

**Títol del treball:** Desenvolupament d'una base de dades d'imatges microscòpiques per millorar el diagnòstic de malària mitjançant aplicacions digitals mòbils

---

Estudiant: Aroa Silgado Giménez

Grau en Biologia

Correu electrònic: aroasilgado@gmail.com

Tutor: Mercè Figueras

Cotutor\*: Mateu Espasa Soley

Empresa / Institució: VALL HEBRON INSTITUT DE RECERCA – MICROBIOLOGIA

Vistiplau tutor (i cotutor\*):

Nom del tutor: Mercè Figueras

Nom del cotutor\*: Mateu Espasa Soley

Empresa / institució: Vall Hebron Institut de Recerca –  
microbiologia

Correu(s) electrònic(s): [mespasa@vhebron.net](mailto:mespasa@vhebron.net)

[merce.figueras@udg.edu](mailto:merce.figueras@udg.edu)

\*si hi ha un cotutor assignat

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació:

## RESUM

La malària és un problema de salut global, on gairebé la meitat de la població mundial es troba en risc d'infecció, i al 2015 va causar 500.000 morts. És una malaltia que presenta una distribució mundial, tot concentrant-se en aquelles zones en vies de desenvolupament. Un dels Objectius de Desenvolupament Sostenible establerts per la OMS<sup>a</sup> per al 2030 és eradicar aquesta malaltia. Així, una prevenció i un control de la transmissió són les claus per tal d'aconseguir-ho. Això pot ser possible si hi ha un diagnòstic acurat i ràpid, per tal d'establir, posteriorment, el tractament més adequat.

Tot i les diverses eines de diagnòstic desenvolupades en els últims anys, la microscòpia òptica segueix sent la eina per excel·lència en el diagnòstic de malària. Té una elevada sensibilitat i especificitat si és realitzada per un personal expert i entrenat. No obstant, a les zones endèmiques de la malaltia, la majoria de tècnics dels centres de salut no es troben familiaritzats amb la malària, o no presenten una experiència elevada. Per això, un sistema de diagnòstic automàtic, que es basi en la microscòpia però que no calgui la presència d'un personal expert, és una bona solució per aquestes zones, i permet contribuir en el control de la malaltia i la seva transmissió.

Aquest diagnòstic automàtic es basa en el desenvolupament d'una aplicació mòbil. Per tal de desenvolupar aquest sistema cal una base de dades d'imatges extensa per tal d'*entrenar* el software de l'aplicació, i així disminuir els falsos positius i negatius que es poden donar degut a altres formes molt semblants als paràsits. Les imatges s'han extret a partir de mostres sanguínies preparades en extensió i tenyides amb Giemsa. Un total de 62 mostres de les 4 espècies causants de la malària en humans han sigut examinades per tal d'obtenir les imatges corresponents.

S'han obtingut 1714 imatges, entre imatges positives (1328) i negatives (386). El major número d'imatges s'ha obtingut de l'espècie *Plasmodium falciparum* donada la importància en la malaltia. Els primers resultats de l'aplicació són esperançadors, atès que s'ha aconseguit detectar un 80% dels paràsits examinats.

D'aquesta manera, un diagnòstic automàtic permet establir un diagnòstic ràpid, i acurat, i a més, a un cost més baix que no pas les tècniques actuals de detecció ràpida: una baixada de 5 a 9 € front els 30 € dels tests de detecció ràpida.

---

<sup>a</sup>Organització Mundial de la Salut

## RESUMEN

La malaria es un problema de salud global, donde casi la mitad de la población mundial se encuentra en riesgo de infección, y en 2015 causó 500.000 muertos. Es una enfermedad que presenta una distribución mundial, concentrándose en aquellas zonas en vías de desarrollo. Uno de los Objetivos de Desarrollo Sostenible establecidos por la OMS<sup>b</sup> para el 2030 es erradicar esta enfermedad. Así, una prevención y un control de la transmisión son las claves para conseguirlo. Esto puede ser posible si hay un diagnóstico cuidadoso y rápido, para establecer, posteriormente, el tratamiento más adecuado.

A pesar de las diversas herramientas de diagnóstico desarrolladas en los últimos años, la microscopia óptica sigue siendo la herramienta por excelencia en el diagnóstico de malaria. Tiene una elevada sensibilidad y especificidad si se realiza por un personal experto y entrenado. No obstante, en las zonas endémicas de la enfermedad, la mayoría de técnicos de los centros de salud no se encuentran familiarizados con la malaria, o no presentan una experiencia elevada. Por eso, un sistema de diagnóstico automático, que se base en la microscopía pero que no haga falta la presencia de un personal experto, es una buena solución para estas zonas, y permite contribuir en el control de la enfermedad y su transmisión.

Este diagnóstico automático se basa en el desarrollo de una aplicación móvil. Para el desarrollo de este sistema se necesita de una base de datos de imágenes extensa para *entrenar* el software de la aplicación, y así disminuir los falsos positivos y negativos que se pueden producir debido a otras formas muy parecidas a los parásitos. Las imágenes se han extraído a partir de muestras sanguíneas preparadas en extensión y teñidas con Giemsa. Un total de 62 muestras de las 4 especies causantes de la malaria en humanos han sido examinadas para obtener las imágenes correspondientes.

Se han obtenido 1714 imágenes, entre imágenes positivas (1328) y negativas (386). El mayor número de imágenes se han obtenido de la especie *Plasmodium falciparum* debido a su importancia en la enfermedad. Los primeros resultados de la aplicación son esperanzadores, dado que se ha conseguido detectar un 80% de los parásitos examinados.

De este modo, un diagnóstico automático permite establecer un diagnóstico rápido, y cuidadoso, y además, a un coste más bajo que las técnicas de detección rápida: una bajada de 5 a 9 € frente los 30 € de los test de detección rápida.

---

<sup>b</sup> Organización Mundial de la Salud

## ABSTRACT

Malaria is a worldwide health problem, where almost half of the world's population is at risk of infection, and in 2015 it caused 500.000 deaths. This disease is has a global distribution, but mainly found in developing areas. One of the Sustainable Development Goals established by the WHO<sup>c</sup> for 2030 is to eradicate this disease. Thus, prevention and transmission control are the keys to getting it. This may be possible if there is a thorough and rapid diagnosis to establish the most appropriate treatment.

Despite the new diagnosis tools developed in recent years, optical microscopy remains the tool for excellence in the diagnosis of malaria. It has a high sensitivity and specificity if it is performed by a skilled and trained microscopist. Nevertheless, in endemic areas of the disease, most technicians of health centers are not familiarized with malaria parasites or do not have a high experience. Therefore, an automatic diagnostic system, which is based on microscopy but does not require the presence of an expert technician, is a good solution for these areas and it can help to control the disease and its transmission.

This automatic diagnosis is based on the development of a mobile application. For this, it needs an extensive database of images to train the application software and thus reduce false positives and negatives that may occur due to other forms similar to parasites. The images have been obtained from blood samples stained with Giemsa. In total 62 samples of the four species causing human malaria were examined to get the corresponding image.

1714 images were obtained between positive (1328) and negative (386). Most of the images obtained correspond to the specie *Plasmodium falciparum* because of its relevance in the disease. The first results of the application are encouraging because it is able to detect 80% of the parasites examined.

In conclusion, an automatic diagnosis allows rapid and careful diagnosis, and also lower cost than current and rapid detection techniques: a drop of 5 to 9 € versus 30 € for the rapid screening test.

---

<sup>c</sup> World Health Organization

## **AGRAÏMENTS**

*Primerament, agrair a l'equip Vall Hebron-UPC-UFRPE per l'oportunitat de formar part en la realització d'aquest projecte.*

*Especialment, a M. Espasa i F. Zarzuela pel temps dedicat en la meva formació, així com a tots els components de l'equip del laboratori.*

*I finalment a la família, pel recolzament des del principi fins al final.*

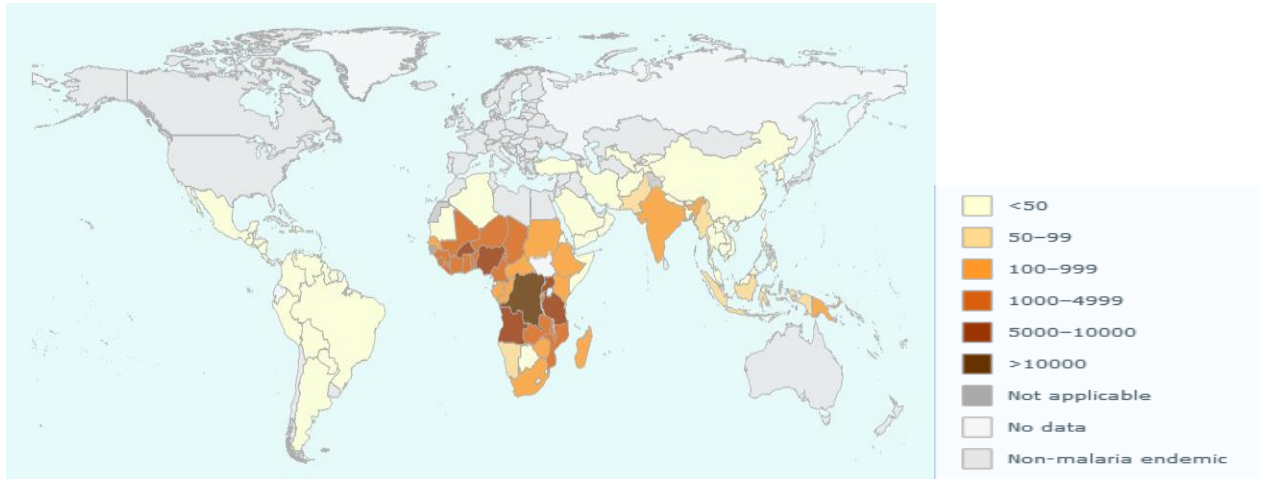
## ÍNDIX

<b>1. INTRODUCCIÓ</b> .....	7
<b>1.1. LA MALALTIA</b> .....	7
<b>1.2. DIAGNÒSTIC</b> .....	11
<b>1.3. REPTES I EXEMPLES REALS</b> .....	15
<b>1.4. CONTEXT DEL TREBALL</b> .....	15
<b>1.5. PROPOSTA I ACTIVITATS</b> .....	16
<b>2. OBJECTIVES</b> .....	17
<b>3. MATERIAL I MÈTODES</b> .....	17
<b>3.1. BASE DE DADES</b> .....	17
<b>3.2. CAPTACIÓ D'IMATGES</b> .....	18
<b>3.3. IDENTIFICACIÓ</b> .....	18
<b>3.4. DIGITALITZACIÓ D'IMATGES</b> .....	19
<b>4. RESULTATS</b> .....	19
<b>4.1. IMATGES</b> .....	19
<b>4.2. APLICATIU</b> .....	21
<b>5. DISCUSSIÓ</b> .....	22
<b>6. CONCLUSIONS</b> .....	25
<b>7. ÈTICA I SOSTENIBILITAT</b> .....	25
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	26

# 1. INTRODUCCIÓ

## 1.1. LA MALALTIA

La malària, o paludisme, és un important problema de salut global, causant d'entre 200 milions d'infeccions i ocasionant la mort a gairebé 500.000 persones al 2015<sup>1</sup> (**figura 1**). Cal remarcar que l'Àfrica subsahariana és la regió que més pateix la malaltia, atès que en 2015, es van registrar el 88% dels casos i un 90% de les morts<sup>1</sup>.



**Figura 1:** nombre de morts per països reportades l'any 2014. S'observa que l'Àfrica subsahariana és la zona més afectada per paludisme, sent la República Democràtica del Congo el país on més morts van ser enregistrades (més de 10.000). Font: OMS

Des de l'any 2000 fins al 2015 hi ha hagut una important reducció de la taxa de mortalitat per paludisme a nivell mundial: un 58% de morts menys per cada 100.000 persones en risc<sup>2</sup>. Així doncs, un major finançament i un augment dels esforços contra la malària han aconseguir evitar 6.2 milions de morts entre aquest període<sup>2</sup>.

Tot i així, encara hi ha milions de persones en risc de contraure la malaltia, i aquestes no tenen un accés a tècniques de diagnòstic per paludisme, així com a tractaments antimalàrics.

D'aquesta manera, s'ha fixat l'objectiu d'eradicar la malària, entre altres malalties infeccioses, l'any 2030, plasmat en els Objectius de Desenvolupament Sostenible.

El paludisme es tracta d'una malaltia parasitària causada per paràsits del gènere *Plasmodium*, que es transmeten per la picadura d'un mosquit femella del gènere *Anopheles* infectat, el qual és el vector<sup>3</sup>. Cal esmentar que també es coneix la transmissió a través de xeringues contaminades, transfusions sanguínies i per via transplacentària<sup>4</sup>. La infecció per *Plasmodium* en l'organisme humà resulta en una reproducció, primerament, dels paràsits a les cèl·lules parenquimatoses del fetge i, seguidament, una infecció dels eritròcits<sup>3</sup>.

Els paràsits del gènere *Plasmodium* pertanyen al fílum *Apicomplexa* i són protozous intracel·lulars<sup>5</sup>. Aquest gènere compren més de 100 espècies, però només quatre de les quals són responsables de causar paludisme en humans: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* i *P. malariae*<sup>6</sup>. *P. vivax* i *P. falciparum* produeixen el 95% dels casos, sent així

les espècies més perilloses<sup>6,7</sup>. Recentment, però, hi ha una espècie que causa paludisme en simis, *P. knowlesi*, que també és considerada causant d'infeccions naturals en humans<sup>8</sup>. No va ser fins el 1880 que es va fer la primera identificació de l'agent causant<sup>9</sup>, tot i ser una malaltia que ha estat present en la humanitat durant segles<sup>3</sup>.

Totes les espècies de *Plasmodium* tenen un àmplia distribució mundial<sup>7</sup>: *P. falciparum* es troba distribuït pel sud-est Asiàtic, Sud-Amèrica i Oceania i les zones tropicals i subtropicals d'Àfrica; *P. vivax* és el més freqüent en les zones temperades; *P. ovale* a l'Àfrica tropical; i *P. malariae* també a l'Àfrica tropical, Sri-Lanka i Índia<sup>4</sup>.

Així, el paludisme és endèmic en aquelles zones on es manté una transmissió constant. Aquesta depèn tant de persones infectades portadores de gametòcits, com la presència d'espècies adequades del mosquit *Anopheles*<sup>9</sup>. Això últim és interessant perquè de 400 espècies d'*Anopheles*, només 30 d'elles són vectors importants del paludisme.

### **Cicle biològic de *Plasmodium spp.***

Els paràsits causants del paludisme porten a terme dos etapes en el seu cicle de vida, ben diferenciades: una etapa asexual (o esquizogònia) a l'ésser humà, la qual comprèn una fase extraeritrocítica i una eritrocítica, i una etapa sexual (o esporogonia) que té lloc al mosquit<sup>5,6</sup> (**figura 2**).

- Fase extraeritrocítica

La malària es contrau per la picadura d'una femella infectada del mosquit *Anopheles* que inocula esporozoïts. Aquests es distribueixen pel torrent sanguini fins arribar a les cèl·lules del parènquima hepàtic en uns 30 minuts després de la picadura<sup>5</sup>. Un cop aquí, es multipliquen per esquizogònia, donant lloc a un esquizont hepàtic, el qual al cap de 8 o 12 dies després es trenca i allibera merozoïts al torrent sanguini<sup>5</sup>. En el cas de les infeccions per *P. vivax* i *P. ovale*, alguns dels merozoïts tornen a infectar als hepatòcits, on es multipliquen lentament, iniciant així un altre cicle exoeritrocític, quedant en forma d'hipnozoïts (estat latent), el qual pot durar mesos, o fins i tot anys<sup>6</sup>.

En aquesta fase, el pacient roman asimptomàtic<sup>7</sup>.

- Fase eritrocítica

Els merozoïts alliberats al torrent sanguini penetren en els eritròcits per endocitosi<sup>6</sup>, donant lloc als símptomes clínics de la malaltia<sup>7</sup>. Aquest procés d'invasió dels eritròcits està determinat per diversos factors, resultant en que *P. vivax* i *P. ovale* infecten només els eritròcits joves, mentre que *P. falciparum* i *P. malariae* tenen tendència a parasitar eritròcits madurs<sup>4</sup>.

Un cop dins dels eritròcits es transformen en un estat d'anell o trofozoït immadur, el qual es caracteritza per la presència d'una vacuola que fa desplaçar el nucli del centre i el citoplasma cap a la perifèria, adquirint una aparença anular<sup>5,6</sup>. A continuació, els paràsits formen el pigment malàric per la destrucció de l'hemoglobina i augmenten de





El període d'incubació varia entre espècies, sent el més curt per *P. falciparum* (de 8 a 11 dies), i el més llarg per *P. malariae* (de 18 a 40 dies)<sup>9</sup>. *P. vivax* i *P. ovale* presenten un període d'incubació de 10 a 17 dies<sup>9</sup>. Després d'aquest és quan s'alliberen els merozoïts que infectaran als eritròcits, produint la fase clínica de la malaltia. En les infeccions per *P. vivax*, *P. ovale* i *P. malariae* es produeixen pics febrils cada 48 hores, mentre que en el cas de *P. malariae* cada 72.

Els símptomes més comuns són: febre, esgarrifances, vòmits i mal de cap<sup>6</sup>, els quals es poden agreujar i produir la mort si no són tractats adequadament, sobretot en el cas de les infeccions per *P. falciparum*.

Cal tenir en compte que, en els casos de *P. vivax* i *P. ovale*, es produeixen recidives (recaigudes després de passar la malaltia) com a causa dels hipozoïts<sup>6</sup>.

La malària és una malaltia curable; un tractament eficaç i aviat, juntament amb un diagnòstic correcte, disminueixen les complicacions que es puguin donar en el transcurs de la malaltia; ajuden a reduir les morts i, fonamentalment, contribueixen a prevenir la seva transmissió. El fàrmac d'elecció en tots els casos d'infecció és la cloroquina, i per les formes intrahepàtiques de *P. vivax* i *P. ovale* s'empra la primaquina<sup>5</sup>.

Malauradament, a les dècades de 1970 i 1980 van sorgir soques de *P. falciparum* resistents a la cloroquina en Sud-Amèrica i el sud-est asiàtic<sup>9</sup>. A més, també s'han detectat soques resistents de *P. vivax* a la primaquina i cloroquina<sup>10</sup>. Les resistències apareixen com a conseqüència de mutacions espontànies en el genoma dels paràsits<sup>5</sup>.

Per aquestes raons, el tractament adequat i recomanat és el tractament combinat amb artemisinina (TCA) per les infeccions per *P. falciparum*<sup>10</sup>. El TCA és una combinació d'artemisinina (o derivats) amb un antimalàric, el qual presenta un mecanisme d'acció diferent a l'artemisinina. En el cas de *P. vivax*, en aquelles zones susceptibles a la cloroquina s'empra com a fàrmac la cloroquina, sinó s'utilitza el TCA.

Cal tenir en compte, però, que un ús indiscriminat d'aquests fàrmacs pot agreujar l'aparició de resistències<sup>11</sup>.

Tot i l'existència d'un tractament eficaç per la cura de la malaltia, encara no existeix cap vacuna comercialitzada per a la prevenció del paludisme<sup>12</sup>.

El punt més important per contribuir a la prevenció de la infecció és el control dels mosquits vectors<sup>9</sup>. Això consisteix tant en la destrucció de les larves com en l'ús d'insecticides d'acció persistent<sup>6</sup>. Tot i així, sorgeixen dificultats per fer front a la eradicació del paludisme, en part, pel desenvolupament de mosquits resistents als insecticides<sup>9</sup>.

Per una altra banda, també és útil l'ús de mosqueters tractats amb insecticides per tal de disminuir, o eliminar, el risc de contraure la malaltia.

## 1.2. DIAGNÒSTIC

Com sembla obvi, la millor manera de prevenir la malaltia és evitant el contagi. Però si un individu s'ha acabat infectant cal un diagnòstic ràpid i acurat, atès que això permetria l'administració d'un tractament ràpid i adequat<sup>13</sup>. Això és important pel control de la malaltia, atès que aquells diagnòstics tardans i erronis, així com un mal tractament, són la major causa de mortalitat de la malària<sup>11</sup>.

Des de l'any 2000, hi ha hagut un augment de l'accés a diagnòstics ràpids, la qual cosa contribueix a que hi hagi un ús més racional dels medicaments antipalúdics<sup>2</sup>.

El diagnòstic es basa en que s'ha de sospitar de paludisme sobre qualsevol síndrome febril observat en persones que tinguin antecedents de viatge, o residència, a àrees endèmiques<sup>5,6</sup>.

En els últims anys s'han desenvolupat noves tècniques de diagnòstics, on s'inclouen la detecció ràpida d'antígens parasitaris (RDTs per les seves sigles en anglès, *Rapid Diagnostic Tests*), tècniques moleculars (PCR; *Polymerase Chain Reaction*) i la microscòpica de fluorescència (QBC; *Quantitative Buffy Coat*)<sup>14</sup>.

La tècnica de la PCR permet determinar concentracions molt baixes de paràsits i és quantitativa; permetrà un control en la eficàcia del tractament<sup>15</sup>. Tot i així, atès a les seves característiques econòmiques i les necessitats instrumentals no es troba al abast de tots els laboratoris, i menys en els situats a les zones endèmiques<sup>15</sup>.

Les tècniques de detecció ràpida d'antígens es basen en determinar la presència, o absència, de *Plasmodium* en sang mitjançant dues molècules<sup>15</sup>: per una banda la proteïna-2 rica en histidina (HRP-2) que és específica per *P. falciparum*, o per l'altra banda l'enzim lactat deshidrogenasa (LDH) que és comú a les quatre espècies. Així, no diferencia les infeccions per *P. vivax*, *P. ovale* i *P. malariae*.

Són mètodes que no precisen d'un microscopi, i són fàcils de realitzar. Els sistemes comercials es poden emprar en el tròpic atès que són estables a temperatura ambient, per tant, els fan bons candidats a ser una tècnica de diagnòstic fiable en les àrees endèmiques<sup>16</sup>.

El sistema de QBC es basa en la visualització del paràsit per fluorescència, atès que queda marcat per taronja d'acridina<sup>14</sup>. És una tècnica que es basa en la microscòpia, però el reconeixement del paràsit de vegades és difícil i no diferencia entre les diferents espècies.

No obstant, tot i els avenços en el desenvolupament de diverses tècniques de diagnòstic, la microscòpia òptica segueix sent el mètode per excel·lència en el diagnòstic del paludisme<sup>17</sup>.

El diagnòstic de malària consta de tres grans tasques: determinar la presència o absència del paràsit en les mostres sanguínies (diagnòstic positiu o negatiu), d'aquells diagnòstics positius, identificar l'espècie de *Plasmodium*, així com l'estat del cycle biològic<sup>17</sup>. També és important realitzar una quantificació de la parasitemia (quantitat de paràsits en sang).

D'aquesta manera, detectar el paludisme és la tasca de més importància, mentre que identificar la espècie causant es necessita per un tractament correcte<sup>17</sup>.

La microscòpia permet donar resposta a totes les tasques que requereix el diagnòstic. Per fer-ho, les mostres de sang perifèrica es preparen en un portaobjectes (o en dos de diferents) de dues maneres:

-realitzant una gota grossa, la qual permet la detecció de paràsits de manera visual (presència o absència) a la mostra d'una manera més ràpida, ja que permet l'estudi d'un major volum de sang<sup>6</sup>. A més, permet detectar parasitemies baixes; és més sensible. En aquesta tècnica, els eritròcits es destrueixen, fent difícil una identificació de les espècies.

-realitzant una extensió, la qual conserva la forma dels eritròcits, podent observar les característiques diferencials de les espècies<sup>6</sup> i determinar-ne quina és la causant.

La parasitemia es pot calcular en tots dos tipus de tècniques, i servirà per dur un seguiment de la resposta terapèutica<sup>5</sup>.

Per a poder visualitzar les mostres al microscopi s'utilitza una tinció anomenada Giemsa. Aquesta tinció s'empra per tal de diferenciar els paràsits de plaquetes, eritròcits, leucòcits i altres artefactes<sup>17</sup>.

Els eritròcits queden d'un color gris pàl·lid, el nucli dels leucòcits s'observa lila fosc, i en el cas dels granulòcits, els grànuls del citoplasma queden ben definits. Les plaquetes es tenyeixen d'un color rosat, i són les més susceptibles a ser confoses amb paràsits<sup>18</sup>.

Altres objectes que es poden trobar i que poden generar confusió amb paràsits de la malària són: cossos de Howell-Jolly<sup>d</sup>, anells de Cabot<sup>e</sup>, puntejats basòfil, entre altres<sup>18</sup>.

Pel que fa als paràsits, els anells dels trofozoïts es tenyeixen d'un blau pàl·lid, mentre que el nucli queda d'un violeta intens<sup>19</sup>.

Anteriorment s'ha esmentat que la extensió permetia observar les característiques diferencials dels paràsits. Això és important perquè les espècies es diferencien segons la mida de l'eritròcit infectat, la presència de puntejats característics, així com la morfologia que adopten segons l'estadi biològic<sup>18</sup> (**taula 1**). Les característiques diferencials dels paràsits i els estadis corresponents es troben plasmades en forma d'il·lustracions a la **taula 2**.

Degut a la importància que presenta pel tractament, és important saber diferenciar les infeccions causades per *P. falciparum* de les causades per les altres espècies<sup>6</sup>.

---







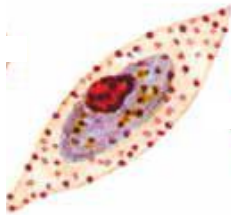


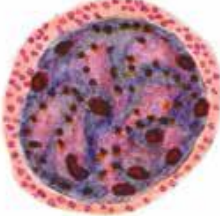



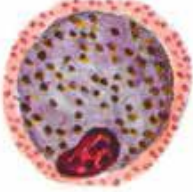
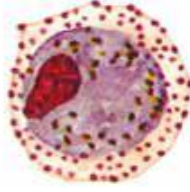

<sup>d</sup> Restes nuclears en eritròcits després de la maduració en la medul·la òssia, les quals queden com un punt basòfil (violeta) en les tincions amb Giemsa.

<sup>e</sup> Consisteixen en fils basòfils, formats per residus de la membrana nuclear.

**Taula 1:** característiques morfològiques dels paràsits del paludisme en extensions sanguínies per a la seva diferenciació

	<b>P. falciparum</b>	<b>P. vivax</b>	<b>P. ovale</b>	<b>P. malariae</b>
<b>Eritròcit infectat</b>	No augmentat de mida, i pot presentar vores irregulars. De vegades s'observen escassos punts grossos (granulació de Maurer)	Augmentat de mida, de forma rodó o angular. S'observa granulació de Schüffner (punts fins) abundants	Augmentat de mida, de forma oval, i de vegades amb extrems fimbriats. S'observa granulació de Schüffner abundant, tot i que més destacada que <i>P. vivax</i>	No augmentat de mida (de vegades mida inferior als no infectats)
<b>Estadi d'anell</b>	Anell petit i delicat, de vegades es poden observar dos punts de cromatina. Espècie més freqüent en trobar més d'un paràsit per eritròcit	De mida gran, amb un citoplasma irregular i fi. Punt de cromatina gran	Compacte, de forma regular i un punt de cromatina més petit que <i>P. vivax</i>	Compacte, amb citoplasma gruixut i un gran punt de cromatina
<b>Estadi de trofozoït</b>	Generalment compacte, i més gruixut que en anell. Es poden observar dos punts de cromatina	Citoplasma ameboide i llarg	Petit, no ameboide, citoplasma compacte, amb un punt de cromatina gran	Compacte, usualment en forma de banda, molt característic.
<b>Esquizont</b>	No se sol trobar en sang perifèrica. Merozoïts petits (8-26), pigment marró fosc	Gran, amb merozoïts grans (12-24)	Més petit que <i>P. vivax</i> , de 6 a 12 merozoïts. El pigment és més fosc que <i>P. vivax</i>	Petit, merozoïts grans (6-12) i pren un aspecte de en forma de "roseta" característic.
<b>Gametòcit</b>	En forma de semi lluna o "plàtan", més llargs que els eritròcits. Pigment al centre del citoplasma	Esfèrics i compactes, amb pigment difús i granulós	De mida allargada, oval o rodó, però més petit que <i>P. vivax</i> . Pigment marró al citoplasma	De forma oval o arrodonida i de mida petita. Pigment difús

**Taula 2:** il·lustracions de les característiques representatives de cada estadi per a cada espècie de *Plasmodium* per a la seva identificació. Font: OMS

	<b>P. falciparum</b>	<b>P. vivax</b>	<b>P. ovale</b>	<b>P. malariae</b>
<b>Estadi d'anell</b>				
<b>Estadi de trofozoït</b>				
<b>Esquizont</b>				
<b>Gametòcit</b>				

### 1.3. REPTES I EXEMPLES REALS

S'han escollit Moçambic, Brasil i Angola com exemples de zones endèmiques de malària.

A Moçambic la malària juntament amb la tuberculosi i la SIDA són els tres problemes sanitaris més greus de la regió.

A l'hospital Carmelo de Moçambic, la tuberculosi és un problema recurrent, i s'ha arribat a detectar més casos gràcies a la disponibilitat de l'aparell de diagnòstic *GeneXpert*, el qual permet fer una detecció ràpida de *Mycobacterium tuberculosis* per PCR. No obstant, *GeneXpert* és una eina de diagnòstic cara, per tant es podria substituir per altres eines de més baix cost, amb una sensibilitat elevada.

La malària es tracta de la mateixa manera en totes les infeccions, sigui quina sigui l'espècie causant. Això és un problema, atès que, com s'ha esmentat anteriorment, un tractament adequat ajuda a reduir el nombre de morts, així com la transmissió de la malaltia.

Concretament, l'espècie prevalent al 100% a Moçambic és *P. falciparum*. Per tant, el fet de no donar un tractament adequat, com a conseqüència d'un mal diagnòstic, pot agreujar les resistències d'aquests paràsits als fàrmacs emprats.

A Angola, igualment que a Moçambic, l'espècie prevalent de *Plasmodium* és *P. falciparum*, del qual hi ha una elevada transmissió. De la mateixa manera, la tuberculosi és un problema de salut general a Angola.

A Brasil es troba l'Institut Oswaldo Cruz, que col·labora en investigació i prestació de serveix per al diagnòstic de malalties infeccioses, així com el control dels vectors implicats.

En aquest país, el 99% dels casos de malària es localitzen en la regió de l'Amazones, la qual és considerada una zona endèmica per la transmissió de la malaltia, sent *P. vivax* més prevalent que *P. falciparum*. Tot i així, encara segueixen en actiu plans d'eliminació d'aquesta espècie atenent a la gravetat que pot cursar la malaltia, així com a l'aparició de soques resistents a artemisinina. No obstant, l'eliminació de *P. vivax* es fa més complexa degut a la capacitat de desenvolupar una forma latent.

### 1.4. CONTEXT DEL TREBALL

El laboratori de Drassanes forma part del servei de microbiologia de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron, i es troba situat a la Unitat de Medicina Tropical i Salut Internacional Drassanes (UMTSID), juntament amb les unitats de tuberculosi i malalties de transmissió sexual.

El grup de treball del Departament d'Informàtica de la "Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)"-Brasil, conjuntament amb el grup de recerca en Biologia Computacional i Sistemes Complexos (BIOCOM-SC) de la UPC han desenvolupat un sistema automàtic de diagnòstic per microscòpia de malària, mitjançant una aplicació

per aparells de telefonia mòbil, basat en sistemes Android. Actualment aquesta tecnologia només identifica trofozoïts de *Plasmodium falciparum*.

El laboratori de Drassanes col·labora en aquest projecte mitjançant la incorporació d'imatges de les diferents morfologies corresponents a cada estadi de desenvolupament de les espècies de *Plasmodium*. D'aquesta manera, l'aplicació pot ser millorada per tal de diferenciar entre les diferents espècies i donar així un diagnòstic acurat.

## 1.5. PROPOSTA I ACTIVITATS

Moltes zones on la malària és endèmica no tenen accés a eines de diagnòstic o presenten dificultats per accedir-hi. D'aquesta manera, es dona un tractament incorrecte, o fins i tot, nul.

Tal i com s'ha esmentat anteriorment, aquells diagnòstics i tractaments que siguin ràpids i acurats són essencials per a evitar morts i, a més, contribueixen a reduir la transmissió de la malaltia.

El diagnòstic emprant la microscòpia requereix d'un entrenament extens i especial, amb una conseqüent experiència elevada per a que el diagnòstic sigui el més acurat. Amb aquests requisits s'aconsegueix que sigui una tècnica de diagnòstic amb una sensibilitat i una especificitat elevada.

No obstant, és un mètode que consumeix temps, així com el previ entrenament, que pot durar entre 4 i 5 setmanes<sup>18</sup>, i el diagnòstic final depèn de la presència dels requisits esmentat anteriorment.

En moltes de les zones endèmiques, el diagnòstic amb microscopi no és gaire fiable degut a la baixa experiència o el poc entrenament dels microscopistes<sup>19</sup>.

Per aquestes raons rau la importància d'automatitzar el diagnòstic de malària, amb la qual cosa s'eliminaria la necessitat de tenir un gran coneixement sobre els paràsits causants, així com una reducció en el temps emprat.

Així, com a solució es proposa el desenvolupament d'un diagnòstic automàtic basat en la microscòpia a través d'una aplicació per a mòbils intel·ligents i *tablets*.

Amb la creació de la base de dades d'imatges es proposa millorar una eina de diagnòstic de baix cost, ràpida i acurada, la qual pot ser emprada en els centres de salut d'àrees endèmiques sense la necessitat d'un expert. Això és important atès que sense un programa que asseguri la qualitat dels centres de salut en aquelles zones endèmiques, un diagnòstic acurat mitjançant la microscòpia és baix<sup>20</sup>.

Per tal que l'aplicació realitzi un diagnòstic acurat cal que sigui *entrenat* prèviament, i per això calen un número considerable d'imatges de estat biològic per a cada espècie, així com d'imatges negatives: un total de 15.000 imatges, repartides en 5.000 positives (presència de *Plasmodium*) i 10.000 per negatives.



Així, les activitats a realitzar són:

- crear una base de dades d'imatges
- processar-les i millorar l'aplicació
- fer proves en terreny

En aquest treball només es durà a terme la creació d'una base de dades d'imatges i la identificació d'aquestes (examinar les imatges obtingudes per determinar el que s'observa). El referent a l'aplicació (processament d'imatges i millora) es realitza per part de la UFRPE i la UPC.

Per últim, les proves en terreny són activitats de futur.

## 2. OBJECTIVES

The main aim of this work is the creation of an images database of blood samples stained for *Plasmodium* genus species detection. This database will be used to provide a mobile application as a diagnostic tool for malaria. This tool is based on microscopy, but eliminating its limitations: time-consuming and reliance on a human operator.

A second goal of the present work is to analyze the images obtained to determine the life-cycle stages of *Plasmodium* species and other objects that are not parasites.

Lastly, a third goal is to analyze the accuracy of the diagnosis using the mobile application.

## 3. MATERIAL I MÈTODES

Les mostres de paludisme es van obtenir del laboratori de Drassanes de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron. Totes van ser tenyides amb Giemsa, i examinades posteriorment per un expert en microscòpia, el qual va donar el diagnòstic oportú a cada mostra, tot especificant l'espècie de *Plasmodium* implicada.

### 3.1. BASE DE DADES

El treball previ a la captació de les imatges ha estat l'elaboració d'una base de dades de totes les mostres a treballar. Així, es van classificar les mostres segons si eren gota grossa o extensió, la parasitèmia i l'espècie.

Es van classificar un total de 241 mostres diagnosticades amb paludisme, on 168 corresponen a paludisme per *P. falciparum*, 36 per *P. vivax* i 37 per *P. ovale*.

Aquesta base servirà per agilitzar el treball d'obtenció de les imatges per una troballa més ràpida de les mostres necessàries.

### 3.2. CAPTACIÓ D'IMATGES

Per a l'obtenció de les imatges s'empren les extensions de les mostres de paludisme, atès que és d'aquesta manera que la mostra sanguínia queda fixada i els paràsits es poden visualitzar dins les cèl·lules, observant així les seves característiques diferencials.

Cadascuna de les extensions s'examina a un augment de 100x amb oli d'immersió en un microscopi òptic. Seguidament, les imatges es capturen emprant una càmera que es troba connectada al microscopi, mitjançant un adaptador (**figura 3**).



Un total de 62 mostres van ser examinades: 30 corresponents a *P. falciparum*, 23 a *P. ovale*, 7 a *P. vivax* i 2 a *P. malariae*.

**Figura 3:** instrumentació emprada per dur a terme la captació de les imatges. Es disposa d'un microscopi òptic el qual, amb un adaptador, disposa d'una càmera per tal d'obtenir la fotografia corresponent al camp de visió.

### 3.3. IDENTIFICACIÓ

Un cop obtingudes les imatges, cada una és examinada posteriorment per tal d'identificar l'objecte present a la imatge.

Per cada espècie de *Plasmodium* es procedeix a determinar l'estat del cicle biològic al qual es troben: trofozoït, esquizont o gametòcit. En el cas de les imatges negatives, la

identificació correspon a determinar si l'objecte de la imatge es tracta d'un leucòcit, un artefacte, plaquetes o altres tipus d'eritròcits.

### 3.4. DIGITALITZACIÓ D'IMATGES

El procés de digitalització d'imatges s'ha dut a terme per membres de la UPC i s'ha realitzat amb el programa MATLAB R2014a.

Primerament, es fa un pre-processament de la imatge, és a dir, es transforma o s'ajusta la imatge (coloració, saturació, etc.) per tal de fer-la més idònia pels processaments posteriors.

A continuació, es determinen un seguit de característiques, com són les diferències en color que presenten els diversos objectes d'una mostra sanguínia després de la tinció. Això serveix per *entrenar* al sistema per tal que detecti possibles candidats a paràsits que es trobin en la imatge, de manera automàtica.

Per últim, un cop realitzat l'*entrenament* del sistema, s'ofereix una imatge al sistema per tal de que avalui de manera autònoma si hi ha paràsits presents o no. És a dir, en aquest punt el sistema decideix si el candidat a paràsit o ho és finalment o no.

## 4. RESULTATS

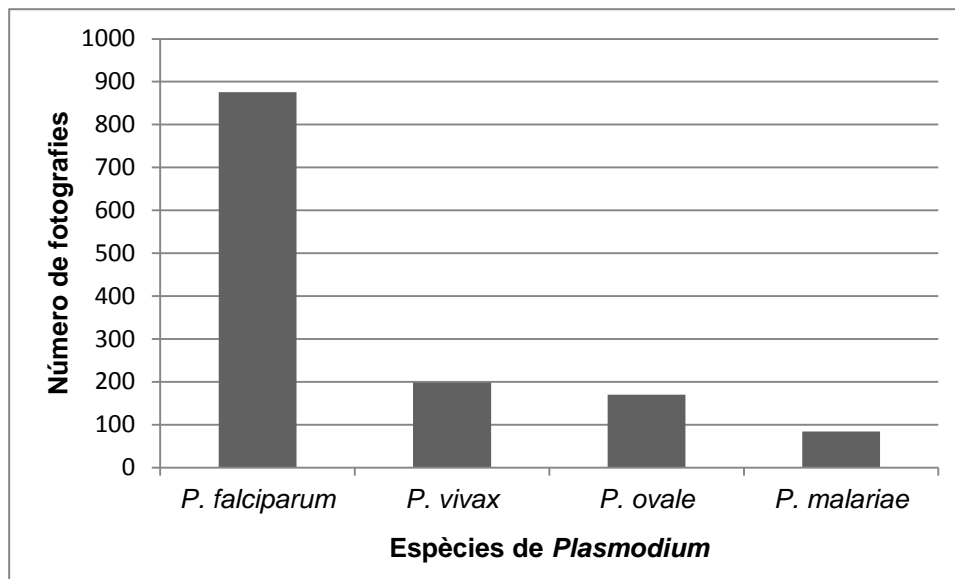
### 4.1. IMATGES

Pel que fa a les imatges obtingudes a partir de les mostres classificades, s'ha obtingut el següent (**taula 3**):

**Taula 3:** número d'imatges totals obtingudes per cada espècie de *Plasmodium* i el seu estat del cicle biològic, així com el número de negatives, on s'inclouen altres formes d'eritròcits, plaquetes, leucòcits i artefactes de tinció.

	<b>P. falciparum</b>	<b>P. vivax</b>	<b>P. ovale</b>	<b>P. malariae</b>	
<b>Trofozoït</b>	850	174	32	22	<b>Negatives</b> 358
<b>Esquizont</b>	1	-	119	55	
<b>Gametòcit</b>	25	24	19	7	
	876	198	170	84	
					<b>Total</b> 1714

S'han obtingut un total de 1714 imatges provinents de 62 mostres. 1356 corresponen a imatges positives: 876 d'infeccions causades per *P. falciparum*, 198 per *P. vivax*, 170 per *P. ovale* i 84 per *P. malariae* (**figura 4**).



**Figura 4:** representació gràfica del número de fotografies totals obtingudes per a cada espècie de *Plasmodium*. S'observa que la espècie de la qual s'obté un major nombre és *P. falciparum*.

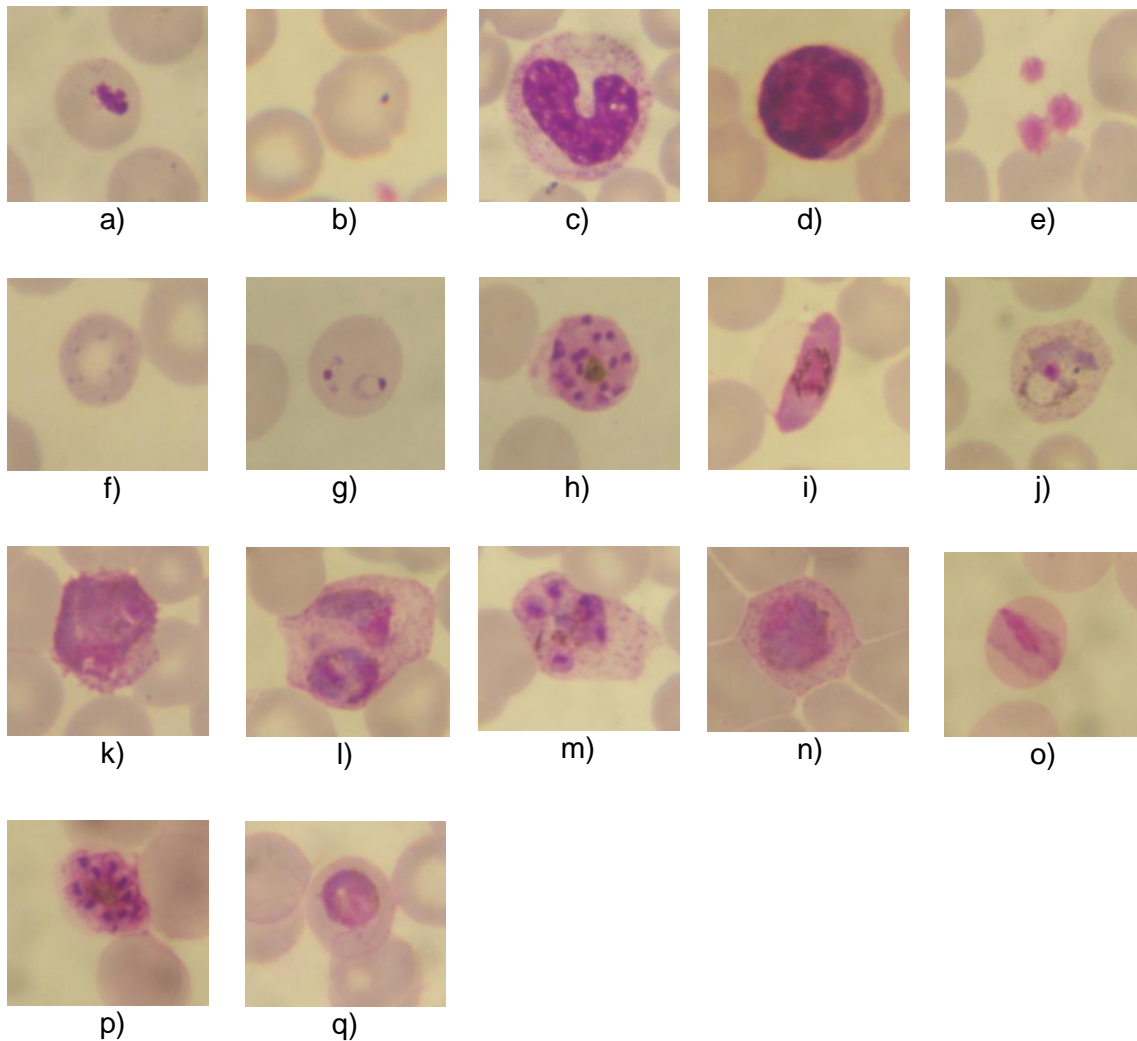
Com es pot observar, l'espècie de la qual s'han obtingut més imatges és *P. falciparum*, ja que és la que presenta més rellevància a nivell clínic i de tractament, i, per tant, és més important que el sistema sàpiga distingir aquesta espècie de les altres.

De *P. malariae* s'han obtingut el menor número de fotos atès que no és una espècie gaire freqüent que causi paludisme, i a més, era de la que menys preparacions es disposava.

De *P. falciparum*, la forma més freqüent que es troba en sang perifèrica és l'estadi de trofozoït, igual que per *P. vivax*. Pel que fa a *P. ovale* i *P. malariae* les formes més trobades han estat les corresponents a l'estadi d' esquizont.

Pel que fa a les imatges restants, 358 són negatives, és a dir, són imatges en les quals no apareix cap eritròcit infectat, però sí que es poden trobar altres formes, com glòbuls blancs, plaquetes o altres artefactes (**figura 5, a-f**)

A la figura 5 es poden observar els diferents estadis observats per cada espècie, així com objectes negatius, com són els cossos de Howell-Jolly, puntejat basòfil, artefactes de tinció, plaquetes i leucòcits.



**Figura 5:** objectes observats en les diferents fotografies realitzades: a) artefacte de tinció, b) cos de Jolly, c) i d) leucòcits, e) plaquetes, f) eritròcit amb puntejat basòfil, g-i) *P. falciparum*: g) anell, h) esquizont, i) gametòcit, j) i k) *P. vivax*: j) trofozoït i k) gametòcit, l-n) *P. ovale*: l) trofozoïts, m) esquizont i n) gametòcit, o-q) *P. malariae*: o) trofozoït, p) esquizont, q) gametòcit.

## 4.2. APLICATIU

Un cop el sistema ha estat *entrenat*, es disposa a avaluar si detecta correctament, o no, els paràsits presents a les imatges (**figura 6**).

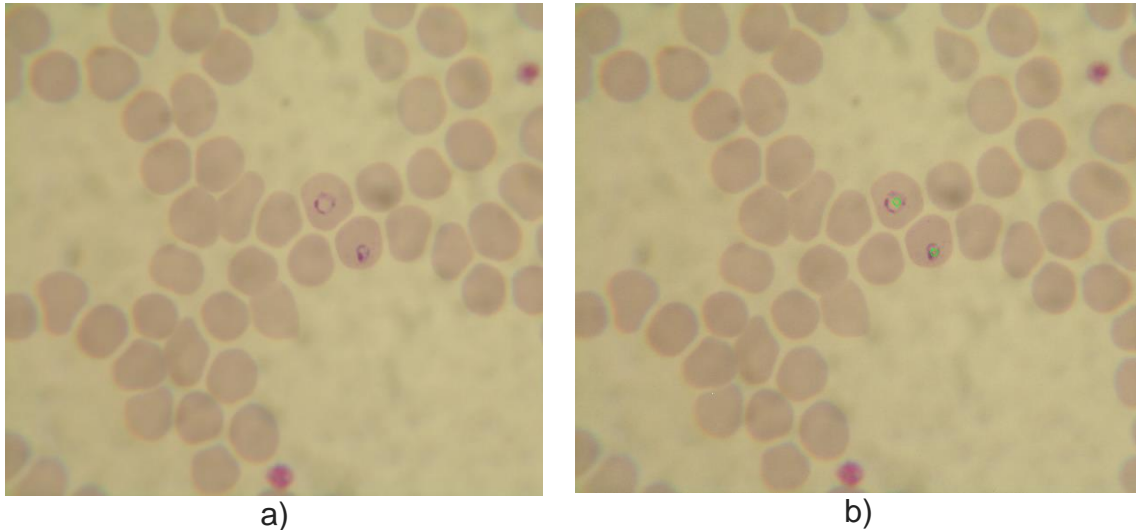
Després de que el sistema examines 117 paràsits de diferents imatges del paràsit *P. falciparum*, en va detectar un 79.6%. És a dir, 93 paràsits van ser detectats correctament pel sistema, mentre que els 24 restants no van ser-ho. Aquests resultats indiquen que 2 de cada 10 paràsits examinats no són detectats i passen desapercebuts pel sistema, generant així falsos negatius.

Per altra banda, en 4 de cada 38 imatges es genera un fals positiu. Això indica que en un 10.5% de les imatges examinades pel sistema hi ha altres formes no parasitàries que fan que el sistema s'equivoqui establint com a paràsit una forma que no ho és,

com podria ser una plaqueta, que ja s'ha esmentat anteriorment que són les que més confusió aporten.

Ja sigui tenint en compte paràsits, o imatges, en tots dos casos es generen falsos resultats, la qual cosa comportaria a un diagnòstic incorrecte.

En aquest cas, però, els falsos positius són més tolerables que els negatius, atès que si una malària causada per *P. falciparum* passa desapercebuda pot acabar causant la mort de la persona.



**Figura 6:** representació del diagnòstic realitzat pel sistema. a) imatge original on s'observen dos eritròcits amb un trofozoït (en estadi d'anell) a cada un, b) imatge posterior a l'examen de la original per part del sistema. S'observa que tots dos paràsits han estat detectats correctament per la presència d'una marca de color verd sobre de cada un.

## 5. DISCUSSIÓ

La malària és una malaltia que afecta a milions de persones en el món, i és per això que cal un control en la seva transmissió per tal de poder eradicar-la. El fet de desenvolupar un sistema de diagnòstic ràpid i acurat rau en la importància d'administrar un tractament ràpid i adequat. I això és el que permetrà controlar la transmissió de malaltia, fins a evitar-la.

Des de l'any 2010, tots els casos sospitosos de malària han de ser confirmats, abans del tractament, per RDTs o microscòpia<sup>21</sup>.

A la **taula 4** es resumeixen les diverses tècniques de diagnòstic disponibles, així com els seus avantatges i inconvenients.

**Taula 4:** tècniques emprades pel diagnòstic del paludisme, avantatges i inconvenients

Tipus de tècnica		Avantatges	Inconvenients
<b>Microscòpia òptica (gota grossa i extensió)</b>	Tinció, microscòpia	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Fàcil de realitzar</li> <li>-Cost baix</li> <li>-Diferenciació entre espècies</li> <li>-Quantificació de la parasitemia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Cal personal expert</li> <li>-Consumeix molt de temps</li> </ul>
<b>QBC</b>	Centrifugació, tinció amb taronja d'acridina	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Fàcil realització</li> <li>-No requereix de personal expert</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Cal un equipament adequat</li> <li>-No diferencia entre espècies</li> <li>-No emprada com a rutina de diagnòstic</li> </ul>
<b>Detecció ràpida d'antígens (RDTs)</b>	Immunocromatografia	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Fàcil de realitzar</li> <li>-No requereix de personal entrenat</li> <li>-No necessita d'electricitat</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Baixa sensibilitat per parasitemies baixes</li> <li>-No és quantitativa</li> <li>-Cost més elevat que microscòpia</li> </ul>
<b>PCR</b>	Detecció genòmica	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Detecta parasitemies baixes i infeccions mixtes (causades per més d'una espècie).</li> <li>-És quantitativa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Necessita d'un equipament adequat</li> <li>-Cost elevat</li> <li>-Requereix personal especialitzat</li> <li>-No emprada com a rutina de diagnòstic</li> </ul>

Així, els RDTs i la microscòpia són els mètodes de referència per al diagnòstic de malària. Tots dos presenten una sensibilitat i especificitat elevada: microscòpia (tinció amb Giemsa) 92-98% i 85-99% respectivament, i RDTs 88-92% i 96-98%<sup>15</sup>.

No obstant, per a l'administració d'un tractament adequat cal conèixer l'espècie causant i l'estadi del cicle biològic en el qual es troba, així com la parasitemia. D'aquesta manera, els RDTs són una eina útil de diagnòstic atès que són fàcils de realitzar i no necessiten de personal expert, però a l'hora de oferir un diagnòstic ho fan d'una manera incompleta. Això és degut a que al ser mètodes qualitius no es pot fer una estimació de la parasitemia, la qual és important per al tractament.

Un altre punt en contra dels RDTs és que no permeten la diferenciació entre espècies, punt important per l'administració del fàrmac més adient. A més, són tècniques cares, al voltant dels 30 € per cada test.

Per tant, la microscòpia continua sent el mètode emprat per excel·lència per al diagnòstic de malària: permet dur a terme totes les tasques necessàries per a aplicar el correcte tractament i és una tècnica barata, aproximadament 7€ per test. Tot i així, també presenta certs desavantatges, sobretot atenent a les zones endèmiques de la malaltia. Primerament, necessita d'un entrenament de qualitat per al personal dels centres de salut. Segon, és un mètode que consumeix temps, donant un resultat al cap de 20-30 minuts després de recollir la mostra.

La problemàtica present en moltes de les regions que són endèmiques per malària és que no tenen un accés a tècniques de diagnòstic, degut a una limitació espacial i/o econòmica. A més, en aquelles regions on disposen de microscopis per dur a terme el diagnòstic, presenten una absència pel que fa a la correcta interpretació dels camps de visió del microscopi.

Per fer front a aquestes problemàtiques cal un sistema de diagnòstic ràpid, de baix cost i acurat.

Aquest treball descriu la generació d'una base de dades d'imatges per a la millora d'una aplicació mòbil que serveixi com a eina de diagnòstic per malària.

Per tal d'obtenir un resultat òptim, es necessiten 15.000 imatges, sent 5.000 el número necessari per positives i 10.000 per negatives<sup>22</sup>. Això contribueix a determinar que l'aplicació sigui factible<sup>22</sup>.

S'han obtingut 1714 imatges, tant de mostres positives com negatives. Aquest número, atenent al necessari (15.000), és baix, la qual cosa limita el procés de millora de l'aplicació. Per aquesta raó, cal continuar amb la captació d'imatges per tal d'arribar al número estimat d'imatges, necessari per a la total millora de l'aplicació. D'aquesta manera, s'aconseguiria que el sistema identifiqués cada estat del cicle vital de les quatre espècies, fent una diferenciació entre elles. A més, aquesta millora permetria reduir el 20% de falsos negatius, d'igual manera que el 10% dels falsos positius, aconseguint % molt menors en tots dos casos.

Aquest baix número d'imatges obtingudes respecte les esperades és degut al temps que implica la captació de les imatges. Les 1714 imatges s'han obtingut en un període de dos mesos (sis setmanes). Això implica que per arribar a les 13.000 caldria estar un any obtenint fotos. És un punt important a destacar, per la dificultat que implica un bon aprenentatge per a una correcta determinació dels paràsits i diferenciació d'espècies, per a una persona que no estava familiaritzada abans.

Per una altra banda, de 117 paràsits que van ser examinats, aproximadament un 20% van resultar en falsos negatius, mentre que en un 10.5% de les imatges examinades pel sistema es generen falsos positius. És important treballar en la minimització d'aquests percentatges, atès que els falsos negatius porten a no tractar possibles casos de malària (que en cas de infecció per *P. falciparum* pot portar a la mort), i els falsos positius fan que es doni un mal ús dels antipal·lúdics, augmentat així el desenvolupament de resistències dels paràsits i els costos innecessaris del tractament<sup>21</sup>.



Amb el desenvolupament d'aquesta aplicació mòbil s'aconseguiria millorar la sensitivitat i especificitat pel diagnòstic, on el control de qualitat de la tècnica (que no es produeixin falsos positius i negatius i millora, si és el cas, del *software*) es podria fer *on-line*. A més, podria ser emprat en qualsevol centre de salut de les àrees endèmiques, només amb la necessitat d'un *smartphone* amb la aplicació instal·lada i el requeriment de subministrament d'un microscopi.

Convé remarcar que amb les imatges obtingudes l'aplicació permet detectar positius en un 80% dels casos i hi ha un 10% falsos positius. Això demostra que l'aplicació és útil, no obstant caldrà entrenar més el sistema per millorar aquests percentatges.

A més a més, la metodologia i tecnologia d'aquest sistema podrien també ser emprades per diagnosticar altres malalties infeccioses importants, com la tuberculosi (que afecta a 9,6 milions de persones en tot el món<sup>2</sup>).

## 6. CONCLUSIONS

A total of 1,714 images were obtained from the analyzed malaria slide samples collection. Of those 358 samples were negative and 1,356 were positive for any *Plasmodium* parasite as follows: 65% of *P. falciparum*, 15% of *P. vivax*, 13% of *P. ovale* and 7% of *P. malariae*.

The mobile application software in development has allowed to detect an 80% of parasites in tested slides. However the rate of false positive has been of 10% and the rate of false negative achieved 20%.

To increase the percentage of parasite detection and improve the rates of false positives and negatives it would be necessary to continue obtaining more images. This will allow to get a better identification software increasing the images data base.

## 7. ÈTICA I SOSTENIBILITAT

El colorant emprat per a les tincions, Giemsa, conté metanol, i per aquesta raó la seva alliberació al medi ambient (aquífers i sòls) ha de ser evitada. De la mateixa manera, el colorant restant de la tinció no s'ha d'eliminar directament per als desguassos (aixetes, etc), sinó que ha de ser eliminat en bidons per tal de fer la gestió de residus pertinent.

Les mostres emprades per a l'obtenció de les imatges microscòpiques corresponen a pacients que han sigut diagnosticats al laboratori. Tot i així, un consentiment redactat no ha estat requerit atès que les mostres no contenen cap identificació personal.

## BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization (2015) World Malaria Report. WHO press, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
2. Unidas, N., & York, N. (2015). Objetivos de Desarrollo del Milenio Informe de 2015. *Naciones Unidas*, 32–38. <http://doi.org/10.1108/17427370810932141>
3. Beck, J. W., & Davies, J. E. (1983). Los esporozoarios. In *Parasitología médica* (3rd ed., pp. 81–116). México: Interamericana.
4. Gállego, J. (2003). Phylum Apicomplexa. In *Manual de parasitología: morfología y biología de los parásitos de interés sanitario* (2nd ed., pp. 166–206). Barcelona: Universitat de Barcelona.
5. Perea, E. (1992). Plasmodium (malaria). In *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* (1st ed., pp. 967–974). Barcelona: Doyma.
6. Pumarola, A., Rodríguez-Torres, A., García-Rodríguez, J. A., & Piédrola-Angulo, G. (1987). Sporozoa: Plasmodium. In *Microbiología y parasitología médica* (2nd ed., pp. 832–843). Barcelona: Masson.
7. Garcia, L., & Bruckner, D. (1988). Malaria and Babesia spp. In *Diagnostic medical parasitology* (pp. 87–102). Amsterdam: Elsevier.
8. Singh, B., & Daneshvar, C. (2013). Human infections and detection of Plasmodium knowlesi. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(2), 165–84. <http://doi.org/10.1128/CMR.00079-12>
9. Markell, E., Vogue, M., & John, D. (1990). Paludismo. In *Parasitología médica* (6th ed., pp. 79–102). Madrid: McGraw-Hill.
10. World Health Organization. (2015). Treatment of Severe Malaria. *Guidelines For The Treatment of Malaria*, 71–88. [http://doi.org/10.1016/0035-9203\(91\)90261-V](http://doi.org/10.1016/0035-9203(91)90261-V)
11. Bell, D., Wongsrichanalai, C., & Barnwell, J. W. (2006). Ensuring quality and access for malaria diagnosis: how can it be achieved? *Nature Reviews. Microbiology*, 4(9 Suppl), S7–S20. <http://doi.org/10.1038/nrmicro1525>
12. Microbiología, S. De, Clínico, H., & Valencia, U. De. (1964). Paludismo: El Desarrollo De Una Vacuna, 1–10.
13. Ross, N. E., Pritchard, C. J., Rubin, D. M., & Dusé, A. G. (2006). Automated image processing method for the diagnosis and classification of malaria on thin blood smears. *Medical and Biological Engineering and Computing*, 44(5), 427–436. <http://doi.org/10.1007/s11517-006-0044-2>
14. Mehrjou, A., Abbasian, T., & Izadi, M. (2013). Automatic malaria diagnosis system. *International Conference on Robotics and Mechatronics, ICRoM 2013*, 205–211. <http://doi.org/10.1109/ICRoM.2013.6510106>
15. Arenas R. (2011). Diagnóstico de laboratorio. *Micología Médica Ilustrada*, 40–59.
16. World Health Organization (2015). Results of WHO product testing of malaria RDTs: round 6 (2014–2015). *Malaria Rapid Diagnostic Test Performance*. Italia
17. Tek, F. B., Dempster, A. G., & Kale, I. (2010). Parasite detection and identification for automated thin blood film malaria diagnosis. *Computer Vision and Image*

*Understanding*, 114(1), 21–32. <http://doi.org/10.1016/j.cviu.2009.08.003>

18. Organización Mundial de la Salud (2014). Parte I: Guía del alumno. *Bases del diagnóstico microscópico del paludismo*. Suïsa
19. Prasad, K., Winter, J., Bhat, U. M., Acharya, R. V., & Prabhu, G. K. (2012). Image analysis approach for development of a decision support system for detection of malaria parasites in thin blood smear images. *Journal of Digital Imaging*, 25(4), 542–549. <http://doi.org/10.1007/s10278-011-9442-6>
20. Linder, N., Turkki, R., Walliander, M., Mårtensson, A., Diwan, V., Rahtu, E., ... Lundin, J. (2014). A malaria diagnostic tool based on computer vision screening and visualization of Plasmodium falciparum candidate areas in digitized blood smears. *PloS One*, 9(8), e104855. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0104855>
21. Worl Health Organization (2016). *Malaria microscopy: Quality Assurance Manual*. Italia
22. Viola, P., & Jones, M. J. (2004). Robust Real-Time Face Detection. *International Journal of Computer Vision*, 57(2), 137–154. <http://doi.org/10.1023/B:VISI.0000013087.49260.fb>