

Revisión Bibliográfica

Diagnóstico de malaria en un centro de referencia: Pasado, presente y futuro

Sandra Martín Ramírez^{1,2}, Carlota Muñoz García^{1,3}, Marta Lanza^{1,4}, Lourdes Barón Argos^{1,5}, Alejandra Jimenez Mejias^{1,6}, Jose M. Rubio^{1,*}

¹ Laboratorio de Malaria y Protozoos Emergentes. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Madrid, Spain

² <https://orcid.org/0000-0002-1132-2211>

³ <https://orcid.org/0000-0002-6505-0434>

⁴ <https://orcid.org/0000-0002-4801-6891>

⁵ <https://orcid.org/0000-0002-0943-1494>

⁶ <https://orcid.org/0000-0001-6358-868X>

* Autor correspondencia: jmrubio@isciii.es; ORCID id: <https://orcid.org/0000-0002-1903-6711>

DOI: <https://doi.org/10.37536/RIECS.2021.6.S1.245>

Resumen: La principal estrategia para el control de la malaria, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), es un diagnóstico rápido y adecuado seguido de un tratamiento efectivo. Los laboratorios de referencia de microbiología tienen entre sus funciones el desarrollo y validación de nuevas metodologías diagnósticas para ayudar al control y erradicación de la malaria en el mundo y en nuestro caso para evitar la reintroducción en nuestro país. En este trabajo se hace una revisión de los métodos más extendidos para el diagnóstico de malaria: i) métodos clásicos, como son la microscopía y los test de diagnóstico rápido, ii) métodos moleculares, como PCR y LAMP, y, iii) por último, los nuevos avances en microscopía automática e inteligencia artificial.

Palabras Clave: Diagnóstico microscópico, Diagnóstico molecular, PCR, LAMP, Microscopía automática.

Abstract: The main strategy for malaria control, according to the World Health Organization (WHO), is a rapid and adequate diagnosis followed by effective treatment. The microbiology reference laboratories have among their functions the development and validation of new diagnostic methodologies to help control and eradicate malaria in the world and in our case to avoid its reintroduction in our country. In this work a review of the most widespread methods for malaria diagnosis is made: i) classical methods, such as microscopy and rapid diagnostic tests, ii) molecular methods, such as PCR and LAMP, and, iii) finally, the new advances in automatic microscopy and artificial intelligence.

Key words: Microscopic diagnosis, Molecular diagnosis, PCR, LAMP, Automatic microscopy.

1. Introducción

El diagnóstico de las parasitosis en general, y de malaria en particular, puede ser complicado, especialmente en zonas donde estas parasitosis, o nunca fueron endémicas, o hace años que no lo son [1]. La principal estrategia para el control de la malaria, según la OMS, es un diagnóstico rápido y adecuado seguido de un tratamiento efectivo.

Los laboratorios de referencia de microbiología son fundamentales para desarrollar servicios de microbiología clínica y de salud pública de alta calidad y son la base para el control y erradicación de esta y otras dolencias. Estos laboratorios, según el CDC europeo, se apoyan en cinco pilares o

funciones básicas; i) Realizar un diagnóstico avanzado de referencia; ii) Dotar de materiales de referencia a otros laboratorios; iii) Asesoramiento científico; iv) Colaboración e investigación, y v) Realizar la vigilancia, alerta y respuesta [2]. Dentro del diagnóstico, la misión del laboratorio de referencia es contar con métodos de laboratorio validados y la capacidad de ofrecer una confirmación diagnóstica de los resultados, y por otro lado tener la capacidad de desarrollo y validación de nuevas metodologías que puedan apoyar el control de la enfermedad.

Es en este punto donde se va a focalizar este trabajo con cierta perspectiva histórica, desde la visión del Laboratorio de Malaria y Protozoos Emergentes (MaPELab) que actúa “*de facto*” como laboratorio de referencia de malaria en el territorio español, aunque sin olvidar los métodos utilizados en los laboratorios de acción primaria, y tiene entre sus funciones el desarrollo y validación de nuevas metodologías diagnósticas para ayudar al control y erradicación de la malaria en el mundo y para evitar la reintroducción de la malaria en nuestro país.

2. Diagnóstico clásico de malaria

El diagnóstico clínico o primario de malaria se basa en los signos y síntomas que presenta el paciente y en el examen físico realizado por el médico [3]. Los primeros síntomas de malaria son inespecíficos y variables, incluyendo fiebre, dolor de cabeza, mialgias, escalofríos, mareo, dolor abdominal, náuseas, vómitos, anorexia y prurito [4]. Debido a esta inespecificidad, que hace que haya un solapamiento con otras enfermedades que presentan síntomas semejantes, el diagnóstico presuntivo de malaria debe ser confirmado mediante pruebas de laboratorio para evitar diagnósticos erróneos que ocasionan tratamientos innecesarios y que favorecen la aparición de resistencias [5].

Los métodos que se usan tradicionalmente para el diagnóstico de malaria son el examen microscópico de sangre por gota gruesa, considerado como el método de referencia o *gold standard*, y por extensión fina, y más recientemente los test de detección de antígeno, más conocidos como test de diagnóstico rápido (TDRs), y aunque su sensibilidad es bastante limitada, son los métodos de elección para el diagnóstico primario de la enfermedad [3,6].

2.1. Diagnóstico microscópico

En la detección de parásitos de *Plasmodium spp.* mediante microscopía convencional la sangre se puede preparar de dos maneras distintas para su observación en el microscopio: la gota gruesa y la extensión fina. En ambos tipos de preparaciones, una gota de sangre es colocada sobre un portaobjetos y posteriormente teñida, generalmente con colorante Giemsa. La diferencia entre ambas radica en que en la primera la gota de sangre se extiende hasta obtener un círculo de 1,5 a 2 cm de diámetro que contiene entre 20 y 30 capas de células, mientras que en la segunda se lleva a cabo la extensión de la sangre en una monocapa de células [7].

El examen microscópico de la gota gruesa de sangre teñida con Giemsa está considerada como la técnica de referencia diagnóstica, puesto que proporciona mayor sensibilidad que la extensión fina, ya que los eritrocitos se lisan y se observan los trofozoítos, gametocitos o esquizontes intactos, examinándose mayor volumen de sangre en una única lámina, además permite evaluar el estadio de los parásitos circulantes y determinar la parasitemia y la respuesta al tratamiento pero solo a microscopistas altamente cualificados [8]. El examen microscópico de la extensión de sangre, aunque menos sensible que la gota gruesa, permite diferenciar con mayor facilidad la especie o especies implicadas en la infección. Existen algunos hallazgos específicos que permiten diferenciar las especies, por ejemplo, la presencia de trofozoítos en banda es característico de *P. malariae* o la presencia de anillos múltiples dentro de un eritrocito suele ser característico de *P. falciparum*. Sin embargo, la identificación de especie no es fácil y tiene cierto componente subjetivo por parte del observador, como ejemplo las identificaciones erróneas de casos de *P. vivax* en población negra en África occidental, que solo fueron demostradas por primera vez mediante técnicas de diagnóstico molecular en nuestro laboratorio [9]. En el caso de infecciones zoonóticas el diagnóstico se complica más, por ejemplo *P. cynomolgi* es indistinguible de *P. vivax* [10] o *P. brasiliensis* de *P. malariae*. Pero el caso más significativo por su importancia clínica es en el diagnóstico de *P. knowlesi* que al compartir

características comunes con *P. falciparum*, *P. vivax* y *P. malariae* puede ser fácilmente confundido [11]. Para evaluar la eficiencia de la microscopía, Barber y col. [12] demostraron que frecuentemente *P. knowlesi* era confundido con *P. falciparum* y *P. vivax* en el diagnóstico e indistinguible de *P. malariae*. Observaron que solo el 72% de las PCR positivas para *P. knowlesi* podían ser identificadas correctamente en microscopía y el 30% de *P. vivax* era identificado erróneamente como *P. malariae*/*P. knowlesi* (Figura 1).

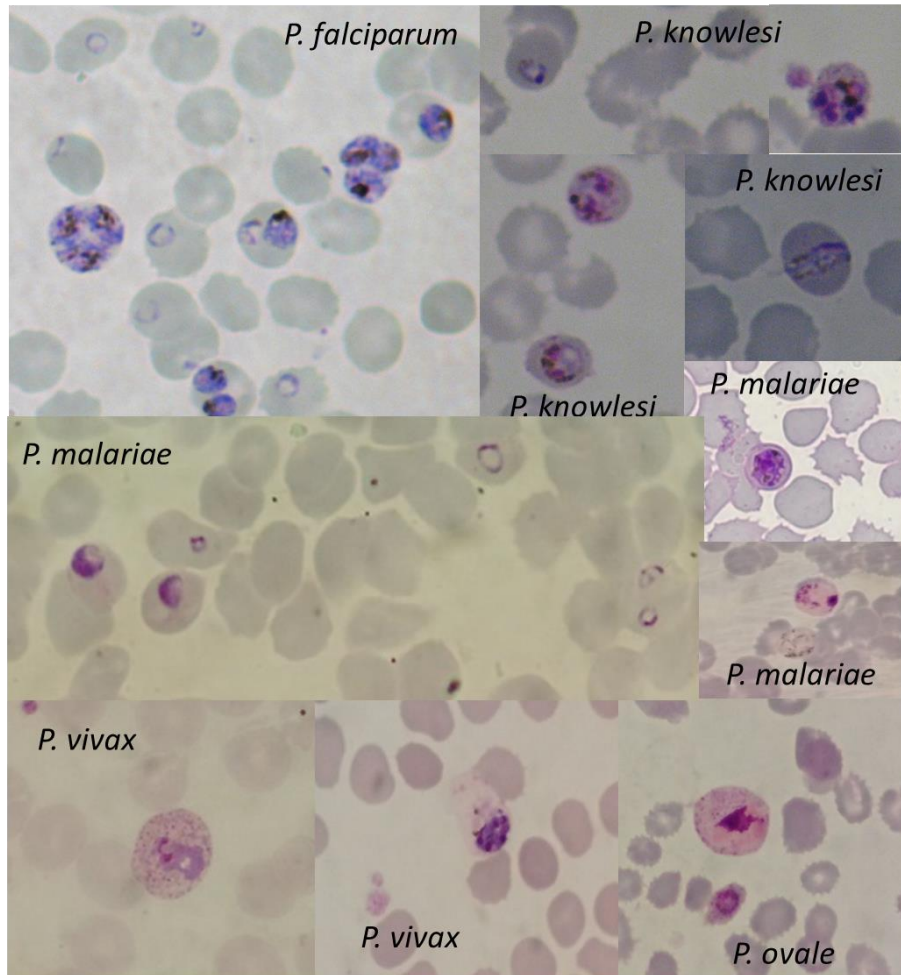


Figura 1 Imágenes microscópicas de las especies de *Plasmodium* que afectan al hombre

La identificación de la especie es muy importante para tomar decisiones terapéuticas, como en infecciones por *P. ovale* y *P. vivax* para añadir primaquina al tratamiento, o en infecciones por *P. falciparum* donde por su severidad se deben de tomar precauciones especiales o también para identificar casos de parasitación mixta [13].

Así pues, de manera general, el diagnóstico por microscopía óptica presenta algunas ventajas, como son una mayor disponibilidad en zonas con recursos limitados, un bajo coste, y la posibilidad de hacer un recuento parasitario y de cuantificar la aclaración de parásitos durante el seguimiento de la enfermedad [7, 14]. Sin embargo, la observación al microscopio de una única muestra de sangre es insuficiente para hacer un diagnóstico de malaria cuando el primer resultado es negativo, debido a la baja sensibilidad. Por ello, para descartar completamente la infección malárica se recomienda que se realicen extensiones de sangre cada 6 u 8 horas hasta tres días si la sospecha clínica es alta [13]. Aun así, la sensibilidad de la microscopía para el diagnóstico de malaria puede variar mucho, especialmente a bajas densidades parasitarias y dependiendo de la experiencia del microscopista [3, 6, 13].

En el laboratorio de referencia esta técnica se dejó de realizar de forma rutinaria a finales del siglo pasado con la implantación de nuevas técnicas y solo se realiza en casos especiales como descripciones morfológicas no comunes o extrañas, por parte de los microbiólogos.

2.2. Diagnóstico por detección de antígeno

Los test de diagnóstico rápido (TDRs) se basan en la utilización de anticuerpos mono o policlonales que detectan antígenos específicos de malaria en las muestras de sangre, gracias a la transformación colorimétrica de tiras de nitrocelulosa. Los principales TDRs comerciales se basan en la detección de uno o varios antígenos, siendo los más utilizados la proteína rica en histidina 2 específica de *P. falciparum* (PfHRP-2), la lactato deshidrogenasa específica de *P. falciparum* (PfLDH), la lactato deshidrogenasa específica de *P. vivax* (PvLDH), la lactato deshidrogenasa (*PspLDH*) y la aldolasa, específicas para todo el género *Plasmodium* [15].

Estos test se intentan implantar por la OMS como una alternativa a la microscopía en zonas que tienen pocos recursos, en la que los laboratorios no disponen de tecnología para realizar un diagnóstico exhaustivo de malaria y en las que esta enfermedad registra un gran número de casos diarios en la población [16].

Los TDRs son rápidos, sencillos y cada vez más económicos, además, su uso es cada vez más común [15]. No requieren un equipamiento especial ni tampoco experiencia previa para interpretar los resultados [6].

En los primeros años de la aparición de estos TDRs y debido a su rápida extensión por los laboratorios de microbiología de los hospitales, el MaPELab, dentro de las funciones como laboratorio de referencia, realizó varios estudios de validación de diferentes kits comerciales [17, 18]. Actualmente, la OMS junto con la Fundación para la Innovación de Nuevos Diagnósticos (FIND) llevan a cabo un programa de control de la calidad de estos TDRs disponibles comercialmente en varias rondas de evaluación siendo la última en 2016-2018 [19]. Sin embargo, a pesar de su utilidad y de los años de desarrollo, siguen existiendo muchas de las limitaciones importantes descritas en sus inicios. Entonces se consideró que la detección de infecciones causadas por otras especies de *Plasmodium* no-*falciparum* era muy baja, no caracterizando entre el 62 y el 83% de ellas dependiendo del test utilizado. Por otro lado, los test permanecían positivos más de diez días después del tratamiento en el 50% de los casos estudiados y, además, en casos de parasitemias por debajo de 100 parásitos/ μ l la detección de casos era mínima [17]. Actualmente, no han mejorado mucho los inconvenientes descritos hace 20 años. En primer lugar, no existen TDRs específicos para detectar *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi* por lo que es frecuente obtener resultados falsos negativos debido a la baja sensibilidad que presentan frente a estas especies [20]. Por otro lado, los TDRs no son útiles para monitorizar la respuesta al tratamiento, pues pueden permanecer positivos días después de la resolución de la infección [6]. Además, en los últimos años, se ha venido a añadir otro inconveniente al uso de estos test que es la aparición de cepas de *P. falciparum* con la delección del gen *PfHRP-2*, que recordemos es la diana principal para la identificación de *P. falciparum* de estos test [21, 22]. Así pues, su empleo en el diagnóstico primario siempre debe ser complementario a las técnicas microscópicas. A pesar de estos inconvenientes, estos métodos tienen sus ventajas, son rápidos, fáciles de usar, no necesitan equipamiento y su relación coste-efectividad es muy adecuada.



Figura 2 Resultados posibles con Test de Diagnóstico Rápido *Pf/Pan*. Marcados los resultados que se observan en cada caso

3. Diagnóstico molecular de malaria

El uso de pruebas basados en la amplificación de ácido nucleico tales como PCR y PCR de transcripción inversa, PCR a tiempo real o cuantitativas (qPCR) y más recientemente sistemas basados en amplificación isotérmica (LAMP: *Loop mediated isothermal amplification*), ha incrementado notablemente la sensibilidad analítica de los ensayos para muchos patógenos humanos, incluyendo la detección de los parásitos de la malaria. Sin embargo, entre los inconvenientes que presentan estos métodos en comparación con los TDRs y la microscopía convencional para el diagnóstico de malaria, se encuentra el mayor coste, el mayor tiempo en la obtención de los resultados y la dificultad de desarrollarlos a gran escala para su uso en el terreno. Es por eso que en general estos métodos se circunscriben a los laboratorios de referencia, aunque algunos han comenzado a dar el salto a los laboratorios de diagnóstico primario especialmente en países no endémicos como se comenta a continuación. Pero en un futuro próximo, en aquellos países que estén en proceso de erradicación o que ya hayan conseguido la certificación de “free malaria country” será necesario la implementación de estos métodos para detectar los casos de malaria asintomática y submicroscópica que pueden ser focos de transmisión.

3.1. Métodos basados en PCR

Las técnicas de PCR se basan en la amplificación de una secuencia de ADN determinada gracias al uso de oligonucleótidos (conocidos como cebadores), que se unen a la cadena de ADN en los extremos del fragmento que se quiere amplificar, y de una ADN polimerasa termoestable, que soporta los cambios de temperatura necesarios para que tenga lugar la hibridación y la desnaturalización de las hebras de ADN. En el caso de la malaria, diferentes trabajos han mostrado que la sensibilidad, en torno a 0,01 parásito/ μ l de sangre, es mayor que los métodos convencionales basados en microscopía o los métodos basados en detección de antígeno [6, 23]. Mejorando también la especificidad permitiendo una mejor caracterización de las especies, eliminando la subjetividad del observador, y mejorando igualmente la detección de infecciones mixtas en mayor proporción que otros métodos [1].

En los últimos 20 años, se han publicado más de 60 conjuntos de cebadores diferentes para la detección de *Plasmodium* por PCR. La diana más utilizada para la discriminación de especies de plasmodio es la subunidad pequeña del ADN ribosómico (SSU-rRNA o 18S), por presentar zonas variables y conservadas a lo largo de la secuencia nucleotídica del gen. Pero otras dianas como el ADN mitocondrial también son muy utilizadas [24].

Una de las más mencionadas en la literatura para el diagnóstico de malaria es la desarrollada por Snounou con diana en los genes de la subunidad pequeña del ARN ribosomal (SSU-rDNA) [25]. Esta PCR consistía en un primer ciclo de amplificación en el cual se utilizan cebadores específicos del género *Plasmodium*, para posteriormente utilizar una alícuota del producto amplificado en un segundo ciclo de amplificación, en el que cada una de las cuatro especies es detectada separadamente

utilizando cebadores específicos. Esta nested-PCR ha sufrido modificaciones con el tiempo, como la adición de una quinta reacción de amplificación específica de género y la adición de una sexta reacción de amplificación específica para *P. knowlesi* [26].

No obstante, uno de los inconvenientes que presenta esta PCR es la necesidad de llevar a cabo de 5 a 6 reacciones de amplificación independientes, con su posterior análisis por electroforesis; lo que supone una gran cantidad de reactivos y productos desechables, elevada mano de obra, mayor riesgo de contaminaciones cruzadas y aumento del coste.

Como solución a estos inconvenientes, se desarrolló una nested multiplex PCR (NM-PCR), cuyos cebadores tenían como diana los genes que codifican el SSU-rDNA [27]. Esta PCR consistía en dos procesos de amplificación múltiple: una primera reacción con cebadores específicos del género *Plasmodium* y de mamíferos (para incluir un control interno de reacción), y una segunda reacción de amplificación que usa el ADN amplificado en la primera reacción como molde y que contiene cebadores específicos para *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*. Esta NM-PCR ha sido modificada posteriormente para la detección de *P. knowlesi* [28] y, además, está comercializada en formato gel "ready to use", mostrando una elevada sensibilidad y especificidad [29]. Este método, ligeramente modificado, es el incorporado a finales del siglo pasado por MaPELab para el diagnóstico molecular de malaria [10].

En los últimos años, los nuevos métodos de PCR que se diseñan se basan en las técnicas de PCR a tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR), ya que presenta ciertas ventajas sobre la nested PCR, como son: 1) solo requieren de un proceso de amplificación; 2) se llevan a cabo en un sistema cerrado y no es necesario un análisis post-amplificación en geles de agarosa, y 3) permite la cuantificación de la carga parasitaria.

Los métodos de qPCR utilizan señales fluorescentes para monitorizar la formación de amplicones a lo largo de la reacción. Estos pueden estar basados en la detección mediante sondas específicas o mediante fluoróforos intercalantes como SYBR Green o EVA Green. Los métodos que utilizan SYBR Green o EVA Green carecen de especificidad, sin embargo, mediante el análisis de las curvas de desnaturalización es posible distinguir entre las diferentes especies de *Plasmodium* [30], pero son los métodos basados en cebadores y sondas específicas para las cinco especies de *Plasmodium* los más extendidos, al aumentar la especificidad [31]. Algunos de los métodos de qPCR se encuentran comercializados, como el RealStar® Malaria Screen&Type PCR kit 1.0 (Altona diagnostics). El laboratorio de referencia ha realizado una validación de este kit que demostró una muy buena sensibilidad y especificidad, equiparable a las obtenidas con el método de referencia, con un límite de detección entre 0,09 y 0,7 parásitos/ μ L, excepto para *P. ovale* que es ligeramente superior, igual que en el caso de las infecciones mixtas. En definitiva, este método demostró ser capaz de detectar parasitemias bajas e infecciones mixtas, incluyendo las infecciones causadas por tres especies de *Plasmodium*, siendo un método válido y que numerosos laboratorios de microbiología de hospitales están incorporando a sus carteras de servicio.

3.2. Métodos basados en amplificación isotérmica mediante LAMP

El método LAMP (LAMP: *Loop mediated isothermal amplification*) se describió por primera vez en el año 2000, como una técnica que amplifica el ADN con alta especificidad, eficiencia y rapidez bajo condiciones isotérmicas [32]. Este método emplea una Bst polimerasa y un conjunto de cuatro o seis cebadores especialmente diseñados [33]. En general, se produce una gran cantidad de ADN y de pirofosfato de magnesio, un subproducto generado como resultado de la combinación del ion pirofosfato, liberado de los desoxirribonucleótidostrifosfato (dNTPs), y el ion magnesio de la reacción. Al acumularse este compuesto se produce un aumento de la turbidez, indicando que ha tenido lugar la reacción de amplificación y, por lo tanto, un resultado positivo.

Se han descrito muchas ventajas asociadas al método LAMP. La principal ventaja es su posible aplicación en zonas endémicas pues es un método que no requiere un equipo específico, ni personal altamente especializado, además la enzima es más permisiva frente a los inhibidores, favoreciendo métodos de extracción de ADN rápidos y baratos y no necesita equipos especiales para la detección de los resultados [34].

Se han descrito diferentes métodos de detección visual, para mejorar la lectura visual de la turbidez, que puede ser subjetiva y requiere de cierta práctica para evaluar el resultado, entre ellos la inclusión de agentes fluorescentes o colorantes indicadores de pH. La lectura de la turbidez puede ser acoplada a dispositivos que proporcionan un resultado positivo o negativo de manera automática, disminuyendo la subjetividad en la interpretación de resultados [35].

El método LAMP, ha sido comercializado para el diagnóstico de diferentes patógenos, incluyendo los responsables de causar malaria en los humanos. Hasta la fecha existen varios kits comercializados y con marcado CE de Conformidad Europea. Eiken Chemical Co. tiene en el mercado un kit (LoopAMP™ Malaria Pan) para la detección de *Plasmodium spp.*, y otros dos para detectar *P. falciparum* y *P. vivax* individualmente (LoopAMP™ Malaria Pf y LoopAMP™ Malaria Pv). Meridian Bioscience™ ha comercializado los kits Alethia™ Malaria y Alethia™ Malaria Plus, para detectar *Plasmodium spp.* que se diferencian entre sí en el método de extracción de ADN, ya incluido en los kits. Estos métodos comercializados, requieren de un equipo de amplificación específico que, además, consta de un lector de turbidez para emitir un resultado positivo o negativo. No obstante, la necesidad de usar estos dispositivos específicos disminuye la versatilidad del método LAMP y su aplicabilidad a países en vías de desarrollo.

En el MaPELab la validación del kit Alethia™ Malaria frente a la NM-PCR mostró una sensibilidad y especificidad del 98,8% y del 94,7%, respectivamente; y el coeficiente kappa del 0,94, con un límite de detección de 0,075 parásitos/μl. Lamentablemente, a pesar de sus excelentes prestaciones, tiene el inconveniente de su coste y de necesitar equipos especiales para la realización y la detección del método.

En el laboratorio se optimizó una serie de métodos de LAMP para cada una de las cinco especies de plasmodio que afectan a los humanos y otro también para la detección del género, basado en cebadores previamente descritos [36, 37] y utilizando verde malaquita para una mejor visualización del resultado, reteniendo un color verde-azulado en las muestras positivas y observándose una pérdida total de color en las muestras negativas, una vez completado el tiempo de reacción (40 minutos). La validación de estos métodos mostró niveles de concordancia y reproducibilidad de más del 90% para todos ellos, con valores de especificidad entre el 95 y el 100% y con una sensibilidad algo menor entre 85,1 y el 100%, excepto para el ensayo de LAMP para *P. malariae* que fue notablemente inferior (47,4%). El laboratorio está trabajando en la mejora de este último LAMP y en el diseño de un multi-LAMP en formato liofilizado para que se pueda utilizar en zonas remotas sin necesidad de cadena de frío, necesaria para la Bst polimerasa, y equipos específicos como ocurre con los LAMP comerciales hasta el momento (Figura 3).

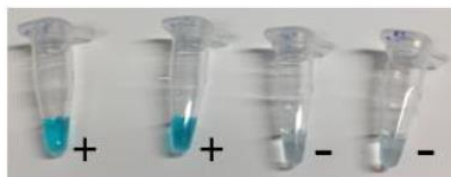


Figura 3 Tubos de reacción tras la amplificación mediante LAMP con verde malaquita. Las dos muestras de la izquierda retienen el color verde-azulado del verde malaquita (positivas) mientras que en las dos muestras de la derecha hay pérdida del color (negativas)

4. Inteligencia artificial y microscopía automática.

Las limitaciones inherentes a la microscopía tradicional han favorecido el desarrollo de técnicas de microscopía automática para la detección de malaria mediante dispositivos automáticos que combinan el análisis de imágenes y la inteligencia artificial. Los primeros desarrollos, algo rudimentarios, se basaban en el análisis de imágenes tomadas en el microscopio [38], con posterioridad se desarrolló un sistema automático, compuesto por un módulo de obtención de imágenes y otro del análisis de la misma, con el inconveniente que sólo era capaz de diferenciar *P. falciparum* de *P. vivax* [39]. Recientemente, Sight Diagnostics, diseñó un equipo complejo, disponible comercialmente, que incluía un dispositivo de microscopía automática y capaz de caracterizar la especie de plasmodio responsable de la infección y cuantificando la parasitemia (Figura 4). Este sistema se basa en teñir las muestras de sangre con colorantes fluorescentes y posteriormente escaneadas, analizándose tanto los glóbulos blancos, las plaquetas y los glóbulos rojos, como los estadios del parásito causante de malaria (trofozoítos, esquizontes y gametocitos). Estos datos son interpretados por un algoritmo para obtener un diagnóstico final que detecta, enumera e identifica las especies de *Plasmodium* con un límite de detección de 20 parásitos/ μ l [40].



Figura 4 Equipo de Sight diagnostics de microscopía automática

En el laboratorio de referencia se realizó una evaluación del equipo de manera prospectiva sobre 639 muestras. La concordancia frente al método de referencia fue del 87,8%, identificando correctamente un 84,3% (91/108) de las muestras de *P. falciparum* pero solo un 62,5% (10/16) de las infecciones de *P. vivax*. En términos de sensibilidad y especificidad, éstas fueron del 76,51% y 92,45%, respectivamente; con un coeficiente kappa de 0,69, estando éste por debajo de los niveles de aceptación para ser utilizado como método de diagnóstico. Además, el algoritmo solo identifica *P. falciparum* y *P. vivax*, en este caso sin diferenciarlo de *P. ovale*, y no distingue infecciones mixtas. Por último, el equipo pesa más de 50 Kg y tiene piezas sensibles que lo hacen poco útil en zonas endémicas.

En esta línea, el laboratorio trabaja en colaboración con una Start-Up española para desarrollar un sistema de diagnóstico de parásitos sanguíneos, entre ellos *Plasmodium*, basado en un adaptador, para usar el teléfono móvil como cámara en el microscopio, una app y un algoritmo de inteligencia artificial.

Este sistema tendrá la ventaja de utilizar microscopios sin características especiales, como los que se utilizan actualmente en las zonas endémicas, pero también la gran mayoría de los que se utilizan en cualquier hospital para ver los frotis de sangre. Este sistema permitirá trabajar sobre esos mismos frotis y dar una confirmación o un apoyo al diagnóstico realizado por el microscopista (Figura 5).

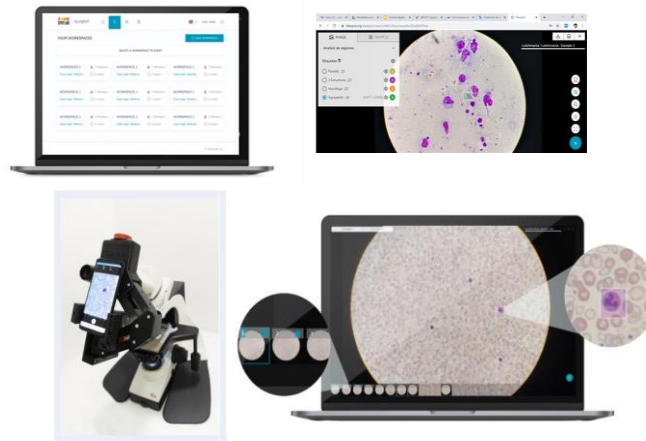


Figura 5 Tecnología de SpotLab. Plataforma web para digitalizar imágenes. Adaptador teléfono móvil-microscopio. Ejemplo de detección de región de interés mediante IA

5. El futuro ya está aquí

Numerosas nuevas líneas están abiertas para el diagnóstico de malaria usando citometría de flujo [41], microfluídica [42], microarrays [43] o en espectrometría de masas [44] y eso sin olvidar los nuevos desarrollos en RDT, qPCR o LAMP. Pero es posible que, gracias a la bajada de costes, el diagnóstico de malaria se haga, en un futuro próximo, mediante metagenómica, bien identificando las especies de *Plasmodium* [45] o bien en un diagnóstico diferencial más amplio, en principio en los centros de referencia, cubriendo en paralelo numerosas enfermedades infecciosas [46].

Los próximos avances en el diagnóstico de malaria realmente ya están aquí, pero la viabilidad de acercarlo del laboratorio de investigación a los laboratorios de los hospitales y a las zonas endémicas es más complicado. Es decir, por ahora la utilidad de estos desarrollos es reducida y su implantación dependerá de su capacidad para reducir costes, la dependencia de equipos con necesidades de verificación importantes y la mejoría económica de los países a los que vaya dirigido.

Comentario final

Es muy importante señalar que no se debe considerar que lo que expresan estas líneas es que haya métodos mejores o peores en el diagnóstico de malaria, la diferencia existe en la pregunta diagnóstica que se haga. Si queremos diagnosticar un caso clínico de malaria, la microscopía en cualquiera de sus formatos nos va a ser perfectamente útil, pero si queremos cribar una población para detectar casos asintomáticos, necesitaremos métodos más sensibles. En definitiva, lo importante no es el método sino la pregunta que queramos responder, y entonces, podremos escoger el método más apropiado considerando no solo la sensibilidad, sino el coste, la disponibilidad y las posibilidades técnicas.

Referencias Bibliográficas

1. Rubio JM, Benito A, Berzosa PJ, Roche J, Puente S, Subirats M, et al. Usefulness of seminested multiplex PCR in Surveillance of imported malaria in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37(10): 3260-3264. DOI: 10.1128/JCM.37.10.3260-3264.1999.
2. European Centre for Disease Prevention and Control. Core functions of microbiology reference laboratories for communicable diseases. Stockholm: ECDC. 2010. DOI: 10.2900/29017.
3. Tangpukdee N, Duangdee C, Wilairatana P, Krudsood S. Malaria Diagnosis: A brief review. *Korean J. Parasitol.* 2009; 47 (2): 93-102. DOI: 10.3347/kjp.2009.47.2.93.
4. Phillips MA, Burrows JN, Manyando C, van Huijsduijnen RH, Van Voorhis WC, Wells TNC. Malaria. *Nat. Rev. Dis. Primer.* 2017; 3 (17050). DOI: 10.1038/nrdp.2017.50.
5. World Health Organization. World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges. Geneva: World Health Organization; 2020.
6. Torrús D, Carranza C, Manuel Ramos J, Carlos Rodríguez J, Rubio JM, Subirats M, et al. Diagnóstico microbiológico de la malaria importada. *Enfermedades Infecc. Microbiol. Clínica.* 2015; 33: 40-46. DOI: 10.1016/S0213-005X(15)30014-8.
7. World Health Organization. Malaria Microscopy Quality Assurance Manual. Version 2. WHO Press, World Health Organization. Geneva, Switzerland. 2016. Disponible en: https://www.who.int/docs/default-source/documents/publications/gmp/malaria-microscopy-quality-assurance-manual.pdf?sfvrsn=dfe54d47_2.
8. Cañavate C CJ, Martínez Ruiz R, Martín-Rabadán P. El laboratorio de microbiología ante las enfermedades parasitarias importadas. *Procedimientos en Microbiología Clínica.* 2a ed. SEIMC; 2009.
9. Rubio JM, Benito A, Roche J, Berzosa P, García L, Mico M, et al. Semi-nested Multiplex PCR on detection of human malaria parasites and evidence of *Plasmodium vivax* infection in Equatorial Guinea (West Africa). *Am Jour Trop Med Hyg.* 1999; 60(2): 183-187. DOI: 10.4269/ajtmh.1999.60.183.
10. Ta TH, Hisam S, Lanza M, Jiram AI, Ismail N, Rubio JM. First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*. *Malar J.* 2014; 13 (68). DOI: 10.1186/1475-2875-13-68.
11. Ta TT, Salas A, Ali-Tammam M, Martínez MC, 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; 27 (219). DOI: 10.1186/1475-2875-9-219.
12. Barber BE, William T, Grigg MJ, Yeo TW, Anstey NM. Limitations of microscopy to differentiate *Plasmodium* species in a region co-endemic for *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi*. *Malar J.* 2013; 12 (8). DOI: 10.1186/1475-2875-12-8.
13. Muñoz J, Rojo-Marcos G, Ramírez-Olivencia G, Salas-Coronas J, Treviño B, Pérez Arellano JL, et al. Diagnosis and treatment of imported malaria in Spain: Recommendations from the Malaria Working Group of the Spanish Society of Tropical Medicine and International Health (SEM-TSI). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015; 33(6): 1-13. DOI: 10.1016/j.eimc.2013.12.014.
14. Murphy SC, Prescott WR, Stewart VA, Parikh S, Etter P, Shott JP. Malaria Diagnostics in Clinical Trials. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2013; 89(5), 824-839. DOI: 10.4269/ajtmh.12-0675.
15. Munkala AN, Kwan J, Lau R, Harris D, Kain D, Boggild AK. An Update on Malaria Rapid Diagnostic Tests. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 2018; 20 (49). DOI: 10.1007/S11908-018-0655-4.
16. Murray CK, Bennett JW. Rapid diagnosis of malaria. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2009; 415953. DOI: [10.1155/2009/415953](https://doi.org/10.1155/2009/415953).
17. Rubio JM, Buhigas I, Subirats M, Baquero M, Puente S, Benito A. Limited level of accuracy provided by available rapid diagnosis tests for malaria enhances the need for PCR-based reference laboratories. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39 (7): 2736-2737. DOI: [10.1128/JCM.39.7.2736-2737.2001](https://doi.org/10.1128/JCM.39.7.2736-2737.2001).
18. Cuadros J, Martín-Rabadán P, Merino FJ, Delgado-Iribarren A, García-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, 26(9): 671-673. DOI: [10.1007/s10096-007-0337-x](https://doi.org/10.1007/s10096-007-0337-x).
19. World Health Organization. Malaria rapid diagnostic test performance: results of WHO product testing of malaria RDTs: round 8 (2016-2018). Geneva: World Health Organization. 2018.
20. Charpentier E, Benichou E, Pagès A, Chauvin P, Fillaux J, Valentin A., et al. Performance evaluation of different strategies based on microscopy techniques, rapid diagnostic test and molecular loop-mediated

- isothermal amplification assay for the diagnosis of imported malaria. *Clinical Microbiology and Infection*. 2020; 26 (1): 115-121. DOI: 10.1016/J.CMI.2019.05.010.
21. Verma AK, Bharti PK, Das A. HRP-2 deletion: A hole in ship of malaria elimination. *The Lancet Infectious Diseases*. 2018; 18(8): 826-827. DOI: 10.1016/S1473-3099(18)30420-1.
 22. Agaba BB, Yeka A, Nsohya S, Arinaitwe E, Nankabirwa J, Opigo J, et al. Systematic review of the status of pfhpr2 and pfhpr3 gene deletion, approaches and methods used for its estimation and reporting in *Plasmodium falciparum* populations in Africa: review of published studies 2010-2019. *Malar J*. 2019; 18(1): 1-10. DOI 10.1186/s12936-019-2987-4.
 23. Berzosa P, de Lucio A, Romay-Barja M, Herrador Z, González V, García L, et al. Comparison of three diagnostic methods (microscopy, RDT, and PCR) for the detection of malaria parasites in representative samples from Equatorial Guinea. *Malar. J*. 2018; 17 (1): 1-12. DOI: 10.1186/s12936-018-2481-4.
 24. Rubio JM, Benito A. Malaria. En: Rodríguez E, Rubio JM y Alvar J, editores. *Diagnóstico de las enfermedades desatendidas: moléculas y trópico*. Madrid. España: Pigmalion; 2015. p 31-48.
 25. Snounou G, Viriyakosol S, Xin Ping Zhu, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol*. 1993; 61(2): 315-320. DOI: 10.1016/0166-6851(93)90077-B.
 26. Singh B, Sung LK, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J, et al. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *The Lancet*. 2004; 363: 1017-1024. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)15836-4.
 27. Rubio JM, Post RJ, Van Leeuwen WMD, Henry MC, Lindergard G, Hommel M. Alternative polymerase chain reaction method to identify *Plasmodium* species in human blood samples: The semi-nested multiplex malaria PCR (SnM-PCR). *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002; 96(SUPPL. 1): S199-S204. DOI: 10.1016/s0035-9203(02)90077-5.
 28. Miguel-Oteo M, Jiram AI, Ta-Tang TH, Lanza M, Hisam S, Rubio JM. Nested multiplex PCR for identification and detection of human *Plasmodium* species including *Plasmodium knowlesi*. *Asian Pac J Trop Med*. 2017; 10(3): 299-304. DOI: 10.1016/j.apjtm.2017.03.014.
 29. Iglesias N, Subirats M, Trevisi P, Ramírez-Olivencia G, Castán P, Puente S, et al. Performance of a new gelled nested PCR test for the diagnosis of imported malaria: Comparison with microscopy, rapid diagnostic test, and real-time PCR. *Parasitol Res*. 2014; 113: 2587-2591. DOI: 10.1007/s00436-014-3911-z.
 30. Tajebe A, Magoma G, Aemero M, Kimani F. Detection of mixed infection level of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* by SYBR Green I-based real-Time PCR in North Gondar, north-west Ethiopia. *Malar J*. 2014; 13(411): 1-8. DOI: 10.1186/1475-2875-13-411.
 31. Reller ME, Chen WH, Dalton J, Lichay MA, Dumler JS. Multiplex 5' nuclease quantitative real-time PCR for clinical diagnosis of malaria and species-level identification and epidemiologic evaluation of malaria-causing parasites, including *Plasmodium knowlesi*. *J Clin Microbiol*. 2013; 51(9): 2931-2938. DOI: 10.1128/JCM.00958-13.
 32. Notomi T, Okayami H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000; 28(12): 63. DOI: 10.1093/nar/28.12.e63.
 33. Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat. Protoc*. 2008; 3: 877-882. DOI: 10.1038/nprot.2008.57.
 34. Lucchi NW, Ndiaye D, Britton S, Udhayakumar V. Expanding the malaria molecular diagnostic options: opportunities and challenges for loop-mediated isothermal amplification tests for malaria control and elimination. *Expert Rev. Mol. Diagn*. 2018; 18 (2): 195-203. DOI: 10.1080/14737159.2018.1431529.
 35. Cuadros J, Martín Ramírez A, González IJ, Ding XC, Perez Tanoira R, Rojo-Marcos G, et al. LAMP kit for diagnosis of non-falciparum malaria in *Plasmodium ovale* infected patients. *Malar. J*. 2017; 16 (20). DOI: 10.1186/s12936-016-1669-8.
 36. Han ET, Watanabe R, Sattabongkot J, Khuntirat B, Sirichaisinthop J, Iriko H, et al. Detection of Four *Plasmodium* Species by Genus- and Species-Specific Loop-Mediated Isothermal Amplification for Clinical Diagnosis. *J. Clin. Microbiol*. 2007; 45: 2521-2528. DOI: 10.1128/JCM.02117-06.
 37. Lau YL, Lai MY, Fong MY, Jelip J, Mahmud R. Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Identification of Five Human *Plasmodium* Species in Malaysia. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2016; 94 (2): 336-339. DOI: 10.4269/ajtmh.15-0569.

38. Díaz G, González FA, Romero E. A semi-automatic method for quantification and classification of erythrocytes infected with malaria parasites in microscopic images. *J. Biomed. Inform.* 2009; 42 (2): 296–307. DOI: [10.1016/j.jbi.2008.11.005](https://doi.org/10.1016/j.jbi.2008.11.005).
39. Kaewkamnerd S, Uthaiyibull C, Intarapanich A, Pannarut M, Chaotheing S, Tongsimma S. An automatic device for detection and classification of malaria parasite species in thick blood film. *BMC Bioinformatics.* 2012; 13 (S18). DOI: [10.1186/1471-2105-13-S17-S18](https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-S17-S18).
40. Eshel Y, Houry-Yafin A, Benkuzari H, Lezmy N, Soni M, Charles M, et al. Evaluation of the Parasight Platform for Malaria Diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 2017; 55: 768–775. DOI: [10.1128/JCM.02155-16](https://doi.org/10.1128/JCM.02155-16).
41. Dumas C, Tirard-Collet P, Mestrallet F, Girard S, Jallades L, Picot S, et al. Flagging performance of Sysmex XN-10 haematology analyser for malaria detection. *J Clin Pathol.* 2020; 73 (10): 676-677. DOI: [10.1136/jclinpath-2019-206382](https://doi.org/10.1136/jclinpath-2019-206382).
42. Choi J, Cho SJ, Kim YT, Shin H. Development of a film-based immunochromatographic microfluidic device for malaria diagnosis. *Biomed Microdevices.* 2019; 21(86). DOI: [10.1007/s10544-019-0431-8](https://doi.org/10.1007/s10544-019-0431-8).
43. Ido Y, Hashimoto M, Yatsushiro S, Tanaka M, Yokota K, Kajimoto K, Kataoka M. Loop-Mediated Isothermal Amplification In Microchambers On A Cell Microarray Chip For Identification of *Plasmodium* Species. *J Parasitol.* 2019; 105 (1): 69-74. DOI: [10.1645/18-107](https://doi.org/10.1645/18-107).
44. Mu J, Yu LL, Wellems TE. Sensitive Immunoassay Detection of *Plasmodium* Lactate Dehydrogenase by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021; 10 (620419). DOI: [10.3389/fcimb.2020.620419](https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.620419).
45. Lalremruata A, Jeyaraj S, Engleitner T, Joanny F, Lang A, Béliard S, et al. Species and genotype diversity of *Plasmodium* in malaria patients from Gabon analysed by next generation sequencing. *Malar J.* 2017; 16(398). DOI: [10.1186/s12936-017-2044-0](https://doi.org/10.1186/s12936-017-2044-0).
46. Pallen MJ. Diagnostic metagenomics: potential applications to bacterial, viral and parasitic infections. *Parasitology.* 2014; 141 (14): 1856-1862. DOI: [10.1017/S0031182014000134](https://doi.org/10.1017/S0031182014000134).



© 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/>.