

TÈCNIQUES IMMUNOLÒGIQUES PER AL DIAGNÒSTIC DE LA MALÀRIA



Autors: Mikel del Valle, Marina Lloses, Júlia Orri, Gemma Torrodà

Mentors: Tresa Grimalt, David Rebulà, Marta Sánchez

Curs: 2n LAB B

Grau: Laboratori Clínic i Biomèdic

Institut: Jesuïtes el Clot

ÍNDEX

Abstract.....	3
Keywords.....	3
Introducció.....	3
Hipòtesis.....	4
Marc Teòric.....	4
Què és la Malària?.....	4
Síntomes.....	5
Tractament.....	6
Prevenció.....	6
Diagnòstic.....	6
Tècniques immunològiques.....	7
-Tècniques d'aglutinació.....	7
-Proves ràpides d'immunocromatografia.....	7
-Western Blot.....	8
Discussió.....	8
Conclusions.....	11
Bibliografia.....	12
Annex.....	13

ABSTRACT

Infectious diseases are caused by pathogenic microorganisms that enter into the body and multiply until they produce the disease. This study is focus on malaria, a disease caused by a parasite called *Plasmodium falciparum*. It is transmitted to humans through bites of infected anopheles mosquito and may cause death. It also studies the techniques used for the diagnosis of this disease, using agglutination techniques to rule out that the blood group does not interfere, immunochromatographic techniques to detect the presence of antigens and Western Blot which detects a specific protein in the blood or a tissue. Finally, it also reviews the evolution over the years of malaria and the techniques used to diagnose it.

KEYWORDS

Malària, *Plasmodium falciparum*, tècniques immunològiques, aglutinació, eritròcits, Western Blot.

INTRODUCCIÓ

Avui en dia la gent està bastant conscienciada de què són les malalties infeccioses i com s'han de tractar, però a l'hora de la veritat poca gent fa les prevencions correctes que s'haurien de dur a terme per no contagiar-se de cap infecció.

Les malalties infeccioses són la causa d'1 de cada 3 morts al món i són un problema important de salut pública. Estan causades per microorganismes patògens com són els bacteris, els virus, els fongs i els protozoous, que entren al cos i es multipliquen fins que produeixen la malaltia.⁶

Cada microorganisme s'instal·la i prolifera en un lloc diferent del cos humà, depenent de la seva via d'entrada i característiques. Les persones que porten pròtesis ortopèdiques o vàlvules cardíques o neurològiques tenen un risc afegit de tenir infeccions oportunistes en aquests dispositius permanents. La majoria es transmeten d'uns individus als altres i poden afectar qualsevol persona.

Aquesta review està centrada en la malària, malaltia causada per un paràsit. És una malaltia que la gent no està molt informada però creiem que és una de les més importants.

Com esmenta l'article², durant molts anys l'únic mètode utilitzat de diagnòstic de la malària ha sigut la gota grossa: s'estudia una pel·lícula grossa de sang per a determinar la presència del paràsit, i aquesta es recull quan la temperatura del pacient està creixent. Aquesta tècnica presenta una sensibilitat del 80% en els pacients simptomàtics i molt menor en el asimptomàtics (presenten entre un a dos paràsits/ml de sang, per tant no es detecta fàcilment amb aquest mètode).

Actualment, existeixen altres proves com les immuno cromatogràfiques, que permeten el diagnòstic directe igual que la gota grossa. També les proves de PCR d'ADN o ARN, en les quals la sensibilitat i especificitat són millors que l'examen microscòpic, les proves serològiques com les immunofluorescència...

Les proves més ràpides per el diagnòstic de la malària són proves que detecten l'antigen parasitari del gènere *Plasmodium* mitjançant antigen-anticòs. Bàsicament, aquestes proves son tires de nitrocel·lulosa amb anticossos monoclonals capaces d'identificar antígens falciparum que parasiten a l'home. En aquest cas ens centrarem en les tècniques d'aglutinació, les tècniques immuno cromatogràfiques i Western Blot.

El nostre objectiu principal és que es conegui més aquesta malaltia, ja que al no ser una malaltia típica de continents amb clima atemperat, la societat que es troba en aquests no coneix la severitat del què provoca aquesta malaltia. Per això creiem que com més informats estiguin i més present estigui avui en dia, estarem tots molt més ben preparats.

HIPÒTESIS

Les hipòtesis que nosaltres ens vam plantejar van ser:

- La malària continua sent una de les malalties infeccioses principals.
- La tècnica Western Blot és un mètode eficaç per detectar la malària.
- El grup sanguini ABO té relació directa amb la infecció de la malària

MARC TEÒRIC

Per combatre les malalties infeccioses, el cos humà disposa del sistema immunitari. Quan un microorganisme intenta penetrar i infectar el nostre organisme, es posen en marxa tota una sèrie de mecanismes perquè no ho aconseguixi. Alguns d'aquests mecanismes són, per exemple, la febre, el moc o la inflamació. D'altres, l'activació de cèl·lules de defensa que s'organitzen de manera implacable per aconseguir eliminar l'invasor. ¹⁰

La malària és una malaltia molt mortal a nivell mundial que afecta normalment a països tropicals i subtropicals..¹¹ Sabem que la malària és provocada per un paràsit anomenat *Plasmodium* que es caracteritza majoritàriament per la presència de febre alta i anèmia, ja que estan relacionats amb els glòbuls vermells. El *Plasmodium falciparum* és l'agent causant de la malària terçana i el *Plasmodium vivax* és el paràsit que tenen els humans que causa la febre terçana. Aquests són transmesos als humans per mitjà de picades de mosquits anòfels infectats. L'únic cas de contagi entre humans és el d'una dona

embarassada que transmet la infecció via transplacentària al fetus. Després de la infecció, els paràsits, anomenats esporozoïtos, circulen a través de torrent sanguini del nostre organisme fins arribar al fetge. Allà maduren i es transformen, aquests s'anomenen merozoïtos que s'uneixen i circulen en el torrent sanguini i d'aquesta manera infecten els glòbuls vermells.

Quan un mosquit femella del gènere *Anopheles* pica una persona o animal infectats, absorbeix, juntament amb la sang, els gametòcits (precursors de les gàmetes masculines i femenines del paràsit). A l'intestí del mosquit, els gametòcits maduren i es transformen en gàmetes que es fusionen donant lloc a l'ooquinet (zigot mòvil), que evolucionarà a esporozoïts, forma infecciosa del paràsit. Els esporozoïts migren cap a les glàndules salivals del mosquit. És per això, que quan el mosquit pica una persona sana, injecta la seva saliva ja que aquesta és anticoagulant i l'ajuda a absorbir la sang de la víctima. Juntament amb la saliva del mosquit, els esporozoïts entren en el torrent sanguini de la persona. Els esporozoïts migren al fetge de l'humà infectat i penetren a les cèl·lules del fetge (hepatòcit) i es reproduïxen asexualment, produint una altra forma del paràsit: els merozoïts (6-15 dies). Els merozoïts tornen al torrent sanguini on penetren als glòbuls vermells, que donen lloc a unes formes inicials típicament anulars, els trofozoïts. Aquests s'alimenten de l'eritròcit i van augmentant la seva mida per divisió del nucli i els orgànuls. L'organisme resultant, conegut en aquest estadi com meront o esquizont, pateix una citocinesi que donen lloc a múltiples merozoïts idèntics, que s'alliberen mitjançant la destrucció del glòbul vermell infectat. Els merozoïts alliberats infecten nous glòbuls vermells (2-3 dies). Alguns merozoïts produeixen gametòcits masculins i femenins. Els paràsits es multipliquen dins dels glòbuls vermells. Aquests eritròcits es trenquen durant les 48-72 hores posteriors a la infecció i infecten a una quantitat major de glòbuls vermells. Si un nou mosquit pica a aquesta persona, els absorbirà amb la sang i el cicle tornarà a començar.

Es tracta d'una transmissió sanguínia.

Síntomes:

Els primers símptomes es presenten entre els 10 primers dies i es poden prolongar fins a 4 setmanes després de la infecció, encara que poden aparèixer fins i tot als 8 dies o fins a un any després d'aquesta. Clínicament la malària es caracteritza o manifesta per febres, esplenomegalia (dolors musculars i de les articulacions), vòmits, diarrees i la presència del paràsit a la sang, on invaeix i destrueix els eritròcits. També les convulsions, el mal de cap i fins i tot la possibilitat de quedar-se en coma.

Una vegada s'ha estat infectat pel *Plasmodium* aquest es pot quedar dins el cos, i encara que si es tracta, la malaltia es redueix a períodes aïllats de febre, pot reaparèixer de forma recurrent durant tota la vida de l'individu; és per això també, que quan es torna d'un viatge en el qual s'ha pogut entrar en contacte amb el mosquit, encara que la malaltia no s'hagi desenvolupat, qualsevol febre esporàdica s'ha de considerar com un brot de malària, i s'ha de recórrer urgentment a un centre mèdic.

Tractament:

La malària si que té cura, però és fonamental actuar a temps. Si es sospita del contagi, segueix les indicacions dels professionals de la salut i iniciar el tractament quan abans millor. El tipus de medicament dependrà dels factors del mosquit, l'edat i altres condicions específiques del pacient (si està embarassada...).

Els tractaments es poden subministrar per via oral, intravenosa i no s'han de deixar fins que no s'han completat segons la prescripció mèdica. Aquests són medicaments antimalàrics, que els més freqüents són les teràpies de combinació basades en la artemisinina (ACT) i els de fosfat de cloroquina. És el tractament de preferència per combatre qualsevol paràsit sensible al medicament. Per desgracia, a moltes parts del món, els paràsits que provoquen la malaltia són resistents a la cloroquina, pel que fa que ja no sigui efectiu.

Prevenció:

La prevenció principal és actuar ràpid consultant al metge un cop comencen els símptomes. També s'han d'utilitzar insecticides, mosquiteres i anar ben tapat per evitar que el paràsit et piqui i et transmeti la seva saliva.

En algunes regions del món, els mosquits que transmeten aquesta malaltia han desenvolupat resistència contra les insecticides. A més, els paràsits també han desenvolupat resistència a alguns antibiòtics. Aquestes condicions dificulten el control tant de la taxa d'infecció com de la disseminació de la malaltia.

Diagnòstic:

La malària diagnosticada a temps i ben tractada es pot curar en un temps breu (entre una i dues setmanes). El problema és per les persones de països on aquesta malaltia abunda, no existeix una remissió completa ja que es veuen exposats contínuament a les picades de mosquit. A més a més, si la malaltia no es tracta, pot arribar a ser mortal, sobretot per dones embarassades, nens petits o persones vulnerables.

Per a detectar la presència del Plasmodium en sang s'utilitzen proves que detecten la presència de la HRP-II (proteïna de 64 aminoàcids, rica en lisina i histidina) o l'enzim deshidrogenasa del lactat, específiques pel paràsit present en infeccions pel Plasmodium falciparum.

Hi ha kits urgents per a detectar de forma basta la presència del paràsit, però en cas de suposar una infecció pel Plasmodium és imprescindible dirigir-se a un metge. En el laboratori es realitzen dos tipus d'anàlisis: l'examen de gota grossa i el frotis: examen més acurat per a determinar l'espècie del paràsit i que es realitza amb el microscopi.

Segons els articles¹²³ hem pogut veure tres tipus de tècniques diferents per detectar la malària; l'aglutinació, Western Blot i tècniques immuno cromatogràfiques.

Tècniques immunològiques:

Les **tècniques d'aglutinació**, citada a l'article¹, es basen en la capacitat que tenen els antigens multivalents (tenen varis epítops) per unir-se als seus anticossos complementaris donen lloc a immunocomplexes visibles a simple vista. L'antigen és particulat i la unió directa amb l'anticòs fa que aglutini. En aquestes tècniques es fan visibles els complexos Ag-Ac per l'aglutinació que produeixen els anticossos quan el Ag forma part o s'ha unit artificialment a la superfície de glòbuls vermells, plaquetes, leucòcits, partícules de làtex, etc. Normalment s'utilitzen glòbuls vermells (hemoaglutinació) o partícules de làtex.

Les reaccions d'aglutinació s'utilitzen per identificar bacteris, l'identificació d'anticossos contra antigens solubles que de manera artificial s'adhereixen sobre eritròcits, les partícules de làtex o de gelatina.

La presència d'antígens en la superfície dels glòbuls vermells es pot detectar per l'hemoaglutinació produïda quan s'afegeix un antiserum amb anticossos enfront a aquests antigens. Aquesta tècnica s'utilitza habitualment per a la identificació dels grups sanguinis i Rh, per a això a la sang heparinitzada se li afegeixen els antisèrums corresponents: anti-A, anti-B o anti-AB (tots ells anti-Rh negatius). Hi haurà aglutinació quan els glòbuls vermells tinguin l'especificitat de l'antisèrum afegit. De la mateixa manera es procedeix amb antisèrums anti-Rh per a la determinació dels diferents grups Rh. (annex 1)

La **immunocromatografia**² és una tècnica ràpida i senzilla de detecció qualitativa de diversos antigens, s'utilitza molt en la detecció de malalties infeccioses, tot i que també té altres usos com el test d'embaràs. La detecció es fa per la unió d'un marcador a un anticòs, i aquesta pot ser de forma enzimàtica, utilitzant un substrat que dona un producte amb color o amb partícules d'or col·loïdal que quan s'acumulen s'observen a simple vista.

Aquestes proves es basen en la migració d'una mostra a través d'una membrana de nitrocel·lulosa. La mostra és afegida a la zona de conjugat, la qual està formada per un anticòs específic contra un dels epítops de l'antigen a detectar i un reactiu de detecció. Si la mostra conté l'antigen problema, aquest s'unirà al conjugat formant un complex immune i migrarà a través de la membrana de nitrocel·lulosa. Si no, migraran el conjugat i la mostra sense unir-se. La zona de captura està formada per un segon anticòs específic contra un altre epítop de l'antigen. A l'arribar la mostra a aquesta zona, els complexos formats per la unió de l'antigen i conjugat quedaran retinguts i la línia es veurà rosa o blau (mostres positives). En el cas contrari les mostres són negatives. La zona control està formada per un tercer anticòs que reconeix el reactiu de detecció. Quan la resta de mostra arriba aquesta zona, l'anticòs s'unirà al conjugat lliure que no ha quedat retingut a la zona de captura. Aquesta línia és un control que l'assaig ha funcionat bé, perquè agafa color sempre, amb mostres positives i negatives. (annex 2)

Una de les altres tècniques immunològiques trobada a l'article³, és la **Western Blot**. S'utilitza principalment per el diagnòstic de malalties. Aquesta tècnica, és essencial en el món de la biologia, consisteix en detectar una proteïna específica en una mostra de sang o de teixit.

En aquest mètode implica l'ús de l'electroforèsi per poder separar les proteïnes de les mostres segons diferents aspecte com per exemple: pes molecular, estructura de la proteïna, hidrofobicitat, etc..

Posteriorment, aquestes proteïnes es transfereixen del gel on s'ha produït la separació de la proteïna a una membrana absorbent, habitualment feta de cel·lulosa o bé de PVDF, llavors aquesta s'exposa a un anticòs específic contra aquesta proteïna que estem aplicant l'estudi.

Finalment, es detecta la unió antigen-anticòs per activitat enzimàtica o fluorescència, entre d'altres mètodes. D'aquesta mateixa manera podem estudiar la presència de la proteïna en l'extracte i analitzar la seva quantitat relativa respecte a les altres proteïnes.

DISCUSSIÓ

En aquest estudi ens vam plantejar diferents hipòtesis que ens van semblar transcendents pel que fa a la malària en l'actualitat i la seva evolució. En els articles que hem recercat trobem una relació i aquesta és principalment els eritròcits, anticossos i antigens.

Un dels articles¹ trobats, parla sobre estudis realitzats a pacients d'entre 18 i 65 anys, infectats amb totes les espècies de malària. Es van preparar frotis de sang primis i gruixuts tenyits de Giemsa i es van examinar al microscopi per observar la presència de paràsits de la malària.

El que es va fer grup sanguini ABO es va determinar a totes les mostres de sang infectada per la malària mitjançant un test d'aglutinació a partir d'antisèrgols monoclonals aglutinats A, B i AB obtinguts de Tailàndia.

La freqüència més alta del grup sanguini ABO en les mostres va ser O, seguida de B, A i AB (Annex 1). No s'ha trobat cap associació significativa entre el grup sanguini ABO i la susceptibilitat de la infecció per la malària. La distribució de tots els tipus d'infeccions contra la malària no va ser significativament diferent en tots els grups sanguinis, encara que la proporció de mostres amb grup sanguini O amb infecció per *P. vivax* va ser aproximadament 3 vegades superior a la que tenia la infecció per *P. falciparum*. L'associació entre el grup sanguini ABO i la gravetat de la infecció per la malària es va determinar encara més en funció de la parasitemia i l'estat anèmic (nivells d'hemoglobina i hematocrit). A partir d'aquests criteris, la proporció de pacients amb alt risc de desenvolupar malària greu era significativament més elevada en el grup sanguini A en comparació amb altres grups sanguinis. La gravetat de la malaltia de la malària de totes les mostres de sang es va classificar segons els dos criteris de laboratori, és a dir, l'anèmia (nivells d'hemoglobina i hematocrit) i la hiperparasitemia

(recompte de parasitemies sanguínies). El risc dels pacients de desenvolupar malària greu basat en l'anàlisi dels glòbuls vermells infectats es va definir com a “risc elevat” si la parasitemia sanguínia era $>100.000 / \mu\text{l}$ i / o hemoglobina <8.0 i / o hematocrit $<20\%$.

²Antigament la malària es diagnosticava amb el mètode de la gota grossa que ens dona una sensibilitat del 80%. Actualment també la podem diagnosticar per immunocromatografia, que ens permet també el diagnòstic directe, la PCR de l'ADN o l'ARN, on la especificitat i sensibilitat són molt altes o amb proves serològiques, com la immunofluorescència, que ens serveix sobretot per excloure donants.

Les proves ràpides per el diagnòstic de la malària són proves que detecten l'antigen parasitari del gènere *Plasmodium* mitjançant reaccions antigen-anticòs. Bàsicament, aquestes proves són tires de nitrocel·lulosa amb anticossos monoclonals capaços d'identificar els antígens *P. falciparum* i no *P. falciparum* del gènere *Plasmodium* que parasiten a l'home.

Comercialment, hi ha dos tipus de proves: les que detecten la proteïna II, rica en histidina (pfHRPII), i les que detecten la PLDH, que és l'enzim lactat deshidrogenasa del paràsit.

En aquest estudi es va utilitzar les tires de nitrocel·lulosa que contenen un pool d'anticossos monoclonals que es dirigeixen específicament cap a la pfLDH; després, aquesta reacció antigen anticòs és fixada per la presència d'anticossos policlonals continguts en la solució de conjugat en suports de liposomes, lligats a un colorant que permet la visualització dels resultats en una mitjana de vint minuts 20.

L'estudi es va dur a terme a les unitats de banc de sang de vuit hospitals de diferents regions de Perú, dividides segons el seu risc de transmissió de malària. Es va calcular segons la incidència de malària a cada zona, segons la variabilitat estacional de la seva transmissió, així com l'afluència de donants en cada un dels bancs de sang. Es va situar com a zona d'alt risc de transmissió de malària als hospitals dels departaments de Piura i Loreto, zona de risc intermedi al departament de San Martín i de baix risc de transmissió al departament de Lima.

A cada donant de sang se li va extreure 60 ml de sang amb la qual es va fer una làmina de gota grossa i una prova ràpida cromatogràfica com a prova d'estudi per cada donant.

El l'estudi de la prova ràpida es va col·locar dues gotes d'el buffer en un primer pouet de color lila que conté els anticossos en fase sòlida, després es va afegir 4 gotes de la memòria intermèdia de rentat en el segon pouet, es va realitzar també una punció digital amb ajuda d'una llanceta i amb el capil·lar es van agafar 10 ml de sang i es van dipositar en el primer vaset. Posteriorment, es va homogeneïtzar la mostra amb el capil·lar i es va inserir la tira. Després d'esperar 10 minuts, es va transferir la tira del primer pouet a el segon i es va esperar uns altres 10 minuts, després es va procedir a llegir els resultats d'acord amb la interpretació de la prova. Amb les dades obtingudes es va calcular la sensibilitat, especificitat, valor predictiu positiu i negatiu.

L'últim article³ tracta sobre la possible utilització de la tècnica Western blot per diagnosticar la malària vivax en cada fase de la malaltia amb mostres de pacients que estaven infectats de malària (confirmat prèviament mitjançant una extensió sanguínia) mitjançant antígens específics recombinats.

Segons l'article per realitzar el Western Blot es va extreure l'ADN genòmic de les cèl·lules sanguínies del plasma d'un pacient amb malària i es va utilitzar com a plantilla per amplificar les regions codificants de les proteïnes amb propietats antigèniques (produïdes per la malària) com: la proteïna circumsporozoïta (CSP-1), la proteïna de superfície merozoïta (MSP-1), l'antigen merozoït apical (AMA-1), l'antigen repetit de serina (SERA) i l'antigen exportat (EXP-1) de *Plasmodium vivax*. El plasma es va recollir després de la centrifugació de la sang a 12.000 rpm. Un cop extret el material genètic es va realitzar una PCR per amplificar les regions codificants.

Cada fragment d'ADN amplificat de CSP-1, MSP-1, AMA-1, SERA i EXP-1 (resultat de la PCR) va ser inserit en un plasmidi per clonar-se en el vector. La finalitat era induir l'expressió de cada proteïna com a proteïnes de fusió GST a *E. coli*.

Les proteïnes obtingudes es van separar en un SDS-PAGE del 10% per així poder realitzar el Western Blot. Quan es van aplicar aquestes tècniques amb mostres de diferents pacients, es van obtenir els resultats positius següents: 147 (91,9%) de 160 de malària vivax, 12 (92,3%) de 13 de malària de falciparum i tots els 9 de malària mixta de vivax / falciparum van reaccionar amb almenys un antigen, mentre que no hi va haver cap reacció amb 20 mostres normals (persones no infectades). En el cas de la malària vivax, CSP-1 va reaccionar amb 128 (80,0%), MSP-1 amb 102 (63,8%), AMA-1 amb 128 (80,0%), SERA amb 115 (71,9%) i EXP- 1 amb 89 (55,6%). Hem obtingut taxes de detecció més elevades en utilitzar 5 antígens (91,9%) enlloc d'utilitzar únicament un sol antigen (55,6-80%), amb una combinació de 2 (76,3-87,5%), 3 (85,6-90,6%) o 4 antígens (89,4 -91,3%). Aquest mètode utilitzat en l'article es pot aplicar al diagnòstic serològic, al cribratge massiu en regions endèmiques o a la prova de seguretat en la transfusió de la malària vivax prevalent. El diagnòstic de Western Blot amb antígens d'etapa circumsporozoïta i hipnozoïta tindrà un paper crític en el diagnòstic d'un període d'incubació prolongat, especialment en la malària vivax. També es pot utilitzar en el cribratge epidemiològic i en la detecció de seguretat dels donants del banc de sang.

CONCLUSIONS

La malària causa uns 20-90 milions de casos de febre alta i aproximadament 1,5 milions de morts anualment. Tot i els esforços de reduir la transmissió i d'incrementar el tractament, hi ha hagut molt poc canvi en àrees que es troben en risc de la malaltia des de 1992. De fet, si la permanència de la malària continua en el seu curs de permanent augment, la taxa de mortalitat pot duplicar-se en els següents vint anys. Les estadístiques precises són desconegudes perquè molts casos succeeixen en àrees rurals on les persones no tenen accés a hospitals o a recursos per a garantir la salut.

Tal i com hem pogut informar-nos en la recerca dels articles¹²³, la malària es pot detectar amb diferents tècniques immunològiques, com les explicades anteriorment (aglutinació, immunocromatografia i Western Blot), cadascuna d'elles serveix per poder detectar la malària.

REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

- ¹ Jiraporn Kuesap, Kesara Na-Bangchang, (Abril 03, 2018) *The Effect of ABO Blood Groups, Hemoglobinopathy, and Heme Oxygenase-1 Polymorphisms on Malaria Susceptibility and Severity* Web: <http://parasitol.kr/journal/view.php?id=10.3347/kjp.2018.56.2.167>
- ² Nancy Arróspide V, Maritza Puray, Elisa Guzmán S, Milton Verano B, Sigifredo Medina, Luz Mendizábal A, Sonia Gonzáles, (Abril/Juny, 2004), *Uso de pruebas rápidas inmunocromatográficas para la detección de Plasmodium falciparum en donantes de sangre en Perú* Web: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-46342004000200004&script=sci_arttext
- ³ Korean J Parasitol., (Juny 30, 2001) *Western blot diagnosis of vivax malaria with multiple stage-specific antigens of the parasite* Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2721094/> ⁴
- Rovira-Graells N, Gupta AP, Planet E, Crowley VM, Mok S, Ribas de Pouplana L, Preiser PR, Bozdech Z, Cortés A., (Març 13, 2002), *Científicos catalanes hallan datos clave sobre el parásito de la malaria* Web: https://www.isglobal.org/documents/10179/25254/NdP+ISGlobal_parasito_malaria.pdf/ef849ac8-3399-4b80-9a5e-c63ae6d6701d
- ⁵ Generalitat de Catalunya, Malària, Web: <http://canalsalut.gencat.cat/ca/detalls/article/Malaria#bloc2>
- ⁶ La Marató de tv3, (2017). Web: <https://www.ccma.cat/tv3/marato/que-es/2017/1031/>
- ⁷ Laia Comas, *Simptomatologia: la febre del viatger*, Web: http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs00-01/Comas_Laia/simptomatologia.html
- ⁸ Maravillas García,(Gener 28, 2018),*¿Cómo se cura la malaria?*, Web: <https://lamalaria.com/consejos/como-se-cura-la-malaria/>
- ⁹ Lawrence C. Brody, Ph.D, *Western Blot*, Web: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Western-Blot>
- ¹⁰ el web de Ràdio i Televisió d'Andorra Web: <https://www.andorradifusio.ad/blog/sistema-immunitari-exercit-gairebe-perfecte>
- ¹¹ Web: <https://lamalaria.com/malaria/distribucion-geografica/>

ANNEX:

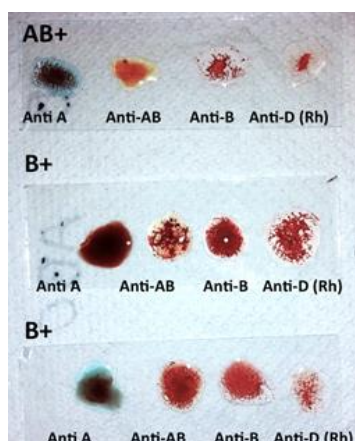


Figura 1: Tècnica d'aglutinació

<i>Plasmodium</i> species	O (%)	A (%)	B (%)	AB (%)	Total (%)
<i>Plasmodium falciparum</i>	9	11	12	3	35
<i>Plasmodium vivax</i>	27	13	19	4	63
Mixed infections with <i>P. falciparum</i> and <i>P. vivax</i>	1	1	0	0	2
Total	37	25	31	7	100

Figura 2: Resultats ABO grup sanguini

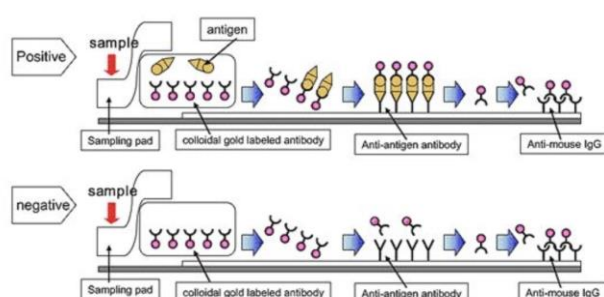


Figura 3: Tècnica immuno cromatografica

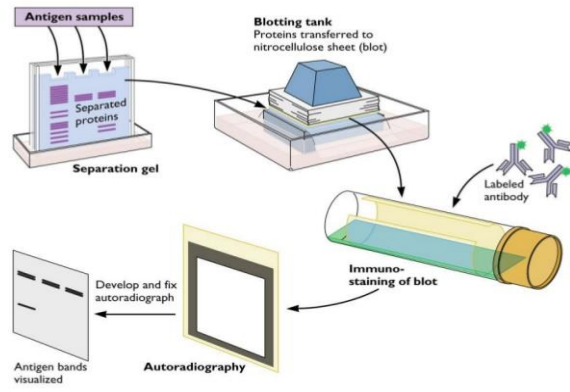


Figura 4: Tècnica immunològica, Western Blot