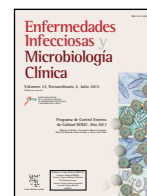




Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Diagnóstico microbiológico de la malaria importada

Diego Torrús^{a,*}, Cristina Carranza^b, José Manuel Ramos^a, Juan Carlos Rodríguez^c, José Miguel Rubio^d, Mercedes Subirats^e y Thuy-Huong Ta-Tang^d

^aConsulta de Enfermedades Importadas y Parasitología Clínica, Unidad de Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario de Alicante, Alicante, España

^bSección de Enfermedades Infecciosas y Medicina Tropical, Hospital Universitario Insular de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, España

^cSección de Microbiología y Parasitología, Hospital General Universitario de Alicante, Área de Microbiología, Universidad Miguel Hernández, Alicante, España

^dLaboratorio de Malaria y otras Parasitosis Emergentes, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España

^eLaboratorio de Parasitología, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario La Paz-Hospital Carlos III, Madrid, España

RESUMEN

Palabras clave:

Malaria
Diagnóstico
Frotis
Gota gruesa
Tests rápidos de detección de antígenos
PCR

El diagnóstico actual de la malaria se basa en el uso combinado y secuencial de los tests rápidos de detección de antígenos de *Plasmodium* y la visualización posterior del parásito teñido con solución de Giemsa en un frotis y una gota gruesa en muestras de sangre total capilar o venosa. Si no se dispone de un microscopista experto debe realizarse siempre un test rápido de detección de antígenos muy sensible para descartar la infección por *Plasmodium falciparum*, emitir inmediatamente el resultado y preparar gotas gruesas (secadas al aire) y extensiones finas (fijadas con metanol) para su posterior tinción y revisión por un microscopista experto del propio laboratorio o de un laboratorio de referencia. Los tests rápidos de detección de antígenos deben utilizarse como prueba inicial de cribado, pero no deben sustituir a las técnicas de microscopía, las cuales deben hacerse en paralelo. El diagnóstico de la malaria debe ser realizado inmediatamente tras la sospecha clínica. El retraso en el diagnóstico de laboratorio (demora mayor de 3 h) no debe impedir el inicio de tratamiento antimalárico empírico si la probabilidad de malaria es alta. Si el primer examen microscópico y el test rápido de detección de antígenos son negativos, estos deben repetirse diariamente en pacientes con alta sospecha. Si esta sospecha permanece tras 3 resultados negativos debe solicitarse la opinión de un experto en enfermedades tropicales. Los métodos de amplificación genómica (reacción en cadena de la polimerasa) son útiles como confirmación del diagnóstico microscópico, para caracterizar infecciones mixtas no detectables por otros métodos y para caracterizar infecciones asintomáticas por debajo del nivel de detección microscópica.

© 2015 Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Microbiological diagnosis of imported malaria

ABSTRACT

Keywords:

Malaria
Diagnosis
Thin and thick blood smears
Rapid antigen detection tests
PCR

Current diagnosis of malaria is based on the combined and sequential use of rapid antigen detection tests (RDT) of *Plasmodium* and subsequent visualization of the parasite stained with Giemsa solution in a thin and thick blood smears. If an expert microscopist is not available, should always be a sensitive RDT to rule out infection by *Plasmodium falciparum*, output the result immediately and prepare thick smears (air dried) and thin extensions (fixed with methanol) for subsequent staining and review by an expert microscopist. The RDT should be used as an initial screening test, but should not replace microscopy techniques, which should be done in parallel. The diagnosis of malaria should be performed immediately after clinical suspicion. The delay in laboratory diagnosis (greater than 3 hours) should not prevent the initiation of empirical antimalarial treatment if the probability of malaria is high. If the first microscopic examination and RDT are negative, they must be repeated daily in patients with high suspicion. If suspicion remains after three negative results must be sought the opinion of an tropical diseases expert. Genomic amplification methods (PCR) are useful as confirmation of microscopic diagnosis, to characterize mixed infections undetectable by other methods, and to diagnose asymptomatic infections with submicroscopic parasitaemia.

© 2015 Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: torrús_die@gva.es (D. Torrús).

Introducción

La malaria o paludismo es una enfermedad parasitaria producida por la infección por varias especies del género *Plasmodium*. En humanos, las 5 especies patogénicas son *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi*. La malaria es la infección parasitaria importada más importante, porque puede ser rápidamente mortal y requiere un diagnóstico seguro y rápido para instaurar el tratamiento de forma precoz y prevenir las complicaciones. El diagnóstico actual de la malaria se basa en el uso combinado y secuencial de los tests rápidos de detección de antígenos (TRD) de *Plasmodium* y la visualización posterior del parásito teñido con solución de Giemsa en un frotis y una gota gruesa en muestras de sangre total capilar o venosa¹.

Recogida y transporte de muestras clínicas

Ante la sospecha de malaria importada hay que solicitar las pruebas de diagnóstico siempre de forma urgente, porque el principal factor asociado al mal pronóstico es el retraso en el diagnóstico. La sangre debe extraerse en cuanto se sospeche malaria, haya o no fiebre en ese momento. Puede ser necesario extraer hasta 3 muestras para descartar la infección, sobre todo en pacientes que han recibido fármacos antipalúdicos como profilaxis o tratamiento. Estudios recientes indican que los resultados de la microscopía y los TRD son similares con sangre capilar obtenida por puncci n digital o con sangre venosa anticoagulada recogida en tubos con EDTA, siempre que las extensiones se preparen en menos de 1 h desde la extracción, para evitar el deterioro de la morfología parasitaria¹. Habitualmente se envía un tubo de sangre con EDTA y se recomienda guardar el tubo de sangre a 4  C para poder hacer todas las pruebas que fueran necesarias, incluidas pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Como la sintomatología del paludismo puede confundirse con la de las fiebres hemorrágicas virales, actualmente muy prevalentes en algunos países de África, hay que extremar las medidas de bioseguridad en el manejo de estas muestras, especialmente si el paciente proviene de estas regiones; por tanto, en la petición debe figurar siempre el país de procedencia del paciente y las características epidemiológicas del proceso. La realización de las extensiones siempre debe hacerse en campana de flujo laminar y con la protección individual adecuada (bata desechable, guantes, mascarilla y gafas protectoras), ya que es un proceso que puede generar aerosoles infecciosos. Si no se dispone de medios adecuados, la muestra debe enviarse a un centro de referencia.

 Cu ndo se han de solicitar pruebas de diagnóstico de malaria?

A cualquier paciente con fiebre procedente de un área endémica se le deben practicar pruebas para descartar malaria²⁻⁶. Las pruebas de diagnóstico de malaria se han de solicitar también a cualquier paciente procedente de un área endémica, aunque no tenga fiebre en ese momento⁷. Así, las personas semiinmunes pueden no presentar fiebre y tener otros síntomas o signos, como por ejemplo cefalea, lumbalgia, diarrea o esplenomegalia.

La mayoría de parámetros de laboratorio no son específicos. En la mayoría de pacientes se observa anemia normocítica normoc mica, pero es rara en los primeros días de enfermedad. El hallazgo más frecuente y consistente es la trombocitopenia (una cifra de plaquetas < 150.000/ μ l tiene un cociente de verosimilitud positivo para malaria de 11,0)³. La presencia concomitante de leucocitosis (> 15.000/ μ l), poco frecuente en los casos de malaria, puede alertar de la presencia de complicaciones o de coinfección bacteriana⁷. A medida que la infección progresa, la hemólisis se manifiesta por aumento de lactato deshidrogenasa (LDH) y bilirrubina indirecta, hemoglobinuria y haptoglobina disminuida^{2,7}.

También hay que tener en cuenta que en España se ha dado 1 caso de malaria autóctona (2010) y 5 casos de malaria nosocomial entre

2007 y 2013, por lo que ante un caso de fiebre de origen desconocido y descartadas otras posibles etiologías se debe realizar una prueba de malaria.

Información de resultados

La malaria es una enfermedad potencialmente mortal en cuestión de horas, sobre todo en pacientes no inmunes, y el laboratorio debe emitir resultados lo antes posible, preferentemente en menos de 3 h tras la extracci n^{1,7}. Se informará como mínimo si el paciente tiene o no malaria y, en caso afirmativo, si es o no por *P. falciparum*. Cuando est  disponible el resultado de la microscopía, se a adir  al informe la identificación de especie y el grado de parasitemia expresada como porcentaje de hematíes parasitados⁷. Si fuera posible se a adir  también el recuento absoluto de trofozoitos/ μ l¹. Este proceso de cuantificación es imprescindible en infecciones por *P. falciparum* o por *P. knowlesi*⁸.

El retraso en el diagnóstico no debe demorar el inicio de tratamiento antimalárico empírico si la probabilidad de malaria es alta (p. ej., viaje a África Subsahariana, presencia de trombopenia y esplenomegalia)⁷.

Métodos de diagnóstico de malaria

Desde que se describiera por primera vez en 1880, el diagnóstico de esta enfermedad se ha realizado mediante la observación de las distintas formas del parásito en el examen microscópico de sangre periférica teñidas con diversos colorantes. Hoy día, la gota gruesa seguida de la extensión sanguínea sigue siendo el "gold standard" para el diagnóstico de la malaria. Sin embargo, la laboriosidad que precisa el entrenamiento de un buen microscopista y la dificultad que entraña observar parasitemias bajas ha impulsado el desarrollo de nuevas técnicas más sencillas. Se puede utilizar un TRD como prueba inicial de cribado, pero no se recomienda sustituir la microscopía por el TRD, ya que este presenta un importante número de falsos negativos en casos de malaria no *falciparum*.

Diagnóstico microscópico

Gota gruesa. El examen microscópico de la gota gruesa permite detectar densidades de hasta 5-20 parásitos/ μ l (parasitemia del 0,0001%), evaluar el estadio de los parásitos circulantes (trofozoitos, esquizontes, gametocitos) y determinar la parasitemia¹. La identificación de la especie infectante es difícil en la gota gruesa y solo está al alcance de microscopistas expertos^{1,9-12}. La gota gruesa debe combinarse con el frotis para la identificación de la especie de *Plasmodium*. No obstante, el volumen de sangre examinado en 100 campos de gran aumento (1.000 ) en la gota gruesa es aproximadamente 50 veces más que en 100 campos de gran aumento en el frotis, por lo que el diagnóstico de malaria no se debe excluir solamente con el resultado negativo del examen de un frotis de sangre perif rica⁹⁻¹².

La tinción de Giemsa es la de referencia. Este colorante sirve tanto para la gota gruesa como para el frotis. Para la gota gruesa se recomienda no fijar con metanol, teñir con colorante de Giemsa al 3% durante 30 min y lavar en agua tamponada a pH 7,2, tanto en la dilución del colorante como en los lavados, para evitar alteraciones morfológicas de los parásitos y poder observar adecuadamente las granulaciones de Schüffner, tan importantes para la diferenciación de la especie.

La gota gruesa es una técnica que requiere microscopistas expertos y un estricto control de calidad. Varios estudios han demostrado la variabilidad de los resultados según el observador y la calidad de la tinción, incluso en pacientes con parasitemias relativamente elevadas. En nuestro medio, en general, la microscopía experta solo está disponible en centros que atienden con frecuencia infecciones importadas y en franjas horarias limitadas¹.

Tabla 1Características morfológicas diferenciales para la identificación de la especie de *Plasmodium* en el frotis de sangre periférica

	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. knowlesi</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. malariae</i>
Características del eritrocito	No agrandado. Redondo, a veces estrellado. Color normal, pero también más oscuro	Más grande. Redondo u oval, extraño. Color normal a pálido	No agrandado. Redondo. Color normal	Más grande. Redondo u oval, a menudo fimbriado. Color normal	No agrandado. Redondo. Color normal
Granulaciones	A veces pueden observarse manchas de Maurer (puntos rojos grandes)	Puntos de Schüffner, pequeños y numerosos puntitos rojos	–	Puntos de Schüffner, pequeños y numerosos puntitos rojos	No granulaciones
Trofozoito (anillo)	Pequeño y delicado; 2 puntos de cromatina; múltiples anillos. Formas marginales. 1-1,7 µm	Relativamente grande; 1 gránulo cromatina, a veces 2; a veces 2 anillos en una célula. Forma ameboide. 4 µm o más	Trofozoito temprano: como <i>P. falciparum</i> Trofozoito tardío: como <i>P. malariae</i>	Compacto, 1 punto de cromatina. Trofozoito ameboide. 4 µm o más	Compacto, 1 punto de cromatina. 2-2,6 µm
Trofozoito maduro	Tamaño moderado; generalmente compacto; pigmento en gránulos	Grande; ameboide; pigmento en forma de bastones finos	–	Ligeramente agrandado, compacto y redondeado; pigmento granuloso	Pequeño; compacto; a menudo en forma de banda; pigmento granuloso
Esquizonte maduro	Tamaño medio; compacto; raro en sangre periférica. 16-24 merozoitos	Grande, ameboide, pigmento fino. 14-20 merozoitos	Muy similares a <i>P. malariae</i> . Muy pigmentados. 16 merozoitos	Tamaño medio, compacto, pigmento disperso. 6-12 merozoitos	Pequeño, compacto, pigmento central. 8-12 merozoitos. Esquizontes en forma de roseta
Gametocito	Grande y alargado. Forma de banana o de salchicha	Esférico, compacto, más grande que otras especies	Grande y alargado. Pigmento malárico diseminado; similar al de <i>P. malariae</i>	Como <i>P. vivax</i> , pero más pequeño	Similar a <i>P. vivax</i> , pero más pequeño y menos numeroso
Parasitemias	Elevadas (hasta un 20%)	Bajas (2%)	Elevadas	Bajas (2%)	Bajas

Frotis/extensión fina. Esta técnica es 30 veces menos sensible que la gota gruesa y no debe emplearse de forma aislada en el diagnóstico de la malaria^{1,9-12}. Por el contrario, es más específica que la gota gruesa, ya que permite identificar con más facilidad la especie infectante y las parasitaciones mixtas, al poder visualizar las modificaciones en la forma y tamaño del hematíe que el parásito produce, la presencia o ausencia de granulaciones en los hematíes parasitados y los plasmodios en sus diferentes fases evolutivas (trofozoito en anillo, trofozoito maduro, esquizonte inmaduro, esquizonte maduro, merozoitos y gametocitos). Para los frotis se recomienda fijar con metanol durante 5 min, teñir con colorante de Giemsa al 10% durante 10 min y lavar en agua tamponada a pH 7,2.

Algunos hallazgos en el frotis son muy específicos, como la presencia de trofozoitos marginales o la parasitación múltiple en el caso de *P. falciparum* o la presencia de trofozoitos en banda o esquizontes en forma de roseta en el caso de *P. malariae*¹¹. En la tabla 1 se muestran las principales características morfológicas que permiten identificar la especie de *Plasmodium* en el frotis. La identificación de la especie es muy importante para tomar decisiones terapéuticas, por ejemplo, para añadir primaquina al tratamiento, con el objeto de eliminar los hipnozoitos en las infecciones por *P. ovale* y *P. vivax*. Permite también identificar casos de parasitación mixta⁹⁻¹².

Es muy importante que el clínico aporte información al microscopista sobre el origen geográfico del paciente ya que, por ejemplo, el *P. vivax* es raro en África central y occidental, siendo sustituido en esta área geográfica por el *P. ovale*, sobre todo en pacientes de raza negra (la mayoría no expresan el antígeno Duffy en los hematíes). O el *P. knowlesi*, que puede confundirse con el *P. malariae* pero únicamente se encuentra en el sudeste asiático.

Cuantificación de la parasitemia

Los pacientes con malaria deben ser manejados en centros que puedan cuantificar la parasitemia (habitualmente expresada como porcentaje de hematíes parasitados o como número de parásitos por

microlitro de sangre). En las primeras 24 h tras el inicio del tratamiento puede haber un incremento en la densidad parasitaria antes de que la parasitemia comience a disminuir¹³.

La parasitemia tiene valor pronóstico y es una variable importante, junto con los datos clínicos y de laboratorio, para adoptar decisiones terapéuticas (como la vía de administración y el fármaco más adecuados) y si el tratamiento será ambulatorio o en el hospital. Además, el estudio seriado de la parasitemia permite monitorizar la respuesta al tratamiento y la aparición de resistencias⁹⁻¹⁴. La relación entre la parasitemia y la gravedad de la infección varía según las poblaciones y los grupos de edad. En general, las parasitemias muy altas se asocian a mayor riesgo de enfermedad grave. Una cifra de parasitemia de más del 2,5% en pacientes no inmunes es un factor pronóstico para el desarrollo de malaria grave⁷. En pacientes semiinmunes, las elevadas parasitemias se toleran mejor. Todas las malaras con una parasitemia superior al 20% deben valorarse como potencialmente graves, con independencia de otros factores clínicos y epidemiológicos⁷. Sin embargo, en la infección por *P. falciparum* es importante recordar que una cifra de parasitemia baja no es sinónimo de bajo potencial de gravedad, ya que la citoaderencia y el secuestro periférico pueden disminuir la cantidad de parásito circulante en casos graves. Asimismo, la visualización de esquizontes de *P. falciparum* en el frotis o la gota gruesa es indicativo de una alta carga parasitaria, aunque la parasitemia en sangre periférica sea pequeña, debido también a estos fenómenos de citoaderencia y de secuestro capilar característicos de esta especie⁹⁻¹⁴.

Control del tratamiento

La microscopia es el único método fiable para controlar la eficacia del tratamiento. Una vez iniciado se deben realizar frotis y gota gruesa diarios hasta que sean negativos para las formas asexuales del parásito (trofozoitos en anillo, trofozoitos maduros, esquizontes). La visualización solamente de gametocitos (que no causan enfermedad clínica) no implica que la fiebre deba ser atribuida a malaria y se

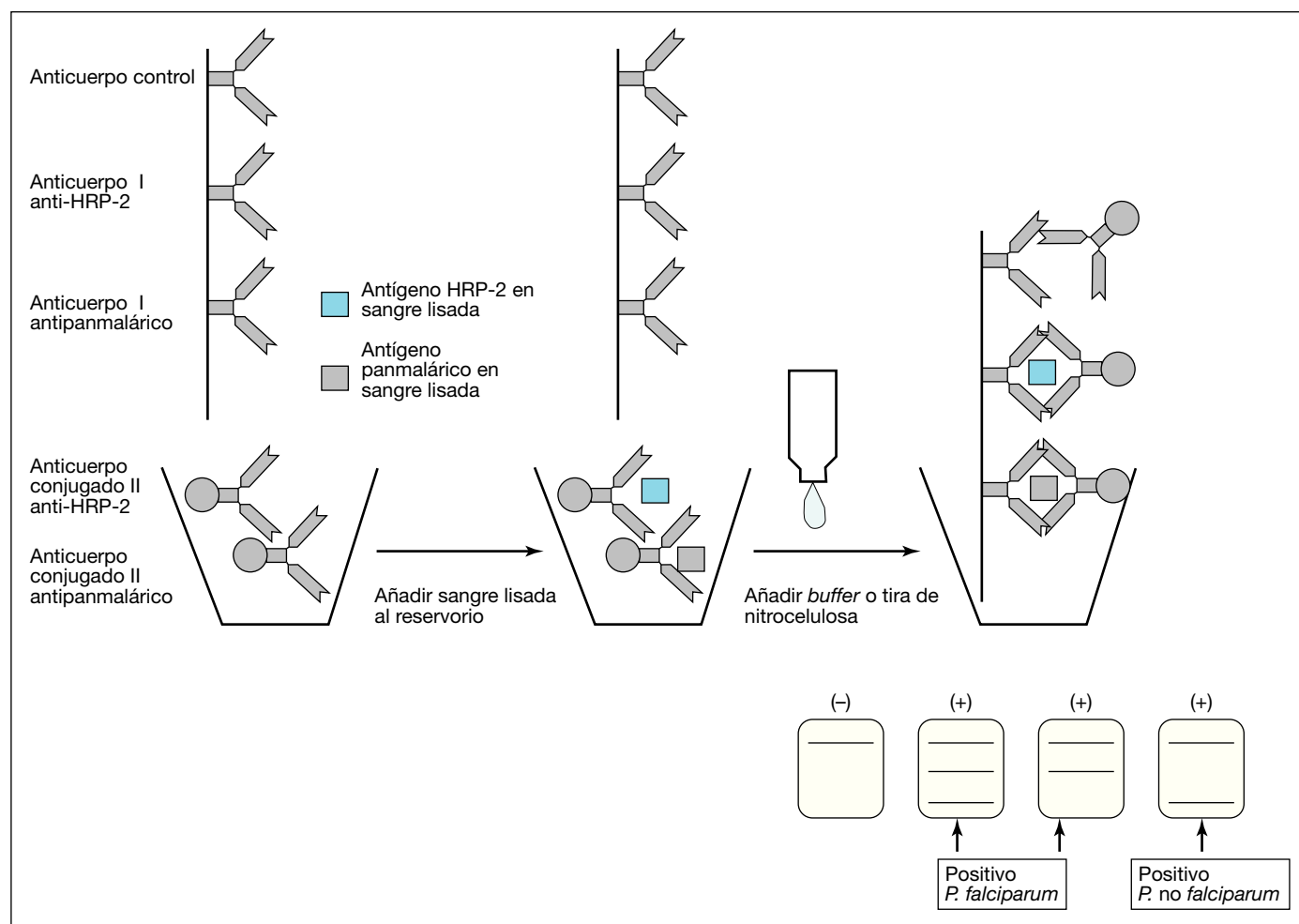


Figura 1. Fundamento de los tests rápidos de detección de antígenos (TRD) basados en inmunocromatografía. HRP-2: proteína rica en histidina II.

debe buscar otra infección concomitante. Además, estos pueden permanecer en sangre durante varios días, incluso semanas, tras un tratamiento antimalárico eficaz que haya eliminado los trofozoitos y esquizontes.

Tests rápidos de detección de antígenos

Los TRD detectan antígenos específicos (proteínas) que producen los plasmodios presentes en la sangre de sujetos infectados o de los infectados que recibieron tratamiento recientemente (en las 4 semanas previas). Algunos TRD detectan solo un antígeno específico de *P. falciparum* y otros detectan también un antígeno panmalárico común a todas las especies.

Los antígenos palúdicos se detectan mediante inmunocromatografía en una tira de nitrocelulosa o tarjeta que incorpora bandas de anticuerpos monoclonales específicos (fig. 1). Los TRD se dividen básicamente en 3 grupos según el antígeno principal detectado: a) los que detectan la proteína 2 rica en histidina (HRP-2) producida por *P. falciparum* exclusivamente, por lo que solo detectan la malaria *falciparum*; b) los que detectan HRP-2 y una enzima producida por todos los plasmodios (antígeno panmalárico), bien la aldolasa o bien la LDH, y c) los que detectan una LDH específica de *P. falciparum* (PFLDH), a veces también una LDH específica de *P. vivax* y una LDH producida por todas las especies de *Plasmodium* (PLDH). Estos 2 últimos grupos permiten distinguir *P. falciparum* y a veces también *P. vivax* del resto de las especies, pero no pueden diferenciar entre el resto de las especies o si hay presencia de infecciones mixtas¹⁵⁻¹⁷.

Ventajas e inconvenientes del uso de los tests rápidos de detección de antígenos

Estas técnicas son de utilización sencilla, rápida (< 20 min), con una cantidad mínima de pasos y reactivos, no requieren un equipamiento especial (en concreto microscopio), no requieren tampoco experiencia previa para interpretar sus resultados y son estables a temperatura ambiente. En la infección por *P. falciparum* deben detectar densidades de al menos 100 parásitos/μl (parasitemia del 0,004%) o tener una sensibilidad mínima del 95% en comparación con la microscopia experta. La sensibilidad puede diferir de un producto a otro. En el diagnóstico de la malaria importada se recomienda que la sensibilidad sea similar a la que se obtiene con la microscopia experta (20-50 parásitos/μl) y que permita detectar también otras especies de malaria^{1,15-17}. Si la infección es por plasmodios no *falciparum*, la sensibilidad es menor y está relacionada directamente con la parasitemia, por lo que no son raros los falsos negativos^{18,19}. La especificidad suele ser mayor del 90%.

Sin embargo presentan algunos inconvenientes, por lo que su empleo debe ser complementario a las técnicas microscópicas: a) no permiten valorar la existencia de infecciones mixtas; b) no permiten cuantificar la parasitemia; c) ninguna de las 3 dianas antigénicas utilizadas en los TRD es específica para plasmodios no *falciparum*; d) presentan una baja sensibilidad en presencia de bajas parasitemias (< 100 parásitos/μl), y e) no son útiles para monitorizar la respuesta al tratamiento, ya que pueden permanecer positivos durante varios días, con alguna diferencia dependiendo del TRD utilizado; así, en el

caso de detección de HRP-2 específica de *P. falciparum*, estos antígenos son estructurales, pudiendo persistir tras la muerte del parásito en sangre periférica hasta 4 semanas después del tratamiento, dependiendo de la parasitemia inicial y el estado inmunológico^{20,21}. En el caso de TRD basados en la detección de LDH específica de *Plasmodium* son más útiles porque solo los parásitos vivos expresan PLDH, aunque la densidad elevada de gametocitos puede afectar los resultados²¹.

Como se ha mencionado anteriormente, la sensibilidad de los TRD en el diagnóstico de las especies de plasmodios no *falciparum* es baja y está directamente relacionada con la parasitemia, por lo que no son raros los falsos negativos^{15,22,23}. Se han descrito también falsos negativos en los TRD en pacientes con malaria *falciparum* con alta parasitemia, probablemente debido a un fenómeno de “prozona”^{24,25}. Este problema parece estar limitado a los tests basados en la detección de la HRP-2¹⁸. Hay falsos negativos en sistemas basados en la detección de HRP-2 debido a mutaciones en el gen HPR-2 o a la ausencia de esta proteína y de la HRP-3 en el genoma de algunas poblaciones de *P. falciparum* localizadas en Sudamérica^{26,27}. En los kits que llevan aldolasa o similar son caracterizados como malaria no *falciparum* y en los que solo detectan HRP-2 como negativos con el consiguiente riesgo^{28,29}. Se pueden encontrar falsos positivos por la presencia de factor reumatoide³⁰ y por reacción cruzada con sujetos infectados por *Schistosoma mekongi*³¹.

Por tanto, los clínicos deben ser advertidos de que los TRD no tienen una sensibilidad del 100% y que deben utilizarse en paralelo y no en lugar del examen microscópico de sangre periférica. Por este motivo, y también para cuantificar la parasitemia, también debe realizarse siempre la técnica de referencia, que es la microscopia. No obstante, en los países endémicos de renta baja, la situación es muy distinta y actualmente los TRD se utilizan ampliamente como única técnica diagnóstica ante la imposibilidad en muchos casos de contar con microscopia experta.

Los resultados de una evaluación multicéntrica de diferentes TRD realizada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) muestran que el mejor funcionamiento se encontró en los test basados en una combinación de HRP-2 y de proteínas panmaláricas³¹. En general puede afirmarse que los kits que detectan HRP-2 son algo más sensibles que los basados en PfLDH para el diagnóstico de la infección por *P. falciparum*. En la detección de *P. vivax*, la determinación de aldolasa y la de PLDH muestran una sensibilidad similar. No hay datos suficientes para evaluar los resultados con otras especies de *Plasmodium*.

Otros usos de los tests rápidos de detección de antígenos

Debido al secuestro placentario de los parásitos, en el diagnóstico de malaria en gestantes, los TRD que detectan HRP-2 son más sensibles que la microscopia. Por otra parte, la persistencia del antígeno HRP-2 puede ser útil para confirmar un diagnóstico previo de malaria en pacientes tratados de forma empírica, en muestras de sangre extraídas hasta 14-28 días después de finalizar el tratamiento o de la resolución de los síntomas.

Usos no recomendados de los tests rápidos de detección de antígenos

Algunos TRD (OptiMal-IT®, Immunoquick malaria 4+ Biosynexy DiaMed AG®) presentan envases de uso individual para autodiagnóstico en viajeros; sin embargo, actualmente no se recomienda el uso de estos kits por personal no sanitario.

Como se ha mencionado anteriormente, los TRD no se utilizan para controlar el tratamiento porque el antígeno HRP-2 puede permanecer positivo hasta 4 semanas después de desaparecer los síntomas clínicos; por otro lado, aunque la aldolasa y la PLDH (producidas por las formas asexuales del parásito) disminuyen rápidamente con un tratamiento eficaz, se pueden expresar también por los gametocitos y estos, dependiendo del tratamiento utilizado, pueden persistir

1 o 2 semanas en la circulación sanguínea tras la resolución de los síntomas clínicos^{20,21}.

Pruebas de biología molecular

Los métodos de diagnóstico y caracterización basados en la amplificación genómica o pruebas de PCR se han revelado de gran utilidad en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas. En el caso de la malaria, diferentes trabajos han mostrado que la sensibilidad, en torno a 0,01 parásitos/μl de sangre, es mayor que en los métodos convencionales basados en microscopia (5-20 parásitos/μl) o los métodos basados en detección de antígeno (100 parásitos/μl)^{32,33}. Por otro lado, la especificidad también mejora permitiendo una mejor caracterización de especie y la detección de infecciones mixtas en mayor proporción que otros métodos^{32,33}.

Existen numerosos métodos de PCR convencional publicados para la detección de las diferentes especies de *Plasmodium*, pero 2 son los más citados y utilizados: a) *nested* PCR³², que consiste en una primera amplificación seguida de 4 amplificaciones, una para cada una de las 4 especies de *Plasmodium* más frecuentes encontradas en humanos, y b) *nested* Multiplex³³, que consiste en 2 amplificaciones encadenadas, en la segunda de las cuales el tamaño de los fragmentos determina la especie o especies de *Plasmodium* presentes en la muestra. En los últimos años se han desarrollado métodos basados en PCR a tiempo real. La sensibilidad de estos métodos está por debajo de los métodos basados en PCR convencional³⁴, incluso en algunos casos no mejorando la sensibilidad de la microscopia.

Desde el punto de vista técnico, las técnicas basadas en *nested* PCR que se desarrollaron inicialmente son las menos recomendables, ya que no permiten la cuantificación de los microorganismos y presentan un elevado riesgo de contaminación cruzada entre las muestras; por el contrario, las técnicas basadas en PCR a tiempo real, utilizando diferentes combinaciones de cebadores y sondas, permiten una fácil automatización y estandarización, y ofrecen resultados fiables y de forma cuantitativa. Especialmente interesantes son las técnicas que no requieren de un proceso previo de extracción de ADN, por su rapidez y su sencillez de uso (sistemas *one-step*), aunque hay que tener en cuenta que la evolución de estas técnicas debe recoger la posible inhibición parcial de la reacción que puede provocar la presencia de inhibidores asociados a la sangre en la que se realiza el estudio y que puede afectar a la cuantificación del proceso³⁵.

Actualmente, en el mercado hay sistemas de detección comercializados tanto para PCR convencional como para PCR a tiempo real, algunos incluso diseñados para ser aplicados en lugares con infraestructura mínima³⁶⁻³⁹. La explosión de todas estas tecnologías diseñadas por diferentes casas comerciales con calidad variable hace necesario que, además de disponer de marcado CE, cualquier producto que se utilice en la práctica clínica deba ser previamente validado por una agencia especializada, ya sea nacional o internacional, aplicando criterios previamente establecidos. Fruto de esta necesidad, la OMS está trabajando en el desarrollo de materiales biológicos de referencia⁴⁰.

A pesar de ser considerado en la práctica clínica un diagnóstico retrospectivo o confirmatorio, el diagnóstico por PCR tiene muchas ventajas y utilidades en el caso de la malaria; entre ellas podemos citar: a) confirmación de casos clínicos y de especies involucradas en la infección⁴¹⁻⁴³; b) detección de casos oligo o asintomáticos en pacientes con parasitemias muy bajas (submicroscópicas) no detectables por otros métodos, especialmente en sujetos adultos procedentes de regiones endémicas; c) detección de infecciones mixtas en casos de difícil interpretación de las pruebas microscópicas⁴¹⁻⁴³; d) control de tratamiento y detección de fallo terapéutico temprano, especialmente los métodos basados en PCR a tiempo real, que permiten cuantificar la carga parasitaria, pero tienen el inconveniente de no diferenciar generalmente las formas asexuales de las sexuales; e) caracterización de infecciones por otros *Plasmodium* no típicos de humanos, que de otra forma serían morfológicamente asignados a

alguna de las especies humanas comunes, al ser un método no subjetivo dependiente del observador, como la microscopia⁴⁴; f) diagnóstico en las gestantes debido a que los parásitos están secuestrados en la placenta, por lo que presentan tinciones de sangre periférica frecuentemente negativas y la sensibilidad de la detección de los antígenos es subóptima; además, estas mujeres pueden estar asintomáticas si presentan alta inmunidad; por tanto, la aplicación de estas técnicas puede disminuir el riesgo de secuelas en el feto⁴⁵; g) en el caso de infecciones por *P. knowlesi*, patógeno emergente, la aplicación de estos procedimientos es fundamental, ya que la microscopia y la detección de antígenos son muy poco útiles^{44,46,47}; h) diferenciación de las 2 especies, recientemente descritas, de *P. ovale* (*P. ovale curtisi* y *P. ovale wallikeri*)^{48,49}; i) detección de mecanismos de resistencia a los fármacos⁵⁰; así, la aparición de cepas de *P. falciparum* resistentes a artemisinina se ha asociado a la aparición de mutaciones puntuales en el gen que codifica la proteína *kelch*, situado en el cromosoma 13 (*kelch13*)⁵¹, y estas mutaciones pueden detectarse por secuenciación de dicha región. Debido a la gran repercusión que en el futuro puede tener la resistencia a estos fármacos es importante conocer profundamente su difusión y su mecanismo molecular^{52,53}, y j) control de calidad para evaluar los diagnósticos por microscopia y TDR que se realizan en cada laboratorio.

No obstante, aun teniendo en cuenta todas las ventajas y posibles aplicaciones, actualmente el diagnóstico por PCR debe considerarse como método de segunda línea, entre otras razones porque el tiempo de diagnóstico, entre 6 y 24 h, es excesivo para dar una respuesta terapéutica rápida comparado con la microscopia (< 1 h) o los TDR (< 30 min); además, el coste en equipos puede ser excesivo para muchos laboratorios y si el método no está automatizado el coste en tiempo de personal es muy elevado, por lo que su uso debería restringirse a laboratorios centrales o de referencia. Teniendo en cuenta todas las ventajas y aplicaciones de la microbiología molecular, estas tecnologías deben entrar en los laboratorios de microbiología clínica, especialmente en los de tercer nivel, por lo que podría designarse una red de centros de referencia. Por otra parte, debería establecerse un centro de referencia nacional de estudio de resistencias donde se enviaran muestras de todos los pacientes con fracaso terapéutico, con objeto de caracterizar mediante secuenciación masiva la causa molecular de este.

Técnicas serológicas

Las pruebas serológicas detectan anticuerpos en sangre producidos en respuesta a una infección por el parásito de la malaria; generalmente se utilizan métodos basados en inmunofluorescencia indirecta (IFI) o enzimoimmunoanálisis (ELISA). En malaria, la serología no puede diagnosticar una infección aguda, ya que, por la persistencia de anticuerpos en el tiempo, no diferencia infecciones pasadas de actuales, y en primoinfecciones, debido al tiempo requerido para el desarrollo de anticuerpos, no aparecen anticuerpos (seroconversión) hasta después de varios días tras la aparición de los síntomas⁵⁴. Sin embargo, la detección de anticuerpos puede ser útil para: a) cribado de donantes de sangre nativos o viajeros de zonas endémicas^{55,56}; b) diagnóstico retrospectivo cuando se desea confirmar el diagnóstico previo en pacientes no inmunes que sufrieron un proceso febril durante un viaje, y c) estudios epidemiológicos.

El método de IFI es un método que permite cuantificar la respuesta inmunológica frente al parásito. Esta técnica es un método simple y sensible, pero es lento y difícil de automatizar; requiere microscopia de fluorescencia y técnicos capacitados, por lo que es dependiente del operador y subjetiva, en particular para las muestras de suero con bajos títulos de anticuerpos, y la comparación de resultados interlaboratorios es complicada debido a la falta de estandarización de los reactivos y las manipulaciones. Hay disponibles pruebas especie-específicas para 3 de las 5 especies de malaria humanas (*P. falciparum*, *P. vivax* y *P. malariae*), y la fase de esquizontes sanguíneos es la

que se usa como antígeno^{57,58}. La prueba frente a *P. falciparum* es la más utilizada, ya que da muy buena sensibilidad para esta especie, aunque muestra reactividad cruzada limitada con otras especies patógenas humanas.

Más reproducibles y fáciles de automatizar son los métodos de ELISA. En principio, estos métodos que utilizaban antígeno soluble crudo de *P. falciparum* carecían de sensibilidad en comparación con los test de IFI^{59–61}, pero con el uso de inmunoanálisis enzimáticos que utilizan antígenos recombinantes⁶² o sistemas mixtos (antígeno crudo y recombinante) se han convertido en una alternativa más sensible y práctica a las pruebas de inmunofluorescencia⁶³. Actualmente, este tipo de pruebas son la que se usan en rutina en los bancos de sangre para el cribado de donantes que han nacido, vivido o viajado a zonas endémicas.

Estos tests no tienen valor diagnóstico, es decir, tener anticuerpos no significa que el donante tenga malaria o sea portador de parásitos en sangre, por lo que se les debe realizar a posteriori un test diagnóstico de alta sensibilidad como la PCR⁵⁵.

Conclusiones

El diagnóstico de la malaria importada es siempre urgente. Las pruebas de diagnóstico de malaria se han de solicitar a cualquier paciente con fiebre procedente de un área endémica. La sangre debe extraerse en cuanto se sospeche malaria, haya o no fiebre en ese momento. El retraso en el diagnóstico no debe demorar el inicio de tratamiento antimalárico empírico si la probabilidad de malaria es alta. La gota gruesa seguida de la extensión sanguínea sigue siendo el “gold standard” para el diagnóstico de la malaria. Los TRD deben usarse como cribado inicial, también en los lugares donde el diagnóstico parasitológico no sea posible, o como método complementario a la microscopia. No se recomienda sustituir la microscopia por los TRD, ya que estos presentan un elevado número de falsos negativos en casos de malaria no *falciparum*. Aun teniendo en cuenta todas las ventajas y posibles aplicaciones, actualmente, el diagnóstico por PCR debe considerarse como método de segunda línea, entre otras razones porque el tiempo de diagnóstico, entre 6 y 24 h, es excesivo para dar una respuesta terapéutica rápida comparado con la microscopia (< 1 h) o los TDR (< 30 min). Las pruebas serológicas no tienen valor en el diagnóstico.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Cañavate C, Cuadros J, Martínez-Ruiz R, Martín-Rabadán P. El laboratorio de microbiología ante las enfermedades parasitarias importadas. Procedimientos en Microbiología Clínica SEIMC 2009 [consultado 14-9-2014]. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/>
- Askling HH, Brunee F, Burchard G, Castelli F, Chiodini PL, Grobusch MP, et al. Management of imported malaria in Europe. *Malar J.* 2012;11:328.
- D'Acremont V, Landry P, Mueller I, Pécoud A, Genton B. Clinical and laboratory predictors of imported malaria in an outpatient setting: and aid to medical decision making in returning travelers with fever. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66:481–6.
- D'Acremont V, Burnand B, Ambresin A, Genton B. Practice guidelines for evaluation of fever in returning travelers or migrants. *J Travel Med.* 2003;10 Suppl 2:S25–52.
- Spira AM. Assessment of travellers who return home ill. *Lancet.* 2003;361:1459–69.
- Aparicio P, Torrús D, Treviño B, Zuberó Z, López-Vélez R. Guías de aproximación al viajero con fiebre al regreso del trópico. Guías Clínicas SEIMC 2006 [consultado 14-9-2014]. Disponible en: http://www.seimc.org/documentos/documentoscienficos/guiasclinicas/seimc-GuiaClinica1_2006_Viajero.pdf
- Muñoz J, Rojo-Marcos G, Ramírez-Olivencia G, Salas-Coronas J, Treviño B, Pérez Arellano JL, et al. Diagnóstico y tratamiento de la malaria importada en España: recomendaciones del Grupo de Trabajo de Malaria de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEMTSI). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014; doi: 10.1016/j.eimc.2013.12.014. [Epub ahead of print].
- Bailey JW, Williams J, Bain BJ, Parker-Williams J, Chiodini PL. Guideline: the laboratory diagnosis of malaria. General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol.* 2013;163:573–80.

9. Bowers KM, Bell D, Chiodini PL, Barnwell J, Incardona S, Yen S et al. Inter-rater reliability of malaria parasite counts and comparison of methods. *Malar J*. 2009;8:267.
10. Petersen E, Marbiah NT, New L, Gottschau A. Comparison of two methods for enumerating malaria parasites in thick blood films. *Am J Trop Med Hyg*. 1996;55:485-9.
11. Gilles HM. Diagnostic methods in malaria. In: Warrell DA, Gilles HM, editors. *Essential Malariology*. 4th ed. Oxford: Oxford University Press; 2002.
12. Wongsrichanalai CM, Barcus MJ, Muth S, Sutamihardja A, Wernsdorfer WH. A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). *Am J Trop Med Hyg*. 2007;77 Suppl:119-27.
13. Flegg JA, Guerin PJ, White NJ, Stepniewska K. Standardizing the measurement of parasite clearance in falciparum malaria: the parasite clearance estimator. *Malar J*. 2011;10:339.
14. World Health Organization. Communicable Diseases Cluster. Severe falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2000;94 Suppl 1:S1-90.
15. World Health Organization. Rapid Diagnostic Tests. Results of round 3: 2012 [consultado 1-10-2014]. Disponible en: http://www.who.int/tdr/publications/tdr-research-publications/rdt_round3/en/index.html
16. Chiodini PL, Bowers K, Jorgensen P, Barnwell JW, Grady KK, Luchavez J, et al. The heat stability of *Plasmodium lactate* dehydrogenase-based and histidine-rich protein 2-based malaria rapid diagnostic tests. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2007;101:331-7.
17. Van Hellemond JJ, Rutten M, Koelwijin R, Zeeman AM, Verweij JJ, Wismans PJ, et al. Human *Plasmodium knowlesi* infection detected by rapid diagnostic tests for malaria. *Emerg Infect Dis*. 2009;15:1478-80.
18. Murray CK, Gasser RA Jr, Magill AJ, Miller RS. Update on rapid diagnostic testing for malaria. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21:97-110.
19. Jelinek T, Grobusch MP, Schwenke S, Steidl S, Von Sonnenburg F, Nothdurft HD, et al. Sensitivity and specificity of dipstick tests for rapid diagnosis of malaria in nonimmune travellers. *J Clin Microbiol*. 1999;37:721-3.
20. Vakharia S, Gopinathan N, Kshirsagar NA. The ParaSight-F test for detecting treatment failure. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1997;91:490-1.
21. Abba K, Deeks JJ, Olliaro P, Naing CM, Jackson SM, Takwoingi Y, et al. Rapid diagnostic tests for diagnosis of uncomplicated *P. falciparum* malaria in endemic countries. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011;7:CD008122.
22. WHO Global Malaria Programme. Information note on recommended selection criteria for procurement of malaria rapid diagnostic tests –September 2014– [consultado 26-10-2014]. Disponible en: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/rdt-selection-criteria-sept2014.pdf?ua=1>
23. Foundation for Innovative New Diagnostics (FIND): Malaria RDT product testing: interactive guide [consultado 1-10-2014]. Disponible en: http://www.finddiagnostics.org/programs/malaria-afs/malaria/rdt_quality_control/product_testing/interactive-guide/index.jsp
24. Luchavez J, Baker J, Alcantara S, Belizario V Jr, Cheng Q, McCarthy JS, et al. Laboratory demonstration of a prozone-like effect in HRP-2-detecting malaria rapid diagnostic tests: implications for clinical management. *Malar J*. 2011;10:286.
25. Gillet P, Scheirlinck A, Stokx J, De Weggheleire A, Ch  que HS, Canhang OD, et al. Prozone in malaria rapid diagnostics tests: how many cases are missed? *Malar J*. 2011;10:166.
26. Koita OA, Doumbo OK, Ouattara A, Tall LK, Konar   A, Diakit   M, et al. False-negative rapid diagnostic tests for malaria and deletion of the histidine-rich repeat region of the hrp2 gene. *Am J Trop Med Hyg*. 2012;86:194-8.
27. Baker J, Gatton ML, Peters J, Ho MF, McCarthy JS, Cheng Q. Transcription and expression of *Plasmodium falciparum* histidine-rich proteins in different stages and strains: implications for rapid diagnostic tests. *PLoS One*. 2011;6:e22593.
28. Maltha J, Gamboa D, Bendezu J, S  nchez L, Cnops L, Gillet P, et al. Rapid diagnostic tests for malaria diagnosis in the Peruvian Amazon: impact of pfrp2 gene deletions and cross-reactions. *PLoS One*. 2012;7:e43094.
29. Gamboa D, Ho MF, Bendezu J, Torres K, Chiodini PL, Barnwell JW, et al. A large proportion of *P. falciparum* isolates in the Amazon region of Peru lack pfrp2 and pfrp3: implications for malaria rapid diagnostic tests. *PLoS One*. 2010;5:e8091.
30. Grobusch MP, Alpermann U, Schwenke S, Jelinek T, Warhurst DC. False-positive rapid tests for malaria in patients with rheumatoid factor. *Lancet*. 1999;353:297.
31. Leshem E, Keller N, Guthman D, Grossman T, Solomon M, Marva E, et al. False positive *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 immunocapture assay in acute schistosomiasis caused by *Schistosoma mekongi*. *J Clin Microbiol*. 2011;49:2331-2.
32. Snounou G, Singh B. Nested PCR analysis of *Plasmodium* parasites. *Methods Mol Med*. 2002;72:189-203.
33. Rubio JM, Post RJ, Van Leeuwen WM, Henry MC, Lindergard G, Hommel M. Alternative polymerase chain reaction method to identify *Plasmodium* species in human blood samples: the semi-nested multiplex malaria PCR (SnM-PCR). *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002;96 Suppl 1:S199-204.
34. Bastien P, Procop GW, Reischl U. Quantitative real-time PCR is not more sensitive than "conventional" PCR. *J Clin Microbiol*. 2008;46:1897-900.
35. Kamau E, Alemayehu S, Feghali KC, Saunders D, Ockenhouse CF. Multiplex qPCR for detection and absolute quantification of malaria. *PLoS One*. 2013;8:e71539.
36. Taylor BJ, Howell A, Martin KA, Manage DP, Gordy W, Campbell SD, et al. A lab-on-chip for malaria diagnosis and surveillance. *Malar J*. 2014;13:179.
37. Patel JC, Lucchi NW, Srivastava P, Lin JT, Sug-Aram R, Aruncharu S, et al. Field evaluation of a real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification assay, RealAmp, for the diagnosis of malaria in Thailand and India. *J Infect Dis*. 2014;210:1180-7.
38. Reller ME, Chen WH, Dalton J, Lichay MA, Dumler JS. Multiplex 5' nuclease quantitative real-time PCR for clinical diagnosis of malaria and species-level identification and epidemiologic evaluation of malaria-causing parasites, including *Plasmodium knowlesi*. *J Clin Microbiol*. 2013;51:2931-8.
39. Li Y, Kumar N, Gopalakrishnan A, Ginocchio C, Manji R, Bythrow M, et al. Detection and species identification of malaria parasites by isothermal tHDA amplification directly from human blood without sample preparation. *J Mol Diagn*. 2013;15:634-41.
40. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Sixty-third report. World Health Organization. World Health Organ Tech Rep Ser. 2014;980:1-489.
41. Mahajan B, Zheng H, Pham PT, Sedegah MY, Majam VF, Akolkar N, et al. Polymerase chain reaction-based tests for pan-species and species-specific detection of human *Plasmodium* parasites. *Transfusion*. 2012;52:1949-56.
42. Cuadros J, Mart  n-Rabad  n P, Merino FJ, Delgado-Iribarren A, Garc  a-Bujalance S, Rubio JM. Malaria diagnosis by NOW ICT and expert microscopy in comparison with multiplex polymerase chain reaction in febrile returned travellers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007;26:671-3.
43. Paglia MG, Vairo F, Bevilacqua N, Ghirga P, Narciso P, Severini C, et al. Molecular diagnosis and species identification of imported malaria in returning travellers in Italy. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;72:175-80.
44. Ta TT, Salas A, Ali-Tammam M, Mart  nez-Medel C, Lanza M, Arroyo E, et al. First case of detection of *Plasmodium knowlesi* in Spain by Real Time PCR in a traveller from Southeast Asia. *Malar J*. 2010;9:219.
45. Fried M, Muehlenbachs A, Duffy PE. Diagnosing malaria in pregnancy: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2012;10:1177-87.
46. Cordina CJ, Culleton R, Jones BL, Smith CC, MacConnachie AA, Coyne MJ, et al. *Plasmodium knowlesi*: clinical presentation and laboratory diagnosis of the first human case in a scottish traveler. *J Travel Med*. 2014;21:357-60.
47. Jeremiah S, Janagond AB, Parija SC. Challenges in diagnosis of *Plasmodium knowlesi* infections. *Trop Parasitol*. 2014;4:25-30.
48. Fuehrer HP, Noeldt HJ. Recent advances in detection of *Plasmodium ovale*: implications of separation into the two species *Plasmodium ovale wallikeri* and *Plasmodium ovale curtisi*. *Clin Microbiol*. 2014;52:387-91.
49. Calderaro A, Piccolo G, Gorrini C, Rossi S, Montecchini S, Dell'Anna ML, et al. Accurate identification of the six human *Plasmodium* spp. causing imported malaria, including *Plasmodium ovale wallikeri* and *Plasmodium knowlesi*. *Malar J*. 2013;12:321.
50. LeClair NP, Conrad MD, Baliraine FN, Nsanabana C, Nsobia SL, Rosenthal PJ. Optimization of a ligase detection reaction-fluorescent microsphere assay for characterization of resistance-mediating polymorphisms in African samples of *Plasmodium falciparum*. *J Clin Microbiol*. 2013;51:2564-70.
51. Ashley EA, Dhorda M, Fairhurst RM, Amaratunga C, Lim P, Suon S, et al. Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. Tracking Resistance to Artemisinin Collaboration (TRAC). *N Engl J Med*. 2014;371:411-23.
52. Ariey F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois AC, Khim N, et al. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2014;505:50-5.
53. Gharbi M, Flegg JA, Pradines B, Berenger A, Ndiaye M, Djimd   AA, et al. Surveillance of travellers: an additional tool for tracking antimalarial drug resistance in endemic countries. *PLoS One*. 2013;8:e77775.
54. Rubio JM, Benito A, Berzosa PJ, Roche J, Puente S, Subirats M, et al. Usefulness of seminested Multiplex PCR in surveillance of imported malaria in Spain. *J Clinical Microbiol*. 1999;37:3260-4.
55. Benito A, Rubio, JM. Usefulness of seminested Polymerase Chain Reaction for screening blood donors at risk for malaria in Spain. *Emerg Infect Dis*. 2001;7:1068.
56. Soler CP, Gerome P, Soullie B, Tisserde F, Bejan H, Yvetot J, et al. Comparison of techniques used to screen blood donations for malaria antibodies. *Med Trop (Mars)*. 2003;63:587-9.
57. Black J, Hommel M, Snounou G, Pinder M. Mixed Infections with *Plasmodium falciparum* and *P. malariae* and fever in malaria. *Lancet*. 1994;343:1095.
58. Lee WJ, Kim HH, Hwang SM, Park MY, Kim NR, Cho SH, et al. Detection of an antibody against *Plasmodium vivax* in residents of Gimpo-si, South Korea, using an indirect fluorescent antibody test. *Malar J*. 2011;10:19.
59. Chiodini PL, Hartley S, Hewitt P, Barbara J, Lalloo K, Bligh J, et al. Evaluation of a malaria antibody ELISA and its value in reducing potential wastage of red cell donations from blood donors exposed to malaria, with a note on a case of transfusion transmitted malaria. *Vox Sang*. 1997;73:143-8.
60. Contreras CE, Pance A, Marcato N, Gonz  lez N, Bianco N. Detection of specific antibodies to *Plasmodium falciparum* in blood bank donors from malaria-endemic and non-endemic areas of Venezuela. *Am J Trop Med Hyg*. 1999;60:948-53.
61. Silv   O, Thellier M, Rosenheim M, D  try A, Lavigne P, Danis M, et al. Potential value of *Plasmodium falciparum* associated antigen and antibody detection for screening of blood donors to prevent transfusion-transmitted malaria. *Transfusion*. 2002;42:357-62.
62. Seed CR, Cheng A, Davis TM, Bolton WV, Keller AJ, Kitchen A, et al. The efficacy of a malarial antibody enzyme immunoassay for establishing the reinstatement status of blood donors potentially exposed to malaria. *Vox Sang*. 2005;88:98-106.
63. Doderer C, Heschung A, Guntz P, Cazenave JP, Hansmann Y, Senegas A, et al. A new ELISA kit which uses a combination of *Plasmodium falciparum* extract and recombinant *Plasmodium vivax* antigens as an alternative to IFAT for detection of malaria antibodies. *Malar J*. 2007;6:19.