

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**COMPARACIÓN DE UNA PRUEBA RÁPIDA CON EL MÉTODO CONVENCIONAL  
GOTA GRUESA PARA EL DIAGNÓSTICO DE MALARIA EN UN ÁREA ENDÉMICA**

**Informe de Tesis  
Presentado por**

**Fabiola Esthela García Axt**

**Para optar al título de  
Química Bióloga**

**GUATEMALA, ENERO 2007**

## **JUNTA DIRECTIVA**

Oscar Cóbar Pinto, PhD.

Decano

Licda. Jannette Sandoval Madrid de Cardona, M.A.

Secretaria

Licda. Lillian Raquel Irving Antillón

Vocal I

Licda. Liliana Vides de Urizar

Vocal II

Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jiménez

Vocal III

Br. Angel Damián Reyes Valenzuela

Vocal IV

Br. Angel Jacobo Conde Pereira

Vocal V

## **ACTO QUE DEDICO**

### **A DIOS Y A LA VIRGEN**

Por iluminar todos los días de mi vida y colmarme de bendiciones.

### **A MIS PADRES**

José García Ixcot y Amelia Axt Estrada porque los sueños de ayer hoy son una realidad. Gracias por su amor, confianza y por apoyarme durante toda mi carrera universitaria, este triunfo es de ustedes.

### **A MI HIJO**

José Rodrigo Dávila García por ser el mejor regalo que la vida me ha dado, y quiero dedicarte este triunfo alcanzado con todo mi amor, tú eres la luz que ilumina mi mundo, te amo.

### **A MI ESPOSO**

Marlon Estuardo Dávila de León por su amor y comprensión pero sobre todo por el apoyo incondicional en este camino ya que desde que te conocí supe que siempre estarías allí, mil gracias.

### **A MIS HERMANOS**

Adilia y Arturo por brindarme siempre su apoyo y comprensión, por ser los mejores, gracias.

### **A MIS SOBRINOS Y CUÑADA**

María José, Axel Arturo, Miguel Sebastián y Mónica por todo su cariño.

### **A MIS TIOS Y PRIMOS**

Alberto, Oswaldo, Estela, Gustavo (+) y Werner por todo su cariño.

### **A MIS AMIGOS**

Eduardo, Carlos, Enma, Elda, Maura, Vicky, Sheilee, Mariela, Lulu, Glenda, Bertha, especialmente a Carlos Eduardo Gonzáles por enseñarme el camino.

### **A MIS CATEDRATICOS**

Dr. Oscar Cobar, Dr. Rubén Velásquez, Lic. Milton Cabrera, Lic. Guillermo Solórzano, Lic. Emilio García, Licda. Julieta de Pezarozi y Licda. Hada Alvarado, Lic. Jorge Hernández

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A mi asesora**

Licenciada Cecilia Sánchez de Porres.

Por compartir sus conocimientos en el trabajo de investigación, pero sobre todo por ser amiga y maestra.

### **A mis revisoras**

Por brindarme su valioso tiempo y colaboración.

Licda. María Paula de León

Licda. Vivian Matta

Licda. María Eugenia Paredes

### **A mis padrinos**

Por su sabiduría y sus enseñanzas.

Ing. Marlon Dávila

Lic. Jorge Mario Aguilar

Dr. Byron Rosales

### **A mi entrañable amiga**

Sra. Zoila Esperanza Valladares de Rivera, por todos los momentos que compartimos durante mi época universitaria.

### **A Sheni Garzaro**

Por todo el cariño y apoyo durante la elaboración de mi tesis.

### **A las diferentes instituciones**

Hospital de Instituto Guatemalteco de Seguridad Social (IGSS) de Mazatenango, Hospital Regional de Occidente “San Juan de Dios” de Quetzaltenango y Merck de Guatemala, por su colaboración.

# ÍNDICE

	<b>Página</b>
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
III. ANTECEDENTES	4
A. Malaria o paludismo	4
1. Historia	4
2. Transmisión	5
3. Patología	6
4. Síntomas	7
5. Epidemiología	9
6. Ciclo biológico	17
7. Fisiología, bioquímica y morfología	20
8. Diagnóstico	25
9. Pruebas para la detección de malaria ( <i>P. falciparum</i> <i>P. vivax</i> , <i>P. ovale</i> y <i>P. malariae</i> )	26
IV. JUSTIFICACIÓN	33
V. OBJETIVOS	34
VI. HIPÓTESIS	35
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	36
A. Universo de trabajo	36
B. Materiales	36
C. Procedimiento	37
D. Diseño de la investigación	39
VIII. RESULTADOS	41
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	44
X. CONCLUSIONES	47

XI.	RECOMENDACIONES	48
XII.	REFERENCIAS	49
XIII.	ANEXOS	54

## I. RESUMEN

La Malaria es una enfermedad producida por cualquiera de las cuatro especies de parásitos del género *Plasmodium* capaces de infectar al ser humano (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium ovale*). Se trata de una enfermedad adquirida en forma natural mediante la picadura del mosquito del género *Anopheles* y el hombre constituye la única fuente de infección. El ciclo de vida del agente causal de la enfermedad involucra una fase de multiplicación sexuada en el vector (hospedador definitivo) y otra asexual en el humano (hospedador intermediario) (1).

La malaria constituye en la actualidad una de las enfermedades infecciosas más importantes, no sólo por su elevada incidencia (se estiman más de 100 millones de casos cada año a nivel mundial), sino también por la importante mortalidad asociada (2 millones o más muertes cada año), predominantemente en los países tropicales y subtropicales (2).

A nivel de Centroamérica, Guatemala es considerada como una zona de alto riesgo de malaria, registrando el 40% de los casos. Durante el año 2005 se registraron 101,067 casos, un 25% más que en el año 2004 (75,707 casos) (3,4).

Diagnosticar a tiempo la malaria puede ser vital para el enfermo, ya que la aparición de complicaciones está muy relacionada con la demora de la instauración del tratamiento. El método de diagnóstico de malaria más usado es de la gota gruesa, ya que es altamente sensible, fácil de realizar y con costos directos relativamente bajos, pero tiene las desventajas de que necesita personal técnico calificado y con experiencia, infraestructura adecuada y un buen control de calidad. Varias opciones al diagnóstico microscópico tradicional de malaria han surgido en los últimos años. Algunas de ellas por su alto costo o por su complejidad quedan restringidas a laboratorios de referencia, como por ejemplo las basadas en técnicas de inmunofluorescencia y por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El presente estudio comparó la prueba rápida COMBO PAN/Pf VISITECT con el examen microscópico gota gruesa para el diagnóstico de malaria, con el objetivo de encontrar el grado de concordancia entre ambas pruebas a través del índice *Kappa*. El COMBO PAN/Pf VISITECT es una prueba que detecta malaria debido a *P. falciparum*, *P. no falciparum* o infecciones mixtas; determina si hay infección por malaria al detectar la enzima Lactato Deshidrogenasa (pLDH) específica para *Plasmodium* y adicionalmente determina si existe infección por *P. falciparum*, mediante la detección de la proteína-2 rica en histidina (Pf HRP-2) (5).

Se analizaron 100 muestras, de las cuales 50 provinieron de pacientes que asistieron a la consulta externa del Hospital del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social (IGSS) de Mazatenango con sintomatología sugestiva de malaria y 50 de pacientes sanos, como grupo control,

que no refirieron sintomatología reciente sugestiva de malaria que asistieron al Banco de sangre del Hospital Regional de Occidente “San Juan de Dios” de Quetzaltenango.

Se calculó la sensibilidad, especificidad, eficacia y el índice de concordancia *Kappa* de la prueba rápida COMBO PAN/Pf VISITECT comparado con gota gruesa.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la prueba rápida COMBO PAN/Pf VISITECT presentó una sensibilidad, especificidad y eficacia del 90.9, 97.4 y 96.0%, respectivamente, para detectar *P. falciparum*, mientras que para *P. vivax* presentó un 100% de sensibilidad, 92.3% de especificidad y 98.0% de eficacia.

Debido a que no se obtuvo resultado positivo de las 50 muestras analizadas del grupo control, la sensibilidad y el coeficiencia de concordancia *Kappa* no fueron calculados para la prueba rápida COMBO PAN/Pf VISITECT. Los únicos valores calculados fueron la especificidad y la eficacia, reportando valores del 100%.

Para malaria en general, la prueba rápida COMBO PAN/Pf VISITECT presentó una sensibilidad del 97.9%, especificidad del 96.1%, eficacia del 97% y una óptima concordancia con gota gruesa a través del índice de *Kappa* de 0.94.

Como recomendación principal se plantea que la prueba rápida COMBO PAN/Pf VISITECT pueda ser utilizada como soporte alternativo para el diagnóstico de malaria.

## II. INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad parasitaria que se transmite de un humano a otro por la picadura de mosquitos infectados, específicamente del género *Anopheles*. Durante los primeros momentos de la enfermedad no hay síntomas, pero el primer ataque suele ocurrir de 10 a 35 días después del contagio y va precedido por dolor de cabeza, fatiga, dolores musculares y fiebre baja. El paciente se siente como en los comienzos de una gripe. Después del contagio, los diminutos parásitos del *Plasmodium* circulan por la sangre y se dirigen al hígado donde se reproducen. A intervalos, regresan a la sangre circulante causando los síntomas característicos de la enfermedad (1).

Existen más de 150 especies de *Plasmodium* que infectan diferentes vertebrados, pero solamente cuatro (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*) infectan al hombre. Las dos especies más comunes son *P. falciparum* la cual es la especie más agresiva, causando la muerte principalmente por coma o por anemia y *P. vivax* que causa infecciones debilitantes y recurrentes, pero raramente causa la muerte; ambas especies tienen una distribución global (2).

El diagnóstico de la malaria se ha realizado mediante la observación de las distintas formas del parásito en el examen microscópico de extensiones de sangre periférica teñidas con diversos colorantes; sin embargo, la laboriosidad y la dificultad que entraña observar parasitemias bajas ha impulsado al desarrollo de pruebas rápidas para el diagnóstico de malaria validadas tanto para *P. falciparum* y *P. vivax* como para infecciones mixtas. La implementación de métodos de diagnóstico rápidos y precisos para detectar malaria en el paciente, ha permitido instaurar un tratamiento rápido y apropiado.

Debido a que en la actualidad hay disponibles una gran variedad de métodos diagnósticos rápidos para malaria que difieren en sensibilidad, especificidad, eficacia y concordancia con el de la gota gruesa, se hace necesario evaluar pruebas como el COMBO PAN/Pf VISITECT, como nueva alternativa para dar un diagnóstico rápido y preciso. El COMBO PAN/Pf VISITECT es una prueba que utiliza como principio un inmunoensayo de doble captura, que detecta malaria debido a *P. falciparum*, *P. no falciparum* o infecciones mixtas; determina si hay infección por malaria al detectar la enzima Lactato Deshidrogenasa (pLDH) específica para *Plasmodium* y adicionalmente determina si existe infección debido a *P. falciparum*, mediante la detección de la proteína-2 rica en histidina (Pf HRP-2) (5).

En el presente estudio se evaluó la sensibilidad, especificidad, eficacia y el índice de concordancia *Kappa* entre la prueba rápida COMBO PAN/Pf VISITECT y el examen microscópico gota gruesa.

### III. ANTECEDENTES

#### A. MALARIA O PALUDISMO

Es una enfermedad causada por el parásito del género *Plasmodium*. Existen más de 150 especies de *Plasmodium* que infectan a diferentes vertebrados, pero solamente cuatro (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*) pueden infectar al hombre, entre éstas, las dos especies más comunes en el mundo son: *P. falciparum* que es la especie más agresiva, la cual causa la muerte principalmente por coma o por anemia y *P. vivax* que puede causar infecciones debilitantes y recurrentes, pero raramente puede causar la muerte (2).

##### 1. Historia

La malaria o paludismo es una de las enfermedades más antiguas, afectando a la humanidad desde las épocas más remotas. Se piensa que el hombre prehistórico debió haber sufrido de malaria. Probablemente esta enfermedad se originó en África y acompañó a las migraciones humanas al Mediterráneo, a la India y a Asia Sur Oriental. Los antiguos escritos médicos de China, Asiria e India describen fiebres intermitentes maláricas, las cuales eran atribuidas a espíritus diabólicos. En el siglo V A.C. Hipócrates describió los síntomas de la enfermedad, atribuyendo el origen de la misma a los vapores y emanaciones fétidas de los pantanos y esteros, lo cual, por veinticinco siglos se mantuvo y reforzó con la observación de que con la desecación de los pantanos disminuían los casos de malaria.

En 1880 Laveran descubrió formas asexuadas y gametos de *P. falciparum*; Romanowsky en 1891 creó una técnica para teñir frotis sanguíneos con la finalidad de estudiar la etapa eritrocítica del parásito. En 1897 William McCallum comprobó y describió el ciclo sexual de la malaria, observando la penetración y fertilización del gameto femenino en el mosquito *Anopheles*. En 1898 Sir Ronald Ross, demostró que en el paludismo aviario, el protozoo se desarrollaba en el estómago de los mosquitos infectados, el cual emigraba a las glándulas salivales, donde podía infectar a pájaros sanos; más tarde, Bigman, Bastianelli y Grassi comprobaron la transmisión del paludismo al hombre por el mosquito *Anopheles*. Durante el siglo XX la aplicación de la medicina preventiva para el control de la malaria tuvo grandes logros. En 1906 William Gorgas trató de controlar al mosquito del género *Anopheles* en el canal de Panamá. En 1912 Bass y John fueron los primeros en reportar el desarrollo del parásito de la malaria *in vitro*, utilizando sangre desfibrinada de pacientes infectados con *P. falciparum* y *P. vivax* la cual fue cultivada a 37 °C, en viales de vidrio a los que se les añadió glucosa (6,7,8).

Durante la Segunda Guerra Mundial se dio inicio a la utilización de insecticidas de acción residual, principalmente del tipo DDT, para el control del vector de la malaria, comprobando la

eficacia de los mismos. La malaria fue declarada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como problema primordial en las reuniones de Santiago de Chile en 1954 y en México en 1955, con lo cual puso en marcha un Programa de erradicación; países como Estados Unidos, Venezuela, Cuba y otros, lograron su total erradicación, pero en la mayoría de países, después de logros prometedores, la situación se ha deteriorado por diversas causas: Resistencia de los mosquitos a los insecticidas, elevación de los costos operacionales, dificultades en el financiamiento, etc., de manera que actualmente, la malaria infecta no menos de 800 millones de personas en el mundo, de las cuales 150 millones presentan la enfermedad y mueren por esa causa un millón de personas al año (9).

La evidencia escrita dejada por las culturas mayas y aztecas no hace referencia alguna a la existencia de malaria, sin embargo en la mitología maya Kukulcan era considerado como el dios que curaba las fiebres, por lo que se supone que la enfermedad fue confundida en las descripciones de las epidemias y pestes que azotaron al país. Las primeras referencias que hacen suponer sea malaria son: En 1852 la tesis de Rodríguez titulada “Fiebres intermitentes”, y en 1861 el trabajo de tesis de Gándara titulado “Qué son las fiebres palúdicas y su tratamiento” (1).

La Fundación Rockefeller, en 1922 auspicia el “Carro Dispensario”, cuyo propósito era atender a las poblaciones ubicadas a lo largo de la línea férrea; continuando hasta 1927, cuando se organizó la Dirección General de Sanidad Pública, la cual fundó sus laboratorios dos años mas tarde (el 12 de octubre de 1929). Durante la década de los treinta, Giaquinto (malariólogo italiano) y De León efectuaron importantes trabajos, los cuales fueron publicados en Boletines Sanitarios; posteriormente en 1955, se organizó el Servicio Nacional de Erradicación de la Malaria (SNEM) y en 1956 se promulgó el Decreto Legislativo 1,080 “Ley de Erradicación de la Malaria”, lográndose resultados satisfactorios, al grado que en 1963 los casos de paludismo y muertes habían descendido notablemente, por lo que se creyó su pronta erradicación, pero con el terremoto del 4 de febrero de 1976 se deterioraron los logros alcanzados, al extremo que en 1984, según la Memoria de la División de Malaria, se diagnosticaron 74,132 casos, de ellos 67,597 correspondían a *P. vivax* y 6,535 a *P. falciparum* (1).

## **2. Transmisión**

La malaria se trasmite por la picadura del mosquito del género *Anopheles*, el cual se encuentra infectado con *Plasmodium*, siendo la hembra la responsable de la transmisión de la enfermedad, ya que es capaz de infectarse y de permitir el ciclo esporogónico completo de *Plasmodium*. Dentro del mosquito, los parásitos se multiplican sexualmente (esporogonia) en el tubo digestivo y se desarrollan en las glándulas salivares; cuando el mosquito inocular los parásitos en un huésped sano, éstos colonizan primero el hígado, donde tienen varios ciclos de multiplicación

asexuada, para posteriormente salir e invadir los glóbulos rojos, en donde los parásitos se reproducen en forma asexuada (esquizogonia), presentándose una fiebre como el primer síntoma de la enfermedad, la cual es producto de la destrucción de los glóbulos rojos infectados; así mismo algunos merozoitos, dentro de los glóbulos rojos, se transforman en gametocitos machos y hembras, cuando un mosquito ingiere estos gametocitos maduros al succionar la sangre, se inicia el ciclo de reproducción sexual, que culmina en la producción de esferozoitos infecciosos para los seres humanos (Anexo 1) (10,11,12).

### **3. Patología**

Las alteraciones patológicas son fundamentalmente vasculares, destrucción de eritrocitos y bloqueo de capilares en las vísceras. En cada liberación sucesiva de merozoitos de los glóbulos rojos, grandes cantidades de hemoglobina son liberadas. Esta liberación desencadena una reacción humoral y celular que tiene por resultado la fagocitosis de parásitos, células infectadas, pigmento y restos celulares por histiocitos libres y macrófagos fijos del sistema retículo endotelial, en especial del bazo, que por este motivo se hipertrofia considerablemente.

La hematina o la hemozoina que se encuentra en el parásito, glóbulos rojos infectados y en el plasma es fagocitada primero por los leucocitos de la sangre, luego por los macrófagos fijos y libres del sistema retículo endotelial. Su depósito por estas células en los distintos órganos agrava la reacción inflamatoria crónica. En el plasma se acumula hemoglobina y metaalbúmina; la hemoglobina libre que no se transforma en hematina, rápidamente da lugar a bilirrubinas que son absorbidas por el hígado y excretada con la bilis (13,14).

El hígado puede mostrar aumento o necrosis de las células parenquimatosas, particularmente en las regiones de las venas centrales, debido a que el hierro de la hemoglobina no se utiliza de inmediato para formar hemoglobina nueva, depositándose como hemosiderina en las células parenquimatosas del hígado. La captación del pigmento palúdico por el sistema retículo endotelial produce pigmentación intensa en el bazo, ganglios linfáticos y médula ósea, de allí su color café amarillento.

La intensa anemia de los palúdicos no suele poderse explicar solamente por la destrucción de los glóbulos rojos, es posible que contribuya una hemólisis autoinmune (15).

La anoxia tisular se debe a una disminución en el número de glóbulos rojos, trombosis múltiple de los pequeños vasos sanguíneos y disminución del volumen sanguíneo circulante.

El carácter pegajoso de los eritrocitos infectados y las alteraciones físicas y químicas del plasma sanguíneo producen aglutinación de los glóbulos rojos y su adherencia al endotelio capilar. Se presentan trastornos circulatorios graves, a través del bloqueo de los capilares por la

acumulación de eritrocitos parasitados y fagocitados, mayor viscosidad del plasma y entorpecimiento de la circulación capilar (13,14).

Durante los accesos de fiebre, aumenta momentáneamente el potasio, glucosa, colesterol y lecitina del suero, en tanto que el fosfato disminuye. Cuando cede la fiebre y desaparecen los parásitos asexuales, se presenta reticulocitosis. En los riñones son raras las lesiones; cuando las hay los túbulos renales están bloqueados con restos defectuosos de hemoglobina. La hinchazón y degeneración del epitelio tubular, así como restos de hemoglobina indican que la nefrosis hemoglobinúrica puede estar presente. La alteración glomerular, consiste en isquemia generalizada, ensanchamiento y aumento celular del glomérulo.

En las infecciones mortales por *P. falciparum* el cerebro está edematoso, de color rojo obscuro y notablemente congestionado, microscópicamente la corteza es gris o parda, pueden encontrarse hemorragias petequiales en los tejidos perivasculares. Los capilares del cerebro contienen muchos glóbulos rojos infectados y fagocitados (13,15).

#### **4. Síntomas**

Durante los primeros momentos de la enfermedad no hay síntomas. Después del contagio, los diminutos parásitos del plasmodio circulan por la sangre y se dirigen al hígado donde se reproducen. A intervalos, regresan a la sangre causando los síntomas característicos de la enfermedad. Los primeros síntomas suelen ocurrir de 10 a 35 días después del contagio y consisten en dolor de cabeza, fatiga, dolores musculares y fiebre baja. El paciente se siente como en los comienzos de una gripe. El ataque agudo se inicia con episodios febriles precedidos por escalofrío, seguidos de intensa sudoración, a repeticiones de cada 48 o 72 horas, según la especie de *Plasmodium*.

Antes de iniciarse el episodio febril se presenta un período de escalofríos, frío intenso y progresivo seguido de temblor incontrolable. Esta fase tiene una duración hasta de media hora. Seguidamente, asciende la temperatura (38 °C) hasta desaparecer el escalofrío, apareciendo el episodio febril cuya duración es de más o menos 6 a 8 horas. Este episodio febril suele acompañarse de otros síntomas tales como cefalea intensa, mialgias, artralgias, náuseas, vómito y malestar general. Durante este episodio se observa la eliminación de una cantidad reducida de orina concentrada. Se debe considerar como un síntoma frecuente del acceso palúdico, el delirio, a veces, las convulsiones y la pérdida del conocimiento (16).

Durante la sintomatología clínica de la enfermedad se presentan las siguientes etapas:

### **a. Período de incubación**

El periodo de incubación depende de la especie que provoca la infección. El lapso que media entre la picadura del mosquito infectante y la aparición del cuadro clínico es de unos 12 días para *P. falciparum*, 14 para *P. vivax* y *P. ovale*, y 30 días para *P. malariae*.

En las zonas templadas principalmente, se ha observado que en algunas cepas de *P. vivax* puede haber un período de incubación más largo (8 a 10 meses), e incluso ser de mayor tiempo como en el caso de *P. ovale*. Cuando la infección se debe a una transfusión de sangre, los períodos de incubación dependen del número de parásitos que han penetrado; suelen ser breves, pero pueden llegar hasta unos dos meses (10,17).

### **b. Período de parasitemia**

Se divide en: parasitemia subpatente y parasitemia patente.

La parasitemia subpatente no presenta un número elevado de parásitos de *Plasmodium*; por el contrario la parasitemia patente presenta un número elevado de parásitos de *Plasmodium*, pero la persona aún no presenta accesos febriles. De inmediato se presenta el ataque primario que se caracteriza por una serie de accesos febriles intermitentes a intervalos de 48 horas con *P. vivax* y *P. falciparum*, y 72 horas con *P. malariae*. Los accesos se inician con una sensación de frío o de temblor durante más o menos una hora, luego la temperatura sube a 39.5 y 41 °C, la cara enrojece, el pulso es rápido, hay cefalea, náuseas, vómitos y en los niños pequeños pueden haber convulsiones. Posteriormente hay una fase de sudoración profusa, la temperatura corporal desciende, desaparece la cefalea, de manera que en pocas horas el paciente se encuentra asintomático, aunque agotado. El episodio febril dura de 8 a 12 horas, pero es más prolongado en las infecciones por *P. falciparum*. Se considera que el episodio ocurre debido a la intensa producción de merozoitos, a la hemólisis por destrucción de glóbulos rojos parasitados y a la liberación de hemoglobina o productos metabólicos por choque.

Durante los escalofríos hay leucopenia, en especial linfocitopenia; después hay leucocitosis con aumento de linfocitos y monocitos; se produce anemia secundaria que se agrava con el número de accesos febriles. Puede presentarse hipertrofia aguda del bazo; dolor en el cuadrante superior izquierdo del abdomen, debido a distensión de la cápsula esplénica y una pequeña hemorragia subcapsular.

Sólo el 2% de los pacientes presenta albuminuria, es por ello que la función renal no presenta mayores alteraciones. Entre las complicaciones más frecuentes de los ataques agudos están: Cefalea intensa, dolor periorbitario, queratitis déndrica o herpética, fotofobia, herpes labial, uveitis y hemorragias alérgicas (1,10,17).

### **c. Infección perniciosa**

Es producida por *P. falciparum* y se caracteriza por que los eritrocitos infectados obstruyen los capilares. La infección perniciosa tipo cerebral presenta el siguiente cuadro clínico: meningitis, encefalitis, delirio, parálisis o convulsiones, edema e hipertensión intracraneal, hipotermia y muerte. El tipo septicémico se caracteriza por presentar fiebre elevada, delirio, cefalea, síntomas de insolación, cianosis y hemorragias internas; la muerte sobreviene por insuficiencia cardíaca y colapso circulatorio (1,10).

### **d. Fiebre biliosa hemoglobinúrica**

Es también llamada “fiebre de aguas negras” y produce del 20 al 25% de mortalidad. Se observa en infecciones producidas por *P. falciparum* y en pacientes tratados con quinina. Es un síndrome hemolítico agudo producido por hemólisis intravascular; el cuadro clínico que presenta es: fiebre, náuseas, vómitos, ictericia y en ocasiones oliguria y anuria. Su presencia se atribuye a una deficiencia de la enzima deshidrogenasa presente en la glucosa-6-fosfato y a la incapacidad del hígado para metabolizar la hemoglobina que resulta de la destrucción de los eritrocitos, lo que conlleva a producir hemoglobinemia, bilirrubinemia y hemoglobinuria (1,10).

### **e. Período de remisión**

Periodo en el cual, los parásitos del *Plasmodium* quedan con formas intraeritrocitarias por lo que no se encuentran en el torrente sanguíneo y el paciente después de varios accesos febriles obtiene inmunidad, liberándose de la infección. Las infecciones producidas por *P. falciparum* desaparecen en menos de un año, las de *P. vivax* de un año a 18 meses y las de *P. malariae* dan recaídas después de 20 a 30 años (1).

### **f. Paludismo crónico**

Puede ser benigno, pero si el paciente continúa en una zona endémica, hay posibilidad de reinfecciones, recaídas y secuelas, que lo conlleva a un deterioro del estado general del paciente, presentando anemia, esplenomegalia, apatía y debilidad (1).

## **5. Epidemiología**

El paludismo es más común en las regiones que se encuentran por debajo de los 1,800 metros sobre el nivel del mar, constituyendo una de las causas principales de morbilidad en esas regiones (18).

*P. falciparum* y *P. vivax* están dispersos en todas las zonas tropicales y subtropicales, sobre todo en las regiones calientes y húmedas. El paludismo por *P. malariae* también es muy frecuente

pero tiende a distribuirse en forma menos uniforme. El paludismo por *P. ovale* se observa sobre todo en África Occidental, pero ha sido reportado en China, América Central, Medio Oriente y costa Oeste de Sur América (18,19,20).

El paludismo es endémico en diversas partes de África, Asia, Centro América y Sur América, donde los factores ambientales (temperatura, humedad y agua estancada) facilitan el desarrollo del vector, el cual se hallan en estrecho contacto con el hombre. La enfermedad en estas zonas origina una elevada mortalidad infantil y síndromes de paludismo crónico (Anexo 2).

La malaria continúa siendo la enfermedad parasitaria más importante en el mundo, ya que afecta a más de 100 millones de personas por año y se estima que aproximadamente el 1 por ciento de estos casos mueren de la enfermedad, aunque estas cifras pueden variar desde menos de 1 por ciento a más de 10 por ciento, según la especie de *Plasmodium* más frecuente, el nivel de la inmunidad, el huésped y la disponibilidad de tratamiento médico inmediato (21).

La epidemiología del paludismo es inseparable de la de sus mosquitos vectores. Los entomólogos tienen que estudiar muy bien las diversas características y los aspectos cambiantes de las muchas especies de *Anopheles*, incluyendo sus costumbres de vuelo y reposo, hábitos alimentarios y grado de resistencia a los insecticidas. Por ejemplo, un cambio reciente en los hábitos de vida del mosquito de doméstico a selvático en Centro América ha disminuido la eficacia de las técnicas usuales de rociamiento residual casero de DDT. Se han registrado varios casos en los cuales los hábitos de comida de los mosquitos cambiaron de los bovinos al hombre y el resultado fue un paludismo epidémico (18,19,20).

Aunque el mosquito es el vector principal del paludismo, puede ocurrir infección por transfusión sanguínea, o por el empleo de jeringas infectadas. La Asociación Americana de Bancos de Sangre recomienda que no se obtenga sangre de ninguna persona que provenga de áreas endémicas, visitado una zona palúdica o haya sufrido paludismo durante los tres años anteriores (3,21).

Mucho se ha hecho para erradicar la malaria en muchas partes del mundo, pero la esperanza de la eliminación total está distante del futuro inmediato. Sin embargo en los países menos desarrollados el paludismo es todavía uno de los principales problemas de la salud pública en donde los procesos de erradicación no han sido eficaces por las siguientes razones: Los países no reportan todas sus áreas maláricas, resistencia a insecticidas residuales especialmente DDT, resistencia de las cepas de *Plasmodium* a agentes quimioterapéuticos e impedimentos políticos debido al alto costo de mantenimiento de un sistema de reconocimiento completo de la enfermedad (9,22).

Las técnicas seroepidemiológicas juegan un papel vital en estos tiempos, ya que éstas pueden ser usadas para estudios de grupos de poblaciones en un período de tiempo corto y pueden proveer mucha información importante. Las enfermedades parasíticas ofrecen un gran reto a

médicos, epidemiólogos y microbiólogos. La sintomatología es raramente patognomónica y la infección puede no causar manifestaciones clínicas y además puede presentar diferente sintomatología, múltiples infecciones por parásitos y no parásitos pueden presentar sintomatología común, y la respuesta del huésped puede ser modificada por factores externos (malnutrición, infecciones coexistentes) por factores del huésped (edad, capacidad inmunológica).

La extensión exacta de morbilidad y mortalidad en el mundo debido a agentes infecciosos, incluyendo infecciones parasíticas, no se conoce precisamente, por falta de estadísticas confiables e índices de sanidad. En ciudades tropicales y sub-tropicales las enfermedades parasíticas son especialmente importantes, porque estos parásitos se ubican usualmente en el ambiente. Se requieren datos de incidencia y prevalencia de estas enfermedades para usos óptimos a favor de programas de salud pública.

Los objetivos de la investigación seroepidemiológica son para obtener datos en el nivel y clase de anticuerpo contra antígenos específicos en el suero de un grupo de personas y así contribuir al conocimiento de la epidemiología de la enfermedad.

Los servicios de salud pública y los programas de control de enfermedades, realizan estudios en términos de incidencia y/o prevalencia de las enfermedades. Estos índices dependen usualmente de la información demográfica y registro de mortalidad. Estos datos pueden ser incompletos o no confiables, especialmente en ciudades en vías de desarrollo, y por eso los métodos serológicos son más eficaces para estudios de malaria en áreas donde la enfermedad es o tiende a ser endémica, midiendo la intensidad y distribución geográfica de la infección. Además los métodos serológicos son más eficaces, cuando la prevalencia es demasiado baja para obtener datos confiables por métodos parasitológicos, o cuando la evaluación endémica de la malaria por la parasitología puede estar comprometida por el uso de drogas antimaláricas (18,19,22,23).

En áreas no maláricas, las técnicas serológicas tienden a ser usadas para detectar posibles infecciones en donadores de sangre y para excluir la probabilidad de malaria en pacientes con fiebre de origen no determinado (24).

#### **a. Malaria en Guatemala**

- **Área malárica**

El área malárica en Guatemala comprende el 74 por ciento del territorio nacional (80,350 km<sup>2</sup>), y de los 22 departamentos sólo Sacatepéquez y Totonicapán están completamente fuera de dichas áreas, los demás departamentos están incluidos parcial o totalmente (19,25).

El área malárica se divide en tres zonas ecológicas que incluyen a los siguientes departamentos:

- a. Zona litoral del Pacífico: Comprende 10 departamentos con extensión de 11,46 km<sup>2</sup>, los cuales son: San Marcos, Quetzaltenango, Suchitepequez, Sololá, Escuintla, Santa Rosa, Jutiapa, Guatemala y Chimaltenango.
- b. Zona Centro Oriental: Comprende 11 departamentos con una extensión de 13,648 km<sup>2</sup>, los cuales son: Baja Verapaz, El Progreso, Zacapa, Chiquimula, Huehuetenango, Chimaltenango, Guatemala, Santa Rosa, Jutiapa, Quiché y Jalapa.
- c. Zona del Norte: Comprende 5 departamentos con una extensión de 55,205 km<sup>2</sup>, los cuales son: Huehuetenango, Alta Verapaz, Izabal, Petén y Quiché (25).

- **Datos epidemiológicos**

A partir de 1955 se diagnosticaron 3 especies de malaria, siendo *P. vivax* con 295 casos, *P. falciparum* con 35 casos y *P. malariae* con 1 caso, a partir de un total de 3,716 muestras de sangre estudiadas. En el año de 1956 se reportaron 7 casos de malaria relacionados a *P. vivax* y *P. falciparum* y en el año de 1957 hubo un mayor porcentaje de positividad, siendo ésta de 24.32 por ciento, para un total de 2,698 muestras sanguíneas, de las cuales 4 casos eran de *P. malariae* y la especie que más prevaleció fue *P. vivax*.

En la década de 1960 a 1970 hubo un aumento progresivo en el número de muestras sanguíneas estudiadas, probablemente debido a que se implantó la red de colaboradores voluntarios.

En el año de 1964 se presentó el mayor porcentaje de positividad, siendo de 7.05 por ciento, con 20,401 casos positivos de un total de 289,059 muestras. Del año de 1960 a 1966 fue cuando se reportó el mayor número de casos causados por *P. malariae*, siendo el año de 1963 el más alto con 43 casos. En 1964 se reportaron 234 casos asociados. En 1969 se estudiaron 521,336 muestras sanguíneas con 10,494 casos positivos.

Del año de 1970 a 1975 se obtuvo un porcentaje de positividad bastante bajo, 1.19 por ciento (1975) en comparación con el 2.5 por ciento (1970), el número de casos disminuyó de 11,044 (1970) a 4,979 (1975). En el año de 1971 se reporta el último caso de *P. malariae* en Guatemala. Este descenso en el número de casos, se debe a que en este período se intensificaron las campañas de prevención y erradicación de la malaria, encaminadas principalmente a controlar al insecto vector, usando insecticidas como DDT y Dieldrin.

En 1976 se tomaron 435,097 muestras sanguíneas, de las cuales 9,616 fueron positivas, este aumento se debió al fuerte daño en la infraestructura del país, debido al movimiento telúrico acaecido en ese año. A partir del año de 1977 hasta la fecha se observa un aumento progresivo en el número de casos, teniéndose el mayor en 1982 con 77,375 casos positivos, debido a la situación política que sufre el país desde 1979. En este año también se registró el mayor número de casos correspondiente a *P. vivax* (69,534) y *P. falciparum* (7,398) (18,26).

En 1979 el total de habitantes que residían en áreas maláricas era de 2,643,865, de los cuales se estudiaron 440,712 muestras sanguíneas con un total de 62,657 casos positivos de malaria (26,27).

En 1982, a nivel nacional el número de habitantes residentes en áreas maláricas fue de 2,905,099. De un total de 468,430 muestras sanguíneas analizadas, 77,375 (16.5%) fueron positivas (28).

Para el año de 1983 residían 3,003,485 de habitantes en áreas maláricas, se examinaron 442,745 muestras, de las cuales 64,024 (14.5%) fueron positivas (29).

En el año de 1984, se estudiaron 526,694 muestras sanguíneas, con 74,132 (14%) casos positivos (30).

Durante los años de 1979 a 1984 el mayor número de casos se registró en el departamento de Escuintla. Entre los departamentos que han incrementado el número de casos aparte de Petén, está Alta Verapaz, que ocupó el tercer lugar en incidencia en el año de 1984.

El departamento de Escuintla demuestra la mayor incidencia de *P. falciparum* desde 1979 hasta 1984, seguido de Petén, así mismo, se demuestra que en Sacatepéquez y Totonicapán, casi no se reportan casos desde 1983.

En 1994 la malaria generó 21,996 casos registrados y 90 defunciones. En 1995 se registraron 23,608 casos y 108 defunciones, de los cuales un caso de dengue hemorrágico se registró en Escuintla. En 1996 se registraron 21,556 casos de malaria clínica, 7,795 de ellos confirmados, de los cuales el 86% correspondieron a *P. vivax* y 0.7% a *P. falciparum*. En 1999 se diagnosticaron 45,098 casos, de los cuales 43,391 correspondieron a *P. vivax* y 1,707 a *P. falciparum* e infecciones mixtas (asociación de *P. falciparum* y *P. vivax*). Durante el año 2000 se presentaron 48,213 casos, lo que constituye un aumento de 7% frente al número de 1999. Hasta la semana 46 del año 2003 se reportó un total de 72,729 casos. El comportamiento de la malaria para el año 2004 es similar al del año inmediatamente anterior (2003), aún a pesar de las medidas implementadas hasta la semana 46 del 2004 se reportaron: 62,070 casos de malaria clínica, 13,265 casos de malaria a *P. vivax*, 335 casos de malaria *P. falciparum* y 37 casos asociados, con un gran total de 75,707 casos. Durante el año 2005, la incidencia de la enfermedad aumentó de forma significativa, pues se detectaron 101,067 casos, un 25% más que en el mismo periodo del año anterior, con una media de 1,944 casos por semana. La distribución de las especies parasitarias fue: 15,992 casos de *P. vivax*, 12,393 (77.5%) se identificaron en áreas de alto riesgo, 2,549 (15.9%) en mediano riesgo y 1,050 (6.6%) en bajo riesgo. Respecto a *P. falciparum*, de los 639 casos diagnosticados, 477 (74.6%) procedieron del área de alto riesgo, 162 (25.4%) de áreas de mediano y bajo riesgo (3,4) (tabla 1).

Tabla 1  
Casos de malaria por áreas de riesgo

Caracterización	CASOS					
	<i>P. vivax</i>		<i>P. falciparum</i>		TOTAL	
	No	%	No	%	No	%
Alto riesgos	12,393	77.5	477	74.7	12,870	77.4
Mediano riesgo	2,549	15.9	81	12.7	2,630	15.8
Bajo riesgo	1,050	6.6	81	12.7	1,131	6.8
<b>TOTAL</b>	<b>15,992</b>	<b>100</b>	<b>639</b>	<b>100</b>	<b>16,631</b>	<b>100</b>

**Tomado de:** Ministerio de Salud Pública. Disponible en <www.mspas.gob.gt>.

Los Departamentos de Alta Verapaz, Petén Sur Occidente, Petén Sur Oriente, Petén Norte, Retalhuleu e Izabal formaron los Departamentos del área de alto riesgo. De los 12,393 casos de *P. vivax*, Alta Verapaz contribuyó con el 16.9% de los casos, mientras que Petén Sur Occidental, Petén Sur Oriente y Petén Norte contribuyeron con el 39.9%, 31.0% y 2.7% respectivamente, así mismo Retalhuleu contribuyó con el 3.1% e Izabal con el 6.4%. De los 477 casos de *P. falciparum* reportados, Alta Verapaz contribuyó con el 23.7% de los casos, mientras que Petén Sur Occidental, Petén Sur Oriente y Petén Norte contribuyeron con el 32.5%, 31.0% y 9.2% respectivamente, así mismo Retalhuleu contribuyó con el 1.3% e Izabal con el 2.3% (4) (tabla 2).

Tabla 2  
Casos de malaria por departamentos en áreas de alto riesgo

Departamentos	TOTAL DE CASOS			
	<i>P. vivax</i>		<i>P. falciparum</i>	
	No.	%	No.	%
Alta Verapaz	2,103	16.9	113	23.7
Petén Sur Occidental	4,949	39.9	155	32.5
Petén Sur Oriente	3,836	31.0	148	31.0
Petén Norte	337	2.7	44	9.2
Retalhuleu	378	3.1	6	1.3
Izabal	790	6.4	11	2.3
<b>TOTAL</b>	<b>12,393</b>	<b>100</b>	<b>477</b>	<b>100</b>

**Tomado de:** Ministerio de Salud Pública. Disponible en <www.mspas.gob.gt>.

Los casos fueron reportados principalmente en personas de 14 a 24 años. Los vectores involucrados en la transmisión son los siguientes: *A. albimanus*, *A. darlingi*, *A. pseudopunctipennis* y *A. vestitipennis*.

El género masculino es el principal afectado, existiendo mayor incidencia en personas de 15 años en adelante. Además, conforme aumenta la edad aumenta también el número de reinfecciones, ésto es debido a la mayor exposición en las labores del campo y actividades migratorias en busca de mejoras salariales y condiciones de vida (26,28-30).

A pesar que los programas de erradicación de la malaria que existen desde hace varios años, se viene observando en el área de América Central, mosquitos resistentes al DDT, Dieldrin, Fenitrothion y Clorfoxim, por lo que se adelantan estudios con Cyflutrin; ésto principalmente en la zona ecológica del Sur de Guatemala. Asimismo, se ha observado una elevación de casos maláricos. Dicho incremento ha alcanzado niveles nunca antes registrados (9,31).

En Guatemala el control antimalárico se estableció en 1930 con la Oficina Química del Estado. En 1954 se planteó transformar la lucha de control por la lucha de erradicación. En 1956 se creó el programa de erradicación de la malaria, según Acuerdo Gubernativo 10-30. En 1960 se creó la red de colaboradores voluntarios de la comunidad, con la función de captar a las personas con sintomatología sugestiva de malaria, someterlas a tratamiento y enviar muestras de gota gruesa, de cada una de ellas, a los laboratorios más cercanos del programa. Estas muestras representan el 75 por ciento de las muestras procesadas por el Servicio Nacional de Erradicación de la Malaria (19,26).

Las especies de *Plasmodium* presentes en Guatemala son: *P. vivax* y *P. falciparum*; siendo la primera la más abundante (30).

Dentro de la distribución de mosquitos vectores se encuentran en Guatemala los siguientes: *A. albimanus*, *A. pseudopunctipennis*, *A. vestitipennis*, *A. darlingi*, *A. punctimacula*; siendo el mosquito *A. albimanus* el más encontrado. Los mosquitos que han encontrado resistencia a algunos plaguicidas en Guatemala son: *A. albimanus* y *A. pseudopunctipennis*.

Desde 1954, ya se usaba DDT (2g/m<sup>2</sup> semestralmente) y luego se decidió usar Dieldrin (0.6 g/m<sup>2</sup>, dosis menor que la recomendada, que es 1 g/m<sup>2</sup> anualmente), sin el control médico del personal de campo; dos años después se suspendió por supuestas intoxicaciones y se continuó con el uso del DDT, hasta que apareció resistencia al mismo, particularmente por parte de *A. albimanus* (9,25,31).

En 1975 se usó Propoxur, suspendiéndose en 1976 los rociamientos por falta de tiempo. Para controlar tanto al mosquito como al *Plasmodium*, el esquema que actualmente utiliza el SNEM en las campañas de erradicación se basa en el tratamiento de las localidades con brotes epidémicos,

dándole tratamiento a la totalidad de la población y utilizando a la vez aplicaciones de piretrinas (26).

Aunque en otras regiones del mundo, se ha reportado resistencia genética a la cloroquina, el tratamiento administrado aquí con mucho éxito es la cloroquina más primaquina en la forma tradicional de 14 días, o en la variante que reduce el tratamiento a 8 días. Este tratamiento de menor duración es preferido, porque los pacientes suelen no continuar con el tratamiento, cuando su duración es de 14 días debido a la mejoría que observan (9).

Para una mejor interpretación de la situación de la malaria en Guatemala, es conveniente tomar en cuenta que en la década de 1940 se registraron 30,000 casos anuales, con 13,000 muertes anuales, siendo la primera causa de morbilidad y la segunda de mortalidad en la república. En 1955, los casos llegaron a 351 o sea el menor número registrado en toda la historia malárica en Guatemala, pero desde entonces la morbilidad subió anualmente hasta 22,045 casos en 1966, y descendió de nuevo a 4,030 casos en 1974 (18,19,26).

A pesar de todas las medidas de control, se ha mencionado el incremento en las tasas de prevalencia de la malaria desde el año 1974. De una tasa de un 1 por ciento en 1975 se eleva hasta 9.6 por ciento en 1976. Desde entonces la prevalencia ha seguido aumentando, ya que en 1984 se registraron 74,132 casos, mientras que en 1975 no llegaban a 5,000. La causa del aumento de la prevalencia se debe a diversas causas políticas, económicas, sociales y biológicas entre las cuales están:

- El terremoto ocurrido en 1976: Aquí los plaguicidas asignados a los programas de erradicación, fueron utilizados para fumigar las áreas del desastre.
- La situación política imperante en el país, por lo cual no fue posible llevar a cabo el control apropiado de las enfermedades, en algunas áreas.
- La migración de personas o poblaciones a varios lugares, por causas diversas. Abandono de las áreas de conflicto, movilización a zonas de producción de caña, café, algodón y cardamomo. Dichas poblaciones emigran por lo general de las tierras altas (libres de malaria) a regiones costeras, en donde la malaria es endémica (25).
- La expansión de la agricultura, sobre todo de ciertos cultivos como el algodón, que requiere un excesivo uso de insecticidas para su desarrollo.
- Problemas financieros, ya que el costo de la campaña es muy elevado (9,25,32).
- La falta de una prueba que detecte pacientes maláricos aún cuando no estén presentes los síntomas.
- La resistencia de los mosquitos a los plaguicidas, ya que éste parece ser el principal obstáculo para el éxito del programa en otras regiones del mundo; sin embargo ya se

comprobó que la resistencia no es adquirida por los insecticidas químicos empleados por los programas de erradicación, sino por el tremendo uso que de ellos han hecho la agricultura (9).

El ICAITI (Instituto Centroamericano de Investigación de Tecnología Industrial) y el Programa de Saneamiento Ambiental, evaluaron la relación de la producción del algodón y el recrudescimiento de la malaria, en las áreas de cultivo y encontraron que la resistencia al DDT para *A. albimanus* ha aumentado en estas áreas, tanto que las resistencias en las regiones algodoneras en Guatemala se elevaron de 58 por ciento a 86 por ciento entre 1960 y 1970. Ante esto, las campañas aplicaron plaguicidas más caros y con más frecuencia, disminuyéndose así los niveles de malaria en esas áreas. En otros países bajo las mismas condiciones no se tuvieron los mismos resultados (9,32).

Por otro lado, hace una década se fumigaba 8 a 9 veces por estación, ahora debido a que las pestes propias del algodón han adquirido resistencia a los venenos, debe de fumigarse hasta 50 veces y por lo tanto el espectro de veneno ha aumentado. En Guatemala en el año de 1972 se rociaron 46.6 kg/ha (9).

Hay que tener en cuenta que por cada kilo de insecticida, usado en el medio, podrían generarse 105 nuevos casos de malaria (32).

## 6. Ciclo biológico

El paludismo se transmite principalmente por la picadura de la hembra del mosquito *Anopheles* infectada por parásitos palúdicos. Sólo la hembra pica al hombre y se alimenta con su sangre. El macho sólo se alimenta de jugos vegetales y no desempeñan ningún papel en la transmisión de la enfermedad (24).

La hembra que necesita sangre como fuente de proteínas para el desarrollo y maduración de los huevos; ha desarrollado sus órganos bucales de forma que pueda perforar la piel y los vasos sanguíneos.

Después de la maduración de los huevos, las hembras se dirigen desde el lugar de su alimentación a los estanques en donde efectúan la puesta de los huevos. La complejidad de los procesos que tienen lugar desde que chupan sangre, hasta que efectúan la puesta de los huevos, constituye el ciclo gonotrófico de la hembra. Todo el ciclo de desarrollo del mosquito, desde la fecundación, el desarrollo del huevo, de la larva y la ninfa hasta la aparición del mosquito alado, se efectúa en el transcurso de 2 a 4 semanas (2,17).

Una vez que la hembra del *Anopheles* ingiere sangre que contiene los parásitos del *Plasmodium*, se inicia el ciclo biológico del mismo, el cual se divide en dos fases:

La **fase sexual o esporogonia** dura de una a tres semanas en condiciones favorables. *P. vivax* y *P. falciparum* completan su desarrollo en el mosquito en 7 a 14 días. *P. ovale* necesita más días y *P. malariae* requiere 3 semanas o más (33).

El ciclo biológico de *Plasmodium* en su fase sexual se inicia cuando el mosquito ingiere los gametocitos provenientes de una persona con infección malárica, luego el microgametocito emite de 4 a 6 flagelos móviles, cada uno conteniendo una porción de cromatina nuclear. Los flagelos se separan del microgameto (exoflagelación) y migran hacia el microgameto y lo fertilizan con lo cual termina la gametogonia y se inicia la esporogonia (6,13).

El macrogameto fertilizado se llama cigoto y a los 20 minutos se transforma en ooquinetto, una forma móvil capaz de atravesar la pared intestinal del mosquito y que se convierte en ooquiste, el cual crece y se alarga por vacuolizaciones progresivas tomando forma de huso y convirtiéndose en esporozoito. Los esporozoitos invaden el cuerpo del mosquito incluyendo las glándulas salivales, de donde son inyectados al huésped humano (1,13,14).

El cigoto es activo y se mueve atravesando el estómago y la pared del intestino medio del mosquito. El parásito en este caso es un "vermículo viajero" y se llama ooquinetto. Bajo el epitelio del intestino, el ooquinetto se vuelve redondeado y forma un quiste que se denomina ooquiste (18).

El núcleo del ooquiste se divide repetidamente para formar muchos núcleos, cada uno de los cuales, con el citoplasma que lo rodea, se transforma en una célula separada, alargada, y un esporozoito. En consecuencia el ooquiste se agranda mucho y finalmente estalla, liberando la masa de esporozoitos en la cavidad del cuerpo. El desarrollo de estos esporozoitos se conoce con el nombre de esporogonia y marcan el final del ciclo sexual (34).

La **fase asexual o esquizogonia** se inicia con la inyección de esporozoitos con la secreción salival del mosquito hembra. Los esporozoitos invaden al mosquito y muchos de ellos llegan a las glándulas salivales y así están en posición favorable para penetrar en el huésped.

Cuando los esporozoitos entran en el torrente sanguíneo del hombre por la picadura del mosquito, éstos se dirigen al hígado para reproducirse, invadiendo el parénquima celular e iniciándose el período exoeritrocítico. A intervalos, regresan a la sangre causando los síntomas característicos de la enfermedad (24,34,35).

Los esporozoitos se dividen asexualmente para formar los merozoitos, seguidamente las células hepáticas se rompen liberando miles de merozoitos exoeritrocíticos a la circulación, aunque algunos de ellos repiten la fase exoeritrocítica como en el caso de *P. vivax* y *P. malariae*, lo cual es paralelo al desarrollo eritrocítico, persistiendo así la fase exoeritrocítica, dando lugar a períodos latentes y recurrencia llamados períodos de esquizogonia hepática secundaria. En el caso de *P. falciparum* no hay fase exoeritrocítica si ya se inició la fase eritrocítica, y en pacientes que adquieren la infección por transfusión sanguínea o de componentes sanguíneos, no hay etapa

exoeritrocítica debido a que solo el esporozoito que se desarrolla en el mosquito es capaz de producir invasión hepática (22,34).

La duración de la fase exoeritrocítica varía con la especie de parásito. Para *P. vivax*, dura 8 días y su esquizonte contiene 10,000 merozoitos, *P. ovale*, requiere 9 días y su esquizonte contiene 15,000 merozoitos, *P. malariae* requiere 15 días produciendo de 75 – 18,600 merozoitos, y *P. falciparum* produce 40,000 merozoitos, requiriendo de 5 a 7 días. Estos parásitos pre-eritrocíticos no contienen pigmento (13,14,34).

Muchos de los merozoitos liberados son destruidos, pero un número significativo se une a receptores específicos de las células rojas, penetrando su membrana celular e iniciando su desarrollo y el ciclo eritrocítico asexual. *P. vivax* ataca exclusivamente a los reticulocitos, ya que parece que es incapaz de invadir a los eritrocitos maduros. *P. falciparum* invade todas las células, tanto maduras como inmaduras (13).

La primera forma que aparece dentro del eritrocito es el trofozoito “en forma de anillo”, que varía morfológicamente según la especie, y visto en frotis teñidos con colorantes de Romanowsky presenta citoplasma azul y la cromatina o sustancia nuclear roja clara. Éste crece y toma forma ameboide o de banda y esto coincide con la destrucción de la hemoglobina. El parásito se hace activamente ameboide, y en 8 a 10 horas aparecen gránulos de pigmento (producto del catabolismo) en la periferia del parásito; éste sufre cambios internos durante 8 a 12 horas para prepararse para la etapa de esporulación. Previo a esto, el eritrocito infectado con *P. vivax* puede presentar un punteado difuso de color rojo claro llamado gránulos de Schüffner, y los eritrocitos infectados con *P. falciparum* pueden tener una forma de llave o de coma de color rojo llamados puntos de Maurer (6,13,14,34).

La cromatina se distribuye en finos gránulos y el pigmento se colecta en masas que tienden a asumir una distribución radial (esquizonte inmaduro); entonces los organismos se dividen en un número de 16 a 32 merozoitos, cada uno de los cuales contiene pequeñas masas de cromatina y el pigmento entre los merozoitos se arregla en masas cerca del centro (esquizonte maduro). Finalmente el eritrocito se rompe y libera los merozoitos que pueden infectar a nuevos eritrocitos o ser destruidos por los leucocitos; el pigmento es fagocitado por las células del sistema reticuloendotelial. Esta fase asexual y la ruptura del esquizonte, están asociados con la fiebre periódica. En el caso de *P. falciparum*, *P. vivax* y *P. ovale* el ciclo dura 48 horas, en *P. malariae* dura 72 horas (6,34).

Después que la infección se establece, algunos merozoitos no continúan el ciclo asexual, sino que se diferencian a formas sexuales llamadas gametocitos, tanto masculino (microgametocito) como femenino (macrogametocito).

En 1983, Sonnenwirth encontró que los merozoitos producidos por esquizontes exoeritrocíticos primarios se desarrollan directamente a formas sexuales sin pasar por una esquizogonia intermedia en sangre periférica. El desarrollo de las formas sexuales es lento y requiere casi el doble de las formas asexuales, persisten libres en la sangre por mucho tiempo hasta que son ingeridas por el mosquito (Anexo 3) (21,34).

## **7. Fisiología, bioquímica y morfología**

La longevidad de *P. falciparum* es más corta y la de *P. malariae* tarda más, por la duración del ciclo exoeritrocitario. El metabolismo de los parásitos se ha estudiado en cultivos de tejidos o en suspensiones. Los catalizadores a base de metales pesados del sistema de los citocromos, las proteínas lábiles, las proteinasas y la deshidrogenasa intervienen en los procesos metabólicos de los plasmodios, que utilizan oxígeno mediante una enzima respiratoria, la citocromoxidasa de porfirina de hierro. La oxidación de la glucosa es más rápida en eritrocitos parasitados que en los normales; la oxidación del lactato es exclusiva y característica de los glóbulos parasitados. *P. vivax* necesita tres veces más lactato y dextrosa que *P. falciparum*. Los elementos nutritivos los toman de la sangre y tejidos del hospedero. La hemoglobina se transforma en globulina y hematina, que origina el pigmento palúdico. Las proteínas del eritrocito se desdoblán y casi la mitad de sus aminoácidos son sintetizados por el plasmodio. El parásito necesita carbohidratos, proteínas, grasas, metionina, ribloflavina y ácidos p-aminobenzoico, pantoténico y ascórbico (1).

Las investigaciones bioquímicas de los mecanismos respiratorios de los parásitos del paludismo indican que las mitocondrias, incluso quizá las de aspecto atípico que se hallan en ciertas fases del parásito, poseen sistemas enzimáticos dotados de importantes funciones respiratorias. De todas formas, aún no se sabe hasta qué punto el parásito es autosuficiente o depende de la célula huésped en lo que respecta a ciertos sistemas enzimáticos importantes (36).

En cuanto a los hematíes humanos, es posible que las variaciones de la concentración de trifosfato de adenosina (ATP), sustancia que tiene una intervención importante en la utilización de la glucosa por el parásito, afecta directamente al desarrollo de los trofozoitos de *P. falciparum*. Incluso se ha pensado que la baja concentración de ATP (asociación posiblemente a la  $\beta$ -talasemia) puede ser uno de los factores genéticos selectivos que determinan la relativa resistencia de ciertos grupos raciales al paludismo por *P. falciparum*.

La hipótesis según la cual una deficiencia hereditaria de glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa (G6FD) eritrocítica puede constituir una protección contra los posibles efectos letales del paludismo por *P. falciparum* ha reavivado el interés por el metabolismo de los parásitos.

El hecho de que el parásito del paludismo utiliza la vía mencionada aclara en parte las relaciones metabólicas entre el parásito y el hematíe huésped y explica los efectos parasiticidas de ciertos medicamentos (1,36).

Además, como dicha vía constituye una posible variante del metabolismo de los hidratos de carbono, los parásitos encuentran en ella una posibilidad suplementaria de proseguir normalmente su metabolismo aún en presencia de concentraciones habitualmente letales de fármacos antipalúdicos.

De una forma u otra, el parásito intraeritrocítico ingiere el contenido de la célula huésped, el cual puede consistir sobre todo en hemoglobina, cuando se trata de hematíes maduros, o en orgánulos de hematíes y precursores de la hemoglobina en el caso de los reticulocitos y de los eritroblastos. No se sabe en qué medida las distintas hemoglobinas son aceptables para las diferentes especies de parásitos; así por ejemplo, se ignora, si la hemoglobina de los hematíes falciformes es inaceptable para el *P. falciparum* y si, en caso que sea así, ello se debe a factores químicos o factores físicos.

Durante el crecimiento del parásito se forman productos derivados de su digestión. Algunos de éstos son completamente inocuos, pero otros pueden ser antigénicos (y provocar en el huésped la formación de anticuerpos específicos) e incluso ser claramente nocivos.

Últimamente despierta un interés mayor el estudio de las sustancias que reducen la actividad respiratoria de las mitocondrias aisladas del hígado del ratón. Estas sustancias se pueden hallar en el suero de sujetos y de animales infectados por diferentes especies de plasmodios (1).

El factor inhibidor está constituido por tres elementos, dos de los cuales son iones de calcio y de fosfato, y el tercero un ácido orgánico formado en gran parte por ácido láctico.

Sin embargo, aún no se ha podido determinar la naturaleza exacta de este factor que interfiere en la fosforilación oxidativa, como tampoco se han evaluado plenamente los efectos fisiopatológicos de estas sustancias tóxicas (1,18).

#### **a. Estructura**

La aplicación del microscopio electrónico al estudio de los parásitos del paludismo ha revolucionado nuestros conocimientos sobre la estructura y la fisiología de estos organismos.

La estructura de las diferentes especies apenas difiere en líneas generales, salvo en ciertos detalles importantes relativos a las fases eritrocíticas y que corresponden sobre todo a la captación y la digestión de la sangre por el parásito. Aún no se ha aclarado la importancia relativa de la pinocitosis y de la captación a través del citoplasma pero, en cambio, se conoce bien el proceso subsiguiente de digestión de la hemoglobina, con o sin ayuda de las mitocondrias. La formación y la distribución del pigmento dependen de estos procesos; sin embargo, el metabolismo puede

alterarse en las cepas de parásitos resistentes a los medicamentos. En las siguientes secciones se resumen los actuales conocimientos sobre la ultraestructura del parásito en las distintas fases de su ciclo biológico (17).

### **b. Esporozoitos**

Los esporozoitos de todas las especies son similares. Posee una gruesa membrana externa cuya extremidad anterior se transforma en una cápsula apical provista de anillos polares y de un conoide. Hacia esta extremidad se dirigen los microtúbulos subpeliculares, los orgánulos, pares y los bastoncitos tortuosos (toxemas).

La disposición de los microtúbulos es característica; todos, salvo uno, están distribuidos a intervalos regulares a lo largo de las dos terceras partes de la circunferencia, aproximadamente, mientras que la única fibrilla se mantiene en el centro del tercio restante.

Es posible que cada especie tenga un número característico de microtúbulos. A la altura del núcleo, siempre en el mismo punto, la membrana superficial está interrumpida por una profunda depresión circular cerrada en su base por una fina membrana; se trata del citostoma, que antes se denominaba micropilo.

En el esporozoito, este orgánulo puede ser no funcional y casi siempre es único. Además se pueden observar en los esporozoitos un núcleo rodeado de su membrana nuclear (1,36).

### **c. Merozoitos**

Al cabo de 50 horas de crecimiento los merozoitos empiezan a brotar en la superficie de los pseudocitómeros (islotos que ocupan la mayor parte del citoplasma y que aparecen tachonados de núcleos), que constituyen la característica distintiva de esta fase del ciclo biológico del parásito.

La parte distal del brote está constituida por la película engrosada, que luego se diferencia para formar la cápsula apical y el conoide. Inmediatamente por debajo del brote se encuentra el par de orgánulos bien visibles. El núcleo es el último elemento que entra en el brote.

En el momento de la separación, el merozoito aparece como un objeto encogido, en forma de botella cuya extremidad se estrecha para formar la cápsula apical a la que llegan los organelos pares.

Además de los ribosomas, muy próximos entre sí, el citoplasma contiene un corpúsculo con membranas concéntricas que probablemente es de naturaleza mitocondrial. Sólo en muy raras ocasiones se ha encontrado un citostoma.

La ultraestructura de los merozoitos consiste en un ápice de tres anillos con un conoide, orgánulos pares y otros corpúsculos densos, una mitocondria que envuelve a un corpúsculo sólido,

microtúbulos subpeliculares y una película de doble capa interrumpida por un citostoma no funcional.

Muchos de estos orgánulos desaparecen durante el crecimiento, para reaparecer después en algunos lugares durante el esquizogonia. Debe señalarse el descubrimiento de un conjunto de fibras fusiformes dispuestas en forma de abanico y situadas cerca del poro del núcleo.

El merozoito está recubierto de una fina membrana exterior cuya textura es más gruesa que de la membrana interior. Debajo se encuentran los microtúbulos, dispuestos transversalmente y a intervalos regulares; empiezan en el anillo polar exterior y terminan en la extremidad posterior del merozoito (1,36).

#### **d. Trofozoitos**

Son los merozoitos extraeritrocíticos que han penetrado a los glóbulos rojos; en su inicio o fase juvenil, presentan núcleo pequeño, compacto que se tiñe de rojo con el colorante de Giemsa, el protoplasma en forma de anillo se tiñe en azul. En *P. falciparum* y *P. malariae* los eritrocitos no aumentan el tamaño, cosa que ocurre con *P. vivax*. Al crecer (trofozoitos adultos) se alimentan de hemoglobina que al no metabolizarse completamente deja residuos de globina, de una hematina ferroporfirina (gránulos de Maurer en *P. falciparum* y de Schüffner en *P. vivax*). Al iniciarse la división nuclear, evolucionan a la siguiente fase (1).

#### **e. Esquizontes**

Los merozoitos extraeritrocíticos jóvenes siguen creciendo y se convierten en esquizontes maduros cuando el núcleo se ha dividido y rodeado de protoplasma, formándose así los merozoitos eritrocíticos (16 a 24 en *P. falciparum*, 16 a 18 en *P. vivax* y de 8 a 10 en *P. malariae*), al romperse dejan libres a los merozoitos que invaden a otros glóbulos rojos. El ritmo de la esquizogonia eritrocítica es característica en cada especie: 24 horas en *P. falciparum*, 48 horas en *P. vivax* y 72 horas en *P. malariae*; en *P. falciparum* tiene lugar en los capilares de las vísceras, incluyendo corazón y cerebro, por lo que no se encuentran esquizontes en la sangre periférica. Después de 2 a 3 generaciones eritrocíticas, algunos merozoitos intracelulares en vez de convertirse en esquizontes se transforman en gametocitos (1,36).

#### **f. Gametocitos**

Presentan una membrana con tres capas y un nucléolo denso en el interior del núcleo. Los macrogametocitos y microgametocitos poseen características según las especies; pueden tener una forma típica de media luna o de banano en *P. falciparum*, esféricos en *P. vivax* y *P. malariae*. Los

macrogametocitos presentan numerosos gránulos de Palade que en general no se observan en los microgametocitos (1,36).

### **g. Ooquinetos**

El ooquinetos posee características peculiares que ni pueden observarse en las fases posteriores del desarrollo del parásito o que desaparecen rápidamente en la fase siguiente (ooquiste uninucleado). El cristaloides es de casi 2  $\mu\text{m}$  de diámetro, generalmente único y con partículas en su interior semejantes a virus, posiblemente de carácter proteínico de un diámetro de unas 35  $\mu\text{m}$ .

El aparato polar está formado por una estrecha protuberancia retráctil, que termina en unos anillos de los cuales parten las fibrillas subpeliculares. Entre estas últimas y la película propiamente dicha existe un espacio que parece deberse a un desgarramiento del plasmalema (membrana superficial) engrosado. A una micra aproximadamente por detrás de la extremidad anterior, la película presenta unos ocho pliegues gruesos que probablemente se abren cuando la extremidad anterior este completamente despegada. En unos de los bordes del núcleo se observa un haz de microtúbulos paralelos que recuerdan algo a las fibras fusiformes del ooquiste.

En el ooquinetos se han observado microtúbulos subpeliculares a los que probablemente se deben su escasa movilidad, pero aún no se han visto ni citostomas ni orgánulos pares bien determinados o estructuras secretoras semejantes, que son probablemente necesarias para que el ooquinetos pueda penetrar a la célula epitelial del intestino del mosquito (1,36).

### **h. Ooquiste**

La pared propiamente dicha del ooquiste está constituida por la película del ooquinetos. Una característica notable del ooquiste de 48-50 horas son los restos de una protuberancia anterior, con su anillo polar y los microtúbulos anexos; esta parte da la impresión de haberse desprendido en su propia sustancia del ooquiste.

Ofrecen especial interés unas estructuras que, cortadas transversalmente, parecen centriolos y están constituidas por un túbulo central único rodeado de nueve túbulos periféricos. Este es el único momento del ciclo biológico del parásito en que tiene lugar una división meiótica del núcleo. Además, se han observado unas fibras fusiformes a lo largo del borde lateral del núcleo.

En los últimos momentos del desarrollo de los ooquistes se puede observar la morfogénesis de los orgánulos característicos de los esporozoitos en los brotes del esporoblasto. Es evidente que los esporoblastos múltiples se originan en vacuolas y hendiduras del citoplasma periférico (1,36).

## 8. Diagnóstico

El diagnóstico clínico de la malaria es frecuentemente difícil. Esta puede ser confundida con alguna enfermedad tropical y cosmopolita. Esta situación es inevitable en vista de los cambios patológicos, los cuales consisten principalmente en interferencia mecánica con la circulación vascular en algunos órganos del cuerpo (18,37).

Algunas enfermedades tropicales pueden confundirse como: kala-azar, abscesos amebianos en el hígado recurriendo en fiebre y fiebre amarilla. Algunas de las enfermedades cosmopolitas pueden simular frecuentemente una enfermedad malárica como lo son: Fiebre tifoidea, tuberculosis, brucelosis, endocarditis maligna o crónica, enfermedad orgánica del sistema nervioso central (13).

Las manifestaciones de la malaria son numerosas y siempre se debe sospechar de la enfermedad en aquellas personas que viven o han vivido en zonas palúdicas. Habitualmente los glóbulos rojos y la hemoglobina presentan una disminución paralela. Puede haber macrocitosis a consecuencia de mayor número de reticulocitos y por el crecimiento de los glóbulos rojos infectados por *P. vivax* y *P. ovale*. La velocidad de sedimentación se encuentra aumentada. En las fases activas, existen signos de hemólisis, en las formas crónicas la cifra de leucocitos suele ser baja, pero aumenta muchas veces los monocitos, se presenta leucocitosis después de los escalofríos y se cree que el nivel más alto de parasitemas se observa una hora después de los mismos (7).

La detección microscópica de los parásitos de la malaria por gota gruesa es un método rápido y exacto cuando la parasitemia esta por encima del parásito por 10,000 glóbulos rojos (10 parásitos/ $\mu$ l). Sin embargo, pueden aparecer problemas cuando la parasitemia es menor, ya que esta técnica consume tiempo y requiere de personal bien entrenado. El examen de preparaciones de frote periférico puede revelar grados de anemia con anisocitocis, poiquilocitocis; la mayoría de veces leucopenia con monocitocis relativa y en casos crónicos pigmentos maláricos de células fagocíticas. La fase de recuperación después del tratamiento, puede ser acompañada por reticulocitosis. El examen de médula ósea puede revelar parásitos intraeritrocíticos y pigmentos en macrófagos si el frote periférico es negativo para parásitos. El examen de orina puede revelar proteinuria (35).

En vista de las marcadas diferencias en la severidad y pronóstico entre *P. falciparum* y otras formas de enfermedad aguda, la identificación de las especies de *Plasmodium* es esencial. El significado de las características diferenciales que pueden ser vistas en las coloraciones de sangre son de gran importancia en el diagnóstico diferencial de la malaria humana (13,38,39).

Algunos exámenes inmunodiagnósticos de la malaria han avanzado grandemente en años recientes. Los exámenes serológicos deben ser interpretados con cuidado, ya que algunas reacciones positivas pueden indicar infección activa a una previa infección, o, solo la presencia de

anticuerpos contra sustancias antigénicas relacionadas con *Plasmodium*. Reacciones cruzadas pueden ocurrir entre las variedades de especie (40).

Los exámenes más usados para auxiliar el diagnóstico, establecer prevalencia de malaria en una población y evaluar potenciales donadores de sangre son: Hemaglutinación indirecta (HI), inmunofluorescencia indirecta (IFI) y Ensayo inmunoenzimática (ELISA). Estos exámenes son particularmente buenos para fines epidemiológicos, más que para fines diagnósticos (41).

En 1987, durante la XXXIX reunión de la Organización Mundial de la Salud y XXXII reunión de la Organización Panamericana de la Salud se presentaron algunos estudios sobre ciertas pruebas para diagnosticar malaria. Como prueba para la detección de *P. falciparum*, se evaluó un oligonucleótido sintético radio marcado empleando muestras de sangre directamente disueltas en filtros de nitrocelulosa. La técnica diagnosticó malaria en chimpancés experimentales infectados con parasitemias de 0.001% (50 parásitos/ $\mu$ l) demostrada por frote sanguíneo, y en un chimpancé cuyo frotis sanguíneo fue negativo, pero positivo para *P. falciparum* en el cultivo. En otro estudio, una secuencia de ADN de *P. falciparum* altamente repetitivo se clonó y empleó como sonda para la hibridación molecular para detectar malaria. Los resultados mostraron que la prueba es específica y sensible para *P. falciparum*. En un estudio a doble ciego de 50 pacientes, los resultados obtenidos con la prueba se correlacionaron bien con los resultados de frotis sanguíneo (31).

### **9. Pruebas para la detección de malaria (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*)**

El diagnóstico de malaria se realiza considerando las manifestaciones clínicas y la confirmación de laboratorio de la gota gruesa u otra prueba que demuestre la presencia del parásito. El inmunodiagnóstico de malaria abarca métodos que evalúan la inmunidad humoral y celular del huésped. Las metodologías son suficientemente sensibles y específicas para detectar las infecciones en las que la parasitemia es baja, diferenciar infecciones pasadas de la actual, la primoinfección de las recrudescencias y las reinfecciones (41).

#### **a. Diagnóstico de laboratorio**

Consiste en el examen microscópico de la muestra de sangre para demostrar la presencia del parásito para lo cual se usa la técnica de coloración de Giemsa, con la que podemos observar la gota gruesa y frotis (42).

- **Gota gruesa**

Es una técnica de rutina y consiste en una gota de sangre conformada por numerosas capas en su mayoría de glóbulos rojos, los que son deshemoglobinizados durante la coloración con

Giemsa. Esta concentración de glóbulos rojos facilita la detección de los parásitos que pudieran estar presentes en su interior en densidades bajas.

La gota gruesa permite analizar una mayor cantidad de sangre, facilitando la detección de parasitemias bajas y un ahorro de tiempo en el examen, aunque al romperse los eritrocitos resulta difícil la identificación de la especie (42).

- **Frotis**

Preparación para examen microscópico, la cual se dispone sobre un portaobjeto con ayuda de otro, de manera que forman una capa muy fina o delgada de células sanguíneas, las que son fijadas con metanol y coloreadas con Giemsa, que facilitan la observación de las características morfológicas de los parásitos presentes dentro de los glóbulos rojos (42).

- **Tinciones de sangre periférica**

Son muchas las tinciones que se aplican para el diagnóstico de malaria, desde las convencionales de Giemsa, Field y Leishman hasta las fluorescentes con naranja de acridina o el sistema QBC.

La tinción de **Giemsa** es la técnica diagnóstica de referencia. Este colorante sirve tanto para la gota gruesa como para el frotis. La necesidad de emplear agua tamponada a pH 7.2 (tanto en la dilución del colorante como en los lavados) se debe a que, con otro pH, puede verse alterada la morfología del parásito, impidiendo la observación de las granulaciones de Schüffner, tan importantes para la diferenciación de la especie. Esta tinción tiene buena sensibilidad (92-98%) y especificidad (85-99%).

La tinción de **Field** (colorantes A y B de Field) sirve tanto para la gota gruesa como para el frotis. Debido a su rapidez y sencillez, es la preferida por los laboratorios de los hospitales tropicales que analizan gran número de muestras. Sin embargo, no siempre permite observar el punteado de Schüffner presente en *P. vivax* y *P. ovale*.

El método de **Leishman** incluye metanol por lo que sólo puede utilizarse para el frotis. La tinción con **naranja de acridina** descrita por Kawamoto se utiliza para el frotis, ya que precisa una fijación previa con metanol antes de teñir y observar en un microscopio de fluorescencia. La sensibilidad es del 77-96% y la especificidad del 81-98%.

El sistema de **QBC** (*Quantitative Buffy Coat System*, Becton Dickinson) se basa en la concentración por gradiente de densidad de los eritrocitos parasitados mediante la centrifugación de un capilar impregnado de heparina y naranja de acridina. Se necesita, por tanto, capilares y una centrífuga especial, así como un acoplador de microscopio y un sistema de epifluorescencia con lente especial, lo que encarece la técnica sin aportar mucho al frotis y gota gruesa (sensibilidad del

88-98% y especificidad del 58-90%). A veces es difícil el reconocimiento del parásito, no permite diferenciar las distintas especies y tiene el inconveniente de trabajar con sangre fresca.

La observación de estas dos técnicas o procedimientos se realiza mediante observación microscópica utilizando el objetivo 100x (42).

- **Diagnóstico inmunológico**

Abarca métodos inmunoserológicos que evalúan la inmunidad humoral y celular del huésped. La metodología es suficientemente sensible y específica para detectar las infecciones cuando la parasitemia es baja, además de ayudar a diferenciar infecciones pasadas de la actual. Entre las técnicas que se encuentran para el inmunodiagnóstico de malaria tenemos:

**Los métodos de diagnóstico inmunológico directo**, como su nombre lo indica, detectan directamente la presencia del parásito mediante la captura de antígenos del parásito durante la infección, estas fracciones antigénicas representan fracciones específicas de la molécula antigénica. Entre las pruebas que tienen este fundamento podemos mencionar las pruebas inmunocromatográficas y la diferentes pruebas de ELISA (42).

**Los métodos de diagnóstico indirecto**, detectan fundamentalmente anticuerpos (también inmunoglobulinas) que se producen en respuesta al estímulo antigénico durante la infección del *Plasmodium* y su desarrollo biológico en el huésped vertebrado. Esta respuesta inmune hace posible el inmunodiagnóstico.

La inmunofluorescencia indirecta (IFI), ELISA, pruebas inmunocromatográficas, hemaglutinación, radioinmunoensayo, etc. son métodos serológicos que se basan en este fundamento. La prueba de ELISA no es de mucha utilidad en el diagnóstico clínico de un paciente, su mayor aplicación es en estudios epidemiológicos (42).

**b. Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)**

Esta prueba se considera de referencia en el serodiagnóstico y seroepidemiología de malaria, sirve para detectar anticuerpos en los sueros, determinar los títulos de éstos y seguir el curso de su producción. Los antígenos se obtienen de cultivos continuos o sangre de personas que tienen una infección primaria activa, los cuales son fijados en láminas portaobjetos sobre las que se agrega el suero del paciente, que contiene anticuerpos contra el agente etiológico (anticuerpo primario) y que se unirán al antígeno. Esta unión se podrá visualizar mediante un microscopio de fluorescencia utilizando una antinmunoglobulina humana marcada con fluoresceína (anticuerpo secundario).

Es útil en zonas endémicas de malaria para medir el grado de la endemidad, verificar la presencia o ausencia de infecciones maláricas, delimitar zonas maláricas, detectar cambios estacionales de transmisión y evaluar actividades antimaláricas. Asimismo, en zonas no endémicas de malaria puede ser utilizada para seleccionar donantes de sangre.

Es importante mencionar que los antígenos homólogos detectan títulos de anticuerpos en niveles más elevados que los antígenos heterólogos y además proveen información retrospectiva sobre la población (42).

Una limitación para la ejecución del ensayo es la disponibilidad de equipos especializados como microscopios de epifluorescencia, incubadora de CO<sub>2</sub> para cultivo de cepas de *P. falciparum* con objeto de producción de antígeno parasitario (18).

### **c. Pruebas rápidas para el diagnóstico de malaria**

Las pruebas rápidas para el diagnóstico de malaria son también llamadas: pruebas inmunocromatográficas. Éstas 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 (40).

Son pruebas fáciles de realizar, rápidas, sensibles y no precisan microscopio. Los sistemas comerciales son estables a temperatura ambiente, lo que facilita su transporte, y constituyen una importante ayuda para el diagnóstico de malaria en los laboratorios con poca experiencia en la microscopía. Aunque tienen el inconveniente de no ser métodos cuantitativos (42).

Estas pruebas consisten en una tira de papel revestida por una membrana de nitrocelulosa, en la cual se han impregnado anticuerpos monoclonales o policlonales específicos para ciertos antígenos de las cuatro especies del género *Plasmodium* que parasitan al hombre. La reacción antígeno-anticuerpo, en presencia del conjugado, expresa la formación de una banda de color que es posible visualizarla macroscópicamente.

Estas pruebas han sido validadas en diferentes partes del mundo alcanzando niveles de sensibilidad (S) y especificidad (E) mayores al 90% con relación a la gota gruesa (40).

- **Fundamentos de las pruebas rápidas para malaria**

El anticuerpo de captura contra el antígeno unido a la membrana de nitrocelulosa captura los antígenos provenientes de la muestra del paciente, a éstos antígenos se une un anticuerpo específico de detección marcado con oro coloidal.

Si el antígeno está presente, se desarrolla un color púrpura-rojizo en la membrana. En caso contrario, no se visualiza la línea en la zona de prueba y sólo en el control por exceso de conjugado (42).

La aplicación de estas pruebas dependen de:

- El nivel de endemidad de la enfermedad.
- La prevalencia y tipo de resistencia a drogas anti-maláricas.
- El acceso geográfico a zonas distantes y apartadas.
- Las características socio-económicas de la población.
- La Infraestructura en salud.
- Herramientas de diagnóstico disponibles (microscopios, personal, etc).

El impacto en el uso de las pruebas rápidas de diagnóstico (PRDx) está evidenciado en las siguientes situaciones:

- Diagnóstico a tiempo real.
- Uso de drogas adecuadas y disminución de resistencia.
- Tiempo de respuesta e inicio de tratamiento a los pacientes.
- Disminución de la incidencia de Malaria severa.
- Disminución de la mortalidad y la morbilidad.
- Disminuir la falla de los tratamientos innecesarios.

Dentro de las ventajas de estas pruebas están: los procedimientos pueden ejecutarse en un tiempo promedio de 10 a 20 minutos, tienen buen porcentaje de especificidad y sensibilidad, son muy útiles en comunidades rurales donde no se cuenta con microscopio óptico, pueden ser usadas como pruebas confirmatorias de gota gruesa en caso de dudas por falta de entrenamiento del microscopista, son de fácil uso e interpretación, ya que no se requiere personal especializado, y pueden detectar una infección cuando los parásitos se encuentran secuestrados en los vasos sanguíneos (42).

#### **d. Antígenos detectados mediante el uso de pruebas rápidas**

- **Proteína-2 rica en Histidina (Pf HRP-2)**

Es una molécula soluble en agua, secretada por los estadios de trofozoitos y gametocitos jóvenes del *P. falciparum*. Para la reacción antígeno-anticuerpo utiliza un conjugado que contiene sulfonaminas (PATH, parasight) y oro coloidal (ICT), ligadas a un colorante para fijar la reacción.

Este antígeno puede seguir circulando en la sangre de la persona hasta por 72 horas después de negativizarse la gota gruesa, fenómeno conocido como antigenemia (42).

- **Lactato Deshidrogenasa (pLDH)**

Es una isoenzima glicolítica producida y expresada en altos niveles durante el estadio eritrocítico del parásito, por tanto es producida únicamente por parásitos vivos de las diferentes especies de *Plasmodium*. Esta prueba también utiliza tiras de nitrocelulosa, las cuales contienen un "pool" de anticuerpos de carácter monoclonal dirigidos específicamente hacia una epítope de la pLDH. Esta reacción antígeno-anticuerpo es fijada por la presencia de anti-anticuerpos policlonales contenidos en la solución de conjugado en soportes de liposomas ligados a un colorante que permite la visualización de los resultados.

En el mercado existen kits que pueden detectar las 4 especies de este género que parasitan al hombre, pero sólo pueden diferenciar *P. falciparum* de los *no falciparum*, más no distingue entre *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*.

Existen también otros antígenos que están presentes en las cuatro especies de *Plasmodium*, que son utilizados en combinación a la detección de la Pf HRP-2 de *P. falciparum*. Estos se denominan "antígenos pan maláricos" (42).

#### **e. Prueba existente en el mercado**

- **Detección del HRP-2**

La proteína-2 rica en histidina (Pf HRP-2) es secretada por *P. falciparum* a la sangre, lo que permite su detección mediante la captura antigénica con anticuerpos específicos y técnicas de inmunocromatografía. Posteriormente se han desarrollado otros métodos que detectan tanto el antígeno HRP-2 de *P. falciparum* como el antígeno panmalárico que se expresa en las fases sanguíneas de *P. falciparum* y *P. vivax* y, probablemente, también de *P. ovale* y *P. malariae*. Tienen una sensibilidad general del 90-92% y una especificidad del 96-98%. Para *P. vivax* son inferiores del 75% y 95% respectivamente. Son técnicas ideales para los laboratorios con poca experiencia en el diagnóstico microscópico y siempre que se requiera un diagnóstico rápido, pero presentan desventajas que les impide reemplazar al frotis y la gota gruesa; ya que no detectan parasitemias bajas (<0,1%), presentan falsos negativos, tantos más cuanto más baja es la parasitemia, y falsos positivos, especialmente en presencia del factor reumatoide. Además, no permiten estimar el grado de parasitemia y no diferencian las distintas especies de *Plasmodium*, ni las parasitemias mixtas persisten positivas durante varios días a pesar de un tratamiento correcto, lo que impide predecir las posibles resistencias (42).

#### **f. Técnicas moleculares**

Se utiliza una técnica de PCR múltiple que permite la detección del ADN genómico de las cuatro especies parasitarias. La amplificación por PCR permite incluso la detección de 3-4

parásitos/ $\mu$ l, así como la determinación de infecciones mixtas. Al ser una técnica potencialmente cuantitativa, permite controlar la eficacia del tratamiento, prediciendo las resistencias a los antipalúdicos. Podría ser la técnica de referencia por su altísima sensibilidad y especificidad pero, aparte de no estar comercializada, no está al alcance de todos los laboratorios y no se adapta al diagnóstico de urgencia individualizado (42).

#### **g. COMBO PAN/Pf VISITECT para malaria**

El COMBO PAN/Pf VISITECT es una prueba rápida que utiliza como principio un inmunoensayo de doble captura, para la detección de malaria debido a *P. falciparum*, *P. no falciparum* o infecciones mixtas. VISITECT PAN/Pf determina si hay infección por malaria al detectar la enzima Lactato Deshidrogenasa (pLDH) específica para *Plasmodium* y que es liberada de los eritrocitos infectados en el huésped. Adicionalmente, VISITECT PAN/Pf determina si existe infección específicamente debido a *P. falciparum*, mediante la detección de la proteína-2 rica en histidina (Pf HRP-2), la cual es una proteína soluble en agua, específicamente para *P. falciparum*, y que es liberada por los eritrocitos infectados.

VISITECT MALARIA COMBO PAN/Pf utiliza sangre completa del paciente. Después de la adición del buffer de dilución, incluido en el kit, la muestra va fluyendo por la membrana del dispositivo de prueba. El anticuerpo anti-pLDH y el monoclonal anti-Pf HRP-2 (marcados con oro coloidal), se conjuga con la pLDH y/o la Pf HRP-2, si existiera en la células lisadas de la muestra. Este complejo se mueve a lo largo de la membrana hacia la región de prueba en donde es inmovilizado por los anticuerpos anti-pLDH y anti-Pf HRP-2 adheridos a la membrana del dispositivo de prueba, y si la prueba es positiva se producen bandas de reacción de color rosado.

En infecciones producidas por *P. falciparum*, aparecerán dos bandas de color rosado. En infecciones producidas por *P. no falciparum*, aparecerá una banda de color rosado. La ausencia de bandas indican resultados negativos (5).

#### IV. JUSTIFICACIÓN

Cada año se registran más de 100 millones de personas que se enferman de malaria en el mundo, ocasionando más de 2 millones de muertes, especialmente en niños de 3 a 5 años de edad (2).

En Guatemala, el 80% del territorio está considerado como zona de riesgo de malaria, convirtiéndolo en el país centroamericano donde la incidencia de la enfermedad es más alta; de hecho, se registra el 40% de los casos de malaria en Centroamérica. Durante el año 2005, la incidencia de la enfermedad aumentó de forma significativa, pues se detectaron 101,067 casos de malaria, un 25% más que en el año 2004 (75,707 casos), con una media de 1,944 casos por semana (3,4).

El diagnóstico clínico de la malaria es frecuentemente difícil, ya que sus manifestaciones son numerosas. Desde que se describiera por primera vez la enfermedad (1880), su diagnóstico se ha realizado mediante la observación de las distintas formas del parásito en el examen microscópico de muestras de sangre periférica teñidas, así como las técnicas de fluorescencia o de detección antigénica comercializada y reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que es una técnica muy sensible pero que no está disponible en todos los laboratorios. Estas técnicas tienen las desventajas de que necesitan personas con capacitación y experiencia, tienen un costo elevado y son muy laboriosas, por lo tanto el tiempo de realización es demasiado largo.

Diagnosticar a tiempo malaria puede ser vital para el enfermo, ya que la aparición de complicaciones está muy relacionada con la demora de la instauración del tratamiento. La comparación de la prueba rápida COMBO PAN/Pf VISITECT con el de la gota gruesa, le garantiza al profesional que la misma es confiable para dar un tratamiento adecuado. El COMBO PAN/Pf VISITECT es una prueba rápida utilizada para la detección de malaria debido a *P. falciparum*, *P. no falciparum* o infecciones mixtas. Esta prueba es fácil de ejecutar, se maneja a temperatura ambiente y proporciona el diagnóstico de malaria en aproximadamente 15 minutos, en comparación con la gota gruesa que requiere de una persona con amplia experiencia para obtener el resultado en alrededor de 45 – 60 minutos.

## V. OBJETIVOS

### A. GENERAL

Comparar la prueba rápida COMBO PAN/Pf VISITECT con gota gruesa para el diagnóstico de malaria en el Instituto Guatemalteco de Seguridad Social (IGSS) de Mazatenango, Suchitepéquez y en el Hospital Regional de Occidente “San Juan de Dios”, Quetzaltenango.

### B. ESPECÍFICOS

1. Comparar la sensibilidad, especificidad y eficacia entre la prueba rápida COMBO PAN/Pf VISITECT y gota gruesa.
2. Establecer la concordancia entre el método rápido y la gota gruesa a través del coeficiente *Kappa*.

## **VI. HIPÓTESIS**

Existe concordancia entre la prueba rápida COMBO PAN/Pf VISITECT y la técnica de gota gruesa.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. UNIVERSO DE TRABAJO

Todos los pacientes que asistieron al Instituto Guatemalteco de Seguridad Social (IGSS) de Mazatenango y Hospital Regional de Occidente “San Juan de Dios” de Quetzaltenango.

#### 1. Muestra

50 pacientes que asistieron a la consulta externa del Hospital del IGSS de Mazatenango con sintomatología sugestiva de malaria y 50 pacientes sanos, como grupo control, que no refirieron sintomatología reciente sugestiva de malaria que asistieron al Banco de sangre del Hospital Regional de Occidente “San Juan de Dios” de Quetzaltenango.

### B. MATERIALES

#### 1. Recursos humanos

- a. Investigadora: Fabiola Esthela García Axt
- b. Asesor: Licda. Cecilia Sánchez de Porres

#### 2. Recursos materiales

##### a. Cristalería

- Tubos de ensayo
- Portaobjetos
- Agitador de vidrio
- Tubos con anticoagulante EDTA

##### b. Equipo

- Microscopio
- Estufa a 37 °C
- Congelador
- Lancetas
- Cronómetro
- Gradillas
- Papel limpia lentes
- Algodón
- Alcohol
- Kit COMBO PAN/Pf
- Computadora

### **c. Reactivos**

- Reactivo para gota gruesa (Giemsa)
- Aceite de inmersión
- Agua destilada

### **d. Institucionales**

- Instalaciones del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social (IGSS) de Mazatenango y del Hospital Regional de Occidente “San Juan de Dios” de Quetzaltenango.

## **C. PROCEDIMIENTO**

### **1. Selección de las muestras en el Instituto Guatemalteco de Seguridad Social (IGSS) de Mazatenango**

- **Criterio de inclusión para grupo de pacientes**

Se aceptaron todos aquellos pacientes: Mayores de 2 años (en caso de menores de edad, además del consentimiento del menor, se contó con la autorización del padre, madre o tutor, en caso de imposibilidad de firmar, se tomó la huella digital) (Anexo 4), que presentaban los siguientes síntomas: cansancio intenso, dolores musculares, fiebre (corroborada por temperatura axilar  $>$  de  $37.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  o antecedente de fiebre de 48 horas previas a la captación), alteraciones gastrointestinales (diarreas, vómitos y dolor de estómago) y hemoglobina  $<$   $5\text{gr/dL}$ .

- **Criterio de exclusión para grupo de pacientes**

Se rechazaron a todos aquellos pacientes que acudieron a la consulta externa y/o emergencia y que no presentaron los signos y síntomas sugestivos de malaria (cansancio intenso, dolores musculares, fiebre  $>$  de  $37.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , alteraciones gastrointestinales (diarreas, vómitos y dolor de estómago) y hemoglobina  $<$   $5\text{gr/dL}$ ).

### **2. Selección de las muestras en el Hospital Regional de Occidente “San Juan de Dios” de Quetzaltenango, Banco de Sangre**

- **Criterio de inclusión para grupo control**

Se aceptaron a todos aquellos donadores voluntarios que provenían, principalmente, de regiones libres de malaria, como Sacatepéquez y Totonicapán; personas que en ningún momento padecieron de la enfermedad; y que después de la entrevista rutinaria en el banco de sangre fueron calificados como aptos para la donación.

- **Criterio de exclusión para grupo control**

Se rechazaron a todos aquellos donantes con presencia de signos sugestivos de malaria: cansancio intenso, dolores musculares, fiebre > de 37.5 °C, alteraciones gastrointestinales (diarreas, vómitos y dolor de estómago), antecedentes de hipersensibilidad a drogas antimaláricas y mujeres embarazadas que recientemente fueron a un área endémica.

### 3. Obtención de muestras de sangre

Las muestras se obtuvieron por flebotomía (extracción de sangre en el antebrazo). Estas muestras se recolectaron en un tubo con anticoagulante EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), los cuales fueron almacenados a -4 °C hasta el momento de procesarlos.

También se le tomaron muestras de sangre a cada uno de los pacientes para preparar láminas de gota gruesa.

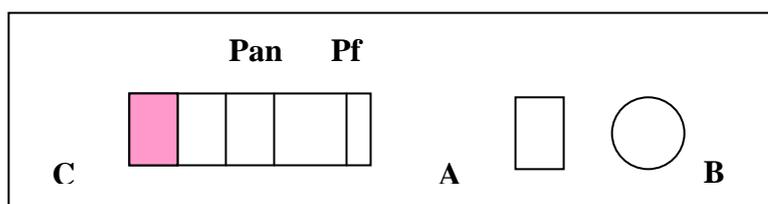
### 4. Procedimiento para la prueba rápida utilizando el COMBO PAN/Pf VISITECT

- Se sacaron las muestras de la refrigeradora, utilizando las necesarias. Las que no se utilizaron se guardaron nuevamente en la refrigeradora para su posterior utilización.
- Se abrió el kit que contenía las tiras, verificando la fecha de expiración consignada por el fabricante.
- Se preparó cada una de las muestras de sangre, mezclándolas uniformemente con un aplicador.
- Con una pipeta, se tomaron 5 µl de sangre del paciente.
- La muestra se dispersó en el pocillo A de la almohadilla.
- Posteriormente se dispersaron 5 gotas del diluyente Buffer en el pocillo B, sosteniendo la pajilla verticalmente.
- Al cabo de 15 minutos se tomaron los resultados.

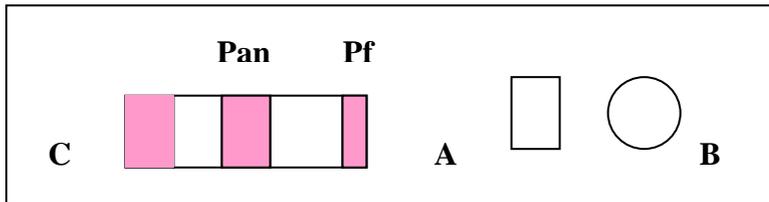
#### a. Interpretación

La interpretación de las bandas fue la siguiente:

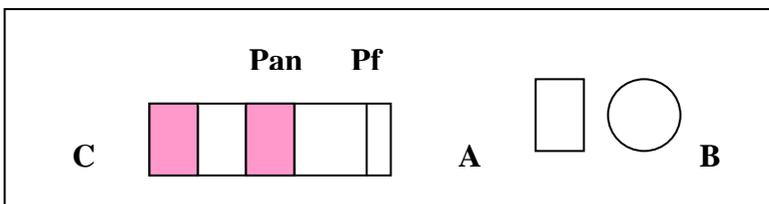
- **Negativo para malaria:** Presencia de una línea rosada en la ventana del control (C).



- **Positivo para malaria (*P. falciparum* o una infección mixta):** Presencia de tres líneas de color rosado: una en la región Pf y otra en la región Pan, así como en la ventana del control (C).



- **Positivo para malaria (*P. no falciparum*):** Presencia de una línea de color rosado en la región Pan, así como en la ventana del control (C).



El test se consideró inválido cuando no apareció ninguna línea y se repitió la prueba utilizando un nueva tira. La prueba no pudo ser interpretada después de 15 minutos.

## 5. Procedimiento para la técnica de gota gruesa

- Se colocó una gota de sangre sobre un portaobjetos limpio.
- Con un agitador de vidrio se extendió hasta que cubrió una zona de 2 cm de diámetro aproximadamente.
- El espesor permitió leer a través de la preparación.
- Se dejó secar al aire.
- Las muestras fueron coloreadas con Giemsa al 5%
- Finalmente fueron leídas con el objetivo de inmersión 100X de aumentos (18).

## D. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

### 1. Muestra y diseño de muestreo

Se tomaron por conveniencia 100 muestras, 50 muestras de pacientes que referían sintomatología de malaria y 50 muestras de donadores voluntarios que no referían sintomatología reciente. Se realizó un muestreo No Probabilístico.

## **2. Análisis de resultados**

Se evaluó la sensibilidad, especificidad, eficacia y concordancia entre la prueba rápida COMBO PAN/Pf VISITECT y el método de la gota gruesa a través del índice *Kappa* (Anexos 5 y 6) (43).

## VIII. RESULTADOS

En el presente estudio se evaluaron un total de 100 muestras, provenientes de pacientes que tenía una edad promedio de 28 años. Se estudiaron 50 muestras de pacientes que referían sintomatología de malaria, de las cuales 10 fueron positivas para *P. falciparum* y 37 para *P. vivax*. De acuerdo a la comparación de la sensibilidad, especificidad, eficacia y concordancia del índice de *Kappa* entre ambas pruebas; se observó que la prueba rápida COMBO PAN/Pf VISITECT alcanzó una sensibilidad y especificidad del 90.9 y 97.4%, respectivamente. La eficacia de la prueba rápida fue del 96% y el análisis estadístico mostró una óptima concordancia con la gota gruesa a través del índice de *Kappa* (0.88); el Intervalo de Confianza (IC) fue del 95% (tabla 3).

Tabla 3

Niveles de concordancia entre la prueba rápida COMBO PAN/Pf VISITECT y el método convencional gota gruesa para detectar *P. falciparum*  
(N=50)

		Gota gruesa		
		Positivo	Negativo	TOTAL
COMBO PAN/Pf VISITECT	Positivo	10	1	11
	Negativo	1	38	39
	TOTAL	11	39	50

	Resultado (%)
Sensibilidad:	90.9
Especificidad:	97.4
Eficacia COMBO PAN/Pf VISITECT vrs. gota gruesa:	96.0
Coefficiente <i>Kappa</i> :	0.88

De las mismas 50 muestras analizadas, 37 fueron positivas y 12 negativas para *P. vivax*. El COMBO PAN/Pf VISITECT presentó una sensibilidad y especificidad del 100 y 92.3%, respectivamente. La eficacia de la prueba rápida fue del 98% y presentó una óptima concordancia con la gota gruesa a través del índice de *Kappa* (0.95); el Intervalo de Confianza (IC) fue del 95% (tabla 4).

Tabla 4  
Niveles de concordancia entre la prueba rápida COMBO PAN/Pf VISITECT y el método convencional gota gruesa para detectar *P. vivax*  
(N=50)

		Gota gruesa		
		Positivo	Negativo	TOTAL
COMBO PAN/Pf VISITECT	Positivo	37	1	38
	Negativo	0	12	12
	TOTAL	37	13	50

	Resultado (%)
Sensibilidad:	100.0
Especificidad:	92.3
Eficacia COMBO PAN/Pf VISITECT vrs. gota gruesa:	98.0
Coefficiente <i>Kappa</i> :	0.95

Las otras 50 muestras analizadas provenían de donadores voluntarios que no referían sintomatología reciente de malaria; de éstas el 100% fueron negativas para malaria en ambas pruebas. La sensibilidad y el coeficiencia de concordancia *Kappa* no fueron cuantificados para la prueba rápida COMBO PAN/Pf VISITECT en este grupo de muestras. Los únicos valores calculados fueron la especificidad y eficacia de la prueba rápida, los cuales fueron del 100%; el Intervalo de Confianza (IC) fue del 95% (tabla 5).

Tabla 5  
Niveles de concordancia entre la prueba rápida COMBO PAN/Pf VISITECT y el método convencional gota para el grupo control  
(N=50)

		Gota gruesa		
		Positivo	Negativo	TOTAL
COMBO PAN/Pf VISITECT	Positivo	0	0	0
	Negativo	0	50	50
	TOTAL	0	50	50

	Resultado (%)
Sensibilidad:	No Cuantificable
Especificidad:	100.0
Eficacia COMBO PAN/Pf VISITECT vrs. gota gruesa:	100.0
Coefficiente <i>Kappa</i> :	No Cuantificable

La tabla 6 presenta la concordancia general de malaria entre la prueba rápida COMBO PAN/Pf VISITECT y el método convencional gota, en donde se obtuvo un 97.9% de sensibilidad, una especificidad del 96.1%, una eficacia del 97% y una óptima concordancia con gota gruesa a través del índice de *Kappa* (0.94); el Intervalo de Confianza (IC) fue del 95%.

Tabla 6

Niveles de concordancia entre la prueba rápida COMBO PAN/Pf VISITECT y el método convencional gota para malaria en general  
(N=100)

		<b>Gota gruesa</b>		
		<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	<b>TOTAL</b>
<b>COMBO PAN/Pf VISITECT</b>	<b>Positivo</b>	47	2	49
	<b>Negativo</b>	1	50	51
	<b>TOTAL</b>	48	52	100

	<b>Resultado (%)</b>
Sensibilidad:	97.9
Especificidad:	96.1
Eficacia COMBO PAN/Pf VISITECT vrs. gota gruesa:	97.0
Coefficiente <i>Kappa</i> :	0.94

## IX. DISCUSION DE RESULTADOS

Dos aspectos importantes en la implementación de la estrategia para el control de la malaria lo constituyen el diagnóstico y el tratamiento oportuno de los casos. El diagnóstico debe ser rápido para proporcionar un tratamiento apropiado, considerando su disponibilidad y validez. En Guatemala, por muchos años el examen microscópico utilizado ha sido la gota gruesa, siendo considerado como el método de referencia para el diagnóstico de malaria, ya que es un método con una sensibilidad muy alta, pudiéndose detectar densidades parasitarias de hasta 5 parásitos/mL (44).

Pese a su sencillez y costo relativamente bajo, la gota gruesa es un método que requiere de una infraestructura adecuada, así como la capacitación y experiencia del personal y una garantía continua de calidad del servicio.

Actualmente en el mercado se disponen de pruebas rápidas para el diagnóstico de malaria validadas tanto para *P. falciparum* como para *P. vivax*, siendo una excelente alternativa ya que son sensibles, específicas, no requieren de un laboratorio tecnificado y resultan aplicables en áreas con dificultades de acceso.

Los resultados obtenidos en este estudio, indican que la sensibilidad (90.9%) del COMBO PAN/Pf VISITECT para detectar *P. falciparum* no se encuentra dentro del rango reportado por la literatura (45) que refiere una sensibilidad mayor del 95%, y que la especificidad (97.4%) fue mayor a la reportada por la literatura (> del 89%). Estos resultados son similares a los encontrados en otros estudios que han demostrado una alta sensibilidad y especificidad para las pruebas rápidas, principalmente en las que se basan en la determinación de proteínas ricas en histidina (PfHRP-2) de *P. falciparum*, reportándose sensibilidades entre el 88 y 97% y especificidades entre el 81 y 99% (46). En un estudio realizado en la India, utilizando una prueba rápida basada en la determinación de la proteína rica en histidina (PfHRP-2) para la detección de *P. falciparum*, se reportó una sensibilidad del 100% y especificidad del 84.5% (47).

La prueba rápida COMBO PAN/Pf VISITECT detectó correctamente casos positivos y negativos de *P. falciparum*, presentando una eficacia del 96.0% al ser comparada con la gota gruesa.

El grado de concordancia (coeficiente *Kappa*) entre la prueba rápida COMBO PAN/Pf VISITECT y la gota gruesa fue de 0.88; el cual indica una concordancia óptima (anexo 6), por lo que la prueba rápida puede ser utilizada como soporte alternativo para diagnosticar *P. falciparum*. Estudios con pruebas rápidas que detectan proteínas ricas en histidina y lactato deshidrogenasa presentaron una concordancia *Kappa* de 0.90, lo cual coincide con el resultado obtenido en esta prueba (41).

El COMBO PAN/Pf VISITECT es una prueba rápida con un 100% de sensibilidad para detectar *P. vivax*, encontrándose dentro del rango reportado por la literatura (> del 75%), no así en la especificidad (92.3%), la que se encuentra ligeramente por debajo del rango reportado (> del 95%). Estos resultados son análogos a los encontrados en otros estudios que han demostrado una alta sensibilidad y especificidad para las pruebas rápidas, principalmente para las que detectan Lactato Deshidrogenasa específica para *Plasmodium* (pLDH) de *P. falciparum* y *P. vivax*, donde se encontraron sensibilidades entre el 85 y 97.8% y especificidades entre 90.1 y 96.5% (45,46).

Llanos *et al.* realizó un estudio en una zona endémica de la amazonia peruana, en el cual evaluó una prueba rápida que detectaba antígenos de *P. falciparum* y *P. vivax* en sangre, utilizando dos anticuerpos, uno específico para *P. falciparum* y otro para ambas especies; reportando una sensibilidad del 71.4% y especificidad del 90.3% (47).

La prueba rápida COMBO PAN/Pf VISITECT es una prueba eficaz (98.0%) en comparación con la gota gruesa, ya que detectó correctamente casos positivos y negativos de *P. vivax*.

La prueba rápida COMBO PAN/Pf VISITECT presentó una concordancia *Kappa* de 0.95 con respecto a la gota gruesa, clasificándose como óptima dentro de la escala de concordancia *Kappa* (anexo 6), por lo que puede ser utilizada para diagnosticar *P. vivax*. Algunos estudios que evaluaron pruebas rápidas que detectaban deshidrogenada láctica presentaron una concordancia *Kappa* de 0.91, lo cual correlaciona con el resultado obtenido en esta prueba (40).

La especificidad y la eficacia, fueron los únicos valores cuantificados para la prueba rápida COMBO PAN/Pf VISITECT, reportando valores del 100%. Estos datos proporcionaron un valor global de la prueba rápida COMBO PAN/Pf VISITECT en la detección de casos negativos, pero no se logró plantear conclusiones concretas, ya que no se pudieron cuantificar los demás parámetros (sensibilidad y coeficiencia de concordancia *Kappa*); debido posiblemente al pequeño número de muestras analizadas.

Para malaria en general, la prueba rápida COMBO PAN/Pf VISITECT presentó una sensibilidad del 97.9%, especificidad del 96.1%, eficacia del 97% y una óptima concordancia con gota gruesa a través del índice de *Kappa* de 0.94.

En países como el nuestro en donde coexisten las infecciones por *P. falciparum* y *P. vivax*, es necesario el uso de pruebas que permitan detectar ambos parásitos. La alta concordancia encontrada en la prueba rápida COMBO PAN/Pf VISITECT demuestra su eficacia como un método apropiado para el diagnóstico de la malaria en zonas donde existe un alto porcentaje de positividad de casos de malaria.

Para realizar el procedimiento completo del examen microscópico de la gota gruesa y la prueba rápida COMBO PAN/Pf VISITECT, se requirió de un seguimiento cuidadoso de los pasos y de esta manera evitar errores que pudieran provocar cambios en los resultados.

En general, el examen microscópico de la gota gruesa requirió de un tiempo de 45 a 60 minutos, desde la toma de la muestra hasta la obtención de resultados; mientras que la prueba rápida COMBO PAN/Pf VISITECT requirió de menos tiempo en su procedimiento (aproximadamente de 15-20 minutos). Esta diferencia de tiempo en la obtención de resultados, a menudo condujo a la demora en el informe del resultado, lo cual es una desventaja para la gota gruesa en comparación con la prueba rápida.

Adicionalmente, COMBO PAN/Pf VISITECT tiene como ventaja sobre gota gruesa de que cada prueba posee un control de calidad interno (pozo control), lo cual no sucede con las muestras de gota gruesa, en la que los resultados no son reproducibles en manos inexpertas, por utilizar una metodología manual.

Por lo anterior, se puede concluir que la prueba rápida COMBO PAN/Pf VISITECT evaluada es fácil de realizar, se presta para poder examinar muchas muestras, es sensible, específica, eficaz y con un alto grado de concordancia con gota gruesa.

Es importante comentar que el costo por prueba del COMBO PAN/Pf VISITECT es de aproximadamente Q 22.00 (\$ 3.00), el cual es elevado si se compara con el costo de la gota gruesa; sin embargo, este costo aparentemente alto es relativo si se tiene en cuenta que el examen microscópico gota gruesa requiere de una adecuada infraestructura y un personal calificado para su observación; lo que implica que en las áreas de difícil acceso cuando es necesario enviar las muestras a un laboratorio central, los resultados del examen pueden demorar varias semanas.

## X. CONCLUSIONES

1. La prueba rápida COMBO PAN/Pf VISITECT presentó una aceptable concordancia con gota gruesa para el diagnóstico de malaria, es fácil de realizar y requiere de un corto tiempo para obtener resultados.
2. La sensibilidad de la prueba rápida COMBO PAN/Pf VISITECT para detectar *P. falciparum* fue del 90.9% y del 100% para *P. vivax*.
3. El COMBO PAN/Pf VISITECT presentó una especificidad del 97.4% para detectar *P. falciparum* y del 92.3% para detectar *P. vivax*.
4. La eficacia de la prueba rápida COMBO PAN/Pf VISITECT para detectar *P. falciparum* fue del 96%, mientras que para *P. vivax* fue del 98%.
5. Para malaria en general, la prueba rápida COMBO PAN/Pf VISITECT presentó una sensibilidad del 97.9%, especificidad del 96.1% y eficacia del 97%.
6. El grado de concordancia *Kappa* entre la prueba rápida COMBO PAN/Pf VISITECT y el examen microscópico gota gruesa es óptimo (0.94), por lo que la prueba rápida puede ser utilizada como soporte alternativo para diagnosticar *P. falciparum* y *P. vivax*.

## **XI. RECOMENDACIONES**

1. Utilizar la prueba rápida COMBO PAN/Pf VISITECT como soporte alternativo para diagnosticar malaria.
2. Realizar estudios económicos complementarios que puedan justificar la utilización de la prueba rápida COMBO PAN/Pf VISITECT, especialmente en laboratorios donde no existe una infraestructura desarrollada.
3. Es recomendable aplicar el estudio a una población mayor, tanto endémica como no endémica, para evaluar si los resultados son reproducibles.

## XII. REFERENCIAS

1. Aguilar A. Parasitología médica. 3 ed. Litografía Delgado. 1997. 366p. (p. 292-311).
2. Malaria o paludismo. Disponible en [www.anlis.gov.ar/consulta/infecciosas/malaria/malaria.htm](http://www.anlis.gov.ar/consulta/infecciosas/malaria/malaria.htm). Fecha de consulta: 23 Sept. 2004.
3. Situación de la malaria en Guatemala. Disponible en [www.ops.org.gt/epc/vector/malaria.htm](http://www.ops.org.gt/epc/vector/malaria.htm). Fecha de consulta: 11 Jul. 2004.
4. Ministerio de Salud Pública. La semana epidemiológica en Guatemala. Disponible en [www.mspas.gob.gt](http://www.mspas.gob.gt). Fecha de consulta: 15 Feb. 2006.
5. Omega diagnostics. Visitect malaria COMBO PAN/Pf. Disponible en [www.omegadiagnostics.co.uk](http://www.omegadiagnostics.co.uk). Fecha de consulta: 21 Sept. 2004.
6. Wungaarden JB, *et al.* Tratado de Medicina Interna. 16 ed. México: Interamericana, Vols. 2, vol, 2, 1985. 2600p. (p.1790-1800).
7. Beenson PB, *et al.* Tratado de la medicina interna. 14 ed. México: Interamericana, 1977. 1826p. (p. 555-563).
8. Historia de la malaria. Disponible en [www.rph.wa.gov.au/labs/haem/malaria/spain/history.html](http://www.rph.wa.gov.au/labs/haem/malaria/spain/history.html). Fecha de consulta: 20 Mar. 2006.
9. Champin G. Pesticide use and malaria resurgence in Central America and India. Soc. Med. 1983; 17:273-290.
10. Jensen JB. *Plasmodium*. p. 155-192 (IN Jensen JB, Ed. *In vitro* cultivation of protozoan parasites. Boca Ratón, Florida; CRC Press, Inc, 1983. 297p.).
11. Murray PR, *et al.* Microbiología médica. 4 ed. Madrid: Elsevier, 2002. 810p. (p. 702-706).

12. Brown EH. Parasitología clínica. 4 ed. México: Interamericana, 1981. 320p. (71-89).
13. Hunter GW. *et al.* Tropical medicine. 5 ed. USA: Saunders company, 1975. 926 p. (p. 333-396).
14. Robins S. Patología estructural y funcional. 2 ed. México: Interamericana, 1975. 519p. (439-441).
15. Guía de atención a la malaria. Disponible en [medicosgeneralescolombianos.com/Malaria.htm](http://medicosgeneralescolombianos.com/Malaria.htm). Fecha de consulta: 30 Mar. 2006.
16. La malaria. Disponible en [www.netsalud.sa.cr/ms/estadist/enferme/paludi.htm](http://www.netsalud.sa.cr/ms/estadist/enferme/paludi.htm). Fecha de consulta: 12 Dic. 2005.
17. Malaria o paludismo. Disponible en [www.tusalud.com.mx/121502.htm](http://www.tusalud.com.mx/121502.htm). Fecha de consulta: 05 Sept. 2004.
18. Aguilar M. Prevalencia de *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum* en donadores de sangre del Hospital de Mazatenango y comparación de los métodos de inmunofluorescencia indirecta y gota gruesa. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1989. 62p.
19. Soto AA. Epidemiología de la malaria. Unidad de metaxénicos fase II, Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala, (Doc. no. 2, 1977), 21p. (p.1-10).
20. Linch MJ. Medical laboratory technology. 3 ed. USA: Saunders Company, Vols. 2, vol. 1, 1976. 1890p. (p.807-814).
21. Sonnenwirth A, *et al.* Métodos y diagnóstico del laboratorio clínico. 8 ed. Argentina: Panamericana, Vols. 2, vol 2, 1983. 2240p. (p.1922-1931).
22. Sommers H, *et al.* Biological and clinical basis of infections diseases. 2 ed. USA: Saunders Company, 1980. 849p. (p.707-710).

23. Carrada T. Epidemiología, diagnóstico y prevención del paludismo. Bol. Med. Hosp. Inf. México. 1983; 40:(423-433).
24. La malaria. Disponible en <[www.monografias.com/trabajos/malaria/malaria.shtml](http://www.monografias.com/trabajos/malaria/malaria.shtml)>. Fecha de consulta: 05 Sept. 2004.
25. Garcés M, *et al.* Geografía de la malaria en Guatemala. Unidad de infección-fase II. Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala, (Doc. no. 1, 1978).
26. Servicio Nacional de Erradicación de la Malaria. Memorias anuales 1979. Educación Sanitaria de la División de Malaria. Guatemala. 1979. 131p. (p.24-64).
27. Servicio Nacional de Erradicación de la Malaria. Memorias anuales 1980. Educación Sanitaria de la División de Malaria. Guatemala. 1980. 144p. (p.22-63).
28. Servicio Nacional de Erradicación de la Malaria. Memorias anuales 1982. Educación Sanitaria de la División de Malaria. Guatemala. 1982. 131p. (p.22-51).
29. Servicio Nacional de Erradicación de la Malaria. Memorias anuales 1983. Educación Sanitaria de la División de Malaria. Guatemala. 1983. 132p. (p.1-2).
30. Servicio Nacional de Erradicación de la Malaria. Memorias anuales 1984. Educación sanitaria de la División de Malaria. Guatemala, 1984. 184p. (p. 1-2).
31. Organización Mundial de la Salud XXXIX reunión, Organización Panamericana de la Salud XXXII reunión. Situación de los programas de malaria en las Américas XXV informe. Washington, D.C. OMS-OPS, 1987. 84 p. (p. 12-52).
32. Champin G, *et al.* Agricultural production and malaria production and malaria resurgence in Central America and India. Nature 1981; 17:181-185.
33. Joklik WK, *et al.* Zinsser microbiology. 17 ed. USA: Appleton Century Crafts. 1980. 1562 p. (p.1445-1450).

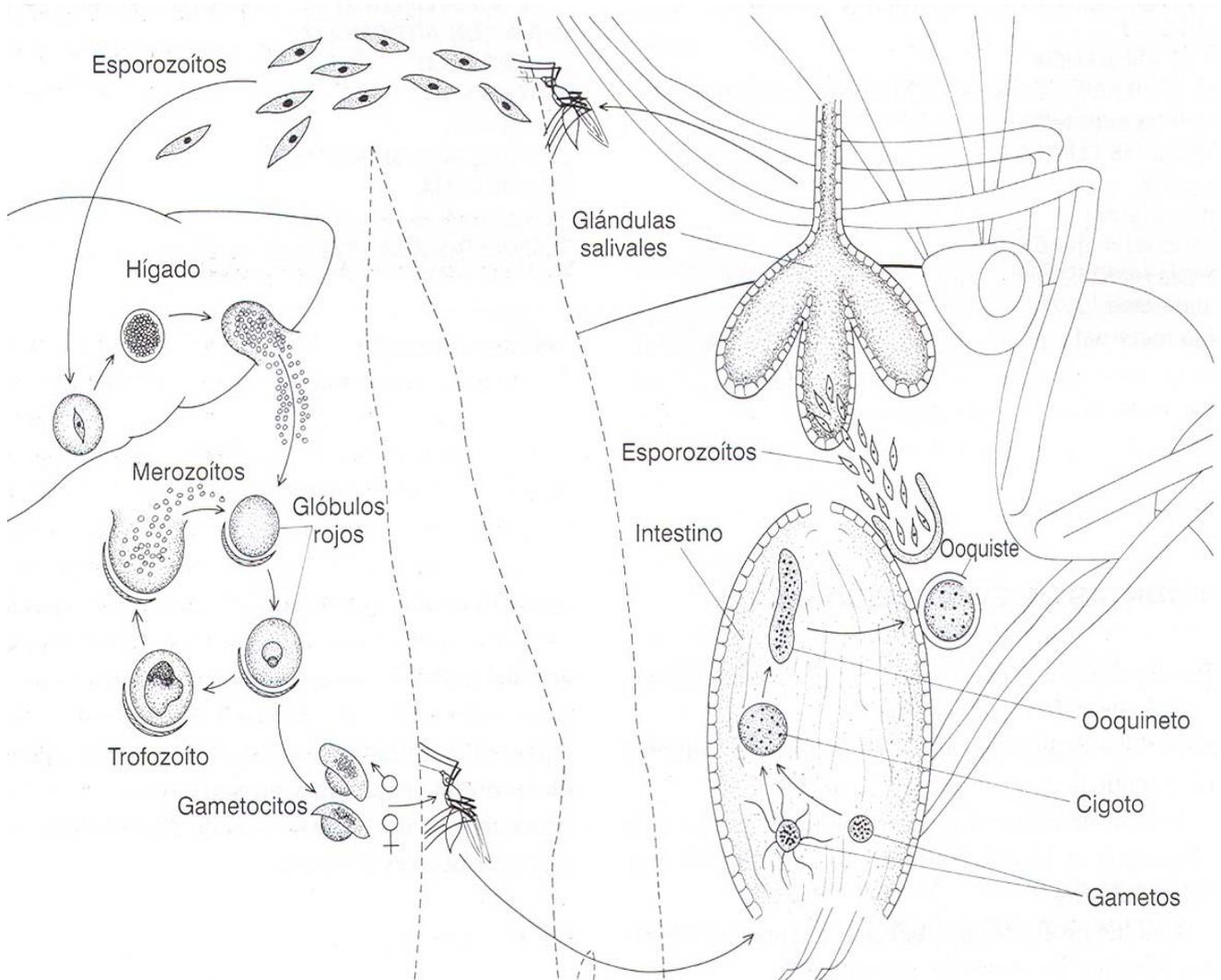
34. Perrin L. The hematology of malaria in man. Sem. Hematol. 1982. (p.1970-1982).
35. Bawer JD. Clinical laboratory methods. 8 ed. USA: Mosby Company, 1974. 785p. (p.588-596).
36. Malaria: Mecanismos de la enfermedad. Disponible en <[www.es.wikipedia.org/wiki/Malaria](http://www.es.wikipedia.org/wiki/Malaria)>. Fecha de consulta: 13 Dic. 2005.
37. Diagnóstico de laboratorio. Disponible en <[www.rph.wa.gov.au/labs/haem/malaria/spain/diagnosis.html](http://www.rph.wa.gov.au/labs/haem/malaria/spain/diagnosis.html)>. Fecha de consulta: 11 Jul. 2004.
38. Lobel HO, *et al.* Seroepidemiology of parasitic disease. CDC 1978; 32:329-333.
39. Harrison RT. Principles of internal medicine. 9 ed. USA: McGraw-Hill, Book Company, 1980. 992p. (p.867-873).
40. Evaluación de la prueba ICT malaria P. f/P.v (AMRAD) para la detección de *P. falciparum* y *P. vivax* en una zona endémica de la amazonia peruana. Disponible en <[www.ins.gob.pe/RevistaPDF](http://www.ins.gob.pe/RevistaPDF)>. Fecha de consulta: 21 Sept. 2004.
41. Evaluación del uso de una prueba rápida inmunocromatográfica en promotores de salud para el diagnóstico de la malaria en áreas rurales de la amazonia peruana. Disponible en <[www.sisbib.unmsm.edu.pe/BVrevistas/Medicina\\_Experimental/N1\\_2004/Pdf/a02.pdf](http://www.sisbib.unmsm.edu.pe/BVrevistas/Medicina_Experimental/N1_2004/Pdf/a02.pdf)>. Fecha de consulta: 21 Sept. 2004.
42. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de malaria. Disponible en <[www.ins.gob.pe/downloads/publicaciones/manual%20MALARIA.pdf](http://www.ins.gob.pe/downloads/publicaciones/manual%20MALARIA.pdf)>. Fecha de consulta: 21 Sept. 2004.
43. Maclure M, *et al.* Misinterpretation and misuse of the Kappa statistic. American Journal of Epidemiology. 1987. p.126:161-169.
44. Lema O, *et al.* Comparison of five methods of malaria detection in the outpatient setting. 1999. 60(2):177-82.

45. Tjitra E, *et al.* Field evaluation of the malaria P.f/P.v immunochromatographic test for detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in patients with a presumptive clinical diagnosis of malaria in eastern Indonesia. *Journal Clinical Microbiology*. 1999. p. 2412 – 2417.
46. Llanos F, *et al.* Evaluación de la prueba ICT malaria P. f/P.v (AMRAD) para la detección de *P. falciparum* y *P. vivax* en una zona endémica de la amazonia peruana. *Revista médica peruana de salud pública*. 2002. p. 39-42
47. Singh N, *et al.* Malaria diagnosis by field workers using an immunochromatographic test. *Topical Medicine*. 1997. p. 396-397.
48. Becerril R, *et al.* Parasitología médica: de las moléculas a la enfermedad. México: McGraw-Hill Interamericana, 2004. 301p. (p.113-118).
49. Koneman E, *et al.* Diagnóstico microbiológico. 5 ed. Argentina: Médica Panamericana, 1999. 1432p. (p.1092-1094).

### XIII. ANEXOS

#### Anexo 1

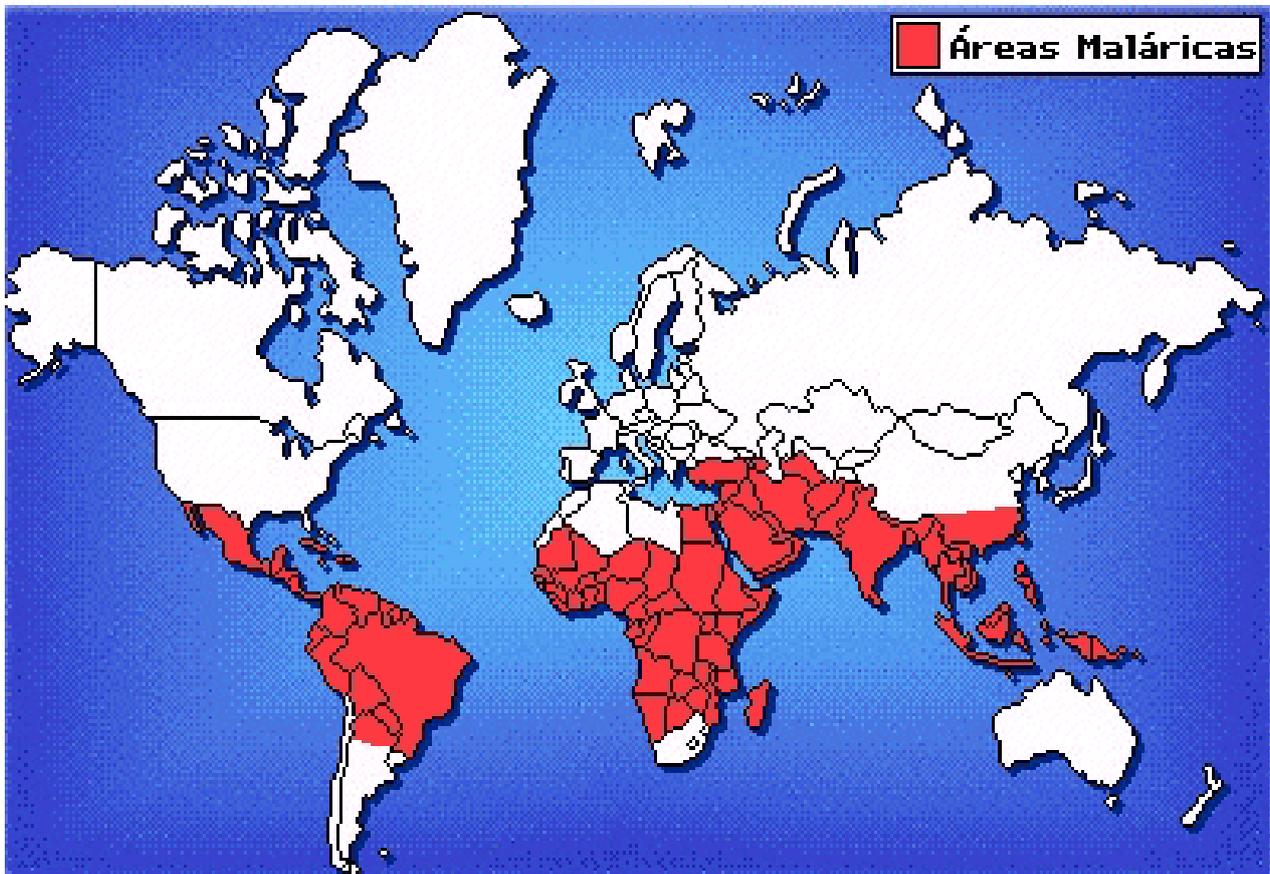
#### Desarrollo del agente causal de la malaria



**Tomado de:** Becerril R, *et al.* Parasitología médica: de las moléculas a la enfermedad. México: McGraw-Hill Interamericana, 2004. 301p. (p.113-118).

**Anexo 2**

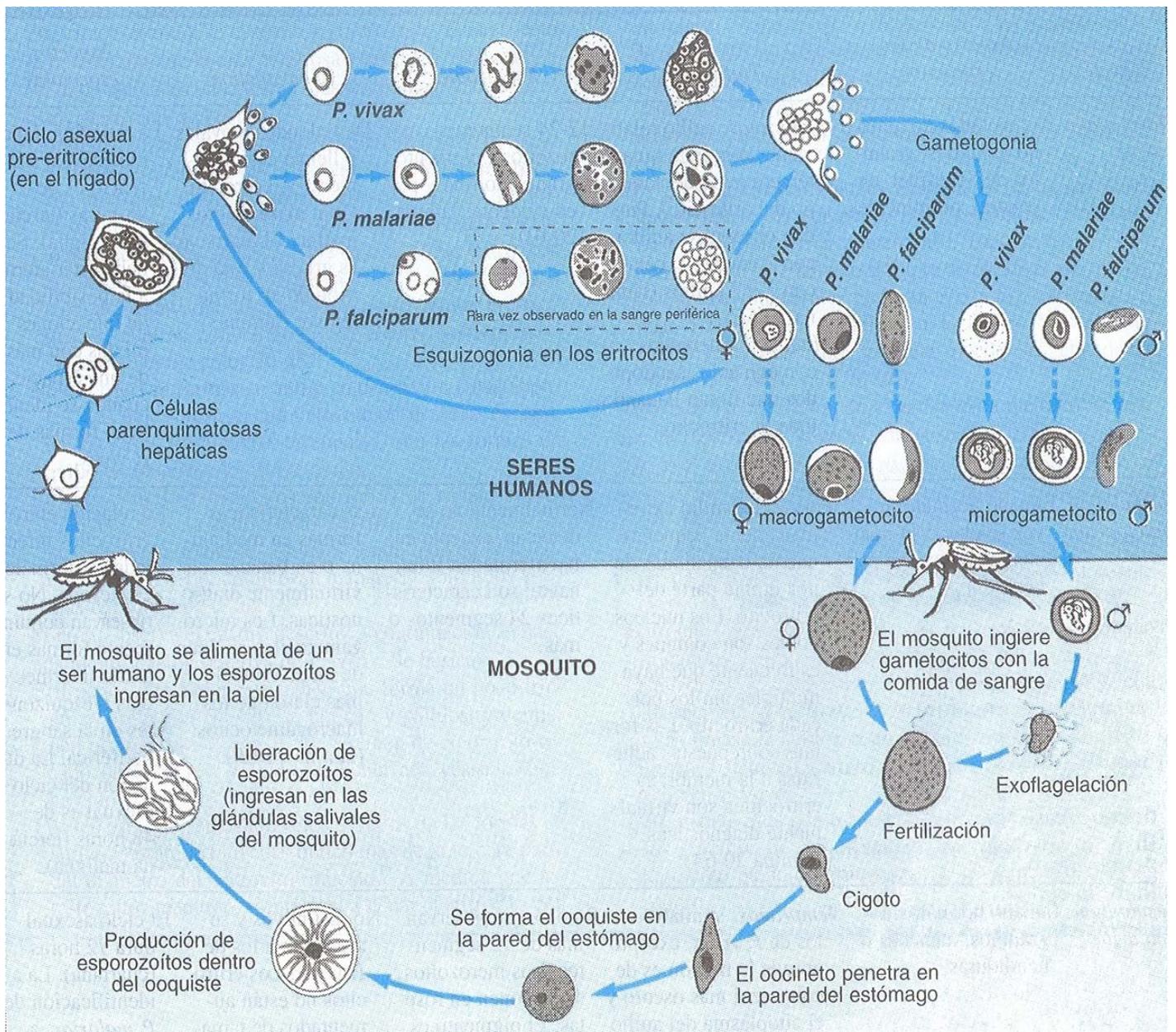
## Incidencia de la malaria



**Tomado de:** Malaria o paludismo. Disponible en  
<[www.anlis.gov.ar/consulta/infecciosas/malaria/malaria.htm](http://www.anlis.gov.ar/consulta/infecciosas/malaria/malaria.htm)>.

## Anexo 3

## Ciclo de infección de la malaria



**Tomado de:** Koneman E, *et al.* Diagnóstico microbiológico. 5 ed. Argentina: Médica Panamericana, 1999. 1432p. (p.1092-1094).

## Anexo 4

### Carta de consentimiento

#### Instituto Guatemalteco de Seguridad Social (IGSS) de Mazatenango - Hospital Regional de Occidente “San Juan de Dios” de Quetzaltenango

Lugar y fecha \_\_\_\_\_

Por medio de la presente manifiesto mi aceptación para que mi hijo(a):

participe en la investigación titulada:

**Comparación de una prueba rápida con el método convencional gota gruesa para el diagnóstico de malaria en un área endémica.** Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de su participación en el estudio.

La Investigadora Responsable se ha comprometido a proporcionarme la información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para su tratamiento, así como a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación.

Se me ha dado seguridad de que no se le identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con su privacidad serán manejados en forma confidencial.

---

Nombre y firma

---

Parentesco

---

Dirección

---

Teléfono

## Anexo 5

### Análisis de resultados

		<b>Test de referencia</b>	
		+	-
<b>Prueba rápida</b>	+	a	b
	-	c	d

$$\text{Sensibilidad} = a / (a + c)$$

$$\text{Especificidad} = d / (d + b)$$

$$\text{Valor Predictivo Positivo (VPP)} = a / (a + b)$$

$$\text{Valor Predictivo Negativo (VPN)} = d / (c + d)$$

$$\text{Eficacia} = (a + d) / (a + b + c + d)$$

$$\text{Coeficiente de Kappa (K)} = (P_o - P_e) / (1 - P_e)$$

Donde: **P<sub>o</sub>** = Proporción de concordancias observadas

**P<sub>e</sub>** = Proporción de concordancias esperadas

$$P_o = (a + d) / (a + b + c + d)$$

$$P_e = [ (a + b) (a + c) + (c + d) (b + d) ] / (a + b + c + d)^2$$

**Tomado de:** Maclure M, *et al.* Misinterpretation and misuse of the Kappa statistic. American Journal of Epidemiology, 1987; 126:161-169.

## Anexo 6

Tabla 6  
Escala de concordancia *Kappa*

	Concordancia	<i>Kappa</i>
1	Malo	< 0.00
2	Pobre	0.00 – 0.20
3	Sufrible	0.21 – 0.40
4	Regular	0.41 – 0.60
5	Buena	0.61 – 0.80
6	Optima	0.81 – 0.99
7	Perfecta	1.00

**Tomado de:** Maclure M, *et al.* Misinterpretation and misuse of the Kappa statistic. American Journal of Epidemiology, 1987; 126:161-169.

**Fabiola Esthela García Axt**  
**Autor**

**Licenciada Cecilia Sánchez de Porres**  
**Asesora**

**Licenciada María Eugenia Paredes**  
**Revisora**

**Licenciada María Paula de León**  
**Revisora**

**Licenciada Vivian Matta**  
**Directora**

**Oscar Cóbar, PhD.**  
**Decano**