

REVISIÓN DE TEMA

## Malaria en humanos por infección natural con *Plasmodium knowlesi*

Edgar Martínez-Salazar<sup>1,2</sup>, Alberto Tobón-Castaño<sup>1,2</sup>, Silvia Blair<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Grupo Malaria, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

<sup>2</sup> Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

El primer caso informado de transmisión natural de *Plasmodium knowlesi* en humanos se publicó en 1965. En el sureste de Asia la presentación atípica de casos de malaria, tanto por cambios en la distribución de las especies diagnosticadas de *Plasmodium*, como por su morfología, motivó diversos estudios que han confirmado la infección en humanos por este plasmodio que infecta naturalmente distintas especies de simios, que son endémicos de las selvas de esta región.

Los estudios recientes sugieren que la malaria por *P. knowlesi* no es una enfermedad emergente en humanos sino que no estaba siendo diagnosticada, debido a la similitud morfológica de este plasmodio con *P. malariae* y *P. falciparum*, lo cual dificulta su reconocimiento mediante examen microscópico. Actualmente, se puede confirmar el diagnóstico mediante reacción en cadena de la polimerasa que permite identificar cebadores específicos de *P. knowlesi*.

La malaria por *P. knowlesi* ha ocasionado desenlaces fatales en humanos, lo que plantea diversos retos como la búsqueda de métodos operativos de diagnóstico para las zonas endémicas, el estudio de los vectores involucrados y la eficacia terapéutica de los medicamentos para su tratamiento. En las regiones selváticas de Suramérica se hace imperativa la vigilancia de parásitos y vectores de la malaria en simios, que potencialmente puedan ocasionar esta zoonosis.

**Palabras clave:** malaria/epidemiología, *Plasmodium knowlesi*, infección, humanos

### Natural *Plasmodium knowlesi* malaria infections in humans

The first reported case of natural transmission of *Plasmodium knowlesi* to humans was published in 1965. In Southeast Asia, the atypical presentation of malaria cases, the changes in the distribution of the *Plasmodium* species diagnosed and their atypical morphology prompted several studies that confirmed natural infections in humans by this protozoon which naturally infects different species of apes which are endemic in the forests of this region.

Recent studies suggest that *P. knowlesi* malaria is not an emerging disease in humans but was rather being misdiagnosed due to its morphological similarity with *P. malariae* and *P. falciparum*, hampering its correct diagnosis by microscopic examination. Currently, the diagnosis can be confirmed by polymerase chain reaction using *P. knowlesi* specific primers.

Malaria by *P. knowlesi* has led to fatal outcomes in humans and poses several challenges such as the development of useful diagnostic tools for endemic areas, the study of the vectors involved and the therapeutic efficacy of the drugs for its treatment. In the jungle regions of South America it is imperative to monitor the parasites of simian malaria and the vectors that have the potential to transmit this zoonosis.

**Key words:** Malaria/epidemiology, *Plasmodium knowlesi*, infection, humans.

#### Contribución de los autores:

Todos los autores participamos en la búsqueda de literatura y redacción del manuscrito.

#### Correspondencia:

Alberto Tobón, Calle 62 N° 52-59, laboratorio 610, Sede Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Telefax: (574) 219 6487

albertobon@saludpublica.udea.edu.co

Recibido: 31/05/11; aceptado:20/10/11

La infección por *Plasmodium knowlesi* se encuentra ampliamente distribuida en el sureste de Asia, donde es endémica en diversas especies de monos y donde se transmite de forma natural a los humanos, en quienes puede resultar fatal (1-3). El primer caso reconocido de infección natural por *P. knowlesi* en humanos se reportó en 1965 (4) y luego se informó un presunto caso en 1971 (5), pero sólo desde el

2004 (2) se ha venido informando sistemáticamente la presencia de infecciones naturales en humanos en diferentes países del sureste de Asia, como en Tailandia (2004) (6), China (2006) (7), Singapur (2008) (8), Filipinas (2008) (9,10), Vietnam (2009) (11) y Malasia (12,13).

A las cuatro especies de plasmodios reconocidas como causantes de enfermedad en los humanos, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*, se agrega esta especie que hace más compleja la situación mundial de la malaria. En 2009 se informaron 294 millones de casos y cerca de un millón de muertes por malaria (14), y se estima que entre dos y tres millones de personas padecen anualmente una forma grave de la enfermedad (15); a esto se suma la creciente falla terapéutica de diversos antipalúdicos, como ocurre con la artemisina y la cloroquina, usados en el tratamiento de malaria por *P. falciparum* y *P. vivax* (14).

*Plasmodium knowlesi* ha sido estudiado para resolver problemas relacionados con el cultivo de otros parásitos de la malaria (16), para mejorar la comprensión del metabolismo de los plasmodios (17,18) y los mecanismos de acción de los medicamentos y la respuesta a ellos (19,20). Sin embargo, su diagnóstico aún representa un reto, primero, por su similitud morfológica con otras especies de plasmodios mucho más prevalentes en la población humana, como *P. malariae* (2), y, en segundo lugar, porque no se dispone de pruebas diagnósticas con anticuerpos específicos para su identificación (21).

Aunque los huéspedes y vectores naturales que se han asociado en Asia con la enzootia de *P. knowlesi*, no existen en Suramérica, el reconocimiento reciente de infecciones naturales por este hemoparásito en humanos demanda el estudio de las especies de plasmodios que circulan en los monos y mosquitos endémicos en este continente y la vigilancia de casos en las regiones selváticas que son focos potenciales de zoonosis por el desplazamiento de poblaciones humanas (22,23). El reconocimiento de esta enfermedad en los humanos hace urgente el diseño de herramientas diagnósticas que permitan diferenciar *P. knowlesi* de otras especies y la valoración de la respuesta terapéutica para su tratamiento con esquemas diferentes al de la cloroquina, medicamento comúnmente empleado en el tratamiento de la malaria por *P. knowlesi* pero que con frecuencia falla en las infecciones por *P. falciparum* en todo el mundo, además de las crecientes fallas en aquellas por *P. vivax* (24).

## Identificación de *Plasmodium knowlesi* como zoonosis

Entre las 20 especies de *Plasmodium* spp. que infectan distintas especies de monos, cinco se consideran agentes potencialmente infecciosos para los humanos: *P. simium* y *P. brasilianum* en Suramérica; y *P. cynomolgi*, *P. inui*, y *P. knowlesi* en el sureste de Asia (25). Se presume que *P. knowlesi* tiene su origen en la región peninsular de Malasia donde infecta comúnmente a los monos, especialmente *Macaca fascicularis*, y desde donde pudo extenderse a regiones cercanas, como Filipinas, Java, Tailandia, Camboya y Vietnam.

En 1927, Franchini fue la primera persona que informó la presencia de este plasmodio en sangre de *M. fascicularis*, distinguiéndolo de *P. inui* y de *P. cynomolgi*, frecuentemente hallados en monos. Sin embargo, fueron Knowles y Das Gupta quienes, en 1932, describieron las formas del parásito en sangre y propusieron la posibilidad de infección en humanos (26). Este mismo año, Sinton y Mulligan describieron detalladamente la morfología de *P. knowlesi*; identificaron características en los eritrocitos de monos infectados, como el punteado particular de su citoplasma y un punto accesorio de cromatina, y establecieron que el ciclo esquizogónico tenía una duración de 24 horas, argumentos con los cuales clasificaron este plasmodio como una nueva especie (26). Se han descubierto variantes de *P. knowlesi*, entre las que se incluyen las variedades sintoni (Brug, 1934), arimai (Yokagawa (1941), hackeri (Wharton y Eyles, 1941) y edesoni, (Garnham, 1963) (26).

Los primeros informes de infección en el hombre se refieren a la inoculación experimental, a partir de sangre de monos, llevada a cabo por Knowles y Gupta (1932) y por Ionesco-Mihaiesi, *et al.* (1934). Posteriormente, se hicieron inoculaciones con este parásito como tratamiento en pacientes con paresia general debida a neurosífilis, para conseguir un estado de pirexia que eliminara el treponema (van Rooyen y Pile, 1935; Das Gupta y Chopra, 1936) (26). Sólo hasta 1965 se diagnosticó el primer caso de infección natural en un militar norteamericano procedente de Malasia, que presentó un cuadro febril con dolor de garganta, escalofríos y sudoración profusa (4); a partir de la sangre infectada de este paciente, se inocularon sujetos de experimentación y, además, se hizo la inoculación mediante mosquitos, lográndose la transmisión de hombre a hombre y de hombre a mono *Rhesus* (27).

En 1999 en la península de Malasia, en la región de Sarawak, se informó de una variación inusual en la distribución de las especies diagnosticadas de plasmodio, con aumento en la frecuencia de casos de malaria por *P. malariae* y observación de morfología atípica en los parásitos (2). Sin embargo en un estudio prospectivo en la misma región se encontró, mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR), que 120 de 208 (58 %) pacientes con malaria eran positivos para *P. knowlesi* y ninguno para *P. malariae*, lo cual sugería un error diagnóstico en los pacientes de 1999. El mismo error se presentó en este estudio, donde las infecciones adquiridas naturalmente por *P. knowlesi* fueron diagnosticadas por microscopía como *P. malariae*, lo que se atribuyó a la similitud morfológica de ambos parásitos (2). Estos hallazgos sugirieron que la malaria por *P. knowlesi* no era una enfermedad emergente en humanos, sino que estaba siendo mal diagnosticada. Esto se confirmó en otro estudio en Malasia en 47 enfermos con diagnóstico de *P. malariae*, de los cuales, 36 fueron positivos con PCR para *Plasmodium* spp., 35 de ellos con *P. knowlesi* y sólo uno con *P. malariae* (28).

### Huéspedes y vectores naturales

El huésped intermediario natural de *P. knowlesi* es *Macaca irus* (antes *M. fascicularis*) de Malasia y las Filipinas, especie en la cual produce infección crónica y benigna (29); además, se ha encontrado en *M. nemestrina*, en Malasia, India, China, Indonesia, Bangladesh, Birmania, Tailandia, Laos, Camboya, Vietnam y en la isla de Sumatra; y en *Presbytis melalophos*, en Indonesia (23,26). En condiciones experimentales se han inducido infecciones con *P. knowlesi* en *Callithrix jacchus* (30), *Saimiri boliviensis* y *Aotus trivirgatus* (31-33), especies que son endémicas en Centroamérica y Suramérica (23).

El papel de vector natural de *P. knowlesi* se atribuyó inicialmente a *Anopheles hackeri*, *A. vagus*, *A. sinensis*, *A. b. introlatus*, *A. maculatus*, *A. kochi*, *A. b. balabacensis* y *A. quadrimaculatus* (26); posteriormente, se ha incriminado a *A. leucosphyrus* (actualmente, *A. latens*), pero son muchas las especies que se han reconocido en su transmisión experimental (26,34). Ninguna de éstas está documentada en Colombia (35).

La búsqueda de huéspedes y vectores para determinar el potencial zoonótico de esta infección, se inició en Malasia (34,36). *Anopheles hackeri* se identificó como el vector más importante de *P. knowlesi* (37), *A. balabacensis introlatus*, como el

vector de *P. cynomolgi* (38), y *A. leucosphyrus* como el de *P. inui* (39), plasmodios causantes de malaria en simios. Sin embargo, se ha observado que *A. hackeri* es poco atraído por los humanos (34,37), mientras que *A. b. introlatus* y *A. leucosphyrus* tienen gran afinidad por los simios y humanos (39), y se ha establecido que esta última especie actúa como vector de *P. knowlesi* para ambos huéspedes, por lo que podría estar implicada en su transmisión a humanos. Otro candidato a vector de malaria como zoonosis, es *Anopheles b. balabacensis*, reconocido transmisor de malaria humana y de *P. cynomolgi* y *P. inui* (40). Los estudios realizados con ocho especies de anofeles demostraron que *A. b. balabacensis* era la especie más propensa a la infección por *P. knowlesi* (26).

Posteriormente, se determinó que *A. leucosphyrus* actúa como vector de *P. knowlesi*, alimentándose tanto de humanos como de simios, y que la mayor tasa de picaduras ocurre en la periferia de la selva (6,74 %) y es menor en la selva (1,85%) o dentro de las viviendas (0,28 %) (34), lo que permite suponer que los humanos adquieren la infección cuando se movilizan para trabajar en la selva (36). Se piensa que la restricción del grupo *leucosphyrus* al hábitat selvático, la falta de oportunidades para infectar a humanos y la competencia evolutiva entre las distintas especies de plasmodios, son condiciones que han limitado las infecciones de *P. knowlesi* en la población humana (41). No ha sido posible establecer si la infección en humanos ha sido adquirida de reservorios animales o si el contagio de humano a humano puede ocurrir en forma natural (25). Por otra parte, el gran número de genotipos hallados de *P. knowlesi* en macacos comparado con los de humanos y el hecho de que se comparten algunos haplotipos y alelos entre ambos reservorios, están a favor de que *P. knowlesi* se transmite como una zoonosis (42).

### Ciclo de vida y características morfológicas

**Ciclo esporogónico.** El ciclo sexual se produce en el vector (huésped definitivo), desde la ingestión de gametocitos hasta la aparición de esporozoítos en las glándulas salivales y tiene una duración entre 12 y 15 días, dependiendo de la especie de anofeles. El tamaño del ooquiste también puede variar según la especie de anofeles, siendo mayor en *A. freeborni* y *A. maculatus* que en *A. b. balabacensis* (26).

**Ciclo exoeritrocitario.** En 1957, Garnham demostró el ciclo exoeritrocitario de *P. knowlesi* en el parénquima hepático de monos inoculados

con la cepa Hackeri, cuyas formas más tempranas pueden observarse a las 96 horas posteriores a la infección (26). En ese momento aparece el parásito con forma ovalada que ocupa casi todo el hepatocito, con una clara separación entre la cromatina y el citoplasma. La duración total del ciclo fue menor de cinco días (26). Para este plasmodio no se ha demostrado la presencia de formas hepáticas latentes o hipnozoítos (43).

**Ciclo eritrocitario.** Al inicio del ciclo las formas en anillo son abundantes y similares a las de *P. falciparum*, de las cuales se diferencian por tener un núcleo esférico más prominente y porque pueden presentar puntos accesorios de cromatina (26). Al completarse el crecimiento, las formas en anillo, no ameboides, ocupan la mitad del glóbulo rojo parasitado. En esta fase aparecen formas en banda que recuerdan aquellas observadas en *P. malariae*. Con la pérdida de la vacuola, el parásito se contrae y se observa el pigmento en forma de gránulos oscuros, el núcleo aumenta de tamaño, se tiñe de rojo intenso y el citoplasma de azul intenso. En el glóbulo rojo parasitado se observa un granulado llamado “punteado de Sinton y Mulligan” (26). Al madurar a esquizonte, se forman hasta 16 merozoítos (10 en promedio) y se acumula un pigmento amarillo disperso que, al final, forma una masa amarilla oscura en el esquizonte maduro, completando así la fase asexual del ciclo en 24 horas (26). Descripciones más recientes de parásitos coloreados con Giemsa indican similitudes con *P. malariae*, como trofozoítos en forma de banda y esquizontes intensamente pigmentados dentro de eritrocitos pequeños, pero difieren por el mayor número de merozoítos en los esquizontes de *P. knowlesi* que en los de *P. malariae* (44). También se describen similitudes con *P. falciparum*, como las formas en anillo y trofozoítos maduros (45).

El desarrollo de formas sexuadas tarda hasta 48 horas a partir del inicio del ciclo eritrocitario. Los macrogametocitos maduros ocupan todo el eritrocito; su núcleo, teñido de rosa oscuro, se ubica en la periferia y el citoplasma, de azul-oscuro, presenta escasos y prominentes gránulos negros de pigmento. El microgametocito se caracteriza por el color rosado del citoplasma y el rosa oscuro del núcleo, el cual ocupa la mitad del parásito; no se encuentra pigmento (26).

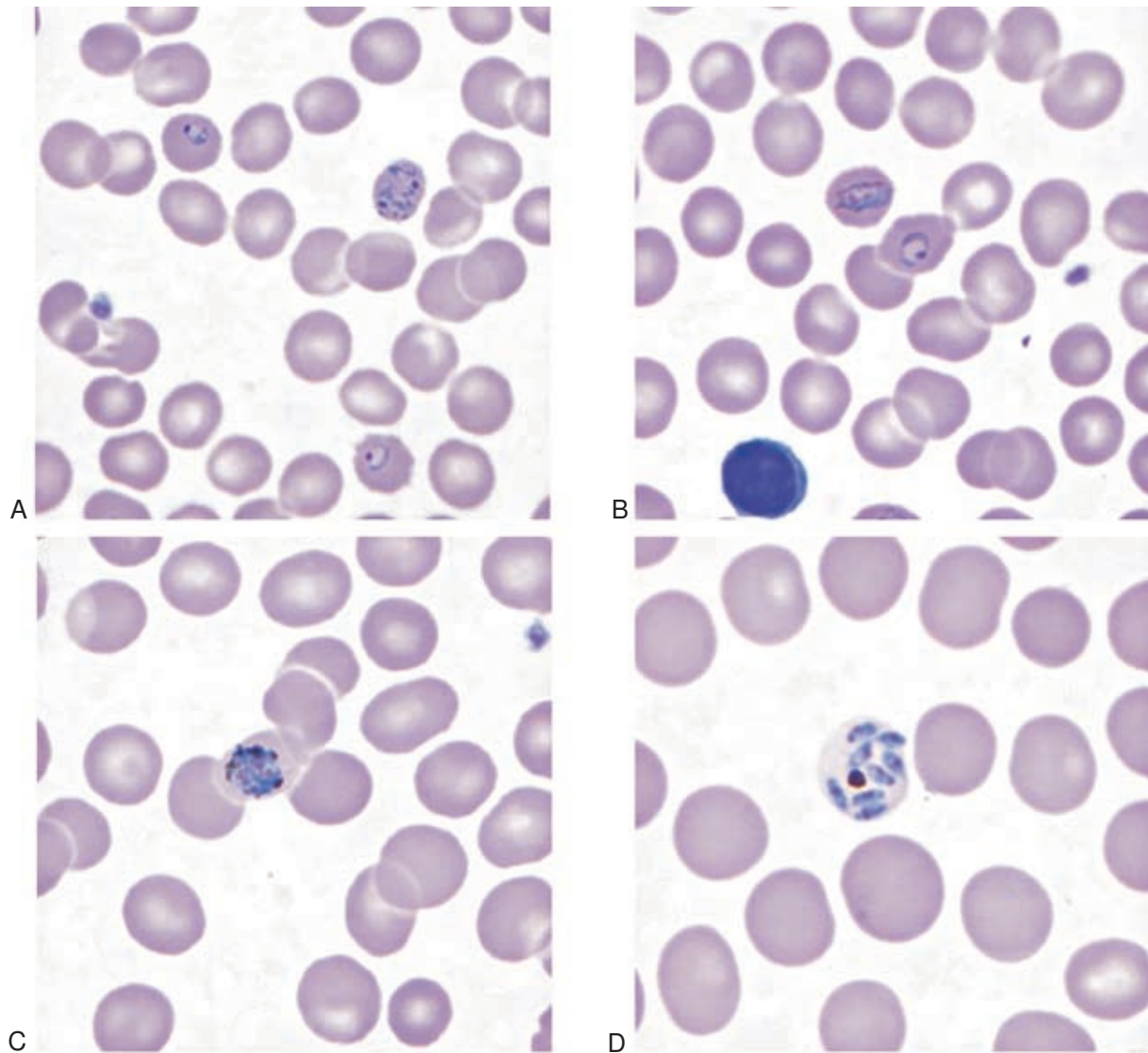
La morfología del parásito depende mucho de los eritrocitos del huésped; es similar a la de *P. vivax* en eritrocitos de *M. fascicularis*, a la de *P.*

*falciparum* en monos *Rhesus* y a la de *P. malariae* en humanos. Además, no siempre se observan las formas con puntos dobles de cromatina y hay discrepancias en la observación del punteado de Sinton y Mulligan, lo que podría deberse a diferencias en la coloración o a las mismas cepas (6) (figuras 1 y 2).

### Mecanismos de inmunidad y patogenia

Desde las primeras investigaciones realizadas en monos por Mulligan y Sinton (1933), se concluyó que se requiere de infección crónica o latente para conseguir inmunidad frente a los efectos clínicos de una nueva infección por la misma cepa del parásito y que múltiples nuevas infecciones heterólogas con ciertas cepas de *P. knowlesi* que compartan factores inmunológicos, parecen producir un importante grado de tolerancia a cepas heterólogas. Por otro lado, en 1938, Shortt, *et al.*, encontraron que las infecciones eliminadas con medicamentos no producían inmunidad residual contra la infección con cepas homologas del parásito (26). En 1969, Voller y Rossan observaron que, en las infecciones crónicas por *P. knowlesi*, la inmunidad producida en monos por la exposición repetitiva a una variante antigénica fue efectiva contra el reto con variantes heterólogas (26).

En monos *Rhesus* se ha observado que en la infección primaria la parasitemia disminuye espontáneamente, al igual que en infecciones siguientes, lo que indica el desarrollo de inmunidad; sin embargo, todos los episodios producen anemia importante. Esto sugiere la participación de la respuesta del huésped, ya que en la infección primaria se ha observado respuesta antiinflamatoria con predominio de la IL-10, que podría controlar la anemia inicial inducida por la respuesta inflamatoria, pero que permitiría posteriormente el aumento de los parásitos, causante de enfermedad y una mayor anemia por eritrocitólisis (46). Además, se ha observado alteración de las propiedades reológicas producidas por *P. knowlesi*, como aumento de la viscosidad de la sangre e inhabilidad de los eritrocitos para rotar, que pueden relacionarse con la disminución de la capacidad de deformarse del eritrocito parasitado. Se ha propuesto que este mecanismo podría explicar la obstrucción capilar producida por este plasmodio (47). En estos monos se han observado lesiones cerebrales microvasculares asociadas con la unión de eritrocitos parasitados y macrófagos a las paredes vasculares, con producción de exudado en las células endoteliales (48).

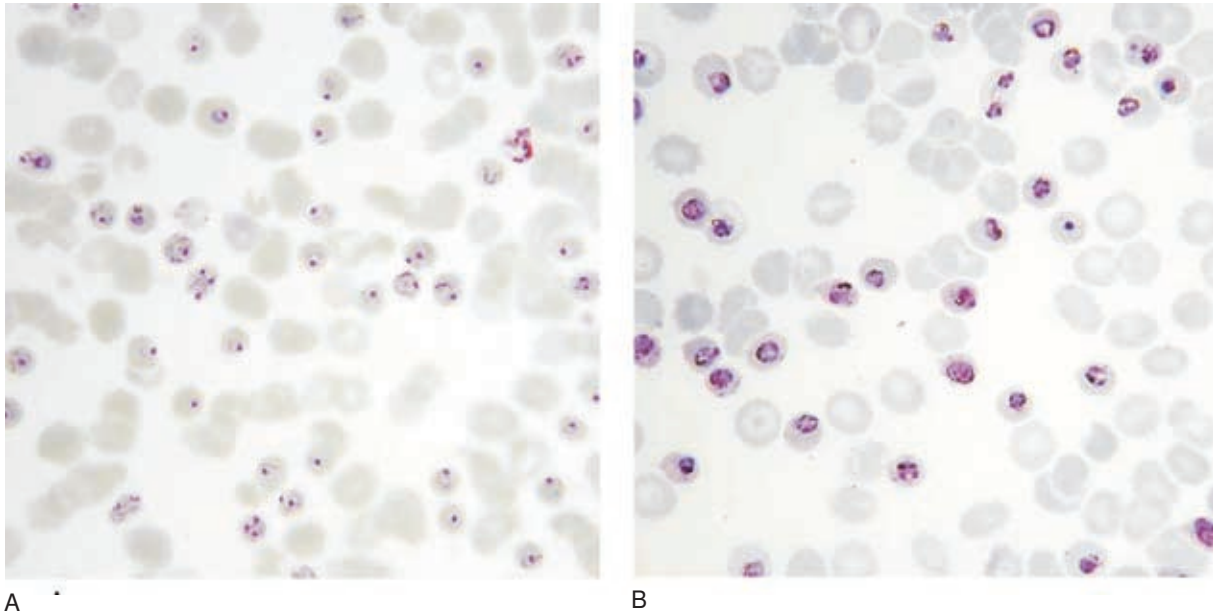


**Figura 1.** Extendidos teñidos con Giemsa, de sangre de un humano que viajó a Filipinas, donde se observan diversos estadios de *Plasmodium knowlesi*. **A.** Trofozoíto en anillo coloreado con Giemsa en un extendido de sangre de un ser humano. Se observan eritrocitos con infección múltiple. **B.** Trofozoítos en forma de banda (arriba) y anillo (abajo) de *P. knowlesi*. **C.** Gametocitos de *P. knowlesi* en extendido de sangre de un paciente que viajó a Filipinas. **D.** Esquizontes maduros de *P. knowlesi* en extendido de sangre. Imágenes tomadas de la biblioteca de imágenes de parásitos, DPDX del CDC de los Estados Unidos de América (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/default.htm>).

### Curso clínico y parasitológico de la infección

En el mono *Rhesus* (*M. mulata*), el período de incubación es de 6 a 9 días; los niveles de parasitemia se elevan desde el día 10, y alcanzan los niveles más altos el día 13 después de la inoculación, tiempo en el cual muere la mayoría de monos (26). En las infecciones inducidas en humanos inoculados con sangre parasitada, Milam y Kusch (1938) observaron que el curso clínico era similar al de la infección por *P. vivax*, a excepción de su menor duración, con picos febriles

durante 10 días que inicialmente alcanzaron los 39,0 °C y, en etapas más tardías, los 41,0 °C, acompañados de escalofrío en aproximadamente la mitad de los pacientes (26). Tanto en infecciones inducidas por picaduras de mosquitos como por inoculación de sangre infectada, el cuadro clínico estuvo caracterizado por fiebre diaria hasta de 40,4 °C, asociada a manifestaciones moderadas de enfermedad e, incluso, algunas graves que terminaron espontáneamente después de dos semanas (26).



**Figura 2.** Extendido de sangre del día de ingreso hospitalario de dos pacientes humanos con infección confirmada por PCR de infecciones únicas por *Plasmodium knowlesi*. Las figuras A y B muestran hiperparasitemia y morfología de los parásitos que, la mayoría de las veces, se confunde con *Plasmodium malariae*.

Fuente: Cox-Singh J, et al. *Plasmodium knowlesi*. Malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. CID 2008;46:170 (January 15th.). Reproducida con permiso de Oxford University Press.

**Parasitemia.** El ciclo de vida asexual de *P. knowlesi* es de 24 horas, en comparación con el ciclo de *P. malariae* que es de 72 horas. Esto hace que aquel pueda alcanzar parasitemias más altas y de manera más rápida, pudiendo, entonces, generar mayores complicaciones que *P. malariae*. La parasitemia alcanzada en humanos mediante inoculación de sangre infectada, rara vez superó los 100 parásitos por 10.000 eritrocitos, mientras que mediante picaduras infecciosas, el día 8 se alcanzaron valores tan altos como 20.850 parásitos/microlitro (26). En pacientes tratados con cloroquina, la desaparición de la parasitemia y la fiebre ocurrió en el mismo momento en *P. knowlesi*, mientras que en *P. vivax* desapareció la fiebre antes de la parasitemia, lo que sugiere que la densidad de parásitos necesaria para producir fiebre es inferior para *P. knowlesi* que para *P. vivax* (49).

**Aspectos clínicos en infecciones naturales.** En Malasia se estableció que el 70 % (107 de 152) de los pacientes admitidos entre 2006 y 2008 en el hospital local con diagnóstico de malaria tenían infección con *P. knowlesi*, sin que fuera posible diferenciarlos clínicamente de aquellos con *P. falciparum* o *P. vivax*. Antes de la hospitalización, los pacientes habían presentado síntomas inespecíficos con duración media de cinco días,

con fiebre y escalofríos en todos los casos; otros síntomas frecuentes fueron cefalea, anorexia, mialgias, dolor abdominal, disnea, tos productiva y, con menor frecuencia, vómito y diarrea (3).

En el examen físico, la taquipnea y taquicardia fueron signos clínicos comunes; además, se encontró hepatomegalia (24 %) y esplenomegalia (15 %). El 93,5 % de estos pacientes tenía malaria no complicada que respondió al tratamiento con cloroquina y primaquina, mientras que el resto desarrolló enfermedad grave, y la complicación principal fue el síndrome de dificultad respiratoria que ocasionó las únicas muertes en este estudio, lo que representó una tasa de mortalidad de 1,8 % (3). Otros síntomas informados durante la enfermedad fueron mialgias y dolor dorsal bajo (50).

Entre las alteraciones más frecuentes de laboratorio clínico, están la trombocitopenia (menos de 150.000 plaquetas/ $\mu$ l) observada hasta en el 98 % de los pacientes, sin presencia de hemorragias; además, se ha informado hiponatremia en 29 % de los casos (3). Las complicaciones descritas incluyen síndrome de dificultad respiratoria, hiperparasitemia (más de 100.000 parásitos/ $\mu$ l) e ictericia con bilirrubina elevada (más de 43  $\mu$ mol/L), falla renal (creatinina por encima de 265 mmol/L, a pesar de la rehidratación), hipotensión grave (presión sistólica menor de 80 mm Hg) e hipoglucemia grave

(glucemia menor de 2,2 mmol/L) (3), algunas de estas descritas en un caso mortal en Borneo (51); en otro caso se informó trombocitopenia grave (22.000 plaquetas/ $\mu$ l) (50).

Se ha propuesto que la etiología del síndrome de dificultad respiratoria en pacientes con malaria por *P. knowlesi* es pulmonar y no metabólica, y que hay una estrecha asociación entre la hiperparasitemia y esta complicación, lo que sugiere un aumento de la capilaridad pulmonar por efectos propios del parásito (3). Además, se ha demostrado importante congestión y reacción inflamatoria en capilares pulmonares de monos *Rhesus* sometidos a la infección por *P. knowlesi* (52); el secuestro es otro fenómeno que puede estar asociado a este síndrome, ya que se ha encontrado este fenómeno en vasos sanguíneos de monos y humanos (1,53). Se ha propuesto que el daño renal está mediado por la adhesión del parásito a los capilares, ya que se produce disfunción renal y falla renal asociados a la parasitemia a pesar de las maniobras de reanimación y rehidratación, como en las infecciones por *P. falciparum*, pero ello no se ha confirmado en la infección por *P. knowlesi* (3).

### Métodos de diagnóstico

El diagnóstico microscópico mediante el examen de gota gruesa presenta dificultades por la similitud de *P. knowlesi* con otras especies, especialmente con *P. malariae* (2,28). Las pruebas de diagnóstico rápido y la PCR resultan ser herramientas muy útiles para un buen diagnóstico. En las pruebas de diagnóstico rápido se han empleado anticuerpos monoclonales contra *P. knowlesi*, dirigidos a la lactato deshidrogenasa del plasmodio (pLDH), los cuales se unen tanto a un antígeno específico de *P. falciparum* (17E4), como a uno de *P. vivax* (13H11), y no reaccionan con los antígenos específicos de *P. ovale* (7E7) y *P. malariae* (10D12); se ha aceptado que este método permite diferenciar *P. knowlesi* de *P. malariae*. Cuando ambos antígenos, 17E4 y 13H11, se unen con anticuerpos anti-pLDH el resultado de la prueba se interpreta como positiva para *P. knowlesi*; la limitación de esta prueba es que, ante una infección mixta por *P. falciparum* y *P. vivax*, no sería posible diferenciarla de una infección por *P. knowlesi*, caso en el cual se requiere del diagnóstico microscópico para aclarar la especie que causa la infección (21). En estos casos, la dificultad para aclarar el diagnóstico microscópico se debe a que en los estadios tempranos *P. knowlesi* es muy parecido a *P. falciparum* (44) y, por ello, es recomendable hacer un extendido de

sangre periférica, además de la gota gruesa, para ver la relación entre parásito y eritrocito.

Con la prueba rápida se ha demostrado que otras cepas de plasmodios que afectan simios, como *P. inui*, *P. cynomolgi* y *P. fieldi*, no reaccionan con los antígenos específicos de *P. falciparum* (17E4), lo que permitiría distinguir *P. knowlesi* de otras especies en estos primates (21). Se ha establecido que las pruebas disponibles en la actualidad para diagnóstico rápido de plasmodios que infectan humanos, detectan *P. knowlesi*, pero los niveles de parasitemia bajos podrían no ser detectados; por lo tanto, una prueba negativa no excluiría una infección por esta especie (50).

En los distintos casos reportados, la PCR ha sido la técnica molecular más usada para confirmar el diagnóstico de malaria por *P. knowlesi*. Hasta hace un tiempo se usaron los cebadores Pmk8-Pmkr9, que habían demostrado ser los más conservados para *P. knowlesi* (2); más adelante se encontró que estos cebadores presentaban reacción cruzada de manera aleatoria con *P. vivax*, lo cual puede llevar a errores diagnósticos (54). Se ha concluido que los cebadores PkF1060-PkR1550 y PkF1140-PkR1550, resultan ser mucho más específicos para *P. knowlesi*, sin presentar reacción cruzada con alguna especie distinta a ésta; sin embargo, se considera que los resultados publicados a la fecha sobre infecciones en humanos por *P. knowlesi* en las que se utilizaron los cebadores Pmk8-Pmkr9, no son dudosos, debido a que en estos estudios se excluyó la infección por *P. vivax* y se amplificó y secuenció un gen diferente perteneciente a *P. knowlesi* (54). Recientemente, se ha utilizado la PCR en tiempo real, lográndose mayor especificidad y sensibilidad que con otros métodos, y reducción de los costos, lo que permitiría su uso en regiones endémicas (55,56).

### Tratamiento antipalúdico

Para el tratamiento de un cuadro agudo de paludismo por *P. knowlesi* puede emplearse la cloroquina, la cual se ha utilizado con éxito en Malasia donde se obtuvo respuesta clínica y parasitológica adecuada en 111 pacientes, que recibieron tratamiento oral con una dosis total de 25 mg de cloroquina base por kilogramo de peso, distribuidos en 10 mg/kg al inicio y 5 mg/kg a las 6, 24 y 48 horas, más 15 mg de primaquina durante dos días (49). En este estudio se concluyó que no se habían presentado recrudescimientos durante 28 días de seguimiento y que el uso de la primaquina sería innecesario porque los gametocitos fueron

sensibles a la cloroquina en las primeras 24 horas de tratamiento, pero no se pudo determinar el efecto de la primaquina sobre los estadios sexuales o asexuales. Algunos casos individuales de infección natural también tuvieron respuesta exitosa con el mismo esquema de cloroquina (6,50).

Con la cloroquina, la eliminación del parásito ocurre más rápidamente en *P. knowlesi* que en *P. vivax*, y la velocidad de depuración fue más rápida que la observada hasta el momento en todas las especies de malaria humana (49). Otros medicamentos que se han empleado con éxito en casos individuales son atovacuona-proguanilo, 250 mg/100 mg, cuatro dosis por tres días (45), mefloquina (12) y quinina con doxiciclina (57); en estos dos últimos medicamentos no se reportó de la dosis empleada.

### Conclusiones

Además de que ha aumentado el número de casos informados de malaria producida por *P. knowlesi* en humanos, se conoce de casos complicados y muertes debidas a esta infección. Según los estudios recientes, este hemoparásito, que produce infección natural en diversas especies de monos en el sureste de Asia, no es causa de una enfermedad emergente en los humanos, sino que su presencia no se había detectado mediante el examen microscópico de rutina por su similitud con *P. malariae* y *P. falciparum*. Hoy se dispone de métodos de diagnóstico mediante reacción en cadena de la polimerasa con cebadores específicos de *P. knowlesi*, pero se requieren métodos de diagnóstico aplicables en las zonas endémicas, y uno sencillo puede ser que los programas operativos en zonas selváticas practiquen el extendido de sangre periférica además de la gota gruesa. La enfermedad aguda no complicada se ha tratado exitosamente con cloroquina a las dosis empleadas para malaria por *P. vivax*.

Se sugiere adelantar estudios en las regiones selváticas de Suramérica donde son endémicas diversas especies de monos y de anofeles, que son potenciales transmisores de la malaria como zoonosis.

### Conflicto de intereses

Los autores declaramos que la publicación de este manuscrito carece de conflicto de intereses.

### Financiación

Grupo Malaria y Programa de Jóvenes Investigadores de la Vicerrectoría de Investigación, Universidad de Antioquia.

### Referencias

1. **Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, Matusop A, Ratnam S, et al.** *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. Clin Infect Dis. 2008;46:165-71.
2. **Singh B, Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul S, Cox-Singh J, et al.** A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. Lancet. 2004;363:1017-24.
3. **Daneshvar C, Davis TM, Cox-Singh J, Rafa'ee MZ, Zakaria SK, Divis PC, et al.** Clinical and laboratory features of human *Plasmodium knowlesi* infection. Clin Infect Dis. 2009;49:852-60.
4. **Chin W, Contacos P, Coatney G, Kimball H.** A naturally acquired quotidian-type malaria in man transferable to monkeys. Science. 1965;149:865.
5. **Fong Y, Cadigan F, Coatney G.** A presumptive case of naturally occurring *Plasmodium knowlesi* malaria in man in Malaysia. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1971;65:839.
6. **Jongwutiwes S, Putaporntip C, Iwasaki T, Sata T, Kanbara H.** Naturally acquired *Plasmodium knowlesi* malaria in human, Thailand. Emerg Infect Dis. 2004;10:2211-3.
7. **Zhu HM, Li J, Zheng H.** Human natural infection of *Plasmodium knowlesi*. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi. 2006;24:70-1.
8. **Ng O, Ooi E, Lee C, Lee P, Ng L, Pei S, et al.** Naturally acquired human *Plasmodium knowlesi* infection, Singapore. Emerg Infect Dis. 2008;14:814.
9. **Luchavez J, Espino F, Curameng P, Espina R, Bell D, Chiodini P, et al.** Human infections with *Plasmodium knowlesi*, the Philippines. Emerg Infect Dis. 2008;14:811.
10. **Centers for Disease Control and Prevention.** Simian malaria in a U.S. traveler—New York, 2008. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2009;58:229-32.
11. **Eede P, Van H, van Overmeir C, Vythilingam I, Duc T, Hung L, et al.** Human *Plasmodium knowlesi* infections in young children in central Vietnam. Malar J. 2009;8:249.
12. **Bronner U, Divis P, Färnert A, Singh B.** Swedish traveller with *Plasmodium knowlesi* malaria after visiting Malaysian Borneo. Malar J. 2009;8:15.
13. **Tang T, Salas A, Ali-Tammam M, del Carmen M, Lanza M, Arroyo E, et al.** First case of detection of *Plasmodium knowlesi* in Spain by real time PCR in a traveller from Southeast Asia. Malar J. 2010;9:219.
14. **World Health Organization.** World malaria report 2010. Geneva: World Health Organization; 2010.
15. **Rowe AK, Rowe SY, Snow RW, Korenromp EL, Schellenberg JR, Stein C, et al.** The burden of malaria mortality among African children in the year 2000. Int J Epidemiol. 2006;35:691.
16. **Cook RT, Aikawa M, Rock RC, Little W, Sprinz H.** The isolation and fractionation of *Plasmodium knowlesi*. Mil Med. 1969;134:866-83.
17. **McCormick GJ.** Amino acid transport and incorporation in red blood cells of normal and *Plasmodium knowlesi*-infected rhesus monkeys. Exp Parasitol. 1970;27:143-9.



18. **Butcher GA, Cohen S, Garnham PC.** Passive immunity in *Plasmodium knowlesi* malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1970;64:850-6.
19. **Dunn MJ.** Alterations of red blood cell sodium transport during malarial infection. *J Clin Invest.* 1969;48:674-84.
20. **Nair CP, Ray AP, Singh J.** Studies on Nuri strain of *P. knowlesi*. XI. Comparative studies on quinine and chloroquine administered intravenously. *Indian J Malariol.* 1956;10:85-93.
21. **McCutchan T, Piper R, Makler M.** Use of malaria rapid diagnostic test to identify *Plasmodium knowlesi* infection. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:1750.
22. **Sallum MA, Peyton EL, Wilkerson RC.** Six new species of the *Anopheles leucosphyrus* group, reinterpretation of *An. elegans* and vector implications. *Med Vet Entomol.* 2005;19:158-99.
23. **Winsconsin Primates Research Centre.** Primate Info Net. 2011 Fecha de consulta: 10 de mayo de 2011. Disponible en: <http://pin.primate.wisc.edu/>.
24. **World Health Organization.** Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010. Geneva: WHO; 2010. p. 121.
25. **Sabbatani S, Fiorino S, Manfredi R.** Malaria due to *Plasmodium knowlesi* in South-Eastern Asia and America. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica.* 2009;28:48-50.
26. **Coatney G, Collins W, McW. Warren, Contacos PG.** The primate malarias. Washington, D.C.: U S Government Printing Office; 1971. p. 366.
27. **Chin W, Contacos PG, Collins WE, Jeter MH, Alpert E.** Experimental mosquito-transmission of *Plasmodium knowlesi* to man and monkey. *Am J Trop Med Hyg.* 1968;17:355-8.
28. **Lee KS, Cox-Singh J, Brooke G, Matusop A, Singh B.** *Plasmodium knowlesi* from archival blood films: Further evidence that human infections are widely distributed and not newly emergent in Malaysian Borneo. *Int J Parasitol.* 2009;39:1125-8.
29. **Brown KN, Brown IN, Hills LA.** Immunity to malaria. I. Protection against *Plasmodium knowlesi* shown by monkeys sensitized with drug-suppressed infections or by dead parasites in Freund's adjuvant. *Exp Parasitol.* 1970;28:304-17.
30. **Langhorne J, Cohen S.** *Plasmodium knowlesi* in the marmoset (*Callithrix jacchus*). *Parasitology.* 1979;78:67-76.
31. **Sullivan JS, Morris CL, Richardson BB, Galland GG, Sullivan JJ, Collins WE.** Sporozoite transmission of three strains of *Plasmodium knowlesi* to *Aotus* and Saimiri monkeys. *J Parasitol.* 1996;82:268-71.
32. **Collins WE, Contacos PG, Skinner JC, Stanfill PS, Richardson BB.** Susceptibility of Peruvian *Aotus* monkeys to infection with different species of *Plasmodium*. *Am J Trop Med Hyg.* 1981;30:26-30.
33. **Collins WE, Sullivan JS, Nace D, Williams T, Williams A, Galland GG, et al.** Additional observations on the sporozoite transmission of *Plasmodium knowlesi* to monkeys. *J Parasitol.* 2004;90:866-7.
34. **Vythilingam I, Tan C, Asmad M, Chan S, Lee K, Singh B.** Natural transmission of *Plasmodium knowlesi* to humans by *Anopheles latens* in Sarawak, Malaysia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006;100:1087-8.
35. **Olano VA, Brochero HL, Sáenz R, Quiñones ML, Molina J.** Mapas preliminares de la distribución de especies de *Anopheles* vectores de malaria en Colombia. *Biomédica.* 2001;21:402-8.
36. **Tan C, Vythilingam I, Matusop A, Chan S, Singh B.** Bionomics of *Anopheles latens* in Kapit, Sarawak, Malaysian Borneo in relation to the transmission of zoonotic simian malaria parasite *Plasmodium knowlesi*. *Malar J.* 2008;7:52.
37. **Wharton R, Eyles D.** *Anopheles hackeri*, a vector of *Plasmodium knowlesi* in Malaya. *Science.* 1961;134:279.
38. **Eyles DE, Warren M, Guinn E, Wharton RH, Ramachandran CP.** Identification of *Anopheles balabacensis* introlatus as a vector of monkey malaria in malaya. *Bull World Health Organ.* 1963;28:134-5.
39. **Wharton R, Eyles D, Warren M, Moorhouse D.** *Anopheles leucosphyrus* identified as a vector of monkey malaria in Malaya. *Science.* 1962;137:758.
40. **Cheong WH, Warren M, Omar AH, Mahadevan S.** *Anopheles balabacensis balabacensis* identified as vector of simian malaria in Malaysia. *Science.* 1965;150:1314-5.
41. **Cox-Singh J, Singh B.** Knowlesi malaria: Newly emergent and of public health importance? *Trends Parasitol.* 2008;24:406-10.
42. **Lee KS, Divis PC, Zakaria SK, Matusop A, Julin RA, Conway DJ, et al.** *Plasmodium knowlesi*: Reservoir hosts and tracking the emergence in humans and macaques. *PLoS Pathog.* 2011;7:e1002015.
43. **Krotoski WA, Collins WE.** Failure to detect hypnozoites in hepatic tissue containing exoerythrocytic schizonts of *Plasmodium knowlesi*. *Am J Trop Med Hyg.* 1982;31:854-6.
44. **Lee K, Cox-Singh J, Singh B.** Morphological features and differential counts of *Plasmodium knowlesi* parasites in naturally acquired human infections. *Malar J.* 2009;8:73.
45. **Figtree M, Lee R, Bain L, Kennedy T, Mackertich S, Urban M, et al.** *Plasmodium knowlesi* in human, Indonesian Borneo. *Emerg Infect Dis.* 2010;16:672-4.
46. **Praba-Egge AD, Montenegro S, Cogswell FB, Hopper T, James MA.** Cytokine responses during acute simian *Plasmodium cynomolgi* and *Plasmodium knowlesi* infections. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;67:586-96.
47. **Miller LH, Usami S, Chien S.** Alteration in the rheologic properties of *Plasmodium knowlesi*-infected red cells. A possible mechanism for capillary obstruction. *J Clin Invest.* 1971;50:1451-5.
48. **Ibiwoye MO, Howard CV, Sibbons P, Hasan M, van Velzen D.** Cerebral malaria in the Rhesus monkey (*Macaca mulatta*): Observations on host pathology. *J Comp Pathol.* 1993;108:303-10.
49. **Daneshvar C, Davis T, Cox-Singh J, Rafa'ee M, Zakaria S, Divis P, et al.** Clinical and parasitological response to oral chloroquine and primaquine in uncomplicated human *Plasmodium knowlesi* infections. *Malar J.* 2010;9:238.

50. **van Hellemond JJ, Rutten M, Koelewijn R, Zeeman AM, Verweij JJ, Wismans PJ, et al.** Human *Plasmodium knowlesi* infection detected by rapid diagnostic tests for malaria. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:1478-80.
51. **Cox-Singh J, Hiu J, Lucas SB, Divis PC, Zulkarnaen M, Chandran P, et al.** Severe malaria - a case of fatal *Plasmodium knowlesi* infection with post-mortem findings: A case report. *Malar J.* 2010;9:10.
52. **Spangler W, Gribble D, Abildgaard C, Harrison J.** *Plasmodium knowlesi* malaria in the rhesus monkey. *Vet Pathol.* 1978;15:83.
53. **Miller LH, Fremont HN, Luse SA.** Deep vascular schizogony of *Plasmodium knowlesi* in *Macaca mulatta*. Distribution in organs and ultrastructure of parasitized red cells. *Am J Trop Med Hyg.* 1971;20:816-24.
54. **Imwong M, Tanomsing N, Pukrittayakamee S, Day N, White N, Snounou G.** Spurious amplification of a *Plasmodium vivax* small-subunit RNA gene by use of primers currently used to detect *P. knowlesi*. *J Clin Microbiol.* 2009;47:4173.
55. **Babady N, Sloan L, Rosenblatt J, Pritt B.** Detection of *Plasmodium knowlesi* by real-time polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81:516.
56. **Oddoux O, Debourgogne A, Kantele A, Kocken CH, Jokiranta TS, Vedy S, et al.** Identification of the five human *Plasmodium* species including *P. knowlesi* by real-time polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011;30:597-601.
57. **Kantele A, Marti H, Felger I, Muller D, Jokiranta TS.** Monkey malaria in a European traveler returning from Malaysia. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:1434-6.