

RECOMENDACIÓN TÉCNICA SOBRE EL DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO AL TRATAMIENTO DE MALARIA POR GOTA GRUESA Y PRUEBAS RÁPIDAS Y USO DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS MOLECULARES EN LA DETECCIÓN DE *PLASMODIUM* S.P.P. EN COLOMBIA

Resumen

Emitir las recomendaciones técnicas para el diagnóstico de malaria por gota gruesa y Pruebas rápidas (PDR) y seguimiento al tratamiento en los laboratorios y puestos de diagnóstico del país.

Generar las pautas para el uso de pruebas diagnósticas moleculares utilizadas en la detección de *Plasmodium s.p.p.* en Colombia.

Liliana Jazmín Cortés Cortés - Angela Patricia Guerra Vega
jcortes@ins.gov.co - aguerra@ins.gov.co



Créditos

MARTHA LUCÍA OSPINA MARTÍNEZ
Directora General

ASTRID CAROLINA FLOREZ SANCHEZ
Directora Técnica de Redes en Salud Pública

CLARA DEL PILAR ZAMBRANO HERNANDEZ
Subdirectora Laboratorio Nacional de Referencia

MARTHA STELLA AYALA SOTELO
Coordinadora Grupo de Parasitología-SLNR

©

Instituto Nacional de Salud

Bogotá, Colombia

Av. Calle 26 No. 51-20



OBJETIVOS

Emitir las recomendaciones técnicas para el diagnóstico de malaria por gota gruesa y pruebas rápidas (PDR) y seguimiento al tratamiento en los laboratorios y puestos de diagnóstico del país.

Generar las pautas para el uso de pruebas diagnósticas moleculares utilizadas en la detección de *Plasmodium s.p.p.* en Colombia.

ALCANCE

La presente recomendación técnica aplica para el diagnóstico y seguimiento por laboratorio de pacientes con malaria mediante gota gruesa y pruebas de diagnóstico rápido (PDR), realizadas por los profesionales en salud, técnicos, auxiliares y personal asistencial de la salud y de los laboratorios de la Red Nacional de Laboratorios del país.

Adicionalmente se emiten las recomendaciones para el uso de pruebas moleculares en la detección de *Plasmodium s.p.* en Colombia, la cual debe ser aplicada por todos los profesionales de los laboratorios de la Red Nacional de Laboratorios del país.

INTRODUCCION

El diagnóstico de malaria se hace mediante visualización directa de la especie parasitaria infectante presente en sangre (*Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, infección mixta) por medio de examen directo microscópico de gota gruesa y extendido de sangre periférica como método complementario, la detección de antígenos parasitarios a través de las Pruebas de Diagnóstico Rápido (PDR) (1,2) y mediante métodos parasitológicos directos que permiten la detección de ácidos nucleicos del parásito como la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

En este contexto se debe garantizar el acceso universal al diagnóstico de malaria que acompañado de un tratamiento oportuno, el reporte y análisis de los casos, así como el seguimiento microscópico al tercer día luego de iniciado el tratamiento, posibilita la toma de decisiones que impactan la morbilidad y la mortalidad de la enfermedad (3,4).

La microscopia se constituye en el estándar de oro para el diagnóstico de la malaria, teniendo en cuenta que se debe contar con metodología estandarizada de elaboración y coloración, colorantes con características técnicas y de calidad adecuados, personal bien entrenado y Programas de Garantía de Calidad continuos, es una metodología que tiene ventajas por ser económica, sensible y específica y que permite realizar actividades de control de calidad (5).

Las PDR son dispositivos de fácil uso e interpretación sencilla que permiten ampliar la cobertura del diagnóstico de malaria en zonas rurales dispersas y en donde la población que se encuentra en riesgo de tener la enfermedad no tiene acceso al diagnóstico ni a un tratamiento antimalárico oportuno. Sin embargo, es importante tener presente que el diagnóstico microscópico es la prueba de referencia para el diagnóstico de malaria y debe ser el método por excelencia siempre que existan las condiciones para su aplicación (6).

A pesar de las numerosas ventajas de las 2 técnicas mencionadas previamente, éstas no logran estimar acertadamente la prevalencia de las infecciones que cursan con parasitemias muy bajas (<100 parásitos/ μ l) en escenarios de baja transmisión. Así, la necesidad de contar con métodos de detección más sensibles ha llevado a la utilización de herramientas diagnósticas basadas en la amplificación del ácido nucleico (NAA por sus siglas en inglés), particularmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). Este tipo de metodología se viene utilizando ampliamente en estudios epidemiológicos o de investigación y actualmente se encuentran disponibles en el mercado varias pruebas con desempeño diagnóstico superior a la microscopía y las PDR (7).

Los recientes avances en el control de la malaria y el incremento en los fondos para combatir esta enfermedad, han llevado a considerar la eliminación de la malaria como una meta alcanzable para un considerable número de regiones endémicas. El paso del control a eliminación prioriza las intervenciones dirigidas a erradicar las infecciones que contribuyen a la transmisión de la malaria, sin considerar el estatus sintomático o la parasitemia (8). Colombia participa en esta iniciativa y ya algunos municipios vienen preparándose para adoptar las estrategias de eliminación. Teniendo en cuenta que las pruebas moleculares tienen una mayor sensibilidad y especificidad y que dentro de las estrategias de eliminación la interrupción de la transmisión es un factor preponderante, las herramientas de detección molecular deben ser consideradas para el diagnóstico de casos con infección sub-microscópica y así contribuir al avance del programa de eliminación de la malaria.

Por otra parte, la eficacia del tratamiento antimalárico debe ser vigilada mediante seguimiento microscópico al tercer día luego de iniciado el tratamiento con gota gruesa, lo que permite monitorear la completa eliminación de formas parasitarias asexuales en el paciente con lo cual se asegura la respuesta adecuada al tratamiento.

Considerando esta situación y con el fin de unificar conceptos sobre estas metodologías de diagnóstico y seguimiento, el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) de la Dirección de Redes en Salud Pública (DRSP) del INS elabora esta recomendación técnica en el marco de sus competencias.

RECOMENDACIONES PARA EL DIAGNÓSTICO MICROSCÓPICO DE MALARIA

- Elaborar tres láminas por paciente: dos láminas cada una con dos gotas gruesas y una lámina con un extendido.
- Para las gotas gruesas realizar proceso de deshemoglobinización con Azul de Metileno Fosfatado.
- Para los extendidos realizar proceso de fijación con metanol.
- Para el proceso de Coloración emplear cualquiera de los colorantes derivados de Romanowsky: Field o Romanowsky modificado (3 ml de sales fosfatadas, 1 gota de solución A y 1 gota de Solución B por cada lámina); Giemsa, Wrigth (9 ml de sales fosfatadas y 1 ml de colorante).
- Se recomienda emplear controles positivos y negativos para cada lote de colorante con el fin de estandarizar el tiempo de coloración.
- Colorear en lámina cóncava, de acuerdo al tiempo estandarizado por cada laboratorio.

Tips para diagnóstico:

- Confirmar la positividad o negatividad empleando la gota gruesa.
- Negatividad: ausencia de parásitos después de observar por lo menos 500 campos microscópicos con objetivo 100x.
- Positividad: confirmar especie; descartar una posible infección mixta.
- Si persisten dudas en la especie se debe usar el extendido.

- Recuento: enfocar campos que tengan de 10 - 20 leucocitos, continuar en campos adyacentes. Informar densidad parasitaria.
- Control: tomar una nueva gota gruesa el día 3 posterior al inicio del tratamiento; la atención del paciente para esta toma de muestra se debe registrar en una nueva ficha de notificación de SIVIGILA.

Reporte resultados

Reportar la gota gruesa como positiva o negativa así:

- Gota gruesa negativa: No se observan hemoparásitos en la muestra examinada.
- Gota gruesa positiva: informar especie y recuento.
 - Infección mixta bajo los siguientes criterios:
 - Observación de formas sexuales y asexuadas de *P. vivax*, junto con gametocitos de *P. falciparum*
 - Observación de formas sexuales y asexuadas de *P. vivax*, junto con formas asexuadas de *P. falciparum*, en cantidades similares de las dos especies. En este caso, se realiza un recuento a 100 parásitos y se determina el porcentaje de cada especie. Para definir infección mixta debe observarse >40% de formas asexuadas de *P. falciparum*.
- Una muestra en la que sólo se observen gametocitos de *P. falciparum* se debe reportar como positiva

Recuento parasitario

En el caso de *P. vivax*, *P. malariae* o *P. ovale* se deben contar todas las formas parasitarias sin discriminar si son sexuales o asexuadas.

En el caso de *P. falciparum* se deben contar todas las formas parasitarias asexuadas e informar la presencia de gametocitos (formas sexuales).

En el caso de infección mixta de *P. vivax* y *P. falciparum*, se debe reportar primero la especie predominante, para *P. vivax* se deben contar todas las formas parasitarias sin discriminar si son sexuales o asexuadas, para *P. falciparum* se deben contar todas las formas parasitarias asexuadas e informar la presencia de gametocitos.

Realizar el recuento parasitario teniendo en cuenta la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Número de parásitos X 8000}}{\text{Número de Leucocitos (200)}}$$

Si al contar 200 leucocitos se observan 10 o más parásitos, aplicar la fórmula con base en 200 leucocitos.

Si al contar 200 leucocitos se observan 9 o menos parásitos, continuar el recuento hasta llegar a los 500 leucocitos y aplicar la fórmula con base en los 500 leucocitos.

Si se cuentan más de 500 parásitos sin llegar a contar los 200 leucocitos, el recuento se dará por terminado cuando se finalice la lectura del último campo y la parasitemia debe calcularse según la fórmula anterior.

RECOMENDACIONES PARA ACTIVIDADES DE LA RED DE DIAGNÓSTICO DE MALARIA

Para el Programa de Evaluación Externa Indirecta del Desempeño (PEID) los municipios deberán remitir al LSP:

- 10 láminas mensuales mediante selección aleatoria (cinco positivas y cinco negativas) (5).
- Los parámetros valorados son: la concordancia de resultados positivos y negativos (aceptable, mayor del 75 %), el índice kappa general y de especie (aceptable, mayor de 0,8), concordancia del recuento parasitario (aceptable, mayor del 75 %) y el error general que corresponde al porcentaje de errores técnicos

Para el Programa de Evaluación Externa Indirecta del Desempeño (PEID) los LSP deberán remitir al INS:

- Todas las láminas positivas para otras especies parasitarias (*P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi*)
- Todas las láminas de infecciones mixtas
- Todas las láminas con recuento ≥ 25.000 parásitos/ μL
- Todas las láminas de pacientes que hayan fallecido con diagnóstico probable de malaria (9).
- Todas las láminas positivas para formas asexuadas de *P. falciparum* en el día 3 post-tratamiento.

Para el Programa de Evaluación Externa Directa del Desempeño (PEDD) se deben tener en cuenta los siguientes criterios:

- Evaluación a partir de un panel de diez (10) láminas de gotas gruesas y extendidos de óptima calidad de las especies presentes en la región con infecciones de *P. falciparum*, *P. vivax* o mixtas.
- Láminas problema, homogéneas y estables, identificadas individualmente con códigos irrepetibles.
- Láminas con diferentes grados de complejidad (densidad parasitaria, morfología, artefactos) y láminas negativas.
- Los parámetros a determinar en los ítems de ensayo son: la positividad o negatividad de las muestras, la especie o especies presentes en la muestra, la identificación morfológica de las formas sexuadas y asexuadas y la densidad parasitaria en los ítems de ensayo positivos.

RECOMENDACIONES PARA EL DIAGNÓSTICO DE MALARIA EMPLEANDO PDR

Características técnicas de las PDR

- Tener registro sanitario Invima.
- Selectividad de la prueba: identificar *P. vivax* y *P. falciparum*
- Se espera que las PDR tengan un puntaje de "Panel Detection Score (PDS) $\geq 75\%$, de acuerdo a criterios OMS con un panel de muestras de baja densidad (200 parásitos/ μL) y uno de mayor densidad (2000 parásitos/ μL) (10).

(a) Para la detección de *P. falciparum* en todos los entornos de transmisión, el PDS debe ser al menos del 75% con una parasitemia de 200 parásitos/ μL .

(b) Para la detección de *P. vivax* en todos los entornos de transmisión, el PDS debe ser al menos del 75% con una parasitemia de 200 parásitos/ μL .

(c) La tasa de falsos positivos debe ser inferior al 10%.

(d) La tasa de invalidez debe ser inferior al 5%.

- Condiciones de almacenamiento: para las condiciones tropicales húmedas del país, es adecuado adquirir pruebas que sean estables a 35 °C y 45 °C y a una humedad del 75%. Almacenadas en un lugar fresco o refrigerado
- Fecha de vencimiento: Este es un requerimiento que debe ser incluido en las adquisiciones de PDR, lo recomendado es solicitar pruebas con una vida útil de al menos 2 años
- Presentación: Empaque individual que proteja la prueba del efecto del sol y el agua, cierre de seguridad que garantice que el envase no ha sido abierto. Inserto en cada prueba de un instructivo del proceso de utilización, lectura e interpretación de la prueba, legible y de fácil lectura, individual y en idioma español. Inclusión de todos los insumos necesarios para el montaje de la técnica
- Lectura e interpretación del resultado: fácil lectura, claridad para diferenciar entre una especie y otra
- Facilidad de uso en campo: de fácil ejecución y manipulación para su utilización en campo
- Recordar que el uso previsto de las pruebas rápidas es el tamizaje, por tanto, se debe seguir el algoritmo correspondiente
- El usuario de pruebas rápidas debe conocer y direccionar al paciente en la ruta de atención en salud dependiendo del resultado obtenido

Criterios para el uso de las pruebas rápidas

Los usos potenciales de las pruebas rápidas para el diagnóstico de malaria pueden fortalecer la atención del paciente con malaria y serán empleadas en los siguientes casos (11):

- Como herramienta de diagnóstico complementaria en brotes y epidemias.
- En centros de salud o instituciones de salud, por otro personal de salud y agentes comunitarios, previamente capacitados, para ampliar cobertura y oportunidad en el diagnóstico.
- En laboratorios de salud pública (LSP) como complemento del diagnóstico microscópico y ante la duda de una de las especies de *Plasmodium spp.* observadas al microscopio.
- En regiones con población dispersa con problemas de malaria y en donde no se cuente con el diagnóstico microscópico, pero que cuente con las condiciones necesarias para mantener las características ambientales sugeridas por el fabricante de las pruebas rápidas.

Recomendaciones para el uso de las pruebas rápidas

- Debido a que la sensibilidad de las pruebas rápidas decrece con el nivel de parasitemia, existen casos en que la prueba puede dar reacción negativa cuando la parasitemia es muy baja.
- Repetir la prueba siempre que de resultado no válido, como en los siguientes casos:
 - No hay reacción en la línea de control o reacción poco clara.
 - No hubo un buen lavado de la tirilla y la sangre impide la lectura del patrón de bandas.
 - Cuando exista reacción en la banda de control, y en la específica para *P. falciparum* pero no en la del antígeno común, en el caso de las PDR que detecten antígeno pan malárico común a todas las especies.
 - Cuando observe un manchón morado por toda la tirilla o marco de lectura.
 - Repetir la prueba cuando la lectura sea dudosa o indeterminada.
- Trabajar siempre en lugares frescos (en donde corra brisa) ya que las altas temperaturas evitan que el buffer corra adecuadamente, evitando un apropiado corrido de la muestra o evitando un buen lavado. Cuando observe que la muestra se detiene puede agregar una gota adicional de buffer.
- Correlacionar la sintomatología del paciente con el resultado de la prueba.
- Las pruebas rápidas no son recomendadas para el monitoreo del tratamiento debido a la estabilidad del antígeno HRP II en algunos pacientes, el cual genera una prueba positiva en ausencia de formas parasitarias hasta por 15 días post-tratamiento. La HRP II da reacción positiva cuando se encuentran en circulación gametocitos jóvenes y además el antígeno pan malárico en algunas ocasiones se ha

demostrado que da reacción en la presencia de gametocitos de *P. falciparum*, obteniéndose falsas lecturas positivas para *P. vivax*.

- Evitar hacer hendiduras a la nitrocelulosa, esto impedirá observar adecuadamente la reacción en la tirilla.
- Realizar la lectura en los tiempos recomendados por el fabricante
- En caso de una PDR negativa en un paciente con **alta sospecha de malaria**, repetir la PDR a las 24-48 horas, si la PDR presenta un resultado negativo, realizar una gota gruesa, si esta es positiva, remitir muestra de sangre al INS en papel de filtro para pruebas moleculares. <https://www.ins.gov.co/TyS/Documents/Manual-toma-envio-muestras-ins.pdf#search=manual%20toma%20de%20muestra>
- Implementar el control de calidad a las pruebas de diagnóstico rápidas con resultado negativo mediante la toma de muestra de gota gruesa simultánea, para verificar este diagnóstico y evitar el riesgo de falsos negativos, debido a la incapacidad de la prueba para detectar ciertas cepas de *P. falciparum* que no producen el antígeno HRP II o HRP III y que circulan en Colombia (12).

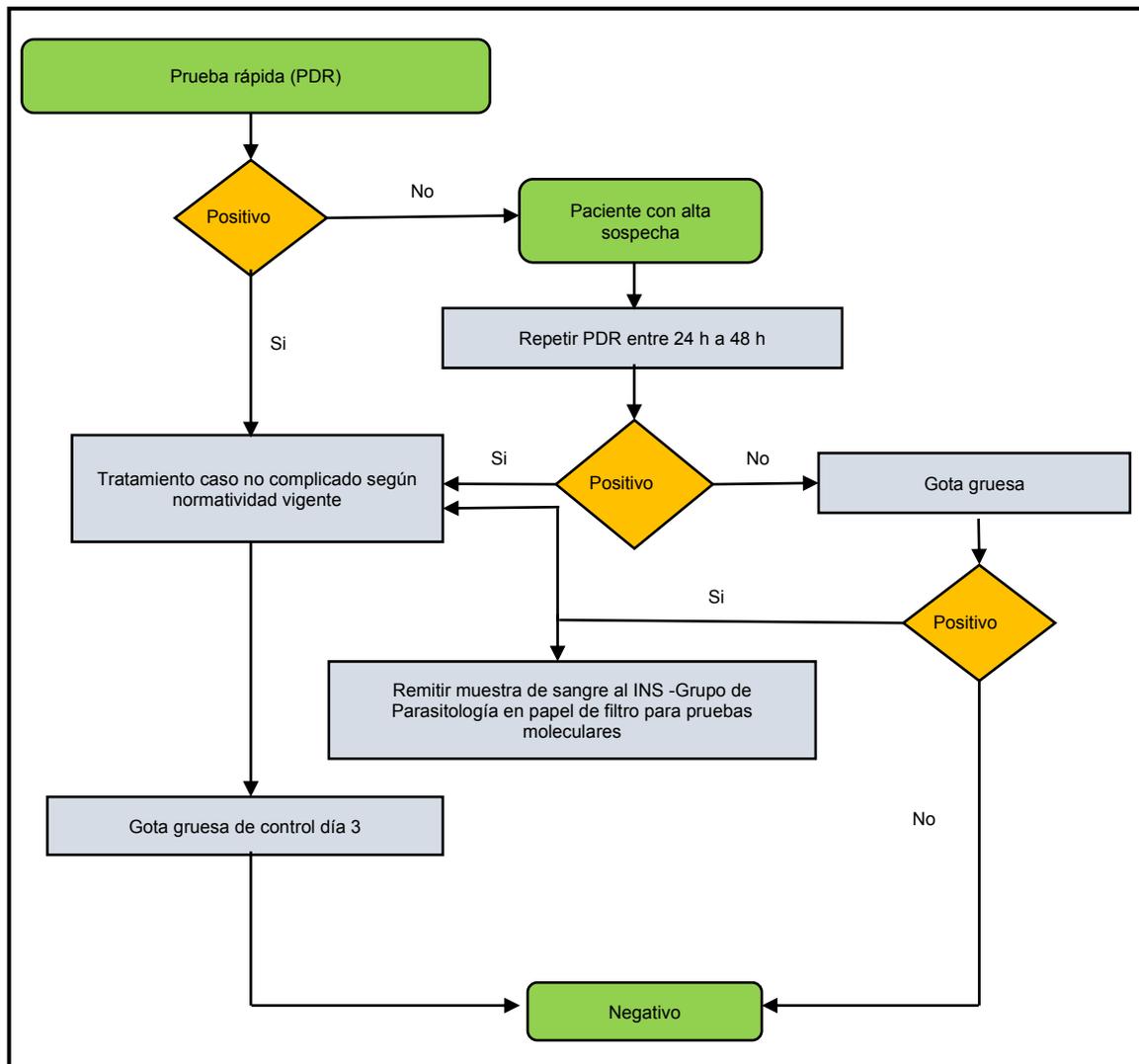


Figura 1. Algoritmo de decisión para la atención del paciente con malaria

RECOMENDACIONES PARA EL DIAGNOSTICO DE MALARIA USANDO METODOS MOLECULARES

Las siguientes recomendaciones acerca del papel de las pruebas diagnósticas moleculares para el diagnóstico de malaria en áreas de baja transmisión se tomaron textualmente del documento emitido en la reunión de expertos convocada por la OMS (7).

- Las infecciones submicroscópicas/asintomáticas por *Plasmodium falciparum* y *P. vivax* son comunes tanto en situaciones de baja transmisión como escenarios de alta transmisión. El uso de métodos diagnósticos basados en la amplificación del ácido nucleico (NAA) por los programas de malaria, debe ser considerado para investigaciones epidemiológicas y encuestas con el objetivo de mapear las infecciones sub-microscópicas en áreas de baja intensidad de transmisión. Pueden también utilizarse estos métodos (NAA) para la identificación de focos para medidas de intervención especiales en situaciones de eliminación.
- La mayoría de las infecciones con parásitos asexuales tienen gametocitos en densidades bajas, los cuales no son detectables por microscopía ni por PDR sino por métodos de amplificación molecular. La mayoría de las infecciones por malaria (microscópicas y sub-microscópicas) deben ser consideradas como potencialmente infecciosas y pueden contribuir a la transmisión continua. No existe la necesidad de la detección rutinaria de gametocitos utilizando métodos NAA en encuestas de malaria o en el entorno clínico.
- Deberán ser desarrollados estándares comunes para las pruebas basadas en la detección de ácidos nucleicos, incluyendo el uso del estándar internacional de la OMS para la amplificación de ADN de *P. falciparum* y el desarrollo de otros estándares para otras especies de *Plasmodium*, particularmente para *P. vivax*.
- Deberá desarrollarse el procedimiento operativo estándar que defina el método para la recolección de las muestras, la extracción del ADN y la cantidad de sangre que debe ser adicionada a la prueba. Las instrucciones generales para la toma de muestra, condiciones de preservación y transporte se establecen en el Manual de procedimientos para la toma, conservación y envío de muestras al Laboratorio Nacional de Referencia. Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia, 2019 (disponible en: https://www.ins.gov.co/Direcciones/RedesSaludPublica/DocumentosdelInteresSRNL/Manual_toma_envio_muestras_INS-2019.pdf y los lineamientos para la extracción del ADN y la prueba molecular se encuentran en la Guía para la vigilancia por laboratorio de parásitos del género *Plasmodium spp.*
- El desarrollo de un sistema de aseguramiento de la calidad externo e internacional es fuertemente recomendado para asegurar que los datos obtenidos a través de las pruebas basadas en la amplificación del ácido nucleico sean confiables y comparables.
- Por lo general, el uso de herramientas diagnósticas más sensibles deberá ser considerado solo en situaciones de baja transmisión donde ya existe y está ampliamente difundido el diagnóstico y tratamiento para malaria, y la tasa de prevalencia es baja (<10%). El uso de métodos diagnósticos basados en la amplificación del ácido nucleico (NAA) no deberá desviar recursos para las acciones de prevención y control de la malaria y el fortalecimiento de los servicios de salud, incluyendo el sistema de vigilancia.
- Se recomienda el uso de técnicas moleculares en casos especiales como:
 - Pacientes sintomáticos con gota gruesa negativa y/o PDR negativa con sospecha de malaria,
 - Para confirmación de malaria mixta o malaria por especies distintas a *P. falciparum* y *P. vivax*,
 - Como apoyo al control de calidad de la microscopía en situaciones discordantes (evaluación indirecta),

- En la elaboración de los paneles de láminas para la evaluación externa directa del desempeño
- En el marco de eliminación de la malaria, en escenarios de baja transmisión para monitorear la circulación de malaria submicroscópica sintomática o asintomática.

BIBLIOGRAFIA

1. Essential Malariology, David A. Warrell, Herbert M. Gilles. Ed. Arnold. Cuarta edición. Londres, 2002
2. Basic malaria microscopy. Part. I. Learner`s Guide. World Health Organization. Geneva.1991
3. Organización Mundial de la Salud. La iniciativa T3: Test. Treat. Track contra el paludismo. Fecha de consulta: 16 de abril de-2015. Disponible en: http://www.who.int/malaria/areas/test_treat_track/es/
4. Ministerio de Salud de Colombia. Resolución 412 de 2000: Guía de atención clínica malaria. Disponible en:
<http://www.acin.org/acin/new/Portals/0/Templates/guia%20de%20atencion%20clinica%20de%20malaria%202010.pdf>
5. World Health Organization. Malaria light microscopy creating a culture of quality. Report of WHO SEARO/WPRO workshop on quality assurance for malaria microscopy. Geneva: WHO; 2005.
6. World Health Organization. Malaria microscopy quality assurance manual. Geneva: WHO; 2009
7. World Health Organization-WHO, 2014. Malaria Diagnosis in Low Transmission Settings. Malaria policy advisory committee meeting. Session 10. Geneva. 12-14 March 2014.
8. Bousema T, Okell L, Felger I, Drakeley C. Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. Nat Rev Microbiol. 2014;12(12):833-40. doi: 10.1038/nrmicro3364.
9. WHO. Malaria microscopy quality assurance manual. Manila: Geneva: World Health Organization; 2009. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204266/1/9789241549394_eng.pdf
10. World Health Organization. Malaria Rapid Diagnostic Test Performance. WHO; 2018. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/276190/9789241514965-eng.pdf?ua=1>
11. World Health Organization. Recommended selection criteria for procurement of malaria rapid diagnostic tests. WHO; 2016.
12. Murillo Solano C, Akinyi Okoth S, Abdallah JF, Pava Z, Dorado E, Incardona S, et al. Deletion of Plasmodium falciparum Histidine-Rich Protein 2 (pfhrp2) and Histidine-Rich Protein 3 (pfhrp3) Genes in Colombian Parasites. PLoS ONE 2015; 10(7): e0131576. doi:10.1371/journal.pone.0131576.