

**AUTOINMUNIDAD ASOCIADA A TROMBOCITOPENIA EN PACIENTES CON
MALARIA POR *Plasmodium vivax***

**AUTOIMMUNITY ASSOCIATED WITH THROMBOCYTOPENIA IN PATIENTS WITH
Plasmodium vivax MALARIA**

Martin Florez Vargas¹ B.Sc.(E), Katherin Sánchez Montiel¹ B.Sc.(E), María Camila Velasco Pareja², M.Sc.

1. Estudiante X Semestre de Bacteriología, Facultad ciencias de la Salud, Universidad de Córdoba. E-mail: mflorezvargas78@correo.unicordoba.edu.co; ksanchezmontiel@correo.unicordoba.edu.co.
2. Bacterióloga, Magíster en Microbiología Tropical. Docente del Programa de Bacteriología, Auxiliar de Investigación en Grupo de Investigaciones Microbiológicas y Biomédicas de Córdoba, Facultad ciencias de la Salud, Universidad de Córdoba. E-mail: mariavelascop@correo.unicordoba.edu.co

Resumen

Objetivo. Evaluar la autoinmunidad contra plaquetas en pacientes con malaria y trombocitopenia concomitante. **Materiales y métodos.** Esta investigación fue analítica, de tipo transversal. Se incluyeron en este trabajo individuos sintomáticos, sin distinción de etnia y/o sexo, con diagnóstico microscópico de mono infección por *P. vivax*. Así mismo, se conformó un grupo de estudio de sujetos sanos. Los datos se recolectaron mediante el diligenciamiento de una ficha clínico-epidemiológica por cada uno de ellos. El diagnóstico fue realizado mediante el ensayo de inmunoabsorción (ELISA). Se utilizó el software GraphPad Prism versión 7.00, mediante el cual se calcularon medidas de resumen y de tendencia centrales tales como promedio, mediana y rangos intercuartílicos. **Resultados.** En los individuos con malaria, hubo un predominio del sexo masculino (56%), respecto al sexo femenino. Por otro lado, se encontró que los pacientes con malaria y trombocitopenia concomitante tenían mayor concentración de anticuerpos contra plaquetas en comparación con las concentraciones obtenidas en pacientes con malaria. Además, se observó que los anticuerpos contra plaquetas tuvieron una correlación negativa con los recuentos plaquetarios. **Conclusiones.** La malaria en Tierralta-Córdoba, se concentra en adolescentes y adultos jóvenes, especialmente en el sexo masculino. En cuanto a los aspectos clínicos, la trombocitopenia es la alteración hematológica más

frecuente en la malaria asociada con *Plasmodium vivax* en el municipio de Tierralta, la cual podría explicarse por la presencia de autoanticuerpos plaquetarios, relacionándose como una de las posibles causas de destrucción plaquetaria.

Palabras claves: Malaria, *Plasmodium vivax*, trombocitopenia. Autoinmunidad.

Abstract

Objective. In this study we evaluated autoimmunity against platelets in patients with malaria and thrombocytopenia. **Materials and methods.** This was an analytical, cross-sectional study. Symptomatic individuals, regardless of ethnicity and/or sex, with microscopic diagnosis of *P. vivax* mono-infection were included in this study. A study group of healthy subjects was also included. Data were collected by filling out a clinical-epidemiological form for each subject. Diagnosis was performed by immunosorbent assay (ELISA). GraphPad Prism software version 7.00 was used to calculate summary and central tendency measures such as mean, median and interquartile ranges. **Results.** In individuals with malaria, there was a predominance of the male sex (56%), with respect to the female sex. On the other hand, it was found that patients with malaria and concomitant thrombocytopenia had higher concentrations of antibodies against platelets compared to the concentrations obtained in patients with malaria. In addition, it was observed that platelet antibodies had a negative correlation with platelet counts. **Conclusions.** Malaria in Tierralta-Córdoba is concentrated in adolescents and young adults, especially in males. Regarding clinical aspects, thrombocytopenia is the most frequent hematological alteration in malaria associated with *Plasmodium vivax* in the municipality of Tierralta, which could be explained by the presence of platelet autoantibodies, being related as one of the possible causes of platelet destruction.

Key words: Malaria, *Plasmodium vivax*, thrombocytopenia. Autoimmunity

Introducción

La malaria es una enfermedad febril causada por protozoos patógenos del género *Plasmodium spp.* y transmitida al humano por la picadura de mosquitos hembras del género *Anopheles spp.*. Existen 5 especies causantes de la infección malárica en el humano: *Plasmodium vivax*, *P. facilparum*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi*(1), siendo las dos primeras las causantes de un mayor número de eventos en el mundo. Según el último Informe mundial, se estima que hubo 14 millones más de casos de malaria en 2020 en comparación con 2019 (241 millones frente a 227 millones, respectivamente). Para este mismo año murieron por malaria 69,000 personas más que en 2019 (627 000 frente a 558000)(2). Múltiples estudios han demostrado que la infección por *P. vivax*, típicamente asociado a malaria benigna, puede causar malaria complicada, convirtiéndola así en una amenaza potencial, por tanto, se ha convertido en una prioridad de Salud Pública en todo el mundo (1,3). En Colombia, según el reporte del Instituto Nacional de Salud para el 2021, se notificaron un total de 72022 casos de malaria (70838 correspondían a malaria no complicada y 1184 a malaria complicada). De los casos totales de malaria complicada reportados en el país, el 70,9% (885) corresponden a complicaciones hematológicas, tales como anemia y trombocitopenia. En cuanto a la situación en el departamento de Córdoba, se reportó la ocurrencia del 11,8% (9,088) del total de casos de malaria del país(4).

Autores han descrito que la trombocitopenia (plaquetas $<150.000/mm^3$) asociada a malaria es la complicación hematológica más frecuente en Córdoba (5). Aunque la trombocitopenia es menos estudiada debido a que por sí sola no produce mortalidad(6)Esta tiene gran importancia porque impacta de forma negativa a quienes la padecen, pues muchos pacientes que consultan por trombocitopenia son hospitalizados generando aumentos en los costos de salud pública en áreas en vía de desarrollo y con altos índices de Necesidades Básicas Insatisfechas (NBI). En Colombia y en el departamento de Córdoba, los estudios relacionados con la trombocitopenia asociada a malaria por *P. vivax* son limitados. No se tienen datos de su frecuencia, ni sobre posibles mecanismos asociados a estos. A pesar de ello, en otras partes del mundo se han estudiado posibles causas asociadas, entre las cuales se encuentran: Las alteraciones de la coagulación, esplenomegalia, alteraciones de la médula ósea, estrés oxidativo, consumo plaquetario(6). De igual forma se ha asociado la autoinmunidad a esta alteración hematológica, es por eso que el objetivo de este trabajo es evaluar la existencia de

anticuerpos contra plaquetas en pacientes con malaria por *Plasmodium vivax* y trombocitopenia concomitantes.

Objetivo general

Evaluar la autoinmunidad contra plaquetas en pacientes con malaria y trombocitopenia.

Objetivo específicos

1. Establecer las condiciones iniciales para el desarrollo de un Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzima contra plaquetas.
2. Describir los aspectos clínicos y sociodemográficos de la población.
3. Determinar la frecuencia de autoanticuerpos en pacientes con malaria y su asociación con la trombocitopenia.

Materiales y métodos

Tipo de estudio y población

Esta investigación fue analítica, de tipo transversal. El muestreo fue no probabilístico por conveniencia y se realizó entre octubre de 2017 y marzo de 2019. Se incluyeron en este trabajo individuos sintomáticos, sin distinción de etnia y/o sexo, con diagnóstico microscópico de mono infección por *P. vivax*. Así mismo, se conformó un grupo de estudio de sujetos sanos, habitantes de la zona endémica, afebriles al momento de la toma de la muestra, sin eventos de malaria en los últimos seis meses. Se realizaron pruebas moleculares para confirmar el diagnóstico de *Plasmodium spp.* (Citar el protocolo de Snounoun).

Criterios de exclusión

1. mujeres en estado de gestación.
2. Pacientes con enfermedades de base u otras enfermedades infecciosas.
3. Menores de 2 años de edad.
4. Pacientes con infección por *P. falciparum* o infecciones mixtas.
5. Pacientes con tratamiento antimalárico en curso.

Zona de estudio

Este estudio se desarrolló en la República de Colombia, específicamente en el municipio de Tierralta (departamento de Córdoba, situado al noroeste de Colombia a orillas del mar Caribe), que se localiza al extremo Sur-Occidental de Córdoba (figura 1). Tierralta posee transmisión estable de *Plasmodium spp.* y habitualmente reporta el mayor número de casos de malaria del departamento.

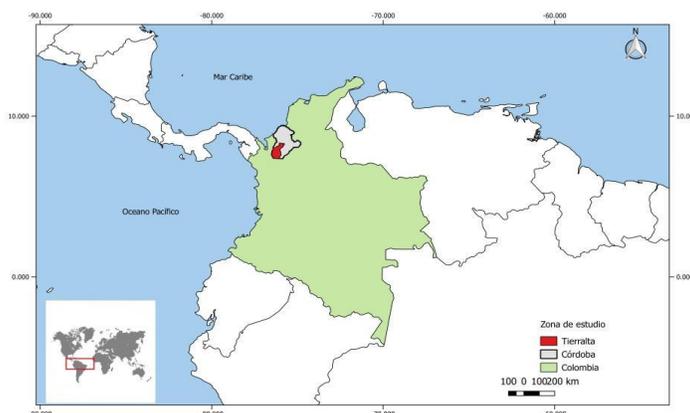


Figura 1. Ubicación geográfica del municipio de Tierralta.

Muestra y procesamiento

Toma y procesamiento de muestra

A cada paciente se le realizó punción venosa mediante sistema al vacío para la obtención de 5 – 10 mL de sangre durante el período febril y previo al inicio de tratamiento antimalárico. Los datos se recolectaron mediante el diligenciamiento de una ficha clínico-epidemiológica por cada uno de ellos. Las muestras fueron enviadas hasta el laboratorio del Grupo de Investigaciones Microbiológicas y Biomédicas de Córdoba, GIMBIC, para su procesamiento.

A partir de la muestra de sangre completa, se realizó un hemograma de V generación en el equipo Cell-dyn Ruby. Posteriormente, se obtuvo plasma a partir de las muestras mediante centrifugación a 180 RCF durante 5 minutos para su posterior almacenamiento a -86°C una vez alicuotado el plasma.

Preparación de plaquetas

Se obtuvo sangre de un voluntario sano mediante sistema al vacío en tubos tapa azul para la obtención de 10 – 15 mL. La muestra fue centrifugada dos veces a 150g/10min obteniéndose plasma rico en plaquetas. Este fue centrifugado a 800g/15min para la sedimentación de plaquetas. El sobrenadante se descartó y las plaquetas se lavaron 3 veces en tampón Tyrode (0,137mol/L de NaCl, 3 mmol/L de KCL, 0,4 mol/L de NaH₂PO₄, 12mmol/L de NaHCO₃, 1mmol/L de MgCl₂, 14,7 mmol/L de HEPES Y 20 mmol/L de glucosa [PH 6,9] suplementado con 0,2% de albúmina de suero bovino (BSA)). Todas las centrifugaciones se realizaron a 37°C en presencia de 1 mmol/ L de prostaglandina E1 (PGE1 (Abcam)) para evitar la activación plaquetaria y finalmente fueron resuspendidas en tampón Tyrode. Obteniéndose un recuento total de: 8x10⁶ / UL plaquetas.

Ensayo de Inmunoabsorción (ELISA)

Para la sensibilización de la placa de ELISA, una vez se purificaron las plaquetas, estas se lisaron mediante choque térmico por ciclos. Se colocaron en un criovial que se llevó a nitrógeno líquido y posteriormente a 37°C. Estos ciclos se repitieron mínimo 5 veces. Seguidamente el lisado de plaquetas se diluyó 100 veces con Buffer Fosfato Salino (PBS) y se sensibilizó la placa con 100 µL de lisado de plaquetas. La placa sensibilizada se cubrió y se dejó incubando durante toda la noche en refrigeración (4°C). Al día siguiente, las placas se lavaron 3 veces con buffer de lavada (PBS 1X, 0,05% Tween-20). Se procedió a realizar el bloqueo con Albúmina Sérica Bovina (BSA), la placa se cubrió con papel adhesivo y se incubó por al menos 1,5 horas (h) a 37°C. Se realizaron 3 lavados nuevamente. Se adicionó el plasma previamente diluido 1:100 y se llevó a incubación durante 2h a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo se eliminó el contenido de cada pozo y se lavó la placa nuevamente 3 veces. Seguidamente las placas se incubaron con un anticuerpo policlonal anti-IgG humano con peroxidasa de rábano diluido (anti-IgG-HRP) (GE Healthcare) durante 1 h a 37°C. Las placas se lavaron 5 veces y se revelaron usando sustrato TetraMetilBenzidina (TMB) (BD Biosciences). La reacción se detuvo usando buffer de parada y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 450 nanómetros (25); para el montaje del ELISA se emplearon placas Costar™ 3750 de 96 pozos.

Análisis estadístico

Se utilizó el software GraphPad Prism versión 7.00, mediante el cual se calcularon medidas de resumen y de tendencia centrales tales como promedio, mediana y rangos

intercuartílicos. Para el manejo de los datos de tipo numérico inicialmente se corroboró la distribución de estos mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov, observándose que, no seguían una distribución normal se realizaron pruebas no paramétricas. Para evaluar la significancia estadística entre grupos se aplicó la prueba de Mann-Whitney; las correlaciones se realizaron mediante la prueba de Spearman. Se consideró significativo un $P < 0.05$ y se utilizaron intervalos de confianza del 95%. Teniendo en cuenta los datos, se conformaron 3 grupos de estudio: i) pacientes con malaria y trombocitopenia concomitante (MT), ii) malaria sin trombocitopenia (M) y iii) controles sanos de área endémica (CS).

Aspectos éticos

El proceso de inclusión y participación de los sujetos se realizó de manera voluntaria y de conformidad con las pautas nacionales colombianas (Resolución N° 008430 del 4 de Octubre de 1993, República de Colombia, Ministerio de Salud) e internacionales (Declaración de Helsinki y sus enmiendas, Asociación Médica Mundial (WMA), Edimburgo, Escocia, Octubre 2000); los participantes firmaron el consentimiento o asentimiento informado de acuerdo con la situación de cada individuo; el proyecto recibió aval ético del Comité de Ética Humana de la Facultad Ciencias de la Salud de la Universidad de Córdoba.

Resultados

Se incluyeron para este estudio un total de 166 pacientes con malaria por *P. vivax* y un total de 120 controles sanos procedentes de área endémica.

Características clínicas y sociodemográficas de los individuos en estudio

En cuanto a los individuos con malaria, se observó un predominio del sexo masculino (56%), respecto al sexo femenino. Así mismo, el 68% de los pacientes tenían entre 11 a 15 años (ver figura 2A). En cuanto a los controles sanos, este se conformó por 59 mujeres y 61 hombres. El 65,6% de los individuos estudiados tenían entre 6 a 15 años (ver figura 2B).

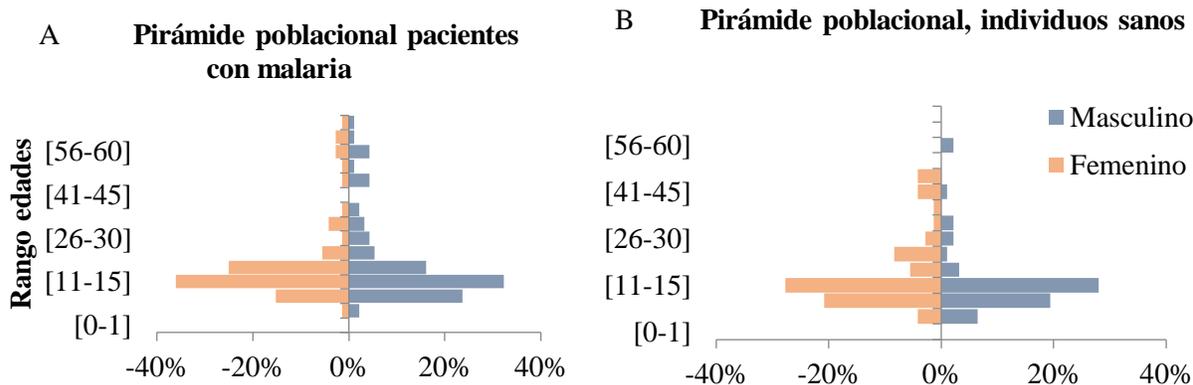


Figura 2. A) Pirámide poblacional de pacientes, Tierralta, Córdoba. B) Pirámide poblacional de controles sanos, Tierralta, Córdoba. Porcentaje de hombres (azul) y mujeres (naranja) de acuerdo a la edad de infectados con *P.vivax* (n=166) y grupo sano (n= 120).

En cuanto a los aspectos clínicos, se observaron bajos niveles de recuentos plaquetarios en más del 75% de la población (<150.000/ μ L). Así mismo los pacientes tenían recuentos normales de glóbulos blancos; solo el 25% de la población tuvo valores de hemoglobina menores a 10gr/dl (Ver tabla 1). El 100% de los individuos de grupo control sano, tenían valores de hemoglobina, plaquetas y recuento de leucocitos dentro los valores normales (Ver tabla 1).

Tabla 1. Parámetros de laboratorio de los pacientes involucrados en el estudio.

Parámetro laboratorio	Pacientes con malaria	Grupo control
	Mediana(*RIC)	(Mediana/RIC)
Hemoglobina	12gr/dL (10gr/dl-13gr/dl)	13gr/dL (12gr/dl-13gr/dl)
Plaquetas	98x10 ³ / μ L (56x10 ³ / μ L -145 x10 ³ / μ L)	287x10 ³ / μ L (248x10 ³ / μ L - 333x10 ³ / μ L)
Recuento leucocitos	6 x10 ³ / μ L (5x10 ³ / μ L - 7x10 ³ / μ L)	8 x10 ³ / μ L (7x10 ³ / μ L - 9x10 ³ / μ L)
Parasitemia	2363p/ μ L (1400p/ μ L 4304p/ μ L)	No aplica

*RIC: Rangos Intercuartílicos 25% y 75%

En cuanto a la trombocitopenia se observó que el 32,5% de los pacientes desarrollaron trombocitopenia moderada. El 22,4% de los pacientes no tenían trombocitopenia (tabla 2).

Tabla 2. Frecuencia de los grados de trombocitopenia en pacientes con malaria, Tierralta, Córdoba, Colombia.

Grados de Trombocitopenia	Valor de recuento de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Frecuencia (n=166)
Leve	$150 \times 10^3/\mu\text{L}$ - $100 \times 10^3/\mu\text{L}$	44(26,5%)
Moderada	$99.9 \times 10^3/\mu\text{L}$ - $50 \times 10^3/\mu\text{L}$	54(32,5%)
Severa	$<50 \times 10^3/\mu\text{L}$	31(18,6%)

Determinar la frecuencia de autoanticuerpos en pacientes con malaria y su asociación con la trombocitopenia

Se observó que la mediana de los valores del grupo con malaria fue significativamente más alta que la de los controles sanos (CS), destacándose que el grupo con malaria y trombocitopenia (MT) era más alto que aquellos sin trombocitopenia (M). Es decir, que los pacientes con MT tenían mayor concentración de anticuerpos contra plaquetas en comparación con las concentraciones obtenidas en pacientes con M Y CS (Ver figura 3).

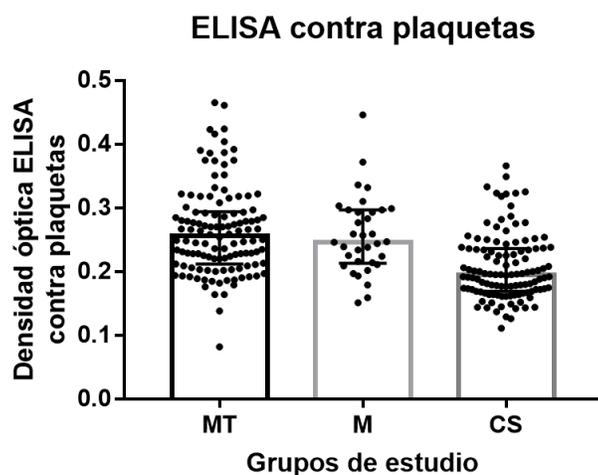


Figura 3. Concentraciones de anticuerpos contra plaquetas en los grupos de estudios: Malaria con trombocitopenia (MT), Malaria sin trombocitopenia (M) y controles sanos (CS).

Se observó que los anticuerpos contra plaquetas tuvieron una correlación negativa con los recuentos plaquetarios, es decir que entre más alta se encontraba la concentración de estos, más bajo era el número de plaquetas en sangre (Ver figura 4).

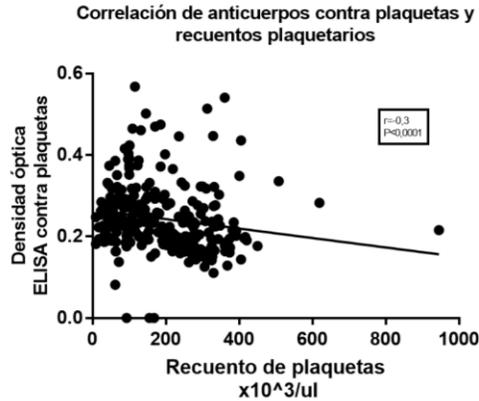


FIGURA 4. Correlación de anticuerpos contra plaquetas y recuentos plaquetarios en pacientes con malaria.

Establecer las condiciones iniciales para el desarrollo de un Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzima contra plaquetas.

Para establecer las condiciones iniciales del ELISA contra plaquetas, se realizaron tres ensayos, con una muestra control donada por la Universidad de New York. En la tabla 3, se observa la media de las densidades ópticas de la muestra control y su desviación estándar entre ensayos de ELISAs.

Se determinó que para lograr un tapizado óptimo de los pocillos de ELISA contra plaquetas, se deben adicionar por pozo 100 μ L de lisado de plaquetas a la concentración de 80.000 $\text{pq}/\mu\text{L}$ diluido con Buffer Fosfato Salino 1X (PBS 1X); ya que a mayores concentraciones plaquetarias (1.380.000 $\text{pq}/\mu\text{L}$) se obtuvieron densidades ópticas bajas que pueden estar relacionados con el efecto postzona. Por otro lado, se estableció que la realización de 5 lavados en el paso final del último ensayo reducía en gran cantidad las interferencias, ya que se obtuvo una densidad óptica del blanco más baja a diferencia de los ensayos anteriores donde no fueron implementados.

Tabla 3. Densidad óptica del blanco y desviación estándar de la densidad óptica del pool entre ELISAs. D.E (Desviación estándar), D.O (Densidad óptica).

ELISA	D.O del blanco	D.O del Pool	D.E del pool entre ELISAS
1	0,263	0,754	
2	0,124	0,176	0,315
3	0,091	0,245	

Discusión

El objetivo de esta investigación fue evaluar la autoinmunidad contra plaquetas en pacientes con malaria por *Plasmodium vivax* en el municipio de Tierralta. Esta enfermedad puede afectar a cualquier tipo de persona que se encuentre en un área endémica. Sin embargo, en este estudio se evidencio un predominio del sexo masculino, tal como diversos estudios lo han reportado y la mayor carga de la enfermedad en población adolescente (11 a 15 años) (7,8). Resultados similares se han encontrado en un estudio realizado por Echeverri, et al. Sobre malaria por *P. vivax* en el municipio de Turbo, donde se reportó un predominio del sexo masculino, pero con una media de ingreso hospitalario de 23 años(9). Algunos grupos de población corren un riesgo considerablemente mayor que otros de contraer la enfermedad y presentar un cuadro clínico grave: los lactantes, los menores de 5 años, las embarazadas y los pacientes con VIH/sida, así como las personas con baja inmunidad que se desplazan a zonas de intensa transmisión palúdica, como puedan ser trabajadores migrantes, viajeros y poblaciones itinerantes(10) .En nuestro estudio, la enfermedad se concentró en los adolescentes, lo que implica un alto riesgo de desarrollar malaria complicada, pues es muy probable que la inmunidad sea baja en jóvenes y niños.

En cuanto a los aspectos hematológicos evaluados en este trabajo, se observó que el 75% de los pacientes tenían recuentos plaquetarios bajos (<150.000pq/ul). Resultados similares fueron reportados en un estudio realizado en Venezuela, donde se evidenció de igual forma que la alteración hematológica más frecuente en pacientes con malaria por *P. vivax* fue la trombocitopenia con un porcentaje de 85,3%(11), un valor similar al de nuestro estudio. Por otra parte, se encontró que el 18,6% de los pacientes presentaron trombocitopenia severa, al revisar otro estudio realizado en el municipio de Apartadó-Colombia, encontraron que el porcentaje de trombocitopenia severa fue de 15,6%(1). En ambos el porcentaje fue bajo, relacionándose en mayor cantidad a casos de malaria no complicada. En otra investigación realizada, de los 17 pacientes afectados con

monoinfección confirmada, 14 presentaron trombocitopenia sugiriendo que esta complicación hematológica puede establecerse como un marcador de gravedad de *P. vivax*(12), además de esto, en un estudio realizado en Pipariya, India, demostró que los pacientes con bajos recuentos plaquetarios y malaria vivax, desarrollaron alteraciones en parámetros de laboratorio, tales como aumento del nitrógeno ureico, bilirrubina y creatinina, reforzando con esto la importancia del monitoreo de los recuentos plaquetarios durante las infecciones maláricas y su posible papel en la fisiopatología de la enfermedad(13).

Las causas de trombocitopenia por *P.vivax* aún son desconocidas, sin embargo, desde finales de la década de los 80's la autoinmunidad se planteó como una posible causa de esta alteración hematológica(14), sin embargo la mayoría de los estudios se enfocan en la anemia, dejando de lado el análisis de las plaquetas. En nuestro estudio, los pacientes con malaria y trombocitopenia concomitantes, tenían mayor concentración de anticuerpos contra plaquetas en comparación con las concentraciones obtenidas en pacientes con M y CS y una vez se evaluó esta correlación, los recuentos plaquetarios tuvieron correlación inversa con estos, es decir que entre más alta se encontraba la concentración de anticuerpos, más bajo era el número de plaquetas. En un estudio realizado, se encontraron resultados similares al nuestro, pues se observó una fuerte relación entre tener Anticuerpos antiplaquetarios (Ac-PI) y presentar trombocitopenia, de igual forma la concentración plaquetaria tuvo una asociación inversamente con la concentración de Ac-PI (15).En estudio realizado por *Galindo, et al 2005* se encontró que el 80% de los pacientes evaluados presentaron trombocitopenia y a través de mecanismos moleculares obtuvieron resultados que permiten inferir que, en el plasma de pacientes contagiados, existen anticuerpos que están reconociendo moléculas de plaquetas sanas, que corresponden a isotipos citofílicos y, que posiblemente, estén involucradas como uno de los mecanismos etiopatogénicos de la plaquetopenia en la malaria por *P. vivax* (16).

En cuanto al ensayo de ELISA, se pudo evidenciar que la concentración óptima para obtener un buen recubrimiento de la placa fue de 100 μ l de lisado de plaquetas a la concentración de 80.000 pq/ μ L diluido con PBS 1X por pozo, ya que a mayores concentraciones plaquetarias (1.380.000 pq/ μ L) se obtuvieron densidades ópticas bajas en los pools utilizados, lo cual pudo haber existido un efecto postzona. Este fenómeno se produce ocasionalmente en los métodos inmunométricos cuando la concentración del antígeno que se va a determinar es inusualmente elevada y uno o ambos anticuerpos

quedan saturados antes de que se dé la reacción dando lugar a resultados falsamente bajos(17),en este caso por un exceso de lisado plaquetario.

A diferencia de nuestro trabajo, una investigación donde se determinaron las condiciones de ensayo óptimas en un ELISA para la detección de anticuerpos contra plaquetas, se estandarizó un recuento plaquetario mínimo por pozo de 3×10^8 . Adicionalmente, realizaron la comparación con citometría de flujo, evidenciando el ELISA como el ensayo más sensible(18).

Por otro lado, en nuestro ensayo se realizaron varios lavados con una repetición mínima de 3 veces, a excepción del último lavado en el cual después de agregar anti-IgG humana-HRP y pasado el tiempo de incubación, se aplicó una repetición de 5 lavados, observándose una disminución considerable de la Densidad Óptica (D.O.) del blanco del último ensayo en comparación con lo realizado anteriormente, donde no fueron aplicados en esa cantidad. El blanco, consistió en la mezcla de reactivos sin muestra y sirve para evaluar la señal de fondo y validar el ensayo (19). En la literatura algunos ensayos en sus procedimientos aplicaron lavados con un número mayor, como en el caso de la identificación de *Strongyloides spp* mediante técnica de ELISA, en la cual se usaron no menos de 5 lavados por lavado, obteniendo buenos resultados(20).

Finalmente, es importante resaltar que dentro de las limitaciones se encuentra la no existencia de criterios de complicación para *P. vivax* establecidos por la Organización Mundial de la Salud y deben aplicarse los criterios por establecidos para *P. faciparum*. Así mismo, existe poca información actualizada de ensayos similares al presente trabajo. Se recomienda ampliar este trabajo a otras metodologías, como citometría de flujo para realizar comparaciones metodológicas, así como un control cuantificado para llevar a punto el ELISA.

Conclusiones

A nivel sociodemográfico, La malaria en Tierralta-Córdoba, se concentra en adolescentes y adultos jóvenes, especialmente en el sexo masculino. En cuanto a los aspectos clínicos, la trombocitopenia es la alteración hematológica más frecuente en la malaria asociada con *Plasmodium vivax* en el municipio de Tierralta, la cual podría explicarse por la presencia de autoanticuerpos plaquetarios, relacionándose como una de las posibles causas de destrucción plaquetaria. Finalmente, concluimos que las condiciones iniciales óptimas para la realización de un ELISA contra plaquetas son: Recubrimiento con 100 ul

de lisado de plaquetas a la concentración de 80.000 pq/ μ L y la realización de más de 5 lavados en el último paso del procedimiento del ensayo, para una considerable eliminación de interferentes y la utilización de un equipo de ELISA altamente sensible para la obtención de resultados aceptables.

Bibliografía

1. Arboleda M, Pérez MF, Fernández D, Usuga LY, Meza M. Clinical and laboratory profile of Plasmodium vivax malaria patients hospitalized in Apartadó,. Biomédica [Internet]. 2012 Apr 1 [cited 2022 Jan 29];32(SUPPL.1):58–67. Available from: <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/599>
2. World malaria report 2021 [Internet]. [cited 2022 Jan 29]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240040496>
3. Pérez HA. La malaria por Plasmodium Vivax (Grassi y Feletti, 1890) en los trópicos y los retos de la cura radical. Interciencia [Internet]. 2004 [cited 2022 Jan 29];29(9):490–5. Available from: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442004000900004&lng=es&nrm=iso&tlng=es
4. Semanal BE. Semana epidemiológica 52 26 de diciembre a 1 de enero de 2021. 2022;
5. Asociación Colombiana de Medicina Interna. J, Lucía Sánchez Y, Yasnot MF. Acta médica colombiana : AMC : órgano de la Asociación Colombiana de Medicina Interna. [Internet]. Vol. 40, Acta Medica Colombiana. Asociación Colombiana de Medicina Interna; 2015 [cited 2022 Jan 29]. 294–304. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-24482015000400006&lng=en&nrm=iso&tlng=es
6. Lacerda MVG, Mourão MPG, Coelho HC, Santos JB. Thrombocytopenia in malaria: who cares? Memórias do Instituto Oswaldo Cruz [Internet]. 2011 Aug [cited 2022 Jan 29];106 Suppl 1(SUPPL. 1):52–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21881757/>
7. CARMONA-FONSECA J. La malaria en Colombia, Antioquia y las zonas de Urabá y Bajo Cauca: panorama para interpretar la falla terapéutica antimalárica. Parte 1. Iatreia [Internet]. 2003 [cited 2022 Jan 29];16(4):299–318. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-07932003000400005&lng=en&nrm=iso&tlng=es
8. Knudson-Ospina A, Sánchez-Pedraza R, Pérez-Mazorra MA, Cortés-Cortés LJ, Guerra-Vega ÁP, Nicholls-Orejuela RS. Perfil clínico y parasitológico de la malaria por Plasmodium falciparum y Plasmodium vivax no complicada en Córdoba, Colombia. Revista de la Facultad de Medicina [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2022 Jan 29];63(4):595–607. Available from: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/revfacmed/article/view/47953>

9. Echeverri M, Tobón A, Álvarez G, Carmona J, Blair S. Clinical and laboratory findings of Plasmodium vivax malaria in Colombia, 2001. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* [Internet]. 2003 [cited 2022 Jan 29];45(1):29–34. Available from: <http://www.scielo.br/j/rimts/a/vdfLvkcrf77DT8TPKD7dfDn/>
10. Paludismo [Internet]. [cited 2022 Jan 29]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/malaria>
11. Clínico C, Tovar C, Tovar R, Sandoval M, Yary S. COMPORTAMIENTO CLÍNICO Y DE LABORATORIO DE MALARIA POR PLASMODIUM FALCIPARUM TRABAJO ORIGINAL RESUMEN. *Bol Venez Infectol.* 2003;29:34.
12. Alexandre MA, Ferreira CO, Siqueira AM, Magalhães BL, Mourão MPG, Lacerda M v., et al. Severe Plasmodium vivax Malaria, Brazilian Amazon. *Emerging Infectious Diseases* [Internet]. 2010 Oct [cited 2022 Feb 1];16(10):1611. Available from: </pmc/articles/PMC3294402/>
13. Muley A, Lakhani J, Bhirud S, Patel A. Thrombocytopenia in plasmodium vivax malaria: How significant? *Journal of Tropical Medicine.* 2014;2014.
14. Sørensen PG, Mickley H, Schmidt KG. Malaria-Induced Immune Thrombocytopenia. *Vox Sanguinis* [Internet]. 1984 Jul 1 [cited 2022 Feb 3];47(1):68–72. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1423-0410.1984.tb01563.x>
15. Ríos-Orrego A, Álvarez-Castillo T, Carmona-Fonseca J, Blair-Trujillo S. Evolución temporal de las plaquetas y los anticuerpos antiplaquetarios en pacientes de área endémica con malaria no complicada. *Anales de Medicina Interna* [Internet]. 2005 [cited 2022 Jan 29];22(12):561–8. Available from: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-71992005001200002&lng=es&nrm=iso&tlng=es
16. Galindo, Torres ;, Jaime R, Noya G, Oscar, Martínez ;, et al. Anticuerpos antiplaquetarios y trombocitopenia por plasmodium vivax. [cited 2022 Feb 1]; Available from: <http://caibco.ucv.ve>
17. Alfayate R, Mauri M. Algunos aspectos que el endocrinólogo debe conocer sobre los métodos de determinaciones hormonales. *Endocrinología y Nutrición* [Internet]. 2008 Feb 1 [cited 2022 Jan 29];55(2):84–8. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-endocrinologia-nutricion-12-articulo-algunos-aspectos-que-el-endocrinologo-S1575092208706417>
18. Hamidpour M, Khalili G, Tajic N, Bi B, Shamsian S, Hamidpour R. Comparative of three methods (ELIZA, MAIPA and flow cytometry) to determine anti-platelet antibody in children with ITP. *American Journal of Blood Research* [Internet]. 2014 [cited 2022 Feb 3];4(2):86. Available from: </pmc/articles/PMC4348796/>
19. Gómez Ruíz H. ANÁLISIS DE AGUA-CRITERIOS GENERALES PARA EL CONTROL DE LA CALIDAD DE RESULTADOS ANALÍTICOS WATER ANALYSIS-GENERAL CRITERIA FOR THE QUALITY CONTROL OF ANALITICAL RESULTS O INTRODUCCIÓN.

20. Huapaya P, Espinoza Y, Huiza A, Sevilla C. Estandarización de la técnica de ELISA para diagnóstico de estrongiloidiosis. 2002;63.