

Revisión Bibliográfica

Avances en el diagnóstico de la malaria en los programas de eliminación de la enfermedad

Juan Cuadros González

DTM&H Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Príncipe de Asturias HUPA;
juan.cuadros@uah.es; ORCID id: <https://orcid.org/0000-0003-4098-4377>

DOI: <https://doi.org/10.37536/RIECS.2021.6.S1.244>

Resumen: Uno de los aspectos clave de las estrategias actuales de control, eliminación y erradicación de la malaria es aumentar la capacidad de detección de la enfermedad con métodos cada vez más sencillos y robustos que puedan aplicarse fácilmente en el terreno. Para lograr este objetivo, es necesario mejorar la sensibilidad de la microscopía clásica con métodos de concentración de hematíes infectados, utilizar test rápidos ultrasensibles de última generación o técnicas moleculares como el LAMP, que no requieren termocicladores y pueden utilizarse en las zonas endémicas. Los sistemas diagnósticos basados en la atracción magnética de la hemozoína son una opción atractiva también para el cribado poblacional.

Palabras clave: Microscopía de malaria, Diagnóstico molecular de malaria, Pruebas rápidas de malaria, Hemozoína, Programas de erradicación de malaria, Eliminación de malaria.

Abstract: One of the key aspects of current malaria control, elimination and eradication strategies is to increase the capacity to detect the disease with increasingly simple and robust methods that can be easily applied in the field. To achieve this objective, it is necessary to improve the sensitivity of classical microscopy with methods for concentrating infected red blood cells, using the latest generation of ultrasensitive rapid tests or molecular techniques such as LAMP, which do not require thermal cyclers and can be used in endemic areas. Diagnostic systems based on the magnetic attraction of hemozoin are also an attractive option for population screening.

Key words: Malaria microscopy, Malaria molecular diagnosis, Malaria rapid tests, Hemozoin, Malaria eradication programs, Malaria elimination.

1. Introducción y objetivos

La malaria es una de las enfermedades infecciosas más importantes a escala global. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2019 se produjeron en todo el mundo unos 229 millones de casos de paludismo que provocaron 409.000 muertes [1]. La incidencia de la malaria a nivel mundial ha disminuido entre 2010 y 2017, pero en los últimos años esta tendencia a la baja se ha desacelerado. Para avanzar hacia la erradicación del paludismo se necesitan múltiples intervenciones, si bien una vigilancia precisa y sensible de la transmisión del paludismo es un elemento clave en todos los programas [2].

El diagnóstico de la malaria es una herramienta clave en el control de la enfermedad y se utiliza generalmente para confirmar la infección clínica en pacientes sintomáticos atendidos en hospitales, centros o puestos de salud de todo el mundo. Sin embargo, otra utilidad fundamental del diagnóstico es la detección cuantitativa del reservorio parasitario que subyace en las infecciones submicroscópicas asintomáticas (ISM). Estas ISM son uno de los principales problemas a resolver en los programas dirigidos a eliminar la enfermedad, es decir, alcanzar una tasa de incidencia parasitaria anual $<1/1000$ y reducir a cero después de tres años la transmisión local.

En esta revisión nos centraremos en este último aspecto del diagnóstico del paludismo, que es un factor determinante para alcanzar el objetivo de eliminar la malaria fuera del continente africano en el 2030 y erradicar la enfermedad del planeta en el año 2050, como han planteado recientemente un grupo de expertos [3]. Aunque la microscopía y las pruebas de diagnóstico rápido continúan siendo una herramienta clave en las estrategias de control de la malaria, la eliminación de la enfermedad requiere métodos de detección de la infección más sensibles para prevenir la transmisión.

El objetivo de esta revisión es describir los recientes avances en la detección de parasitemias bajas presentando nuevas técnicas moleculares, así como otras de reciente desarrollo, y comentar las ventajas de estos métodos frente a las técnicas clásicas de microscopía y test de diagnóstico rápido (TDR).

2. Métodos

Para la elaboración de este trabajo, se ha realizado una búsqueda bibliográfica sistemática de estudios relevantes, publicados entre 2015 y 2020 y registrados en la base de datos PubMed. En la búsqueda se combinaron las palabras clave, "malaria molecular diagnosis", "malaria control and elimination diagnostics", "asymptomatic malaria", "innovative malaria tools".

Asimismo, se ha consultado el *World Malaria Report* de 2020 y se han comentado los resultados de estudios propios sobre el diagnóstico de la malaria [4-6]. En este sentido, se hallaron 582 artículos, entre los que hubo 62 revisiones seleccionando finalmente 15 publicaciones relevantes a efectos de esta revisión.

3. Resultados y discusión

El diagnóstico de la malaria se basa en procedimientos que permiten detectar células (hematíes y leucocitos) que contienen parásitos, proteínas de los parásitos, ácidos nucleicos específicos o hemozoína. Para diagnóstico retrospectivo y para los estudios epidemiológicos, también pueden detectarse anticuerpos específicos. Comentaremos a continuación diversos aspectos referentes a los diagnósticos empleados.

3.1. Microscopía y citometría

La microscopía ha sido el patrón de referencia del diagnóstico de la malaria desde el descubrimiento inicial de Laveran en el siglo XIX [7]. El principal problema de la microscopía en la práctica es la dificultad técnica y la falta de reactivos de calidad, así como de personal entrenado en las zonas endémicas. La sensibilidad real no se corresponde a lo descrito en la mayoría de las revisiones ya que en muchos centros y hospitales de distrito de países endémicos solo se tiñen extensiones de sangre convencionales y no se realizan gotas gruesas, por lo que el límite de detección (LOD) de la técnica en realidad puede llegar a ser muy superior al de 200 HI/ μ l, que es el límite descrito para los TDR [6,8]. Una forma de aumentar la sensibilidad de la microscopía es elevar la cantidad de sangre estudiada de 1 a 100 μ l mediante la exposición de la sangre extraída a campos magnéticos, de esta forma se alcanzan sensibilidades similares a las obtenidas por técnicas moleculares [9,10].

3.2. Test rápidos para la detección de proteínas

En las últimas décadas estos test han sido la base del diagnóstico clínico de la malaria en gran parte de las áreas endémicas debido a su sencillo uso en comparación con la microscopía de la malaria, una técnica laboriosa, que requiere un control de calidad estricto y personal técnico bien formado [6]. Solo en 2017 se distribuyeron 276 millones de test globalmente y, de estos, 223 se utilizaron en el continente africano [11]. En estos test se han utilizado diferentes biomarcadores específicos como las proteínas ricas en histidina 2 y 3 (HRP-2/3), las enzimas lactato deshidrogenasa (LDH), glutamato deshidrogenasa (GDH) y aldolasa o la proteína de superficie 3 del merozoito (MSP-3) [12].

Los test se presentan habitualmente en un formato de *cassette* con una técnica de inmunocromatografía de flujo lateral [12]. Se ha descrito un LOD de 200 a 2000 trofozoítos para *Plasmodium falciparum*, aunque en algunos estudios multicéntricos se ha demostrado que la detección de HRP2pf puede alcanzar una sensibilidad similar a la obtenida con microscopistas expertos en centros de referencia [4]. El inconveniente principal de estos test es que solo detectan proteínas de *P. falciparum* y *P. vivax* y no pueden utilizarse en zonas donde la prevalencia de la delección PfHRP2/3 es superior al 10%, ya que este genotipo del parásito no produce la proteína y, por tanto, no se detecta con los test rápidos. En el último Informe Mundial sobre la Malaria se mencionan once países donde se han detectado estas delecciones en los dos últimos años: China, Guinea Ecuatorial, Etiopía, Ghana, Myanmar, Nigeria, Sudán, Uganda, Reino Unido (importado de varios países endémicos de malaria), la República Unida de Tanzania y Zambia [1].

Por otro lado, es necesario desarrollar TDR más sensibles para detectar parasitemias bajas de *P. vivax* y acelerar el proceso de eliminación de la malaria en América, la región Asia-Pacífico y África oriental [3]. La organización FIND (*Foundation for Innovative Diagnostics*) impulsa el desarrollo de nuevos TDR capaces de detectar cepas de *P. falciparum* sin los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* y test con mayor sensibilidad para *P. vivax* que estarán disponibles ya en el año 2021 [3]. Recientemente se han desarrollado sistemas de biosensores electroquímicos que aumentan la sensibilidad en la detección de estos biomarcadores que se encuentran actualmente en fase de investigación y que podrían aplicarse en un futuro en los programas de control de la malaria debido a su alta sensibilidad, robustez, linealidad de la respuesta, estabilidad y reproducibilidad [12].

3.3. Métodos moleculares

Los metaanálisis que comparan las tasas de prevalencia determinadas por PCR frente a la microscopía han demostrado que la proporción de infecciones submicroscópicas por *P. falciparum* en la comunidad aumenta de forma considerable cuando disminuye la intensidad de transmisión de la malaria [13,14]. En las fases previas a la eliminación, la existencia de un amplio reservorio subpatente de infecciones dificulta mucho las tareas de vigilancia del paludismo cuando el objetivo es interrumpir la transmisión local. En una zona de Zambia que se encuentra en una fase previa a la eliminación, un estudio mostró que casi la mitad de todas las infecciones permanecieron sin ser detectadas por TDR [15].

Se considera que la infección submicroscópica (ISM) representa el 20% de las infecciones en las áreas de transmisión intensa (comunidades con una prevalencia parasitaria $\geq 75\%$), pero este porcentaje se eleva al 70-80% en áreas de transmisión baja (prevalencia parasitaria $< 10\%$) [16]. El LOD (límite de detección) de los test moleculares es 2-4 veces inferior al LOD de la microscopía y los TDR. El LOD de las diferentes técnicas diagnósticas depende de factores como la conservación y buen uso de los reactivos, la adecuada ejecución de los procedimientos diagnósticos y la capacitación del personal técnico; estos límites son variables y oscilan entre 5-200 hematíes infectados HI/ μl en la microscopía y 200 a 2000 HI/ μl en los TDR; sin embargo, con las técnicas moleculares la sensibilidad aumenta hasta 5 a 0,5 HI/ μl de sangre completa e incluso 0,005-0,05 HI/ μl de sangre completa concentrada.

Los primeros test moleculares para la malaria se centraron en detectar la secuencia del gen 16S RNA ribosómico [17], aunque posteriormente se han utilizado otras dianas como la familia multigénica *stevor* *P. falciparum*, el DNA mitocondrial (mtDNA) o el elemento repetitivo 2 asociado al telómero (TARE-2) y las secuencias Pvr64 y de mtDNA para *P. vivax*. Estas nuevas técnicas moleculares pueden aumentar la sensibilidad hasta alcanzar un LOD de 0,0005–0.005 HI/ μl o 1–10 HI/2ml de sangre. La tecnología LAMP de amplificación isotérmica permite realizar los test en el terreno, ya que no necesita utilizar un termociclador y se ha utilizado ya en programas de eliminación en el continente africano [5,6]. Otra estrategia eficaz que se ha utilizado en Zanzíbar es el uso de PCR en pools de muestras en el contexto de la detección reactiva de casos (RCT), es decir el cribado mediante PCR de la población en las zonas específicas donde se han detectado casos clínicos [18].

3.4. Nuevas tecnologías basadas en la atracción magnética de la hemozoína

La técnica de detección de hemozoína en sangre completa mediante MDM (microscopía con deposición magnética) aumenta la concentración de células parasitadas en la muestra hasta cuarenta veces y puede alcanzar una sensibilidad de 0,5 a 0,05 HI/ μ l [2-4]. Esta herramienta permitiría mejorar el LOD de la microscopía convencional, especialmente en la detección de gametocitos y por este motivo podría ser muy útil en los programas de eliminación de la malaria [19]. Otro método muy prometedor es la detección magneto óptica en un dispositivo de cristales de hemozoína que producen todas las especies del género *Plasmodium*. Un rayo de luz polarizada atraviesa el lisado de una muestra de sangre diluida bajo la influencia de campos magnéticos altos (\sim .55T) y bajos en un pequeño dispositivo rápido, robusto y económico denominado Gazelle [20, 21]. La sensibilidad y especificidad del test en el primer estudio de validación clínica realizado en la India fue similar a los obtenidos con microscopía convencional y los test rápidos [21] y este podría ser una alternativa en zonas de escasos recursos en sustitución de las técnicas de microscopía.

4. Conclusión

Uno de los aspectos clave de las estrategias actuales de control, eliminación y erradicación de la malaria es aumentar la capacidad de detección de la enfermedad con métodos cada vez más sencillos y robustos que puedan aplicarse fácilmente en el terreno. En este sentido, aunque la microscopía convencional, los test rápidos y las técnicas moleculares convencionales continúan siendo el pilar diagnóstico de los programas, el uso de test rápidos ultrasensibles, test moleculares con amplificación isotérmica, microscopía en sangre concentrada mediante campos magnéticos y la detección de cristales de hemozoína con dispositivos portátiles son métodos nuevos que permitirán mejorar y facilitar en el futuro los sistemas de detección del parásito.

Referencias Bibliográficas

1. World Health Organization. World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges. 2020.
2. Tanner M, Greenwood B, Whitty CJ, Ansah EK, Price RN, Dondorp AM, et al. Malaria eradication and elimination: views on how to translate a vision into reality. *BMC medicine* 4. 2015;13(1):167.
3. Feachem RG, Chen I, Akbari O, Bertozzi-Villa A, Bhatt S, Binka F, et al. Malaria eradication within a generation: ambitious, achievable, and necessary. *The Lancet* 2019;394(10203):1056-1112.
4. Cuadros J, Martin-Ran P, Merino FJ, Delgado-Irribarren A, Garcia-Bujalance S, Rubio JM. Malaria diagnosis by NOW ICT and expert microscopy in comparison with multiplex polymerase chain reaction in febrile returned travellers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007 September 01;26(9):671-673.
5. Cuadros J, Ramírez AM, González IJ, Ding XC, Tanoira RP, Rojo-Marcos G, et al. LAMP kit for diagnosis of non-falciparum malaria in *Plasmodium ovale* infected patients. *Malaria journal* 2017;16(1):1-5.
6. Cuadros J, Perez-Tanoira R, Prieto-Perez L, Martin-Martin I, Berzosa P, Gonzalez V, et al. Field Evaluation of Malaria Microscopy, Rapid Malaria Tests and Loop-Mediated Isothermal Amplification in a Rural Hospital in South Western Ethiopia. *PLoS One* 2015 November 10;10(11):e0142842.
7. Ledermann DW. Laveran, Marchiafava and paludism. *Rev Chilena Infectol* 2008 June 01;25(3):216-221.
8. Zimmerman PA, Howes RE. Malaria diagnosis for malaria elimination. *Curr Opin Infect Dis* 2015;28(5):446-454.
9. Karl S, David M, Moore L, Grimberg BT, Michon P, Mueller I, et al. Enhanced detection of gametocytes by magnetic deposition microscopy predicts higher potential for *Plasmodium falciparum* transmission. *Malaria journal* 2008;7(1):66.
10. Zimmerman PA, Thomson JM, Fujioka H, Collins WE, Zborowski M. Diagnosis of malaria by magnetic deposition microscopy. *Am J Trop Med Hyg* 2006;74(4):568-572.
11. Ahmad A, Verma AK, Krishna S, Sharma A, Singh N, Bharti PK. *Plasmodium falciparum* glutamate dehydrogenase is genetically conserved across eight malaria endemic states of India: Exploring new avenues of malaria elimination. *PloS one* 2019;14(6):e0218210.
12. Krampa FD, Aniweh Y, Kanyong P, Awandare GA. Recent Advances in the Development of Biosensors for Malaria Diagnosis. *Sensors* 2020;20(3):799.

13. Okell LC, Ghani AC, Lyons E, Drakeley CJ. Submicroscopic infection in *Plasmodium falciparum*-endemic populations: a systematic review and meta-analysis. *J Infect Dis* 2009;200(10):1509-1517.
14. Shekalaghe SA, Teun Bousema J, Kunei KK, Lushino P, Masokoto A, Wolters LR, et al. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage is common in an area of low and seasonal transmission in Tanzania. *Tropical Medicine & International Health* 2007;12(4):547-553.
15. Kobayashi T, Kanyangarara M, Laban NM, Phiri M, Hamapumbu H, Searle KM, et al. Characteristics of subpatent malaria in a pre-elimination setting in Southern Zambia. *Am J Trop Med Hyg* 2019;100(2):280-286.
16. Okell L, Bousema JT, Griffin JT, Oueaogo AL, Ghani A, Keley C. Factors determining the occurrence of submicroscopic malaria infections and their relevance for control. *Nature communications* 2012;3(1):1237.
17. Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol* 1993;58(2):283-292.
18. Grossenbacher B, Holzschuh A, Hofmann NE, Omar KA, Stuck L, Fakih BS, et al. Molecular methods for tracking residual *Plasmodium falciparum* transmission in a close-to-elimination setting in Zanzibar. *Malaria Journal* 2020;19(1):1-12.
19. Karl S, David M, Moore L, Grimberg BT, Michon P, Mueller I, et al. Enhanced detection of gametocytes by magnetic deposition microscopy predicts higher potential for *Plasmodium falciparum* transmission. *Malaria journal* 2008;7(1):66.
20. Ley B, Thriemer K. A novel generation of hemozoin based malaria diagnostics show promising performance. *EClinicalMedicine* 2020;22.
21. Kumar R, Verma AK, Shrivastava S, Thota P, Singh MP, Rajasubramaniam S, et al. First successful field evaluation of new, one-minute haemozoin-based malaria diagnostic device. *EClinicalMedicine* 2020; 22:100347.



© 2021 por los autores; Esta obra está sujeta a la licencia de Reconocimiento 4.0 Internacional de Creative Commons. Para ver una copia de esta licencia, visite <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.