate dehydrogenase of *Plasmodium* species P.f., P.v., P.m. and P.o. When a positive sample is applied, the antibodies on the test membrane will react specifically with the Malaria antigens present in the sample causing a direct sandwich reaction in the complex of membrane-antibody-antigen-conjugated-antibody. The formed complex results in the appearance of a colored test line. The control line (goat anti-mouse IgG) is used for procedural control. Control line should always appear if the test procedure is performed properly and the reagents are working correctly.

Storage:
 The Malaria test kit cassettes should be stored at room temperature between 8° and 40° C. Diluent can be stored between 1 and 40° C. The test device is sensitive to humidity and heat. Be sure to use-pouch only the number of cassettes that will be immediately used. The test kit may be used until its expiration date, which can be found on the package label.

Materials Required but not included:
 Timer

Precautions and Warnings:


- Optimal results will be obtained by strict adherence to this protocol. Reagents must be added carefully to maintain precision and accuracy.
- Treat samples and used cassettes as biohazardous. Do not reuse cassettes.
- Biological contamination of dispensing equipment, containers or reagents can lead to false results. Observe established precautions against microbiological and serological hazards in specimen handling, disposal and throughout all procedures.
- Do not use kits beyond their expiration date. Keep storage boxes dry.
- Cassettes, diluent and samples must be at room temperature before running the assay.
- The assay diluent contains sodium azide as a preservative. Sodium azide is toxic and should, therefore, be handled carefully, avoiding ingestion or skin contact. It may react with lead or copper plumbing to form explosive metal azides. Flush with a liberal volume of water when disposing of unopened reagent.
- Do not mix reagents from different kit lots.
- Use separate disposable capillary pipettes or pipette tips for each sample in order to avoid cross-contamination.

Specimen Collection:

A) To obtain capillary blood via puncture of a finger, clean the area with a sterile swab. Squeeze the end of the fingertip and puncture the skin with a sterile lancet. Wipe away the first drop of blood with sterile gauze or cotton. Take a 5 µl sample loop provided. Dip the circular end of the loop into the blood sample and carefully place the circular end of the loop into the round sample well of the test cassette.

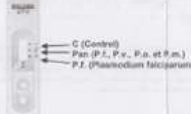
B) Collect venous blood, by the standard venipuncture procedure, into a collection tube (containing EDTA, sodium citrate or heparin). If the test cannot be performed immediately, the blood may be stored for up to three days at 2°C - 8°C or at -20°C if a longer storage period is required. Longer storage time at 2-8°C can cause non-specific reactions. A testing of the sample after a storage of more than 3 days can cause non-specific reactions.

Test Procedure:



1. Ensure all test components warm to room temperature prior to use. Just prior to use, remove the cassette from foil pouch. Lay the cassette flat on the work surface.
2. Prick the finger with the lancet and transfer 5 µl of blood into the round sample well of the test cassette using a sample loop provided.
3. Add 4 drops of assay diluent into square-shaped diluent well.
4. Wait a minimum of 15 minutes (up to 20 minutes) and read the results. Don't read test results after 30 minutes; this can give false results.

Results Interpretation:
 This cassette contains two test result lines: A test line that solely detects Malaria P.f. (line P.f.) and a test line that detects all four Malaria *Plasmodium* species: P.f., P.v., P.m. and P.o. (line Pan). A positive result is indicated when any visible line forms in the result window next to the P.f. or Pan zone together with a line in the C zone.



***Plasmodium falciparum* detection:**

1. A visible test line on the strip located in the P.f. zone indicates a positive result for *Plasmodium falciparum*. The control line must also be present.
2. A visible test line on the strip located in the P.f. zone and the Pan zone indicates a positive test result for *Plasmodium falciparum*. The control line must also be present.

***Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* or *Plasmodium malariae* detection:**
 A visible test line on the device only located in the Pan zone indicates a positive test result for *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* or *Plasmodium malariae*. The test cannot distinguish between these three malaria subtypes. The control line must also be present.

Mixed infection:
 A visible test line on the strip located in the P.f. zone and the Pan zone may indicate mixed infection of P.f. and P.v. (or P.m., P.o.).

Negative:
 The test is negative if only the Control line appears.

Invalid:
 The test is invalid if the Control line does not appear whether or not a Test line is present. If this occurs, the test should be repeated using a new cassette.

Quality control:

- Cypress Diagnostic Malaria Total test includes a procedural control. A control line appearing in the control area indicates proper performance and reactive reagents.
- Good laboratory practice includes the use of external control to ensure proper kit performance.

Limitations of Procedure:

- This test kit detects P.f. HRP-II and/or Pan specific pLDH in patient whole blood and is useful as a screening procedure of malaria diagnosis. Inactive samples should be confirmed by a supplemental assay such as microscopic examination of thin blood smear.
- The test is limited to the detection of antigen to Malaria *Plasmodium* species. Although the test is very accurate in detecting HRP-II of P. falciparum and pLDH of *Plasmodium* species (P.f., P.v., P.o. and P.m.), a low incidence of false results can occur. Other clinically available tests are required if questionable results are obtained. As with all diagnostic tests, a definitive clinical diagnosis should not be based on the results of a single test, but should only be made by the physician after all clinical and laboratory findings have been evaluated.
- P.f. HRP-II line may remain positive for up to 2 weeks following treatment and parasite clearance as confirmed by microscope. Pan line will become negative within days of successful treatment.
- As known relevant interfering specimens, haemolytic samples, rheumatoid factor-containing samples and lipemic, icteric samples can impair the test results.

Performance characteristics:

- In a comparison of the Cypress Diagnostics' Malaria Total Quick Test versus microscopic examination, the results gave sensitivity of 99.7% (P.f.) and 95.5% (Pan), a specificity of 99.5%, and total agreement of 98.5%.

	Sensitivity		Specificity
	Malaria P.f.	Malaria Pan	
Cypress Malaria Total Quick Test	99.7% (367/368)	95.5% (150/111)	98.5% (193/200)

- Detection of malaria (P.f. and non P.f.) according to the level of parasitemia: From more than 50 parasites/µl blood → 100% (P.f.) and minimal 90% (Pan) detectable. From more than 100 parasites/µl blood → 100% (P.f.) and minimal 90% (Pan) detectable. From more than 500 parasites/µl blood → 100% (P.f. and Pan) detectable.

Bibliography:

1. Leonardi K, Basco et al, *Experimental Parasitology* 86, 260-271 (1995)
2. David J, Vannier Agg et al, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 4 (1981) 255-264
3. David J, Beck et al., *Malaria and Biochemical Parasitology*, 01(1973) 135-144
4. Harati Nard et al, *Antimicrobials agents and chemotherapy*, 46 (2002) 1658-1664
 Langdorp, 04.2019

www.diagnostics.be

Langdorpsteenweg 160 • 3201 Langdorp • Belgium • Tel: ++ 32 16 44 63 89 • Fax: ++ 32 16 44 77 62 • e-mail: cypress@diagnostics.be

21.3 Anexo N° 3: Protocolo extracción de ADN.





ARMY MALARIA INSTITUTE

Document:	SOP No. DRD 025	Reference:	G:\ami\Groups\Quality Management\Drug Resistance & Diagnostics\SOPs\P3 SOPs\DRD 025 - Manual Isolation of Parasite DNA from Malaria Infected Blood.doc		
Subject:	Manual Isolation of Parasite DNA from Malaria Infected Blood	Revision:	2	Revision Date:	19 Jan 2014
Section:	DRD	Copy No.:	1 of 2	Page:	2 of 5
Author:	Dr Q. Cheng	Authorised by:	LTCOL M.D. Edstein (CO)		

- 4.7 10% saponin: dissolve 100 mg of saponin in 1 mL of DDW. It needs to be made once a week freshly.
- 4.8 6 M guanidine-HCl in 10 mM Tris, pH 8.0 and 1mM EDTA. (See SOP1)
- 4.9 Wizard Plus Minipreps DNA purification systems (Promega)
- 4.10 5% Chelex-100 (BioRad Cat# 142-2832)
- 4.11 QIAamp kit (QIAGEN)
- 4.12 Isopropanol
5. **EQUIPMENT**
- 5.1 Microfuge and tubes
- 5.2 Bench top centrifuge and tubes
- 5.3 Heating block
- 5.4 Water bath
- 5.5 Pipettes and pipette aid
- 5.6 2 mL or 5 mL syringes
6. **Isolation of DNA from fresh blood or cultures**
- 6.1 Dilute 100 μ L of blood with 900 μ L of TKM1 buffer and lyse the red cells by adding 10 μ L of 10% saponin. Mix the sample well by inverting the tube several times till the solution becomes clear.
- 6.2 Spin in a microfuge for 5 min at top speed to pellet the parasites. Remove the supernatant.
- 6.3 Add 1 mL of TKM1 buffer to the pellet and resuspend the pellet. Spin again for 5 min at top speed to pellet the parasites. This step should be repeated till the supernatant is colourless.
- 6.4 Resuspend the pellet in 10 μ L of TKM1 buffer and vortex. Add 0.4 mL of TKM2 and 25 μ L of 20% SDS to the tube and mix well. Incubate the tubes at \sim 55°C for 15 min.
- 6.5 Add 0.15 mL 6M NaCl to the samples and spin in a microfuge for 5 min. This step removes protein.
- 6.6 Transfer the supernatant to a fresh tube and add 2 vol. of 100% ethanol (= 1 mL). Mix well and spin for 5 min to pellet DNA.
- 6.7 Decant supernatant. Add 0.5 mL of 75% ethanol to the DNA pellet and spin again for 5 min. Decant supernatant and dry the pellet by inverting the tube on a piece of tissue and standing for \sim 5 min.
- 6.8 Dissolve DNA pellet in 100 μ L of DDW. Note: it may take 30 min to re-dissolve the pellet.

21.4 Anexo N° 4: Protocolo PCR.

ARMY MALARIA INSTITUTE

ARMY MALARIA INSTITUTE

Document Subject	SOP DRD 004a	Reference	Version	Revision Date	17 January 2011
Confirmation of Malaria Parasites using PCR for AnAID Study					
Version	Drug Resistance & Diagnostics	Copy No	1 of 1	Revision Date	17 January 2011
Author	Unit No.	Submitted to	DRD Department Head	Page	1 of 7

Document Subject	SOP DRD 004a	Reference	Version	Revision Date	17 January 2011
Confirmation of Malaria Parasites using PCR for AnAID Study					
Version	Drug Resistance & Diagnostics	Copy No	1 of 1	Revision Date	17 January 2011
Author	Unit No.	Submitted to	DRD Department Head	Page	1 of 7

Confirmation of Malaria Parasites using PCR for AnAID Study

1. PURPOSE

This SOP describes the method for Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification of *Plasmodium* rDNA genes for identifying different species of malaria. This method can be applied to parasitology-preserved whole blood samples, and also to filter paper samples, cultures or thick whole blood.

2. SCOPE

This procedure applies to the Drug Resistance & Diagnostics (DRD) Dept at AAI and is not to be modified except by the Head of Department, DRD.

3. REFERENCES

- D. Fuller, A.H. Mawby, P.L. Chiodini and J. Saldanha. Use of a rapid, single-amplicon, multiplex PCR to detect malaria species and identify species present. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, Vol. 97, No. 131-137, (2003).

4. PROCEDURES

- Extract the parasite DNA following the methods described in the Extraction SOP DRD 004a "DNA Extraction using QIAcube Robot for AnAID Study", or 004b "BDT DNA Extraction using QIAcube Robot for AnAID Study".
- Primer sequences:**

Single reverse primer and 4 species-specific primers

Rev: GTA TCT GAT CGT CTT CAC TCC C

PF: AAC AGA CGG GTA GTC ATG ATT GAG

Pv: CGG CTT GGA AGT CCT TGT

Pf: CTG TTC TTT GCA TTC CTT ATG C

Pm: CGT TAA GAA TAA ACG CCA AGC C
- Controls:** 4 positive controls and one blank control.
 - Blank control - for all samples - No DNA in well, only water.
 - Positive controls - aliquots of 10-4 diluted purified PCR products from each species are stored in the chest freezer in G-13. Do not take the control aliquots from G-13 to the PCR room. After preparing and aliquoting stock solutions take the tubes into the same lab and add the positive controls to G-13.

SOP DRD 004a (07 Jan 09) 1

• Make up a mastermix (21µL per well)

Ingredient	Pf Confirmation Assay per 1 sample (µL)	Pv Confirmation Assay per 1 sample (µL)	n number of samples +1 (µL)
Tris-HCl 50mM	1.25	1.25	
10x Buffer	2.5	2.5	
1.25mM dNTPs	4	4	
Rox primer	0.75	0.75	
Pf forward primer	---	---	
Pv forward primer	---	0.75	
Distilled water	0.0625	0.0625	
DNA	5	5	
H ₂ O	Add water to 25	Add water to 25	

- Complete plate and gel templates
- Label a plate (well copy of wells with the date, your initials, sample range and confirmation plate number)
- Align the amount of mastermix across DNA into each well and then add 7 µL of the DNA sample per reaction.
- Add positive controls in G-13, then spin down plate.
- Run PCR with cycling conditions as follows:
PCR Program - 94°C for 10 minutes
(94°C for 30secs, 60°C for 30secs, 65°C for 1min) for 45 cycles.
- After reaction is completed spin down plate and store in -20°C freezer in freezer room.
- Load 10µL of PCR product on a 1% agarose gel as per SOP DRD 042a "Agarose Gel Electrophoresis for AnAID Study".

Band sizes are:
Pf: 278 bp
Pv: 300 bp

Note:

- This assay can also be run to confirm infection of a single malaria species using species-specific primers in separate PCRs.
- When a sample has a mixed infection with both *P. falciparum* and *P. vivax* a band read may be seen at 278 or 300 bp. Confirmation of mixed infection using *P. falciparum* and *P. vivax* primers in separate PCR reactions may be required.

SOP DRD 004a (07 Jan 09) 2

21.5 Anexo N° 5: Metodología del estudio.



Fotografía N° 1: Realización de curvas de sensibilidad.



Fotografía N° 2: Recolección de muestras



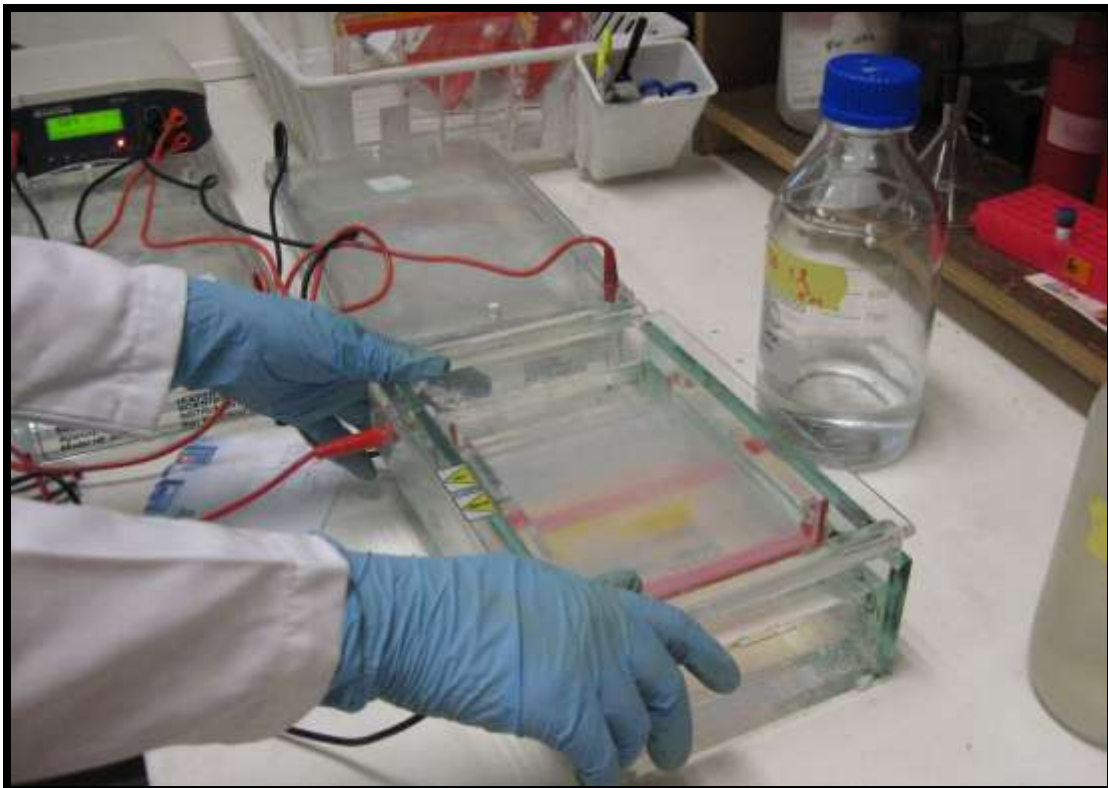
Fotografía N° 3: Procesamiento de muestras



Fotografía N° 4: Prueba Rápida / ELISA



Fotografía N° 5: Reactivos utilizados



Fotografía N° 6: Confirmación de muestras positivas en ELISA mediante PCR.

21.6 Anexo N° 6: Equipos utilizados.



Fotografía N° 8: Incubador de ELISA



Fotografía N° 9: Pipetas automáticas



Fotografía N° 10: Lavador de ELISA



Fotografía N° 11: Lector de ELISA



Fotografía N° 12: Centrifuga refrigerada Fotografía N° 13: Cámara de electroforesis



Fotografía N° 14: Termociclador

22. BIBLIOGRAFÍA.

- Arróspide. (2002). Estudio multicentrico de Diamed Optimal para el diagnóstico de *P. falciparum* y *P. vivax* en áreas endémicas del Perú 2001. *Perú MedExp Salud Pública*.
- Arróspide Nancy, F. R. (2006). Evaluación de una prueba rápida para el diagnóstico de Malaria en áreas endémicas del Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*, 23(2).
- Arróspide, N. (2004). Uso de pruebas rápidas inmunocromatográficas para la detección de *P. falciparum* en donantes de sangre en Perú. *Perú. med. exp. salud pública*, 21(2).
- Asamblea Nacional. (2011). Ley Orgánica de Salud del Ecuador.
- Astorga, & Amaya. (2011). *Proyecto de Regionalizacion de los Bancos de Sangre*. Recuperado el 2012, de <http://es.scribd.com/doc/53985931/Bancos-de-Sangre-Centralizacion-1>
- Bain, L. (2011). Detection and speciation of Malaria Parasites using PCR for AusAID study. Australia.
- Bajornas, R. (2012). *La Prensa*. Recuperado el 2013, de <http://www.prensa.com/uhora/america-latina-redujo-incidencia-de-malaria-en-los-ultimos-10-anos/25301>
- Biomedicas. (2008). *Biomedicas*. Recuperado el 2012, de <http://idibam.blogspot.com/2008/06/fundamentos-y-etapas-de-la-reaccin-en.html>
- Bottius E, G. A. (1996). Malaria: Even more chronic in nature than previously thought; evidence for subpatent. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 90:15-19.
- Calderón Juana del Carmen, S. E. (2006). Comparación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y microscopía en la detección de malaria después del tratamiento para infecciones con *P. vivax* y *P. falciparum*. *Mosaico Cient*, 43-48.

- Carlton, e. a. (1999). Karyotype and synteny among the cromosomes of all four species of human malaria parasite. *Mol Biochem Parasitol*, (1-2):23-32.
- Castillo, C. (2005). Tamización de malaria en donantes de sangre en Cali, Colombia. *Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal*, 25:203-10.
- Castro, I., & Rodríguez, M. (2009). Análisis proteómico de Plasmodium, el agente causal de la malaria. *Salud Pública Mex*, 51.
- Chauhan, V., & al, e. (2009). Transfusion TRansmitted alaria in a Non-Endemic. *JAPI*, 57:653-654.
- Chávez, B. (2008). *Scribd*. Recuperado el 2012, de <http://es.scribd.com/doc/4746199/SEROLOGIA-QUIMICA-CLINICA>
- Cheng, Q. (2001). Manual Isolation of Parasite DNA from Malaria infected blood. Australia.
- Clive R, K. A. (2005). The Current Status and Potential Role of Laboratory Testing to Prevent Transfusion-Transmitted Malaria. *Transfusion*, 229-240.
- Contreras Ochoa, C., & M. Ramsey Ph. D, J. (2004). Gametocitos de Plasmodium vivax y Plasmodium falciparum: etapas relegadas en el desarrollo de vacunas. *SciELO*.
- Cooke, A. (1999). Comparasion of a parasite lactate dehydrogense based inmunochromatographic antigen detection assay with microscopy for detection of malaria parasites in human blood samples. *Am J Trop Med Hyg*, 173-176.
- Cruz Roja Ecuatoriana. (2010). Recuperado el 2011, de <http://www.cruzroja.org.ec>
- Cultek. (2006). Recuperado el 2011, de <http://www.cultek.com>
- D. Noubouossie, C. T.-E. (2011). Asymptomatic carriage of malaria parasites in blood donors. *Transfusion Medicine*, 63-67.

- Del Portillo, e. a. (2001). A superfamily of variant genes encoded in the subtelomeric region of *Plasmodium vivax*. *Nature*.
- Diagnostics, S. (2010). SD malari Antigen ELISA.
- Doolan, D. D. (2009). Acquired immunity to malaria. *Clinical Microbiology Reviews*, 22: 13-36.
- Elghouzzi MH, S. A. (2008). Multicentric evaluation of the DiaMed enzyme-linked immunosorbent assay malaria antibody test for screening of blood donors for malaria. *Vox Sanguine*, 94:33-40.
- Esthela, G. F. (2007). *Tesis: Comparación de una prueba rápida con el método convencional gota gruesa para el diagnóstico de malaria en una área endémica*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Fernández, D. N. (2007). *Técnica de ELISA*. Obtenido de www.higiene.edu.uy/parasito/trabajos/elisa.pdf
- Florens, L., & et al. (2002). A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature*.
- Gardner, M., & al, e. (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 419: 498-499.
- Guerrero IC. (1983). Transfusion Malaria in the United States. *Ann Intern Med*, 221-6.
- Guevara, R. (1997). Biología de los parásitos del género *Plasmodium*. *Gac Méd Caracas*, 105(1):24-26.
- Gutierrez, S., & Arróspide, N. (2003). Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de malaria. *Malaria División de Parasitología Centro Nacional de Salud*.
- Hassanpour Gholamreza, M. M. (2011). Detection of malaria infection in blood transfusion: a comparative study among real time PCR, rapid diagnostic test and microscopy. *Parasitology*, 108: 1519-1523.

- Jaime Ordoñez, et all. (1997). Comparación de la prueba Parasight F con el metodo convencional de gota gruesa en el diagnostico de *P. falciparum* en Zaragoza Antioquia 1996. *Colombia Medica*, 109-112.
- Jiménez Judy Natalia, M. C. (2005). Diversidad genética de *Plasmodium falciparum* y sus implicaciones en la epidemiología de la malaria. *Biomédica*, 25: 588-602.
- Jimenez, D. R. (2006). Transmision de infecciones virales por la transfusion de sangre, Instituto de Hematologia e Inmunologia . *Hemato Inmuno Hemoter*.
- Kakkilaya. (2009). *Malaria Site*. Recuperado el 2009, de <http://www.malariasite.com/malaria>
- Kitchen AD. (2006). Malaria and blood transfusion. *Transfusion: Vox Sanguinis*, 90:77-84.
- Lee SH. (2002). New strategies for the diagnosis and screening of malaria. *Journal of Hematology*, 1:291-293.
- Maestre, A. (2011). *La inmunidad en malaria*. Recuperado el 2011, de http://docencia.udea.edu.co/vicedocencia/trabajos/amanda/actividad_5
- Moody. (2002). Rapid Diagnostics test for Malaria parasites. *ClinMicrobiol*, 66-78.
- Morrasin, B., Fabre, R., Barry, A., & Magnaval , J. (2002). One year´s experience with the polymerse chain reaction as a routine method for the diagnosis of imported malaria. *Am J Trop Med Hyg*, 66:503-8.
- MSP. (2007). Recuperado el 2011, de <ftp://ftp.unach.edu.ec/ConferenciasTM/EstadisticaMSP/paludismo.pdf>
- MSP. (2011). Recuperado el 2011, de http://www.msp.gob.ec/dps/snem/index.php?option=com_content&view=article&id=218&Itemid=300
- Noedl H, Y. K. (2006). Sensitivity and specificity of an antigen detection ELISA for malaria diagnosis. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1205-1208.

- OMS. (2000). WHO Expert Committee on Malaria. *WHO Technical Report series 892*.
- OMS. (2005). Recuperado el 2011, de
http://www.rbm.who.int/wmr2005/html/exsummary_sp.htm
- OMS/OPS. (2009). Recuperado el 2011, de <http://new.paho.org>
- OPS. (2007). Estandares de Trabajo en Bancos de Sangre. El Salvador.
- OPS. (2009). Recuperado el 2011, de <http://new.paho.org>
- OPS. (2012). Recuperado el 2013, de
http://new.paho.org/hq/index.php?cx=014283770845240200164%3Aprvkaxcnku0&searchword=erradicacion+de+la+malaria&q=erradicacion+de+la+malaria&sa=Buscar...&cof=FORID%3A0&searchphrase=all&ie=iso-8859-1&scope=on&option=com_search&Itemid=1#gsc.tab=0&gsc.q=erradi
- OPS/OMS. (02 de 04 de 2009). *Ecuador Gana Premio*. Recuperado el 2010, de
http://new.paho.org/ecu/index.php?option=com_content&task=view&id=188&Itemid=259
- Organizacion Mundial de la Salud. (2006). Uso de las pruebas rapidas en el Diagnostico Rapido de la Malaria. *OMS*.
- Organización Mundial de la Salud. (2009). Elegibilidad para la donación de sangre. *Recomendaciones para la educación y selección de donantes potenciales de sangre*, 1-113.
- Organización Mundial de la Salud. (2010). Malaria en las Américas. 12.
- Organization, W. H. (2005). Recommendations on Screening of donates blood for transfusion transmissible in blood transfusion service. *WHO*.
- Orozco, R. (1997). Malaria congénita. *Tópicos de Infectología. Universidad de Antioquia.*, 12-14.

- PAHO. (2001). Recuperado el 2011, de http://www.paho.org/spanish/sha/be_v22n1-malaria.htm
- Pereira BI, N. C. (2011). Transfusion-transmitted protozoal infections: what is the risk in non-endemic countries? *Acta Médica Portuguesa*, 4: 897-906.
- Philippe Gillet, A. S. (2011). Prozone in malaria rapid diagnostic test: how many case are missed? *Malaria Journal*, 10:1-66.
- Pita Fernandez, et all. (2003). Unidad de Epidemiologia Clinica y Bioestadistica. *Cad Aten Primaria (España)*, 10: 120-124.
- Pouvelle B, e. a. (2000). Cytoadhesion of Plasmodium falciparum ring-stage-infected erythrocytes. *Nat Med*, 6: 1264-68.
- Robert, S., & al, e. (2001). Transfusion-transmitted malaria in Canada. *Canadian Medical Association* , 164(3).
- Rogerson SJ, H. L. (2007). Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. *Lancet Infect Dis* , 7(2):105-17.
- Secretaria de Salud Veracruz Mexico. (2011). Recuperado el 2011, de <http://sesver.ssaver.gob.mx>
- Seed, C. R. (2005). The efficacy of a malarial antibody enzyme immunoassay for establishing the reinstatement status of blood donors potentially exposed to malaria. *VoxSanguinis_Transfussion*, 88:98-106.
- Sing B, B. A.-S. (1999). A genus and species-specific nested polymersa chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *Am J Trop Med Hyg*, 60: 687-692.
- Slinger R, G. A.-C. (2001). Transfusion-transmitted malaria in Canada. *Can Med Assoc J*, 164:377-379.
- SNEM-RAVREDA/OPS. (2008). Manual Operativo Estandar para la gestión de diagnóstico microscópico de Plasmodium. 1-121.

- Spielman, A., Perrone, J., & Levirene, R. (1998). Malaria diagnostic by direct observation of centrifuge samples of blood. *Am J Trop Med Hyg*, 39:337-42.
- Torres, A., & Baca, B. (1995). Reacción en cadena de la polimerasa. *Elementos*, 16-21.
- Turrientes Ma Carmen, L.-V. (2000). Aspectos prácticos del diagnóstico de laboratorio y profilaxis de la malaria. *Control de Calidad SEIMC*.
- UNED. (2000). Reacción en cadena de la polimerasa. *Principios básicos de la manipulación genética*.
- Unicef, W. H. (October 2007). TDR, Malaria Rapid Test. *A guide for selecting rapid diagnostic test*.
- Westphal R. (1999). Transfusion-transmitted malaria infections. *American Society of Clinical Pathologist Press*, 167-80.
- WHO. (2005). Recommendations on screening of donated blood for transfusion transmissible in blood transfusion service.
- WHO. (2010). World Malaria Report.
- WHO. (2012). Recuperado el 2011, de http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=1449%3Aelegibilidad-para-la-donacion-de-sangre&catid=1163%3Ahssblood-services-&Itemid=2163&lang=pt
- Wilson, & Chosewood. (2009). Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. *HHS Publication*.
- Zuluaga, & Trujillo. (2010). Malaria: consideraciones sobre su diagnóstico. *Medicina y laboratorio*, 16: 7-8.