

Títol del treball:

Aplicació de la PCR digital pel diagnòstic de la malària

Nom estudiant: Inés Díaz Alcántara

Correu electrònic: u1973478@campus.udg.edu

Grau en: Biologia

Nom del tutor: Alba Abras Feliu

Correu electrònic: alba.abras@udg.edu

Nom del cotutor* (en cas de places externes):

Correu electrònic:

Empresa/institució:

Data de dipòsit de la memòria a través de la plataforma de TFG: 03/07/2024

ÍNDEX

RESUM	<i>i</i>
RESUMEN	<i>ii</i>
ABSTRACT	<i>iii</i>
REFLEXIÓ SOBRE ÈTICA	<i>iv</i>
REFLEXIÓ SOBRE SOSTENIBILITAT	<i>iv</i>
REFLEXIÓ SOBRE PERSPECTIVA DE GÈNERE	<i>iv</i>
1. Introducció	1
1.1 Breu perspectiva històrica	1
1.2 Epidemiologia	1
1.3 L'agent causal de la malària: <i>Plasmodium</i> sp.	2
1.3.1 Cicle vital	2
1.3.2 Vies de transmissió	3
1.4 Simptomatologia	3
1.5 Tractament	3
1.6 Diagnòstic	4
2. AIM	5
3. Material i mètodes	6
4. Resultats i discussió	6
4.1 Anàlisi dels articles seleccionats	6
4.2 La tècnica de la PCR digital	11
4.2.1 Base del mètode	11
4.3 Tipus de mostra	12
4.4 Punts forts	14
4.5 Punts febles	14
4.6 Principals aplicacions de la dPCR	16
4.6.1 Diagnòstic	16
4.6.2 Anàlisi de la resistència de fàrmacs anti-malària	16
4.6.3 Control vectorial de la malària	16
4.7 dPCR en vers altres mètodes	17
4.7.1 dPCR vs. microscòpia òptica	17
4.7.2 dPCR vs. qPCR	17
4.7.3 dPCR vs. LAMP	18
4.8 Perspectives de futur	19
5. Conclusions	20
6. Agraïments	20
7. Bibliografia	21

RESUM

La malària o paludisme, és una infecció vectorial provocada per paràsits del gènere *Plasmodium* i transmesa per mosquits femella del gènere *Anopheles*. Aquesta malaltia és un problema de salut pública, sobretot a l'Àfrica, on es concentren el 90% dels casos. Els símptomes inicials són inespecífics que, si no es tracta a temps, es pot complicar i resultar mortals. Actualment, existeixen fàrmacs efectius pel tractament, però la resistència a aquests és cada vegada més recurrent. El diagnòstic es realitza mitjançant mètodes microscòpics, immunològics i/o moleculars on el darrer es basa en l'amplificació del material genètic del paràsit. La tècnica molecular més usada és la PCR, però recentment han aparegut noves tècniques prometedores com és el cas de la PCR digital (dPCR). L'objectiu d'aquest TFG va ser estudiar la dPCR i la seva aplicació en el diagnòstic de la malària per avaluar-la com a una possible alternativa diagnòstica. La cerca bibliogràfica es va fer a partir de la base de dades Web of Science mitjançant la combinació de les següents paraules clau: "malària", "Plasmodium", "digital PCR", "dPCR" i "ddPCR". Finalment, es van seleccionar 12 articles després de revisar els títols i els resums dels resultats. La dPCR és una eina molecular innovadora que permet la quantificació absoluta mitjançant la partició de la reacció. Una variant de la dPCR, és la *droplet digital PCR* (ddPCR), que comparteix el mateix principi que la dPCR, però difereix en la partició de la mostra. La sang total és la mostra més adequada pel diagnòstic, però el sèrum, la saliva o l'hisop bucal poden ser alternatives viables. Els principals avantatges de la dPCR inclouen el no requisit d'una corba estàndard per a la quantificació, l'alta tolerància als inhibidors, l'alta sensibilitat, la utilitat per a la detecció de l'ADN diana en mostres amb baixa càrrega parasitària i infeccions mixtes, i la capacitat de detectar variants genètiques rares amb gran precisió. No obstant això, la dPCR presenta alguns punts febles, com ara, la possible saturació de la reacció en mostres molt concentrades, i que és una tècnica cara i laboriosa. De cara al futur, la dPCR és una tècnica prometedora pel diagnòstic de la malària, però la seva aplicació en zones endèmiques amb recursos limitats requereix el desenvolupament d'equips més assequibles. Les principals aplicacions de la dPCR inclouen el diagnòstic, l'anàlisi de la resistència als fàrmacs contra el paràsit i el control vectorial de la malaltia.

RESUMEN

La malaria o paludismo, es una infección vectorial causada por parásitos del género *Plasmodium* y transmitida por mosquitos hembra del género *Anopheles*. Esta enfermedad es un problema de salud pública, sobre todo en África, donde se concentran el 90% de los casos. Los síntomas iniciales son inespecíficos, que si no se tratan a tiempo, pueden agravarse y resultar letales. Existen fármacos efectivos para el tratamiento, pero la resistencia a estos es cada vez más recurrente. El diagnóstico se realiza mediante métodos microscópicos, inmunológicos y/o moleculares, donde el último se basa en la amplificación del material genético del parásito. La técnica molecular más usada es la PCR, pero recientemente han aparecido nuevas técnicas prometedoras, como la PCR digital (dPCR). El objetivo de este TFG fue estudiar la dPCR y su aplicación en el diagnóstico de la malaria para evaluarla como una posible alternativa diagnóstica. La búsqueda bibliográfica se hizo a partir de la base de datos *Web of Science* mediante la combinación de las siguientes palabras clave: "malaria", "Plasmodium", "digital PCR", "dPCR" y "ddPCR". Finalmente, se eligieron 12 artículos después de revisar los títulos y los resúmenes de los resultados. La dPCR es una herramienta molecular innovadora que permite la cuantificación absoluta mediante la partición de la reacción. Una variante de la dPCR es la *droplet digital PCR* (ddPCR), que comparte el mismo principio que la dPCR, pero difiere en la partición de la muestra. La sangre total es la muestra más adecuada para el diagnóstico, pero el suero, la saliva o el hisopo bucal pueden ser alternativas viables. Las principales ventajas de la dPCR incluyen el no requisito de una curva estándar para la cuantificación, la alta tolerancia a los inhibidores, su alta sensibilidad, la gran utilidad para la detección del ADN diana en muestras con baja carga parasitaria e infecciones mixtas, y la capacidad de detectar variantes genéticas raras con gran precisión. Sin embargo, la dPCR presenta algunos puntos débiles, como, la posible saturación de la reacción en muestras muy concentradas, y que es cara y laboriosa. Para el futuro, la dPCR es una técnica prometedora para el diagnóstico de la malaria, pero su uso en zonas endémicas con recursos escasos requiere el desarrollo de equipos más asequibles. Las principales aplicaciones de la dPCR incluyen el diagnóstico, el análisis de la resistencia a los fármacos contra el parásito y el control vectorial de la enfermedad.

ABSTRACT

Malaria or paludism is a vector infection caused by parasites of the genus *Plasmodium* and transmitted by female mosquitoes of the genus *Anopheles*. This disease is a public health problem, especially in Africa, where 90% of cases are concentrated. The initial symptoms are non-specific, which, if not treated in time, can be complicated and fatal. There are effective drugs for treatment, but resistance to them is increasingly common. The diagnosis of malaria is carried out using microscopic, immunological and/or molecular methods, with the amplification of the parasite genetic material being the principle of molecular methods. The most used molecular technique is PCR, but new promising methods have recently appeared, such as digital PCR (dPCR). The objective of this TFG was to study the dPCR and its application in diagnosing malaria to evaluate it as a possible diagnostic alternative. The bibliographic search was done from the Web of Science database by combination of the following keywords: "malaria", "Plasmodium", "digital PCR", "dPCR" and "ddPCR". Finally, 12 articles were selected after reviewing the titles and abstracts results. dPCR is an innovative molecular tool that allows absolute quantification by partitioning the reaction. A variant of the dPCR is the droplet digital PCR (ddPCR), which shares the same principle as the dPCR but differs in the partitioning of the sample. Whole blood is the most suitable sample for diagnosis, but serum, saliva, or oral swabs may be viable alternatives. The main advantages of dPCR include that it does not require a standard curve for quantification, high tolerance to inhibitors, highly sensitive, very useful for target DNA detection in samples with low parasitic load and mixed infections, and the ability to detect rare genetic variants with great precision. However, the dPCR has some weaknesses, such as the possible saturation of the reaction in very concentrated samples and being expensive and laborious technique. For the future, dPCR is a promising technique for the diagnosis of malaria, but its application in endemic areas with limited resources requires the development of more affordable equipment. The main applications of the dPCR include diagnosis, analysis of drug resistance against the parasite, and vector control of the disease.

REFLEXIÓ SOBRE ÈTICA

En aquest treball bibliogràfic sobre la malària es plantegen algunes qüestions ètiques. En primer lloc, la pressió per publicar (“publish or perish”) pot arribar a provocar pràctiques poc ètiques com la manipulació de dades o el plagi (Wiedermann, 2016). Per això, s’ha revisat que els articles utilitzats per aquest treball hagin mantingut una revisió per parells (“peer review”), ja que d’aquesta manera es garanteix la validesa del treball, això no obstant, pot fer sorgir conflictes d’interessos per aquest procés (Ferguson *et al.*, 2014). En segon lloc, cal mantenir una bona transparència en la presentació de dades i divulgar els resultats negatius perquè així, farà que s’evitin biaixos i en conseqüència no es distorsionen els resultats ni es posarà en dubte la validesa dels treballs (Weintraub, 2016). I finalment, hi ha mecanismes que poden ajudar a mantenir la integritat del procés científic sense causar cap conducta no ètiques com són: PubPeer, Retraction Watch, etc. (Balyakina, 2022).

REFLEXIÓ SOBRE SOSTENIBILITAT

En tractar-se d’un treball bibliogràfic no s’ha fet ús del laboratori i, per tant, no s’ha produït residus. A més s’ha evitat imprimir els articles a treballar i s’ha procurat mantenir un consum baix de transport evitant així la contaminació, ja que la majoria de les reunions amb la tutora s’ha realitzat a través de la plataforma *Google Meet*, la qual cosa fa que es redueixin els desplaçaments.

REFLEXIÓ SOBRE PERSPECTIVA DE GÈNERE

En la ciència es mostra una representació de les dones bastant escassa, segons l’ONU (Organización de las Naciones Unidas), menys del 30% dels investigadors en àrees com la ciència o la tecnologia són dones. Això en part és a causa dels efectes de sostre de vidre o l’efecte Matilda que impedeixen el reconeixement de les dones en la ciència (ONU, 2021). Actualment, la síndrome de la impostora afecta moltes investigadores de manera que es perpetua la desigualtat tant en finançament (marcant així una bretxa salarial persistent), com en citacions i autories (Moss-Racusin *et al.*, 2012).

Pel que fa als articles escollits per aquest treball, d’entre els 12 seleccionats, hi ha un total de 10 autories diferents que compten com a primers autors. D’aquest total el 60% són homes i el 40% són dones, trobem que hi ha un petit biaix de gènere tot i que les dades no són representatives del conjunt de publicacions científiques.

1. Introducció

1.1 Breu perspectiva històrica

La malària o paludisme, és una infecció vectorial provocada per paràsits del gènere *Plasmodium* i transmesa pels mosquits femella del gènere *Anopheles*. La malaltia va ser denominada per primera vegada com a “malària” pel metge italià Francesco Totti (1658-1741), ja que en un inici es creia que la infecció es transmetia a través del “mal aire” (Fernández-Busquets, 2017). D'altra banda, el concepte de paludisme prové del llatí “palus” que significa pantà, i de la relació de la propagació de la infecció en zones pantanoses amb aigües estancades. Finalment, el britànic Ronald Ross (1857-1932), que va ser un metge, entomòleg i professor universitari, va demostrar l'any 1895 el desenvolupament i el cicle vital del paràsit *Plasmodium* sp. dins del mosquit *Anopheles*, el qual actua com a vector de transmissió de la infecció a través de la seva picada (Coleman-Jones, 1999).

1.2 Epidemiologia

Segons l'Organització Mundial de la Salut (OMS), l'any 2022 es van produir 249 milions de casos de malària que van donar lloc a 608.000 morts en un total de 85 països, la majoria concentrats a l'Àfrica (94% dels casos i 95% de les defuncions). Entre totes les morts per malària registrades a la regió africana, el 78% corresponen a menors de cinc anys, els que juntament amb les dones embarassades constitueixen la població de risc per a aquesta infecció (WHO, 2023). Els 11 països amb major càrrega de malària durant l'any 2023 van ser Burkina Faso, Camerun, la República Democràtica del Congo, Ghana, Índia, Mali, Moçambic, Níger, Nigèria, Uganda i la República Unida de Tanzània. D'aquests, els que registren un major risc de malària se situen a l'Àfrica central (Figura 1) (Yaundé & WHO, 2024).

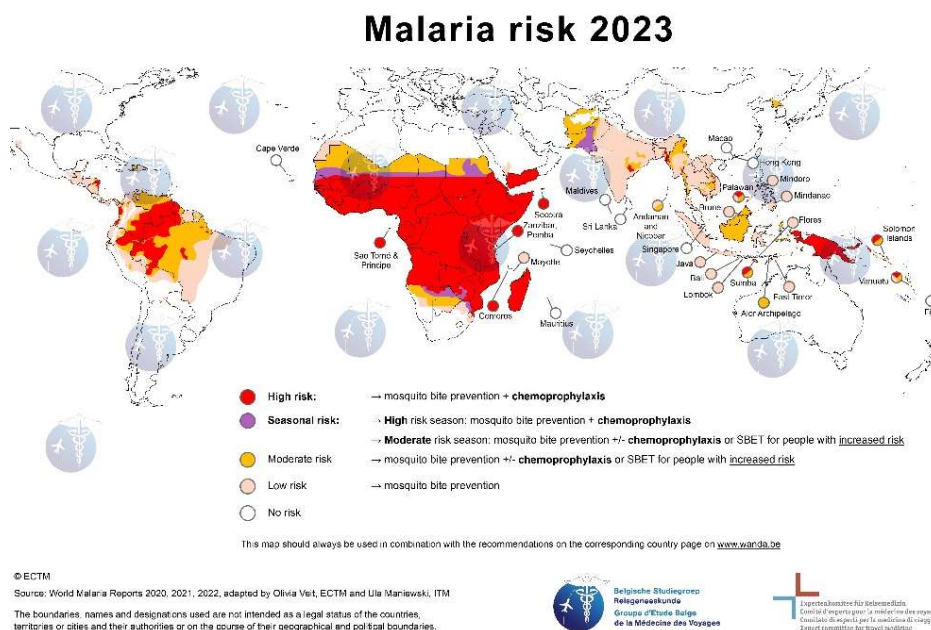


Figura 1. Mapa mundial del risc de malària durant l'any 2023 (Croughs & Maniewski, 2023).

1.3 L'agent causal de la malària: *Plasmodium* sp.

Plasmodium és un gènere de protists pertanyents al filum Apicomplexa, ordre Haemosporidia i família Plasmodiidae. Actualment, existeixen més de 175 espècies de *Plasmodium* sp. descrites dins de les quals n'hi ha cinc que es relacionen específicament amb la malària en humans: *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesi*, *P. falciparum* i *P. vivax*. D'aquestes, *P. falciparum* destaca per la seva elevada virulència i *P. vivax* per ser l'espècie més àmpliament estesa (Escalante & Ayala, 1994).

1.3.1 Cicle vital

El cicle de vida de *Plasmodium* sp. implica dos hosts: un mosquit femella del gènere *Anopheles* sp., que actua com a vector, i un hoste vertebrat (humans i altres primats). El paràsit es multiplica sexualment en el vector i de manera asexual a l'hoste vertebrat (Khan & Baik, 2020) (Figura 2).

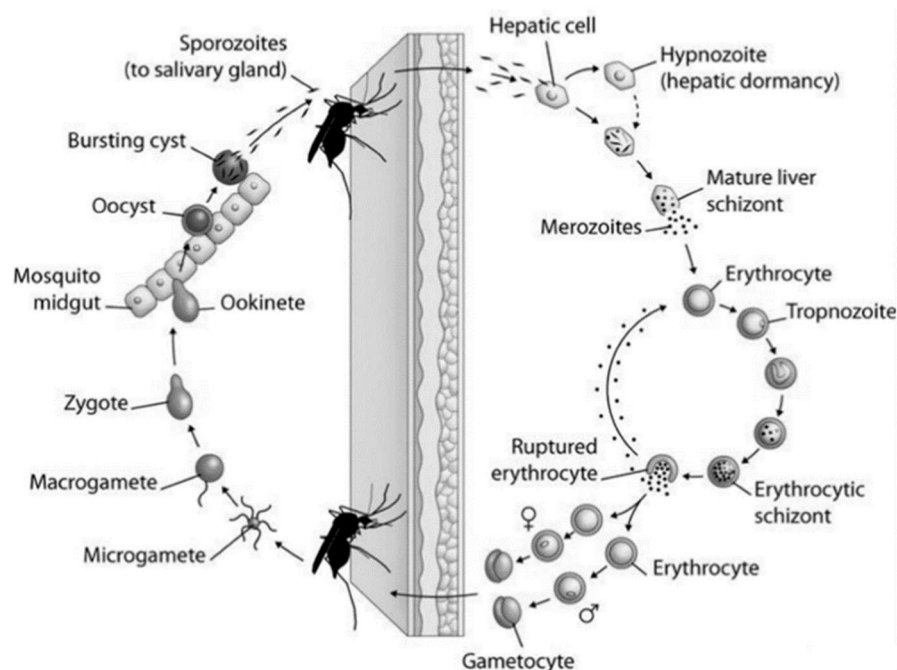


Figura 2. Esquema del cicle biològic del *Plasmodium* sp. (Khan & Baik, 2020).

El cicle vital de *Plasmodium* sp. s'inicia quan els paràsits en la seva forma infectiva d'esporozoït es transmeten a l'hoste humà a través de la saliva del mosquit femella *Anopheles* sp. quan pica. A continuació, els esporozoïts envaeixen les cèl·lules del fetge i maduren a esquizonts (Portal INSST, 2022). Quan els esquizonts es trenquen alliberen merozoïts, els que infecten els glòbuls vermells o eritròcits (Boyle *et al.*, 2010). D'aquest tipus de multiplicació asexual se'n diu esquizogònia exo-eritrocítica o hepàtica (Spencer *et al.*, 2016). En el cas d'algunes espècies de *Plasmodium* sp., com *P. vivax* i *P. ovale*, alguns dels esquizonts es poden mantenir latents durant un temps en forma d'hipnozoïts o esquizonts dorments, els quals passats de 6 a 11 mesos poden activar-se novament (Markus, 2010). Un cop al torrent circulatori, els merozoïts dins dels eritròcits passen a trofozoïts, en forma d'anell, i maduren a esquizonts que en trencar-se alliberen merozoïts al torrent sanguini (Ejigiri & Sinnis, 2009). Aquest

tipus de multiplicació asexual s'anomena esquizogònia eritrocítica. Alguns paràsits es diferencien a formes eritrocítiques sexuades anomenades gametòcits. Els gametòcits mascles (microgametòcits) i els femelles (macrogametòcits) són ingerits pel mosquit *Anopheles* durant la picada i es produeix la gametogènesi (Meibalan & Marti, 2016). La multiplicació sexual dels paràsits en el mosquit s'anomena cicle esporogònic. A l'estómac del vector, els microgametes penetren els macrogametes i es generen zigots. A continuació es formen els ooquins que envaeixen la paret de l'intestí mitjà del mosquit i passen a ooquistes. Aquests creixen, es trenquen i alliberen esporozoïts, els que es dirigeixen a les glàndules salivals del mosquit per ser inoculats a un altre hoste humà i tancar el cicle d'infecció (Barillas-Mury & Kumar, 2005).

1.3.2 Vies de transmissió

La via de transmissió principal és la vectorial, és a dir, a través de la picada del mosquit *Anopheles* sp. Aquest tipus de transmissió només es pot donar en les regions que es defineixen com a endèmiques per la malària, el que significa que l'insecte vector de la infecció hi és present. No obstant això, existeixen altres vies alternatives a la vectorial que es poden donar tant en zones endèmiques com en absència del mosquit *Anopheles* sp.: transfusió sanguínia, trasplantament d'òrgans, via parenteral a través de xeringues contaminades (sobretot en casos de drogodependència) i transmissió vertical o congènita, és a dir, de mares a fills durant l'embaràs (Portal INSST, 2022).

1.4 Simptomatologia

L'aparició dels primers símptomes coincideix amb l'arribada del paràsit al torrent circulatori, 10-15 dies després de la picada del mosquit *Anopheles* infectat (OMS, 2024), però el temps d'incubació és variable segons l'espècie de *Plasmodium* (Pereira & Pérez, 2002). Tot i que els primers símptomes són molt inespecífics i sovint es poden confondre amb altres infeccions, els primers senyals d'alerta són la febre elevada amb calfreds després d'una estada en una zona endèmica de malària. En un inici, els símptomes més comuns són sensació de malestar, mal de cap, nàusees, vòmits i diarrees que progressen a fatiga, dolor muscular, dolor abdominal, tos, convulsions i dificultat respiratòria (Calvo & Méndez, 2020). Si no es tracta a temps, avança fins a insuficiència renal, convulsions, confusió mental, coma i mort. La simptomatologia més greu rep el nom de malària complicada i es produeix en la majoria de casos de la malaltia produïts per *P. falciparum* (Bartoloni & Zammarchi, 2012).

1.5 Tractament

El principal objectiu del tractament és eliminar de manera ràpida i total els paràsits *Plasmodium* sp. del torrent circulatori de la persona afectada. D'aquesta manera s'evita la progressió cap a una simptomatologia més greu que pot derivar en malària complicada. Cal instaurar el tractament amb la prestesa més gran possible un cop diagnosticada la infecció (Muñoz *et al.*, 2015). La malària se sol tractar amb el medicament antipalúdic Cloroquina, tanmateix, com que *P. falciparum* ha desenvolupat certa resistència al fàrmac, actualment es fa teràpia combinada amb Artemisina per fer

front als casos de malària produïts per aquesta espècie de *Plasmodium* sp. (Nosten & White, 2007).

Per altra banda, els repel·lents de mosquits i les mosquiteres impregnades amb insecticida es fan servir com a mesures preventives. En cas de viatjar a zones endèmiques de malària també es recomana prendre tractament quimioprolàctic (Rojo-Marcos & Cuadros-González, 2016).

1.6 Diagnòstic

Davant d'una sospita de la infecció a causa d'una simptomatologia compatible, la malària es pot diagnosticar mitjançant mètodes microscòpics, immunològics i/o moleculars. El diagnòstic microscopi es basa primerament en la tècnica de la gota gruixuda que consisteix en la presa d'una mostra de sang per la seva observació al microscopi (Tuteja, 2007). Aquest mètode és útil per detectar el paràsit a l'interior dels eritròcits, ja que concentra una gran quantitat de sang, però no en permet identificar l'espècie. Per això, si la gota gruixuda és positiva es realitza una gota fina o un frotis utilitzant la tinció amb el colorant Giemsa (Figura 3) (Jan *et al.*, 2018). El principal avantatge dels mètodes parasitològics és el seu baix cost, però, són altament dependents de la destresa i l'experiència del tècnic que fa l'observació i poden conduir fàcilment a falsos negatius (Siahaan, 2018).

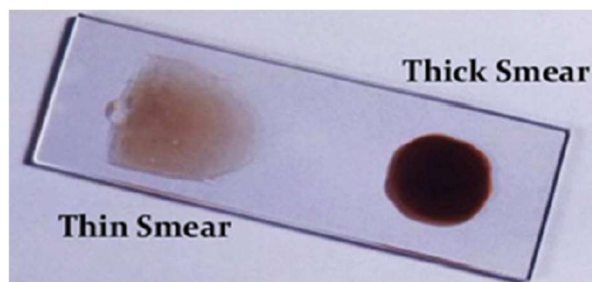


Figura 3. Tècniques de la gota gruixuda (thick smear) i la gota fina (thin smear) (Jan *et al.*, 2018).

En el cas del diagnòstic immunològic o serològic, es basa en la detecció d'anticossos anti-*Plasmodium* sp. aprofitant la reacció antígen-anticòs utilitzant tècniques com l'ELISA (de l'anglès *enzyme-linked immunosorbent assay*). La serologia és molt útil pel cribratge de donants de sang i per estudis epidemiològics però no per detectar la infecció aguda, ja que els anticossos enfront del paràsit poden perdurar durant temps al torrent circulatori dels afectats no permetent la diferenciació entre una infecció passada i una d'actual (Mathison & Pritt, 2017). Per altra banda, hi ha una variant d'aquest tipus de diagnòstic que són els tests de diagnòstic ràpid o RDTs (de l'anglès *rapid diagnostic tests*). Els RDTs es basen en la detecció en sang d'antígens de *Plasmodium* sp. utilitzant principalment la immunocromatografia (Figura 4) (Turrientes & López-Vélez, 2000). Aquests tests permeten obtenir resultats de manera senzilla i ràpida, però, per contra, són poc sensibles i poden donar lloc a falsos negatius (Mathison & Pritt, 2017).

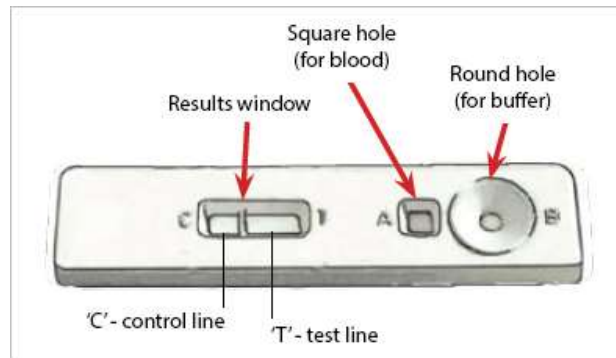


Figura 4. RDT pel diagnòstic de la malària (OMS, 2024).

Finalment, el diagnòstic de la malària es pot realitzar mitjançant tècniques moleculars o NAATs (de l'anglès, *nucleic acid amplification test*). El diagnòstic molecular es basa en l'amplificació del material genètic del paràsit. Dins del diagnòstic molecular, la PCR és la tècnica més utilitzada i també la seva variant quantitativa, la PCR a temps real o real-time PCR (qPCR) (Figura 5). Les tècniques moleculars tenen l'avantatge que són molt més sensibles que les anteriors i són especialment útils per a la detecció de les infeccions mixtes. També s'han desenvolupat altres tècniques moleculars alternatives com el LAMP (de l'anglès, *Loop-Mediated Isothermal Amplification*) que permet l'amplificació d'ADN a temperatura isotèrmica sense necessitat d'equipaments sofisticats (Sattabongkot *et al.*, 2018). Més recentment, la PCR digital (dPCR) s'ha postulat com a una possible eina de detecció i quantificació absoluta dels paràsits *Plasmodium* sp. facilitant-ne el diagnòstic i permetent la classificació en les diferents espècies causants de la malària (Pomari *et al.*, 2020).

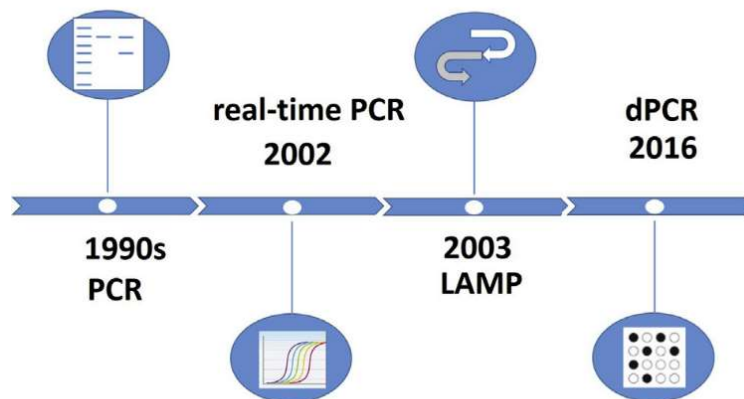


Figura 5. Cronograma de les diferents tècniques moleculars que s'apliquen per a la detecció de paràsits. Modificat de Pomari *et al.*, 2019.

2. AIM

In this framework, the objective of the present Bachelor's Thesis is to study the basis of the digital PCR and its application to malaria diagnosis in order to evaluate the technique as a possible diagnostic alternative for *Plasmodium* sp. infection.

3. Material i mètodes

La cerca bibliogràfica es va fer durant els mesos de desembre del 2023 i gener i febrer de 2024 a través de la base de dades *Web of Science* (WOS), inclosa dins del portal de la *Fundación Española para la ciencia y la Tecnología* (FECYT).

Dins la plataforma, es van realitzar un total de sis cerques diferents amb les següents paraules clau: “malaria AND digital PCR”, “malaria AND dPCR”, “malaria AND ddPCR”, “Plasmodium AND digital PCR”, “Plasmodium AND dPCR”, “Plasmodium AND ddPCR”. Es van incloure tots els resultats fins a la data de cerca tenint en compte tant articles originals com revisions bibliogràfiques. Es van realitzar aquestes mateixes cerques a les bases de dades Scopus i Pubmed per comprovar que no s’obtenien nous resultats.

Seguidament, es va fer una lectura general dels títols i resums dels resultats per a cada cerca per tal d’acceptar o rebutjar els articles segons si contenien informació rellevant pel treball. El principal motiu d’exclusió va ser que l’enfocament del treball no anava dirigit específicament a la malària o bé s’utilitzaven altres mètodes moleculars diferents de la dPCR. Finalment, es va procedir a la lectura dels articles seleccionats per tal d’analitzar-ne i sintetitzar-ne el contingut.

4. Resultats i discussió

4.1 Anàlisi dels articles seleccionats

La primera cerca amb les paraules clau “malaria AND digital PCR” va obtenir un total de 30 resultats i se’n van seleccionar 15. Dels 15 restants, se’n van descartar 10 perquè que no utilitzaven la PCR digital sinó la PCR convencional, la PCR quantitativa o altres tècniques com el FISH o el Northern Blot, i els darrers cinc últims perquè se centraven en la transmissió de la infecció o en algorismes diagnòstics basats en microscòpia òptica. La segona cerca amb les paraules clau “malaria AND dPCR” va obtenir quatre resultats que van ser seleccionats pel treball. Seguidament, es va fer la cerca “malaria AND ddPCR” i es van obtenir 20 resultats. D’aquests, 13 ja formaven part de la llista d’articles seleccionats, tres ja s’havien descartat anteriorment i els quatre restants es van descartar perquè no tractaven sobre PCR digital com a eina diagnòstica. A continuació, es fa la cerca amb “Plasmodium AND digital PCR” va donar 26 possibles resultats que no van ser inclosos a la llista de seleccionats perquè ja s’havien seleccionat (13) o descartat (12) en cerques anteriors o bé no tractaven el tema objectiu del treball (1). “Plasmodium AND dPCR” va donar un total de tres cerques les quals dues estaven ja seleccionades i l’última restant es va descartar perquè utilitzava un altre tipus de dPCR. L’última cerca va ser “Plasmodium AND ddPCR” la qual tenia 15 resultats on 10 dels totals ja formaven part del llistat d’articles seleccionats, quatre dels possibles resultats ja estaven descartats, i l’últim novament no tractava de la tècnica a voler analitzar.

Tanmateix, es va fer una revisió dels possibles articles que formarien part del llistat definitiu i es van descartar un total de set articles, els quals no se centraven en la malària sinó que ho feien en els mosquits, tractaven altres gèneres de paràsits

diferents de *Plasmodium*, o bé perquè no feien ús de la tècnica que es vol analitzar (Figura 6).

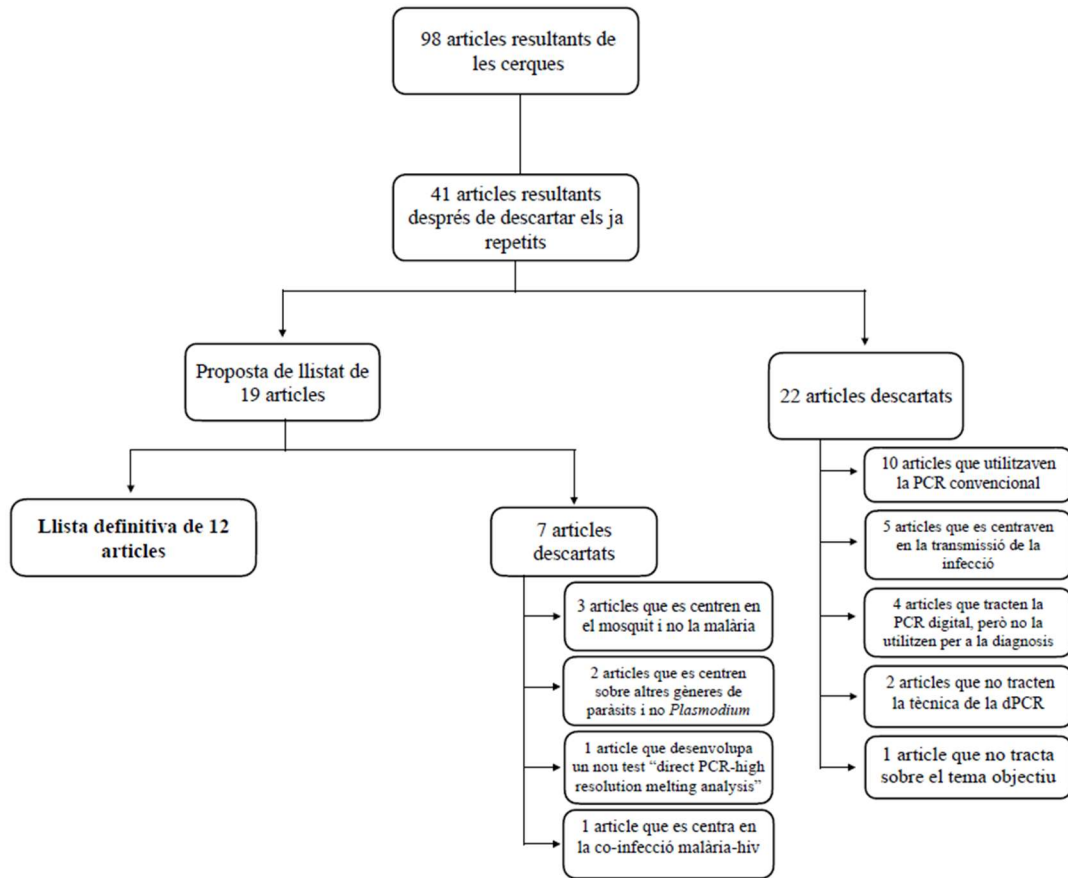


Figura 6. Esquema del procés de selecció dels articles pel treball. Elaboració pròpia.

Aquests 12 articles finals estan distribuïts en vuit àmbits científics o categories dins del cercador de la base de dades WOS tal com es mostra en la Figura 7.



Figura 7. Nombre d'articles seleccionats en les vuit categories diferents segons els àmbits científics determinats pel cercador de la base de dades WOS.

Dins de les categories seleccionades pel cercador WOS pels 12 articles inclosos en el present treball, la predominant és *Infectious Diseases*. És important destacar que un mateix article pot estar inclòs en més d'una categoria. A la Taula 1, es troben representats els 12 articles de manera individual indicant a quines categories es troben inclosos cadascun d'ells.

Taula 1. Representació dels 12 articles seleccionats a través de WOS de més recent, a més antic, i classificats segons les diferents categories amb un codi de color en funció de l'àmbit científic al qual pertanyen. La llegenda de colors està establerta a la part inferior de la taula.

Article	Referència	Categories			
Multiplexed ddPCR-amplicon sequencing reveals isolated <i>Plasmodium falciparum</i> populations amenable to local elimination in Zanzibar, Tanzania	Holzschuh <i>et al.</i> (2023)				
A rapid multiplex assay of human malaria parasites by digital PCR	Dong <i>et al.</i> (2023)				
High-throughput <i>Plasmodium falciparum</i> hrp2 and hrp3 gene deletion typing by digital PCR to monitor malaria rapid diagnostic test efficacy	Vera-Arias <i>et al.</i> (2022)				
Improving the Molecular Diagnosis of Malaria: Droplet Digital PCR-Based Method Using Saliva as a DNA Source	Costa <i>et al.</i> (2022)				
Highly sensitive droplet digital PCR-based diagnostics for the surveillance of malaria vector populations in low transmission and incipient resistance Settings	Mavridis <i>et al.</i> (2021)				
Measurement of gene amplifications related to drug resistance in <i>Plasmodium falciparum</i> using droplet digital PCR	Srisutham <i>et al.</i> (2021)				
Droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) for the detection of <i>Plasmodium knowlesi</i> and <i>Plasmodium vivax</i>	Mahendran <i>et al.</i> (2020)				

Droplet Digital PCR for the Detection of Plasmodium falciparum DNA in Whole Blood and Serum: A Comparative Analysis with Other Molecular Methods	Pomari <i>et al.</i> (2020)				
Digital PCR: a new technology for diagnosis of parasitic infections	Pomari <i>et al.</i> (2019)				
Assessing Plasmodium falciparum transmission in mosquito-feeding assays using quantitative PCR	Wang <i>et al.</i> (2018)				
Four human Plasmodium species quantification using droplet digital PCR	Srisutham <i>et al.</i> (2017)				
Sensitive and accurate quantification of human malaria parasites using droplet digital PCR (ddPCR)	Koepfli <i>et al.</i> (2016)				

	Infectious Diseases		Medical Laboratory Technology
	Microbiology		Biology
	Parasitology		Tropical Medicine
	Multidisciplinary Sciences		Pathology

Com es pot apreciar a la Taula 1, hi ha tres articles (Srisutham *et al.*, 2021, Mahendran *et al.*, 2020 i Wang *et al.*, 2018) que es troben en un màxim de tres categories que són *Infectious Diseases*, *Parasitology* i *Tropical Medicine*. Mentre que la resta d'articles, exceptuant Pomari *et al.* (2019) que s'inclou en dos, es troben en una sola categoria que varia entre elles on la més present és la *Multidisciplinary Sciences*.

En referència a l'any de publicació dels articles (Figura 8), es tracta de publicacions recents, ja que l'article més antic es va publicar l'any 2016. L'any amb més publicacions és el 2022 amb tres articles. Pel que fa a les citacions, el pic es troba en els anys 2021-2022 amb més de 50 citacions anuals. L'any 2024 no s'hauria de tenir en compte, ja que les cerques es van fer entre el mes de desembre de 2023 i gener-febrer de 2024.

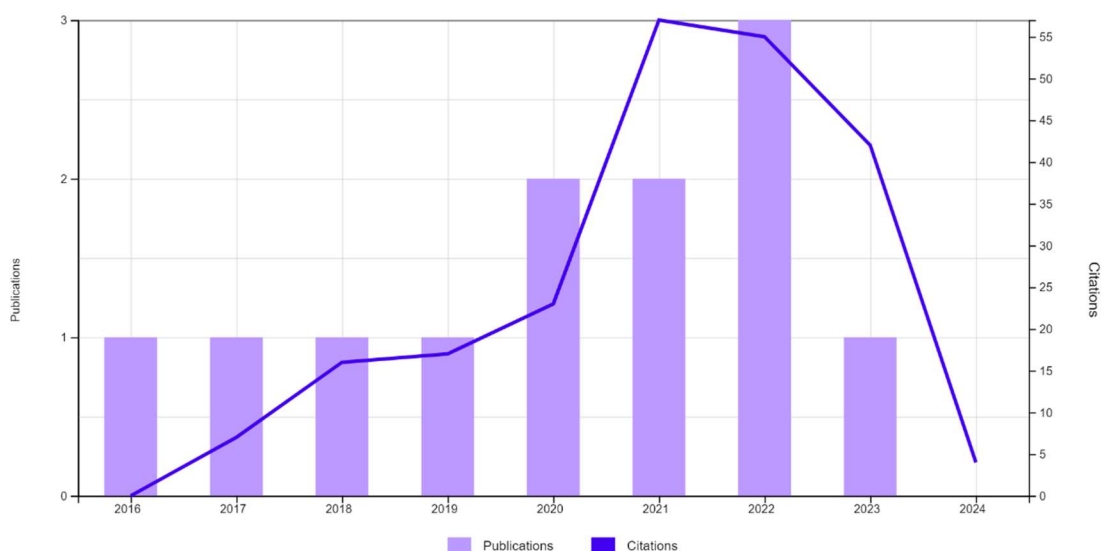


Figura 8. Nombre d'articles citats per any (línia contínua) i nombre d'articles publicats per any (barres) dels articles seleccionats a la base de dades de WOS fins al mes de març de 2024.

En relació amb les citacions de cada article de manera independent (Figura 9), l'article més citat és Koepfli *et al.* (2016) amb un total de 72 citacions. Aquest article planteja l'ús de la Droplet Digital PCR (ddPCR) per diagnosticar i quantificar *P. falciparum* i *P. vivax* en humans. D'altra banda, s'observa una tendència d'augment del nombre de citacions com més anys fa que l'article és publicat, el que és lògic. Tot i això, hi ha excepcions, ja que articles més recents com Vera-Arias *et al.* (2022) acumula 11 citacions, el qual se centra més en les deleccions dels gens que codifiquen les proteïnes dels RDTs.

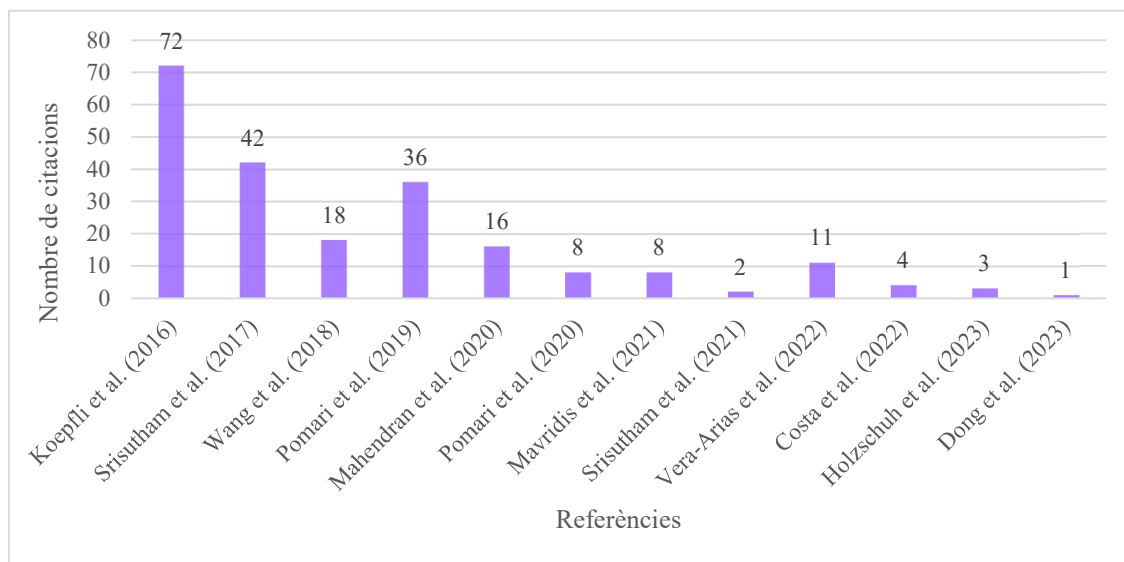


Figura 9. Nombre de citacions dels articles seleccionats pel treball. Des de la data de publicació fins a la data actual (març de 2024).

El contingut dels 12 articles s'ha dividit en diferents seccions que es mostren a continuació.

4.2 La tècnica de la PCR digital

4.2.1 Base del mètode

La dPCR és una tècnica innovadora i potent que permet fer una quantificació absoluta de manera molt precisa de la concentració de genomes parasitaris presents en una mostra concreta (Dong *et al.*, 2023). La base de la tècnica té moltes similituds amb la qPCR, però la singularitat de la dPCR recau en la divisió de la mostra en milers de reaccions individuals abans de l'amplificació. Mitjançant la distribució aleatòria de les molècules d'ADN en particions, a diferència de l'anàlisi en bloc de la qPCR, es minimitza l'efecte de les molècules diana que competeixen entre si i s'aconsegueix millorar la precisió i sensibilitat en la detecció de molècules poc freqüents (Costa *et al.*, 2022). Existeix una variant de la dPCR anomenada *droplet digital PCR* o PCR digital basada en gotes (ddPCR). La diferència entre la dPCR i la ddPCR és el mètode de divisió de la mostra (Figura 10). En la dPCR la partició de la mostra es basa en una nanoplaca en la que la mostra es divideix de manera física en una placa de microfluids amb nanopouets. En la ddPCR, la mostra es divideix en milers de gotes d'aigua-oli emulsionades que seran després analitzades una a una (Sánchez-Martín *et al.*, 2024). Pel que fa a l'amplificació, la dPCR utilitza un termociclador pla que permetrà recollir les dades en una imatge mitjançant l'escaneig mentre que en la ddPCR l'amplificació es dona a l'interior d'un tub de microcentrifuga i mitjançant un lector de fluorescència es comptaran les gotes positives i negatives. Finalment, totes dues variants donen resultats visuals on es determinen les mostres positives i negatives segons la seva fluorescència. Per cada assaig, s'estableix un punt de tall a partir del qual la fluorescència emesa es considera a conseqüència d'una mostra positiva i no com a soroll de fons (Costa *et al.*, 2022).

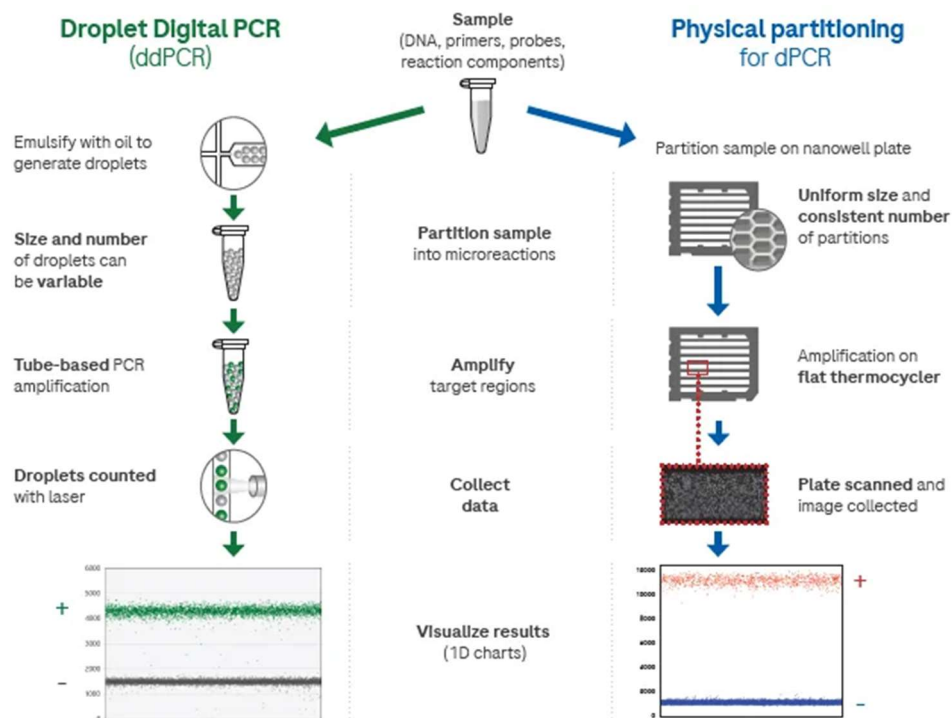


Figura 10. Comparativa entre la partició de mostres emulsionades de la ddPCR en vers a la partició física de dPCR (Roche Sequencing and Life Science, 2024).

En els diferents estudis s'utilitza com a tècnica principal la dPCR o bé la ddPCR, però el principi de la tècnica és el mateix en ambdós casos. Cada mostra analitzada amb dPCR o ddPCR es divideix en unes 15.000 particions i en cadascuna d'elles es realitzarà una PCR de punt final o *end-point* (Vera-Arias *et al.*, 2022). A cada partició hi consten els reactius necessaris per portar a terme la reacció d'amplificació de l'ADN incloent els encebadors i les sondes fluorescents que solen ser de tipus TaqMan. Generalment, el gen diana per a la quantificació de les diferents espècies de *Plasmodium* és el 18S rRNA (Srisutham *et al.*, 2021; Koepfli *et al.*, 2016). Després de realitzar aproximadament 40 cicles de PCR, s'analitza cada partició en el lector corresponent i es determina si és positiva (emissió de fluorescència) o negativa (absència de fluorescència) (Srisutham *et al.*, 2017). De manera general, es considera positiu quan hi ha com a mínim una còpia/ μL que s'amplifica (Pomari *et al.*, 2020). Seguidament, es fa un comptatge del nombre de particions positives amb el producte d'amplificació i negatives, i això permet fer una estimació de la densitat del motlle sense la necessitat de realitzar una corba estàndard aplicant una anàlisi estadística de Poisson (Koepfli *et al.*, 2016). Per tant, la dPCR permet determinar la concentració absoluta de l'ADN diana present a la mostra inicial sense dependre d'una referència (Dong *et al.*, 2023).

Cal destacar que en aquest TFG s'ha inclòs estudis que utilitzen la PCR digital en les seves dues variants, dPCR i ddPCR. A partir d'aquest punt endavant, quan es tracti la dPCR s'estarà incloent indirectament la ddPCR i viceversa. Tanmateix, s'especificarà explícitament en quins casos la tècnica usada és la ddPCR.

4.3 Tipus de mostra

És essencial seleccionar adequadament el tipus de mostra a analitzar, ja que això pot influir en la precisió i la fiabilitat dels resultats. Entre els diferents tipus de mostra, la més usada és la sang perquè conté alts nivells d'eritròcits on es poden trobar els paràsits *Plasmodium*. No obstant això, Pomari *et al.* (2020) va valorar l'eficàcia de la ddPCR per a la detecció d'ADN de *P. falciparum* tant en sang com en sèrum en comparació amb LAMP i qPCR. L'estudi va partir de 52 mostres de sang i sèrum de 26 pacients diagnosticats amb malària per *P. falciparum* mitjançant diagnòstic microscòpic. A partir de les mostres de sang, les tres tècniques van aconseguir una sensibilitat del 100%. Pel que fa a les mostres de sèrum, la ddPCR va ser la tècnica que va obtenir un major nombre de mostres positives (77%, 20/26) en comparació amb la qPCR (17/26) i el LAMP (16/26) (Taula 2). Els autors conclouen que l'ús de la ddPCR en mostres de sèrum pot ser una bona aproximació per a la detecció d'ADN de *Plasmodium* quan les mostres de sang no estiguin disponibles (Pomari *et al.*, 2020).

Taula 2. Resultats de la comparativa entre les mostres de sang (*whole blood*) i les mostres de sèrum (*serum*) amb les diferents tècniques: LAMP, qPCR (rtPCR) i ddPCR. La parasitèmia s'expressa com a nombre de trofozoïts/ μL de sang determinat mitjançant el microscopi, el % iRBCs expressa el percentatge d'eritròcits infectats contats amb el microscopi, nd: no detectats i nv: no vàlids. Recuperada de Pomari *et al.*, (2020).

Patient ID	Trophozoites/ μL Blood	%iRBCs	LAMP Wholeblood	LAMP Serum	rtPCR (Ct) Wholeblood	rtPCR (Ct) Serum	ddPCR (Copies/ μL Blood) Wholeblood	ddPCR (Copies/ μL Serum) Serum
P1	383,460	9.15	Positive	Positive	20.05	34.85	9350	608.178
P2	366,000	9.5	Positive	Positive	21.89	21.42	5588	780.267
P3	196,930	4.7	Positive	Positive	21.69	37.12	5654	39.111
P4	159,544	2.96	Positive	Positive	18.88	24.58	21,109	107.36
P5	159,120	5.2	Positive	nv	20.37	nd	3916	221.467
P6	135,135	3.85	Positive	nv	19.07	33.95	8228	611.6
P7	118,800	3.37	Positive	Positive	16.89	23.66	82,500	337.92
P8	109,470	2.05	Positive	Positive	18.91	40.16	8668	nd
P9	97,600	2.44	Positive	Negative	18.51	nd	13,002	nd
P10	96,400	2.41	Positive	Positive	18.55	24.4	10,230	155.76
P11	32,560	0.55	Positive	nv	22.65	nd	2926	nd
P12	31,790	0.85	Positive	Negative	21.22	nd	8448	nd
P13	24,610	1.15	Positive	Negative	21.76	44.85	6644	0.152
P14	8076	0.184	Positive	Positive	23.51	nd	1476.2	268.4
P15	6409	0.15	Positive	Positive	28.42	32.93	80.52	80.178
P16	6133.5	0.1557	Positive	Positive	21.15	25.08	7601	63.184
P17	4620	0.092	Positive	Positive	26.89	30.86	191.4	2.249
P18	2764	0.0507	Positive	Positive	26.31	27.14	242	108.044
P19	2613	0.0549	Positive	nv	26.04	nd	391.6	7.676
P20	332.5	0.0088	Positive	Positive	27.29	29.8	25.74	5.104
P21	189	0.0043	Positive	Positive	30.83	45.26	14.3	0.093
P22	95.4	0.0023	Positive	Negative	31.45	nd	11.88	0.152
P23	76.5	0.0014	Positive	Negative	33.38	nd	1.54	nd
P24	39.5	0.0008	Positive	Positive	31.76	40.29	9.24	1.662
P25	17.5	0.0003	Positive	Negative	34.5	nd	1.276	nd
P26	17	0.0004	Positive	Positive	30.7	32.22	5.72	0.484

Per altra banda, Costa *et al.* (2022) va afegir com a possibles mostres de partida per la ddPCR tant la saliva com el frotis bucal mitjançant l'ús d'un hisop. L'estudi va analitzar la presència d'ADN de *Plasmodium* sp. per ddPCR en mostres de saliva, frotis bucal i sang de 157 pacients susceptibles de patir malària utilitzant com a dianes gens multicòpia no ribosomals de *P. vivax* (Pvr47) i *P. falciparum* (Pfr364). Els resultats obtinguts es van comparar amb els obtinguts per qPCR. Els resultats de sensibilitat de les dues tècniques pels diferents tipus de mostra es mostren a la Taula 3.

Taula 3: Resultats de la comparativa entre la sensibilitat de la tècnica pels diferents tipus de mostra de l'estudi de Costa *et al.*, (2022). Elaboració pròpia.

	Sensibilitat qPCR (%)	Sensibilitat ddPCR (%)
Sang	93	99
Saliva	77	73
Frotis bucal	47	59

La ddPCR va ser més sensible que la qPCR en sang i frotis bucal però no en saliva. Es va detectar una bona concordança entre els resultats obtinguts amb les dues tècniques moleculars. També cal destacar que la ddPCR va permetre detectar més casos d'infeccions mixtes que la qPCR en sang (15%), saliva (9%) i frotis bucal (9%). Tot i que en comparació amb la sang, la saliva i el frotis bucal, presenten una menor sensibilitat, aquest tipus de mostres reforcen el potencial en el diagnòstic de la malària per la facilitat i la rapidesa en l'obtenció de la mostra. Per tal d'obtenir uns bons

resultats pel que fa a la sensibilitat i esquivar els falsos negatius cal combinar aquest tipus de mostres amb tècniques potents com la ddPCR (Costa *et al.*, 2022).

En resum, l'ús de mostres alternatives a la sang només és factible si es combinen amb tècniques altament sensibles, ja que calen mètodes més potents per arribar als mateixos resultats que amb la sang com a mostra de partida (Pomari *et al.*, 2020; Costa *et al.*, 2022).

4.4 Punts forts

La dPCR presenta una sèrie d'avantatge respecte a les altres tècniques moleculars existents. Tal com remarquen tots els estudis seleccionats en aquest TFG, el principal punt fort de la dPCR és que no requereix una corba estàndard o recta patró per a quantificar l'ADN diana present a la mostra problema, ja que realitza una quantificació absoluta en cadascuna de les particions que se subdivideix la mostra. Aquest fet l'hi atorga una precisió molt elevada en la quantificació. A més, aquesta precisió la fa ideal per a la detecció de SNPs (de l'anglès, *single nucleotide polymorphisms*) rars o presents en baixa freqüència, els que són especialment importants per la seva potencial influència en la resistència als fàrmacs utilitzats en el tractament de la malària (Pomari *et al.*, 2019).

La seva elevada sensibilitat respecte altres tècniques de diagnòstic molecular, fa que la dPCR sigui especialment útil per a la detecció de *Plasmodium* sp. en mostres amb baixa càrrega parasitària, el que pot incloure casos asimptomàtics, i també en infeccions mixtes que involucrin diferents espècies dins del gènere *Plasmodium* (Mahendran *et al.*, 2020; Pomari *et al.*, 2020; Dong *et al.*, 2023).

Un altre clar avantatge de la dPCR és que és altament tolerant als inhibidors de PCR, el que facilita la tasca dels laboratoris i fa disminuir les taxes de falsos negatius (Dong *et al.*, 2023; Pomari *et al.*, 2019).

4.5 Punts febles

Malgrat tots els seus beneficis, la dPCR també presenta algunes limitacions. Degut precisament a l'elevada sensibilitat de la tècnica que la fa especialment interessant per diagnosticar la malària quant la concentració de *Plasmodium* sp. és baixa, la dPCR pot arribar a saturar la reacció d'amplificació quan la càrrega parasitària és molt elevada. Una possible solució per aquesta limitació és diluir les mostres d'ADN de manera que la concentració en la qual treballi la dPCR sigui la idònia per a una bona execució (Pomari *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2018).

Tot i que es descriuen pocs inconvenients, els més reiterats són el temps i el cost de la reacció que són excessius, sumats a la seva complexitat en termes de preparació de mostres, pot acabar limitant l'ús de la tècnica pel diagnòstic de rutina. En l'estudi de Srisutham *et al.* (2017), s'exposa una alternativa per a reduir els costos que consta en dur a terme la ddPCR de manera dúplex/múltiplex, és a dir mitjançant la detecció simultània de dos o més gens diana (Jeon & Eom, 2024). En aquest estudi es van comparar dues ddPCRs *duplex*, una per *P. falciparum* i *P. vivax* i l'altra per *P. malariae* i *P. ovale*, amb ddPCRs en format *simplex* amb diana a cadascuna de les quatre espècies del gènere *Plasmodium* per separat. Totes les reaccions tenien com a diana el gen 18s rRNA. No es van observar diferències significatives en la quantificació de les diferents espècies pel format *simplex* i el *duplex* (Figura 11).

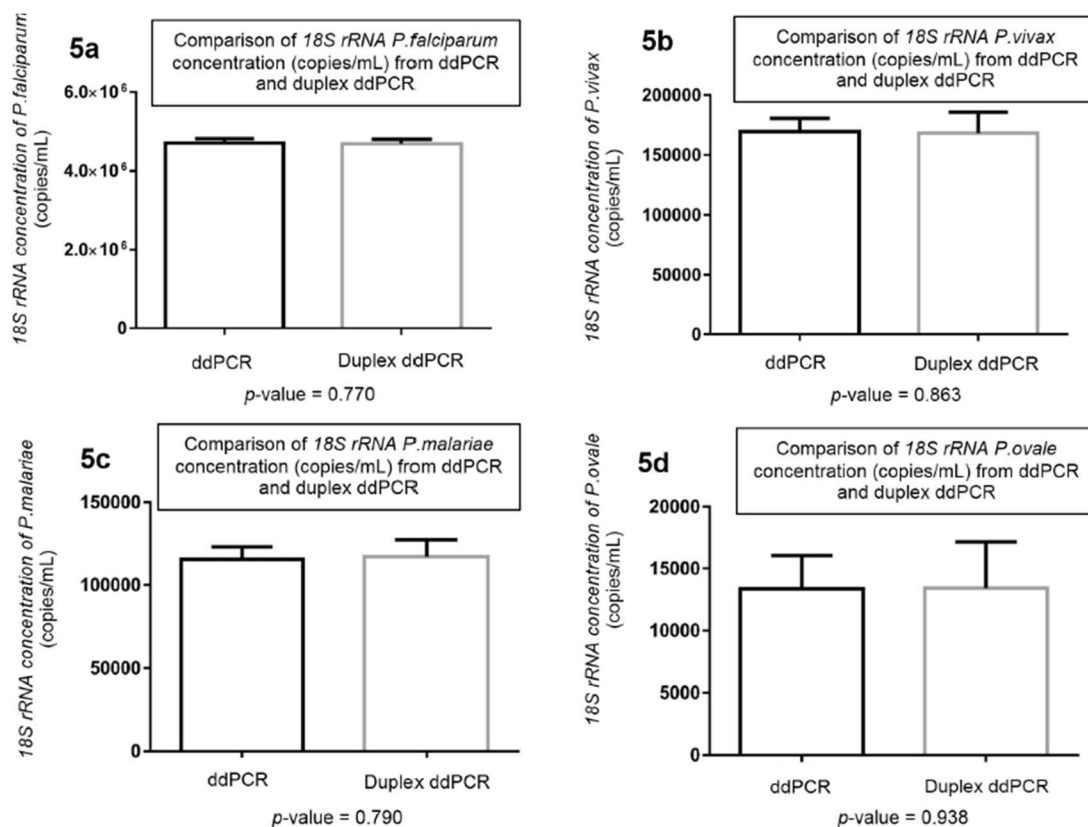


Figura 11. Gràfic de barres que mostra 18S rRNA còpies/mL de sang obtinguts dels assajos de la reacció ddPCR *simplex* i la ddPCR dúplex (Srisutham *et al.*, 2017).

Per tant, l'ús de la ddPCR *duplex* es proposa com a un bon recurs per estalviar costos en el diagnòstic de la malària (Srisutham *et al.*, 2017). Srisutham *et al.* (2021) indica que fent ús del format múltiplex, s'aconsegueix reduir costos en un 47% i baixar en un 50% el temps de realització passant de 12 hores totals a sis hores. De manera optimista, Pomari *et al.* (2019) i Mavridis *et al.* (2021) mencionen que els costos disminuiran en un futur pròxim quan augmenti l'ús de la tècnica i es desenvolupin noves plataformes més assequibles relacionades amb la dPCR. Segons els autors, aquest fet permetrà que deixi de ser una tècnica secundària de diagnòstic i que se'n globalitzi el seu ús.

Per últim, una alta flaqueza és la necessitat d'un equip tècnic específic i sofisticat per dur a terme la dPCR. Aquest fet limita l'aplicació de la tècnica a laboratoris de referència i en fa prohibitiu l'ús en zona amb recursos escassos. Precisament en aquestes zones amb clares limitacions, els anomenats tests POC (de l'anglès *point-of-care*) pel diagnòstic de la malària són especialment interessants. Es tracta de tests de diagnòstic ràpid (RDTs) que permeten diagnosticar la infecció *in situ* i de manera ràpida en uns 10 minuts sense la necessitat de cap laboratori (Lin *et al.*, 2023). D'aquesta manera es pot instaurar el tractament amb prestesa en cas d'un resultat positiu. Malgrat això, aquests tests ràpids són poc sensibles, no quantifiquen la càrrega parasitària ni permeten determinar l'espècie causant de la infecció pel que, una vegada determinada la malaltia, caldria verificar aquests paràmetres en un laboratori especialitzat.

4.6 Principals aplicacions de la dPCR

4.6.1 Diagnòstic

Com s'ha comentat en apartats anteriors, gràcies a la seva resistència als inhibidors i a la seva alta precisió en la quantificació dels resultats, és idònia pel diagnòstic (Srisutham *et al.*, 2021; Costa *et al.*, 2022). Srisutham *et al.* (2017) remarca que la dPCR és molt útil per detectar nivells baixos de parasitemia i coinfecció. Costa *et al.* (2022) insisteix en la necessitat d'un mètode que detecti al paràsit causant de la malària en baixes concentracions, ja que més del 50% dels casos de la infecció no són detectats a temps per microscòpia i passen a ser casos de malària complicada. Pomari *et al.* (2020) també recolza l'ús de la ddPCR per augmentar la sensibilitat de la detecció per *Plasmodium* sp.

4.6.2 Anàlisi de la resistència de fàrmacs anti-malària

La resistència dels paràsits del gènere *Plasmodium* als fàrmacs anti-malària és un aspecte crític pel que fa a la gestió de la infecció. L'estudi de Holzschuh *et al.* (2023) destaca l'ús de la dPCR per a l'anàlisi de la resistència a l'artemisinina, un dels tractaments més eficients contra les infeccions per *P. falciparum*. L'alta capacitat de detecció de forma molt precisa de la dPCR permet detectar i quantificar les mutacions rares. Una detecció precoç de la resistència pot influir en el subministrament dels tractaments i poder atacar eficientment les diferents espècies de *Plasmodium* causants de la infecció (Vera-Arias *et al.*, 2022). Srisutham *et al.* (2021) també proposen la ddPCR com a una eina molt valuosa per a la vigilància genètica de la resistència als fàrmacs antipalúdics.

4.6.3 Control vectorial de la malària

El control dels mosquits vectors de la malària és clau per tal d'aconseguir l'eliminació de la infecció (Wang *et al.*, 2021). La ddPCR s'ha proposat com a una tècnica útil per a la detecció de la infecció en els mosquits *Anopheles* que transmeten la malaltia, d'aquesta manera es poden realitzar estudis epidemiològics en les zones endèmiques i dirigir les campanyes de control vectorial (Mavridis *et al.*, 2021). La ddPCR es pot utilitzar per detectar gens que confereixin resistència als insecticides en les poblacions

de vectors, cosa que permet mantenir un control vectorial de manera més precisa i eficient (Vera-Arias *et al.*, 2022). Tanmateix, la capacitat de tolerar inhibidors que poden ser presents en les mostres de camp l'hi atorga a la ddPCR un valor afegit per ser aplicada com a tècnica de monitoratge en els programes de control vectorial (Pomari *et al.*, 2020; Dong *et al.*, 2023).

4.7 dPCR en vers altres mètodes

4.7.1 dPCR vs. microscòpia òptica

La microscòpia òptica és la tècnica de diagnòstic de rutina per a la malària més usada fins al moment, però perquè sigui eficient cal tenir una vista entrenada. Es considera un bon mètode principalment degut al seu baix cost, però en l'estudi de Costa *et al.* (2022), on es fa una comparativa entre la dPCR i la microscòpia òptica, es menciona la baixa detecció com a un dels majors inconvenients d'aquest mètode tradicional, sobretot quan es tracta de casos amb baixa parasitemia. Mitjançant mètodes moleculars com la dPCR és possible augmentar la sensibilitat de la detecció dels paràsits del gènere *Plasmodium* i eliminar el factor subjectiu lligat a la destresa de l'observador (Pomari *et al.* 2020).

4.7.2 dPCR vs. qPCR

Tant la qPCR com la dPCR són tècniques avançades utilitzades per a la detecció i quantificació d'ADN. La qPCR es basa en l'amplificació d'ADN en temps real, mesurant l'acumulació del producte de PCR a cada cicle mitjançant fluorescència, permetent una quantificació relativa de la seqüència d'interès (Koepli *et al.*, 2016). En canvi, la dPCR implica la divisió de la mostra en petites reaccions individuals i, un cop finalitzada la reacció de PCR, s'identifiquen les particions positives a través de l'emissió de fluorescència, obtenint així una quantificació absoluta sense necessitat d'una corba estàndard (Dong *et al.*, 2023; Holzschuh *et al.*, 2023) (Figura 12).

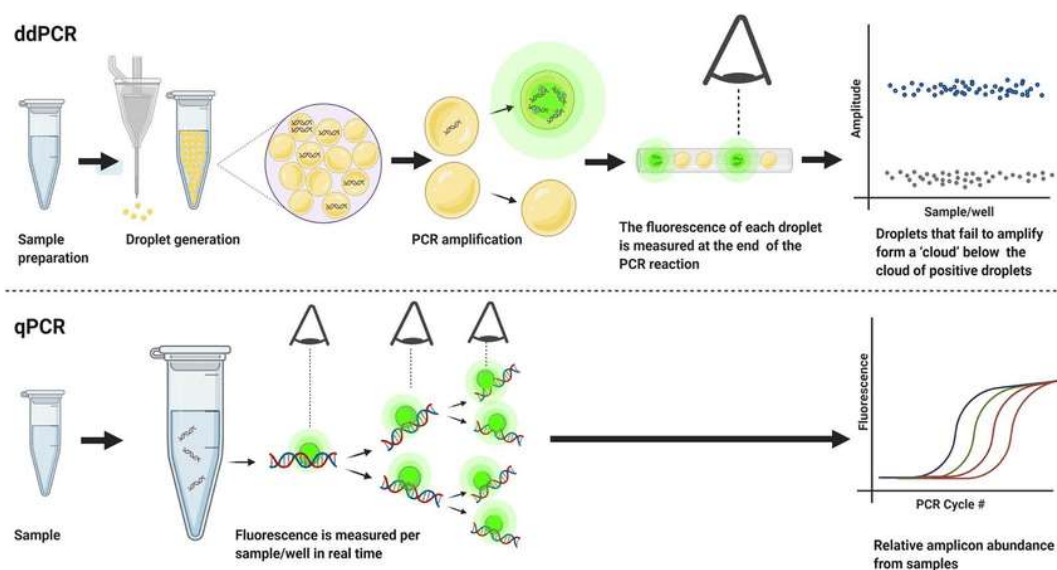


Figura 12. Comparativa del procés entre la droplet digital PCR (ddPCR) amb la real-time PCR (qPCR) (Kokkoris *et al.*, 2021).

Les diferències que es mostren entre la qPCR i la dPCR/ddPCR són significatives tenint un impacte en els resultats. Primerament, la dPCR ofereix una quantificació digital i absoluta del nombre de paràsits, millorant la precisió i reduint la variabilitat, mentre que la qPCR proporciona una mesura en temps real de l'amplificació però requerint un estàndard per a la quantificació (Pomari *et al.*, 2019; Mavridis *et al.*, 2021). La qPCR resulta molt eficient per a la quantificació relativa en experiments d'expressió gènica, però, per altra banda, es pot veure afectada per inhibidors de PCR fent variar l'eficiència de la reacció (Costa *et al.*, 2022). La qPCR és ràpida, permet l'anàlisi simultània de diverses mostres i hi ha una gran disponibilitat de plataformes disponibles per a la seva realització (Wang *et al.*, 2018). No obstant això, pot resultar poc precisa en mostres que presentin una baixa concentració de l'ADN d'interès (Mavridis *et al.*, 2021). La dPCR és menys susceptible als inhibidors i és capaç de quantificar l'ADN diana en concentracions baixes amb alta sensibilitat, el que permet una detecció precisa i efectiva de variants rares (Mahendran *et al.*, 2020). Per contra, però, aquests assajos tenen un cost elevat i requereixen una major complexitat en la preparació de les mostres (Pomari *et al.*, 2020).

Totes dues tècniques són àmpliament utilitzades tant en investigació com en diagnòstic clínic. Per tant, tot i que ambdues tècniques ofereixen certs avantatges pel diagnòstic molecular de la malària, l'elecció entre qPCR i dPCR dependrà de les necessitats específiques de cada aplicació, donant prioritat a la velocitat i versatilitat de la qPCR o a la precisió i fiabilitat de la dPCR (Pomari *et al.*, 2020).

4.7.3 dPCR vs. LAMP

En l'estudi de Pomari *et al.* (2020) treballen la comparativa entre el LAMP i la dPCR per a la detecció de *P. falciparum*. Un dels grans avantatges del LAMP és que treballa a temperatura isotèrmica i no requereix equipament sofisticat per a la seva realització (Figura 13). Això fa que sigui un bon candidat com a test POC, ja que permet el diagnòstic in situ a més d'obtenir resultats en pocs minuts. Per altra banda, però, el LAMP no permet la identificació de les espècies de *Plasmodium* sp. ni la quantificació de la càrrega parasitària (Pomari *et al.*, 2020). La dPCR no permet un diagnòstic in situ degut al seu requisit d'equipament, però sí que pot detectar i quantificar les diferents espècies dins del gènere *Plasmodium*.

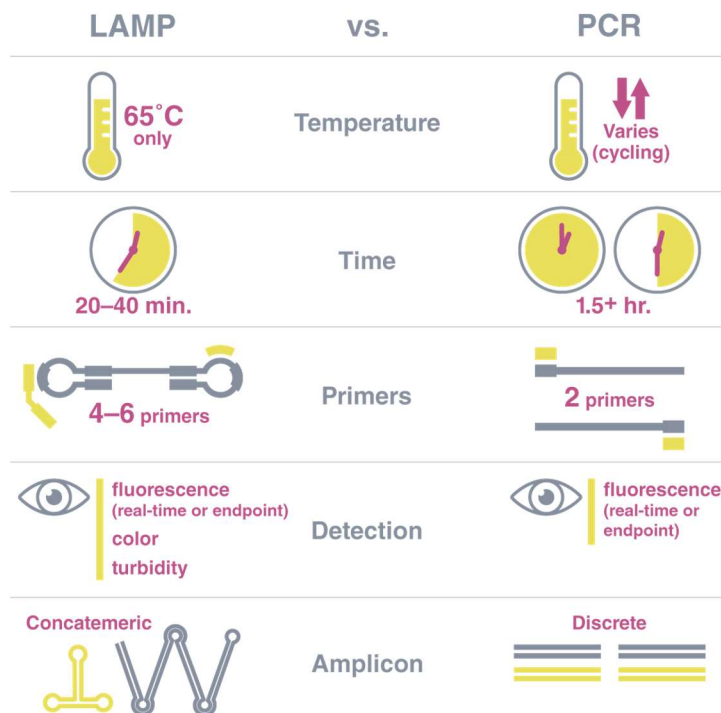


Figura 13. Comparativa de les principals diferències entre el LAMP i la PCR (Gibson, 2022).

4.8 Perspectives de futur

Les perspectives de futur de la dPCR són esperançadores gràcies a la seva elevada precisió en la quantificació de material genètic i l'alta sensibilitat. Pel que fa a l'ús de la dPCR per al diagnòstic de la malària, és important tenir en compte els avantatges d'aquesta tècnica i les propostes de millora relacionades. Com bé s'ha anat citant amb anterioritat, la dPCR ofereix una precisió excepcional, a més de la capacitat de quantificar de manera absoluta fent-la així útil en casos de detecció de variants genètiques resistents a fàrmacs i en mostres amb càrregues parasitàries baixes (Holzschuh *et al.*, 2023). Aquestes característiques també la fan una bona tècnica candidata per a la vigilància epidemiològica de la malària (Srisutham *et al.*, 2021).

No obstant això, la implementació de la dPCR en regions endèmiques de malària és complicada en entorns amb escassos recursos degut al seu preu (Costa *et al.* 2022). Per tant, és fonamental desenvolupar estratègies per reduir costos i simplificar els protocols perquè la dPCR sigui un avanç tecnològic a disposició de tots. Això inclou la creació de dispositius que permetin una major accessibilitat i programes de formació per al personal local. D'aquesta manera es podria assegurar la disponibilitat de la dPCR a gran escala, contribuint de manera global a la lluita contra la malaltia.

5. Conclusions

The conclusions of this Bachelor's Thesis are:

- dPCR is a new generation of PCR that enables absolute quantification through partitioning the reaction. This is an innovative and powerful technique for quantifying the concentration of parasite genomes present in a sample.
- There is a variant of dPCR, called ddPCR, which shares the same principle as the first but differs in the sample partitioning approach.
- In reference to the type of sample, whole blood is the most used, but serum, saliva or buccal swab may be feasible alternatives if the former is not available.
- The main advantages of dPCR over other methods are that it does not require a standard curve for quantification, is very tolerant to inhibitors, is highly sensitive, is especially useful for detection of target DNA in samples with low parasite load and mixed infections and can detect rare genetic variants with high accuracy.
- The weaknesses of dPCR are the possible saturation of the reaction in highly concentrated samples, but above all, the main drawback of the technique is that it is currently expensive and time consuming.
- As a future perspective, dPCR is a very promising technique for malaria diagnosis but its application in resource-limited endemic areas requires the development of more affordable and user-friendly equipment.
- The main applications of dPCR are malaria diagnosis, analysis of resistance to anti-*Plasmodium* drugs and vector control of the disease.

6. Agraïments

Realitzar aquest treball no ha estat gens fàcil, i és per això que m'agradaria agrair aquelles persones que m'han ajudat i guiat durant aquests mesos. En primer lloc, agrair a la Dra. Alba Abras per estar present en qualsevol moment aconsellant-me i aportant suport constant, a més de la seva implicació en qualsevol dubte que em sorgia durant aquest camí. Gràcies per tota la paciència i per obrir-me una porta cap a les tècniques moleculars com la PCR digital que desconeixia fins ara, i fer que sigui conscient de la importància de la malària i el seu diagnòstic precoç per eliminar-la a temps.

En segon lloc, agrair també a la meva família, per tot el suport que m'han donat durant aquest temps i insistir que segueixi endavant, els amics per compartir moments difícils junts que finalment els hem superat, i per últim donar les gràcies a la meva parella que ha confiat en mi des del primer moment donant-me els ànims que necessitava en tot moment.

7. Bibliografia

- Balyakina, E. A. (2022). Retraction Watch: A tool for informing academia about ethical violations in publications. *Naučnyj Redaktor I Izdatel'*, 6(2), 164–174. <https://doi.org/10.24069/sep-21-12>
- Barillas-Mury, C., & Kumar, S. (2005). Plasmodium-mosquito interactions: a tale of dangerous liaisons. *Cellular Microbiology*, 7(11), 1539–1545. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00615.x>
- Bartoloni, A., & Zammarchi, L. (2012). CLINICAL ASPECTS OF UNCOMPLICATED AND SEVERE MALARIA. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 4(1), e2012026. <https://doi.org/10.4084/mjihid.2012.026>
- Boyle, M. J., Wilson, D. W., Richards, J. S., Riglar, D. T., Tetteh, K. K. A., Conway, D. J., Ralph, S. A., Baum, J., & Beeson, J. G. (2010). Isolation of viable Plasmodium falciparum merozoites to define erythrocyte invasion events and advance vaccine and drug development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(32), 14378–14383. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009198107>
- Calvo, P. A., & Méndez, D. P. (2020). Malaria: revisión bibliográfica. *Ciencia & Salud*, 4(4). <https://doi.org/10.34192/cienciaysalud.v4i4.193>
- Coleman-Jones, E. (1999). Ronald Ross and the great malaria problem: historical reference in the biological sciences. *Journal of Biological Education*, 33(4), 181–184. <https://doi.org/10.1080/00219266.1999.9655662>
- Costa, G. L., Alvarenga, D. A. M., Aguiar, A. C. C., Pereira, D. B., de Oliveira, T. F., Carvalho, L. H., Ferreira Alves de Brito, C., & Nóbrega de Sousa, T. (2022). Improving the molecular diagnosis of malaria: Droplet digital pcr-based method using saliva as a dna source. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.882530>
- Croughs, M., & Maniewski, U. (2023). *Malaria—World map*. <https://www.wanda.be/en/a-z-index/malaria-world-map/>
- Dong, L., Li, W., Xu, Q., Gu, J., Kang, Z., Chen, J., Xu, X., Zhang, X., Zhang, X., Jiang, H., & Guan, M. (2023). A rapid multiplex assay of human malaria parasites by digital PCR. *Clinica Chimica Acta*, 539, 70-78. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2022.12.001>
- Ejjigiri, I., & Sinnis, P. (2009). Plasmodium sporozoite–host interactions from the dermis to the hepatocyte. *Current Opinion in Microbiology*, 12(4), 401–407. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.06.006>
- Escalante, A. A., & Ayala, F. J. (1994). Phylogeny of the malarial genus Plasmodium, derived from rRNA gene sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(24), 11373–11377. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.24.11373>
- Ferguson, C., Marcus, A., & Oransky, I. (2014). Publishing: The peer-review scam. *Nature*, 515(7528), 480–482. <https://doi.org/10.1038/515480a>

- Fernández-Busquets, X. (2017). *La malaria a través de la historia: Desde los dinosaurios hasta un simple «mal aire» (Parte 1) - Blog*. ISGLOBAL. <https://www.isglobal.org/healthisglobal/-/custom-blog-portlet/a-short-hi-story-of-malaria-from-dinosaurs-to-a-simple-bad-air-part-1-/91316/0>
- Gibson, J., PhD. (2022, October 12). Getting started with loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *NEB*. <https://www.neb.com/en/nebinspired-blog/getting-started-with-loop-mediated-isothermal-amplification>
- Holzschuh, A., Lerch, A., Gerlovina, I., Fakhri, B. S., Al-mafazy, A. H., Reaves, E. J., Ali, A., Abbas, F., Ali, M. H., Ali, M. A., Hetzel, M. W., Yukich, J., & Koepfli, C. (2023). Multiplexed ddPCR-amplicon sequencing reveals isolated *Plasmodium falciparum* populations amenable to local elimination in Zanzibar, Tanzania. *Nature Communications*, 14(1), 3699. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39417-1>
- Jan, Z., Khan, A., Sajjad, M., Muhammad, K., Rho, S., & Mehmood, I. (2018). A review on automated diagnosis of malaria parasite in microscopic blood smears images. *Multimedia Tools and Applications*, 77(8), 9801-9826. <https://doi.org/10.1007/s11042-017-4495-2>
- Jeon, H., & Eom, K. S. (2024). Cestodes and cestodiasis. In *Elsevier eBooks* (pp. 2941–2963). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818619-0.00044-7>
- Khan, S. U., & Baik, R. (2020). MPPIF-Net: Identification of *Plasmodium Falciparum* Parasite Mitochondrial Proteins Using Deep Features with Multilayer Bi-directional LSTM. *Processes*, 8(6), 725. <https://doi.org/10.3390/pr8060725>
- Kokkoris, V., Vukicevich, E., Richards, A., Thomsen, C., & Hart, M. (2021). *Optimizing droplet digital pcr for environmental samples*. <https://doi.org/10.20944/preprints202104.0299.v1>
- Koepfli, C., Nguitragool, W., Hofmann, N. E., Robinson, L. J., Ome-Kaius, M., Sattabongkot, J., Felger, I., & Mueller, I. (2016). Sensitive and accurate quantification of human malaria parasites using droplet digital PCR (Ddpcr). *Scientific Reports*, 6(1), 39183. <https://doi.org/10.1038/srep39183>
- Lin, K., Wang, S., Sui, Y., Zhang, T., Luo, F., Shi, F., Qian, Y., Li, J., Lu, S., Cotter, C., Wang, D., & Li, S. (2023). Evaluation of an innovative Point-of-Care Rapid Diagnostic test for the identification of imported malaria parasites in China. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 8(6), 296. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8060296>
- Mahendran, P., Liew, J. W. K., Amir, A., Ching, X.-T., & Lau, Y.-L. (2020). Droplet digital polymerase chain reaction (Ddpcr) for the detection of *Plasmodium knowlesi* and *Plasmodium vivax*. *Malaria Journal*, 19(1), 241. <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03314-5>
- Markus, M. B. (2010). Malaria: Origin of the term “Hypnozoite.” *Journal of the History of Biology*, 44(4), 781–786. <https://doi.org/10.1007/s10739-010-9239-3>

- Mathison, B. A., & Pritt, B. S. (2017). Update on malaria diagnostics and test utilization. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(7), 2009-2017. <https://doi.org/10.1128/JCM.02562-16>
- Mavridis, K., Michaelidou, K., & Vontas, J. (2021). Highly sensitive droplet digital PCR-based diagnostics for the surveillance of malaria vector populations in low transmission and incipient resistance settings. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 21(10), 1105-1114. <https://doi.org/10.1080/14737159.2021.1963234>
- Meibalan, E., & Marti, M. (2016). Biology of malaria transmission. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(3), a025452. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025452>
- Moss-Racusin, C. A., Dovidio, J. F., Brescoll, V. L., Graham, M. J., & Handelsman, J. (2012). Science faculty's subtle gender biases favor male students. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(41), 16474–16479. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211286109>
- Muñoz, J., Rojo-Marcos, G., Ramírez-Olivencia, G., Salas-Coronas, J., Treviño, B., Perez Arellano, J. L., Torrús, D., Muñoz Vilches, M. J., Ramos, J. M., Alegría, I., López-Vélez, R., Aldasoro, E., Perez-Molina, J. A., Rubio, J. M., & Bassat, Q. (2015). Diagnóstico y tratamiento de la malaria importada en España: Recomendaciones del Grupo de Trabajo de Malaria de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (Semtsi). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(6), e1-e13. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.12.014>
- Nosten, F., & White, N. J. (2007, December 1). *Artemisinin-Based Combination Treatment of Falciparum Malaria*. Defining and Defeating the Intolerable Burden of Malaria III: Progress and Perspectives - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1713/?report=reader>
- Organización de las Naciones Unidas. (2021). <https://news.un.org/es/story/2020/02/1469451>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). *How malaria RDTs work*. (2024). <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/case-management/diagnosis/rapid-diagnostic-tests/how-malaria-rdts-work>
- Pereira, Á., & Pérez, M. (2002). Epidemiología y tratamiento del paludismo. *Offarm*, 21(6), 110-114. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-epidemiologia-tratamiento-del-paludismo-13033516>
- Pomari, E., Piubelli, C., Perandin, F., & Bisoffi, Z. (2019). Digital PCR: A new technology for diagnosis of parasitic infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 25(12), 1510-1516. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.06.009>
- Pomari, E., Silva, R., Moro, L., La Marca, G., Perandin, F., Verra, F., Bisoffi, Z., & Piubelli, C. (2020). Droplet digital pcr for the detection of plasmodium falciparum dna in whole blood and serum: A comparative analysis with other molecular methods. *Pathogens*, 9(6), 478. <https://doi.org/10.3390/pathogens9060478>

- Portal INSST. (2022). *Plasmodium spp. (Humano y de los simios)*—INSTT. <https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/parasitos/plasmodium-spp-humano-y-simios>
- Roche Sequencing and Life Science. (2024) *Digital LightCycler® DPCR System Sequencing* <https://sequencing.roche.com/us/en/products/group/digital-lightcycler-dpcr-system.html>
- Rojo-Marcos, G., & Cuadros-González, J. (2016). Malaria y protozoos intestinales. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 34(3), 191–204. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.12.009>
- Sánchez-Martín, V., López-López, E., Reguero-Paredes, D., Godoy-Ortiz, A., Domínguez-Recio, M. E., Jiménez-Rodríguez, B., Alba-Bernal, A., Quirós-Ortega, M. E., Roldán-Díaz, M. D., Velasco-Suelto, J., Linares-Valencia, N., Garrido-Aranda, A., Lavado-Valenzuela, R., Álvarez, M., Pascual, J., Alba, E., & Comino-Méndez, I. (2024). Comparative study of droplet-digital PCR and absolute Q digital PCR for ctDNA detection in early-stage breast cancer patients. *Clinica Chimica Acta*, 552, 117673. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2023.117673>
- Sattabongkot, J., Suansomjit, C., Nguitragee, W., Sirichaisinthop, J., Warit, S., Tiensuwan, M., & Buates, S. (2018). Prevalence of asymptomatic Plasmodium infections with sub-microscopic parasite densities in the northwestern border of Thailand: a potential threat to malaria elimination. *Malaria Journal*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2476-1>
- Siahaan, L. (2018). Laboratory diagnostics of malaria. *IOP Conference Series. Earth and Environmental Science*, 125, 012090. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/125/1/012090>
- Spencer, L. M., Gómez, A., & Collovini, E. (2016). Mechanisms of invasion from sporozoite and merozoite of Plasmodium. *Bionatura*, 1(2), 89–94. <https://doi.org/10.21931/rb/2016.01.02.9>
- Srisutham, S., Saralamba, N., Malleret, B., Rénia, L., Dondorp, A. M., & Imwong, M. (2017). Four human Plasmodium species quantification using droplet digital PCR. *PLOS ONE*, 12(4), e0175771. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175771>
- Srisutham, S., Suwannasin, K., Sugaram, R., Dondorp, A. M., & Imwong, M. (2021). Measurement of gene amplifications related to drug resistance in Plasmodium falciparum using droplet digital PCR. *Malaria Journal*, 20(1), 120. <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03659-5>
- Turrientes, M. C., & López-Vélez, R. (2000). *Aspectos prácticos del diagnóstico de laboratorio y profilaxis de la malaria*. Madrid: Unidad de Medicina Tropical y Parasitología Clínica. Hospital Ramón y Cajal. <https://seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/parasitologia/malaria.pdf>
- Tuteja, R. (2007). Malaria – an overview. *the FEBS Journal*, 274(18), 4670–4679. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05997.x>

- Vera-Arias, C. A., Holzschuh, A., Oduma, C. O., Badu, K., Abdul-Hakim, M., Yukich, J., Hetzel, M. W., Fakih, B. S., Ali, A., Ferreira, M. U., Ladeia-Andrade, S., Sáenz, F. E., Afrane, Y., Zemene, E., Yewhalaw, D., Kazura, J. W., Yan, G., & Koepfli, C. (2022). High-throughput Plasmodium falciparum hrp2 and hrp3 gene deletion typing by digital PCR to monitor malaria rapid diagnostic test efficacy. *eLife*, 11, e72083. <https://doi.org/10.7554/eLife.72083>
- Wang, C. Y. T., McCarthy, J. S., Stone, W. J., Bousema, T., Collins, K. A., & Bialasiewicz, S. (2018). Assessing Plasmodium falciparum transmission in mosquito-feeding assays using quantitative PCR. *Malaria Journal*, 17(1), 249. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2382-6>
- Weintraub, P. G. (2016). The importance of publishing negative results. *Journal of Insect Science*, 16(1), 109. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iew092>
- Wiedermann, C. J. (2016). Ethical publishing in intensive care medicine: A narrative review. *World Journal of Critical Care Medicine*, 5(3), 171. <https://doi.org/10.5492/wjccm.v5.i3.171>
- World Health Organization: WHO & World Health Organization: WHO. (2023, December 4). *Paludismo*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/malaria>
- Yaundé & World Health Organization: WHO. (2024, 6 marzo). Ministros de Salud de África se comprometen a poner fin a las muertes por paludismo. *Organización Mundial de la Salud*. <https://www.who.int/es/news/item/06-03-2024-african-health-ministers-commit-to-end-malaria-deaths>