UAB
Universitat Autònoma de Barcelona

Aplicación de las técnicas moleculares en el diagnóstico de la malaria y caracterización genética de Plasmodium falciparum para la vigilancia epidemiológica en un área rural de Angola

ALEJANDRO MEDIAVILLA PÉREZ

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons: https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons: https://creativecommons.org/licenses/?lang=es

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license: https://creativecommons.org/licenses/?lang=en

Aplicación de las técnicas moleculares en el diagnóstico de la malaria y caracterización genética de *Plasmodium falciparum* para la vigilancia epidemiológica en un área rural de Angola

TESIS DOCTORAL

Presentada por

ALEJANDRO MEDIAVILLA PÉREZ

Para optar al grado de doctor

Programa de doctorado en Microbiología

Departamento de Genética y Microbiología, Facultad de Biociencias

Universitat Autònoma de Barcelona

Directores

ELENA SULLEIRO IGUAL y PEDRO BERZOSA DÍAZ

Tutora

ELENA SULLEIRO IGUAL

Barcelona, Julio de 2026

Certificado de depósito

La **Dra. Elena Sulleiro Igual**, Jefa de Sección de Salud Internacional del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Vall d'Hebron e investigadora del Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), y Profesora asociada a la Universidad Autónoma de Barcelona; y el **Dr. Pedro Javier Berzosa Díaz**, Jefe del Laboratorio de Cooperación Científico-Técnica en Enfermedades Tropicales del Centro Nacional de Medicina Tropical del Instituto de Salud Carlos III; como directores de la tesis doctoral de **Alejandro Mediavilla Pérez**,

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de investigación, titulado "**Aplicación de las técnicas moleculares en el diagnóstico de la malaria y caracterización genética de *Plasmodium falciparum* para la vigilancia epidemiológica en un área rural de Angola**", es apto para su depósito y presentación en el programa de Doctorado en Microbiología de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).

La **Dra. Elena Sulleiro Igual**, en su condición de tutora afiliada a la Universitat Autònoma de Barcelona, acredita la presentación de la tesis como parte de la universidad.

La tesis doctoral será presentada por **compendio de publicaciones** ante el tribunal que corresponda y cumple rigurosamente con las condiciones y la normativa vigente exigidas por la UAB.

Y para que conste a efectos oportunos, firman el presente certificado:

Directora y tutora	Director
	
Elena Sulleiro Igual	**Pedro Javier Berzosa Díaz**

A mi madre

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer la participación en esta tesis de todas las personas involucradas durante estos cuatro años de trabajo, tanto a los profesionales de la salud, investigadores, amigos y a cada una de las personas que participaron en los estudios de forma altruista a pesar de padecer una enfermedad que azota a millones de personas cada año.

Gracias a todos mis compañeros de grupo. A Aroa por ser mi mentora, por enseñarme cómo se ha de trabajar en un laboratorio de análisis clínico, por cada extracción, por cada PCR, gel, análisis estadístico, opinión científica, por revisar cada artículo, por tus consejos burocráticos y por significar el comienzo de esta etapa para mí. A Carles como compañero de malaria, porque he aprendido y disfrutado mucho de poder colaborar en tus proyectos y por ser un claro ejemplo de humildad en el trabajo y fuera de él. A mi Patri por compartir mi día a día durante todo el proceso, por ayudarme con los experimentos, por cada consejo de colores y forma en las presentaciones, porque tu opinión siempre la tengo en cuenta (aunque me mantenga firme en mi cabezonería), por soportar mis quejas, por estar en los días buenos y en los malos, pero sobre todo por lo gran amiga mía que eres. A Elena porque considero que eres un gran ejemplo de cómo ha de actuar una directora de tesis y que muchos deberían tomar nota, por abrirme infinidad de oportunidades, por la confianza depositada, porque cuando llegué al hospital hace cuatro años solo sabía que la malaria era causada por *Plasmodium* y que anteriormente se trataba con cloroquina, y ahora siento que gracias a tus consejos puedo llegar a aportar mucho en este mundo, y sobre todo porque cuando uno tiene esos días malos en los que no encuentra la motivación tú has sabido levantar el ánimo y darme esas ganas que tengo a día de hoy por seguir investigando.

A todo el resto del servicio de microbiología del Hospital Vall d'Hebron. A María Arnedo por correr tantos geles juntos al comienzo de la tesis y por tus visitas al despacho que, pese a que digas que no, me alegran los días con tu cariño y tus sonrisas. A Karen y a María Piquer por prestarme tanta ayuda en el trabajo experimental. A todo el equipo de Bacteriología, a Josep, a Albert, a Alba y al resto por acogerme al comienzo y por todos los almuerzos y las comidas juntos.

A toda la gente de Drassanes. Al personal clínico, a Edurne y a Lupe por cada vacuna, a Mateo, Viky, Yanire, Marta, Sisto y todos los demás. A Inés por tu conocimiento de la malaria, porque cada sugerencia ha tenido un peso muy grande en los estudios de la tesis, y al resto del equipo de infecciosas, a Israel, Marisa, Joan, Nano y Espe. A la gente de

laboratorio, como Marc y Neus, por vuestra motivación, por los entrenamientos previos a Angola y por ser dos grandes personas. A Sol y a Loreto por vuestra alegría y todo lo que me queda de aprender de vosotras. A Françesc por enseñarme tanto en el mundo de la parasitología y de las medicina tropical, porque sé mirar malarias gracias a ti, y por toda la sabiduría y consejos previos para el trabajo en el trópico.

A Pedro porque desde que fuiste mi director he aprendido tanto sobre la malaria que espero que quede reflejado de acuerdo con la calidad de la enseñanza en esta tesis, por acogerme en el CNMT como a uno más, por el gran trato recibido, por sentarte a mi lado y ponernos a pipetear juntos. Gracias a ti y a todo el equipo del ISCIII, a Irene, Luz, Vicen y Sandra, porque gracias a vosotros han salido adelante los estudios de deleciones y de las resistencias, y espero poder seguir colaborando en futuras ocasiones.

Al equipo del CIETUS de Salamanca, especialmente a Bego porque tu estancia en Cubal y todo el esfuerzo que realizaste al recolectar esas muestras me han brindado esta oportunidad. Esta tesis lleva sin duda alguna también tu nombre. Por estar disponible para cada duda y por tu implicación en cada artículo publicado. Y también a Pedro por su amabilidad y por hacerme recordar mis años en Salamanca con tu invitación.

A todas las personas que me acompañaron en mis viajes a Cubal. A Marisa y a Espe por abrirme las puertas de este lugar. A mis meninas, María Valor y Mar, por vuestra compañía, por trabajar a mi lado, por los consejos clínicos, por las risas, buenos momentos y por convertiros en las personas tan importantes que sois para mí. A Miguel porque tener al lado a alguien que sabe tanto proporciona mucha seguridad y por estar a mi lado en los pequeños incidentes. A Joan, Nano y Patri por compartir el día a día con vosotros.

A todos los voluntarios del segundo año. A Alejandra, a Pau, a Paula, a las Marías, a Cora, a Claudia, a Raquel, a Xana, a Patri y a Judit por proporcionarme vuestra ayuda en cada campaña de muestreo, por todos los momentos vividos, por pasar hambre juntos y la pequeña familia que formamos. Gracias a Sofía por ser mi fiel compañera, porque he aprendido mucho junto a ti de cómo se debe trabajar en un laboratorio, por las horas que nos pasamos mirando gotas gruesas, por tu profesionalidad, el gran recuerdo que dejaste y gracias de todo corazón por todo tu esfuerzo. A Iñigo porque mis estancias comenzaron y terminaron junto a ti, porque me has servido de referente en terreno, por hacerme sentir apoyado en cada momento y porque vales mucho.

Agradeço a todos os trabalhadores do Hospital Nossa Senhora da Paz e à Congregação das Irmãs Teresianas. Começo por agradecer às irmãs Arminda, Mafalda, Laurinda e

Fátima, por todo o carinho recebido e por terem estado presentes nos momentos mais difíceis. À Gene, por representar um pedaço de Espanha em Angola. A cada médico, enfermeiro e activista que colaborou nos nossos estudos, por facilitarem o nosso trabalho e por nos integrarem na comunidade. Ao pessoal da UEN, Ermelinda e Musiko, pela vossa dedicação e pela magnífica missão que desempenham junto de cada criança. À extraordinária equipa do DREAM, à Bela, à Samba e à Katí, porque graças a vocês tive a oportunidade de descobrir um novo mundo nas consultas de VIH. Obrigado pela forma calorosa e humana com que comunicam com cada paciente. A todo o pessoal do laboratório, especialmente ao Abel, ao Francisco e ao Salomão, por cada amostra recolhida e pela vossa amizade. E, como não poderia deixar de ser, à Arlette. Porque aprendi imenso ao teu lado. Porque és um exemplo de responsabilidade, dedicação e liderança. Porque te preocupas com cada paciente, cada criança, adolescente, adulto, idoso, mulher ou homem, independentemente da sua condição ou proveniência. Porque serás sempre a chefe e a líder. Obrigado por estares comigo em todos os momentos e em todas as situações, por me acolheres na tua família, por todas as refeições partilhadas, por cada malária observada, por me ensinares a integrar-me numa cultura diferente. Obrigado por tanto. As palavras não são suficientes para expressar toda a minha gratidão.

A mi Xana porque tu TFM ha formado parte de esta tesis, por aquellos meses en el laboratorio, por tu ayuda en Angola, por tu motivación con la malaria y la parasitología, porque lo que la ciencia unió, nunca se separará.

Por último, quiero agradecer a mi familia. A mi hermana y a mi tía Carmen, porque vuestro orgullo es lo que me motiva a seguir progresando. A mi tía María Antonia por ser mi referente más grande en el mundo profesional y en el mundo de la investigación, porque sin ti no habría llegado hasta aquí. Y, para terminar, dar las gracias a la persona más importante y más influyente que he tenido en mi vida, que eres tú, mamá, porque desde bien niño tú me introdujiste en el mundo de la ciencia, por cada tarde de estudio, por tu confianza, por tu amor, por ser mi guía en cada decisión, y porque sé que allí donde quiera que estés estarás celebrando este momento con una sonrisa. Por y para siempre, te quiero mamá.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS XII

ÍNDICE DE TABLAS XIIII

LISTA DE ABREVIATURAS XIVV

RESUMEN XVII

ABSTRACT XVIIII

1. Introducción 1

1.1. Reseña histórica de la malaria 1

1.1.1. Primeras descripciones y percepción histórica de la enfermedad 1

1.1.2. Descubrimiento del agente etiológico y del vector 2

1.1.3. Tratamiento y estrategias de control a lo largo del siglo XX 3

1.1.4. Transición hacia tratamientos y estrategias modernas de control 4

1.2. Características biológicas de la malaria 5

1.2.1. Etiología de la malaria 5

1.2.2. Ciclo biológico de *Plasmodium* spp. 9

1.3. Epidemiología de la malaria 11

1.3.1. La malaria como problema de salud pública global 11

1.3.2. La malaria en África subsahariana 13

1.3.3. La malaria en Angola 14

1.4. Presentación clínica de la enfermedad 18

1.4.1. Malaria sintomática 18

1.4.2. Portadores asintomáticos 20

1.4.3. Poblaciones vulnerables 20

1.5. Diagnóstico de la malaria 20

1.5.1. Importancia del diagnóstico en el control de la malaria 20

1.5.2. Microscopía convencional 21

1.5.3. Test de diagnóstico rápido 22

1.5.4. Técnicas moleculares 23

1.5.5. Técnicas serológicas 24
1.5.6. Diagnóstico de imagen asistido por inteligencia artificial 25
1.5.7. Otros métodos diagnósticos 25
1.6. Tratamiento de la malaria 25
1.6.1. Fármacos antimaláricos 26
1.6.2. Tratamiento de la malaria *falciparum* 27
1.6.3. Tratamiento de la malaria no *falciparum* 28
1.7. Quimioprofilaxis 28
1.7.1. Principales fármacos empleados en quimioprofilaxis de malaria 29
1.7.2. Estrategias de quimioprofilaxis intermitente 29
1.7.3. Administración masiva de medicamentos 30
1.8. Resistencias a los antimaláricos 30
1.8.1. Causas y factores que favorecen la aparición de resistencias 30
1.8.2. Mecanismos biológicos y moleculares de resistencia 31
1.8.3. Estudios de eficacia terapéutica 32
1.8.4. Vigilancia de marcadores moleculares de resistencia 33
1.9. Epidemiología molecular de la malaria 35
1.9.1. Deleciones y variabilidad de los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* 35
1.9.2. Marcadores moleculares de resistencia a antimaláricos 39
2. Justificación 47
3. Hipótesis y objetivos 49
3.1. Hipótesis 49
3.2. Objetivos 49
3.2.1. Objetivo general 49
3.2.2. Objetivos específicos 49
4. Metodología 51
5. Resultados 52
Bloque 1: Diagnóstico molecular de la malaria y estrategias de detección en contextos endémicos y rurales como Cubal 52

Artículo 1. PCR en tiempo real para el diagnóstico de la malaria e identificación de especies de *Plasmodium* en pacientes febriles en Cubal, Angola 52

Artículo 2. Evaluación del uso de DBS para el diagnóstico de la malaria mediante PCR en tiempo real en un entorno rural de Angola.....66

5.1. Bloque 2: Caracterización genética de *P. falciparum* para el manejo de la malaria en Angola 80

Artículo 3. Análisis de las deleciones de los genes *pfhrp2* y *pfhrp3*, y de la estructura y variabilidad de las proteínas *Pf*HRP2 y *Pf*HRP3: implicaciones para el rendimiento de los test de diagnóstico rápido de malaria en Cubal, Angola 80

Artículo 4. Marcadores moleculares de resistencia a antimaláricos en los genes *pfk13*, *pfmdr1*, *pfdhfr* y *pfdhps* de *Plasmodium falciparum* en el municipio rural de Cubal, provincia de Benguela, Angola (2022-2023) 97

6. Discusión 112

6.1. Diagnóstico molecular de la malaria y estrategias de detección en contextos endémicos y rurales como Cubal.....112

6.1.1. PCR en tiempo real para el diagnóstico e identificación de especies de *Plasmodium* en Cubal.....112

6.1.2. Evaluación de las DBS para el diagnóstico molecular de la malaria mediante PCR en tiempo real en Cubal.....116

6.2. Caracterización genética de *P. falciparum* para el manejo de la malaria en Angola118

6.2.1. Deleciones de los genes *pfhrp2*/*pfhrp3* y variabilidad de las proteínas *Pf*HRP2/*Pf*HRP3: impacto en los test de diagnóstico rápido 119

6.2.2. Marcadores moleculares de resistencias a antimaláricos.....122

6.3. Limitaciones de la tesis 126

6.3.1. Limitaciones logísticas y epidemiológicas 126

6.3.2. Limitaciones técnicas y de rendimiento diagnóstico 126

6.3.3. Limitaciones en la caracterización molecular.....127

7. Conclusiones 129

8. Perspectivas futuras 131

9. Referencias bibliográficas 133

10. Anexos.....160

Anexo I. Material suplementario 160

Tablas suplementarias 160
Material suplementario: artículos de la tesis 161
Anexo II. Artículos adicionales publicados durante la tesis 165
Artículos relacionados con malaria 165
Artículos adicionales de enfermedades tropicales y parasitología 166
Anexo III. Becas concedidas durante la tesis 169
Beca de movilidad SOCEPA. Estancia 2024 169
Beca de movilidad SEMTSI-PROBITAS. Estancia 2025 172

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ilustraciones de *Plasmodium* spp. por Laveran.....2

Figura 2. Filogenia del orden Haemosporida. 5

Figura 3. Morfología del merozoíto de *Plasmodium* spp. y proteínas implicadas en la invasión eritrocítica 6

Figura 4. Fotografías de los diferentes estadios eritrocíticos de *P. falciparum*.....7

Figura 5. Fotografías de los diferentes estadios eritrocíticos de *P. vivax*.....7

Figura 6. Fotografías de los diferentes estadios eritrocíticos de *P. ovale* (*wallikeri*/*curtisi*).....8

Figura 7. Fotografías de los diferentes estadios eritrocíticos de *P. malariae*.....8

Figura 8. Fotografías de los diferentes estadios eritrocíticos de *P. knowlesi*. 9

Figura 9. Distribución geográfica de las principales especies de *Plasmodium* que infectan humanos.....9

Figura 10. Ciclo biológico de la malaria. Se muestra una representación gráfica del ciclo de vida de *Plasmodium* spp. utilizando al humano como hospedador intermediario.....10

Figura 11. Países con casos endémicos de malaria en el año 2000 y su estado en 2024. 12

Figura 12. Evolución temporal de la incidencia de casos de malaria a nivel mundial ...12

Figura 13. Proporción del número de casos de malaria por países en 2024.....13

Figura 14. Transmisión y prevalencia de malaria en Angola.. 15

Figura 15. Situación geográfica del Hospital Nossa Senhora da Paz de Cubal (HNSP). 17

Figura 16. Frotis de sangre periférica para el diagnóstico microscópico de malaria. 21

Figura 17. Expresión de las principales dianas antigénicas para las pruebas de diagnóstico rápido de malaria (PDR).....22

Figura 18. Electroforesis, curvas de fluorescencia de PCR en tiempo real y muestras de sangre seca (DBS) para el diagnóstico de la malaria.....24

Figura 19. Vida media de los dos componentes de las Terapias Combinadas basadas en Artemisininas (TCA). 27

Figura 20. Mecanismos de resistencia a los antimaláricos. 31

Figura 21. Estructura de los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* y sus regiones flanqueantes....36

Figura 22. Mapa de prevalencia de deleciones de *pfhrp2* en 2024....38

Figura 23. Distribución de los marcadores moleculares de resistencia a las artemisininas en África según la OMS hasta 2024. 41

Figura 24. Principales haplotipos de los genes *pfcrt* y *pfmdr1* asociados a resistencias a antimaláricos en África....43

Figura 25. Evolución espacio-temporal de la expansión de marcadores de resistencia a SP en África bajo umbrales críticos de prevalencia. 45

Figura 26. Diagrama de flujo de la metodología llevada a cabo en los estudios incluidos en esta tesis. 51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fármacos y tipos de tratamientos quimioprofilácticos de la malaria.....29

Tabla 2. Resumen del tratamiento y la quimioprofilaxis de la malaria 34

Tabla 3. Marcadores moleculares de resistencia a las artemisininas: gen *pfk13* 40

Tabla 4. Marcadores de resistencia a las 4-aminoquinolonas, arilaminoalcoholes y antifolatos de *P. falciparum*. 46

LISTA DE ABREVIATURAS

AL: arteméter-lumefantrina

AS: África subsahariana

AS + AQ: artesunato-amodiaquina

AS + MQ: artesunato-mefloquina

AS + SP: artesunato-sulfadoxina-pirimetamina

Ct: ciclo umbral

DBS: muestras de sangre seca (*Dried Blood Spots*)

DHA + PPQ: dihidroartemisinina-piperaquina

dPCR: PCR digital

EET: estudios de eficacia terapéutica

GTS: Estrategia Técnica Mundial contra la Malaria 2016-2030 (*Global Technical Strategy for Malaria*)

HNSP: Hospital Nossa Senhora da Paz

HUVH: Hospital Universitario Vall d'Hebron

INIS: Instituto Nacional de Investigação em Saúde

LAMP: amplificación isotérmica mediada por bucle (*Loop-Mediated Isothermal Amplification*)

MAb: anticuerpos monoclonales (*Monoclonal Antibody*)

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

PCR-DBS: PCR a partir de DBS

PDR: Prueba de Diagnóstico Rápido

PDR-*Pf*HRP2: PDR dirigidas a *Pf*HRP2

*Pf*CRT: transportador de resistencia a la cloroquina de *P. falciparum* (*Chloroquine Resistance Transporter*)

*Pf*HRP2: proteína rica en histidina 2 de *P. falciparum* (*Histidine-Rich Protein 2*)

*Pf*HRP3: proteína rica en histidina 3 de *P. falciparum* (*Histidine-Rich Protein 3*)

*Pf*MDR1: proteína 1 de resistencia a múltiples fármacos de *P. falciparum* (*Multi-Drug Resistance Protein 1*)

PNCM: Programa Nacional de Control de Malaria

qPCR: PCR en tiempo real cuantitativa

QEM: quimioprofilaxis estacional de malaria en niños

QPM: quimioprevención perenne de malaria

RDC: República Democrática del Congo

SNP: polimorfismo de nucleótido único (*Single Nucleotide Polymorphism*)

SP: sulfadoxina-pirimetamina

SP + AQ: sulfadoxina-pirimetamina-amodiaquina

TAAN: técnicas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos

TCA: Terapias Combinadas Basadas en Artemisininas

TPIe: Tratamiento Preventivo Intermitente en embarazadas

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

RESUMEN

La malaria supone un gran desafío de salud pública a nivel global. La mayor carga de enfermedad se concentra en la región de África subsahariana, donde se registran anualmente más del 90% de los casos y muertes a nivel mundial. Angola se sitúa de forma constante entre los países con mayor impacto epidemiológico, ocupando actualmente el sexto lugar en incidencia y el octavo en mortalidad. El municipio de Cubal es una región rural en el interior de Angola caracterizada por una alta endemicidad. Comúnmente, el diagnóstico de la malaria en este tipo de contextos se basa en el examen microscópico y las pruebas de diagnóstico rápido (PDR). Aunque son fundamentales, estas herramientas presentan serias limitaciones: la microscopía es altamente dependiente de la experiencia del observador y carece de sensibilidad para detectar infecciones con baja parasitemia, mientras que las PDR no permiten cuantificar la carga parasitaria y son vulnerables a mecanismos de evasión diagnóstica como las deleciones en los genes *pfhrp2*/*pfhrp3*. Alternativamente surgen las técnicas moleculares como la PCR en tiempo real y la secuenciación genética para mejorar la precisión del diagnóstico y realizar una vigilancia epidemiológica robusta, respectivamente. Para superar las barreras logísticas de los entornos rurales con recursos limitados, el uso de muestras de sangre seca (DBS) se presenta como una solución factible que facilita el transporte y conservación de material genético sin necesidad de cadena de frío. Asimismo, la creciente preocupación por la aparición de cepas con deleciones génicas que comprometen la eficacia de las PDR, y la emergencia de la cada vez más extendida resistencia a los antimaláricos, justifican la necesidad de establecer sistemas de vigilancia molecular para garantizar la eficacia de las estrategias de control y tratamiento.

El objetivo de esta tesis doctoral es evaluar la aplicación de las técnicas moleculares para fortalecer los sistemas de vigilancia de la malaria en el municipio de Cubal. Para ello, se propuso estimar la carga de la enfermedad, evaluar específicamente el rendimiento diagnóstico de la PCR en tiempo real y la viabilidad de llevar a cabo estudios moleculares a partir de muestras de DBS. Por otro lado, se quiso determinar la frecuencia de las deleciones en los genes *pfhrp2* y *pfhrp3*, así como caracterizar los marcadores moleculares asociados a la resistencia a artemisininas y otros antimaláricos utilizados en Cubal.

Se desarrollaron cuatro estudios en los que se combinó el trabajo de campo en Cubal con el análisis molecular. Se realizaron dos muestreos entre 2022 y 2023 en el Hospital Nossa Senhora da Paz de Cubal, cuyas muestras se enviaron al Hospital Universitario Vall d'Hebron de Barcelona para realizar los estudios moleculares. Este enfoque permitió

evaluar el rendimiento diagnóstico de la PCR a tiempo real frente a las técnicas convencionales (microscopía y PDR), estudiar la utilidad del DBS en la recolección y transporte de muestras, y proceder a la caracterización genética detallada de los casos producidos por *P. falciparum*.

Los resultados revelaron una prevalencia estimada por PCR a partir de DBS del 50% en pacientes febriles de Cubal y una tasa de positividad global de las técnicas diagnósticas que alcanzó el 61,5%. *P. falciparum* fue la especie predominante (100% de los casos), aunque la PCR identificó una presencia significativa de infecciones mixtas (18,6%) con otras especies (*P. malariae* y/o *P. ovale*). La PCR mostró una sensibilidad del 83,6% utilizando la microscopía como referencia. Por otro lado, utilizando el diagnóstico en terreno como referencia (microscopía + PDR) la PCR a partir de DBS mostró mayor sensibilidad (77,7%) que la PCR a partir de los eluidos de ADN extraídos *in situ* (64,1%), confirmando su viabilidad operativa para la vigilancia molecular en entornos con recursos limitados. Respecto a la evasión diagnóstica, no se encontraron deleciones en el exón 2 de *pfhrp2* ni presencia de deleciones dobles (*pfhrp2*/*3*), lo que garantiza el mantenimiento de la utilidad de las PDR basadas en *Pf*HRP2 en Cubal. En cuanto a las resistencias, el análisis del gen *pfk13* no detectó mutaciones validadas de resistencia a artemisininas. Sin embargo, se observó una elevada frecuencia de mutaciones en los genes *pfdhfr* y *pfdhps* asociadas a la resistencia a la sulfadoxina-pirimetamina, con el haplotipo "totalmente resistente" (**IRNGE**) presente en la población en el 17,8% de los casos.

En conclusión, el municipio de Cubal continúa enfrentando una elevada carga de malaria que requiere de estrategias de vigilancia reforzadas. Las técnicas moleculares complementan significativamente al diagnóstico convencional, permitiendo una estimación más precisa de la prevalencia real y de las especies de *Plasmodium* circulantes. El uso de DBS constituye una estrategia factible y eficaz para implementar la vigilancia molecular en entornos rurales como el de Cubal, eliminando las barreras del transporte en cadena de frío. Aunque actualmente las deleciones de *pfhrp2*/*3* no representan una amenaza inmediata para la fiabilidad de las PDR y no existen evidencias de resistencia a las artemisininas en esta región, la detección de marcadores de resistencia a otros fármacos subraya la necesidad de una vigilancia continua.

ABSTRACT

Malaria remains a major global public health challenge. The greatest burden of disease is concentrated in sub-Saharan Africa, where more than 90% of malaria cases and deaths worldwide are reported each year. Angola is consistently among the countries most affected by malaria, currently ranking sixth in incidence and eighth in mortality. The municipality of Cubal is a rural region in inland Angola characterized by high endemicity. In such settings, malaria diagnosis commonly relies on microscopic examination and rapid diagnostic tests (RDTs). Although these tools are essential, they present important limitations: microscopy is highly dependent on the observer's expertise and lacks sensitivity for detecting low-parasitaemia infections, while RDTs do not allow parasite density quantification and are vulnerable to diagnostic evasion mechanisms such as deletions in the *pfhrp2*/*pfhrp3* genes. Alternatively, molecular techniques such as real-time PCR and genetic sequencing have emerged to improve diagnostic accuracy and enable robust epidemiological surveillance, respectively. To overcome the logistical barriers of rural, resource-limited settings, the use of dried blood spot (DBS) samples represents a feasible solution, facilitating the transport and preservation of genetic material without the need for a cold chain. Furthermore, the growing concern regarding the emergence of parasite strains carrying gene deletions that compromise RDT performance, together with the increasing spread of antimalarial drug resistance, highlights the need to establish molecular surveillance systems to ensure the effectiveness of malaria control and treatment strategies.

The aim of this doctoral thesis was to evaluate the application of molecular techniques to strengthen malaria surveillance systems in the municipality of Cubal. Specifically, the objectives were to estimate the burden of disease, assess the diagnostic performance of real-time PCR, and evaluate the feasibility of conducting molecular studies using DBS samples. In addition, the frequency of *pfhrp2* and *pfhrp3* gene deletions was determined, and molecular markers associated with resistance to artemisinins and other antimalarial drugs used in Cubal were characterized.

Four studies were conducted, combining fieldwork in Cubal with molecular analysis. Two sampling campaigns were carried out between 2022 and 2023 at Nossa Senhora da Paz Hospital in Cubal, and the collected samples were subsequently sent to Vall d'Hebron University Hospital in Barcelona for molecular testing. This approach enabled the assessment of the diagnostic performance of real-time PCR compared with conventional

techniques (microscopy and RDTs), the evaluation of DBS utility for sample collection and transport, and the detailed genetic characterization of *P. falciparum* infections.

The results revealed a PCR-estimated prevalence of 50% among febrile patients in Cubal using DBS samples, while the overall positivity rate of diagnostic techniques reached 61.5%. *P. falciparum* was the predominant species (100% of cases), although PCR identified a significant presence of other species (*P. malariae* and *P. ovale*) and 18.6% mixed infections. PCR showed a sensitivity of 83.6% using microscopy as the reference standard. Furthermore, when field diagnosis (microscopy plus RDTs) was used as the reference standard, PCR performed on DBS samples showed higher sensitivity (77.7%) than PCR performed on DNA eluates extracted *in situ* (64.1%), confirming its operational feasibility for molecular surveillance in resource-limited settings. Regarding diagnostic evasion, no deletions were detected in exon 2 of *pfhrp2*, nor were any double deletions (*pfhrp2*/*pfhrp3*) identified, supporting the continued utility of *Pf*HRP2-based RDTs in Cubal. Concerning antimalarial resistance, analysis of the *pfk13* gene did not detect any validated mutations associated with artemisinin resistance. However, a high frequency of mutations in the *pfdhfr* and *pfdhps* genes associated with sulfadoxine-pyrimethamine resistance was observed, with the "fully resistant" haplotype (**IRNGE**) present in 17.8% of cases.

In conclusion, the municipality of Cubal continues to face a high malaria burden that requires strengthened surveillance strategies. Molecular techniques significantly complement conventional diagnostic methods, enabling a more accurate estimation of the true prevalence of malaria and the circulating *Plasmodium* species. The use of DBS constitutes a feasible and effective strategy for implementing molecular surveillance in rural settings such as Cubal, eliminating the logistical constraints associated with cold-chain transport. Although *pfhrp2*/*pfhrp3* deletions do not currently represent an immediate threat to the reliability of RDTs and there is no evidence of artemisinin resistance in this region, the detection of resistance markers to other antimalarial drugs highlights the need for continuous molecular surveillance.

1. Introducción

1.1. Reseña histórica de la malaria

1.1.1. Primeras descripciones y percepción histórica de la enfermedad

La malaria, o paludismo, es una enfermedad con miles de años de historia documentada desde los comienzos de las primeras civilizaciones humanas. Evidencias moleculares sitúan le existencia del parásito en el 3200 a.C., al encontrarse antígenos de *Plasmodium falciparum* en restos humanos momificados en Egipto [1]. Las primeras referencias datan aproximadamente del 2700 a.C. en la antigua China y del 2000 a.C. en Mesopotamia, encontradas en escritos que hablaban de fiebres mortales periódicas [2]. En la India, los textos védicos y brahmánicos (1500-800 a.C.) describían estas fiebres como una de las enfermedades más graves y comunes del momento, llegándola a denominar como "el rey de las enfermedades" [3].

Hipócrates (460-370 a.C.) llevó a cabo una clasificación y caracterización detallada de los patrones de fiebre intermitente, estableciendo categorías que se atribuyen a distintas especies de *Plasmodium* [4], relacionando la enfermedad directamente a factores ambientales, como la estacionalidad (finales de verano y otoño) y la proximidad a zonas húmedas o pantanosas [2,5].

La teoría de los miasmas, predominante durante más de 2000 años, atribuía la sintomatología descrita a la inhalación de emanaciones nocivas procedentes de ambientes insalubres como aguas estancadas y zonas pantanosas [2,5]. Esta concepción influyó directamente en el nombre de la enfermedad, ya que el término "malaria" proviene de expresiones italianas que se refieren al "mal aire". Por otra parte, la denominación "paludismo", ampliamente utilizado en el contexto hispanohablante, procede del término latín "palus", que significa pantano [6,7].

En cuanto a las estrategias terapéuticas tradicionales, el uso de la corteza del árbol de la quina (*Cinchona* spp.) supuso un punto de inflexión en el tratamiento de la enfermedad. En el siglo XVII, los misioneros jesuitas que habían observado este hábito en las comunidades indígenas andinas introdujeron la corteza en España y expandieron su uso por Europa como un remedio eficaz frente a las fiebres intermitentes. Antes del aislamiento de la quinina en 1820, su administración se basaba en la desecación y pulverización de la corteza en distintos líquidos [8].

1.1.2. Descubrimiento del agente etiológico y del vector

En 1880 el médico militar francés Alphonse Laveran identificó el agente causal de la malaria al observar, en muestras de sangre de un soldado febril en Argelia, cuerpos hialinos pigmentados y presenciar el fenómeno de la exflagelación de los microgametocitos, lo que significó la primera descripción de la naturaleza parasitaria y protozoaria de la infección (Figura 1) [8].

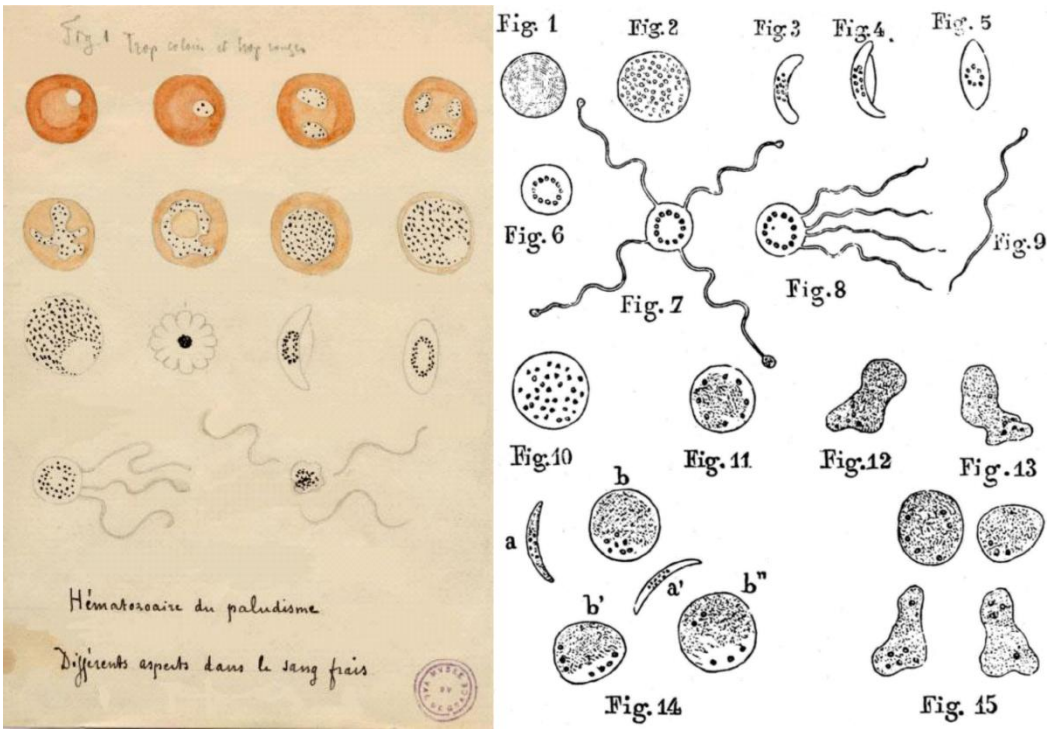


Figura 1. Ilustraciones de *Plasmodium* spp. por Laveran. Primeras ilustraciones del agente etiológico de la malaria (*Plasmodium* spp.) realizadas por Laveran en 1880 tras sus observaciones del parásito en muestras de sangre fresca de soldados con paludismo [9].

En 1897 Ronald Ross observó formas parasitarias en el tubo digestivo de un mosquito de "alas moteadas" alimentado con sangre de un paciente infectado [3]; posteriormente, mediante el modelo de malaria aviar (*P. rectilium*) describió el ciclo completo [3]. Más tarde, entre 1898 y 1899, un grupo de científicos italianos entre los que destacó Giovanni Batista Grassi, identificaron los mosquitos del género *Anopheles* como vectores responsables de la transmisión a humanos, tras transmitir experimentalmente la fiebre terciana a un voluntario sano mediante la picadura del mosquito *Anopheles claviger* [7]. William MacCallum describió los procesos de reproducción sexual del parásito en el mosquito, contribuyendo a esclarecer su ciclo vital [2].

1.1.3. Tratamiento y estrategias de control a lo largo del siglo XX

El siglo XX supuso un cambio sustancial en el abordaje de la malaria, comenzando el desarrollo de fármacos sintéticos y la implementación de estrategias de control a gran escala. Aunque el aislamiento de la quinina se sitúa en 1820 constituyendo el primer tratamiento eficaz documentado [10], su producción a gran escala consolidó su uso clínico durante las primeras décadas del siglo XX [3,10].

A pesar de su eficacia, las limitaciones de suministros naturales y los efectos secundarios que producía la quinina impulsaron la investigación de alternativas sintéticas [11]. Tras la Primera Guerra Mundial y durante el transcurso de la Segunda, se desarrollaron diferentes fármacos entre los que destacó la cloroquina, sintetizada en 1934 por Hans Andersag [4], convirtiéndose en el tratamiento antimalárico de referencia a nivel mundial debido a su elevada eficacia, bajo coste y perfil de seguridad favorable [11].

El avance farmacológico coincidió con el desarrollo de estrategias de control vectorial, como el uso de insecticidas de acción residual tras el descubrimiento de las propiedades del Dicloro-Difenil-Tricloroetano por Paul Hermann Müller en 1939 [5]. En este contexto, en 1955 la Organización Mundial de la Salud (OMS) impulsó el Programa Global de la Erradicación de la Malaria, basado en la combinación del control vectorial con insecticidas y el tratamiento de casos con cloroquina [12]. Aunque esta iniciativa consiguió eliminar la malaria en Europa, América del Norte y varias regiones de Asia y el Caribe, su implementación resultó insuficiente en áreas de alta transmisión, particularmente en África subsahariana (AS), debido a la falta de estructura y a la aparición de resistencias por parte del vector y del parásito, por lo que el programa fue abandonado en 1969 [4,12].

A partir de 1960, la aparición de resistencias a la cloroquina condicionó en gran medida las estrategias de control. Inicialmente descritas en el Sudeste Asiático y Colombia, las resistencias a la cloroquina se extendieron rápidamente hacia el continente africano en los años 80 [11]. Como respuesta se introdujo la combinación sulfadoxina-pirimetamina (SP), pero la rápida emergencia de resistencias obligó a la búsqueda de alternativas terapéuticas [13]. Entre ellas, la mefloquina, desarrollada en el ámbito militar, fue altamente efectiva para tratar la malaria resistente, sin embargo, la resistencia a este fármaco emergió hacia el 1985, centrándose principalmente en regiones del Sudeste Asiático [14]. Al mismo tiempo se reforzaron las intervenciones preventivas, destacando el uso de mosquiteras tratadas con insecticidas de larga duración, consolidándose como uno de los pilares fundamentales en el control de la malaria a finales del siglo XX [15,16].

1.1.4. Transición hacia tratamientos y estrategias modernas de control

Al finalizar el siglo XX, las estrategias de control de la malaria se veían amenazadas por la pérdida progresiva de la eficacia de los fármacos de primera línea. La introducción de los derivados de la artemisinina significó un paso hacia delante en la terapia antimalárica. Este compuesto fue aislado originalmente en 1972 por un grupo de investigadores chinos liderado por Tu Youyou, a partir de la planta *Artemisia annua* [5,17].

Con el objetivo de preservar la eficacia de estos compuestos y evitar la rápida selección de resistencias, se impulsó el desarrollo de las Terapias Combinadas Basadas en Artemisininas (TCA) [18]. En 2002, la OMS recomendó oficialmente su uso como tratamiento de primera línea para la malaria no complicada en países donde los niveles de resistencia a la cloroquina habían alcanzado niveles significativos (tasa de fracaso terapéutico > 25%) [3,19], generalizándose a todos los países endémicos en 2006 [20]. Sin embargo, en el año 2007, volvió a aparecer la preocupación de su efectividad, al detectar resistencias parciales a las artemisininas en la frontera de Tailandia y Camboya [21].

Al mismo tiempo que se producían estos cambios en las políticas de tratamiento, el diagnóstico experimentó una transformación significativa con la introducción de las pruebas de diagnóstico rápido (PDR) a finales de la década de 1990 [22]. Tradicionalmente el diagnóstico de la malaria se había basado en el examen microscópico de frotis de sangre periférica teñidos, una técnica que desde su aparición en 1880 se ha mantenido como el patrón de oro (*gold standard* en inglés) por su capacidad de diferenciar especies de *Plasmodium* y cuantificar la densidad parasitaria [23]. Sin embargo, debido a sus limitaciones como la necesidad de instrumentación y personal cualificado [23], durante décadas predominó el diagnóstico clínico presuntivo en gran parte de las regiones endémicas, lo que conllevaba a un uso inadecuado de los antimaláricos y a manejo ineficiente de la enfermedad [3]. Por ello, en 2010 la OMS recomendó que el manejo clínico de la malaria se fundamentara en la confirmación parasitológica previa al inicio del tratamiento. En este contexto, las PDR adquirieron un papel clave, consolidándose como herramientas complementarias a la microscopía y permitiendo ampliar el acceso al diagnóstico en entornos donde esta no es viable [22].

Este avance diagnóstico ha sido complementado por el desarrollo de técnicas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la secuenciación genómica, las cuales han tenido un impacto considerable en la capacidad de detección y vigilancia epidemiológica [24,25]. Este desarrollo ha favorecido una transición hacia modelos de

vigilancia más precisos y dinámicos, integrados en estrategias globales como la Estrategia Técnica Mundial contra la Malaria 2016-2030 (GTS) [25].

1.2. Características biológicas de la malaria

1.2.1. Etiología de la malaria

1.2.1.1. Clasificación taxonómica y filogenia del género Plasmodium

La malaria está causada por un protozoo parásito perteneciente al filo Apicomplexa, clase Aconoidasida y orden Haemosporida [26]. Tradicionalmente agrupados en el género *Plasmodium*, estudios filogenéticos recientes han puesto de manifiesto la naturaleza polifilética de este grupo (Figura 2) [27].

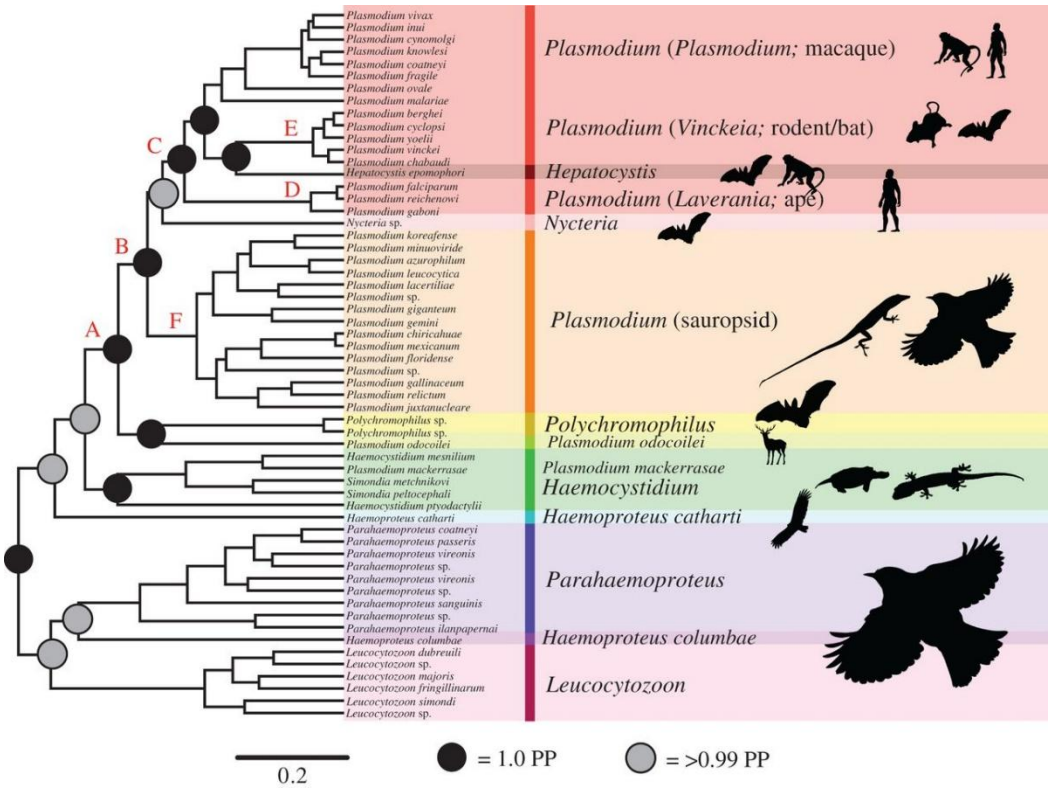


Figura 2. Filogenia del orden Haemosporida. El árbol ilustra la naturaleza polifilética del género *Plasmodium*, demostrando que diversos clados englobados en este género presentan mayor semejanza evolutiva con otros géneros hemosporidios como *Hepatocystis*, *Nycteria* o *Polychromophilus* [27].

1.2.1.2. Características biológicas generales

Los parásitos del género *Plasmodium* presentan adaptaciones especializadas a su forma de vida intracelular. Destaca su complejo apical, una estructura polarizada conformada

por orgánulos secretores (Figura 3), imprescindible para la invasión eritrocítica [28]. Por otro lado, un punto crítico en su supervivencia en la fase hemática, es cuando se produce la degradación de la hemoglobina en la vacuola digestiva, que genera como subproducto un residuo tóxico conocido como hemozoína o pigmento malárico [29,30].

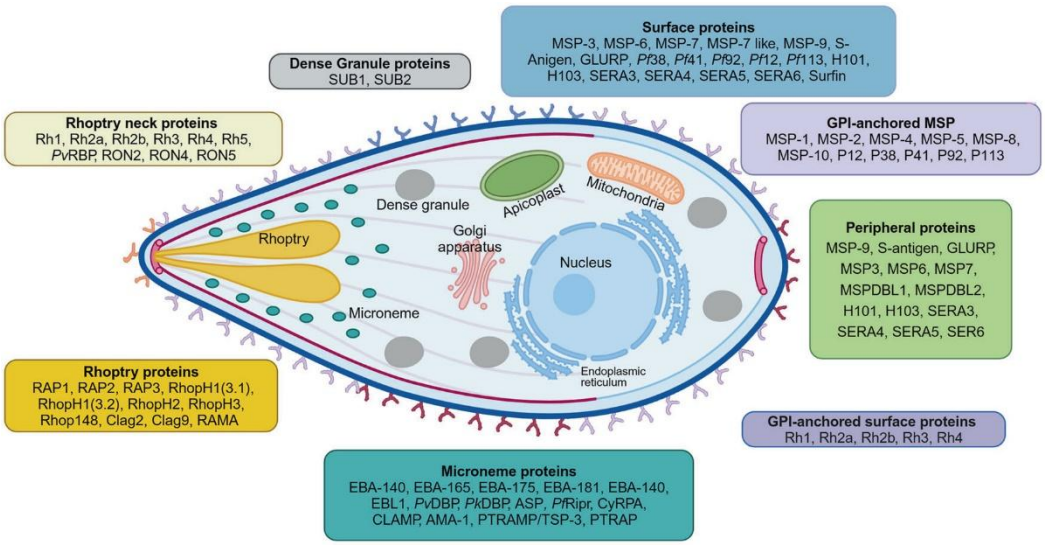


Figura 3. Morfología del merozoíto de *Plasmodium* spp. y proteínas implicadas en la invasión eritrocítica [31].

1.2.1.3. Especificidad del hospedador y características del vector

El ciclo biológico de *Plasmodium* spp. es heteroxeno y requiere de dos hospedadores:

- **Hospedador intermediario (vertebrados)**: a pesar de que el humano es el de mayor relevancia clínica, más de 200 especies de *Plasmodium* infectan a una gran variedad de vertebrados, entre los que se incluyen tanto mamíferos (primates no humanos, roedores, murciélagos y ungulados) como aves y reptiles [32].
- **Hospedador definitivo (mosquito)**: la transmisión natural de la malaria depende exclusivamente de mosquitos hembra del género *Anopheles*, los cuales transmiten al parásito actuando como vector. Presentan hábitos principalmente nocturnos y crepusculares. Alrededor de 68 especies de *Anopheles* poseen la capacidad de transmisión al ser humano, la cual está determinada por características ecológicas y conductuales [33].

1.2.1.4. Especies de Plasmodium que infectan al ser humano

A continuación, se describen las principales características biológicas y distribución geográfica de las seis especies de *Plasmodium* que infectan al ser humano:

P. falciparum: pertenece al subgénero *Laverania* [34]. Presenta un ciclo eritrocítico de unas 48 horas y se caracteriza por su capacidad de invadir eritrocitos de todas las edades, lo que favorece al desarrollo de altas parasitemias [28]. Se distribuye por todas las regiones tropicales del mundo, siendo con diferencia la especie más prevalente en AS [35,36].

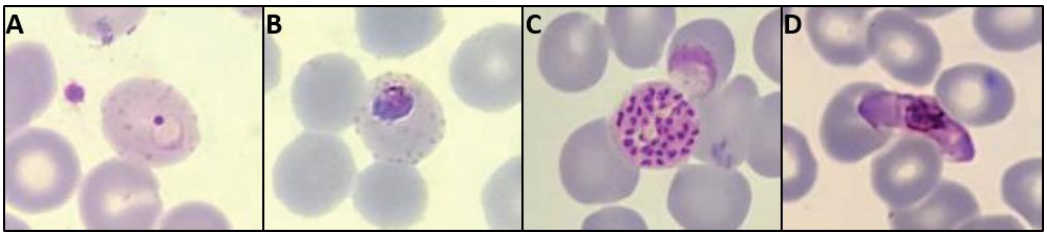


Figura 4. Fotografías de los diferentes estadios eritrocíticos de *P. falciparum*. **A** Anillo, **B** Trofozoíto, **C** Esquizonte y **D** Gametocito; observados mediante microscopía de frotis de sangre fina teñidas con Giemsa [35].

P. vivax: su ciclo eritrocítico es de 48 horas [37]. Se distingue por su capacidad de formar hipnozoítos hepáticos, responsables de recaídas clínicas semanas o meses tras la infección inicial [38]. Tiene un marcado tropismo por los reticulocitos y precisa de la interacción del antígeno Duffy para la invasión [39], por lo que su presencia en África es limitada debido a la alta prevalencia del fenotipo Duffy-negativo [38]. Es la especie con mayor distribución geográfica a nivel global, predominando en Asia, Oriente Medio y Sudamérica.

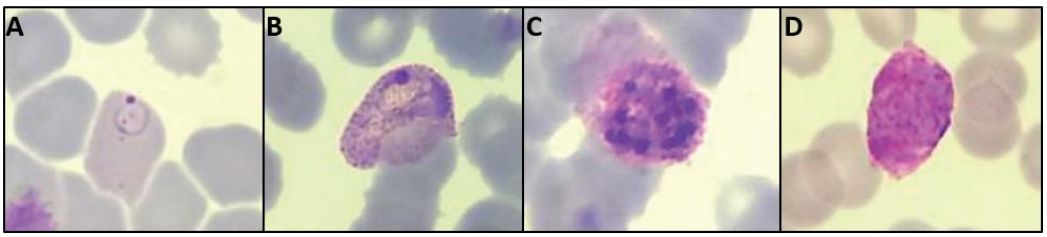


Figura 5. Fotografías de los diferentes estadios eritrocíticos de *P. vivax*. **A** Anillo, **B** Trofozoíto, **C** Esquizonte y **D** Gametocito; observados mediante microscopía de frotis de sangre fina teñidas con Giemsa [35].

***P. ovale* (*curtisi* y *wallikeri*)**: a pesar de que históricamente se clasificara como una única especie, estudios recientes han determinado que la malaria producida por *P.ovale* es causada por dos especies distintas *P. o. curtisi* y *P. o. wallikeri*, las cuales no se diferencian morfológicamente por microscopía, coexisten en las mismas regiones geográficas y no se cruzan entre sí [40]. Comparten con *P. vivax* la capacidad de formar hipnozoítos y el tropismo por reticulocitos, con un período de latencia mucho más prolongado en *P. o. curtisi* [41]. Su ciclo eritrocítico es de 48 horas [35]. La mayoría de

los casos se concentran en AS, y excepcionalmente en Asia y regiones insulares del Pacífico [42].

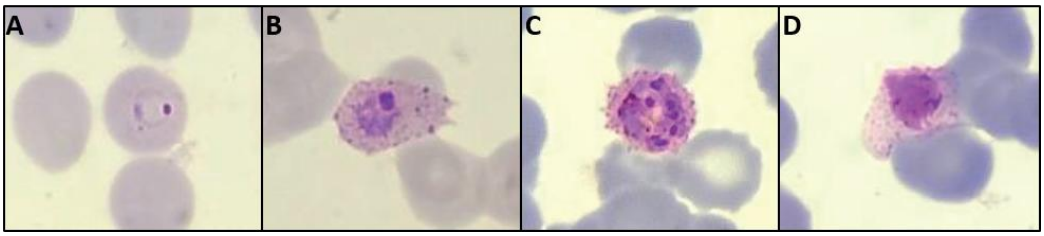


Figura 6. Fotografías de los diferentes estadios eritrocíticos de *P. ovale (wallikeri/curtisi)*. **A** Anillo, **B** Trofozoíto, **C** Esquizonte y **D** Gametocito; observados mediante microscopía de frotis de sangre fina teñidas con Giemsa [35].

P. malariae: se caracteriza por un ciclo eritrocítico más prolongado, de 72 horas. Invaden preferentemente eritrocitos maduros o envejecidos [43]. Puede llegar a persistir de forma crónica durante décadas en bajas densidades parasitarias [40]. Presenta una distribución amplia pero heterogénea en regiones tropicales y subtropicales de AS, Sudeste Asiático y Centro y Sudamérica [43].

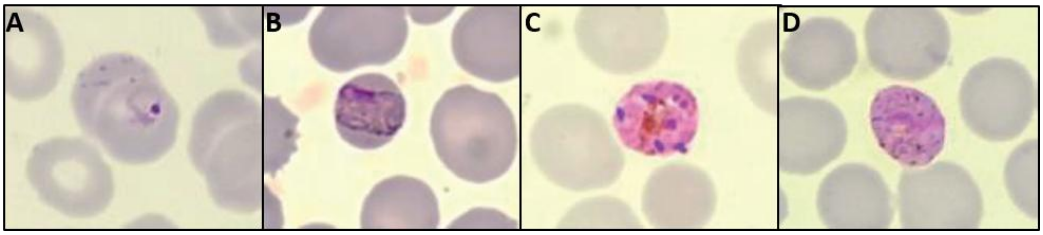


Figura 7. Fotografías de los diferentes estadios eritrocíticos de *P. malariae*. **A** Anillo, **B** Trofozoíto, **C** Esquizonte y **D** Gametocito; observados mediante microscopía de frotis de sangre fina teñidas con Giemsa [35].

P. knowlesi: es un parásito zoonótico cuyo reservorio natural incluye los macacos de cola larga (*Macaca fascicularis*) y de cola de cerdo (*M. nemestrina*) [44]. Presenta el ciclo eritrocítico más corto de las especies humanas (24 horas), lo que puede conllevar a incrementos rápidos de la parasitemia [45]. Su distribución se restringe al sudeste asiático, principalmente en Malasia, aunque se han observado casos en Tailandia, Myanmar, Camboya, Vietnam, Singapore, Indonesia y Filipinas [31].

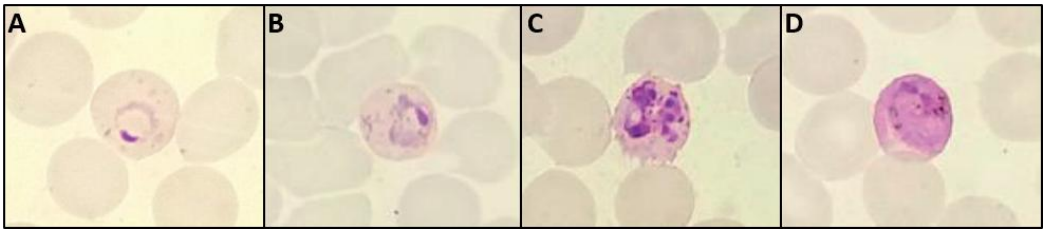


Figura 8. Fotografías de los diferentes estadios eritrocíticos de *P. knowlesi*. **A** Anillo, **B** Trofozoíto, **C** Esquizonte y **D** Gametocito; observados mediante microscopía de frotis de sangre fina [35].

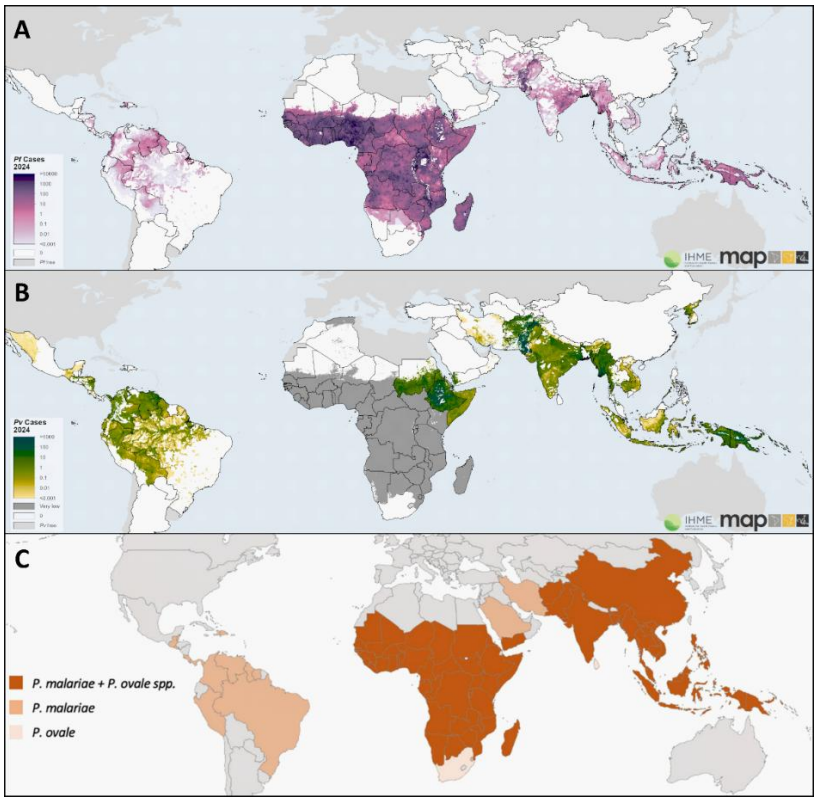


Figura 9. Distribución geográfica de las principales especies de *Plasmodium* que infectan humanos. **A** Mapa cuantitativo sobre la distribución de número de casos de malaria *falciparum* en 2024. **B** Mapa cuantitativo sobre la distribución de número de casos de malaria *vivax* en 2024 [46]. **C** Mapa cualitativo de la distribución de *P. ovale* y *P. malariae* [42]. No se muestran datos de *P. knowlesi*, aunque su distribución está restringida al sudeste asiático.

1.2.2. Ciclo biológico de *Plasmodium* spp.

El ciclo biológico de los parásitos del género *Plasmodium* es complejo ya que es un parásito intracelular obligado, y requiere la alternancia entre el mosquito hembra del género *Anopheles* y el humano [32]. A continuación, se muestra esquemáticamente las diferentes fases del ciclo de la malaria humana, iniciándose en el momento de la infección:

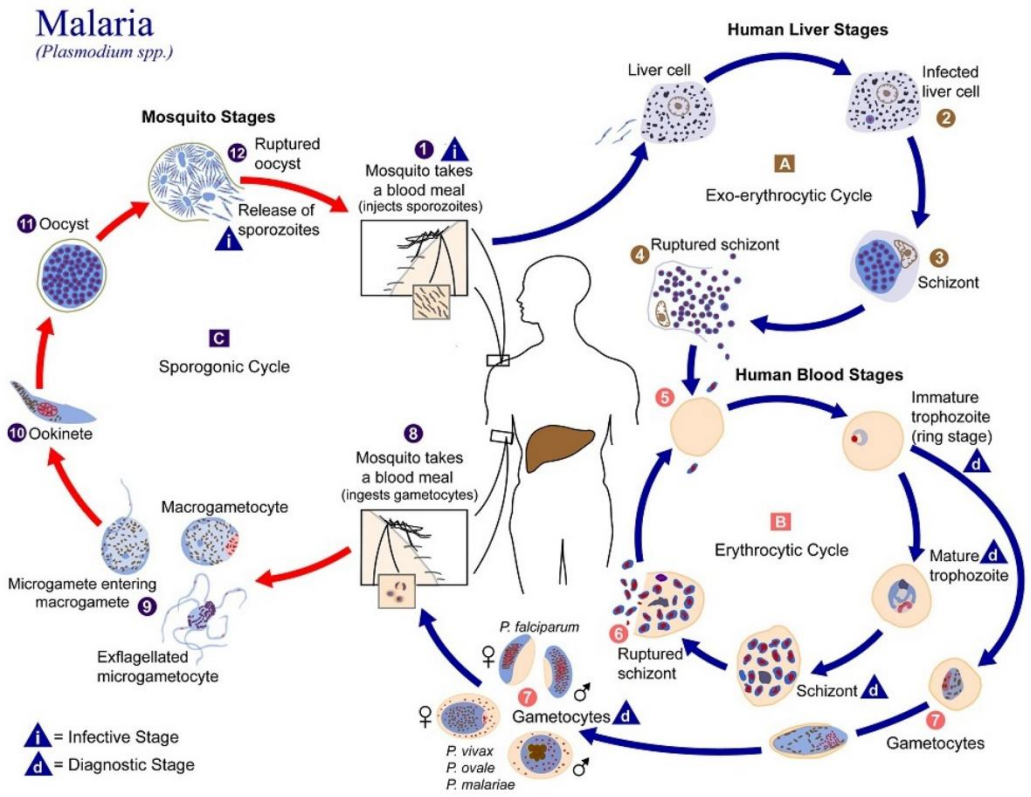


Figura 10. Ciclo biológico de la malaria. Se muestra una representación gráfica del ciclo de vida de *Plasmodium* spp. utilizando al humano como hospedador intermediario. El ciclo se divide en tres fases: **A** ciclo exoeritrocítico, **B** ciclo eritrocítico y **C** ciclo esporogónico [47].

Fase hepática (exoeritrocítica): la infección comienza con la inoculación de esporozoítos durante la picadura del mosquito infectado. Estas formas móviles se liberan al torrente sanguíneo y llegan hasta el hígado, invadiendo los hepatocitos. En este momento, el parásito experimenta una intensa reproducción asexual (esquizogonia hepática), formando esquizontes que contienen decenas de miles de merozoítos. Cuando estos maduran, retornan a la circulación sanguínea (Figura 10A) [48]. En el caso de *P. vivax* y *P. ovale*, una fracción de parásitos hepáticos puede permanecer en estado latente y no dividirse, formando así los hipnozoítos, que pueden dar lugar a recaídas futuras [35].

Fase eritrocítica: es la fase clínica del ciclo [33]. En ella, los merozoítos invaden los eritrocitos mediante una serie de interacciones ligando-receptor [49]. Una vez en el interior del hematíe, el parásito madura y pasa por las fases de anillo, trofozoíto y esquizonte. En el interior del esquizonte se producen los merozoítos que, tras la ruptura sincronizada de los eritrocitos infectados se liberan, reiniciando esta fase del ciclo [33]. La duración del ciclo eritrocítico es dependiente de la especie (24, 48 o 72 horas) y

determina la periocidad de la fiebre. Como parte de la transmisión, una pequeña proporción de trofozoítos jóvenes se diferencian en gametocitos (microgametocitos ♂ y macrogametocitos ♀), que circularán en la sangre hasta ser ingeridos durante una nueva picadura [32].

Fase esporogónica: es la fase sexual del ciclo. Comienza cuando el mosquito ingiere sangre humana infectada con gametocitos, estos maduran en el intestino medio a gametos, produciéndose la fecundación y la formación del zigoto, única fase diploide del parásito. Este evoluciona a oocineto, el cual atraviesa el epitelio intestinal y se transforma en ooquiste [33]. En su interior se da el proceso de esporogonia, generando miles de esporozoítos haploides. Tras la ruptura del ooquiste, los esporozoítos migran a las glándulas salivales del mosquito y permanecen a la espera de una nueva picadura, reiniciándose el ciclo [50].

A pesar de que la transmisión vectorial es la forma natural y más habitual de contraer la infección [51], existen otras vías mucho más infrecuentes como: transfusiones sanguíneas [52], trasplantes de órganos [53], vía congénita y neonatal [54], y la transmisión nosocomial por el uso accidental de material punzante contaminado [55].

1.3. Epidemiología de la malaria

1.3.1. La malaria como problema de salud pública global

La malaria continúa representando uno de los principales desafíos para la salud pública global. Según la OMS, en 2024 se registraron alrededor de 282 millones de casos y 610.000 muertes en 85 países endémicos, lo que sugiere un incremento con respecto a los 273 millones de casos y 598.000 muertes de 2023. Su distribución geográfica es marcadamente heterogénea, concentrándose de forma predominante en la Región africana de la OMS, la cual el 2024 acumuló el 94% de los casos y el 95% de las defunciones. Otras regiones con incidencia significativa incluyen el Sudeste Asiático, el Mediterráneo Oriental, el Pacífico Occidental y las Américas (Figura 11) [36].

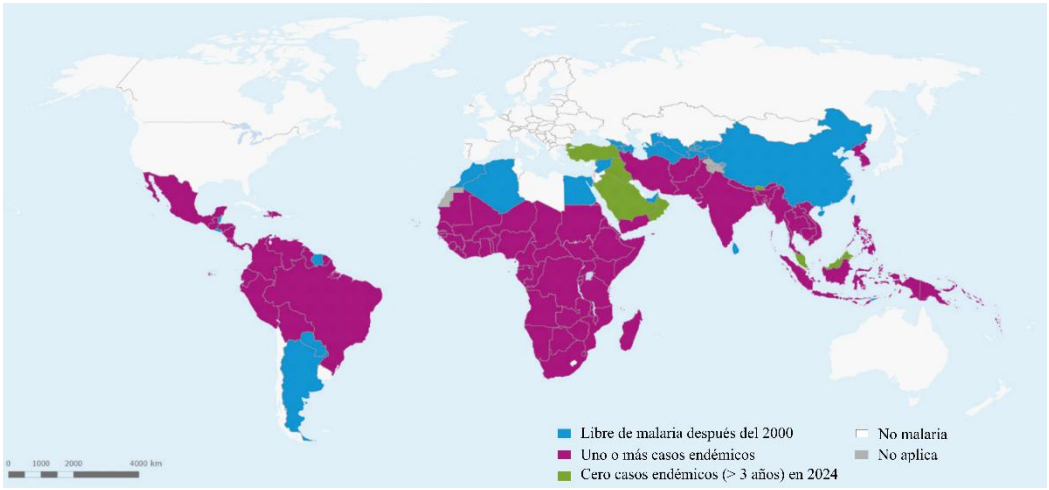


Figura 11. Países con casos endémicos de malaria en el año 2000 y su estado en 2024 [36].

Entre los años 2000 y 2015 se lograron avances significativos en el control de la enfermedad, con una reducción del 40% en la incidencia clínica y una disminución sustancial de la prevalencia en África [56]. No obstante, desde 2015-2016 este progreso se ha ralentizado e incluso revertido en algunas regiones. Este estancamiento se atribuye a múltiples factores como, el cambio climático, las crisis humanitarias, las limitaciones en la financiación de los programas de control y, de forma especialmente relevante, las interrupciones en los servicios sanitarios derivadas de la pandemia COVID-19 (Figura 12) [57].

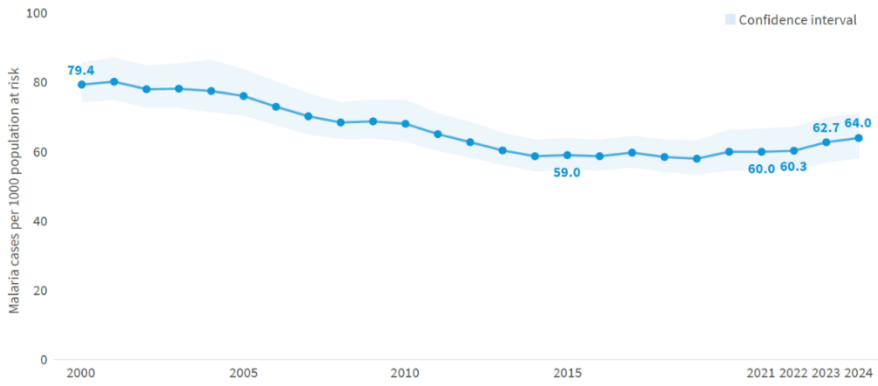


Figura 12. Evolución temporal de la incidencia de casos de malaria a nivel mundial [36]. Se muestra gráficamente el número de casos de malaria (por cada 1000 habitantes) en todo el mundo.

Para conseguir la erradicación de la malaria, la OMS establece tres pilares fundamentales articulados en la GTS: 1) acceso universal a la prevención, diagnóstico y tratamiento; 2) aceleración de la eliminación; y 3) fortalecimiento de la vigilancia mediante sistemas de información robustos que permitan orientar las intervenciones sanitarias. En este último,

la vigilancia molecular ha adquirido una importancia creciente para monitorizar amenazas emergentes, como la resistencia a antimaláricos y las deleciones de los genes *pfhrp2*/*pfhpr3*, que comprometen la eficacia de las PDR [25].

1.3.2. La malaria en África subsahariana

1.3.2.1. Carga epidemiológica

AS concentra la mayor parte de la carga mundial de malaria, constituyendo la principal región de transmisión y mortalidad con una distribución entre países muy heterogénea. Un grupo reducido de países entre ellos Nigeria, República Democrática del Congo (RDC), Uganda, Etiopía, Mozambique y Angola (Figura 13) representa más de la mitad de los casos mundiales [36].

En 2024, la Región africana de la OMS notificó alrededor de 265 millones de casos y 579.000 muertes [36].

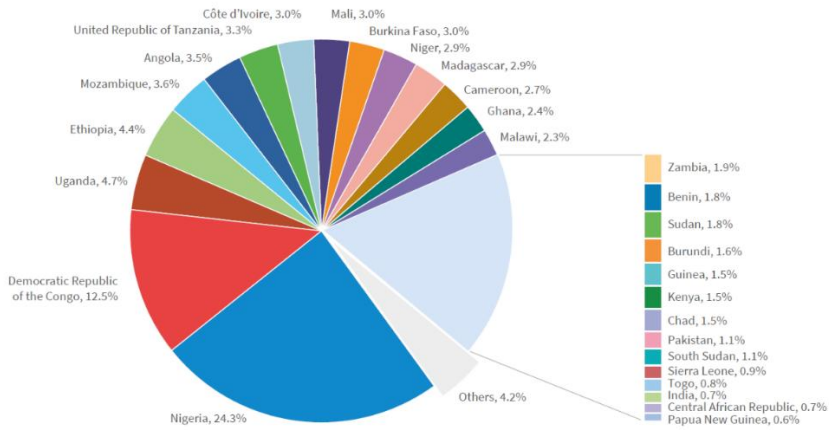


Figura 13. Proporción del número de casos de malaria por países en 2024. Se observa gráficamente, como la mayoría de los casos se registraron en países de África subsahariana [36].

Los niños menores de cinco años, debido a su inmunidad aún en desarrollo, constituyen el grupo de mayor riesgo y representan cerca del 80% de las muertes por malaria en AS [58]. Se estima que, cerca de 300.000 niños africanos mueren anualmente por esta enfermedad que es prevenible y tratable [59].

P. falciparum es la especie más prevalente en AS, el cual es responsable de la gran mayoría de casos graves y fallecimientos [59]. En cuanto a la transmisión, se presentan distintos patrones en función del contexto ecológico: en las latitudes cercanas al ecuador la transmisión es intensa y perenne, en cambio, en áreas como el Sahel o algunas regiones

del sur de África adopta un carácter marcadamente estacional, asociado con los períodos de lluvias [56].

1.3.2.2. Factores que condicionan la transmisión

La persistencia de la malaria en AS responde a la interacción de factores climáticos, biológicos y estructurales. Las temperaturas cálidas y la elevada humedad favorecen tanto el desarrollo del parásito en el mosquito como la supervivencia de los vectores [60]. Además, se suman factores socioeconómicos que amplifican la exposición como la precariedad de las viviendas, la ausencia de barreras físicas contra mosquitos y el saneamiento deficiente de las aguas que facilitan la presencia de criaderos. Las limitaciones al acceso a servicios sanitarios, derivadas de barreras geográficas, económicas o estructurales, retrasan el diagnóstico y el tratamiento, incrementando la transmisión y la probabilidad de casos graves [61]. Por último, los sistemas de vigilancia insuficientes constituyen otro obstáculo importante. La subnotificación de casos, especialmente en zonas rurales o de difícil acceso, dificulta la estimación de la carga real de la enfermedad y dificulta la planificación eficiente de intervenciones [25].

1.3.3. La malaria en Angola

1.3.3.1. Situación epidemiológica nacional

Angola, localizado en el suroeste de África, se clasifica como país de alta transmisión y está presente de forma constante entre los países con mayor carga de malaria a nivel mundial. En 2024, ocupó el sexto y el octavo lugar en relación con la incidencia de casos (3,5%) y muertes (2,7%) causadas por esta enfermedad en todo el mundo, respectivamente [36]. La malaria constituye el principal problema de salud pública del país, siendo la primera causa de mortalidad [62], así como de morbilidad y absentismo laboral y escolar [63]. Toda la población reside en áreas con riesgo de transmisión. Su distribución está determinada por las características climáticas de cada región (Figura 14) [62].

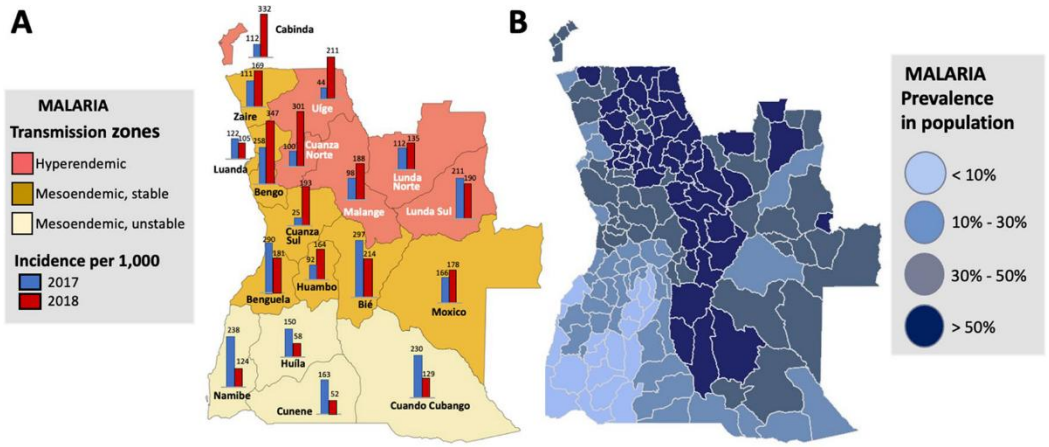


Figura 14. Transmisión y prevalencia de malaria en Angola. **A** Mapa político de Angola que indica las tres zonas geográficas según la intensidad y la estabilidad de la transmisión, y las tasas de incidencia en los años 2017 y 2018. **B** Mapa de Angola que indica la prevalencia de malaria en la población de cada región [64].

El contexto socioeconómico condiciona en gran medida la dinámica de la enfermedad, afectando especialmente a comunidades rurales y de recursos limitados [65]. Los niños menores de cinco años y las mujeres embarazadas se consideran como los grupos más vulnerables [66], siendo la malaria la responsable del 74% de la mortalidad infantil en 2021 [63].

1.3.3.2. Programa Nacional de Control de Malaria en Angola

La lucha contra la malaria en Angola se rige hasta el momento siguiendo el Programa Nacional de Control de Malaria (PNCM), que establece el marco de coordinación de las intervenciones, orientación de la financiación y fortalecimiento del sistema sanitario. Sus objetivos principales son la reducción de la morbilidad y mortalidad, promoviendo el acceso de la población a la prevención, diagnóstico y tratamiento [62].

1.3.3.2.1. Estrategias nacionales de diagnóstico

La normativa nacional exige la confirmación parasitológica previa al inicio del tratamiento en los casos de sospecha. Las herramientas diagnósticas disponibles incluyen: 1) El examen microscópico por gota gruesa, 2) las PDR basados principalmente en la proteína rica en histidina 2 de *P. falciparum* (PDR-*Pf*HRP2) [67], los cuales han permitido ampliar el acceso diagnóstico en áreas rurales mediante los Agentes de Desarrollo Comunitario y Sanitario [65] y, 3) las técnicas moleculares como la PCR, las cuales se limitan a actividades de vigilancia y control de calidad en centros de referencia, como el Instituto Nacional de Investigação em Saúde (INIS) [62].

1.3.3.2.2. Políticas terapéuticas

Desde 2007-2008, Angola adoptó las TCA como tratamiento de primera línea frente a la malaria no complicada [64]. Las TCA autorizadas en el país incluyen: arteméter-lumefantrina (AL), artesunato-amodiaquina (AS + AQ) y dihidroartemisinina-piperaquina (DHA + PPQ). En los casos de malaria grave, las guías recomiendan el artesunato parenteral (intravenoso o intramuscular) durante al menos 24 horas, seguido de un ciclo completo de TCA cuando el paciente lo tolere [67].

En el ámbito preventivo, el Tratamiento Preventivo Intermitente en embarazadas (TPIe) mediante dosis de SP en cada consulta prenatal a partir de las 13 semanas de gestación, es utilizado como quimioprofilaxis de malaria durante el embarazo [67]. A pesar del aumento de la cobertura en los últimos años, los últimos datos indican que tan solo el 31% de las embarazadas recibieron ≥ 3 dosis en 2023-2024 [66].

1.3.3.3. Provincia de Benguela

La provincia de Benguela, situada en el litoral centro-oeste del país (Figura 14A), presenta un clima tropical con variaciones entre las zonas costeras semiáridas y áreas interiores más húmedas [64]. Desde un punto de vista epidemiológico, se clasifica como área mesoendémica estable, con transmisión sostenida todo el año y aumentos estacionales asociados a la época lluviosa. Su tasa de transmisión (181 casos por 1000 habitantes en 2018) la sitúan detrás de las provincias hiperendémicas del norte [64].

1.3.3.4. Municipio de Cubal

Cubal es un municipio mayoritariamente rural situado en el interior de la provincia de Benguela (Figura 15C), con una población estimada en torno a 320.000 habitantes. Aproximadamente el 42% de la población presenta un bajo nivel socioeconómico con un acceso limitado a servicios básicos: el 42,3% de los residentes depende de fuentes de agua no canalizada, el 23,6% de los hogares carece de saneamiento básico y únicamente el 33,6% de las unidades familiares dispone de suministro eléctrico. A pesar de estas condiciones estructurales, el 87,1% de la población refiere tener acceso a servicios sanitarios, los cuales se concentran principalmente en el Hospital Nossa Senhora da Paz (HNSP, centro de estudio de esta tesis) y en el Hospital Municipal, complementados por diversos puestos médicos periféricos distribuidos en el municipio [63].

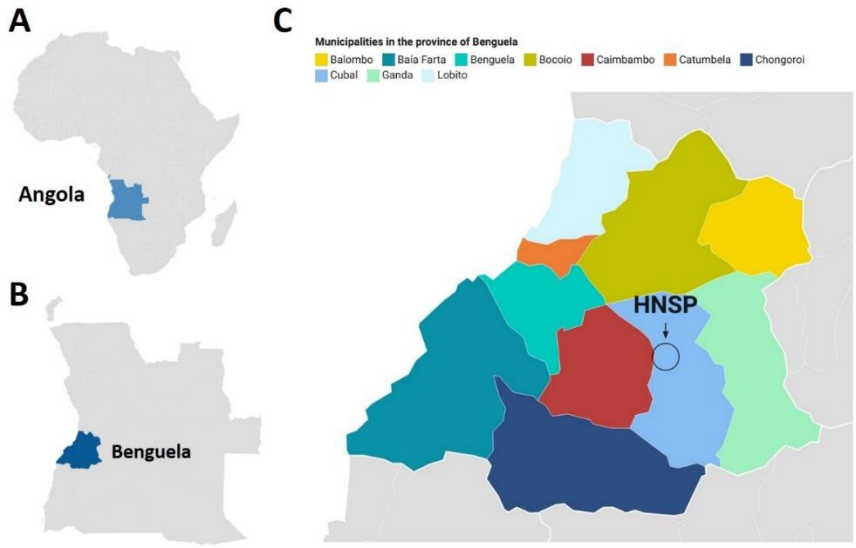


Figura 15. Situación geográfica del Hospital Nossa Senhora da Paz de Cubal (HNSP). **A** Mapa de África con Angola resaltado. **B** Mapa de Angola con la provincia de Benguela resaltada. **C** Municipios de la provincia de Benguela, señalando la situación geográfica del HNSP de Cubal. El mapa ha sido creado utilizando el software gratuito Datawrapper (https://app.datawrapper.de/select/map) y Microsoft PowerPoint.

Cubal muestra un patrón de transmisión de malaria con picos entre diciembre y marzo, coincidiendo con la estación de lluvias (noviembre-mayo) [68]. Aunque históricamente fue catalogado como mesoendémico estable, estudios recientes indican una marcada estacionalidad y un aumento de la incidencia desde 2014, observándose un aumento de 2,3 a 12,4 casos por 1000 habitantes en 2016, asociado a factores climáticos y a la reducción del apoyo internacional. La especie predominante es *P. falciparum*, la cual representa prácticamente la totalidad de los casos (99,6%), aunque también circulan otras especies como *P. malariae*, *P. ovale* y *P. vivax*. El 24,3% de los casos confirmados cumplen algún criterio de gravedad y la tasa de mortalidad se sitúa alrededor del 8,7% de los casos hospitalizados. Los niños menores de cinco años son los más afectados, representando el 51,6% de los casos de malaria [63].

El diagnóstico se centra en el uso extendido de los PDR-*Pf*HRP2 y la microscopía, sin disponibilidad de diagnóstico molecular [63]. Posteriormente a las políticas de tratamiento de la malaria no complicada con quinina oral más clindamicina, en 2012 se implementó definitivamente el AL como tratamiento de primera línea [68]. Por último, el TPIe con SP está implementado en las consultadas prenatales de los distintos centros sanitarios, si bien las barreras económicas y geográficas limitan su cobertura completa [62].

1.4. Presentación clínica de la enfermedad

La malaria se manifiesta como una enfermedad febril aguda cuya sintomatología inicial es inespecífica y sumamente variada, lo que lleva en numerosas ocasiones a confundirla con otras patologías de causa viral o bacteriana. Los síntomas generales incluyen cefalea, fatiga, malestar general y mialgias, muchas veces acompañados de problemas gastrointestinales. Clínicamente la fiebre (temperatura axilar ≥ 37,5 °C) o antecedente de la misma es el principal criterio de sospecha para iniciar el diagnóstico, especialmente en personas procedentes de áreas endémicas [20].

1.4.1. Malaria sintomática

La aparición de manifestaciones clínicas está directamente relacionada con la fase eritrocítica del parásito. Durante la ruptura eritrocítica se liberan componentes parasitarios que inducen una respuesta inflamatoria mediada por citosinas, responsables de los cuadros febriles característicos de la enfermedad [69]. No obstante, la presentación clínica puede variar en función del nivel de transmisión en la región (a mayor transmisión mayor inmunidad), el estado inmunológico del individuo, el momento en que se administra el tratamiento y la especie de *Plasmodium* causante de la infección [20,70].

1.4.1.1. Malaria por P. falciparum

La infección por *P. falciparum* constituye la forma más grave de la enfermedad y es responsable de la mayor parte de la morbi-mortalidad a nivel mundial, principalmente en AS [71].

1.4.1.1.1. Malaria no complicada

La malaria no complicada se define por la presencia de parasitemia con síntomas clínicos en ausencia de disfunción orgánica grave [20]. Los síntomas más comunes incluyen: fiebre intermitente cada 48 horas (terciana), escalofríos, cefalea, mialgias, debilidad generalizada y síntomas gastrointestinales como náuseas y/o vómitos [71].

1.4.1.1.2. Malaria grave

De acuerdo con la definición de la OMS, la malaria grave causada por *P. falciparum* se define por la presencia de uno o más de los siguientes criterios clínicos o de laboratorio en presencia de parasitemia asexual confirmada: 1) alteración del nivel de conciencia, 2) postración, 3) convulsiones múltiples, 4) acidosis metabólica que suele manifestarse como dificultad respiratoria, 5) hipoglucemia, 6) anemia malárica grave, 7) insuficiencia renal,

8) ictericia, 9) edema pulmonar, 10) hemorragia significativa, 11) shock e 12) hiperparasitemia (densidad parasitaria > 10% de hematíes parasitados) [72].

1.4.1.2. Malaria no falciparum

Las infecciones causadas por especies no *falciparum* han sido tradicionalmente consideradas de menor gravedad, aunque actualmente se reconoce su capacidad para producir complicaciones clínicas e incluso letales, especialmente en la malaria causada por *P. vivax* y *P. knowlesi* [70].

P. vivax: es capaz de causar tanto malaria no complicada como grave. En esta última los criterios de gravedad más comunes son: anemia grave, síndrome de dificultad respiratoria aguda y en algunos casos malaria cerebral [73]. Además, la esplenomegalia es un hallazgo que ocurre en mayor frecuencia que las infecciones por *P. falciparum* [74].

P. ovale: comparte características clínicas con *P. vivax* [20,75]. Históricamente se ha considerado como una forma benigna de la enfermedad. Sin embargo, ocasionalmente puede derivar en cuadros de malaria grave y muerte [70].

P. malariae: habitualmente causa malaria no complicada, aunque puede provocar recrudescencias tiempo después de la infección inicial [71].

P. knowlesi: caracterizado por paroxismos febriles de 24 horas (cotidiana), característica que favorece un rápido aumento de la densidad parasitaria dando lugar cuadros graves similares a la malaria *falciparum*, aunque habitualmente sin síntomas neurológicos [20].

1.4.1.3. Infecciones mixtas

Las infecciones mixtas por dos o más especies de *Plasmodium*, representan un hallazgo frecuente en regiones de elevada transmisión [20]. Clínicamente abarcan un amplio espectro de severidad dependiendo de las interacciones entre las especies causantes de la infección. Las infecciones por *P. falciparum* + *P. vivax* suponen un mayor riesgo de desarrollar formas graves de la enfermedad, especialmente en niños, provocando una exacerbación de cuadros anémicos. Esto mismo parece ocurrir cuando *P. malariae* coinfecta con *P. falciparum*. En contraste, la presencia de *P. ovale* sugiere un efecto protector relativo, en comparación a monoinfecciones por *P. falciparum* [70]. Además, las infecciones mixtas de *P. knowlesi* con otras especies son habitualmente frecuentes [20], específicamente su coinfección junto con *P. vivax* incrementa el riesgo de complicaciones sistémicas [76].

1.4.2. Portadores asintomáticos

Existen casos de portadores asintomáticos definidos como la presencia de formas asexuales de *Plasmodium* en sangre periférica, a menudo en bajas parasitemias o incluso infecciones submicroscópicas (parasitemias < límite de detección del examen microscópico), sin fiebre u otras manifestaciones clínicas compatibles con la enfermedad [72]. Este fenómeno se observa con mayor frecuencia en regiones donde la transmisión es estable, debido a que la exposición repetida al parásito favorece el desarrollo de la inmunidad adquirida [77].

1.4.3. Poblaciones vulnerables

Existen determinados grupos poblacionales con un riesgo significativamente mayor de desarrollar malaria grave, condicionado principalmente por la ausencia o alteración de la inmunidad adquirida, así como por factores nutricionales y la coexistencia de otras enfermedades. Entre ellos se incluyen: 1) los niños menores de cinco años, cuya elevada vulnerabilidad se asocia a la inmadurez del sistema inmunitario; 2) las mujeres embarazadas, en quienes los cambios hormonales e inmunológicos aumentan la susceptibilidad a la infección; 3) las personas infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) u otras condiciones de inmunosupresión, en las que se ha descrito una interacción sinérgica desfavorable entre ambas infecciones; y 4) los viajeros procedentes de zonas no endémicas, que carecen de inmunidad adquirida frente al parásito.

1.5. Diagnóstico de la malaria

1.5.1. Importancia del diagnóstico en el control de la malaria

Desde un punto de vista clínico, el diagnóstico presuntivo basado exclusivamente en la sintomatología resulta insuficiente y muchas veces contraproducente, ya que las manifestaciones iniciales de la malaria (particularmente la fiebre) son inespecíficas. Por esta razón, desde el año 2010 la OMS [78], recomienda que, todo caso sospechoso de malaria sea confirmado mediante pruebas parasitológicas como la microscopía y/o PDR antes de iniciar el tratamiento [72].

El sobrediagnóstico puede conducir a la administración innecesaria de antimaláricos, con el consiguiente incremento de los gastos sanitarios, la exposición del paciente a efectos secundarios de los fármacos y el aumento de la presión selectiva sobre los parásitos favoreciendo la aparición de resistencias. Por el contrario, el infradiagnóstico puede

retrasar el tratamiento adecuado, aumentando el riesgo de progresión a formas graves de la enfermedad y manteniendo la transmisión al favorecer la persistencia de reservorios humanos [25].

Las técnicas diagnósticas empleadas en la actualidad, se centran principalmente en la detección del parásito en su fase eritrocítica mediante métodos directos [79].

1.5.2. Microscopía convencional

El examen microscópico de frotis sanguíneos continúa siendo el "*gold standard*" para el diagnóstico de la malaria. Esta técnica se basa en la observación directa del parásito en sangre periférica mediante la coloración de Giemsa preferentemente, aunque existen otros métodos de tinción alternativos como Field, Jaswant Singh Bhattacharji, Leishman y, Wright [80]. El procedimiento diagnóstico consiste en la preparación de dos tipos de muestras complementarias: 1) la gota gruesa permite examinar un mayor volumen de sangre en un mismo campo, ya que se trata de una técnica de concentración y, por lo tanto, aumenta la probabilidad y la rapidez para identificar infecciones de baja carga parasitaria, además de cuantificar la parasitemia (parásitos/µL de sangre); y 2) la extensión fina que facilita la identificación de la especie de *Plasmodium* al observar al parásito en el interior de los eritrocitos, además de dar una cuantificación de la parasitemia como proporción de hematíes parasitados [81].

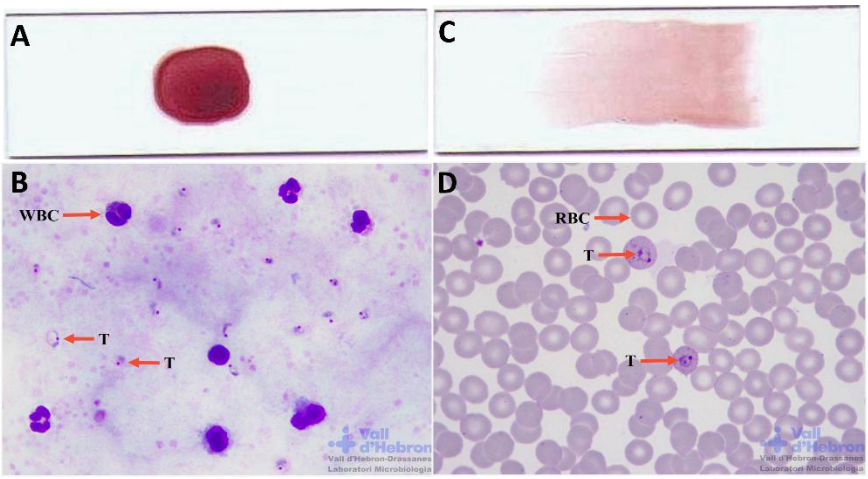


Figura 16. Frotis de sangre periférica para el diagnóstico microscópico de malaria. **A** Preparación de frotis de sangre mediante gota gruesa (1-2 cm de diámetro). **B** Gota gruesa observada al microscopio con el objetivo de 100X. Se observan tanto leucocitos (WBC) como trofozoítos de *Plasmodium* spp. (T) [79]. **C** Preparación de frotis de sangre mediante extensión fina. **D** Extensión fina observada al microscopio con el objetivo de 100X. Se observan tanto eritrocitos (RBC) como trofozoítos de *P. falciparum* en estado intraeritrocítico (T) [79].

Entre las principales ventajas de la microscopía destaca su bajo coste, la posibilidad de estimar la densidad parasitaria y su utilidad para identificar las especies causantes de la infección. Además, permite evaluar la respuesta al tratamiento mediante el seguimiento de la disminución del número de formas asexuales en sangre [72]. No obstante, esta técnica presenta grandes limitaciones. Se trata de un procedimiento que requiere tiempo, dependiente de la experiencia del microscopista, y su sensibilidad disminuye en infecciones de muy bajas parasitemias o submicroscópicas, como es frecuente en el caso de los individuos asintomáticos [79]. Asimismo, requiere de una infraestructura mínima, incluyendo microscopios, reactivos de tinción y electricidad [72].

1.5.3. Test de diagnóstico rápido

Las PDR son dispositivos de flujo lateral basados en el principio inmunocromatográfico que permiten detectar antígenos específicos del parásito en muestras de sangre. Las principales dianas antigénicas de los test son: 1) la proteína *Pf*HRP2 que es producida en elevadas cantidades por *P. falciparum* durante las fases de trofozoíto y esquizonte, por lo que se considera la diana de mayor sensibilidad para la detección de esta especie (Figura 17); 2) la lactato deshidrogenasa panmalárica (pLDH), una enzima fundamental en la vía glucolítica presente en las principales especies de *Plasmodium* que infectan al humano y que está asociada a parásitos viables; y 3) la aldolasa panmalárica, otra enzima metabólica común en diferentes especies del género *Plasmodium* [82].

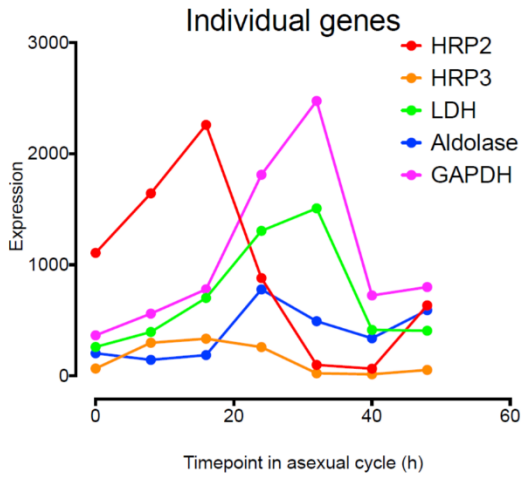


Figura 17. Expresión de las principales dianas antigénicas para las pruebas de diagnóstico rápido de malaria (PDR). HRP2: proteína rica en histidina 2, comúnmente empleada como diana de las PDR para la detección de *P. falciparum*. HRP3: proteína rica en histidina 3, homóloga a HRP2. LDH: lactato deshidrogenasa. La GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, no se detecta mediante las PDR actuales [83].

Entre las principales ventajas de las PDR destaca la rapidez en la obtención de resultados (15-30 minutos), su bajo coste, su termoestabilidad y su facilidad de uso en entornos con recursos limitados, ya que no requiere de equipos sofisticados ni de personal cualificado [84].

No obstante, presenta varias limitaciones. Debido a la persistencia del antígeno en sangre, especialmente la *Pf*HRP2 que puede permanecer en la circulación varias semanas tras el fin de la infección, pueden dar resultados falsos positivos en pacientes ya tratados [85]. Por otro lado, también pueden dar resultados falsos negativos en los casos con bajas parasitemias (generalmente < 100-200 parásitos/µL en las PDR-*Pf*HRP2), casos de elevadas parasitemias en los que se da el denominado efecto prozona [82], y como consecuencia de la creciente presencia de cepas de *P. falciparum* con deleciones en los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* [86]. Además, la sensibilidad y especificidad de estas pruebas pueden variar según la marca comercial y las condiciones de almacenamiento, no permiten la cuantificación de la parasitemia, y su capacidad para diferenciar especies distintas de *P. falciparum* y *P. vivax* es limitada [82].

1.5.4. Técnicas moleculares

Las técnicas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos (TAAN) han demostrado una sensibilidad y especificidad superiores a los métodos convencionales para el diagnóstico de la malaria. Entre ellas, la PCR y principalmente la PCR a tiempo real, presentan una elevada sensibilidad diagnóstica, pudiendo detectar cargas parasitarias muy bajas, del orden de 0,5-5 parásitos/µL de sangre [81], por lo que resulta más conveniente a la hora de diagnosticar infecciones asintomáticas, y es de gran utilidad en estudios de prevalencia [81]. Además, permite la identificación precisa de las especies de *Plasmodium* y la detección de infecciones mixtas con exactitud [87]. La PCR a tiempo real permite estimar de forma indirecta la densidad parasitaria mediante el análisis del ciclo umbral (Ct) en el que se detecta la amplificación de la región genética diana. Además, la incorporación de curvas patrón de amplificación posibilita la cuantificación de la carga parasitaria con mayor precisión, constituyendo la denominada PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR) [88]. Mediante la qPCR, se puede llevar a cabo la monitorización de la respuesta al tratamiento con gran precisión.

A pesar de sus ventajas diagnósticas, la implementación de estas técnicas en entornos endémicos de recursos limitados sigue siendo compleja. Entre los principales inconvenientes se encuentran el elevado coste de la instrumentación y reactivos, y la necesidad de personal altamente cualificado [81]. Como solución, para facilitar la

logística en casos clínicos concretos o en estudios epidemiológicos, la recolección a partir de muestras de sangre seca en papel de filtro (*dried blood spots*, DBS), permite almacenar y transportar las muestras a temperatura ambiente hacia laboratorios de referencia para llevar a cabo el análisis molecular [89].

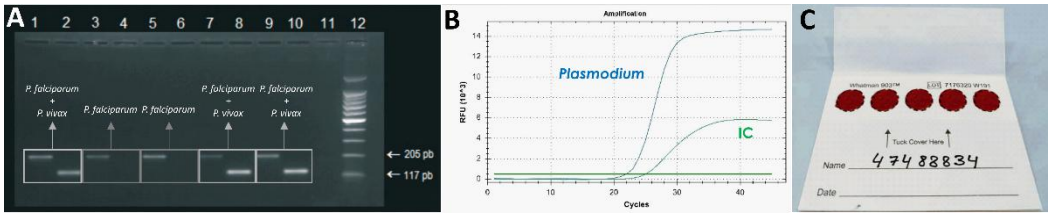


Figura 18. Electroforesis, curvas de fluorescencia de PCR en tiempo real y muestras de sangre seca (DBS) para el diagnóstico de la malaria. **A** Gel de agarosa en el que se observan los amplicones producto de PCR convencional: tres casos de infección mixta *P. falciparum* + *P. vivax* (carriles 1-2, 7-8 y 9-10) y dos monoinfecciones por *P. falciparum* (carriles 3-4 y 5-6 [90]. **B** Curvas de PCR en tiempo real para la detección de *Plasmodium* spp. [91]. **C** DBS en papel de filtro para el análisis molecular de la malaria [92].

Además de la PCR, se han desarrollado otras TAAN con potencial de aplicación en el terreno como la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP). Esta tecnología, permite amplificar el ADN parasitario a temperatura constante (60-65 °C), eliminando la necesidad de un termociclador, por lo que se reducen los costes y facilita su utilización en entornos con recursos limitados [93], aunque puede presentar una menor especificidad y mayor susceptibilidad a contaminaciones [81,94]. Como variante, el método LAMP con detección colorimétrica de los resultados es especialmente adecuado para su uso en terreno, porque permiten leer el resultado a simple vista reduciendo la subjetividad del observador, sin requerir de equipos de fluorescencia ni turbidímetros [93].

Más recientemente, las técnicas moleculares como la PCR digital (dPCR) y los sistemas basados en CRISPR, como SHERLOCK se han propuesto como alternativas prometedoras para mejorar la sensibilidad y la rapidez en el diagnóstico de la malaria [87].

1.5.5. Técnicas serológicas

La serología de malaria se basa en la detección de anticuerpos específicos, dirigidos contra antígenos de las fases eritrocíticas del parásito [79,87]. Habitualmente se realiza mediante técnicas como el ensayo por inmunoarbsorción ligado a enzimas o la inmunofluorescencia indirecta [87]. Su utilidad en el diagnóstico clínico es limitada, debido a que no permiten diferenciar entre infección activa y exposición pasada. Sus principales aplicaciones se sitúan en el ámbito del estudio de donantes en bancos de sangre [95], la vigilancia epidemiológica en estudios de seroprevalencia, especialmente en regiones de baja

transmisión, así como para la evaluación de intervenciones de control o erradicación [72,79].

1.5.6. Diagnóstico de imagen asistido por inteligencia artificial

El diagnóstico mediante microscopía automatizada e inteligencia artificial surgió como una estrategia para reducir la subjetividad y la fatiga asociadas al diagnóstico microscópico convencional. Estos sistemas emplean algoritmos de aprendizaje profundo (*Deep Learning Models*), capaces de analizar imágenes digitales de gota gruesa y extensión fina [79]. Particularmente, tecnologías como EasyScan Go [96] o iMAGING [97], han mostrado resultados prometedores para su aplicación en entornos con recursos limitados. No obstante, presentan ciertas limitaciones, como una menor sensibilidad en infecciones con muy bajas parasitemias, dificultades para diferenciar especies con morfología similar y dependencia de la calidad de la preparación [98].

1.5.7. Otros métodos diagnósticos

Además de los métodos mencionados anteriormente, existen otras técnicas innovadoras que se sitúan en diferentes etapas de desarrollo en implementación.

- Dispositivos magneto-ópticos basados en la detección de hemozoína: estas técnicas aprovechan las propiedades biofísicas del pigmento malárico para su detección. Destacan dispositivos como Gazelle [99] o RMOD [100].
- Citometría de flujo fotoacústica: permite la detección no invasiva *in vivo* de parásitos circulantes mediante señales fotoacústicas generadas por la hemozoína, como el sistema Cytophone [101].
- Biosensores portátiles: capaces de detectar antígenos parasitarios u otros marcadores en muestras no invasivas, como la saliva u orina [81].

1.6. Tratamiento de la malaria

El tratamiento farmacológico de la malaria se considera una intervención clave tanto para el manejo clínico individual como para las estrategias de control poblacional. Su objetivo principal es reducir la mortalidad, evitando la aparición de complicaciones y logrando la curación mediante la eliminación de la parasitemia. Desde la perspectiva de salud pública, un tratamiento temprano y eficaz, acorta el período durante el cual el paciente puede infectar al mosquito, limitando así la transmisión [20].

1.6.1. Fármacos antimaláricos

1.6.1.1. Derivados de la artemisinina

Los derivados de la artemisinina constituyen la base del tratamiento antimalárico actual por su elevada eficacia y su rápida acción esquizonticida. Con el fin de conservar su efectividad terapéutica y retrasar la aparición de resistencias, se recomienda su administración en forma de tratamiento combinado [102]. Los principales fármacos de este grupo son: el artesunato, arteméter y la dihidroartemisinina [103]. Su mecanismo de acción se centra en interferir en el metabolismo del hierro (grupo hemo), generando radicales libres que contribuyen a la eliminación del parásito [102]. Estos fármacos muestran especial eficacia frente a las formas jóvenes de anillo y trofozoítos [103], presentando además actividad frente a gametocitos inmaduros [20].

1.6.1.2. Aminoquinolonas

Las aminoquinolonas constituyen el grupo más antiguo de antimaláricos, y actualmente siguen teniendo relevancia terapéutica [104]. Se clasifican en dos subfamilias:

4-aminoquinolonas: se encuentran la cloroquina, amodiaquina y piperaquina. Su actividad está dirigida principalmente contra formas eritrocíticas asexuales [59].

8-aminoquinolonas: representadas por la primaquina y la tafenoquina. Son los únicos antimaláricos capaces de eliminar los hipnozoítos hepáticos de *P. vivax* y *P. ovale*. Además, también tienen actividad gametocida frente a *P. falciparum*. Es fundamental considerar el estado de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), ya que ante pacientes que tienen una deficiencia de esta enzima, el tratamiento con 8-aminoquinolonas puede desencadenar anemia hemolítica grave [105].

1.6.1.3. Arilaminoalcoholes

Los arilaminoalcoholes son compuestos relacionados estructuralmente con la quinina y se emplean tanto para el tratamiento como en la profilaxis de malaria. Se incluyen: la quinina, mefloquina, lumefantrina y halofantrina. Tienen gran actividad frente a los estadios de trofozoíto y esquizonte, incluso actúan como gametocidas frente a las especies no *falciparum* como es el caso de la quinina [20].

1.6.1.4. Antifolatos

Los antifolatos son fármacos de acción lenta que incluyen a la pirimetamina, el proguanil, y sulfamidas como la sulfadoxina. Esta última se administra habitualmente con la pirimetamina como tratamiento quimiopreventivo [104]. Estos fármacos actúan frente a

formas eritrocíticas asexuales maduras, aunque, tienen capacidad de interrumpir el desarrollo del parásito en el hígado, y de reducir la infectividad de los gametocitos hacia el mosquito [20].

1.6.1.5. Naftoquinonas

El principal representante es la atovacuona, empleada habitualmente en combinación con el proguanil para la profilaxis e infecciones por *P. falciparum* [104]. Es activa frente a todos los estadios parasitarios [20].

1.6.2. Tratamiento de la malaria *falciparum*

1.6.2.1. Malaria no complicada: Terapias Combinadas Basadas en Artemisininas

El empleo de terapias combinadas responde a la necesidad de contrarrestar la pérdida de eficacia observada con antiguas monoterapias, como la cloroquina o la SP, cuyo uso favoreció la selección de cepas resistentes [106]. Las TCA se fundamentan en la combinación de dos componentes con propiedades farmacológicas complementarias: 1) derivado de artemisinina: de acción rápida, responsable de la reducción intensa inicial de la densidad parasitaria; y 2) fármaco acompañante de vida media prolongada: cuya función es eliminar los parásitos remanentes y aportar efecto profiláctico tras el tratamiento (Figura 19) [20].

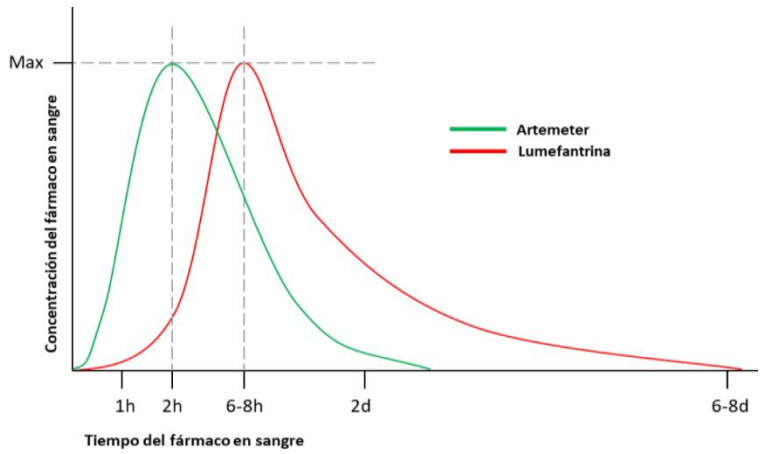


Figura 19. Vida media de los dos componentes de las Terapias Combinadas basadas en Artemisininas (TCA). Representación gráfica de la vida media de un derivado de artemisinina (arteméter) y su fármaco acompañante (lumefantrina) [107].

Esta estrategia reduce de forma significativa la probabilidad de desarrollo de resistencias, ya que la probabilidad de que el parásito presente mecanismos de resistencia frente a dos

principios activos diferentes es extremadamente baja [18]. Las combinaciones terapéuticas recomendadas por la OMS son [20]:

- AL: es el TCA más empleado a escala global y presenta elevada eficacia clínica [104].
- AS + AQ: ampliamente utilizada en África y Sudamérica, con buena eficacia terapéutica, aunque se asocia con mayores efectos secundarios gastrointestinales [108].
- DHA + PPQ: la prolongada vida media de la piperaquina confiere un efecto protector post-tratamiento que contribuye a disminuir el riesgo de reinfección [109]. Ha sido muy utilizada en el sudeste asiático, en dónde se han detectado resistencias [110].
- Artesunato-mefloquina (AS + MQ): empleada tradicionalmente en el Sudeste Asiático, de elevada eficacia, aunque en determinadas zonas del Gran Mekong se han descrito resistencias tanto a la artemisinina como a la mefloquina [20,111].
- Artesunato-sulfadoxina-pirimetamina (AS + SP): su utilidad es limitada debido a la expansión de resistencias a la SP [20].

1.6.2.2. Malaria grave

El tratamiento de elección para la malaria grave son los derivados de las artemisininas parenterales, más concretamente el artesunato endovenoso (o intramuscular si no es posible por esta vía), el cual ha demostrado ser superior a la quinina. El arteméter intramuscular se utiliza como alternativa de segunda opción cuando el artesunato no está disponible [59].

1.6.3. Tratamiento de la malaria no *falciparum*

El abordaje terapéutico de la malaria se ajusta según la especie de *Plasmodium* identificada, con el fin de garantizar una cura radical. Las infecciones por especies no *falciparum* suelen responder adecuadamente a la cloroquina o a las TCA [20]. Para las infecciones por *P. vivax* o *P. ovale* es necesario añadir primaquina para la eliminación de hipnozoítos [112].

1.7. Quimioprofilaxis

La quimioprofilaxis consiste en la administración periódica de antimaláricos con el fin de evitar la infección o impedir su progresión a formas clínicas. Se distinguen dos enfoques: 1) prevención individual orientada a viajeros que se desplazan a zonas endémicas, y 2)

quimioprevención poblacional, que implica la administración de tratamientos a grupos específicos en áreas de transmisión activa, independientemente de que exista infección confirmada [113].

1.7.1. Principales fármacos empleados en quimioprofilaxis de malaria

La elección del fármaco profiláctico depende del destino, el riesgo de exposición, el perfil de resistencias local y las características del individuo. En la Tabla 1 se muestran los principales fármacos quimioprofilácticos según el grupo poblacional al que van dirigidos.

Tabla 1. Fármacos y tipos de tratamientos quimioprofilácticos de la malaria [113].

Población	Tipo quimioprofilaxis	Fármacos
Niños menores de 5 años	QEM	SP + AQ
	QPM	SP
Mujeres embarazadas	TPIe	SP
Viajeros	Quimioprofilaxis en viajeros	Atovacuona-proguanil; cloroquina; doxiciclina; mefloquina; primaquina; tafenoquina

QEM: quimioprofilaxis estacional de malaria en niños; QPM quimioprevención perenne de malaria; TPIe: tratamiento preventivo intermitente en embarazadas; SP + AQ: sulfadoxina-pirimetamina-amodiaquina; SP: sulfadoxina-pirimetamina.

1.7.2. Estrategias de quimioprofilaxis intermitente

La SP es el fármaco de elección para las estrategias de quimioprofilaxis en África, debido a su eficacia, tolerabilidad y bajo coste [72].

1.7.2.1. Tratamiento preventivo intermitente en embarazadas

El TPIe tiene como finalidad evitar la malaria durante la gestación y evitar complicaciones maternas y neonatales [114]. Está dirigido a todas las gestantes residentes en áreas endémicas de transmisión moderada o alta (Tabla 1) [115]. Esta intervención ha demostrado disminuir la anemia materna, el riesgo de bajo peso al nacer y la mortalidad neonatal [114].

1.7.2.2. Quimioprofilaxis estacional de malaria en niños

La quimioprofilaxis estacional de malaria en niños (QEM) tiene como objetivo proteger a la población infantil menor de cinco años que vive en regiones con transmisión marcadamente estacional (Tabla 1).

1.7.2.3. Quimioprevención perenne de malaria

La quimioprevención perenne de malaria (QPM), busca proteger a los niños durante las etapas de mayor vulnerabilidad inmunológica frente a formas graves de la enfermedad. Está dirigido a niños de hasta 24 meses de edad (Tabla 1).

1.7.3. Administración masiva de medicamentos

La administración masiva de medicamentos (AMM) es una estrategia de salud pública orientada a disminuir de forma rápida la carga de la enfermedad y la transmisión comunitaria. Se aplica a toda la población de un área determinada, excluyendo personas con incompatibilidades médicas. Consiste en la distribución de ciclos terapéuticos completos de TCA [116].

1.8. Resistencias a los antimaláricos

La resistencia a los antimaláricos se define como la capacidad de una cepa de *Plasmodium* para sobrevivir o multiplicarse tras la administración y adecuada absorción de un antimalárico a dosis iguales o superiores a las recomendadas. Desde el punto de vista clínico, suele manifestarse como un fallo terapéutico caracterizado por la incapacidad de eliminar completamente la parasitemia o por un retraso significativo en el aclaramiento [117]. A nivel parasitológico, la resistencia se evidencia por la presencia de parásitos detectables mediante microscopía al tercer día del tratamiento [118].

1.8.1. Causas y factores que favorecen la aparición de resistencias

La aparición y propagación de resistencias constituye un proceso evolutivo impulsado por la presión farmacológica sostenida. El uso extendido de los antimaláricos favorece la selección de mutaciones aleatorias que confieren ventajas de supervivencia al parásito [117]. Históricamente, la utilización de monoterapias favoreció la selección de cepas resistentes, lo que promovió la transición hacia terapias combinadas [119]. Otros factores incluyen la subdosificación y la baja adherencia terapéutica. Asimismo, la automedicación y el uso masivo de antimaláricos en programas poblaciones contribuyen a este fenómeno [120]. Entre los factores biológicos, una elevada carga parasitaria incrementa la probabilidad de mutaciones espontáneas. Las zonas de baja transmisión suelen actuar como focos de selección de resistencias, ya que la menor inmunidad adquirida de la población junto con una menor competencia de cepas sensibles favorece una transmisión más eficiente de los parásitos resistentes [117].

1.8.2. Mecanismos biológicos y moleculares de resistencia

Los mecanismos de resistencia se basan principalmente en modificaciones en las proteínas diana del fármaco, lo que reduce su afinidad de unión, así como alteraciones de proteínas transportadoras que disminuyen la concentración en el compartimento intracelular de acción del fármaco (Figura 20) [121].

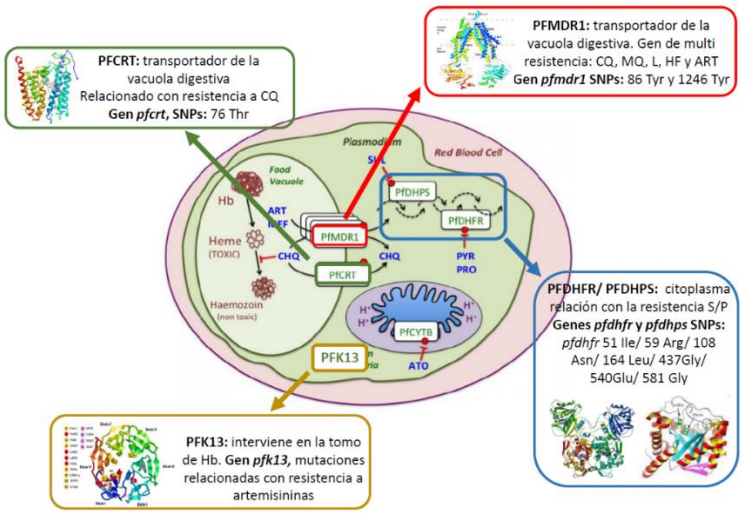


Figura 20. Mecanismos de resistencia a los antimaláricos. Principales proteínas y genes parasitarios implicados en la resistencia a antimaláricos. Figura creada por el laboratorio de cooperación científica y técnica en enfermedades tropicales, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.

En la presente tesis, se analizaron los marcadores moleculares asociados a resistencia en los genes *pfk13*, *pfmdr1*, *pfdhfr* y *pfdhps*. A continuación, se describen los mecanismos de resistencia frente a los fármacos relacionados con los marcadores estudiados.

1.8.2.1. Resistencia a las artemisininas

El fenómeno característico de la resistencia parcial a las artemisininas es el retraso en el aclaramiento parasitario, reflejado en una vida media de aclaramiento prolongada (> 5 horas) [122]. En este caso, es importante diferenciar entre resistencia parcial, en la que se da un retraso en el aclaramiento, y el fracaso terapéutico completo, que suele producirse cuando coexiste resistencia al fármaco acompañante en las TCA [120].

El mecanismo de resistencia se centra en modificaciones en la proteína Kelch 13 —codificada por el gen *pfk13*— concretamente en su dominio *propeller*, en *P. falciparum* [123]. Dichas alteraciones se vinculan con una desregulación de la proteostasis y con una respuesta más eficiente al estrés celular en los estadios tempranos de anillo: disminuyen la ubiquitinación y degradación de proteínas enzimáticas específicas (fosfaditilinositol-3-

quinasa), provocando un aumento intracelular de fosfatidilinositol-3-fosfato, el cual activa los mecanismos de supervivencia frente al daño oxidativo [124].

1.8.2.2. Resistencia a fármacos asociados en terapias combinadas

A continuación, se exponen los mecanismos de resistencia frente a los fármacos acompañantes de las TCA:

Amodiaquina: Su resistencia se basa en la disminución de la acumulación del fármaco en la vacuola digestiva, mediante su expulsión activa al citosol, impidiendo que alcance niveles tóxicos [117]. Esto es mediado por el transportador de resistencia a la cloroquina (*Pf*CRT) y se ve reforzado por la proteína 1 de resistencia a múltiples fármacos (*Pf*MDR1) [125].

Lumefantrina: actúa principalmente en el citosol parasitario. Por ello, el mecanismo de resistencia es inverso al de la amodiaquina. Consiste en el secuestro del fármaco dentro de la vacuola digestiva, transportado por la *Pf*MDR1 y retenido dentro de la vacuola digestiva, alejándolo de su diana citosólica al no ser transportado con eficiencia por el *Pf*CRT [125].

Mefloquina: el mecanismo de resistencia es similar al de la lumefantrina y consiste en el secuestro del fármaco a la vacuola digestiva, lo que reduce su concentración citosólica e impide su interacción con los ribosomas. El exceso de transportadores *Pf*MDR1 es el que provoca este mecanismo de secuestro. Al igual que en la lumefantrina, el *Pf*CRT actúa modulando la tolerancia a la mefloquina [125].

1.8.2.3. Resistencia a la sulfadoxina-pirimetamina

La resistencia a la combinación SP se origina por alteraciones en la vía metabólica del ácido fólico, lo que reduce la afinidad de los fármacos a sus enzimas diana: dihidrofolato reductasa y dihidropteroato sintasa, las cuales son diana de la pirimetamina y la sulfadoxina, respectivamente [126]. Al modificar el sitio activo de las enzimas, los fármacos pierden su capacidad de unión, por lo que la síntesis del folato, esencial para la replicación, puede llevarse a cabo eficientemente [124].

1.8.3. Estudios de eficacia terapéutica

Los estudios de eficacia terapéutica (EET) son ensayos clínicos *in vivo* considerados el estándar de referencia para evaluar la eficacia a los antimaláricos, calculando la tasa de curación y de fracaso terapéutico [127]. Su diseño contempla el seguimiento a los pacientes durante 28 a 42 días tras la administración del tratamiento [128]. Se realizan en

niños menores de cinco años residentes en zonas de alta endemicidad [129]. Para interpretar correctamente los resultados, es imprescindible realizar un genotipado mediante marcadores moleculares como *pfmsp1* y *pfmsp2*, para diferenciar entre recrudescencia (persistencia del mismo clon tras el tratamiento) y reinfección (nueva infección adquirida durante el seguimiento) [130]. La OMS marca como umbral una tasa de fracaso terapéutico > 10% para el cambio en la política de tratamiento [36].

1.8.4. Vigilancia de marcadores moleculares de resistencia

La vigilancia genética constituye una herramienta fundamental para la detección precoz de mutaciones asociadas a resistencia antes de que se traduzcan en fallos terapéuticos generalizados. Frente a los EET, ofrece importantes ventajas: menor coste, mayor rapidez, capacidad para analizar un gran volumen de muestras y posibilidad de anticipar la dinámica de expansión de las cepas resistentes. Aunque se deben plantear como complemento accesorio a los EET, actuando como un sistema de alerta temprana [121].

En la Tabla 2, se muestra a modo de resumen, las principales características y consideraciones de los fármacos empleados para al tratamiento y la quimioprofilaxis de la malaria.

Tabla 2. Resumen del tratamiento y la quimioprofilaxis de la malaria.

Tipo tratamiento	Combinación terapéutica	Indicación específica	Mecanismo	Resistencias	Marcadores moleculares de resistencia	Referencias
Tratamiento						
Malaria no complicada	AL	Adultos, niños y embarazadas	El arteméter elimina parásitos rápidamente; la lumefantrina (acción larga) elimina el resto	Fracaso terapéutico >10% en zonas de Angola, Kenia, Uganda y Tanzania	**Arteméter**: mutaciones en *pfk13.* **Lumefantrina**: mutaciones en *pfcrt* y *pfmdr1* y Nº copias	[131,132]
	AS + AQ	Alternativa TCA. Efectos secundarios de amodiaquina	Derivado de artemisinina con aminoquinolina de vida media larga	Tasas de fracaso menores al 10% en estudios recientes en África	**Artesunato**: mutaciones en *pfk13.* **Amodiaquina**: mutaciones en *pfcrt* y *pfmdr1* y Nº copias.	[131,133]
	AS + MQ	Alternativa TCA. Desrecomendada en antecedentes neuropsiquiátricos	Acción rápida artesunato y vida media larga de mefloquina	Resistencia a mefloquina detectada en el sudeste asiático	**Artesunato**: mutaciones en *pfk13.* **Mefloquina**: Nº copias *pfmdr1*	[117,124]
	DHA + PPQ	Mayor riesgo de fracaso en niños <5 años si no se ajusta la dosis	La piperaquina ofrece un periodo profiláctico post-tratamiento prolongado	Reducción de sensibilidad en Camboya occidental	**Dihidroartemisinina**: mutaciones en *pfk13.* **Piperaquina**: Nº de copias de *pfpm2/3* y mutaciones en *pfcrt*	[117,128,134]
	AS + SP	Contraindicado en primer trimestre del embarazo	El artesunato compensa la resistencia parcial de la SP en la fase eritrocítica	Alta resistencia a SP limita su uso en muchas regiones endémicas	**Artesunato**: mutaciones en *pfk13.* **Sulfadoxina**: mutaciones en *pfdhps.* **Pirimetamina**: mutaciones en *pfdhfr*	[135,136]
	AS + PY	Evitar en personas con enfermedad hepática	Pironaridina: fármaco asociado de alta eficacia	Tasa de fracaso del 7,6% detectada en Uganda	**Artesunato**: mutaciones en *pfk13*.	[137,138]
Malaria grave	Artesunato endovenoso	Primera línea para todos los pacientes	Hidrólisis rápida a dihidroartemisinina; más eficaz que quinina	Riesgo de mortalidad aumenta si resistencia a artemisinina	Mutaciones en *pfk13.*	[122,139]
	Arteméter intramuscular	Si no hay artesunato disponible. Preferido sobre la quinina	Menos activo que la dihidroartemisinina; inyección IM oleosa	Eficacia comprometida en zonas de resistencia	Mutaciones en *pfk13.*	[120,140]
	Quinina edovenosa	Si no hay artesunato ni arteméter	Menos eficaz y más tóxica que artemisininas	Resistencia histórica en América, Asia y África	Mutaciones *pfmdr1* y Nº copias	[139,141]
Malaria no *falciparum*	Cloroquina	Cura clínica para *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi* sensibles	Interfiere con la detoxificación del grupo hemo en el parásito	Resistencia confirmada en *P. vivax* en Indonesia y el sudeste asiático	Mutaciones en *pfcrt* y *pfmdr1* y Nº copias.	[117,142]
	Primaquina	Cura radical de *P. vivax*/*ovale*. No recomendada en deficiencia de G6PD	Hipnozoiticida y gametocitocida	Sin validar	Posible relación con el gen *pfmrp*	[117,121,143]
Quimioprevención						
Profilaxis	Sulfadoxina-pirimetamina	TPIe y QPM	Concentraciones preventivas para eliminar infecciones existentes y nuevas	La eficacia disminuye según la frecuencia de mutaciones	**Sulfadoxina**: mutaciones en *pfdhps.* **Pirimetamina**: mutaciones en *pfdhfr*	[113,126]
	SP + AQ	QEM	Farmacología pareada para evitar periodos de monoterapia	Selección de mutaciones *pfdhfr*/*pfdhps* sin pérdida total de eficacia	**Sulfadoxina**: mutaciones en *pfdhps.* **Pirimetamina**: mutaciones en *pfdhfr.* **Amodiaquina**: mutaciones *pfcrt* y *pfmdr1* y Nº copias.	[144]
	Atovacuona-proguanil	Viajeros no inmunes a zonas endémicas de *P. falciparum*	Actúa inhibiendo el desarrollo del parásito en su fase hepática	Cuando se utiliza de forma inadecuada	**Atovacuona**: mutaciones en *pfcytb.* **Proguanil**: mutaciones en *pfdhfr*	[145]
	Mefloquina	Viajeros no inmunes	Interfiere en la detoxificación del grupo hemo.	Resistencia en el sudeste asiático	Mutaciones *pfmdr1* y Nº copias	[146]

AL: artemèter-lumefantrina; AS + AQ: artesunato-amodiaquina; AS + MQ: artesunato-mefloquina; DHA + PPQ: dihidroartemisinina-piperaquina; AS + SP: artesunato-sulfadoxina-pirimetamina; AS + PY: artesunato-pironadirina; IM: intramuscular; G6PD: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; TPIe: tratamiento preventivo intermitente en embarazadas; QPM: quimioprevención perenne de malaria; SP + AQ: sulfadoxina-pirimetamina-amodiaquina; QEM: quimioprofilaxis estacional de malaria.

1.9. Epidemiología molecular de la malaria

La epidemiología molecular se define como la aplicación de las herramientas de biología molecular para estudiar la distribución y los determinantes de la enfermedad a nivel poblacional, permitiendo la caracterización genética del parásito con fines epidemiológicos [147].

En los programas de control y eliminación de la malaria, la vigilancia molecular facilita la estimación de la prevalencia real mediante la detección de infecciones submicroscópicas, la diferenciación entre recrudescencias y reinfecciones, la identificación de casos importados y la caracterización de las cadenas de transmisión y flujo genético. Asimismo, es de gran utilidad para monitorizar la eficacia de las intervenciones, centrando su interés en la vigilancia de las deleciones de *pfhrp2* y *pfhrp3*, que comprometen la utilidad de las PDR [148], y la detección de marcadores moleculares asociados a resistencias a antimaláricos. Esta información resulta fundamental para orientar las decisiones programáticas y adaptar las guías terapéuticas al perfil genético de las poblaciones parasitarias [149].

1.9.1. Deleciones y variabilidad de los genes *pfhrp2* y *pfhrp3*

La eficacia de las PDR que detectan infecciones por *P. falciparum* se ha visto amenazada por la creciente aparición de cepas con los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* delecionados. El gen *pfhrp2* codifica la proteína *Pf*HRP2, principal diana antigénica de las PDR debido a su elevada expresión, estabilidad térmica, sensibilidad y especificidad diagnóstica para esta especie [150]. La proteína rica en histidina 3 de *P. falciparum* (*Pf*HRP3), codificada por el gen parálogo *pfhrp3*, presenta gran similitud estructural con *Pf*HRP2, lo que contribuye a su detección por las PDR-*Pf*HRP2 en casos de parasitemias moderadas-altas (> 1000 parásitos/µL) [151].

1.9.1.1. Base genética y función de las proteínas PfHRP2 y PfHRP3

Los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* se localizan en regiones subteloméricas de los cromosomas 8 y 13, respectivamente [152]. Ambos genes comparten una estructura similar, compuesta por un intrón y dos exones: el exón 1 codifica la secuencia señal de secreción y el exón 2

contiene la secuencia codificante principal rica en repeticiones de histidina (Figura 21) [153].

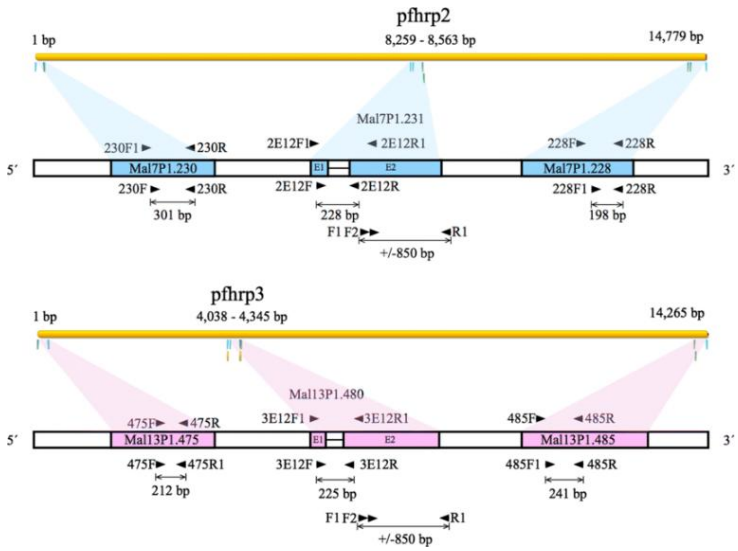


Figura 21. Estructura de los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* y sus regiones flanqueantes [154].

Las proteínas *Pf*HRP2 y *Pf*HRP3 se producen abundantemente durante la fase eritrocítica asexual del parásito y en los estadios tempranos de los gametocitos [155]. Aunque su función biológica no está completamente esclarecida, se ha propuesto que *Pf*HRP2 participa en la detoxificación del grupo hemo, además de contribuir a la remodelación del eritrocito infectado y a la modulación de la respuesta inmune del hospedador [83]. A pesar de ello, los genes codificantes no se consideran esenciales para la supervivencia del parásito. No obstante estudios recientes sugieren que su pérdida puede implicar un coste en el *fitness*, lo que podría influir en la dinámica de propagación de las variantes con deleciones [156].

1.9.1.2. Bases moleculares de las deleciones

Las deleciones de estos genes pueden variar desde pérdidas completas del gen que incluyen amplias regiones flanqueantes (> 20 kb) hasta deleciones parciales que afectan a exones específicos [150,157]. Estos eventos se originan principalmente por recombinación homóloga y por la inestabilidad de las regiones subteloméricas donde se localizan estos loci en el genoma de *P. falciparum* [150]. Desde un punto de vista clínico, se distinguen dos patrones principales: las deleciones simples, que afectan a uno de los genes —con mayor frecuencia *pfhrp3*—, y las deleciones dobles (*pfhrp2* y *pfhrp3*), las

cuales tienen una mayor relevancia diagnóstica, ya que provocan de forma consistente el fallo en la detección de las PDR-*Pf*HRP2 [151].

1.9.1.3. Impacto en el rendimiento de las PDR

La aparición de parásitos con deleciones en *pfhrp2* provoca resultados falsos negativos, lo que disminuye la sensibilidad diagnóstica de las PDR y supone un gran reto diagnóstico para la malaria por *P. falciparum* [151], dada la dependencia actual de estas pruebas [150]. En los casos de deleción simple de *pfhrp2*, la proteína *Pf*HRP3 puede compensar parcialmente la ausencia de *Pf*HRP2 cuando la parasitemia es relativamente alta. Sin embargo, en los casos de baja parasitemia o de deleciones dobles la eficacia de las PDR-*Pf*HRP2 queda comprometida, ya que arrojan resultados falsos negativos [151]. Esto tiene un impacto clínico y epidemiológico grave: el infradiagnóstico puede retrasar o impedir el tratamiento, favoreciendo la progresión hacia formas graves y manteniendo reservorios que perpetúan la transmisión [158].

1.9.1.4. Distribución geográfica y expansión de las deleciones

La primera deleción identificada en aislados de campo se documentó en la Amazonía peruana en el estudio llevado a cabo por Gamboa *et al*. en 2010 [159]. Desde entonces, se ha demostrado su amplia expansión por la cuenca amazónica (Colombia, Brasil, Surinam, etc.), así como en diversas regiones de Asia y África (Figura 22) [158,160]. En AS se ha observado un incremento preocupante de su prevalencia en múltiples países, destacando especialmente los localizados en el Cuerno de África (Eritrea, Yitubi y Etiopía) [161–163], aunque también se han descrito casos en la costa occidental, como en Ghana [164], Mali [165], Guinea Ecuatorial [166], RDC [167], y en el sur del continente, como en Angola, donde se has observado deleciones de *pfhrp2* en muy baja prevalencia (0,4%) [168].

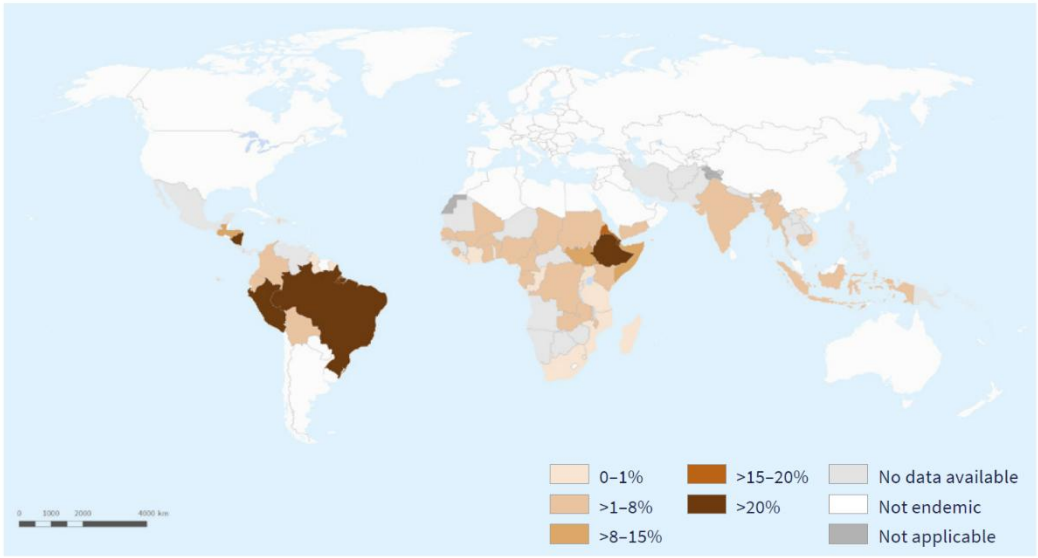


Figura 22. Mapa de prevalencia de deleciones de *pfhrp2* en 2024. Las muestras recogidas en cada uno de los estudios fueron recolectadas entre 1996 y 2024 [36].

Se sabe que las deleciones de *pfhrp2* han ocurrido a través de múltiples eventos de mutación independientes a nivel global [150], aunque en regiones como en el cuerno de África se sugiere que la expansión ha sido a partir de un único origen [162]. Entre los factores que favorecen esta expansión destacan el uso generalizado de PDR-*Pf*HRP2 y las dinámicas poblacionales que facilitan el flujo de genes mutantes entre distintas áreas geográficas. El uso extensivo de las PDR-*Pf*HRP2 ejerce una presión selectiva que favorece la expansión de cepas con deleciones, ya que estas variantes son capaces de eludir su detección, lo que conlleva a la ausencia de tratamiento y facilita la persistencia de la transmisión. Este proceso suele producirse en regiones de baja transmisión y alta tasa de tratamiento, donde la menor variabilidad genética parasitaria facilita el asentamiento de estos genotipos en las poblaciones circulantes de *P. falciparum* [169].

1.9.1.5. Implicaciones en políticas diagnósticas

La creciente amenaza de las deleciones *pfhrp2*/*3* compromete la eficacia de las estrategias de diagnóstico basadas en PDR-*Pf*HRP2 y aumenta el riesgo de infradiagnóstico a gran escala. Ante esta situación, la OMS recomienda realizar evaluaciones periódicas de la prevalencia de las deleciones mediante metodologías moleculares estandarizadas. Para ello, se deben utilizar métodos capaces de confirmar la ausencia de amplificación de los exones y garantizar la calidad del ADN mediante la amplificación de genes de copia única como control [170]. A diferencia de la PCR convencional, la qPCR o dPCR son capaces

de identificar deleciones en infecciones policlonales en las que coexisten cepas portadoras del gen junto con cepas con el gen delecionado [152].

La OMS ha establecido un umbral operativo para la toma de decisiones programáticas: cuando la prevalencia de deleciones de *pfhrp2/3* responsables de falsos negativos en PDR-*Pf*HRP2 supera el 5%, se recomienda reconsiderar la política diagnóstica nacional. Entre las alternativas a este problema se sugiere el uso de PDR basadas en otros antígenos (pLDH o aldolasa) —aunque generalmente cuentan con menor sensibilidad y estabilidad térmica—, así como la confirmación diagnóstica mediante microscopía o técnicas moleculares [170]. A continuación, se muestra la fórmula establecida por la OMS para el cálculo de la prevalencia:

$$X = \frac{\text{Nº casos deleción } pfhrp2/3 \text{ y falsos negativos en PDR}}{\text{Nº casos confirmados } P.falciparum \text{ (otro PDR o microscopía)}}$$

Donde "*X*" es la proporción de casos de *P. falciparum* con resultado falso negativo por PDR-*Pf*HRP2 debido a las deleciones en *pfhrp2/3*, y "PDR" es PDR-*Pf*HRP2.

1.9.1.6. Variabilidad antigénica y su repercusión en el rendimiento de las PDR-PfHRP2

La variabilidad antigénica de las proteínas *Pf*HRP2 y *Pf*HRP3 puede influir en el rendimiento de las PDR-*Pf*HRP2 debido a determinados polimorfismos de secuencia que afectan al número y la disposición de las repeticiones aminoacídicas del exón 2 de estos genes (Tabla S1, Anexo I) [158]. Para evaluar su impacto, se han propuesto modelos predictivos como el de Baker *et al.* [171], que sugiere una menor sensibilidad diagnóstica en variantes con baja frecuencia de determinados motivos repetitivos, especialmente en parasitemias ≤ 250 parásitos/µL, aunque su validez continúa siendo objeto de debate. Además, la eficiencia diagnóstica depende de los epítopos reconocidos por los anticuerpos monoclonales (MAb) del test, cuya abundancia y conformación espacial pueden verse modificadas por esta variabilidad, repercutiendo en la sensibilidad de las PDR [172].

1.9.2. Marcadores moleculares de resistencia a antimaláricos

1.9.2.1. Marcadores asociados a la resistencia a las artemisininas

El principal determinante molecular asociado a la resistencia parcial a las artemisininas son las mutaciones en el gen *pfk13*. Más concretamente, los polimorfismos vinculados a un aclaramiento tardío se concentran en el dominio *propeller* del extremo carboxilo terminal del gen. La OMS clasifica las mutaciones de *pfk13* en dos categorías: 1) mutaciones validadas, asociadas a un retraso en el aclaramiento *in vivo* y confirmadas *in*

vitro; y 2) mutaciones candidatas, que cumplen solo uno de los dos criterios anteriores (Tabla 3) [173]. Con esto, la OMS ha establecido el umbral de preocupación del 5% de prevalencia de un SNP validado o candidato, recomendando en estos casos intensificar la vigilancia [174].

Tabla 3. Marcadores moleculares de resistencia a las artemisininas: gen *pfk13* [173].

Marcadores validados	Marcadores candidatos
F446I	P441L
N458Y	G449A
C469Y	C469F
M476I	A481V
Y493H	R515K
R539T	P527H
I543T	N537I/D
P553L	G538V
R561H	V568G
P574L	
C580Y	
R622I	
A675V	

En regiones previas a los dominios donde se concentran las mutaciones avaladas y candidatas, se han descrito variantes como K189T y E252Q, que en estudios clínicos se han relacionado con un retraso en el aclaramiento parasitario. En particular, la mutación E252Q ha mostrado, en estudios *in vitro*, una posible asociación con resistencia parcial, si bien este efecto parece depender de su coexistencia con otras mutaciones [173].

Aunque la resistencia a las artemisininas se originó y es más prevalente en el Sudeste Asiático, en la última década se han identificado focos de resistencia en África [173]. Se ha descrito la fuerte expansión clonal de la mutación R561H en Ruanda [175] y Tanzania [176]; así como de A675V y C469Y en Uganda [177]; y de la mutación R622I en la región del Cuerno de África [178–180].

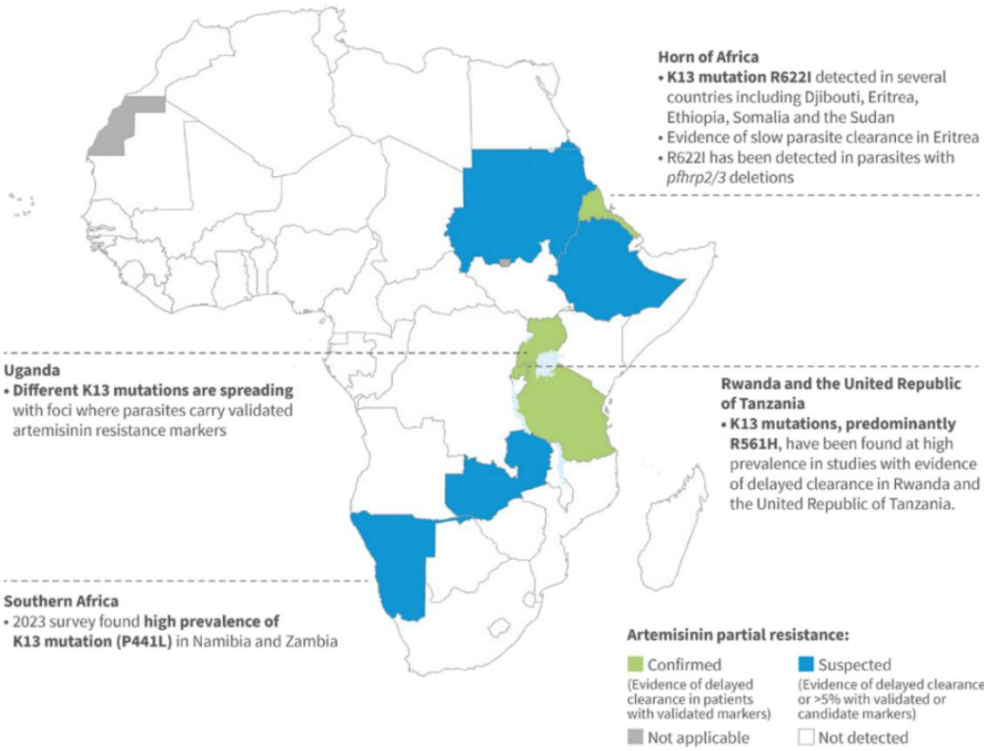


Figura 23. Distribución de los marcadores moleculares de resistencia a las artemisininas en África según la OMS hasta 2024 [36]. A pesar de aparecer señalados como "no detectado", países como la República Democrática del Congo (RDC) y Angola (casos importados en China) han reportado mutaciones validadas y candidatas de resistencia parcial a las artemisininas [181,182].

En Angola, los estudios de vigilancia molecular sugieren que el alelo salvaje de *pfk13* continúa siendo predominante [128,131,183,184]. No obstante, en casos importados en China procedentes de Angola, se han detectado mutaciones validadas (R539T y P553L) [182]. Además, se ha informado de variantes como A578S —frecuente en África, pero sin asociación con resistencias— [185], así como un listado de mutaciones no sinónimas sin relación confirmada con resistencias: F434Y, T437N, P443R, A504V, A569T, M579I, V589I, Q613E y N694K [128,182,186,187]. Asimismo, en países vecinos a Angola también se han descrito mutaciones de resistencia en *pfk13*. En RDC se han identificado mutaciones validadas como C469Y [181] y R561H [188], así como las candidatas P441L [188] y C469F [189], mientras que en Zambia y Namibia se ha reportado la presencia de P441L [36,190].

1.9.2.2. Marcadores asociados a resistencias a las 4-aminoquinolonas y arilaminoalcoholes

Las resistencias a las 4-aminoquinolonas y a los arilaminoalcoholes están medidas principalmente por polimorfismos en los genes *pfcrt* y *pfmdr1* [191]. Entre estos fármacos existe un fenómeno de presión selectiva cruzada: mutaciones que confieren resistencia a las 4-aminoquinolonas pueden aumentar la sensibilidad a algunos arilaminoalcoholes [192]. Por ejemplo, el tratamiento con AL tiende a seleccionar los alelos salvajes N86 y D1246, y la mutación Y184F en *pfmdr1* (haplotipo N**F**D), asociados a mayor resistencia a la lumefantrina [193]. Por el contrario, el uso de AS + AQ selecciona las mutaciones N86Y y D1246Y, y el alelo salvaje Y184 (haplotipo **YY**Y), vinculadas a resistencia a amodiaquina y cloroquina [194].

En esta tesis únicamente se han utilizado los marcadores de *pfmdr1* para estudiar las resistencias a estos fármacos, por lo que nos centraremos en ellos:

- N86Y: clave en la resistencia a cloroquina y amodiaquina, aunque aumenta la susceptibilidad a lumefantrina y mefloquina [195].
- E130K: aunque raro, descrito en aislados africanos [183].
- Y184F: frecuente en África, modula la susceptibilidad en combinación con el estado del codón 86 [121].
- S1034C, N1042D y V1109I: característicos de aislados de Sudamérica y Sudeste Asiático (poco frecuentes en África), asociados a resistencias a quinina y mefloquina [189].
- D1246Y: contribuye a la resistencia a amodiaquina y quinina, aunque más común en Sudamérica, ha sido detectado recientemente en aislados de Angola [184] y países vecinos como RDC [188] y Zambia [196].

Además de los SNP, la variación en el número de copias de *pfmdr1* tiene un papel relevante en cuanto a la resistencia de algunos fármacos. Su amplificación (múltiples copias) confiere resistencia a la mefloquina, halofantrina, lumefantrina y quinina [197].

Los principales haplotipos para los genes *pfmdr1* y *pfcrt* en África se muestran en la Figura 24.

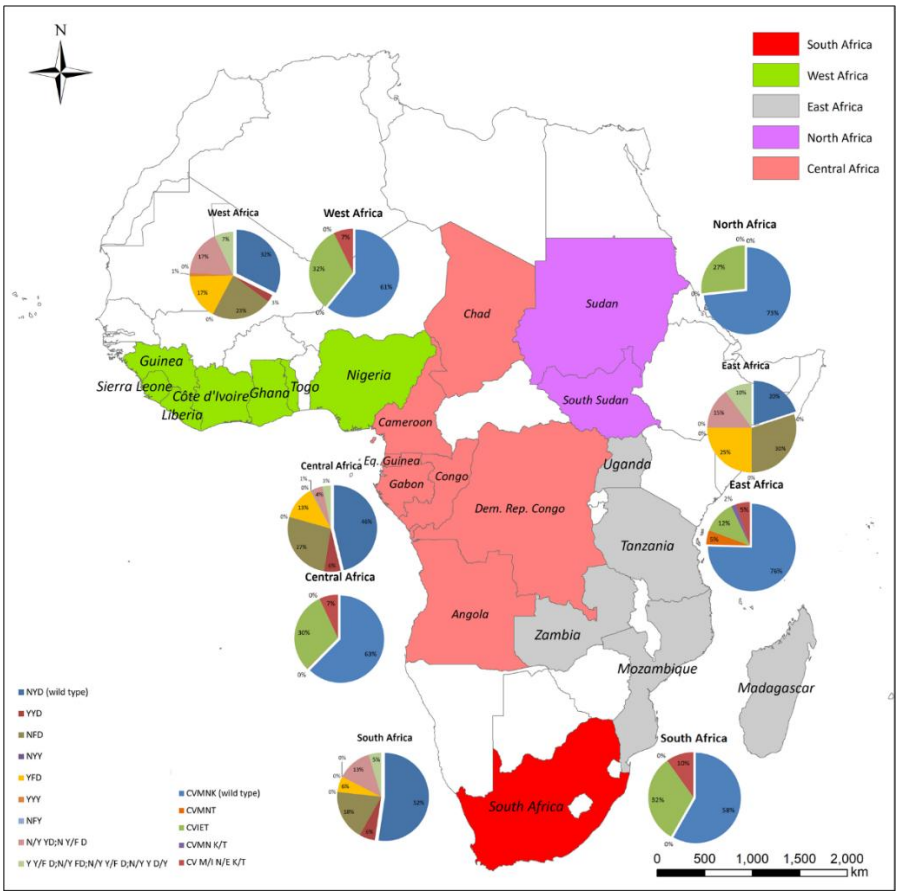


Figura 24. Principales haplotipos de los genes *pfcrt* y *pfmdr1* asociados a resistencias a antimaláricos en África. Los datos se corresponden a casos importados en China procedentes de los distintos países africanos entre 2012 y 2015 [182]. En la leyenda, la columna de la izquierda hace referencia a los haplotipos de *pfmdr1* (codones 86, 184 y 1246) y la de la derecha a los de *pfcrt* (codones 72-76).

En Angola, tras la retirada de la cloroquina como tratamiento de primera línea, se ha observado una recuperación progresiva de la sensibilidad a las 4-aminoquinolonas, reflejada en el aumento de la frecuencia de alelo salvaje N86 de *pfmdr1* y en la disminución de la mutación K76T de *pfcrt* [183,198].

1.9.2.3. Marcadores asociados a resistencias a antifolatos

La resistencia a la SP en *P. falciparum* se debe a la acumulación progresiva de mutaciones puntuales en los genes *pfdhfr* y *pfdhps*. En *pfdhfr*, las mutaciones N51I, C59R, S108N y I164L —esta última se relaciona con niveles elevados de resistencia— confieren resistencia a la pirimetamina. En *pfdhps*, las mutaciones vinculadas a la resistencia a sulfadoxina son: I431V (emergente en África central), S436A/F, A437G, K540E, A581G y A613S/T [199].

El grado de resistencia se evalúa mediante haplotipos combinados de ambos genes. Los triples mutantes *pfdhfr* (N51I, C59R y S108N) y el doble *pfdhps* (A437G y K540E) constituyen las combinaciones básicas. Los grados de resistencia en base a estas combinaciones son [200]:

- Parcialmente resistente (cuádruple mutante): triple *pfdhfr* + A437G *pfdhps* (**IRNG**).
- Totalmente resistente (Quíntuple mutante): triple *pfdhfr* + doble *pfdhps* (**IRNGE**).
- Superresistente (séxtuple mutante): quíntuple mutante + A581G de *pfdhps* (**IRNGEG**).

En Angola, los estudios realizados en provincias como Benguela, Zaire y Lunda Sul muestran que el haplotipo parcialmente resistente (**IRNG**) es el más común, con una prevalencia cercana a la fijación de las mutaciones N51I y S108N (*pfdhfr*) y A437G (*pfdhps*) [201]. La mutación I164L (*pfdhfr*) fue detectada por primera vez en la ciudad de Lubango (provincia de Huíla) [126].

A continuación, se muestra la evolución espacio temporal de los principales marcadores moleculares asociados a la resistencia a la sulfadoxina en África.

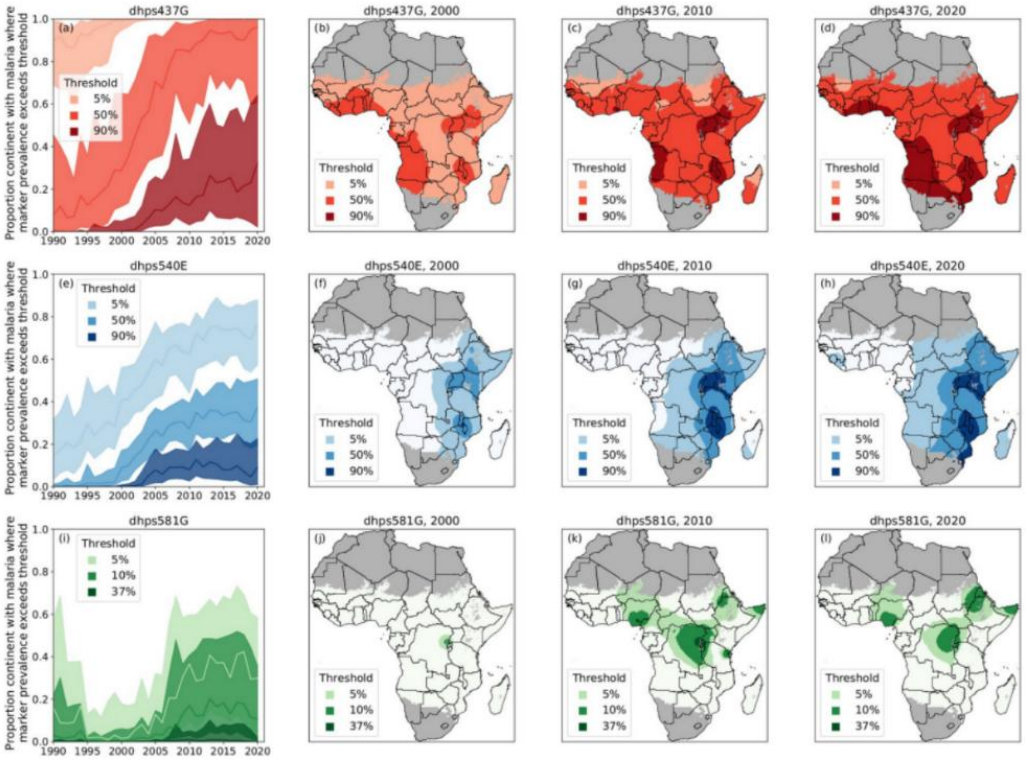


Figura 25. Evolución espacio-temporal de la expansión de marcadores de resistencia a SP en África bajo umbrales críticos de prevalencia [202]. Las figuras **A**, **E** e **I** muestran la evolución temporal de la expansión de las mutaciones A437G, K540E y A581G en *pfdhps*, respectivamente, desde 1990 hasta 2020 en el continente africano. El resto de figuras muestran la expansión geográfica de estos mismos marcadores en los años 2000, 2010 y 2020 por los distintos países africanos.

Hasta 2022, la OMS recomendaba no utilizar SP en estrategias de quimioprevención cuando la prevalencia de la mutación K540E superaba el 50% en la QPM y el 95% en el TPIe [203,204]. No obstante, estudios más recientes indican que la SP puede mantener su eficacia incluso en contextos con alta prevalencia de este marcador. Sin embargo, se considera que las zonas donde la prevalencia de la mutación A581G alcanza o supera el 10% podrían no ser adecuadas para la implementación del TPIe [115]. Con esta situación, existe una gran preocupación por la expansión de haplotipos superresistentes y de variantes emergentes como I431V en *pfdhps* (haplotipo **VAGKGS**). Esta variante ya se ha detectado en varios países de África occidental, entre ellos Nigeria, Mali y Costa de Marfil [205], donde representa una amenaza creciente al poder comprometer la eficacia de las estrategias profilácticas [199].

A modo de resumen, en la Tabla 4 se muestran, los principales marcadores moleculares de resistencia a antimaláricos para los genes *pfdmdr1*, *pfdhfr* y *pfdhps*.

Tabla 4. Marcadores de resistencia a las 4-aminoquinolonas, arilaminoalcoholes y antifolatos de *P. falciparum*.

Gen*	Fármaco/s	Posición codón	Posición nucleótidos	Triplete en 3D7	Aminoácido salvaje	Aminoácido mutado
pfmdr1	4-aminoquinolonas y arilaminoalcoholes	86	256-8	AAT	N	Y
		130	388-90	GAA	E	K
		184	550-2	TAT	Y	F
		1034	3100-2	AGT	S	C
		1042	3124-6	AAT	N	D
		1109	3325-7	GTA	V	I
		1246	3736-8	GAT	D	Y
pfdhfr	Pirimetamina y proguanil	51	151-3	AAT	N	I
		59	175-7	CGT**	C	R
		108	322-4	AAC**	S	N/T
		164	490-2	ATA	I	L
pfdhps	Sulfamidas	431	1291-3	ATA	I	V
		436	1306-8	TCT	S	A
		437	1309-11	GGT**	A	G
		540	1618-20	AAA	K	E
		581	1741-3	GCG	A	G
		613	1837-9	GCC	A	S

* No se muestra el gen *pfcrt* por no haber sido analizado en esta tesis doctoral.

** El triplete que aparece en la secuencia referencia del clon 3D7 contiene la mutación.

2. Justificación

Angola está entre los 10 países con mayor incidencia de malaria, lo que refleja sus dificultades en el acceso al diagnóstico, tratamiento y mantenimiento de la vigilancia epidemiológica. Estas limitaciones se acentúan en entornos rurales como Cubal, donde la ausencia o debilidad de los sistemas de vigilancia impide disponer de datos robustos sobre la verdadera prevalencia de la enfermedad y las características genéticas de su principal agente causal, *P. falciparum*. La falta de información compromete el diseño y la implementación de intervenciones adaptadas al contexto local, perpetuando la transmisión, y el impacto sanitario y socioeconómico asociado a esta enfermedad.

El diagnóstico de la malaria en Cubal se basa en la microscopía y el uso de las PDR-*Pf*HRP2. Si bien estas herramientas han permitido ampliar el acceso al diagnóstico, presentan serias limitaciones. Ambas muestran una sensibilidad reducida en infecciones con baja parasitemia, y dificultades para la correcta identificación de especies y detección de infecciones mixtas. En cambio, la PCR es capaz de detectar infecciones submicroscópicas, e identificar con exactitud las especies y las coinfecciones. Sin embargo, su implementación en áreas con recursos limitados es compleja debido a sus requerimientos técnicos y económicos. En este contexto, las DBS permiten la recolección, almacenamiento y transporte de muestras para su posterior análisis molecular en centros de referencia. Por su parte, las PDR-*Pf*HRP2, ampliamente utilizadas por su simplicidad y bajo coste, se enfrentan a una amenaza creciente derivada de la expansión de cepas con los genes *pfhrp2*/*pfhrp3* delecionados, lo que puede generar falsos negativos y comprometer el manejo de casos clínicos. Se ha alertado de estas variantes en países vecinos y de casos sospechosos en Angola. En consecuencia, la fiabilidad de esta herramienta diagnóstica en regiones como Cubal podría estar comprometida, sin que existan datos locales que permitan constatarlo.

Históricamente, el control y el manejo de casos de malaria han estado marcados por la pérdida progresiva de eficacia a los antimaláricos debido a la capacidad adaptativa del parásito. Actualmente, la detección de marcadores moleculares asociados a resistencias a las artemisininas y a sus fármacos acompañantes en las TCA, en Angola y países colindantes, plantea un elevado riesgo para la eficacia de los tratamientos de primera línea. De igual modo, el aumento de la prevalencia de mutaciones asociadas a resistencia a la SP compromete las estrategias de quimioprofilaxis dirigidas a poblaciones vulnerables. La ausencia de datos locales en Cubal dificulta evaluar la magnitud real de este problema y limita la capacidad de anticipar posibles fallos terapéuticos.

Ante esta problemática, el uso de técnicas moleculares permite aumentar el rendimiento diagnóstico, y caracterizar la diversidad genética del parásito al identificar marcadores de resistencia y monitorizar la presencia de deleciones génicas.

3. Hipótesis y objetivos

3.1. Hipótesis

Las técnicas moleculares para el diagnóstico y la caracterización genética de *P. falciparum* constituyen herramientas útiles para generar información epidemiológica relevante sobre la carga de malaria, la distribución de las especies de *Plasmodium* circulantes, la frecuencia e implicaciones de las infecciones mixtas, y la presencia de marcadores moleculares asociados a la evasión diagnóstica de las PDR y a la resistencia a los antimaláricos en entornos rurales endémicos como Cubal. La integración de esta información en los sistemas de vigilancia proporcionará evidencia complementaria para orientar las estrategias y políticas de control de la enfermedad, apoyando la adopción de intervenciones dirigidas a reducir la transmisión, la morbilidad y la mortalidad asociadas a la malaria.

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo general

Aplicar y evaluar las herramientas moleculares para la mejora del diagnóstico y el fortalecimiento de los sistemas de vigilancia epidemiológica de la malaria en el municipio rural de Cubal.

3.2.2. Objetivos específicos

A) Diagnóstico molecular de la malaria y estrategias de detección en contextos endémicos y rurales como Cubal.

1. Calcular la frecuencia de casos de malaria, y caracterizar la distribución de las especies de *Plasmodium* circulantes e infecciones mixtas en pacientes febriles del municipio de Cubal mediante el análisis integrado de las diferentes herramientas diagnósticas utilizadas.

2. Evaluar la utilidad de la PCR en tiempo real para el diagnóstico de la malaria en pacientes con sintomatología febril en Cubal, comparando su rendimiento con los métodos diagnósticos convencionales (microscopía y PDR).

3. Analizar la viabilidad del uso de DBS como método de recogida, conservación y transporte de muestras sanguíneas desde un entorno con recursos limitados como

Cubal hacia un centro de referencia, para su posterior diagnóstico molecular mediante PCR en tiempo real.

B) Caracterización genética de *P. falciparum* para el manejo de la malaria en Cubal, Angola.

1. Determinar la frecuencia de deleciones de los exones 1-2 y 2 en los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* en la población de estudio, así como caracterizar la variabilidad antigénica de las proteínas *Pf*HRP2 y *Pf*HRP3 mediante el análisis de repeticiones de aminoácidos y epítopos de unión a MAb, evaluando su potencial impacto en la sensibilidad de las PDR-*Pf*HRP2.

2. Caracterizar el perfil molecular de resistencia a antimaláricos mediante la determinación de la frecuencia de mutaciones en genes clave (*pfk13*, *pfmdr1*, *pfdhfr* y *pfdhps*), y analizar su implicación en la susceptibilidad a las TCA y SP en el municipio de Cubal.

4. Metodología

A continuación, se muestra un esquema del diseño metodológico que resume las diferentes fases y procedimientos llevados a cabo en los estudios incluidos en esta tesis doctoral.

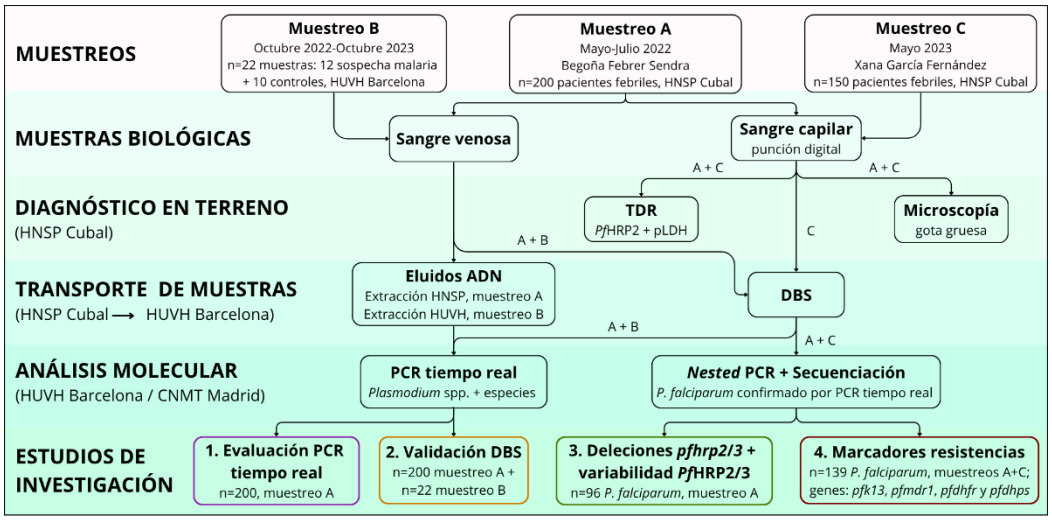


Figura 26. Diagrama de flujo de la metodología llevada a cabo en los estudios incluidos en esta tesis. En primer lugar, se realizaron tres muestreos entre mayo de 2022 y octubre de 2023, dos en el Hospital Nossa Senhora da Paz (HNSP) de Cubal (Angola) y uno en el Hospital Universitario Vall d'Hebron (HUVH) de Barcelona (España), incluyendo pacientes con sospecha de malaria (fiebre y antecedente epidemiológico) y controles que simulan sangre infectada. Se obtuvieron muestras de sangre capilar y venosa para el diagnóstico en terreno (HNSP; microscopía y PDR), y para su posterior análisis molecular en el HUVH y el Centro Nacional de Medicina Tropical (CNMT) de Madrid (España) tras ser transportadas como muestras de sangre seca (DBS) y ADN eluido. El análisis molecular se llevó a cabo mediante PCR en tiempo real para la detección de *Plasmodium* spp. e identificación de especies. Las muestras confirmadas para *P. falciparum* fueron secuenciadas para los genes de interés tras su amplificación por *nested* PCR. Esta metodología permitió desarrollar cuatro líneas de investigación: **1)** la evaluación de la PCR en tiempo real para el diagnóstico de malaria [206], **2)** la validación del uso de DBS para su posterior análisis molecular [207], **3)** el análisis de deleciones de los genes *pfhrp2/3* y variabilidad de las proteínas ricas en histidina 2 y 3 de *P. falciparum* (*Pf*HRP2/3), y **4)** la caracterización de marcadores moleculares de resistencia a antimaláricos (genes: *pfk13*, *pfmdr1*, *pfdhfr* y *pfdhps*).

5. Resultados

Los resultados de la presente tesis doctoral se estructuran en dos bloques que abordan sus principales temáticas: el diagnóstico molecular de la malaria y la caracterización genética de *P. falciparum*, ambos orientados a mejorar el control de la enfermedad en Cubal (Angola). Cada uno de estos bloques incluye dos artículos científicos, ya publicados en revistas internacionales de acceso abierto especializadas en parasitología y malaria.

Bloque 1: Diagnóstico molecular de la malaria y estrategias de detección en contextos endémicos y rurales como Cubal

Este bloque se centra en la evaluación y optimización de herramientas moleculares para el diagnóstico de la malaria en un entorno rural y endémico como Cubal. Incluye dos estudios complementarios entre sí: el primero analiza la utilidad de la PCR en tiempo real en comparación con las técnicas diagnósticas convencionales, y el segundo evalúa el uso de DBS como estrategia para la recogida, conservación y transporte de muestras en entornos con recursos limitados.

Artículo 1. PCR en tiempo real para el diagnóstico de la malaria e identificación de especies de *Plasmodium* en pacientes febriles en Cubal, Angola

Título original: Real-time PCR for malaria diagnosis and identification of *Plasmodium* species in febrile patients in Cubal, Angola.

Autores: Mediavilla A, Silgado A, Febrer-Sendra B, Crego-Vicente B, Martínez-Vallejo P, Maturana CR, Goterris L, Nindia A, Martínez-Campreciós J, Aixut S, Aznar-Ruiz-de-Alegría ML, Fernández-Soto P, Muro A, Salvador F, Molina I, Berzosa P, Oliveira-Souto I, Sulleiro E.

Revista: Parasites & Vectors (Factor de impacto: 3,5; Q1 en parasitología y enfermedades infecciosas).

Fecha de publicación: 11 de septiembre de 2024.

DOI: 10.1186/s13071-024-06467-3

Resumen

Antecedentes

La malaria es la enfermedad parasitaria con mayor morbimortalidad a nivel mundial. La OMS estima que hubo aproximadamente 249 millones de casos en 2022, de los cuales el 3,4% se registraron en Angola. El diagnóstico se basa en la identificación del parásito mediante examen microscópico, detección de antígenos y/o pruebas moleculares, como la PCR. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la utilidad de la PCR en tiempo real como método diagnóstico de la malaria en un área endémica (Cubal, Angola).

Métodos

Se llevó a cabo un estudio transversal en el HNSP de Cubal, Angola, incluyendo a 200 pacientes que consultaron por síndrome febril entre mayo y julio de 2022. De cada paciente se obtuvo una muestra de sangre capilar mediante punción digital para el diagnóstico de malaria en campo (microscopía y PDR) y una muestra de sangre venosa para PCR en tiempo real realizada en el Hospital Universitario Vall d'Hebron (HUVH) en Barcelona, España. Cualquier participante con resultado positivo en al menos uno de estos tres métodos fue diagnosticado de malaria.

Resultados

De los 200 participantes incluidos, el 54% eran mujeres y la edad mediana fue de 7 años. La malaria se diagnosticó mediante al menos una de las tres técnicas (microscopía, PDR y/o PCR en tiempo real) en el 58% de los participantes, siendo la PDR la técnica con mayor porcentaje de positividad (49%), seguido de la PCR en tiempo real (39,5%) y la microscopía (33,5%). De las 61 muestras discordantes, 4 fueron positivas únicamente por microscopía, 13 por PCR en tiempo real y 26 por PDR. *P. falciparum* fue la especie más frecuente (90,6%), seguida de *P. malariae* (17,2%) y *P. ovale* (9,4%). Se detectaron infecciones mixtas en diez participantes (15,63%): seis (60%) fueron causadas por *P. falciparum* y *P. malariae*, tres (30%) por *P. falciparum* y *P. ovale*, y una (10%) infección triple por estas tres especies. Además, se observó que la infección mixta por *P. falciparum* y *P. malariae* incrementó significativamente la densidad parasitaria de esta última.

Conclusiones

La PDR fue la técnica con mayor tasa de positividad, seguida de la PCR en tiempo real y la microscopía. Los resultados de la PCR en tiempo real pueden haber sido infraestimados debido a condiciones subóptimas de almacenamiento durante el transporte de los eluidos de ADN. Sin embargo, las técnicas de PCR en tiempo real tienen un papel importante en la vigilancia.

Mediavilla *et al. Parasites & Vectors* (2024) 17:384
https://doi.org/10.1186/s13071-024-06467-3

Parasites & Vectors

RESEARCH

Open Access

Real-time PCR for malaria diagnosis and identification of *Plasmodium* species in febrile patients in Cubal, Angola

Alejandro Mediavilla[1,2], Aroa Silgado[1,3], Begoña Febrer-Sendra[4], Beatriz Crego-Vicente[4], Patricia Martínez-Vallejo[1,2], Carles Rubio Maturana[1,2], Lidia Goterris[1], Arlette Nindia[5], Joan Martínez-Campreciós[3,6], Sandra Aixut[6], María Luisa Aznar-Ruiz-de-Alegría[3,6], Pedro Fernández-Soto[4], Antonio Muro[4], Fernando Salvador[3,6], Israel Molina[3,6], Pedro Berzosa[7], Inés Oliveira-Souto[3,6*] and Elena Sulleiro[1,3,6*]

Abstract

Background Malaria is the parasitic disease with the highest morbimortality worldwide. The World Health Organization (WHO) estimates that there were approximately 249 million cases in 2022, of which 3.4% were in Angola. Diagnosis is based on parasite identification by microscopy examination, antigen detection, and/or molecular tests, such as polymerase chain reaction (PCR). This study aimed to evaluate the usefulness of real-time PCR as a diagnostic method for malaria in an endemic area (Cubal, Angola).

Methods A cross-sectional study was carried out at the Hospital Nossa Senhora da Paz in Cubal, Angola, including 200 patients who consulted for febrile syndrome between May and July 2022. From each patient, a capillary blood sample was obtained by finger prick for malaria field diagnosis [microscopy and rapid diagnostic test (RDT)] and venous blood sample for real-time PCR performed at the Hospital Universitario Vall d'Hebron in Barcelona, Spain. Any participant with a positive result from at least one of these three methods was diagnosed with malaria.

Results Of the 200 participants included, 54% were female and the median age was 7 years. Malaria was diagnosed by at least one of the three techniques (microscopy, RDT, and/or real-time PCR) in 58% of the participants, with RDT having the highest percentage of positivity (49%), followed by real-time PCR (39.5%) and microscopy (33.5%). Of the 61 discordant samples, 4 were only positive by microscopy, 13 by real-time PCR, and 26 by RDT. *Plasmodium falciparum* was the most frequent species detected (90.63%), followed by *P. malariae* (17.19%) and *P. ovale* (9.38%). Coinfections were detected in ten participants (15.63%): six (60%) were caused by *P. falciparum* and *P. malariae*, three (30%) by *P. falciparum* and *P. ovale*, and one (10%) triple infection with these three species. In addition, it was observed that *P. falciparum* and *P. malariae* coinfection significantly increased the parasite density of the latter.

Conclusions RDT was the technique with the highest positivity rate, followed by real-time PCR and microscopy. The results of the real-time PCR may have been underestimated due to suboptimal storage conditions during the transportation of the DNA eluates. However, real-time PCR techniques have an important role in the surveillance

*Correspondence:
Inés Oliveira-Souto
ines.oliveira@vallhebron.cat
Elena Sulleiro
elena.sulleiro@vallhebron.cat
Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s) 2024. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

of circulating *Plasmodium* species, given the epidemiological importance of the increase in non-*falciparum* species in the country, and can provide an estimate of the intensity of infection.

Keywords Malaria, Angola, *Plasmodium*, Diagnosis, Real-time PCR, Species identification

Background

Malaria is the parasitic disease with the highest morbidity and mortality worldwide. According to the World Health Organization (WHO), approximately 249 million cases of malaria and 608,000 deaths were recorded worldwide in 2022 [1]. This anopheline mosquito-borne disease is caused by protozoa of the genus *Plasmodium*. The five species that infect humans are *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* (subspecies: *P. ovale wallikeri* and *P. ovale curtisi*), and *P. knowlesi* [2].

Angola, located in southwest Africa, is one of the malaria high-burden countries, recording 3.4% of malaria cases and 3.2% of global malaria deaths in 2022 [1]. *Plasmodium falciparum* is the most prevalent species, however, molecular studies carried out in the last two decades have demonstrated the presence of *P. malariae*, *P. ovale,* and *P. vivax* in smaller proportions [3]. The malaria prevalence in this country varies according to latitude: the north is hyperendemic, the center is stable mesoendemic, and the south is unstable mesoendemic [4]. Cubal is a rural locality in the province of Benguela, located in central-western Angola, which has a tropical climate with a rainy season (November–May) associated with a period of high transmission and a dry season (July–October) of low transmission [5]. Malaria transmission in Cubal has been defined as stable mesoendemic in previous studies [6].

Accurate and early diagnosis of malaria is of great importance for effective treatment and correct management of the disease. The main diagnostic methods for malaria are based on the identification of parasitic forms by microscopic examination of blood smears, detection of antigens by rapid diagnostic tests (RDTs), or nucleic acids by molecular methods, such as polymerase chain reaction (PCR) and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) [7]. Clinical diagnosis is widely used in endemic areas [8], however, symptoms are often not specific (fever, chills, muscle pains, headaches, and so on), and vary according to the stage of the disease or the different *Plasmodium* species causing the infection [9]. Therefore, the Global Technical Strategy for Malaria 2016–2030, adopted by the WHO Global Malaria Program in 2015, recommends that clinical suspicions of malaria should be confirmed by parasitological laboratory testing (microscopy and/or RDT) before treatment [10].

Microscopic examination remains the gold standard technique for malaria diagnosis as it allows for the quantification and identification of *Plasmodium* species in blood samples. However, microscopy has a highly expert-dependent detection limit of approximately 50–100 parasites/μL, which implies a low sensitivity in patients with a low parasite load and in those with coinfections of two or more *Plasmodium* species cases [8, 11, 12]. Further, RDTs are a simple, rapid, easy-to-perform, and cost-effective method for malaria diagnosis. The most frequent RDT targeting histidine-rich protein 2 of *P. falciparum* (*Pf*HRP2) has a high sensitivity when the parasite density is > 100 parasites/μL (94.3%), however, when parasitaemia is less than < 100 parasites/μL its sensitivity decreases considerably (74.1%) [13]. Moreover, RDTs do not allow quantification of the parasitaemia or accurate identification of the *Plasmodium* species, and mutations in the gene encoding the *Pf*HRP2 can lead to false-negative results [14, 15].

Currently, molecular methods, mainly based on PCR protocols, serve as relevant tools for the diagnosis of malaria due to their high sensitivity and specificity, as they are able to detect the presence of parasite DNA in asymptomatic patients or those with very low parasite loads (detection limit < 1 parasite/μL) [16, 17]. Moreover, PCR allows for the specific identification of *Plasmodium* species [18]. Quantitative real-time PCR enables the quantification of the parasite load [19], making it possible to monitor the response to treatment over time and establish the possible effect of coinfections on parasite density [20, 21]. However, PCR has not been efficiently implemented in resource-limited settings, mainly due to the high cost of the equipment and the need for laboratories and specialized technicians [22]. On the contrary, LAMP is a rapid and simple molecular method for the diagnosis of malaria in all types of endemic and nonendemic areas. In addition, the reagents and instrumentation used are cheaper than those required for PCR techniques [23].

The objective of this study was to evaluate the usefulness of real-time PCR for diagnosing malaria in patients with febrile symptoms in Cubal, Angola, comparing it with other diagnostic methods (microscopy and RDT).

Methods

Study population and data collection

A cross-sectional study was conducted at the Hospital Nossa Senhora da Paz (HNSP, Cubal, Angola) in febrile patients between May and July 2022. Recruitment of participants and sample collection was performed as described by Febrer-Sendra et al. [23], with febrile syndrome as the sole inclusion criterion.

Demographic data (age and gender) were collected for each participant. In terms of age, four population groups were established: preschool-aged children (PSAC) (0–4.9 years), school-aged children (SAC) (5–14.9 years), adults (15–49.9 years), and the elderly (> 50 years).

Sample size calculation

The sample size was calculated from data published in a previous study at the HNSP of Cubal by Salvador et al. [6]. A sample size of 186 patients with suspected malaria was initially estimated with 95% confidence and a 5% accepted error, with the final sample size rounded to 200 participants [24].

Sample collection and malaria diagnosis

A capillary blood sample and a 3 mL venous blood sample (collected in a tube with EDTA anticoagulant) were collected from each participant following the clinical protocol established by the HNSP. Capillary blood obtained by finger stick was used for microscopic examination and RDT, whereas venous blood obtained by venipuncture was used for molecular analysis (Fig. 1).

Microscopy was used as the standard for diagnosing malaria. Until proven otherwise, it is this test that is considered the WHO standard for malaria diagnosis. Regarding field diagnosis, the malaria case was defined by a positive result by microscopy and/or RDT.

Microscopy examination

A thick drop smear was prepared from each capillary blood sample and stained with 10% Giemsa for 15 min [23]. The reading, diagnosis, and quantification of parasite load were performed as described by Febrer-Sendra et al. and by Alger et al. [23, 25]. Three groups of infection intensity were established according to the parasite load of each drop following the thresholds marked by Fox et al. [26], as follows: low intensity (< 800 parasites/μL), medium intensity (800–4000 parasites/μL), and high intensity (> 4000 parasites/μL). The detection limit of microscopic examination in this study was 80 parasites/μL.

Rapid diagnostic test

The STANDARD™ Q Malaria Pf/Pan Ag test (SD Biosensor, Republic of Korea) was used for the rapid diagnosis of malaria (lot numbers: 5102A71AC/1, 5102BJ1AC1, and 5102C82AC1). This antigen test targets *Pf*HRP2 of *P. falciparum* and panmalaric lactate dehydrogenase (pLDH) of *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, and *P. malariae*. The detection limit is 163 parasites/μL. The test was carried out according to the manufacturer's instructions.

Molecular analysis

DNA extraction was performed on the same day of sample collection at the HNSP, using 200 μL of venous blood, and eluting DNA in 100 μL of elution buffer, as described by Febrer-Sendra et al. [23]. The eluates were stored in the HNSP laboratory at −20 °C until transport to Spain. Eluted DNA samples were shipped to the Microbiology

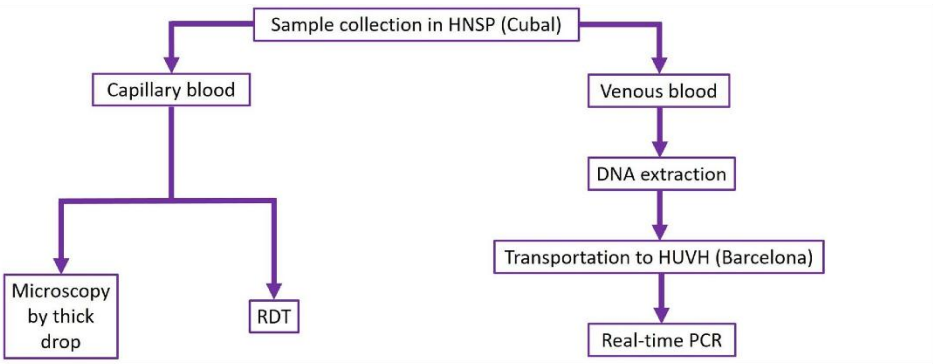


Fig. 1 Flow chart established for sample collection and diagnostic methods used. Sample collection was carried out at the Hospital Nossa Senhora da Paz (HNSP) in Cubal. For real-time PCR, a previous DNA extraction step was required, the eluates of which were transported to the Hospital Universitario Vall d'Hebron (HUVH) in Barcelona

Department of the Hospital Universitario Vall d'Hebron (HUVH, Barcelona, Spain) for analysis by real-time PCR. It should be noted that it was not possible to keep the samples cold during transport.

A first real-time PCR was performed to detect *Plasmodium* spp.-specific DNA using the RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 (Altona Diagnostics, Hamburg, Germany) according to the manufacturer's instructions [limit of detection: 1.27; confidence interval (CI) 0.57–5.42 copies/µL of eluate]. Positive samples from the first PCR were tested in a second real-time PCR that detects *Plasmodium* species-specific DNA using the RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 (Altona Diagnostics), following the manufacturer's instructions. This assay consists of two independent multiplex reactions, one targeting DNA specific to *P. falciparum* and *P. vivax* (limits of detection: 0.80 and 0.73; CI 0.44–2.45 and 0.46–1.62 copies/µL of eluate, respectively) and the other targeting DNA specific to *P. malariae*, *P. ovale*, and *P. knowlesi* (limits of detection: 0.36, 1.46, and 2.35; CI 0.24–0.74, 0.89–3.28, and 1.37–5.55 copies/µL of eluate, respectively). All real-time PCR reactions were performed using the CFX96 Touch real-time PCR detection system (Bio-Rad, Hercules, CA).

Negative (nuclease-free water) and positive (*Plasmodium* spp.-specific or species-specific DNA, obtained from DNA extraction from blood of patients with malaria attending HUVH, whose infection was confirmed by microscopy and real-time PCR) controls were included in each run. Samples were considered positive for *Plasmodium* DNA when the threshold cycle (Ct) for the *Plasmodium* target was < 40 and the internal control amplified effectively.

Although real-time PCR used in this study is not an absolute but a relative quantitative method, Ct values were used as an indirect estimate of parasite density [27].

Statistical analysis

Qualitative variables were expressed as percentages and absolute frequencies. Quantitative variables were described using the mean or median and standard deviation (SD) or interquartile range (IQR) according to normality.

Spearman's correlation test assessed the relationship between quantification via microscopy and real-time PCR. The point-biserial correlation test was utilized to establish the relationship between the patient's age and diagnosis by real-time PCR. Potential associations between diagnosis using the different techniques, as well as participant's gender in relation to real-time PCR diagnosis, were evaluated using the chi-squared test of independence or Fisher's exact test. The Kruskal–Wallis test followed by the Mann–Whitney–Wilcoxon test, and single-factor analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test for multiple comparisons were applied to detect any significant differences between the groups established on the basis of infection intensity for quantification by microscopy and real-time PCR, respectively. To test whether there was an effect on parasite density due to coinfections, single-factor ANOVA and Tukey's test for multiple comparisons were applied. In all cases, the significance level was set at P-value < 0.05.

Diagnostic performance parameters for each test (sensitivity, specificity, positive and negative predictive values) were calculated. Cohen's Kappa coefficient was used to analyze the level of agreement between tests, and was interpreted as follows: slight agreement (0.00–0.20), fair agreement (0.21–0.40), moderate agreement (0.41–0.60), substantial agreement (0.61–0.80), and almost perfect agreement (0.81–1.00). Youden's index was calculated to report the effectiveness of each technique: ineffective test (negative value) and effective test (positive value).

The excess risk of coinfections was calculated as described by Holzschuh et al. [21]. All species were assumed to be independently distributed; thus, if X_i is the frequency of one species and X_j of another, the expected frequency of a coinfection will be X_iX_j, and the excess risk will be $\frac{Xij}{XiXj}$, with Xij being the observed frequency of the coinfection [21].

Statistical analyses were performed using the R-UCA package for Windows (version R-UCA-3.3.1.exe).

Results

Characteristics of the study population

A total of 200 participants were included, of whom 54% (108/200) were female. In 199 cases, age could be recorded, with a median of 7 years (IQR 1.4–26.5), of which 43.7% (87/199) were PSAC, 19.6% (39/199) SAC, 29.7% (59/199) adults, and 7.0% (14/199) elderly.

Malaria diagnosis and intensity of infection

Of all the febrile subjects, 58% (116/200) were diagnosed with malaria by at least one of the three techniques. Field diagnosis methods (microscopy and RDT) confirmed malaria in 51.5% (103/200) of cases. Regarding the technique used, 49% (98/200) of samples were positive by RDT, 39.5% (79/200) by real-time PCR, and 33.5% (67/200) by microscopy. Of the 98 RDT-positive cases, *Pf*HRP2 was detected in all of them, in 33.67% (33/98) of cases both *Pf*HRP2 and pLDH were detected, and no case was only positive for pLDH.

From the 67 microscopy-positive samples, the mean parasite density was 3120 parasites/µL (IQR 687–16,287): 47.8% (32/67) were classified as high, 22.4% (15/67) as moderate, and 29.9% (20/67) as low intensity.

The intensity of infection was estimated by real-time PCR, and the mean Ct value was 30.3 (SD 5.6). In cases

positive by both microscopy and real-time PCR techniques, a correlation was observed between parasite density and Ct values ($r = -0.5$; P-value < 0.001).

When comparing microscopy and real-time PCR results, the high-intensity group continued to be the most represented (53.57%; 30/56). The median number of parasites in each group increased significantly (P-value < 0.05). As expected, lower Ct values were obtained in the high-intensity infection group. The median Ct of the high- and low-intensity groups presented statistically significant differences (P-value < 0.05) (Table 1).

Table 1 Intensity of *Plasmodium* spp. infection determined by microscopy and relationship with real-time PCR ($n = 56$)

Infection intensity	Infections	Microscopy	Real-time PCR
	N (%)	Parasite density (parasite/µL)[a]	Ct[b]
Low	12 (21.4)	314.0 (185.0–476.0) a[c]	32.9 (4.9) a[c]
Medium	14 (25.0)	1920.0 (1255.3–2523.8) b[c]	29.5 (4.5) ab[c]
High	30 (53.6)	18,121.5 (9779.3–81,959.5) c[c]	26.4 (5.28) b[c]

[a] The results are expressed as the median and its interquartile range

[b] The results are expressed as the mean and its standard deviation

[c] Letters indicate statistically significant differences between groups of different infection intensities for each of the diagnostic techniques (P-value < 0.05)

RDT, real-time PCR, and microscopy results by age and gender

The median age of participants diagnosed with malaria by at least one of the techniques employed was 4 years (IQR 1.3–15.5). The technique with the lowest median age for positive cases was RDT (median = 3; IQR 1.2–10.0). The results of the three techniques employed were significantly related to age (P-value < 0.05) (Table 2). The group with the highest proportion of positive results by real-time PCR was SAC (48.7%, 19/39), however, no statistically significant association was found between the different age groups established (P-value > 0.05) (Table 2).

Women presented a higher proportion of positive cases detected by all techniques, however, no significant association was found with the gender of the participants (P-value > 0.05) (Table 2).

Performance of diagnostic methods

When microscopy is considered the reference technique, the sensitivity of real-time PCR was 83.6% with a specificity of 82.7%. Both techniques showed a substantial level of agreement ($\kappa = 0.64$) (Table 3). When using the field diagnosis as the reference (microscopy and/or RDT), real-time PCR had a sensitivity of 64.1% with a specificity of 86.6%, showing moderate agreement ($\kappa = 0.5$) between both methods (Table 4). In contrast, using a positive result of at least one of malaria diagnosis techniques (RDT, real-time PCR, and/or microscopy) as the reference, the sensitivity of RDT was 84.5%, that of real-time PCR 68.1%, and that of microscopy 57.8% (Table 5).

Table 2 Demographic data of the participant's positive for the different diagnostic methods used

Demographic data		RDT		Real-time PCR		Microscopy		RDT ± real-time PCR ± microscopy[a]	
		N (%)	P-value (r)[c]	*N* (%)	P-value (r)[c]	*N* (%)	P-value (r)[c]	*N* (%)	P-value (r)[c]
Age	Age (years)[b]	3 (1.2–10.0)	< 0.001* (−0.37)	5 (1.7–17)	< 0.05* (−0.15)	5 (1.5–14.8)	< 0.05* (−0.16)	4 (1.3–15.5)	< 0.001* (−0.27)
	0–4.9 years (87/199; 43.7%)	54 (62.1)	< 0.001*	37 (42.5)	> 0.05	32 (36.8)	> 0.05	58 (66.7)	< 0.01*
	5–14.9 years (39/199; 19.6%)	25 (64.1)		19 (48.7)		17 (43.6)		27 (69.2)	
	15–49.9 years (59/199; 29.7%)	15 (25.4)		18 (30.5)		14 (23.7)		25 (42.4)	
	> 50 years (14/199; 7.0%)	3 (21.4)		5 (35.7)		3 (21.4)		5 (35.7)	
Gender	Female (108/200; 54%)	55 (50.9)	> 0.05	47 (43.5)	> 0.05	41 (38.0)	> 0.05	66 (61.1)	> 0.05
	Male (92/200; 46%)	43 (46.7)		32 (34.8)		26 (28.3)		50 (54.3)	

[a] Patients with a positive result in at least one of the three techniques (RDT, real-time PCR, and/or microscopy)

[b] The results are expressed as the median and its interquartile range

[c] The r-value is the Pearson correlation coefficient of age with respect to malaria diagnosis by the different techniques.

*Statistically significant

Table 3 Performance of real-time PCR using microscopy as the reference ($n = 200$)

		Microscopy *N*		Sensibility (95% CI)[a]	Specificity (95% CI)[a]	PPV[a] (95% CI)[a]	NPV[a] (95% CI)[a]	Kappa (95% CI)[a]	Youden's index
		+	−						
Real-time PCR	+	56	23	83.6 (72.1–91.1)	82.7 (75.0–88.5)	70.9 (59.4–80.3)	90.9 (84.0–95.2)	0.64 (0.52–0.75)	0.66
	−	11	110						

[a] CI, confidence interval; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value

Table 4 Performance of real-time PCR using field diagnosis (microscopy and RDT) as the reference ($n = 200$)

		Microscopy ± RDT[a] *N*		Sensibility (95% CI)[b]	Specificity (95% CI)[b]	PPV[b] (95% CI)[b]	NPV[b] (95% CI)[b]	κ (95% CI)[b]	Youden's index
		+	−						
Real-time PCR	+	66	13	64.1 (54.0–73.1)	86.6 (77.8–92.4)	83.5 (73.1–90.6)	69.4 (60.3–77.3)	0.50 (0.38–0.62)	0.50
	−	37	84						

[a] Patients with a positive result in at least one of the two techniques used in the field (microscopy and/or RDT)

[b] CI, confidence interval; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value

Table 5 Performance and comparative results of malaria diagnostic techniques using all malaria diagnosis techniques as the reference ($n = 200$)

		RDT ± real-time PCR ± microscopy[a] *N*		Sensibility (95% CI)[b]	Specificity (95% CI)[b]	PPV[b] (95% CI)[b]	NPV[b] (95% CI)[b]	Youden's Index
		+	−					
RDT	+	98	0	84.5 (76.8–90)	100 (95.6–100)	100 (96.2–100)	84.2 (73.8–88.5)	0.85
	−	18	84					
Real-time PCR	+	79	0	68.1 (59.2–75.9)	100 (95.6–100)	100 (95.4–100)	69.4 (60.7–76.9)	0.68
	−	37	84					
Microscopy	+	67	0	57.8 (48.7–66.4)	100 (95.6–100)	100 (94.6–100)	63.2 (54.7–70.9)	0.58
	−	48	84					

[a] Patients with a positive result in at least one of the three techniques (RDT, real-time PCR, and/or microscopy)

[b] CI, confidence interval; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value

The similarities and discrepancies between the diagnostic techniques are shown in Fig. 2. A total of 55 samples were positive and 84 negative by the three diagnostic techniques (real-time PCR, RDT, and microscopy). The highest similarity of positive cases was observed between real-time PCR and RDT (10 samples), while the negative cases for infection showed higher similarities in the diagnosis by real-time PCR and microscopy (26 samples). Despite the discordances, malaria diagnosis by each of the techniques was shown to be significantly dependent (P-value < 0.001).

Molecular identification of *Plasmodium* species

Species identification was not successful in 19% (15/79) of the confirmed cases due to low sample parasitaemia (first real-time PCR Ct values > 34.5). The species could be identified in 64 samples, with *P. falciparum* being the most prevalent (90.6%; 58/64), followed by *P. malariae* (17.2%; 11/64) and *P. ovale* (9.4%; 6/64). Single infection was determined in 84.4% (54/64) of cases, while coinfections with two or more *Plasmodium* species were found in 15.6% (10/64) (Fig. 3a).

Of all monoinfections, those caused by *P. falciparum* were by far the most prevalent (88.9%; 48/54), followed by *P. malariae* (7.4%; 4/54) and *P. ovale* (3.7%; 2/54). In these cases, 83.3% (45/54) were RDT-positive (42 *P. falciparum*, 2 *P. malariae*, and 1 *P. ovale*). *Pf*HRP2 was detected in all positive RDTs; in contrast, the pLDH band was only visualized in 57.14% (24/42) of *P. falciparum* infections and one case of *P. ovale* but not in *P. malariae*. Of patients with *P. falciparum* monoinfections, 45.8% (22/48) were PSAC, 25% (12/48) SAC, 22.9% (11/48), and

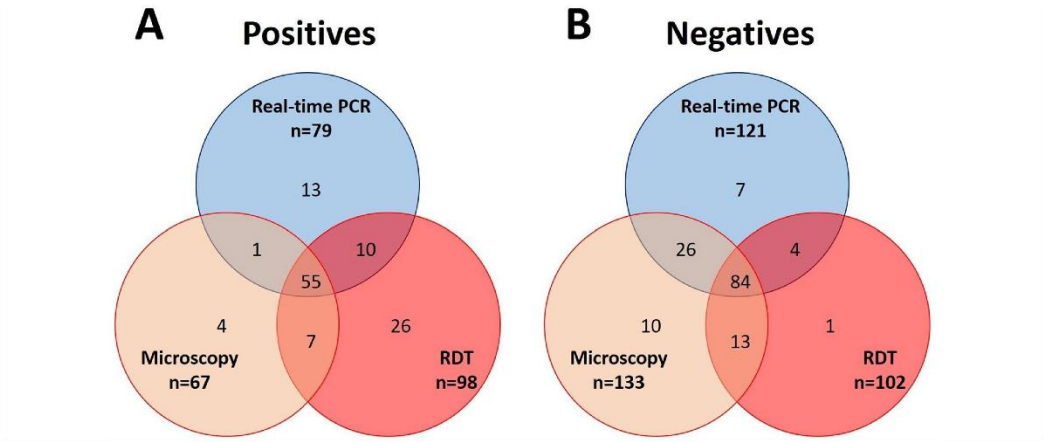


Fig. 2 Venn diagrams for comparison between diagnostic techniques (real-time PCR, microscopy, and RDT). **A** Distribution of positive samples for *Plasmodium* spp. infection for each technique. **B** Distribution of negative samples for *Plasmodium* spp. infection for each technique

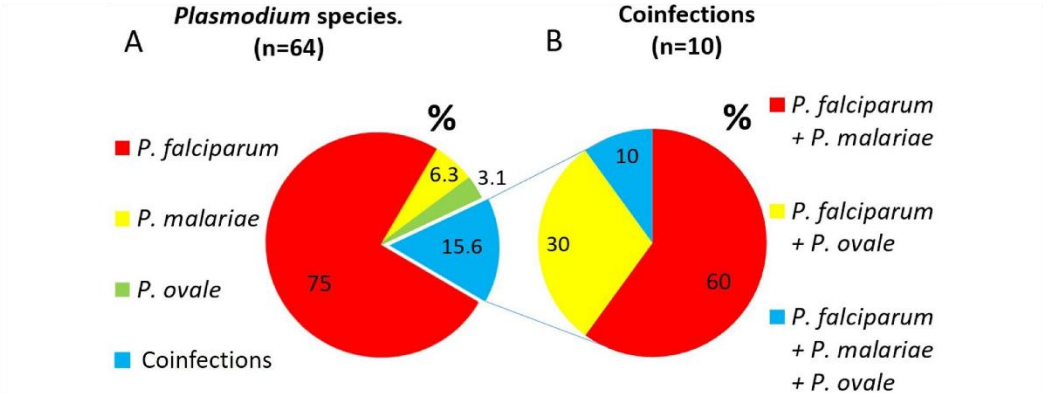


Fig. 3 Molecular identification of *Plasmodium* species in patients diagnosed with malaria by real-time PCR. **A** The results of real-time PCR specific to each *Plasmodium* species are shown graphically. Coinfections refer to infection by more than one *Plasmodium* species. Results are expressed as the percentage of infections in which the species could be determined ($n=64$). **B** Coinfections of different *Plasmodium* species are plotted. Results are expressed as a percentage of coinfections ($n=10$)

6.3% (3/48) elderly; of those monoinfected with *P. malariae*, 50% (2/4) were PSAC, 25% (1/4) SAC, and 25% (1/4) elderly, while those monoinfected with *P. ovale* were all SAC.

Regarding the ten coinfections, *P. falciparum* was present in all cases, with *P. falciparum*+*P. malariae* being the most common combination (60%; 6/10), followed by *P. falciparum*+*P. ovale* (30%; 3/10). One case of triple coinfection with *P. falciparum*+*P. malariae*+*P. ovale* was found (10%; 1/10) (Fig. 3b). All cases of coinfection were RDT-positive. *Pf*HRP2 bands were visualized in all these cases, whereas pLDH was visualized in 66.7% (4/6) of *P. falciparum*+*P. malariae* coinfections and 33.3% (1/3) of *P. falciparum*+*P. ovale*, but not in the case of triple coinfection. Patients with coinfections were 6/10 (60%) PSAC, 3/10 (30%) SAC, and only 1/10 (10%) was an adult, aged 17 years.

The expected and observed frequencies of the different coinfections were as follows: 4.7% and 9.4% of *P. falciparum*+*P. malariae*, 2.3% and 4.7% of *P. falciparum*+*P. ovale*, and 0.2% and 1.6% of triple coinfection, respectively (Fig. 4a). The excess risk was estimated

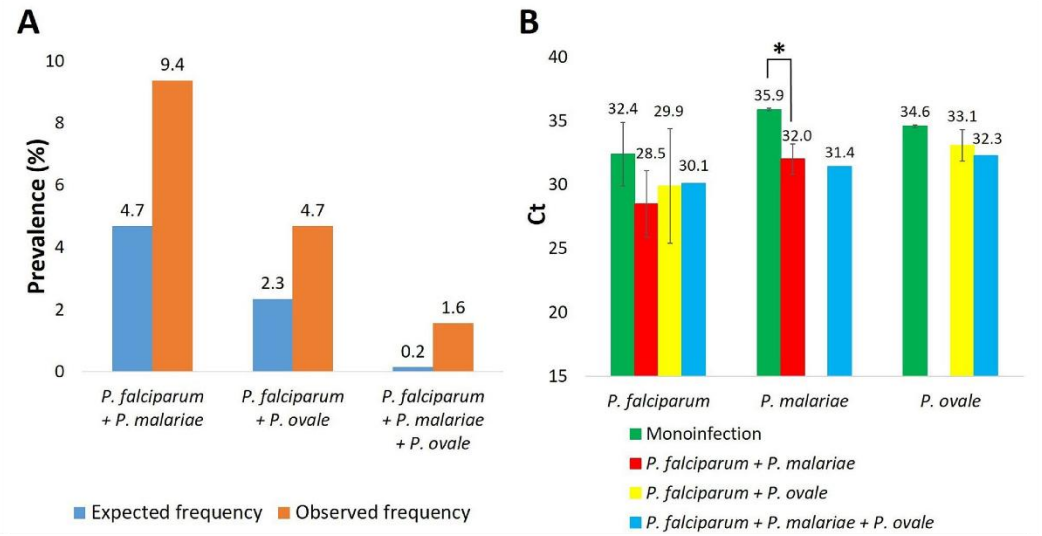


Fig. 4 Prevalence of *Plasmodium* coinfections and effect of coinfection on parasite load estimated by real-time PCR. **A** Expected and actual prevalence of different coinfections with the three *Plasmodium* species detected by real-time PCR. **B** Relative quantification by real-time PCR of the density of each *Plasmodium* species according to the type of infection (mono or coinfection). Results are expressed as mean Ct and SD (error bars). The asterisk indicates significant differences (*P*-value < 0.05) between the mean Ct of *P. malariae* infections in the case of monoinfections and coinfection with *P. falciparum*

for the coinfections: triple infection (10.7), *P. falciparum* + *P. malariae* (2.0), and *P. falciparum* + *P. ovale* (2.0).

The results of the possible effect of coinfections on parasite density estimated by real-time PCR are shown in Fig. 4b. The mean Ct value for *P. falciparum* was lower when coinfected with *P. malariae* (Ct = 28.5) compared with single infection (Ct = 32.4) (*P*-value > 0.05). The same was observed for *P. malariae* coinfected with *P. falciparum* (Ct = 32.0) compared with monoinfection (Ct = 35.9) (*P*-value < 0.05).

Discussion

The aim of this study was to evaluate the usefulness of real-time PCR for the diagnosis of malaria in a group of febrile patients from a rural setting in Angola. The prevalence of malaria in patients with febrile syndrome in Cubal was 58%. In a study conducted in Bengo (a province in northwestern Angola), the prevalence observed was 15.9%, determined by microscopy and PCR [28]. These differences were attributed to the fact that in the Bengo study, participants were selected regardless of their symptomatology. Other studies conducted in localities of Central African countries such as Gabon and the Republic of the Congo, where the transmission rate is higher and more uniform than in Angola, showed a malaria prevalence of 69.6% in febrile children by PCR and 32.5% in febrile patients of all ages by RDT, respectively [29, 30].

RDTs and microscopy are the most widely used diagnostic methods for malaria control [31]. Microscopy remains the gold standard for the diagnosis of malaria infection; however, more sensitive methods capable of providing early and accurate diagnosis are needed [32]. In this study, taking the results of three techniques used as the reference, real-time PCR had a higher sensitivity (68.1%) than microscopy (57.8%) but RDT had a higher sensitivity (84.5%) and negative predictive value than real-time PCR. However, using microscopy as the reference method, real-time PCR showed a higher specificity and positive predictive value than RDT according to the results published by Febrer-Sendra et al. for RDT [23].

Our results agree with other published works in which real-time PCR and RDT had higher sensitivities than microscopy, taking the results of the three techniques as the reference [33–36]. In contrast, most of them obtained a higher sensitivity for real-time PCR than RDT [34, 36]. However, other studies obtained similar sensitivities [35], and others agreed with our results [33]. In our case, this low sensitivity of real-time PCR could be due to inadequate storage and transport of DNA eluates, which could have caused sample degradation. In addition, the use of venous blood for DNA extraction may have reduced the

sensitivity of real-time PCR instead of using capillary blood [37].

Classic microscopy is considered the gold standard method for malaria diagnosis, and RDT and real-time PCR are more sensitive alternatives for estimating the prevalence in patients with febrile symptoms in endemic areas [35]; however, PCR has not yet been adequately implemented in the field. In this sense, LAMP is a good alternative in rural areas with limited resources. In the study by Febrer-Sendra et al. conducted in Cubal in 2022, a colorimetric and real-time LAMP was used for malaria diagnosis, obtaining a higher performance than that obtained in this study using real-time PCR [23]. These results suggest the importance of implementing a diagnostic method with better performance than microscopy. Therefore, and despite the effort made in this study, the strategy of performing DNA extraction *in situ* is not recommended unless optimal storage conditions can be guaranteed for a truly effective molecular analysis.

Regarding the discordances obtained between the three diagnostic methods, samples that were positive by microscopy or RDT and negative by real-time PCR could be explained by the different method of blood collection and the possible degradation of the DNA during transport to Barcelona. On the contrary, those that were positive by real-time PCR and negative by microscopy or RDT could be due to the parasite load being submicroscopic or below the RDT detection limit. Nonetheless, there is a possibility that these latter mismatches between real-time PCR and RDT could be due to a deletion of the *pfhrp2* gene (which encodes for the target protein of the antigenic test), as has been reported in other countries in West sub-Saharan Africa [38, 39].

Furthermore, quantification of parasite density by microscopy provides information about the intensity of the infection as well as monitoring the response to treatment [40]. In addition, real-time PCR allows for an indirect estimation of the parasite load through Ct values [41]. It was expected that most febrile patients show a high intensity of infection, as published by Mangal et al. [42]. In our case, we observed that as parasite densities determined by microscopy increased, the Ct of real-time PCR decreased. Thus, this Ct value could be an indirect measure of parasite load and would allow the determination of the intensity of infection, at least in the high- and low-intensity groups.

Gender was not related to real-time PCR diagnosis, however, female patients and children presented a higher proportion of positive cases, as described in another study carried out in Ethiopia [43]. These results highlight the great importance of focusing on the younger age groups, as children under 5 years of age are those most affected by malaria worldwide and have the highest mortality. In our case, the technique with the greatest capacity to identify infections at an earlier age was RDT, with a higher correlation than real-time PCR or microscopy. Again, RDT yielded better results than real-time PCR. Moreover, its rapidity in producing a result makes it a highly effective technique for the diagnosis of malaria in children. Nevertheless, once again we emphasize the importance of sample preservation during transport, which could have altered the results of real-time PCR.

Single-step real-time multiplex PCR has advantages over end-time PCR, such as greater sensitivity, speed, and lower risk of cross-contamination, in addition to allowing for the identification of *Plasmodium* species in fewer reactions [44]. In our study, the most prevalent *Plasmodium* species was *P. falciparum*, followed by *P. malariae* and *P. ovale*. The same results were previously described by Fançony et al. in Northern Angola in 2012 [3].

It is important to highlight that coinfections with different *Plasmodium* species are frequently overlooked by microscopic examination [12]. In this study, a higher number of mixed infections (15.6%) was found compared with those reported by other studies conducted in Angola (7.6%) or Zambia (10.3%) [3, 45]. Regarding causative species, the most prevalent coinfection was caused by *P. falciparum* and *P. malariae,* in concordance with published data from Angola and Zambia [3, 45].

Since *P. falciparum* is the most prevalent species in Cubal, and it was expected to be present in all cases of coinfection. On the basis of our results, we found that the prevalence of coinfections was higher than expected if each species was randomly distributed in the host population. Therefore, we believe that there must be one or more factors that could explain this fact, such as different host susceptibility to infection and/or heterogeneity of individual exposure to mosquito bites [21]. It should be noted that most coinfected patients were children, and only one corresponded to an adult (17 years old).

From the real-time PCR Ct values, we were able to estimate the effect of coinfections on the parasite density of each *Plasmodium* species. Interestingly, when *P. malariae* coinfected with *P. falciparum*, the Ct values of *P. malariae* were lower than in individual infection, which implies that its parasite density is higher when coinfected with *P. falciparum*. Our results are in perfect agreement with those of another study in Papua New Guinea, in which they observed this benefit of *P. malariae* when coinfected with other species [21]. An increase in the parasite density of *P. falciparum* and *P. ovale* was also observed in coinfections; however, the low number of samples could explain why a statistical relationship in these cases was not observed.

A striking fact of this study is that three patients infected only with non-*P. falciparum* species (two

P. malariae and one *P. ovale*) were positive for the detection of *Pf*HRP2 by RDT. As this protein is specific to *P. falciparum*, these results would support the idea that the DNA could be degraded during sample transport, with the consequent non-detection of *P. falciparum*.

Limitations of this study

Several limitations were identified in this study that could affect the interpretation of the results. Microscopy was performed by a single microscopist rather than by two independent technicians, which limits the robustness of the results. It is also important to note that the blood sample used for microscopy and RDT diagnosis (capillary blood) was not the same as that used for real-time PCR (whole blood), which could introduce variability in the results. During the transport of the eluted DNA to the HUVH in Barcelona, the cold chain could not be maintained at all times, which could have affected the quality of the DNA analyzed. Finally, the positive controls used in the PCRs did not correspond to strains commonly used in this type of study, such as 3D7 or NF54, but were based on DNA from the blood of patients previously diagnosed with malaria by microscopy and real-time PCR, which could limit the comparability of the results.

Conclusions

Despite logistical constraints regarding the preservation of DNA eluates during transport, our study demonstrated that real-time PCR is more effective than microscopy for detecting malaria in febrile patients in Cubal (Angola). It is imperative that the method of sampling and preservation during transport be rigorously adhered to so that an accurate result of molecular techniques can be ensured. Furthermore, real-time PCR can provide an estimate of the intensity of infection and allows for the identification of *Plasmodium* species for surveillance purposes.

Abbreviations

CI	Confidence interval
Ct	Threshold cycle
HNSP	Hospital Nossa Senhora da Paz
HUVH	Hospital Universitario Vall d'Hebron
IQR	Interquartile range
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification
PCR	Polymerase chain reaction
*Pf*HRP2	Histidine-rich protein 2 of *P. falciparum*
pLDH	Panmalaric lactate dehydrogenase
PSAC	Preschool-aged children
RDT	Rapid diagnostic test
SAC	School-aged children
SD	Standard deviation
WHO	World Health Organization

Acknowledgement

We thank Helena Kruyer for reviewing and correcting the manuscript, ensuring that the language is comprehensible to all readers.

Author contributions

Conception and design of the study: A.M., B.F.S., B.C.V., P.F.S., A.M., M.L.A.R.A., F.S., I.M., P.B., I.O.S., and E.S. Recruitment of participants and acquisition of laboratory data at the HNSP in Cubal, Angola: B.F.S., B.C.V., A.N., J.M.C., and S.A. Acquisition of molecular data and laboratory work at the Hospital Universitario Vall d'Hebron in Barcelona, Spain: A.M., A.S., P.M.V., C.R.M., and L.G. Drafting the manuscript and analyzing and interpreting the data: A.M. Revising the article critically for important intellectual content: A.S., B.F.S., P.F.S., C.R.M., F.S., I.O.S., and E.S. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

Not applicable. The author(s) declare that no financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article.

Availability of data and materials

The data supporting the conclusions of this article are included in this manuscript.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The Ethics Committee of the Angolan Ministry of Health approved this study (39 C.E/MINSA.INIS/2022). All participants gave written informed consent (in the case of children, parental/guardian consent was obtained) after receiving an explanation of the objectives of the study. All procedures were performed in accordance with the ethical standards described in the Declaration of Helsinki of 2013.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Author details

[1]Microbiology Department, Vall d'Hebron University Hospital, Autonomous University of Barcelona, PROSICS Barcelona, Barcelona, Spain. [2]Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain. [3]Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. [4]Infectious and Tropical Diseases Research Group (e-INTRO), Biomedical Research Institute of Salamanca-Center for Research in Tropical Diseases of the University of Salamanca (IBSAL-CIETUS), Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, Salamanca, Spain. [5]Hospital Nossa Senhora da Paz, Cubal, Angola. [6]International Health Unit Vall d'Hebron-Drassanes, Infectious Diseases Department, Vall d'Hebron University Hospital, PROSICS Barcelona, Barcelona, Spain. [7]Malaria and Neglected Tropical Diseases Laboratory, National Centre for Tropical Medicine, Carlos III Health Institute, CIBER de Enfermedades Infecciosas, Madrid, Spain.

Received: 8 March 2024 Accepted: 24 August 2024
Published online: 11 September 2024

References

1. World Health Organization (WHO). World malaria report 2023. 2023. https://cdn.who.int/media/docs/default-source/malaria/world-malaria-reports/world-malaria-report-2023-spreadview.pdf?sfvrsn=bb24c9f0_4. Accessed 1 Mar 2024.
2. Poespoprodjo JR, Douglas NM, Ansong D, Kho S, Anstey NM. Malaria. Lancet. 2023;402:2328–45.
3. Fançony C, Gamboa D, Sebastião Y, Hallett R, Sutherland C, Sousa-Figueiredo JC, et al. Various *pfcrt* and *pfmdr1* genotypes of *Plasmodium falciparum* cocirculate with *P. malariae*, *P. ovale* spp., and *P. vivax* in Northern Angola. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56:5271–7.
4. Cosep Consultoria, Consaúde, and ICF International. Angola Malaria Indicator Survey 2011. Calverton, Maryland: Cosep Consultoria, Consaúde, and ICF International. 2011. https://dhsprogram.com/pubs/pdf/MIS11/MIS11.pdf. Accessed 1 Mar 2024.

5. Tavares W, Morais J, Martins JF, Scalsky RJ, Stabler TC, Medeiros MM, et al. Malaria in Angola: recent progress, challenges and future opportunities using parasite demography studies. Malar J. 2022;21:396.
6. Salvador F, Cossio Y, Riera M, Sánchez-Montalvá A, Bocanegra C, Mendioroz J, et al. Changes in malaria epidemiology in a rural area of Cubal. Angola Malar J. 2015;14:21.
7. Oyegoke OO, Maharaj L, Akoniyon OP, Kwoji I, Roux AT, Adewumi TS, et al. Malaria diagnostic methods with the elimination goal in view. Parasitol Res. 2022;121:1867–85.
8. Wongsrichanalai C, Barcus MJ, Muth S, Sutamihardja A, Wernsdorfer WH. A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). Am J Trop Med Hyg. 2007;77:119–27.
9. Milner DA Jr. Malaria pathogenesis. Cold Spring Harb Perspect Med. 2018;8:a025569.
10. World Health Organization (WHO). Global technical strategy for malaria 2016–2030, 2021 update. 2021. https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/342995/9789240031357-eng.pdf?sequence=1.World. Accessed 1 Mar 2024.
11. Lin K, Li M, Wang D, Luo F, Lu S, Michael MG, et al. Evaluation of malaria standard microscopy and rapid diagnostic tests for screening—Southern Tanzania, 2018–2019. China CDC Wkly. 2022;4:605–8.
12. Mbakilwa H, Manga C, Kibona S, Mtei F, Meta J, Shoo A, et al. Quality of malaria microscopy in 12 district hospital laboratories in Tanzania. Pathog Glob Health. 2012;106:330–4.
13. Maltha J, Gillet P, Jacobs J. Malaria rapid diagnostic tests in travel medicine. Clin Microbiol Infect. 2013;19:408–15.
14. Gamboa D, Ho MF, Bendezu J, Torres K, Chiodini PL, Barnwell JW, et al. A large proportion of *P. falciparum* isolates in the Amazon region of Peru lack *pfhrp2* and *pfhrp3*: Implications for malaria rapid diagnostic tests. PLoS One. 2010;5:e8091.
15. Molina-de la Fuente I, Yimar M, García L, González V, Amor A, Anegagrie M, et al. Deletion patterns, genetic variability and protein structure of *pfhrp2* and *pfhrp3*: implications for malaria rapid diagnostic test in Amhara region, Ethiopia. Malar J. 2022;21:287.
16. Mwenda MC, Fola AA, Ciubotariu II, Mulube C, Mambwe B, Kasaro R, et al. Performance evaluation of RDT, light microscopy, and PET-PCR for detecting *Plasmodium falciparum* malaria infections in the 2018 Zambia National Malaria Indicator Survey. Malar J. 2021;20:386.
17. Ramírez AM, Tang THT, Suárez ML, Fernández AÁ, García CM, Hisam S, et al. Assessment of commercial real-time PCR assays for detection of malaria infection in a non-endemic setting. Am J Trop Med Hyg. 2021;105:1732–7.
18. Hawkes M, Kain KC. Advances in malaria diagnosis. Expert Rev Anti Infect Ther. 2007;5:485–95.
19. Kamau E, Alemayehu S, Feghali KC, Saunders D, Ockenhouse CF. Multiplex qPCR for detection and absolute quantification of malaria. PLoS ONE. 2013;8:e71539.
20. Kamaliddin C, Joste V, Hubert V, Kendjo E, Argy N, Houze S. Evaluation of PCR to monitor *Plasmodium falciparum* treatment efficacy in a nonendemicity setting. J Clin Microbiol. 2019;58:e01080-e1119.
21. Holzschuh A, Gruenberg M, Hofmann NE, Wampfler R, Kiniboro B, Robinson LJ, et al. Co-infection of the four major *Plasmodium* species: effects on densities and gametocyte carriage. PLoS Negl Trop Dis. 2022;16:e0010760.
22. Hänscheid T, Grobusch MP. How useful is PCR in the diagnosis of malaria? Trends Parasitol. 2002;18:395–8.
23. Febrer-Sendra B, Crego-Vicente B, Nindia A, Martínez-Campreciós J, Aixut S, Mediavilla A, et al. First field and laboratory evaluation of LAMP assay for malaria diagnosis in Cubal, Angola. Parasit Vectors. 2023;16:343.
24. Daniel WW, Cross CL. Biostatistics: a foundation for analysis in the health sciences. 10th ed. Wiley; 1984.
25. Alger J. Densidad Parasitaria en Malaria: Métodos de determinación y su interpretación. Rev Méd Hondur. 2001;69:118–20.
26. Fox E, Strickland GT. The interrelationship of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* in the Punjab. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1989;83:471–73.
27. Vafa Homann M, Emami SN, Yman V, Stenström C, Sondén K, Ramström H, et al. Detection of malaria parasites after treatment in travelers: a 12-months longitudinal study and statistical modelling analysis. EBioMedicine. 2017;25:66–72.
28. Fançony C, Sebastião YV, Pires JE, Gamboa D, Nery SV. Performance of microscopy and RDTs in the context of a malaria prevalence survey in Angola: a comparison using PCR as the gold standard. Malar J. 2013;12:284.
29. Boumbanda Koyo CS, Oyegue-Liabagui SL, Mediannikov O, Cortaredona S, Kouna LC, Raoult D, et al. High circulation of malaria and low prevalence of bacteremia in febrile and afebrile children in northeastern Gabon. Am J Trop Med Hyg. 2020;102:121–9.
30. Pembet Singana B, Casimiro PN, Matondo Diassivi B, Kobawila SC, Youndouka JM, Basco LK, et al. Prevalence of malaria among febrile patients and assessment of efficacy of artemether-lumefantrine and artesunate-amodiaquine for uncomplicated malaria in Dolisie, Republic of the Congo. Malar J. 2022;21:137.
31. Belachew M, Wolde M, Nega D, Gidey B, Negash L, Assefa A, et al. Evaluating performance of multiplex real time PCR for the diagnosis of malaria at elimination targeted low transmission settings of Ethiopia. Malar J. 2022;21:9.
32. Zimmerman PA, Howes RE. Malaria diagnosis for malaria elimination. Curr Opin Infect Dis. 2015;28:446–54.
33. Saha S, Narang R, Deshmukh P, Pote K, Anvikar A, Narang P. Diagnostic efficacy of microscopy, rapid diagnostic test and polymerase chain reaction for malaria using Bayesian latent class analysis. Indian J Med Microbiol. 2017;35:376–80.
34. Doctor SM, Liu Y, Whitesell A, Thwai KL, Taylor SM, Janko M, et al. Malaria surveillance in the Democratic Republic of the Congo: comparison of microscopy, PCR, and rapid diagnostic test. Diagn Microbiol Infect Dis. 2016;85:16–8.
35. Badiane A, Thwing J, Williamson J, Rogier E, Diallo MA, Ndiaye D. Sensitivity and specificity for malaria classification of febrile persons by rapid diagnostic test, microscopy, parasite DNA, histidine-rich protein 2, and IgG: Dakar, Senegal 2015. Int J Infect Dis. 2022;121:92–7.
36. Schachterle SE, Mtove G, Levens JP, Clemens EG, Shi L, Raj A, et al. Prevalence and density-related concordance of three diagnostic tests for malaria in a region of Tanzania with hypoendemic malaria. J Clin Microbiol. 2011;49:3885–91.
37. Mischlinger J, Pitzinger P, Veletzky L, Groger M, Zoleko-Manego R, Adegnika AA, et al. Use of capillary blood samples leads to higher parasitemia estimates and higher diagnostic sensitivity of microscopic and molecular diagnostics of malaria than venous blood samples. J Infect Dis. 2018;218:1296–305.
38. Krueger T, Ikegbunam M, Lissom A, Sandri TL, Ntabi JDM, Djontu JC, et al. Low Prevalence of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 and 3 gene deletions—a multiregional study in Central and West Africa. Pathogens. 2023;12:455.
39. McCaffery JN, Nace D, Herman C, Singh B, Sompwe EM, Nkoli PM, et al. *Plasmodium falciparum pfhrp2* and *pfhrp3* gene deletions among patients in the DRC enrolled from 2017 to 2018. Sci Rep. 2021;11:22979.
40. World Health Organization (WHO). Malaria parasite counting. 2016. https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/340469/WHO-HTM-GMP-MM-SOP-2016.09-eng.pdf?sequence=1. Accessed 1 Mar 2024.
41. van Bergen K, Stuitje T, Akkers R, Vermeer E, Castel R, Mank T. Evaluation of a novel real-time PCR assay for the detection, identification and quantification of *Plasmodium* species causing malaria in humans. Malar J. 2021;20:314.
42. Mangal P, Mittal S, Kachhawa K, Agrawal D, Rath B, Kumar S. Analysis of the clinical profile in patients with *Plasmodium falciparum* malaria and its association with parasite density. J Glob Infect Dis. 2017;9:60–5.
43. Santana-Morales MA, Afonso-Lehmann RN, Quispe MA, Reyes F, Berzosa P, Benito A, et al. Microscopy and molecular biology for the diagnosis and evaluation of malaria in a hospital in a rural area of Ethiopia. Malar J. 2012;11:199.
44. Reller ME, Chen WH, Dalton J, Lichay MA, Dumler JS. Multiplex 5′ nuclease quantitative real-time PCR for clinical diagnosis of malaria and species-level identification and epidemiologic evaluation of malaria-causing parasites, including *Plasmodium knowlesi*. J Clin Microbiol. 2013;51:2931–8.
45. Sitali L, Chipeta J, Miller JM, Moonga HB, Kumar N, Moss WJ, et al. Patterns of mixed *Plasmodium* species infections among children six years and under in selected malaria hyper-endemic communities of Zambia: population-based survey observations. BMC Infect Dis. 2015;15:204.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Artículo 2. Evaluación del uso de DBS para el diagnóstico de la malaria mediante PCR en tiempo real en un entorno rural de Angola

Título original: Evaluation of dried blood spot sampling for real-time PCR malaria diagnostics in a rural setting in Angola.

Autores: Mediavilla A, Febrer-Sendra B, Silgado A, Martínez-Vallejo P, Crego-Vicente B, Nindi, A, Maturana CR, Goterris L, Martínez-Campreciós J, Aixut S, Fernández-Soto P, Aznar ML, Muro A, Oliveira-Souto I, Molina I, Sulleiro E.

Revista: Parasites & Vectors (Factor de impacto: 3,5; Q1 en parasitología y enfermedades infecciosas).

Fecha de publicación: 7 de febrero de 2025.

DOI: 10.1186/s13071-025-06685-3

Resumen

Antecedentes

La malaria es la enfermedad parasitaria con mayor morbimortalidad a nivel mundial. Angola es uno de los cinco países de África subsahariana con mayor carga de malaria (datos 2022). El diagnóstico mediante PCR en tiempo real en áreas endémicas no se ha implementado debido a su alto coste y a la necesidad de infraestructuras adecuadas. Las DBS constituyen una alternativa para la recogida, conservación y transporte de muestras sanguíneas a laboratorios de referencia. El objetivo del estudio fue evaluar la eficacia de las DBS como método de muestreo en estudios de investigación sobre malaria que emplean PCR en tiempo real.

Métodos

El estudio se dividió en dos fases: (i) estudio prospectivo en el HUVH para comparar la PCR en tiempo real a partir de sangre total o DBS, incluyendo 12 muestras de sangre venosa de pacientes con PCR en tiempo real positiva para *Plasmodium* spp. y 10 muestras de control de calidad (nueve muestras infectadas y un control negativo). Las muestras se recogieron como DBS (10, 20, 50 µl/círculo). Las muestras de ambas fases del estudio se analizaron mediante PCR en tiempo real genérica (*Plasmodium* spp.) y, posteriormente, las muestras positivas se sometieron a PCR en tiempo real específica de especie (especies de *Plasmodium*); y (ii) estudio transversal realizado en el HNSP, Cubal (Angola), que incluyó a 200 participantes con fiebre. De cada paciente se obtuvo una muestra de sangre capilar fresca (microscopía y PDR) y sangre venosa recogida como DBS (dos círculos de 10 µl combinados para un volumen total de 20 µl de DBS). Los DBS fueron enviados al HUVH, Barcelona, España.

Resultados

(i) La PCR en tiempo real a partir de sangre total fue positiva en el 100% de las 21 muestras infectadas por *Plasmodium* spp., mientras que la PCR en tiempo real a partir de DBS detectó la infección por *Plasmodium* spp. en proporciones menores: 76,2% (16/21) para 10 µl, 85,7% (18/21) para 20 µl, 88,2% (15/17) para 50 µl y 85,7% (18/21) para DBS de 100 µl. (ii) El diagnóstico en campo (microscopía y/o PDR) mostró una tasa de positividad del 51,5% (103/200), mientras que el 50% (100/200) de las muestras de DBS resultaron positivas mediante PCR en tiempo real. Utilizando el diagnóstico en campo como método de referencia, la sensibilidad de la PCR en tiempo real en muestras de DBS fue del 77,7% y la especificidad del 79,4%. Se identificaron especies de *Plasmodium* en

86 muestras mediante PCR en tiempo real: el 81,4% (16/86) fueron causadas por *P. falciparum*, el 11,6% (10/86) fueron infecciones mixtas de *P. falciparum* + *P. malariae*, el 4,7% (4/86) fueron *P. falciparum* + *P. ovale*, y el 2,3% (2/86) fueron infecciones mixtas triples.

Conclusiones

El volumen de DBS utilizado para la extracción de ADN es un factor determinante en el rendimiento de la PCR en tiempo real para la detección de ADN de *Plasmodium*. Un volumen de DBS de 50–100 µl parece ser óptimo para el diagnóstico de la malaria y la determinación de especies de *Plasmodium* mediante PCR en tiempo real. El DBS es un método adecuado para la recogida de muestras en Cubal, seguido de su análisis mediante PCR en tiempo real en un laboratorio de referencia.

Mediavilla *et al. Parasites & Vectors* (2025) 18:44
https://doi.org/10.1186/s13071-025-06685-3

Parasites & Vectors

RESEARCH

Open Access

Evaluation of dried blood spot sampling for real-time PCR malaria diagnostics in a rural setting in Angola

Alejandro Mediavilla[1,2], Begoña Febrer-Sendra[3], Aroa Silgado[1,4], Patricia Martínez-Vallejo[1,2], Beatriz Crego-Vicente[3], Arlette Nindia[5], Carles Rubio Maturana[1,2], Lidia Goterris[1], Joan Martínez-Campreciós[4,6], Sandra Aixut[6], Pedro Fernández-Soto[3], María Luisa Aznar[4,6], Antonio Muro[3], Inés Oliveira-Souto[4,6], Israel Molina[4,6] and Elena Sulleiro[1,4*]

Abstract

Background Malaria is the parasitic disease with the highest morbidity and mortality worldwide. Angola is one of the five sub-Saharan African countries with the highest malaria burden. Real-time PCR diagnosis in endemic areas has not been implemented due to its high cost and the need for adequate infrastructure. Dried blood spots (DBSs) are an alternative for collecting, preserving, and transporting blood samples to reference laboratories. The objective of the study was to assess the efficacy of DBS as a sampling method for malaria research studies employing real-time PCR.

Methods The study was divided into two phases: (i) prospective study at the Hospital Universitario Vall d'Hebron (HUVH) to compare real-time PCR from whole blood or DBS, including 12 venous blood samples from patients with positive real-time PCR for *Plasmodium* spp. and 10 quality control samples (nine infected samples and one negative control). Samples were collected as DBSs (10, 20, 50 µl/circle). Samples from both phases of the study were analyzed by generic real-time PCR (*Plasmodium* spp.) and the subsequent positive samples underwent species-specific real-time PCR (*Plasmodium* species) and (ii) cross-sectional study conducted at the Hospital Nossa Senhora da Paz, Cubal (Angola), including 200 participants with fever. For each patient, a fresh capillary blood specimen [for thin and thick blood films and rapid diagnostic test (RDT)] and venous blood, collected as DBSs (two 10-µl circles were combined for a total volume of 20 µl of DBS), were obtained. DBSs were sent to HUVH, Barcelona, Spain.

Results (i) Real-time PCR from whole blood collection was positive for 100% of the 21 *Plasmodium* spp.-infected samples, whereas real-time PCR from DBSs detected *Plasmodium* spp. infection at lower proportions: 76.19% (16/21) for 10 µl, 85.71% (18/21) for 20 µl, 88.24% (15/17) for 50 µl and 85.71% (18/21) for 100 µl DBSs. (ii) Field diagnosis (microscopy and/or RDT) showed a 51.5% (103/200) positivity rate, while 50% (100/200) of the DBS samples tested positive by real-time PCR. Using field diagnosis as the reference method, the sensitivity of real-time PCR in DBS samples was 77.67% with a specificity of 79.38%. *Plasmodium* species were identified in 86 samples by real-time PCR: 81.40% (16/86) were caused by *Plasmodium falciparum*, 11.63% (10/86) were coinfections of *P. falciparum* + *P. malariae*, 4.65% (4/86) were *P. falciparum* + *P. ovale*, and 2.33% (2/86) were triple coinfections.

*Correspondence:
Elena Sulleiro
elena.sulleiro@vallhebron.cat
Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s) 2025. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Conclusions The DBS volume used for DNA extraction is a determining factor in the performance of real-time PCR for *Plasmodium* DNA detection. A DBS volume of 50–100 µl appears to be optimal for malaria diagnosis and *Plasmodium* species determination by real-time PCR. DBS is a suitable method for sample collection in Cubal followed by real-time PCR analysis in a reference laboratory.

Keywords Malaria, Dried blood spots, Sampling, Real-time PCR, Diagnosis, Whole blood

Background

Malaria remains a global health concern, being especially devastating in resource-limited endemic settings located in tropical and subtropical regions [1]. The World Health Organization (WHO) reported approximately 249 million cases and 608,000 deaths from this parasitic disease in 2022 [2]. During this period, the African continent accounted for 93.6% of cases and 95.4% of deaths globally, with the sub-Saharan region being the most affected [2]. Angola is a malaria-endemic country in this region, harboring 3.4% of malaria cases and 3.2% of malaria deaths worldwide, making it the fifth most prevalent and seventh most deadly country in the world [2]. Cubal is a rural municipality in the province of Benguela (Angola) where malaria transmission has been described as stable mesoendemic [3]. In this type of setting, field surveys and research studies for active surveillance are considered useful tools for estimating the prevalence of malaria in the population, as they can identify transmission foci established by asymptomatic carriers and infections with low parasitemia [4–6].

The microscopic examination of blood smears has long been the technique of choice for determining the prevalence of malaria in epidemiological studies [7–9]. Currently, this technique also remains the gold standard for the diagnosis of this disease, allowing parasite density quantification and the identification of the *Plasmodium* species. However, sensitivity varies based on the observer's experience, and its detection limit is around 50-100 parasites/µl [10]. Moreover, often it cannot detect infections with low parasite densities [11] or differentiate mixed infections caused by two or more *Plasmodium* species [12]. Recently, rapid diagnostic tests (RDTs) have been implemented for field surveys. These tests are a simple rapid method that detects specific antigens of *Plasmodium* spp. and/or *Plasmodium falciparum*, such as panmalaric [lactate dehydrogenase (pLDH), and aldolase] or histidine-rich protein 2 (*Pf*HRP2), respectively. However, RDTs cannot quantify the parasite load or accurately identify non-*P. falciparum* species. Additionally, deletions in the *pfhrp2* gene have been reported in *P. falciparum* populations in various geographical areas, which can lead to a false negative result [13–16]. Some studies have reported that a significant number of *Plasmodium* spp. infections are missed by RDTs because their parasite density is below the detection limit of the test [17].

Nowadays, the emergence of molecular techniques, such as real-time polymerase chain reaction (PCR), has opened a new path in malaria diagnosis due to its numerous advantages. The high sensitivity, low detection limit (< 1 parasite/µl), possibility of quantifying parasite density and capacity to identify *Plasmodium* species and mixed infections are the main advantages; however, the high cost of the equipment and reagents used for real-time PCR has prevented its implementation in resource-limited settings [18–20].

One of the challenges in performing PCR in settings where resources are limited is the correct extraction of DNA from whole blood and/or storage conditions during sample transport to a reference center. Nevertheless, the dried blood spot (DBS) method for the conservation of blood samples is widely used [21]. DBS sampling consists of placing drops of capillary blood, obtained by finger prick or venous blood collected by venipuncture, on filter papers that can be stored, preserved and transported at room temperature (RT) [22]. The DNA extracted from DBS is of sufficient quality to be used in PCR reactions, typing and sequencing techniques [23].

The objective of this study was to evaluate the usefulness of DBS as a method of preserving and transporting blood samples from a resource-limited environment, such as Cubal (Angola), to a reference center for the diagnosis of malaria by real-time PCR.

Methods

Two independent studies were conducted for related purposes (Fig. 1): to evaluate (i) the performance of real-time PCR for malaria diagnosis using DBS sampling, conducted at the Hospital Universitario Vall d'Hebron (HUVH, Barcelona, Spain), and (ii) the usefulness of DBS as a method for collecting and transporting samples without cold storage, conducted at the Hospital Nossa Senhora da Paz (HNSP, Cubal, Angola).

Study population and sample collection

Performance of real-time PCR for malaria from DBS at HUVH

A prospective study was carried out at HUVH between October 2022 and October 2023. A total of 22 blood samples were included: 12 whole blood samples positive

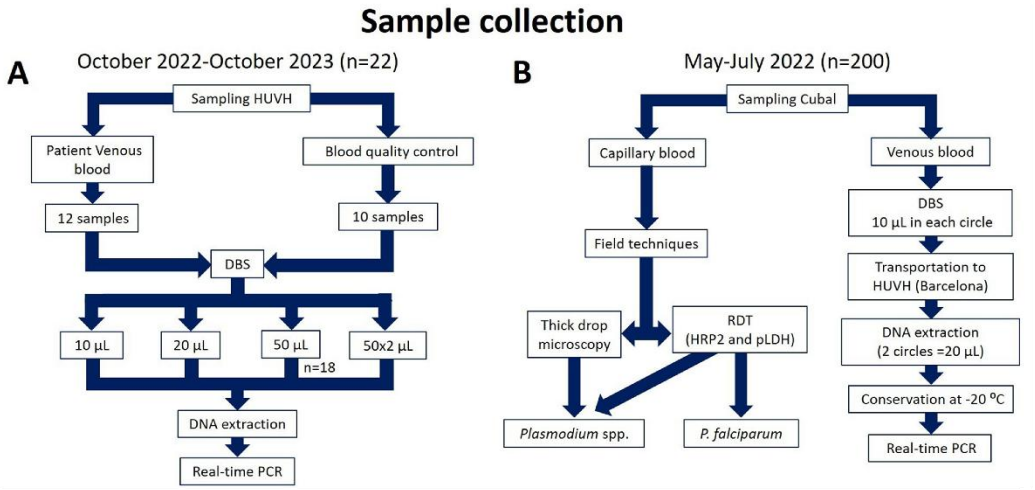


Fig. 1 Flowchart established for the sample collection and diagnostic techniques used. **A** Schematic of the sampling carried out between October 2022 and October 2023 at the Vall d'Hebron University Hospital (HUVH, Barcelona, Spain) is shown. **B** Details of the procedure followed in the sampling carried out between May and July 2022 in Cubal

for *Plasmodium* spp. by real-time PCR from migrant patients from sub-Saharan countries who came to the HUVH for diagnosis of malaria and 10 quality control samples from QCMD 2023 *Plasmodium* spp. (Malaria) EQA Pilot Study (Quality Control for Molecular Diagnostics, Glasgow, UK). These control samples simulate human blood infected ($n=9$) and not infected ($n=1$) with *Plasmodium* spp. Different volumes (10 µl, 20 µl and 50 µl) of blood and quality control samples were used to obtain DBS samples on Whatman 903™ filter paper cards (GE Healthcare Life Sciences, Cardiff, UK). DBS samples were dried overnight at RT until DNA extraction for real-time PCR analysis (Fig. 1A).

Usefulness of DBS for malaria diagnosis by real-time PCR in Cubal, Angola

A cross-sectional study was conducted between May and July 2022 involving 200 samples from patients attending the HNSP for suspected malaria. Inclusion criteria were all patients presenting to HNSP with febrile syndrome. Recruitment was performed as described by Febrer-Sendra et al. [24]. Two types of samples were collected from each participant following the clinical protocol established by the HNSP: (i) a capillary blood sample obtained by finger prick was used for field diagnostic techniques (microscopy and RDT); (ii) a whole blood sample was obtained by venipuncture, from which 10 µl was inoculated in each circle of Whatman 903™ filter paper cards (GE Healthcare Life Sciences, Cardiff, UK). The young age and nutritional status of some of the participants, added to the other clinical tests performed with the same blood collection, meant that the DBS collection would be from venous blood and that the inoculated volume of blood in each circle of the filter paper could not exceed 10 µl. DBS samples were completely dried for 24 h at RT and stored at 4 °C until shipment to the HUVH; during shipment, the DBS samples were kept at RT. Once at destination, DBS samples were stored at − 20 °C until further molecular analysis. These storage conditions were established to preserve the highest possible quality of parasite DNA as it took several weeks before they were analyzed [25] (Fig. 1B).

Field diagnostic techniques: microscopy and RDT

For microscopic examination, a thick blood smear was prepared from each capillary blood sample and stained with 10% Giemsa for 15 min. An experienced microscopist examined all slides at 100× magnification with immersion oil. For each smear, the presence or absence of *Plasmodium* spp. infection was determined, and parasite density was quantified according to the number of parasites per 100 leukocytes, assuming a quantity of 8000 leukocytes/µl of blood. A slide was determined as negative if no *Plasmodium* spp. parasites were observed after counting 500 leukocytes [24]. Three groups were established, according to the intensity of infection, as follows: low intensity (< 800 parasites/µl), medium intensity (800–4000 parasites/µl) and high intensity (> 4000

parasites/µl) [26]. The RDT used in this study was the STANDARD™ Q Malaria Pf/Pan Ag test (SD Biosensor, Republic of Korea). This RDT is a membrane-based immunochromatography for the qualitative detection of *P. falciparum*-specific *Pf*HRP2 and *Plasmodium* spp. (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* and *P. malariae*)-specific pLDH. The detection limit is 163 parasites/µl. The diagnosis of *Plasmodium* spp. infection by at least one of these two techniques was used as a reference method when determining the performance of real-time PCR from DBSs collected at HSNP.

DNA extraction

DNA extraction from both DBS and whole blood samples was performed with the automated eMAG™ system (BioMérieux SA, Marcy-l'Étoile, France), according to the manufacturer's instructions; both types of samples were eluted into 110 µl elution buffer.

For DBSs collected at HUVH, one circle inoculated with 10 µl, 20 µl and 50 µl of whole blood or two circles with 50 µl of whole blood were placed in individual 2-ml NUCLISENS® lysis buffer tubes. For DBSs collected at HNSP, two circles infected with 10 µl of whole blood each were punched and placed into individual lysis buffer tubes (20 µl total volume of DBS per sample). Then, DBSs were incubated with continuous mixing at RT for 30 min. The filter paper debris was removed with sterile tweezers, and a rapid centrifugation was performed before starting the isolation program. For whole blood samples, a volume of 200 µl was used for DNA extraction. The eluates were stored at − 20 °C until further analysis by real-time PCR.

Real-time PCR

All real-time PCR reactions were performed on the CFX96 Touch real-time PCR detection system (Bio-Rad, Hercules, CA). First, a real-time PCR for *Plasmodium* spp. detection (hereafter, generic PCR) was performed using the RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 (Altona Diagnostics, Hamburg, Germany), following the manufacturer's instructions (limit of detection: 1.27; CI 0.57–5.42 copies/µl eluate). Samples that tested positive in the generic PCR were subjected to a second real-time PCR for identification of the *Plasmodium* species (hereafter, specific PCR) using the RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 (Altona Diagnostics, Hamburg, Germany) [limits of detection: *P. falciparum* = 0.80 (CI = 0.44–2.45), *P. vivax* = 0.73 (CI = 0.46–1.62), *P. malariae* = 0.36 (CI = 0.24–0.74), *P. ovale* = 1.46 (CI = 0.89–3.28) and *P. knowlesi* = 2.35 (CI = 1.37- 5.55) copies/µl of eluate].

A positive control (*Plasmodium* spp.-specific or species-specific DNA, obtained from DNA extraction from the blood of malaria patients attending HUVH, whose infection was confirmed by microscopy and real-time PCR) and a negative control (nuclease-free water), were included in each run. Samples were considered positive for *Plasmodium* DNA when the threshold cycle (Ct) for the *Plasmodium* target was < 40 and the internal control amplified effectively.

Although real-time PCR used in this study is not an absolute but a relative quantitative method, Ct values were used as an indirect estimate of parasite density [27, 28].

Statistical analysis

Qualitative variables are expressed as percentages and absolute frequencies. Quantitative variables are described as mean or median and standard deviation (SD) or interquartile range (IQR) according to the normality of the data distribution.

Statistical analyses were performed using the R-UCA package for Windows (version R-UCA-3.3.1.exe). The statistical tests used were as follows: (i) single factor ANOVA and Tukey's test for pairwise comparisons to determine whether there were significant differences between real-time PCR from DBSs or whole blood; this test was also applied in the analysis according to infection intensity groups to detect any differences between real-time PCR Ct values from DBSs collected in Cubal; (ii) the Chi-square test of independence was used to determine the dependence between field diagnostic and real-time PCR results; (iii) the Kruskal-Wallis test followed by the Wilcoxon test was used to test for significant differences in parasite density determined by microscopy between the different groups established according to the intensity of infection; (iv) Spearman's correlation test was used to determine the correlation between real-time PCR Ct values from DBSs collected at Cubal and parasite density determined by microscopy. In all cases, the significance level was set at $P < 0.05$.

The differences in Ct values between DBS and blood samples (ΔCt) using real-time PCR for the study conducted at HUVH were calculated as follows:

$$\Delta Ct = \frac{(Ct_{DBS} - Ct_{whole\ blood})}{n}$$

where Ct_{DBS} is the Ct obtained from a particular DBS volume for a sample, $Ct_{wholeblood}$ is the Ct obtained from whole blood of the same sample, and n is the total number of samples analyzed for the same DBS volume.

For real-time PCR performed on the samples from the study conducted at HNSP, the following diagnostic performance parameters were calculated using microscopy and/or RDT results as a reference: sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV). To establish the level of concordance

of real-time PCR with reference results, Cohen's kappa coefficient was calculated and interpreted as follows: slight concordance (0–0.20), fair concordance (0.21–0.40), moderate concordance (0.41–0.60), substantial concordance (0.61–0.80) and almost perfect concordance (0.81–1.00).

Results

Performance of real-time PCR for malaria from DBS

Real-time PCR for the detection of Plasmodium spp. DNA

Real-time PCR from whole blood samples was positive in 100% (21/21) of *Plasmodium* spp.-infected samples and negative in the one uninfected sample. The number of positive samples from DBS varied according to the volume of blood inoculated: 76.19% (16/21) for 10 µl, 85.71% (18/21) for 20 µl, 88.24% (15/17) for 50 µl and 85.71% (18/21) for 100 µl. Notably, for four samples, it was not feasible to fill one circle of the filter paper with 50 µl. All samples with Ct > 34 in real-time PCR performed from whole blood were negative for all DBS volumes. The only sample that was PCR negative from whole blood was also negative for all DBS volumes. See Table 1.

The yield loss of real-time PCR from the different DBS volumes used compared to whole blood (represented as ΔCt) is shown in Fig. 2. The highest loss was with the 10 µl DBS volume, with a difference of 7.92 Ct. The ΔCt for each DBS volume presented significant differences between them in all cases ($P < 0.001$), except between the 50 µl and 100 µl DBS groups ($P > 0.05$).

Real-time PCR for the identification of Plasmodium species

According to the PCR results from whole blood, 80.95% (17/21) of samples corresponded to *P. falciparum*, 14.29% (3/21) to *P. malariae,* and 4.76% (1/21) to mixed infection by *P. falciparum* and *P. ovale.* When a higher DBS volume was analyzed, *Plasmodium* species could be identified in a greater number of samples. The mixed infection sample could not be identified by PCR using any of the DBS volumes because the generic PCR for DBS was negative; therefore, the specific PCR was not performed. See Table 1.

ΔCt was observed in specific real-time PCR when using DBSs with whole blood (Fig. 2). For *P. falciparum,*, a higher ΔCt was observed using 10 µl of DBS compared with *P. malariae* detection. For *P. falciparum*, mean ΔCt values for each of the DBS volumes presented significant differences ($P < 0.01$), except between the 50 µl and 100 µl DBS groups ($P > 0.05$).

Usefulness of DBS for malaria diagnosis by real-time PCR in Cubal, Angola

Real-time PCR performance

Field diagnosis (microscopy and/or RDT) determined that 51.5% (103/200) of participants were infected with *Plasmodium* spp. compared to 50% (100/200) detected by real-time PCR from DNA extracted from DBSs ($P < 0.001$). Microscopic examination detected 33.5% (67/200) positive and RDT 49% (98/200). The performance parameters (sensitivity, specificity, PPV, NPV and kappa coefficient) of real-time PCR from DBSs using field diagnosis as the reference are shown in Table 2.

A comparison between the results of field diagnosis of malaria and diagnosis by real-time PCR is shown in Fig. 3. Of the total number of samples analyzed, 61.50% (123/200) were positive by field diagnosis and/or real-time PCR. Field diagnosis detected more positive cases than real-time PCR (23 *vs.* 20, respectively). Of these samples, only 34.78% (8/23) were microscopy-positive, and only two were not low-intensity infections (1103 and 5866 parasites/µl); the other discordant samples were only detected by RDT.

The mean Ct value obtained by real-time PCR was 30.76 (SD = 5.96). The median parasite densities obtained from microscopic examination were 6508 (IQR = 1223.5–19,731.5) parasites/µl. In addition, there was a significant correlation between real-time PCR Ct values and the parasite density quantification established by microscopy ($P < 0.001$, $r = -0.88$). When groups were

Table 1 Detection and identification of *Plasmodium* species by real-time PCR from whole blood and DBS

	PCR result	Whole blood N (%)	DBS			
			10 µl N (%)	20 µl N (%)	50 µl N (%)[a]	100 µl N (%)
Generic PCR	*Plasmodium* spp.	21/21 (100)	16/21 (76.19)	18/21 (85.71)	15/17 (88.24)	18/21 (85.71)
Specific PCR[b]	*P. falciparum*	17/21 (80.95)	10/16 (62.50)	13/18 (72.22)	11/15 (73.33)	14/18 (77.78)
	P. malariae	3/21 (14.29)	2/16 (12.50)	2/18 (11.11)	2/15 (13.33)	2/18 (11.11)
	P. falciparum + *P. ovale*	1/21 (4.76)	0/16 (0)	0/18 (0)	0/15 (0)	0/18 (0)
	Undetermined	0/21 (0)	4/16 (25)	3/18 (16.67)	2/15 (13.33)	2/18 (11.11)

[a] In four samples, it was not possible to fill the filter paper circle with 50 µl

[b] Percentages are calculated according to the number of positive samples for *Plasmodium* spp.

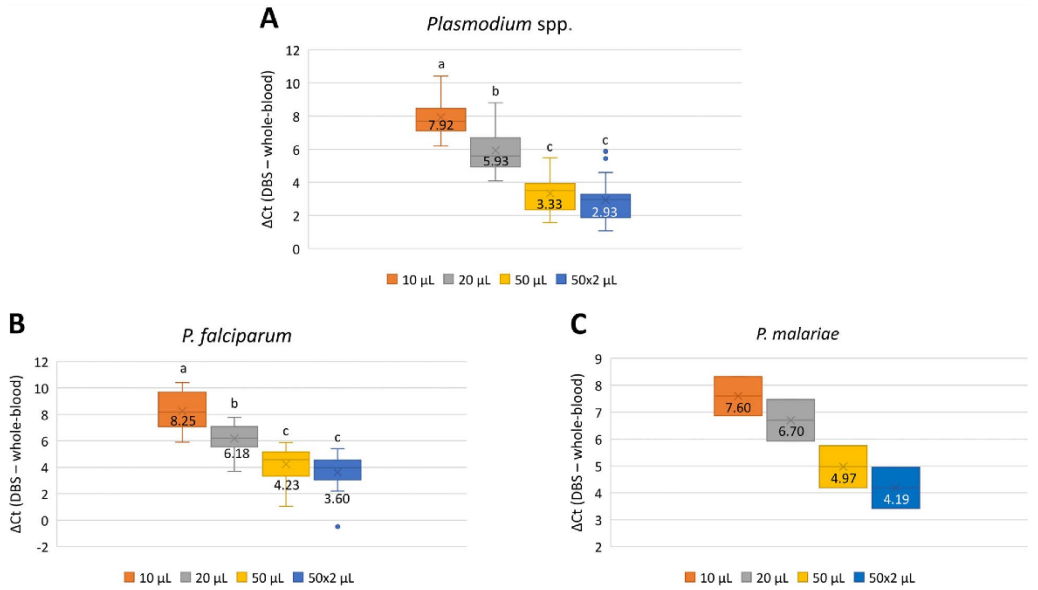


Fig. 2 Yield loss (ΔCt) detection of real-time PCR performed on DNA extracted from DBS inoculated with different volumes of blood (10 µl, 20 µl, 50 µl and 100 µl) compared to extraction from whole blood (200 µl). The crosses inside the box and numbers indicate the mean value of the ΔCt. Letters indicate groups according to significant differences between mean ΔCt values, so that values with different letters (a, b or c) present statistically significant differences between them ($P < 0.01$). **A** ΔCt values of generic real-time PCR, **B** ΔCt values of *Plasmodium falciparum*-specific PCR and **C** ΔCt values of *Plasmodium malariae*-specific PCR. Significant differences were not analyzed for *P. malariae* as only two samples were positive

Table 2 Performance of real-time PCR from DBS using field diagnosis (microscopy and RDT) as the reference

	Sensitivity (CI 95%)	Specificity (CI 95%)	PPV[a] (CI 95%)	NPV[a] (CI 95%)	Kappa (CI 95%)
Real-time PCR DBS	77.67 (68.19–85.04)	79.38 (69.72–86.66)	80.00 (70.57–87.08)	77.00 (67.31–84.58)	0.57 (0.46–0.68)

[a] PPV: positive predictive value, NPV: negative predictive value

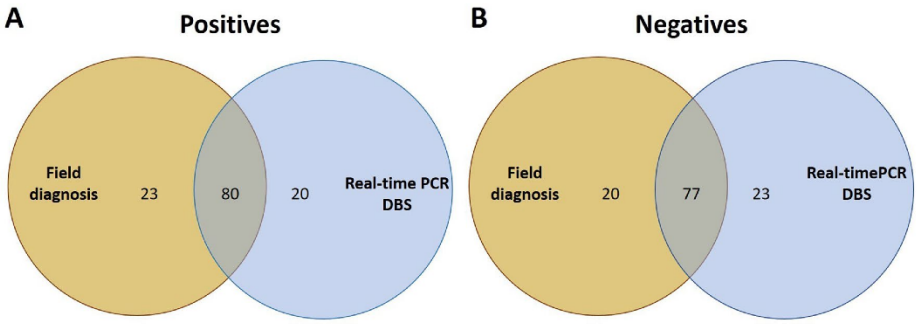


Fig. 3 Venn diagrams for the comparison between real-time PCR from DBS and field diagnosis. **A** Distribution of positive and **B** negative samples for *Plasmodium* spp. infection with each technique

established based on the intensity of infection, it was found that as the intensity decreased, the mean real-time PCR Ct value increased significantly ($P < 0.01$) in each of the groups (Table 3).

Plasmodium species identification by real-time PCR

Of the samples positive for *Plasmodium* spp. DNA by real-time PCR, the species could not be determined in 14% (14/100) of the cases due to low sample parasitemia (first real-time PCR Ct values > 36.3). The most prevalent species was *P. falciparum*, present in 100% (86/86) of infections, followed by *P. malariae* in 13.95% (12/86) and *P. ovale* in 6.98% (6/86) of cases. *Plasmodium falciparum* was detected as a single species infection in 81.40% (70/86) and as a mixed infection in 18.60% (16/86) (Fig. 4A). Of the mixed infections, *P. falciparum* and *P. malariae* coinfection accounted for 62.5% (10/16), *P. falciparum* and *P. ovale* 25% (4/16), and triple coinfections with these three species were identified in 12.5% (2/16) of the cases (Fig. 4B).

Table 3 Intensity of infection established by microscopy and its relationship to real-time PCR from DBS samples collected in Cubal ($n = 59$)

Infection intensity	Infections N (%)	Microscopy Parasite density (parasites/μl)[a]	Real-time PCR Ct[b]
High	31 (52.54)	19315 (9819.50–77,973)a[c]	23.70 (2.14)a[c]
Moderate	14 (23.73)	1920 (1255.25–2523.75) b[c]	28.66 (2.77)b[c]
Low	14 (23.73)	424 (252.50–666.75)c[c]	32.35 (3.31)c[c]

[a] Results are expressed as median and IQR

[b] Results are expressed as mean and SD

[c] Letters indicate statistically significant differences between infection intensity groups for each technique ($P < 0.05$)

Discussion

The use of highly sensitive diagnostic methods, e.g. molecular techniques, is fundamental for accurately reporting the true prevalence of malaria in the population and interrupting transmission; however, the implementation of these techniques in rural settings is limited [21]. One potential approach would be to collect and transport the samples to a reference laboratory, but this presents certain challenges. In this sense, DBS sampling offers an efficient and applicable solution in resource-limited settings for the collection, conservation, and transport of whole blood samples [23]. The combination of molecular techniques together with the DBS method has been used in numerous research studies [15, 29–34].

Concerning the study of malaria real-time PCR performance from DBS samples at HUVH, a higher agreement between whole blood and DBS samples was observed in PCR results and species identification when larger volumes of whole blood were used for DBS (100 μl). However, of the 21 PCR-positive whole blood samples, 13.6% (3/21) of the DBS samples returned a negative result, even when using the DBS volume that gave the best results (100 μl). Our results agree with other published studies, with DBS PCR for 4% [22], 13.3% [35] and 27% [36] of infections detected from whole blood. The sensitivity of PCR from DNA extracted from DBS has been described to vary for different reasons: the blood volume used, type of filter paper [22], storage conditions (time, temperature and humidity) [25], extraction method used [37] and PCR kit chosen [22, 38]. Similarly, there appears to be an inherent yield loss when performing extraction

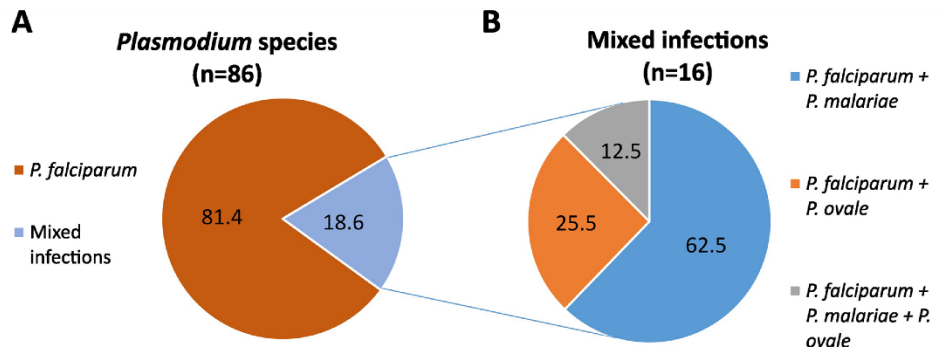


Fig. 4 Molecular identification of *Plasmodium* species by real-time PCR from DBS collected in Cubal. **A** Percentages of the prevalence of *Plasmodium* species identified and of mixed infections are shown with respect to the total number of samples in which the species could be determined ($n = 86$). **B** The percentages of prevalence of the different mixed infections caused by two or more *Plasmodium* species are plotted ($n = 16$)

of genetic material from DBS compared to whole blood. This might be due to incomplete recovery of the total volume of blood inoculated onto the filter paper during the pre-extraction step, possibly depending on the dilution factor set in the sample recovery.

Moreover, we found that DBS volume influences the sensitivity of real-time PCR. One possible explanation is that when performing nucleic acid extraction with larger blood volumes, the number of parasites and consequently the number of DNA molecules will be higher. In our study, the 50- and 100µl volumes resulted in a smaller loss of sensitivity. However, further investigations with a larger number of low parasitemia samples are necessary to determine whether a 100µl volume is better than a 50µl volume. Nevertheless, blood volume is usually a limitation when collecting samples in the field [36], and 50 µl could be sufficient for molecular studies of malaria in resource-limited settings. On the other hand, we made an important finding: when whole blood samples had a Ct value > 34, the corresponding DBS sample recorded a lack of amplification in real-time PCR, leading us to believe that infections with very low parasite densities may be missed with this technique.

In our study, all *Plasmodium* species identified were concordant between whole blood and DBS; however, in a small number of samples, identification was not possible. Differences have been observed in the performance of PCR from DBS depending on the *Plasmodium* species. Three independently conducted studies concluded that a higher proportion of infections were missed with *P. vivax* compared with *P. falciparum* when using DBS [22, 36, 39]. One potential explanation for this phenomenon is the lower parasitemia observed in infections caused by *P. vivax* compared to the high parasite densities frequently seen in *P. falciparum* infections [40]. Unfortunately, we did not identify any cases of *P. vivax*. However, we observed that the detection performance with *P. malariae* was lower than that of *P. falciparum* when 50- and 100µl DBSs were used.

Upon reviewing real-time PCR Ct values, we observed that whole blood samples with a Ct > 35 were those in which the *Plasmodium* species could not be identified. This led us to believe that the lower sensitivity of the specific PCR used in species identification compared with the generic PCR that detects *Plasmodium* spp. was the reason we could not identify these species from the DBS samples [28]. In addition, the only mixed infection found was also missed when using DBSs. Nonetheless, this was due to the low parasitemia of that sample as *Plasmodium* spp. infection was also not detected from DBSs.

Focusing on the field study, real-time PCR determined fewer infections than field diagnosis using both microscopy and RDT. This may be explained by the possibility of false-positive RDT results, as it is common in high transmission settings for this test to detect the *Pf*HRP2 antigen in the blood of a patient who has recently had malaria but was not infected at the time of testing [41]. However, PCR detected a higher proportion of positive samples compared with using microscopy or RDT independently. Our results agree with other studies conducted in Equatorial Guinea and the Democratic Republic of Congo, where PCR performed on DNA extracted from DBSs identified a higher number of positive samples than microscopy and RDT [31, 42].

Concerning the samples positive by field diagnosis and negative by real-time PCR, the possibility of false-positive RDT results due to the persistence of antigen after past infection, and the loss of PCR performance with DBS in low parasitemia samples may be the cause of these discrepancies. However, the failure of PCR to detect two samples with medium- and high-intensity infections remains unexplained. In contrast, a positive result with real-time PCR and a negative one for field diagnosis may be due to the higher sensitivity of the PCR technique, as demonstrated in previous studies [31, 42, 43].

In another recent study also conducted in Cubal, real-time PCR from DNA extracted in situ determined that 39.5% of the participants were infected with *Plasmodium* spp. [28] compared with 50% detected from DBSs in this study. In addition, in the present study, the sensitivity of real-time PCR regarding field diagnosis was considerably higher (77.67%) compared with PCR of DNA extracted in situ (64.08%) [28]. This led us to think that, during the transport of the DNA eluates, the genetic material of *Plasmodium* spp. underwent a strong degradation due to inadequate preservation conditions. In this sense, using DBS for sample transport is highly advantageous since it does not require the maintenance of a cold chain and allows the effective preservation of parasite DNA for detection by real-time PCR. Despite the loss of PCR sensitivity when performed on DBSs compared with whole blood, the advantages offered by DBS as a means of preservation and transportation of blood samples simplify the logistics of molecular studies in resource-limited settings, as is the case of Cubal.

Regarding quantification to estimation of infection intensity, we observed that real-time PCR from DBSs could detect one case of high-intensity and two cases of low-intensity infections that were missed in the study in which DNA extraction was carried out in situ [28]. In addition, mean Ct values were lower for all intensity groups in the case of DBS compared with in situ extracted DNA [28], especially in the high-intensity group. Therefore, real-time PCR Ct values from DBSs could be an indicator to estimate the intensity of infection, always

considering the loss of sensitivity of this method compared with using whole blood.

To identify the *Plasmodium* species, PCR from DBS samples allows us to accurately identify these species and distinguish mixed and single infections [30, 47, 48]. As expected, real-time PCR from DBS was able to identify more species than PCR from in situ DNA extracts because of better DNA preservation [28]. In the previous in situ extraction study, two cases first categorized as mono-infections of *P. malariae* and *P. ovale* [28] turned out to be mixed infections of these species together with *P. falciparum* according to the results obtained from the DBS. Thus, DBS achieved a more accurate identification of the *Plasmodium* species and could detect mixed infections with greater precision than with in situ DNA extraction.

Some limitations were identified in this study that could affect the interpretation of the results. First, venous blood was used to collect DBSs instead of capillary blood. This decision was influenced by the young age and nutritional status of the participants, as well as the high number of diagnostic tests required, making venous sampling a more practical option in this setting. However, as a result, only two 10µl DBS circles could be collected per participant, which may have reduced the sensitivity of the real-time PCR performed on these samples. Second, the lower sensitivity of the species-specific PCR compared to the generic *Plasmodium* spp. DNA-targeted PCR limited our ability to identify *Plasmodium* species in cases with very low parasitemia. Finally, the persistence of antigens in the bloodstream may have contributed to false-positive results in RDTs, potentially leading to an overestimation of field diagnostic results. This overestimation may, in turn, have resulted in an underestimation of the sensitivity of real-time PCR from DBS when calculating its diagnostic performance.

Conclusions

The volume of DBS used for DNA extraction is a determining factor in the efficacy of real-time PCR for *Plasmodium* DNA detection and species identification. In addition, DBS allows estimation of the intensity of infection based on real-time PCR Ct values. In light of the above findings, our recommendation is that DBS sampling be employed as the optimal methodology for the acquisition, transport and subsequent molecular analysis of samples in malaria research. However, it is important to note that microscopy and RDTs should continue to be employed in point-of-care diagnosis, as they facilitate immediate results that are vital for initiating treatment. In addition, the volume of blood collected, as well as the process of drying and transporting the samples, may pose problems that require attention, as they could affect the accuracy of the results. Consequently, further research is needed to determine optimal methodologies for using DBS in prevalence studies and in mapping residual malaria, which will be of vital importance for malaria elimination in endemic regions.

Abbreviations

Ct	Threshold cycle
DBS	Dried blood spot
ΔCt	Differences in Ct values between DBS and blood samples
HNSP	Hospital Nossa Senhora da Paz
HUVH	Hospital Universitario Vall d'Hebron
IQR	Interquartile range
NPV	Negative predictive value
pLDH	Panmalaric lactate dehydrogenase
PCR	Polymerase chain reaction
*Pf*HRP2	*Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2
PPV	Positive predictive value
RDT	Rapid diagnostic test
RT	Room temperature
SD	Standard deviation
WHO	World Health Organization

Acknowledgements

We thank Helena Kruyer for reviewing and correcting the manuscript, ensuring that the language is comprehensible to all readers.

Author contributions

Conception and design of the study: AM, BFS, BCV, PFS, MLA, AM, IOS, IM and ES. Recruitment of participants and acquisition of laboratory data at the HNSP in Cubal, Angola: BFS, BCV, AN, JMC and SA. Acquisition of molecular data and laboratory work at the Hospital Universitario Vall d'Hebron in Barcelona, Spain: AM, AS, PMV, CRM and LG. Drafting the manuscript and analyzing and interpreting the data: AM. Revising the article critically for important intellectual content: BFS, AS, CRM, PFS and ES. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

Not applicable. The author(s) declare that no financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article.

Availability of data and materials

The data supporting the conclusions of this article are included in this manuscript. The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

This study was approved by the Vall d'Hebron University Hospital Drug Research Ethics Committee [PR(AG)79/2024] and by the Ethics Committee of the Angolan Ministry of Health (39 C.E/MINSA.INIS/2022). Each participant signed an informed consent form (in the case of minors, parental/guardian consent was obtained) after being informed of the objectives of the study. All procedures were performed according to the ethical guidelines of the 2013 Declaration of Helsinki.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Author details

[1]Microbiology Department, Vall d'Hebron University Hospital, Autonomous University of Barcelona, PROSICS Barcelona, Barcelona, Spain. [2]Department of Microbiology and Genetics, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain. [3]Infectious and Tropical Diseases Research Group (E-INTRO),

Biomedical Research Institute of Salamanca-Center for Research in Tropical Diseases of the University of Salamanca (IBSAL-CIETUS), Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, Salamanca, Spain. [4]Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. [5]Hospital Nossa Senhora da Paz, Cubal, Angola. [6]International Health Unit Vall d'Hebron-Drassanes, Infectious Diseases Department, Vall d'Hebron University Hospital, PROSICS Barcelona, Barcelona, Spain.

Received: 2 October 2024 Accepted: 23 January 2025
Published online: 07 February 2025

References

1. Varo R, Chaccour C, Bassat Q. Update on malaria. Med Clin (Barc). 2020;155:395–402.
2. World Health Organization (WHO). World malaria report 2023. 2023. https://cdn.who.int/media/docs/default-source/malaria/world-malaria-reports/world-malaria-report-2023-spreadview.pdf?sfvrsn=bb24c9f0_4. Accessed 30 Sep 2024.
3. Salvador F, Cossio Y, Riera M, Sánchez-Montalvá A, Bocanegra C, Mendioroz J, et al. Changes in malaria epidemiology in a rural area of Cubal. Angola Malar J. 2015;14:21.
4. Fançony C, Sebastião YV, Pires JE, Gamboa D, Nery SV. Performance of microscopy and RDTs in the context of a malaria prevalence survey in Angola: a comparison using PCR as the gold standard. Malar J. 2013;12:284.
5. Hay SI, Smith DL, Snow RW. Measuring malaria endemicity from intense to interrupted transmission. Lancet Infect Dis. 2008;8:369–78.
6. Hsiang MS, Hwang J, Kunene S, Drakeley C, Kandula D, Novotny J, et al. Surveillance for malaria elimination in Swaziland: a national cross-sectional study using pooled PCR and serology. PLoS ONE. 2012;7:e29550.
7. de Cola MA, Sawadogo B, Richardson S, Ibinaiye T, Traoré A, Compaoré CS, et al. Impact of seasonal malaria chemoprevention on prevalence of malaria infection in malaria indicator surveys in Burkina Faso and Nigeria. BMJ Glob Health. 2022;7:e008021.
8. Sousa-Figueiredo JC, Gamboa D, Pedro JM, Fançony C, Langa AJ, Magalhães RJS, et al. Epidemiology of malaria, schistosomiasis, geohelminths, anemia and malnutrition in the context of a demographic surveillance system in northern Angola. PLoS ONE. 2012;7:e33189.
9. Coldiron ME, Assao B, Guindo O, Sayinzoga-Makombe N, Koscalova A, Sterk E, et al. Prevalence of malaria in an area receiving seasonal malaria chemoprevention in Niger. Malar J. 2022;20:419.
10. Lin K, Li M, Wang D, Luo F, Lu S, Michael MG, et al. Evaluation of malaria standard microscopy and rapid diagnostic tests for screening - southern Tanzania, 2018–2019. China CDC Wkly. 2022;4:605–8.
11. Houzé S. Les tests de diagnostic rapide pour le paludisme. Bull Soc Pathol Exot. 2017;110:49–54.
12. Leonard CM, Mohammed H, Tadesse M, McCaffery JN, Nace D, Halsey ES, et al. Missed *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* mixed infections in Ethiopia threaten malaria elimination. Am J Trop Med Hyg. 2022;106:667–70.
13. Keating J, Miller JM, Bennett A, Moonga HB, Eisele TP. *Plasmodium falciparum* parasite infection prevalence from a household survey in Zambia using microscopy and a rapid diagnostic test: Implications for monitoring and evaluation. Acta Trop. 2009;112:277–82.
14. Endeshaw T, Gebre T, Ngondi J, Graves PM, Shargie EB, Ejigsemahu Y, et al. Evaluation of light microscopy and rapid diagnostic test for the detection of malaria under operational field conditions: a household survey in Ethiopia. Malar J. 2008;7:118.
15. Molina de la Fuente I, Yimar M, García L, González V, Amor A, Anegagrie M, et al. Deletion patterns, genetic variability and protein structure of pfhrp2 and pfhrp3: implications for malaria rapid diagnostic test in Amhara region Ethiopia. Malar J. 2022;21:287.
16. Barnwell JW, Udhayakumar V, Macedo-de-Oliveira A. Vigilancia molecular de la expresión génica de *hrp2* y *hrp3* en los parásitos de *Plasmodium falciparum* de América del Sur y Centroamérica. Pan American Health Organization. 2012. https://www3.paho.org/hq/dmdocuments/2013/CDC-Molecular-Surv-SCAmerica-Spa.pdf. Accessed 30 Sep 2024.
17. Imwong M, Nguyen TN, Tripura R, Peto TJ, Lee SJ, Lwin KM, et al. The epidemiology of subclinical malaria infections in South-East Asia: Findings from cross-sectional surveys in Thailand-Myanmar border areas, Cambodia, and Vietnam. Malar J. 2015;14:381.
18. Mens PF, van Amerongen A, Sawa P, Kager PA, Schallig HD. Molecular diagnosis of malaria in the field: development of a novel 1-step nucleic acid lateral flow immunoassay for the detection of all 4 human Plasmodium spp. and its evaluation in Mbita Kenya. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008;61:421–7.
19. Hänscheid T, Grobusch MP. How useful is PCR in the diagnosis of malaria? Trends Parasitol. 2002;18:395–8.
20. Ramírez AM, Tang THT, Suárez ML, Fernández AÁ, García CM, Hisam S, et al. Assessment of commercial real-time PCR assays for detection of malaria infection in a non-endemic setting. Am J Trop Med Hyg. 2021;105:1732–7.
21. Nain M, Sinha A, Sharma A. Dried blood spots: a robust tool for malaria surveillance in countries targeting elimination. J Vector Borne Dis. 2023;60:11–7.
22. Ataei S, Nateghpour M, Hajjaran H, Edrissian GH, Foroushani AR. High specificity of semi-nested multiplex PCR using dried blood spots on DNA Banking Card in comparison with frozen liquid blood for detection of *Plasmodium falciparum* and Plasmodium vivax. J Clin Lab Anal. 2011;25:185–90.
23. Kumar A, Mhatre S, Godbole S, Jha P, Dikshit R. Optimization of extraction of genomic DNA from archived dried blood spot (DBS): potential application in epidemiological research & bio banking. Gates Open Res. 2019;2:57.
24. Febrer-Sendra B, Crego-Vicente B, Nindia A, Martínez-Campreciós J, Aixut S, Mediavilla A, et al. First field and laboratory evaluation of LAMP assay for malaria diagnosis in Cubal. Angola Parasit Vectors. 2023;16:343.
25. Schwartz A, Baidjoe A, Rosenthal PJ, Dorsey G, Bousema T, Greenhouse B. The effect of storage and extraction methods on amplification of *Plasmodium falciparum* DNA from dried blood spots. Am J Trop Med Hyg. 2015;92:922–5.
26 Fox E, Strickland GT. The interrelationship of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* in the Punjab. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1989;83:471–3.
27. Vafa Homann M, Emami SN, Yman V, Stenström C, Sondén K, Ramström H, et al. Detection of malaria parasites after treatment in travelers: a 12-months longitudinal study and statistical modelling analysis. EBioMedicine. 2017;25:66–72.
28. Mediavilla A, Silgado A, Febrer-Sendra B, Crego-Vicente B, Martínez-Vallejo P, Maturana CR, et al. Real-time PCR for malaria diagnosis and identification of *Plasmodium* species in febrile patients in Cubal. Angola Parasit Vectors. 2024;17:384.
29. Hayuma PM, Wang CW, Liheluka E, Baraka V, Madebe RA, Minja DTR, et al. Prevalence of asymptomatic malaria, submicroscopic parasitaemia and anaemia in Korogwe District, north-eastern Tanzania. Malar J. 2021;20:424.
30. Sitali L, Chipeta J, Miller JM, Moonga HB, Kumar N, Moss WJ, et al. Patterns of mixed *Plasmodium* species infections among children six years and under in selected malaria hyper-endemic communities of Zambia: population-based survey observations. BMC Infect Dis. 2015;15:204.
31. Berzosa P, de Lucio A, Romay-Barja M, Herrador Z, González V, García L, et al. Comparison of three diagnostic methods (microscopy, RDT, and PCR) for the detection of malaria parasites in representative samples from Equatorial Guinea. Malar J. 2018;17:333.
32. Berzosa P, Molina de la Fuente I, Ta-Tang TH, González V, García L, Rodríguez-Galet A, et al. Temporal evolution of the resistance genotypes of *Plasmodium falciparum* in isolates from Equatorial Guinea during 20 years (1999 to 2019). Malar J. 2021;20:463.
33. Quan H, Igbasi U, Oyibo W, Omilabu S, Chen SB, Shen HM, et al. High multiple mutations of *Plasmodium falciparum*-resistant genotypes to sulphadoxine-pyrimethamine in Lagos. Nigeria Infect Dis Poverty. 2020;9:91.
34. Berzosa P, González V, Taravillo L, Mayor A, Romay-Barja M, Garciá L, et al. First evidence of the deletion in the *pfhrp2* and *pfhrp3* genes in *Plasmodium falciparum* from Equatorial Guinea. Malar J. 2020;19:99.
35. Strøm GE, Moyo S, Fataki M, Langeland N, Blomberg B. PCR targeting *Plasmodium* mitochondrial genome of DNA extracted from dried blood on filter paper compared to whole blood. Malar J. 2014;13:137.

36. Canier L, Khim N, Kim S, Eam R, Khean C, Loch K, et al. Malaria PCR detection in Cambodian low-transmission settings: dried blood spots versus venous blood samples. Am J Trop Med Hyg. 2015;92:573–7.
37. Panda BB, Meher AS, Hazra RK. Comparison between different methods of DNA isolation from dried blood spots for determination of malaria to determine specificity and cost effectiveness. J Parasit Dis. 2019;43:337–42.
38. Proux S, Suwanarusk R, Barends M, Zwang J, Price RN, Leimanis M, et al. Considerations on the use of nucleic acid-based amplification for malaria parasite detection. Malar J. 2011;10:323.
39. Zainabadi K, Adams M, Han ZY, Lwin HW, Han KT, Ouattara A, et al. A novel method for extracting nucleic acids from dried blood spots for ultrasensitive detection of low-density *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax infections*. Malar J. 2017;16:377.
40. Garcia LS. Malaria. Clin Lab Med. 2010;30:93–129.
41. Martiáñez-Vendrell X, Skjefte M, Sikka R, Gupta H. Factors affecting the performance of HRP2-based malaria rapid diagnostic tests. Trop Med Infect Dis. 2022;7:265.
42. Doctor SM, Liu Y, Whitesell A, Thwai KL, Taylor SM, Janko M, et al. Malaria surveillance in the Democratic Republic of the Congo: comparison of microscopy, PCR, and rapid diagnostic test. Diagn Microbiol Infect Dis. 2017;89:251.
43. Cortés LJ, Guerra ÁP. Concordance analysis of three diagnostic tests for malaria in the symptomatic population of Colombian endemic municipalities. Biomedica. 2020;40:117–28.
44. Tran TM, Aghili A, Li S, Ongoiba A, Kayentao K, Doumbo S, et al. A nested real-time PCR assay for the quantification of *Plasmodium falciparum* DNA extracted from dried blood spots. Malar J. 2014;13:393.
45. van Bergen K, Stuitje T, Akkers R, Vermeer E, Castel R, Mank T. Evaluation of a novel real-time PCR assay for the detection, identification and quantification of *Plasmodium* species causing malaria in humans. Malar J. 2021;20:314.
46. Gonzales G. Malaria parasite counting. Malaria microscopy standard operating procedure – MM-SOP-09. World Health Organization. 2016. https://www.who.int/docs/default-source/wpro---documents/toolkit/malaria-sop/gmp-sop-09-revised.pdf?sfvrsn=6587afac_2. Accessed 30 Sep 2024.
47. Mahittikorn A, Masangkay FR, Kotepui KU, De Jesus MG, Kotepui M. Comparative performance of PCR using DNA extracted from dried blood spots and whole blood samples for malaria diagnosis: a meta-analysis. Sci Rep. 2021;11:4845.
48. Pradhan N, Rath A, Panda BB, Mohanty I, Somalkar NM, Hazra RK. Implementation of molecular method in routine malaria diagnosis and entomological studies. J Vector Borne Dis. 2020;57:314–24.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

5.1. Bloque 2: Caracterización genética de *P. falciparum* para el manejo de la malaria en Angola

Este bloque aborda la caracterización genética de *P. falciparum* como herramienta clave para optimizar el diagnóstico y el tratamiento de la malaria en Angola, mediante el uso de técnicas de PCR y secuenciación aplicadas a la epidemiología molecular. Se incluyen dos estudios independientes: el primero analiza las deleciones en los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* y la variabilidad de las proteínas que codifican, y su impacto en el rendimiento de las PDR; y el segundo evalúa la frecuencia de los marcadores moleculares de resistencia a antimaláricos, con especial atención a los genes *pfk13*, *pfmdr1*, *pfdhfr* y *pfdhps*.

Artículo 3. Análisis de las deleciones de los genes *pfhrp2* y *pfhrp3*, y de la estructura y variabilidad de las proteínas *Pf*HRP2 y *Pf*HRP3: implicaciones para el rendimiento de los test de diagnóstico rápido de malaria en Cubal, Angola

Título original: Analysis of *pfhrp2* and *pfhrp3* gene deletions, and the structure and variability of *Pf*HRP2 and *Pf*HRP3 proteins: implications for the performance of malaria rapid diagnostic tests in Cubal, Angola

Autores: Mediavilla A, Molina-de la Fuente I, Martínez-Vallejo P, Francisco K, Martins JF, Febrer-Sendra B, Maturana CR, Silgado A, Nindia A, Goterris L, Martínez-Campreciós J, Oliveira-Souto I, Molina I, Berzosa P, Sulleiro E.

Revista: Malaria Journal (Factor de impacto: 3; Q2 en parasitología). Revista internacional de referencia en investigación sobre malaria.

Fecha de publicación: 30 de septiembre de 2025.

DOI: 10.1186/s12936-025-05523-2

Resumen

Antecedentes

Las PDR-*Pf*HRP2 se utilizan ampliamente para el diagnóstico de la malaria. Sin embargo, su eficacia se ve comprometida por deleciones y variaciones genéticas en los genes *pfhrp2* y *pfhrp3*. Además, la variabilidad antigénica, incluyendo diversas variantes proteicas y perfiles de epítopos, puede afectar a la sensibilidad de las PDR. Este estudio tuvo como objetivo describir la frecuencia y la variabilidad genética de las deleciones de *pfhrp2* y *pfhrp3* y evaluar la variabilidad de las proteínas *Pf*HRP2 y *Pf*HRP3 mediante el análisis de su impacto en el rendimiento de las PDR en Cubal, un área rural del oeste de Angola.

Métodos

Las muestras se recogieron en el HNSP de Cubal entre mayo y julio de 2022. Un total de 100 muestras de gotas de sangre seca de pacientes febriles fueron confirmadas como positivas para *Plasmodium* spp. mediante PCR en tiempo real. El diagnóstico de malaria se validó mediante microscopía de gota gruesa y PDR dirigidas a *Pf*HRP2 y pLDH. Las deleciones en *pfhrp2* y *pfhrp3* se evaluaron mediante amplificación por PCR de los exones 1–2 y 2. Las secuencias del exón 2 se analizaron para identificar repeticiones de aminoácidos y epítopos candidatos, y las muestras se clasificaron según la sensibilidad prevista de las PDR.

Resultados

La identificación de especies reveló que el 96% estaban infectados por *P. falciparum* y fueron incluidos en los análisis; se encontraron deleciones en el exón 1–2 en el 7,3% (*pfhrp2*) y en el 11,46% (*pfhrp3*) de los aislados. No se observaron deleciones en el exón 2 de *pfhrp2* ni de *pfhrp3*. El análisis proteico reveló una variabilidad significativa en las repeticiones de histidina entre los diferentes grupos de muestras establecidos según la sensibilidad teórica a las PDR. En *Pf*HRP2, los epítopos 3A4 y C1-13 estuvieron presentes en el 100% de las muestras, observándose las mayores frecuencias por aislado (15 y 18 veces por aislado, respectivamente).

Conclusiones

La baja prevalencia de deleciones en *pfhrp2* y la ausencia de deleciones dobles en *pfhrp2/3*, junto con el buen rendimiento de las PDR-*Pf*HRP2, sugieren que estos test son una herramienta diagnóstica adecuada en Cubal. No obstante, el seguimiento continuo de las deleciones de *pfhrp2* y *pfhrp3* es esencial para garantizar su eficacia a largo plazo. La

variabilidad de *Pf*HRP2 puede influir en el rendimiento de las PDR; sin embargo, se requieren más estudios para aclarar su impacto preciso. Estos hallazgos mejoran la comprensión de la variabilidad genética y la estructura de *Pf*HRP2 y *Pf*HRP3, destacando el potencial de los *Pf*HRP2-PDR dirigidos a los epítopos 3A4 y C1-13 para mejorar el diagnóstico de la malaria.

Mediavilla *et al. Malaria Journal* (2025) 24:296
https://doi.org/10.1186/s12936-025-05523-2

Malaria Journal

RESEARCH

Open Access

Analysis of *pfhrp2* and *pfhrp3* gene deletions, and the structure and variability of *Pf*HRP2 and *Pf*HRP3 proteins: implications for the performance of malaria rapid diagnostic tests in Cubal, Angola

Alejandro Mediavilla[1,2], Irene Molina-de la Fuente[3], Patricia Martínez-Vallejo[1,2], Kheta Francisco[4], José F. Martins[4], Begoña Febrer-Sendra[5], Carles Rubio Maturana[1,2], Aroa Silgado[1,6], Arlette Nindia[7], Lidia Goterris[1], Joan Martínez-Campreciós[6,8], Inés Oliveira-Souto[6,8], Israel Molina[6,8], Pedro Berzosa[3*] and Elena Sulleiro[1,6,8*]

Abstract

Background Rapid diagnostic tests (RDTs) based on *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 (*Pf*HRP2-RDTs) are widely used for malaria diagnosis. However, the efficacy of *Pf*HRP2-RDTs is compromised by deletions and genetic variations in the *pfhrp2* and *pfhrp3* genes. In addition, antigen variability, including diverse protein variants and epitope profiles, can affect the sensitivity of RDTs. This study aimed to report the frequency and genetic variability of *pfhrp2* and *pfhrp3* deletions and to assess *Pf*HRP2 and *Pf*HRP3 protein variability by analysing their impact on RDT performance in Cubal, a rural area in western Angola.

Methods Samples were collected at the Hospital Nossa Senhora da Paz in Cubal from May to July 2022. A total of 100 dried blood samples from febrile patients were confirmed positive for *Plasmodium* spp. by real-time PCR. The diagnosis of malaria was validated by thick blood smear microscopy and RDT targeting *Pf*HRP2 and pan-malarial lactate dehydrogenase. Deletions in *pfhrp2* and *pfhrp3* were assessed by PCR amplification of exons 1–2 and 2. Exon 2 sequences were analysed for amino acid repeats and candidate epitopes, and samples were sorted according to predicted RDT sensitivity.

Results Species identification revealed that 96% were infected with *P. falciparum* and were included in the analyses; deletions in exon 1–2 were found in 7.29% (*pfhrp2*) and 11.46% (*pfhrp3*). No deletions were observed in exon 2 of *pfhrp2* or *pfhrp3*. Protein analysis revealed significant variability in histidine repeats between RDT sensitivity groups. In *Pf*HRP2, epitopes 3A4 and C1-13 were present in 100% of the samples, with the highest frequencies per isolate being observed (15 and 18 times per isolate, respectively).

*Correspondence:
Pedro Berzosa
pberzosa@isciii.es
Elena Sulleiro
elena.sulleiro@vallhebron.cat
Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s) 2025. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License, which permits any non-commercial use, sharing, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if you modified the licensed material. You do not have permission under this licence to share adapted material derived from this article or parts of it. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/.

Conclusions The low prevalence of deletions in *pfhrp2* and the absence of double deletions in *pfhrp2/3*, together with the good performance of *Pf*HRP2-RDT suggest that these tests are a suitable diagnostic tool in Cubal. However, continued monitoring of *pfhrp2* and *pfhrp3* deletions is essential to ensure long-term efficacy. *Pf*HRP2 variability may influence RDT performance; however, further research is needed to clarify its precise impact. These findings enhance the understanding of the genetic variability and structure of *Pf*HRP2 and *Pf*HRP3, highlighting the potential of *Pf*HRP2-RDTs targeting the 3A4 and C1-13 epitopes for improved malaria diagnosis.

Keywords Malaria diagnosis, Angola, *pfhrp2*, *pfhrp3*, Rapid diagnostic test, Deletion, Antigenic variability, Amino acid repeats, Epitopes

Background

Despite efforts to control and eliminate malaria, it remains a serious global health problem, especially in sub-Saharan African countries. Malaria is caused by parasitic protozoa of the genus *Plasmodium*, with *Plasmodium falciparum* being the most prevalent and most deadly species [1]. Accurate and early diagnosis is one of the main tools to reduce the burden and transmission of this disease [2]. Microscopy remains the gold standard for malaria diagnosis but is not always accessible in the field due to the limited availability of equipment and the need for qualified personnel [3]. Thus, in the last decades, the World Health Organization (WHO) has recommended rapid diagnostic tests (RDTs) as the more cost-effective alternative when microscopy cannot be performed [4–7]. Most RDTs use monoclonal antibodies (MAbs) to detect *P. falciparum* histidine-rich protein 2 (*Pf*HRP2) [8], due to their abundant production by the parasite. This makes RDTs targeting *Pf*HRP2 (*Pf*HRP2-RDTs) more sensitive than other RDTs that target pan-malarial proteins such as lactate dehydrogenase (LDH) or aldolase. Moreover, *Pf*HRP2-RDTs are more stable under high-temperature conditions than other tests [8–11]. Notably, the histidine-rich protein 3 of *P. falciparum* (*Pf*HRP3) can be detected by most *Pf*HRP2-RDTs at parasitaemia levels ≥ 1000 parasites/µL due to the conservation of repeat epitopes in both antigens, resulting in cross-reactivity of *Pf*HRP3 with *Pf*HRP2 MAbs [12].

The genes encoding *Pf*HRP2 and *Pf*HRP3 (*pfhrp2* and *pfhrp3*, respectively) are located in highly labile subtelomeric regions of chromosomes 8 (*pfhrp2*) and 13 (*pfhrp3*), so it is common for deletion mutations to occur and the encoded proteins are not expressed [8, 13]. These deletions contribute to the false-negative detection of *Pf*HRP2 by *Pf*HRP2-RDTs [14]. Since *pfhrp2* and *pfhrp3* are located on different chromosomes, cases have been described in which the deletion affects only one of these two genes, such that when only the *pfhrp2* gene is deleted, the presence of *Pf*HRP3 above a certain antigen threshold still enables detection by *Pf*HRP2-RDTs [12, 15–17].

In studies assessing the prevalence of *pfhrp2* and *pfhrp3* gene deletions, the WHO recommends including molecular PCR techniques to confirm gene absence and establishes a 5% prevalence of *pfhrp2/3* deletion among the false-negatives of the *Pf*HRP2-RDT as a threshold for routine use *Pf*HRP2-RDTs [18]. Regarding the African continent, several studies in different countries have reported the presence of deletions close to or above the WHO threshold; therefore, a continuous surveillance system is needed to monitor the status of these deletions in the countries of the African continent [19, 20].

The *pfhrp2* and *pfhrp3* genes consist of two exons separated by an intron. Exon 1 and the beginning of exon 2 code for the signal peptide and cleavage sequence, while exon 2 contains the protein-coding sequence consisting of histidine- and alanine-rich repeats distributed in tandem [8, 21, 22]. These genes have great variability, which translates into a wide diversity of the proteins they encode [22–25]. Prior research hypothesized that the variability of the antigen itself may affect RDT sensitivity depending on the number and type of these amino acid repeats [26]. In particular, it was postulated that these amino acid repeats, e.g., Type 2 (AHHAHHAAD), Type 4 (AHH) and Type 7 (AHHAAD) previously described by Baker et al. [26], could exert an influence on the sensitivity of *Pf*HRP2-RDTs. Variability in the target epitopes of MAbs has also been reported to influence RDT performance [27].

Angola is a malaria-endemic country located in southwest Africa. According to WHO, Angola accounted for 3.1% of malaria cases and 2.7% of malaria deaths in 2023, making it the seventh country with the highest prevalence and mortality in the world [28]. Cubal is a municipality in Benguela province, located in west-central Angola, where more than 90% of malaria cases are due to *P. falciparum* infections [29–31]. Hospital Nossa Senhora da Paz (HNSP) is the main medical institution in Cubal, where malaria diagnosis is performed almost exclusively by microscopy of thick blood smears and occasionally by RDT [29]. A recent study using samples from patients recruited in the provinces of Uíge and Huambo (provinces in northern and central Angola, respectively)

reported a low proportion of *pfhrp2* and *pfhrp3* deletions. However, to date, no studies purporting to report the genetic profile of *pfhrp2* and *pfhrp3*, nor the variability of the proteins they encode, have been conducted in Angola.

The main objective of this study was to determine the frequency of exon 1–2 and 2 deletions of the *pfhrp2* and *pfhrp3* genes in Cubal, Angola. Protein variability based on variations in the amino acid sequences of *Pf*HRP2 and *Pf*HRP3 was also characterized by analysing the different amino acid repeats and MAbs-binding epitopes used by *Pf*HRP2-RDTs. In addition, the sensitivity of *Pf*HRP2-RDTs was determined as a function of the variability of the antigen itself according to a theoretical model first predicted by Baker et al. [26].

Methods

Study population and sample collection

A convenience study was conducted in which a total of 100 dried blood spot (DBS) samples from patients with suspected malaria, previously confirmed positive for *Plasmodium* spp. DNA by real-time PCR, were analysed as part of a previous study conducted at HNSP in Cubal, Angola, between May and July 2022 [31]. All procedures related to sample collection, malaria field diagnosis (microscopy and RDT), DNA extraction (from 20 µL of DBS for all samples), molecular detection of *Plasmodium* spp., and identification of *Plasmodium* species by real-time PCR were described in detail in Mediavilla et al. [31].

Rapid diagnostic test

The RDT employed in this study was the STANDARD™ Q Malaria Pf/Pan Ag test (SD Biosensor, Republic of Korea). This assay is based on membrane immunochromatography and is designed for the qualitative detection of *P. falciparum*-specific *Pf*HRP2, as well as *Plasmodium* spp. (*P. falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, and *Plasmodium malariae*) via panmalaric LDH (pLDH). The assay has a detection threshold of 163 parasites/µL. All procedures were performed in accordance with the manufacturer's guidelines [31].

Analysis of deletions in the pfhrp2 and pfhrp3 genes

For the analysis for deletions in the *pfhrp2* and *pfhrp3* genes, a flow chart was established as shown in Fig. 1. Exon 1–2 of both genes were amplified according to the protocol established by Bharti et al. [32], and that of Baker et al. [26] for exon 2, with slight modifications. The primers used and the conditions for each PCR are shown in Table S1 (Additional file 1). PCR amplicons were visualized on 1.5% agarose gel stained with CondaSafe Stain (Condalab, Madrid, Spain). All PCR reactions were performed on the Applied Biosystems SimpliAmp Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Plasmodium species identification by real-time PCR was not possible in all cases. Therefore, a nested PCR for amplification of the *P. falciparum pfcrt* gene (fragment *pfcrt*−76) was performed on *Plasmodium* spp.-positive samples (*P. falciparum* + undetermined species) to identify the remaining *P. falciparum* and check the quality of the sample DNA. Thus, the absence of amplification of the *pfhrp2* and *pfhrp3* genes would be due to a true deletion. The primers and PCR conditions for the amplification of *pfcrt*−76 are shown in Table S1 (Additional file 1) [33].

All PCR reactions were performed on the Applied Biosystems SimpliAmp Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), and PCR amplicons were visualized on 1.5% agarose gel stained with CondaSafe Stain (Condalab, Madrid, Spain).

If no amplification in any of the genes was observed, the PCR was repeated. If the result of the second PCR was still negative, and the DNA quality control PCR (*pfcrt*−76) had amplified correctly, the corresponding exon was considered deleted. For exon 1–2 of both genes, a third nested PCR was conducted using a modified elongation temperature of 60 °C to confirm the deletion, as this condition has been shown to enhance the sensitivity of the PCR [34] (Fig. 1). Negative controls (nuclease-free water) and positive controls (*P. falciparum* DNA extracted from the blood of a patient diagnosed with malaria by microscopy and real-time PCR, and positive for *Pf*HRP2 by RDT) were included in all reactions. Negative controls for the amplification of *pfhrp2* and *pfhrp3* were not included as no strains with the deleted genes were available.

For each gene (*pfhrp2* and *pfhrp3*), partial deletions were considered when only the absence of amplification was observed in one of the two exons analysed (exon 1–2 or exon 2). In addition, in samples with amplification of exon 1–2 of *pfhrp3*, the Ct values of the real-time PCR used for *Plasmodium* spp. detection were all ≤ 34.27. Therefore, this value was established as the detection limit to consider a true deletion or a candidate deletion, and thus not overestimate the deletions in this genetic region. True deletions were defined as the absence of amplification of *pfhrp3* exon 1–2 with Ct ≤ 34.27, indicating sufficient parasite DNA to confirm gene loss. In contrast, candidate deletions were defined as cases with no amplification of *pfhrp3* exon 1–2 and Ct > 34.27, where low parasite density could limit PCR sensitivity, preventing confirmation of the deletion. Ct values from real-time PCR that detected *Plasmodium* spp. infections were used as an indirect measure of parasite density.

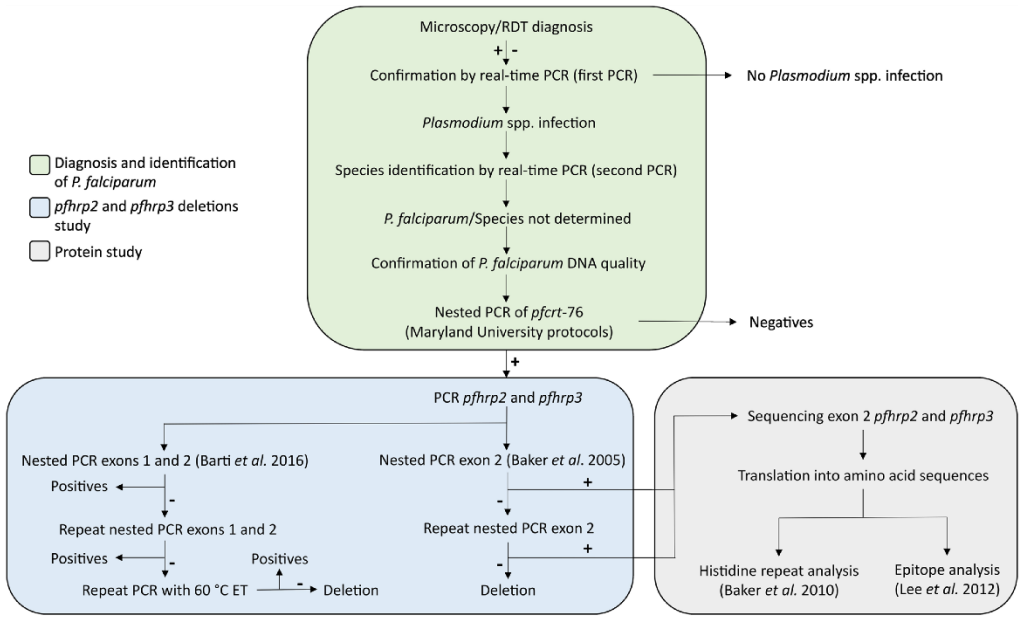


Fig. 1 Flow chart established for the study methodology. The diagnosis and identification of *P. falciparum* began with microscopy and RDT at the HNSP of Cubal. The infection was then confirmed, and the *Plasmodium* species was determined by real-time PCR. Finally, DNA quality was confirmed, and the remaining *P. falciparum* were identified by amplification of the *pfcrt*–76 gene by nested PCR. Deletions in the *pfhrp2* and *pfhrp3* genes were studied by nested PCR of exons 1–2 and 2 in duplicate for both genes. The symbol "–" indicates a lack of exon amplification, whereas "+" indicates correct amplification. Deletions were identified when two consecutive negative results were obtained. In the case of exon 1–2, an additional third nested PCR was performed by modifying the elongation temperature (ET) to 60 °C. Additionally, a subsample of *P. falciparum* was sequenced to analyse the protein variability of *Pf*HRP2 and *Pf*HRP3, specifically examining amino acid repeats and candidate epitopes for binding to the MAbs used in *Pf*HRP2-RDTs

Protein study

Sequencing of exon 2 of pfhrp2 and pfhrp3

A set of samples positive for exon 2 of *pfhrp2* and *pfhrp3* was randomly selected. PCR products were sent to the Centro Nacional de Medicina Tropical (Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain) for exon 2 Sanger sequencing. The sample was first purified using IlustraTM ExoprostarTM 1-step (GE Healthcare Life Sciences) according to the manufacturer's instructions. Sequencing was performed in both directions, with forward and reverse primers of exon 2 of both genes (Pfhrp2-2-F2 and Pfhrp2-2-R1; Pfhrp3-2-F2 and Pfhrp3-2-R1) following the protocol described by Molina-de la Fuente et al. [20]. BioEdit Sequence Alignment version 7.7.1 was used for sequence analysis, resolution of indeterminate sites, and translation of nucleotide sequences to amino acid sequences.

Amino acid sequence analysis

The histidine-rich repeats previously described by Baker et al. [22] were identified in all amino acid sequences (*Pf*HRP2 and *Pf*HRP3). Only repetitions appearing uniquely, without being part of longer ones, were considered, excluding shorter ones embedded within longer sequences. The number and position of repeats were determined using a custom Python 3.11 code (Additional file 2). Three groups of samples were established according to their sensitivity to RDT based on the theoretical regression model established by Baker et al. [26], calculating the product between the number of Type 2 and 7 repetitions: type A (≥ 100), type B (43–99) and type C (< 43) [22, 26]. Type A and B would be classified as RDT-sensitive (detection limit ≤ 250 parasites/μL) and C non-sensitive (detection limit > 250 parasites/μL) [26].

Similarly, a number of minimal epitopes were identified as potential candidates for binding the MAbs used in the *Pf*HRP2-RDTs described by Lee et al. [35], since data on MAbs used in the commercial RDT kits are

unavailable. Due to a discrepancy in the sequence of the minimal Genway epitope in Lee et al. [35], the two sequences listed in their publication were analysed separately: Genway (AYAHHAHHAHHAAY) and Genway "short" (AHHAHHAHAAY). The frequency and position of these epitopes were determined with a custom Python 3.11 code (Additional file 3).

Statistical analysis

Qualitative variables were expressed as percentages and absolute frequencies. Quantitative variables were described by mean or median and standard deviation (SD) or interquartile range (IQR) according to normality. Student's *t*-test and the Mann–Whitney-Wilcoxon test were used to test whether the mean and median Ct values (indirect estimate of parasite density) of samples with exon 1–2 deletions in *pfhrp2* and *pfhrp3* were significantly higher than in those with that exon present, respectively. Spearman's correlation test assessed any correlation between the length of *Pf*HRP2 and *Pf*HRP3. Pearson's correlation test was employed to test the correlation between amino acid sequence lengths and number of repeats of *Pf*HRP2 and *Pf*HRP3. Single-factor ANOVA followed by Tukey's test for multiple comparisons was applied to detect any significant differences in the number of repeats, epitopes and amino acids in the amino acid sequences according to the groups established based on RDT sensitivity. In all cases, the significance level was set at p-value < 0.05. Statistical analysis was carried out with the R-UCA package for Windows (version R-UCA-3.3.1).

Results

Characteristics of the study population

A total of 100 participants were included in the study, of which 59% (59/100) were female, 73% (73/100) were minors (< 18 years), and the median age was six (IQR = 1.48–18) years.

Malaria diagnosis and identification of *Plasmodium falciparum*

Of the 100 samples positive for *Plasmodium* spp. by real-time PCR, 59% (59/100) were positive by microscopy and 79% (79/100) by RDT. The band corresponding to *Pf*HRP2 was visualized in 100% (79/79) of the RDT-positive cases; however, pLDH was present in 41.77% (33/79) of cases. Table 1 shows the comparative results between microscopy and the two RDT targets.

Amplification of the *pfcrt* gene by nested PCR showed that 96% (96/100) of samples contained *P. falciparum* genetic material of sufficient quality for the deletion study (Fig. 2). Of the total samples included in the deletion study, 21.88% (21/96) were RDT-negative for *Pf*HRP2. Of these 21 discordant samples, only one (4.76%) was positive by microscopy.

Table 1 Comparison of microscopic examination and the different RDT targets

	Microscopy (+)	Microscopy (–)	*Pf*HRP2 (+)	*Pf*HRP2 (–)
pLDH (+)	33	0	33	0
pLDH (–)	1	20	41	21
*Pf*HRP2 (+)	58	21	–	–
*Pf*HRP2 (–)	1	20	–	–

All results are expressed as number of positive (+) or negative (–) samples

Deletions in *pfhrp2* and *pfhrp3*

Deletions of exons 1–2 and 2

The results of exon 1–2 and 2 deletions of the *pfhrp2* and *pfhrp3* genes are shown in Table 2. Only partial deletions of exon 1–2 were found in the *pfhrp2* and *pfhrp3* genes. A higher number of true deletions in exon 1–2 were observed for *pfhrp3* (11/96; 11.46%) compared with the *pfhrp2* gene (7/96; 7.29%). No deletions of exon 2 of *pfhrp2* or *pfhrp3* were found in any of the samples analysed. Both *pfhrp2* and *pfhrp3* genes were truly intact in 55/96 (57.29%) samples. No true co-deletion of exon 1–2 was observed for both genes. See results in Table 3.

Characteristics of the exon 1–2 deletions of pfhrp2 and pfhrp3

Ct values of samples with truly deleted exon 1–2 of *pfhrp2* or *pfhrp3* (median = 38.96, IQR = 38.23–39.21 Ct; mean = 32.72, SD = 0.7 Ct, respectively) were significantly higher than in samples in which the exon was truly present (median = 28.96, IQR = 25.28–34.53 Ct; mean = 26.18, SD = 3.56 Ct, respectively) (p-values < 0.01).

RDT was negative for *Pf*HRP2 in 4/96 (4.17%) samples in which exon 1–2 of *pfhrp2* was deleted. For these samples the real-time PCR Ct values were ≥ 36.03. On the other hand, 3/96 (3.13%) samples were RDT-positive and had exon 1–2 of *pfhrp2* deleted. These three samples had high Ct values (≥ 37.92), but one was positive by microscopy (240 parasites/µL). See Fig. 2.

A total of 11/96 (11.46%) samples had a true deletion of exon 1–2 of *pfhrp3*, and 30/96 (31.25%) samples were considered candidate deletions. Of the samples with true deletions, 2/96 (2.08%) were negative by RDT and by microscopy; in contrast, 9/96 (9.38%) had a positive RDT result and 5/96 (5.21) were positive by microscopy. Furthermore, 3/96 (3.13%) samples with candidate deletions were positive by microscopy. See Fig. 2.

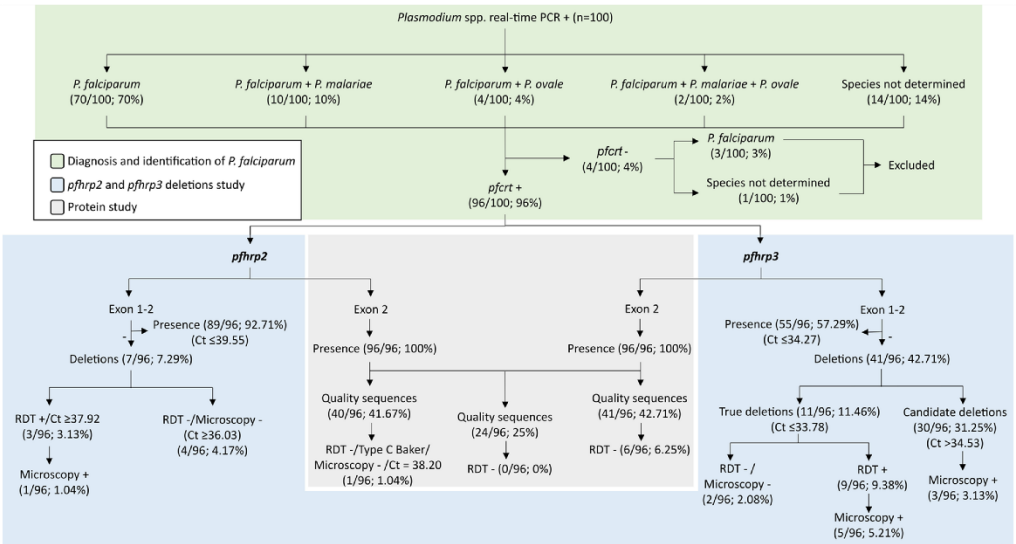


Fig. 2 Results of the molecular analysis for the study of *pfhrp2* and *pfhrp3*. Diagnosis and identification of *Plasmodium* species were performed by real-time PCR, and DNA quality and identification of *P. falciparum* was checked by nested PCR of the *pfcrt* gene. Negative PCR results for each exon or diagnosis by RDT or microscopy are represented by the symbol "−", whereas a positive result by microscopy or RDT is represented by the symbol "+". For samples with exon 1–2 deletions in *pfhrp2* and *pfhrp3*, we provide the results of RDT, microscopy, and real-time PCR Ct values. The protein variability study of *Pf*HRP2 and *Pf*HRP3 includes the total number of sequenced samples, the number of RDT-negative samples, and Baker's classification according to RDT sensitivity by amino acid repeat analysis for *Pf*HRP2

Table 2 Deletions/presence of exon 1–2 and exon 2 of *pfhrp2* and *pfhrp3* (n = 96)

	Exon 1-2[a]	Exon 2[a]	n (%)
pfhrp2			
Complete deletion	−	−	0 (0)
Partial deletion	−	+	7 (7.29)
Partial deletion	+	−	0 (0)
Complete gene	+	+	89 (92.71)
pfhrp3			
Complete deletion	−	−	0 (0)
Candidate partial deletion[b]	−	+	41 (42.71)
True partial deletion[b]	−	+	11 (11.46)
Partial deletion	+	−	0 (0)
True complete gene[c]	+	+	55 (57.29)
Candidate complete gene[c]	+	+	85 (88.54)

[a] The symbol "−" represents exon deletion and "+" its presence

[b] Candidate partial deletion: all samples with no amplification of *pfhrp3* exon 1–2 were considered deletions. True partial deletion: samples with no *pfhrp3* exon 1–2 amplification and real-time PCR Ct values ≤ 34.27 were considered deletions

[c] True complete gene: samples in which there was amplification of exon 1–2 of *pfhrp3*. Candidate complete gene: amplification of exon 1–2 of *pfhrp3* and candidate deletions (Ct > 34.27) were considered as presence of the exon

Table 3 Presence/unique deletions/co-deletions of *pfhrp2* and *pfhrp3* (n = 96)

pfhrp2		*pfhrp3*		n (%)
Exon 1-2[a]	Exon 2[a]	Exon 1-2[a]	Exon 2[a]	
+	+	+[b]	+	55 (57.29)
−	−	+[b]	+	0 (0)
+	+	−[b]	−	0 (0)
−	+	−[b]	+	7 (7.29)
+	−	+[b]	−	0 (0)
−	−	−[b]	−	0 (0)
+	+	+[c]	+	85 (88.54)
−	−	+[c]	+	0 (0)
+	+	−[c]	−	0 (0)
−	+	−[c]	+	0 (0)
+	−	+[c]	−	0 (0)
−	−	−[c]	−	0 (0)

[a] The symbol "−" represents the deletion of the exon and "+" its presence

[b] Both candidate deletions (Ct > 34.27) and true deletions (Ct ≤ 34.27) are considered deletions

[c] Only true deletions are considered deletions. Candidate deletions are considered as exon presence

Table 4 Prevalence and amino acid repeat number range in *Pf*HRP2 (n = 40) and *Pf*HRP3 (n = 41)

Repeat types	Amino acid repeat	*Pf*HRP2			*Pf*HRP3		
		Range of repeat Nº	Prevalence		Range of repeat Nº	Prevalence	
			n	%		n	%
Type 1	AHHAHHVAD	0–8	35	87.50	0–3	29	70.73
Type 2	AHHAHHAAD	6–17	40	100	0	0	0
Type 3	AHHAHHAAY	0–2	36	90	0	0	0
Type 4	AHH	0–15	32	80	1–5	41	100
Type 5	AHHAHHASD	0–2	34	85	0	0	0
Type 6	AHHATD	1–6	40	100	0	0	0
Type 7	AHHAAD	2–13	40	100	1	41	100
Type 8	AHHAAY	0–2	36	90	0	0	0
Type 9	AAY	0–1	1	2.50	0	0	0
Type 10	AHHAAAHHATD	0–3	33	82.50	0	0	0
Type 11	AHN	0	0	0	0–1	1	2.44
Type 12	AHHAAAHHEAATH	0–1	6	15	0	0	0
Type 13	AHHASD	0–1	7	17.50	0	0	0
Type 14	AHHAHHATD	0–1	3	7.50	0	0	0
Type 15	AHHAHHAAN	0	0	0	0–1	35	85.37
Type 16	AHHAAN	0–1	1	2.50	5–16	41	100
Type 17	AHHDG	0	0	0	2–10	41	100
Type 18	AHHDD	0	0	0	1–3	41	100
Type 19	AHHAA	0–4	23	57.50	0–3	2	4.88
Type 20	SHHDD	0	0	0	0–1	41	100
Type 21	AHHAHHATY	0	0	0	0	0	0
Type 22	AHHAHHAGD	0	0	0	0	0	0
Type 23	ARHAAD	0	0	0	0	0	0
Type 24	AHHTHHAAD	0	0	0	0	0	0

Analysis of the protein sequences of *Pf*HRP2 and *Pf*HRP3

Nucleotide and amino acid sequences

Exon 2 was sequenced in 40/96 (41.67%) samples for *pfhrp2* and 41/96 (42.71%) for *pfhrp3* with sufficient quality to perform the protein study; exon 2 of both genes was sequenced in 24/96 (25%) samples (Fig. 2). All sequences were submitted to the GenBank database (accession numbers: PQ868099- PQ868138 and PQ868139- PQ868179).

The nucleotide sequences of *pfhrp2* and *pfhrp3* ranged in size from 604 to 844 (average 734.73) and 407–613 (average 526.27) nucleotides, with an average C + G content (%) of 54.85% and 47.97%, respectively. The amino acid sequences of *Pf*HRP2 and *Pf*HRP3 ranged in length from 201 to 281 (average 244.55) and 135–204 (average 175.05) amino acids, respectively. No statistically significant correlation was observed between the length of *Pf*HRP2 and *Pf*HRP3 (p-value > 0.05, r = 0.137). The most abundant amino acids in *Pf*HRP2 were alanine (42.29%), histidine (40.55%), and aspartic acid (11.34%). In contrast, in *Pf*HRP3, they were histidine (33.86%), alanine (33.34%), asparagine (10.24%), and aspartic acid (10.12%).

Histidine-rich repeat patterns

The prevalence and range of the number of repeats per *Pf*HRP2 and *Pf*HRP3 sample for each amino acid repeat type are shown in Table 4.

PfHRP2 A total of 15 types of previously described amino acid repeats were found. The average number of repeats was 30.77 (SD = 2.83) per sequence. In all cases, Types 2, 6 and 7 were present and presented the highest average repeat frequency (11.73 (SD = 2.34), 2.93 (SD = 1.10), and 6.03 (2.19) times per sequence, respectively). The total number of repeats correlated with sequence length (p-value < 0.001, r = 0.76). The different repetition patterns are shown in Fig. S1 (Additional file 4).

PfHRP3 A total of 10 different types of previously described repeats were found. The average number of

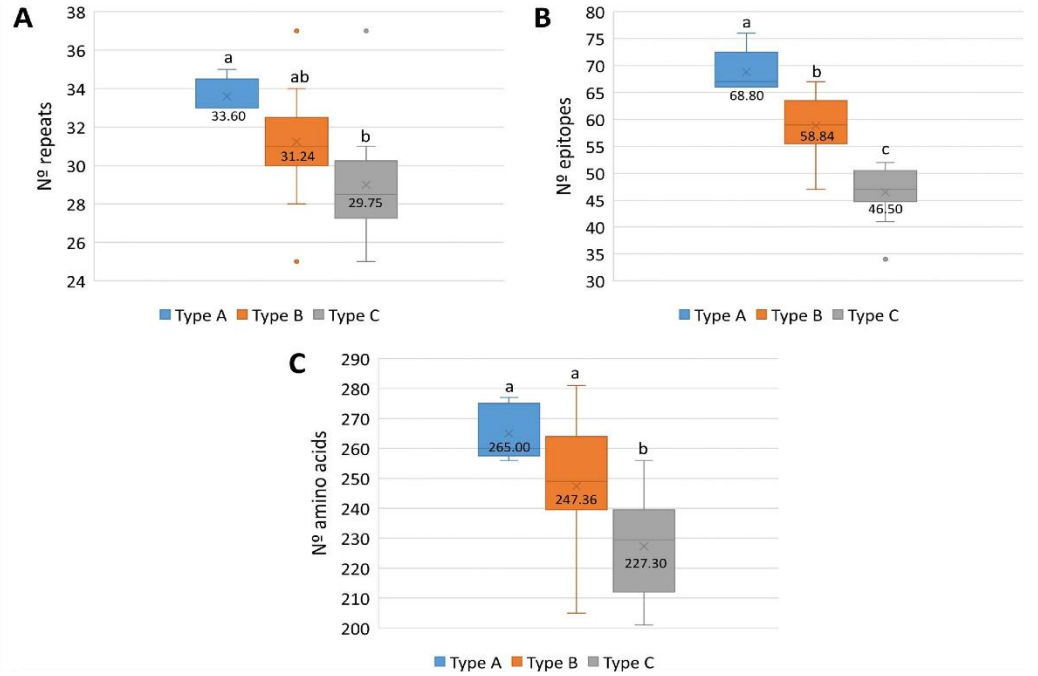


Fig. 3 Relationship between RDT sensitivity and *Pf*HRP2 characterization. Groups are established based on the theoretical RDT sensitivity of *Pf*HRP2 according to the product of Type 2 and 7 repeats described by Baker et al. [22], and are plotted as a function of A) total number of histidine repeats, B) total number of candidates RDT MAbs-binding epitopes, and C) total number of *Pf*HRP2 amino acids. Numerical values represent the mean of each variable per group, and the outer dots represent extreme values. Letters "a", "b", and "c" represent significant differences for each variable (histidine repeats, epitopes, and amino acids) between groups of samples with different RDT sensitivities (A, B, and C) (p-value < 0.05)

repeats was 24.07 (SD = 2.96) per sequence. Types 4, 7, 16, 17, 18, and 20 were present in 100% (41/41) of cases with average frequencies of 1.46 (SD = 0.92), 1 (SD = 0), 11.20 (SD = 2.19), 5.63 (SD = 1.79), 1.93 (SD = 0.52), and 1 (SD = 0) times per sequence, respectively. The total number of repeats was significantly related to the length of the sequences (p-value < 0.001, r = 0.92). The different repetition patterns are shown in Fig. S2 (Additional file 4).

RDT sensitivity The classification of *P. falciparum* samples according to their theoretical sensitivity to RDT was as follows: 5/40 (12.5%) samples were type A, 25/40 (62.5%) were type B, and 10/40 (25%) were type C. All type A samples presented parasite densities > 250 parasites/μL and were RDT-positive. Among type B samples, 22/25 (88%) corresponded to parasite densities > 250 parasites/μL, 2/25 (8%) had parasite densities < 250 parasites/μL and were positive for *Pf*HRP2 by RDT, and 1/25 (4%) was negative by microscopy (Ct = 33.49) and positive by RDT. In contrast, 7/10 (70%) type C samples had parasite densities > 250 parasites/μL, 2/10 (20%) were negative by microscopy (Ct = 33.55 and 38.96) and positive by RDT, and only 1/10 (10%) was negative by microscopy (Ct = 38.20) and RDT.

Based on the hypothesis—assuming Baker's model is correct—that the sensitivity of *Pf*HRP2-RDTs could be related to sequence length and the total number of epitopes and amino acid repeats, an analysis was conducted to evaluate these associations. Figure 3 shows the comparison of samples classified according to their theoretical sensitivity to RDT (types A, B, and C) with respect to the total number of histidine repeats, epitopes and amino acids of the *Pf*HRP2 protein. The average number of histidine repeats was significantly higher in Type A (mean = 33.30, SD = 0.89 repeats) than in Type C samples (29.75, SD = 2.33 repeats) (p-value < 0.01). Type A samples had the highest number of epitopes (mean = 68.80, SD = 4.21 epitopes), followed by Type B (mean = 58.84, SD = 4.9 epitopes) and Type C (mean = 46.4, SD = 5.44 epitopes) (p-values < 0.001). The mean number of amino acids was significantly higher in Type A (mean = 265.00, SD = 9.35 amino acids) and B (mean = 247.36,

Table 5 Prevalence and frequency per isolate of candidate MAbs-binding epitopes of *Pf*HRP2-RDTs for *Pf*HRP2 (n = 40) and *Pf*HRP3 (n = 41)

MAb[a]	Minimum epitope	*Pf*HRP2				*Pf*HRP3			
		Prevalence		Frequency per isolate		Prevalence		Frequency per isolate	
		n	%	Median	IQR	n	%	Median	IQR
3A4	AHHAHHA	40	100	15	14–16	37	90.24	1	1–1
2G12-1C12	DAHHAADAHH	40	100	6	4.75–7	0	0	0	0
1E1-A9	AHHAHHV	35	87.50	2	1–3	30	73.17	1	0–1
A6-4	HATDAHH	40	100	4	3–5	0	0	0	0
C1-13	AHHAADAHH	40	100	18	15–20.25	0	0	0	0
N7	DAHHAADAHHA	40	100	6	4.75–7	0	0	0	0
PTL-3	YAHHAHHA	40	100	2	2–3	0	0	0	0
S2-5	AHHASDAHHA	34	85	1	1–1	0	0	0	0
TC-10	TDAHHAADAHHAADA	27	67.50	1	0–1	0	0	0	0
C2-3	HAHHAHHAADAHH	14	35	0	0–1	0	0	0	0
Genway	AYAHHAHHAAY	0	0	0	0	0	0	0	0
Genway "short"	AHHAHHAAY	36	90	1	1–2	0	0	0	0

[a] MAb: Monoclonal antibody

SD = 18.41 amino acids) with respect to Type C samples (mean = 227.30, SD = 17.62 amino acids) (p-values < 0.05).

Candidate epitopes to be recognized by the MAbs used in RDTs

The prevalence and frequency of RDT MAbs-binding epitopes located in exon 2 sequences of *Pf*HRP2 and *Pf*HRP3 are shown in Table 5.

PfHRP2 All epitopes studied were found except Genway. The average number of epitopes was 57 (SD = 8.47) per sequence. All sequences had epitopes 3A4, 2G12-1C12, A6-4, C1-13, N7, and PTL-3. Genway "short", 1E1-A9, S2-5, and TC-10 epitopes appeared in the majority of cases (36/40, 90%; 35/40, 87.5%; 34/40, 85%; and, 27/40, 67.5%, respectively). The C2-3 epitope was found in 35% (14/40) of sequences. The epitopes with the highest frequency per isolate were C1-13 (median = 18, IQR = 15–20.25) and 3A4 (median = 15, IQR = 14–16). In contrast, the least frequent epitopes per isolate were S2-5 (median = 1, IQR = 1–1), Genway "short" (median = 1, IQR = 1–2), TC-10 (median = 1, IQR = 0–1), and C2-3 (median = 0, IQR = 0–1). The only RDT-negative sample presented a lower number of total epitopes (41 epitopes) compared with the average of all sequences (57 epitopes).

PfHRP3 Only epitopes 3A4 and 1E1-A9 were found in 90.24% (37/41) and 73.17% (30/41) of the sequences, with a median frequency of 1 (IQR = 1–1) and 1 (IQR = 0–1), respectively. The average number of epitopes was 1.80 (SD = 0.87) per sequence.

Discussion

In the last decades, the number of symptomatic patients who have access to pre-treatment diagnosis of malaria has increased, especially in African countries, thanks to the implementation of *Pf*HRP2-RDTs in healthcare facilities as part of test-treatment strategies [19]. Due to recent reports of *pfhrp2* gene deletions in sub-Saharan African countries, the need to monitor these genetic alterations is of utmost importance as they pose a threat to malaria control and eradication efforts.

Deletions in *pfhrp2* and *pfhrp3*

Recent studies in countries neighbouring Angola, such as the Democratic Republic of the Congo (DRC), have reported a variable prevalence of deletions in the *pfhrp2* and *pfhrp3* genes. In southern provinces of the DRC, such as Kinshasa and Kwilu, which are geographically close to Angola, the prevalence of *pfhrp2* deletions was 2% and 9.2%, respectively [36, 37]. In addition, the Kinshasa study also identified *pfhrp3* deletions with a frequency of < 1% [36]. Other studies conducted in Gabon and other DRC regions reported a low prevalence of *pfhrp2* (1% and 0.27%, respectively) and *pfhrp3* (0% and 0.09%, respectively) deletions [3, 38]. A study by Plucinsky et al., conducted on outpatients in the Angolan provinces of Uíge and Huambo, aimed to test a multiplex antigen assay and report on the different antigenic profiles found. They reported *P. falciparum* genetic profiles with deletions in *pfhrp2* (Uíge) and *pfhrp2*/*pfhrp3* (Huambo), representing < 1% of the 466 samples they detected as *Plasmodium* spp. [39]. Despite

methodological differences with this study—Plucinski et al. did not aim to report on the different genetic profiles of *pfhrp2*/*pfhrp3*—the results are in agreement with this research because the low number of deletions does not seem to compromise the use of *Pf*HRP2-RDTs in Angola; however, it reinforces the importance of establishing a surveillance system for *pfhrp2* deletions. The *P. falciparum* samples included in this study did not present any double deletion of *pfhrp2/3*. In view of these results, Angola is far from reaching the WHO threshold of 5% of *pfhrp2/3* deletions causing false-negative results by RDT [18]. This, combined with the good performance of *Pf*HRP2-RDTs observed in previous studies carried out in Cubal [30], it seems that these RDTs remain an effective tool for malaria diagnosis in this region for the time being.

This study reports a significant number of exon 1–2 deletions in both *pfhrp2* (7.29%) and *pfhrp3* (11.46%). These findings align with previous studies, which also reported higher exon 1–2 deletions compared with exon 2, with deletions in *pfhrp3* being more frequent than in *pfhrp2* [20, 40]. Mutations involving the disappearance of *pfhrp2* and/or *pfhrp3* are usually due to large subtelomeric deletions involving the removal of several genes, which can lead to a partial or complete deletion of *pfhrp2* and/or *pfhrp3* [13, 14]. The present study has reported cases where the absence of amplification of exon 1–2 of *pfhrp2* suggests a direct involvement in false-negative RDT results (4.17% of samples). However, it is possible that the amplification yield of exon 1–2 is lower than that of exon 2, which could lead to an overestimation of the number of partial deletions observed in samples with low parasite density. Despite this, there were also found cases where this fragment appeared to be deleted but the RDT result was positive (3.13% of samples). No true deletion of *pfhrp3* was observed in these samples, suggesting that the positive RDT result could be attributed to cross-reactivity between *Pf*HRP3 and the MAbs used in the RDT. However, these cases exhibited low parasitaemia, so this option should be discarded. This finding could be attributed to a recent previous infection with *P. falciparum* strains carrying intact *pfhrp2* and *pfhrp3* genes, whose antigens could have remained circulating in the bloodstream of these individuals, thus producing a positive result in the RDT despite having eliminated this infection.

The detection of *pfhrp2* deletions is mainly associated with low malaria transmission environments, where the use of *Pf*HRP2-RDTs exerts selective pressure on circulating *P. falciparum* strains [15, 41]. This study reported a low number of *pfhrp2* and *pfhrp3* gene deletions, and the absence of double deletions of *pfhrp2/3* in the municipality of Cubal, Benguela province, Angola. In contrast to other sub-Saharan countries, such as Eritrea and Ethiopia, where genetic deletions have raised concerns about the policy of using *Pf*HRP2-RDTs [19, 20]. It should be noted that this study was conducted in the municipality of Cubal, which belongs to the province of Benguela (Angola). Here, the transmission rate in the years 2017 and 2018 was 290 and 181 infected persons per 1000 inhabitants, respectively [42], much higher than the incidence of 55 and 40 cases per 1000 inhabitants in Eritrea and Ethiopia [43]. Therefore, it can be hypothesized that the selective pressure effect is less pronounced in countries such as Angola. However, the high transmission of malaria in this region makes polyclonal infections more common, which may result in infections caused by both parasites with and without deletions, posing a problem when identifying the presence of parasites with deletions in the *pfhrp2* and *pfhrp3* genes by conventional PCR [44].

The function of *Pf*HRP2 and *Pf*HRP3 is unclear; nevertheless, in vitro studies revealed a possible association of *pfhrp2* and/or *pfhrp3* deletions with loss of fitness in the parasite, resulting in reduced parasitaemia in the host and difficulty for strains with the deleted gene to be maintained in high-transmission environments [45, 46]. In this study, parasitaemia estimated by real-time PCR was higher in patients with intact genes than in those infected by strains with exon 1–2 deletions. In light of the results, partial deletions of the *pfhrp2* and *pfhrp3* genes may suggest a potential fitness cost for the parasite, as the loss of these genetic regions would likely lead to the proteins they encode not being expressed and directly affect their associated functions. Although it may also be indicative of the low yield of PCRs amplifying exon 1–2.

Analysis of *Pf*HRP2 and *Pf*HRP3 variability and its relationship to RDT sensitivity

In countries with high transmission, such as Angola, polyclonal infections of several *P. falciparum* strains in the mosquito are frequent. This triggers recombination processes involving a high degree of genetic variability, resulting in different *Pf*HRP2 and *Pf*HRP3 protein profiles [20, 23, 47–49]. In this study, no significant relationship was observed between the length of *Pf*HRP2 and *Pf*HRP3 (p-value < 0.05), which seems to indicate that *pfhrp2* and *pfhrp3* variability occurs independently of each other [22]. This finding could indicate that evolutionary pressures driving gene variability act separately on each gene. Further studies are needed to elucidate whether these independent patterns are consistent in different geographic regions or under different selective pressures.

Histidine-rich repeats patterns

Despite the large variability observed among *Pf*HRP2 proteins, most repeat motifs were consistent with studies performed in other regions. For example, Type 1 repeats typically initiate the sequence, followed by Type 2 tandem repeats, with Types 7, 10 and 12 located near the C-terminal end [20, 50]. However, the translated *Pf*HRP2 sequences in this study revealed unique repeat profiles. In the case of *Pf*HRP2, most sequences in this study ended with a Type 4 repeat, rather than the Types 10 and 12 typically described in the literature [20, 23, 26, 47, 48, 51]; however, this may be due to the level of stringency of the final cut-off point of each sequence at the time of the bioinformatic analysis. In addition, three low-prevalence repeats were identified: Type 9, previously found in isolates from Papua New Guinea (PNG) and the Philippines [22, 26, 51]; Type 16, described only in Ethiopia [20]; and Type 19, observed in Cambodia, the Philippines, PNG, Kenya, India, and Ethiopia [20, 22, 23, 25, 51]. For *Pf*HRP3, the repeat profiles and motifs observed in the present study closely resemble those observed in sub-Saharan African countries, such as Ethiopia, Kenya, and Senegal, as well as in Asian regions, such as Myanmar [20, 23, 47, 52]. However, this study also reported for the first time the presence of Type 11 repeats in *Pf*HRP3 and Type 19 repeats in two samples, which have only been documented in Ethiopia [20]. The lower variability of *Pf*HRP3 observed in the samples analysed in this study appears to coincide with the patterns described in different geographical regions. Furthermore, the specific repeat motifs and their consistent patterns suggest that recombination and mutational events may be more constrained in the chromosomal region where *pfhrp3* is located compared with the region harboring *pfhrp2*.

There is some controversy regarding the effect that antigen structure variability may have on the performance of RDTs. Different studies have determined that amino acid repeat number variations in *Pf*HRP2 may determine the diagnostic outcome of RDT when parasitaemia is below a certain threshold (< 200–250 parasites/μL) [26, 49, 52–54]. In contrast, other studies have reported no such relationship [22, 25, 55]. In this study, the results for *P. falciparum* strains considered sensitive to RDT (types A and B) according to the model of Baker et al. [32, 36] showed that RDT positivity was consistently observed at all parasite densities. However, the classification of samples as non-sensitive (group C) did not conform to Baker's model. While one sample with a negative microscopy result was also negative by RDT, two samples that were negative by microscopy exhibited positive RDT results, which was an unexpected observation. On the other hand, a significant correlation was observed between amino acid sequence length and sample sensitivity according to Baker's model (p-value < 0.001). However, in view of the conflicting results with this model, it cannot be stated with certainty that the number of amino acids of *Pf*HRP2 influences RDT performance; further studies using *P. falciparum*-infected samples with negative RDT results are needed.

Candidate epitopes to be recognized by the MAbs used in RDT

Notwithstanding the considerable genetic variability of *pfhrp2* and *pfhrp3*, there appears to be a notable similarity in the structure and organization of amino acid repeats across diverse geographic regions [20]. This could be attributed to the persistence of conserved epitopes for *Pf*HRP2 over time [56].

All epitopes were identified in *Pf*HRP2, with the exception of Genway. The prevalences and frequencies observed per isolate were highly consistent with those reported in other studies conducted in Ethiopia, Ghana, Madagascar, PNG, and Central America [20, 50, 51, 57, 58]. Instead, the Genway "short" epitope was observed to be present at a high prevalence (90%), which may indicate that the presence of this epitope was underestimated due to the discrepancy in the sequence of the minimal Genway epitope in the Lee et al. publication [35].

In the study by Molina-de la Fuente et al. in Ethiopia, epitopes with a higher frequency per isolate (3A4 and C1-13) were more widely distributed on the surface of *Pf*HRP2, thus increasing its accessibility to RDT MAbs [20]. In this study, the most frequently identified epitopes were 3A4 and C1-13. Therefore, it can be concluded that RDTs using MAbs directed against these two epitopes could enhance the accuracy of *P. falciparum* detection. Furthermore, the considerable number of epitopes identified validates the efficacy of *Pf*HRP2-RDTs for malaria diagnosis in Angola. This is supported by other studies that reported the presence of *P. falciparum* in > 97% of malaria cases in various regions of the country [31, 59].

Notwithstanding the encouraging results of this study, the RDT failed to correctly identify one sample. Upon examination of the *Pf*HRP2 sequence structure, the number of epitopes present was markedly lower (41 epitopes) compared with the mean number of epitopes observed in all samples (57 epitopes). This finding is consistent with the statistical relationship observed between the number of epitopes per sequence and classification according to Baker's model (p-value < 0.001) since that sample belonged to type C. Moreover, the two epitopes most accessible to MAbs were less represented (3A4 = 13 and C1-13 = 13 epitopes) than the others (median 3A4 = 15 and median C1-13 = 18 epitopes). However, the limited number of false-negatives we observed by RDT prevents us from making definitive conclusions about the contribution of each epitope to RDT performance.

Regarding *Pf*HRP3, epitopes 3A4 and 1E1-A9 were observed in the majority of isolates, in accordance with the findings of other studies conducted in Ethiopia and Central America [20, 58]. The safety role of *Pf*HRP3 in cases of partial *pfhrp2* deletion may suggest that it would only be effective when the *Pf*HRP3 sequence contains the linear epitopes most accessible to the MAbs of the RDT (3A4 and C1-13). A high proportion of samples presented the 3A4 epitope (90.24%), however, its median frequency per isolate was relatively low (one epitope per sequence), suggesting that it was not readily accessible to RDT MAbs. Nevertheless, given the low prevalence of epitopes in *Pf*HRP3, it is plausible that RDT Mabs-binding is derived from conformational and non-linear epitopes [20].

Limitations of this study

Some limitations were identified in this study that could affect the interpretation of the results. First, due to the low number of samples analysed and the possibility of polyclonal infections with different genetic profiles for *pfhrp2* and/or *pfhrp3*, some cases of exon 2 deletion in *pfhrp2* and/or *pfhrp3* could have been missed [44]. On the other hand, given the results of the exon 1–2 deletions and the low parasitaemia observed in samples with these mutations, it cannot be stated with certainty that the proportion of partial deletions reported has not been overestimated due to the low yield of PCRs amplifying this genetic region. Moreover, the study did not strictly follow WHO protocol for investigating *pfhrp2* deletions. This was because this research aimed to provide a general overview of the status of *pfhrp2* and *pfhrp3* in Cubal, Angola, a region where no similar studies have been conducted. These findings aim to inform future research efforts on determining the true prevalence of *pfhrp2* and *pfhrp3* deletions in Angola. Regarding the protein study and its implications for RDT performance, this study only has data on the protein sequence of one RDT sample with a false negative result; therefore, these statements are merely indicative, and further studies including more RDT cases with false negative results are needed to reach solid conclusions.

Conclusions

This study has identified a significant number of deletions in exon 1–2 of the *pfhrp2* and *pfhrp3* genes in samples collected in Cubal (Angola). In contrast, exon 2 was consistently present in all cases analysed. In addition, valuable information has been provided on the structural and organizational characteristics of *Pf*HRP2 and *Pf*HRP3, with particular emphasis on the type and number of amino acid repeats observed. The protein variability of *Pf*HRP2 may have significant implications for RDT performance, although its impact remains to be elucidated. The findings of this study indicate that *Pf*HRP2 variants present in *P. falciparum* populations in this region possess a substantial number of potential epitopes for binding to MAbs used in RDTs. However, it is imperative to maintain continuous surveillance for possible deletions and/or alterations in the *pfhrp2* and *pfhrp3* genes to ensure the efficacy of these tests.

Abbreviations

Ct	Threshold cycle
DRC	Democratic Republic of the Congo
HNSP	Hospital Nossa Senhora da Paz
IQR	Interquartile range
LDH	Lactate dehydrogenase
MAbs	Monoclonal antibodies
PNG	Papua New Guinea
*Pf*HRP2	*P. falciparum* Histidine-rich protein 2
*Pf*HRP2-RDTs	RDTs targeting *Pf*HRP2
*Pf*HRP3	Histidine-rich protein 3 of *P. falciparum*
RDT	Rapid diagnostic test
SD	Standard deviation
WHO	World Health Organization

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1186/s12936-025-05523-2.

Additional file 1.

Additional file 2.

Additional file 3.

Additional file 4.

Acknowledgements

We thank Helena Kruyer for reviewing and correcting the manuscript, ensuring that the language is comprehensible to all readers.

Author contributions

AM, IMF, AS, PB, and ES conceived the original idea. BFM, AN, and JMC coordinated and carried out sample collection at Cubal HNSP. AM, IMF, PMV, CRM, AS, and LG carried out the molecular analysis. AM and IMF performed the data analysis. AM drafted the manuscript. AM, IMF, PMV, KF, JFM, BFS, CRM, AS, IOS, IM, PB, and ES contributed substantially to the revision of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

Not applicable. The authors declare that no financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article.

Data availability

All data generated or analysed during this study are included in this published article and its supplementary information files.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

This study was approved by the Vall d'Hebron University Hospital Drug Research Ethics Committee (PR(AG)79/2024) and by the Ethics Committee of the Angolan Ministry of Health (39 C.E/MINSA.INIS/2022). Each participant signed an informed consent form (in the case of minors, parental/guardian consent was obtained) after being informed of the objectives of the study. All procedures were performed according to the ethical guidelines of the 2013 Declaration of Helsinki.

Consent for publication
Not applicable.

Competing interests
The authors declare no competing interests.

Author details
[1]Microbiology Department, Vall d'Hebron University Hospital, Autonomous University of Barcelona, PROSICS Barcelona, Barcelona, Spain. [2]Department of Microbiology and Genetics, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain. [3]Malaria and Neglected Tropical Diseases Laboratory, National Centre for Tropical Medicine, Carlos III Health Institute, CIBER de Enfermedades Infecciosas, Madrid, Spain. [4]Programa Nacional de Controlo da Malária, PNCM, Luanda, Angola. [5]Infectious and Tropical Diseases Research Group (e-INTRO), Biomedical Research Institute of Salamanca-Center for Research in Tropical Diseases of the University of Salamanca (IBSAL-CIETUS), Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, Salamanca, Spain. [6]Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. [7]Hospital Nossa Senhora da Paz, Cubal, Angola. [8]International Health Unit Vall d'Hebron-Drassanes, Infectious Diseases Department, Vall d'Hebron University Hospital, PROSICS Barcelona, Barcelona, Spain.

Received: 21 February 2025 Accepted: 15 August 2025
Published online: 30 September 2025

References

1. Milner DA Jr. Malaria pathogenesis. Cold Spring Harb Perspect Med. 2018;8: a025569.
2. Oyegoke OO, Maharaj L, Akoniyon OP, Kwoji I, Roux AT, Adewumi TS, et al. Malaria diagnostic methods with the elimination goal in view. Parasitol Res. 2022;121:1867–85.
3. Krueger T, Ikegbunam M, Lissom A, Sandri TL, Ntabi JDM, Djontu JC, et al. Low prevalence of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 and 3 gene deletions—a multiregional study in Central and West Africa. Pathogens. 2023;12: 455.
4. Wilson ML. Malaria rapid diagnostic tests. Clin Infect Dis. 2012;54:1637–41.
5. Poespoprodjo JR, Douglas NM, Ansong D, Kho S, Anstey NM. Malaria. Lancet. 2023;402:2328–45.
6. Cortés LJ, Guerra ÁP. Concordance analysis of three diagnostic tests for malaria in the symptomatic population of Colombian endemic municipalities. Biomedica. 2020;40:117–28.
7. Reyburn H, Mbakilwa H, Mwangi R, Mwerinde O, Olomi R, Drakeley C, et al. Rapid diagnostic tests compared with malaria microscopy for guiding outpatient treatment of febrile illness in Tanzania: randomised trial. BMJ. 2007;334:403.
8. Poti KE, Sullivan DJ, Dondorp AM, Woodrow CJ. HRP2: transforming malaria diagnosis, but with caveats. Trends Parasitol. 2020;36:112–26.
9. Desakorn V, Dondorp AM, Silamut K, Pongtavornpinyo W, Sahassananda D, Chotivanich K, et al. Stage-dependent production and release of histidine-rich protein 2 by *Plasmodium falciparum*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2005;99:517–24.
10. Li B, Sun Z, Li X, Li X, Wang H, Chen W, et al. Performance of pfHRP2 versus pLDH antigen rapid diagnostic tests for the detection of *Plasmodium falciparum*: a systematic review and meta-analysis. Arch of Med Sci. 2017;13:541–9.
11. Gatton ML, Rees-Channer RR, Glenn J, Barnwell JW, Cheng Q, Chiodini PL, et al. Pan-*Plasmodium* band sensitivity for *Plasmodium falciparum* detection in combination malaria rapid diagnostic tests and implications for clinical management. Malar J. 2015;14:115.
12. Kong A, Wilson SA, Ah Y, Nace D, Rogier E, Aidoo M. HRP2 and HRP3 cross-reactivity and implications for HRP2-based RDT use in regions with *Plasmodium falciparum hrp2* gene deletions. Malar J. 2021;20:207.
13. Feleke SM, Reichert EN, Mohammed H, Brhane BG, Mekete K, Mamo H, et al. *Plasmodium falciparum* is evolving to escape malaria rapid diagnostic tests in Ethiopia. Nat Microbiol. 2021;6:1289–99.
14. Cheng Q, Gatton ML, Barnwell J, Chiodini P, McCarthy J, Bell D, et al. *Plasmodium falciparum* parasites lacking histidine-rich protein 2 and 3: a review and recommendations for accurate reporting. Malar J. 2014;13:283.
15. Gatton ML, Chaudhry A, Glenn J, Wilson S, Ah Y, Kong A, et al. Impact of *Plasmodium falciparum* gene deletions on malaria rapid diagnostic test performance. Malar J. 2020;19:392.
16. Das S, Peck RB, Barney R, Jang IK, Kahn M, Zhu M, et al. Performance of an ultra-sensitive *Plasmodium falciparum* HRP2-based rapid diagnostic test with recombinant HRP2, culture parasites, and archived whole blood samples. Malar J. 2018;17:118.
17. Beshir KB, Sepúlveda N, Bharmal J, Robinson A, Mwanguzi J, Busula AO, et al. *Plasmodium falciparum* parasites with histidine-rich protein 2 (*pfhrp2*) and *pfhrp3* gene deletions in two endemic regions of Kenya. Sci Rep. 2017;7:14718.
18. WHO. Surveillance template protocol for *pfhrp2/pfhrp3* gene deletions. Geneva: world health organization; 2020. https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/331196/9789240002036-eng.pdf. Accessed 20 Feb 2025.
19. Berhane A, Anderson K, Mihreteab S, Gresty K, Rogier E, Mohamed S, et al. Major threat to malaria control programs by *Plasmodium falciparum* lacking histidine-rich protein 2, Eritrea. Emerg Infect Dis. 2018;24:462–70.
20. Molina-de la Fuente I, Yimar M, García L, González V, Amor A, Anegagrie M, et al. Deletion patterns, genetic variability and protein structure of *pfhrp2* and *pfhrp3*: implications for malaria rapid diagnostic test in Amhara region, Ethiopia. Malar J. 2022;21:287.
21. Sullivan DJ Jr, Ayala YM, Goldberg DE. An unexpected 5' untranslated intron in the *P. falciparum* genes for histidine-rich proteins II and III. Mol Biochem Parasitol. 1996;83:247–51.
22. Baker J, Ho MF, Pelecanos A, Gatton M, Chen N, Abdullah S, et al. Global sequence variation in the histidine-rich proteins 2 and 3 of *Plasmodium falciparum*: implications for the performance of malaria rapid diagnostic tests. Malar J. 2010;9:129.
23. Nderu D, Kimani F, Thiong'o K, Karanja E, Akinyi M, Too E, et al. *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein (PfHRP2 and 3) diversity in Western and Coastal Kenya. Sci Rep. 2019;9: 1709.
24. Amoah LE, Abankwa J, Oppong A. *Plasmodium falciparum* histidine rich protein-2 diversity and the implications for PfHRP 2: based malaria rapid diagnostic tests in Ghana. Malar J. 2016;15:101.
25. Kumar Bharti P, Singh Chandel H, Krishna S, Nema S, Ahmad A, Udhayakumar V, et al. Sequence variation in *Plasmodium falciparum* Histidine Rich Proteins 2 and 3 in Indian isolates: implications for malaria rapid diagnostic test performance. Sci Rep. 2017;7:1308.
26. Baker J, Mccarthy J, Gatton M, Kyle DE, Belizario V, Luchavez J, et al. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* Histidine-Rich Protein 2 (PfHRP2) and its effect on the performance of PfHRP2-based rapid diagnostic tests. J Infect Dis. 2005;192:870–7.
27. Lee N, Baker J, Andrews KT, Gatton ML, Bell D, Cheng Q, et al. Effect of sequence variation in *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 on binding of specific monoclonal antibodies: implications for rapid diagnostic tests for malaria. J Clin Microbiol. 2006;44:2773–8.
28. WHO. World malaria report 2024. Geneva: world health organization; 2024. https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2024. Accessed 20 Feb 2025.
29. Salvador F, Cossio Y, Riera M, Sánchez-Montalvá A, Bocanegra C, Mendioroz J, et al. Changes in malaria epidemiology in a rural area of Cubal, Angola. Malar J. 2015;14: 21.
30. Mediavilla A, Silgado A, Febrer-Sendra B, Crego-Vicente B, Martínez-Vallejo P, Maturana CR, et al. Real-time PCR for malaria diagnosis and identification of *Plasmodium* species in febrile patients in Cubal, Angola. Parasit Vectors. 2024;17: 384.
31. Mediavilla A, Febrer-Sendra B, Silgado A, Martínez-Vallejo P, Crego-Vicente B, Nindia A, et al. Evaluation of dried blood spot sampling for real-time PCR malaria diagnostics in a rural setting in Angola. Parasit Vectors. 2025;18:44.
32. Bharti PK, Chandel HS, Ahmad A, Krishna S, Udhayakumar V, Singh N. Prevalence of *pfhrp2* and/or *pfhrp3* gene deletion in *Plasmodium falciparum* population in eight highly endemic states in India. PLoS ONE. 2016;11: e0157949.
33. Maryland University Protocols. http://www.medschool.umaryland.edu/malaria/Protocols/. Accessed 20 Feb 2025.
34. Parr JB, Anderson O, Juliano JJ, Meshnick SR. Streamlined, PCR-based testing for *pfhrp2*- and *pfhrp3*-negative *Plasmodium falciparum*. Malar J. 2018;17:137.
35. Lee N, Gatton ML, Pelecanos A, Bubb M, Gonzalez I, Bell D, et al. Identification of optimal epitopes for *Plasmodium falciparum* rapid

diagnostic tests that target histidine-rich proteins 2 and 3. J Clin Microbiol. 2012;50:1397–405.
36. Nundu SS, Arima H, Simpson SV, Chitama BYA, Munyeku YB, Muyembe JJ, et al. Low prevalence of *Plasmodium falciparum* parasites lacking *pfhrp2/3* genes among asymptomatic and symptomatic school-age children in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. Malar J. 2022;21(1): 126.
37. Munyeku YB, Musaka AA, Ernest M, Smith C, Mansiangi PM, Culleton R. Prevalence of *Plasmodium falciparum* isolates lacking the histidine rich protein 2 gene among symptomatic malaria patients in Kwilu Province of the Democratic Republic of Congo. Infect Dis Poverty. 2021;10:77.
38. McCaffery JN, Nace D, Herman C, Singh B, Sompwe EM, Nkoli PM, et al. *Plasmodium falciparum pfhrp2* and *pfhrp3* gene deletions among patients in the DRC enrolled from 2017 to 2018. Sci Rep. 2021;11:22979.
39. Plucinski MM, Herman C, Jones S, Dimbu R, Fortes F, Ljolje D, et al. Screening for *Pfhrp2/3*-deleted *Plasmodium falciparum*, non-*falciparum*, and low-density malaria infections by a multiplex antigen assay. J Infect Dis. 2019;219:437–47.
40. Berzosa P, González V, Tavarillo L, Mayor A, Romay-Barja M, García L, et al. First evidence of the deletion in the *pfhrp2* and *pfhrp3* genes in *Plasmodium falciparum* from Equatorial Guinea. Malar J. 2020;19:99.
41. Watson OJ, Slater HC, Verity R, Parr JB, Mwandagalirwa MK, Tshefu A, et al. Modelling the drivers of the spread of *Plasmodium falciparum hrp2* gene deletions in sub-Saharan Africa. Elife. 2017;6: e25008.
42. Tavares W, Morais J, Martins JF, Scalsky RJ, Stabler TC, Medeiros MM, et al. Malaria in Angola: recent progress, challenges and future opportunities using parasite demography studies. Malar J. 2022;21:396.
43. WHO. World malaria report 2023. Geneva: world health organization; 2023. https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2023. Accessed 20 Feb 2025.
44. Gatton ML, Dunn J, Chaudhry A, Ciketic S, Cunningham J, Cheng Q. Implications of parasites lacking *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 on malaria morbidity and control when rapid diagnostic tests are used for diagnosis. J Infect Dis. 2017;215:1156–66.
45. Nair S, Li X, Nkhoma SC, Anderson T. Fitness costs of *pfhrp2* and *pfhrp3* deletions underlying diagnostic evasion in malaria parasites. J Infect Dis. 2022;226:1637–45.
46. Sepúlveda N, Phelan J, Diez-Benavente E, Campino S, Clark TG, Hopkins H, et al. Global analysis of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein-2 (*pfhrp2*) and *pfhrp3* gene deletions using whole-genome sequencing data and meta-analysis. Infect Genet Evol. 2018;62:211–9.
47. Alemayehu GS, Messele A, Blackburn K, Lopez K, Lo E, Janies D, et al. Genetic variation of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 and 3 in Assosa zone, Ethiopia: its impact on the performance of malaria rapid diagnostic tests. Malar J. 2021;20:394.
48. Lê HG, Kang JM, Lee J, Yoo WG, Myint MK, Lin K, et al. Genetic variations in histidine-rich protein 2 and histidine-rich protein 3 of Myanmar *Plasmodium falciparum* isolates. Malar J. 2020;19:388.
49. Kumar N, Singh JPN, Pande V, Mishra N, Srivastava B, Kapoor R, et al. Genetic variation in histidine rich proteins among Indian *Plasmodium falciparum* population: possible cause of variable sensitivity of malaria rapid diagnostic tests. Malar J. 2012;11:298.
50. Addai-Mensah O, Dinko B, Noagbe M, Ameke SL, Annani-Akollor ME, Owiredu EW, et al. *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 diversity in Ghana. Malar J. 2020;19:256.
51. Willie N, Zimmerman PA, Mehlotra RK. *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 gene variation in a malaria-endemic area of Papua New Guinea. Am J Trop Med Hyg. 2018;99:697–703.
52. Wurtz N, Fall B, Bui K, Pascual A, Fall M, Camara C, et al. *Pfhrp2* and *pfhrp3* polymorphisms in *Plasmodium falciparum* isolates from Dakar, Senegal: impact on rapid malaria diagnostic tests. Malar J. 2013;12:34.
53. Kumar N, Pande V, Bhatt RM, Shah NK, Mishra N, Srivastava B, et al. Genetic deletion of HRP2 and HRP3 in Indian *Plasmodium falciparum* population and false negative malaria rapid diagnostic test. Acta Trop. 2013;125:119–21.
54. Mariette N, Barnadas C, Bouchier C, Tichit M, Ménard D. Country-wide assessment of the genetic polymorphism in *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* antigens detected with rapid diagnostic tests for malaria. Malar J. 2008;7:219.
55. Mussa A, Talib M, Mohamed Z, Hajissa K. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 (*Pf*HRP2) and its effect on the performance of *Pf*HRP2-based rapid diagnostic tests. BMC Res Notes. 2019;12:334.
56. Nderu D, Kimani F, Thiong'o K, Akinyi M, Karanja E, Meyer CG, et al. PfHRP2-PfHRP3 diversity among Kenyan isolates and comparative evaluation of PfHRP2/pLDH malaria RDT with microscopy and nested PCR methodologies. Parasitol Int. 2018;67:793–9.
57. Willie N, Mehlotra RK, Howes RE, Rakotomanga TA, Ramboarina S, Ratsimbasoa AC, et al. Insights into the performance of SD bioline malaria Ag P.f/Pan rapid diagnostic test and *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 gene variation in Madagascar. Am J Trop Med Hyg. 2018;98:1683–91.
58. Fontecha G, Pinto A, Escobar D, Matamoros G, Ortiz B. Genetic variability of *Plasmodium falciparum* histidine-rich proteins 2 and 3 in Central America. Malar J. 2019;18:31.
59. Fançony C, Gamboa D, Sebastião Y, Hallett R, Sutherland C, Sousa-Figueiredo JC, et al. Various *pfcrt* and *pfmdr1* genotypes of *Plasmodium falciparum* cocirculate with *P. malariae*, *P. ovale* spp., and *P. vivax* in Northern Angola. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56:5271–7.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Artículo 4. Marcadores moleculares de resistencia a antimaláricos en los genes *pfk13*, *pfmdr1*, *pfdhfr* y *pfdhps* de *Plasmodium falciparum* en el municipio rural de Cubal, provincia de Benguela, Angola (2022-2023)

Título original: Molecular markers of antimalarial drug resistance in *pfk13*, *pfmdr1*, *pfdhfr*, and *pfdhps* genes of *Plasmodium falciparum* in a rural municipality in Cubal, Benguela Province, Angola (2022–2023).

Autores: Mediavilla A, García X, Martínez-Vallejo P, Molina-de-la-Fuente, Febrer-Sendra B, Silgado A, Francisco K, Maturana CR, Martins JF, Nindia A, Martínez-Campreción J, Aznar ML, Oliveira-Souto I, Molina I, Sulleiro E, Berzosa P.

Revista: Malaria Journal (Factor de impacto: 3; Q2 en parasitología).

Fecha de publicación: 16 de marzo de 2026.

DOI: 10.1186/s12936-026-05856-6

Resumen

Antecedentes

La malaria continúa siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en Angola, donde *P. falciparum* es responsable de la mayoría de las infecciones. El uso generalizado de AL como tratamiento de primera línea y de SP para el TPIe ejerce una presión selectiva sobre las poblaciones parasitarias locales. La vigilancia molecular de los marcadores de resistencia es esencial para monitorizar la sensibilidad y anticipar cambios que puedan influir en las estrategias de tratamiento y prevención. Este estudio analizó los polimorfismos en los genes *pfk13*, *pfmdr1*, *pfdhfr* y *pfdhps* en aislados de *P. falciparum* procedentes de Cubal, provincia de Benguela, con el objetivo de evaluar la evolución genética del parásito bajo la presión de AL y SP.

Métodos

Se llevó a cabo un estudio transversal entre 2022 y 2023 en el HNSP (Cubal). Se incluyeron un total de 139 infecciones por *P. falciparum* confirmadas mediante PCR en tiempo real. Las DBS fueron sometidas a secuenciación de los genes implicados en la resistencia. Se determinaron las frecuencias de mutaciones y haplotipos asociados a resistencia a antimaláricos.

Resultados

De las 120 secuencias de *pfk13*, se detectaron mutaciones en 12 aislados (10%), incluyendo cinco variantes no sinónimas; sin embargo, ninguna correspondió a marcadores validados o candidatos de resistencia a artemisininas. En *pfmdr1* (100 secuencias), la mutación más prevalente fue Y184F (43%), mientras que N86Y fue rara (1%) y D1246Y no se detectó. Además, se identificaron siete variantes adicionales en este gen.

De los 101 aislados correctamente secuenciados para *pfdhfr*/*pfdhps*, el 77,2% presentaba la triple mutación de *pfdhfr* N51I/C59R/S108N. En *pfdhps*, la mutación A437G se encontraba prácticamente fijada (98%), K540E mostró una prevalencia moderada (23,8%) y A581G no se detectó. Los haplotipos más frecuentes de *pfdhps* fueron IS**G**KAA (64,4%) e IS**GE**AA (22,8%). El análisis combinado de *pfdhfr*/*pfdhps* clasificó el 58,4% de los aislados como "parcialmente resistentes" (**IRNG**) y el 17,8% como "totalmente resistentes" (**IRNGE**), sin detectarse haplotipos "superresistentes". También se identificaron mutaciones adicionales no asociadas a resistencia a SP.

Conclusiones

Este estudio proporciona un perfil molecular actualizado de la resistencia a antimaláricos en un área rural de Angola. No se identificaron marcadores validados ni candidatos en *pfk13* asociados a resistencia a artemisininas. Sin embargo, la predominancia de haplotipos de *pfmdr1* vinculados a una menor sensibilidad a la lumefantrina plantea preocupaciones sobre la eficacia de AL. Aunque la SP sigue siendo adecuada para el TPIe, la presencia del haplotipo "totalmente resistente" (**IRNGE**) en *pfdhfr*/*pfdhps* sugiere posibles riesgos para su eficacia a largo plazo. Estos hallazgos refuerzan la necesidad de implementar sistemas integrados de vigilancia molecular y estudios periódicos de eficacia terapéutica para orientar las políticas de control de la malaria en entornos rurales de Angola.

Mediavilla *et al. Malaria Journal* (2026) 25:172
https://doi.org/10.1186/s12936-026-05856-6

Malaria Journal

RESEARCH

Open Access

Molecular markers of antimalarial drug resistance in *pfk13*, *pfmdr1*, *pfdhfr*, and *pfdhps* genes of *Plasmodium falciparum* in a rural municipality in Cubal, Benguela Province, Angola (2022–2023)

Alejandro Mediavilla[1,2], Xana García[3], Patricia Martínez-Vallejo[1,2], Irene Molina-de la Fuente[4,6], Begoña Febrer-Sendra[5], Aroa Silgado[1,6], Kheta Francisco[7], Carles Rubio Maturana[1], José F. Martins[7], Arlette Nindia[8], Joan Martínez-Campreciós[6,9], María Luisa Aznar[6,9], Inés Oliveira-Souto[6,9], Israel Molina[6,9], Elena Sulleiro[1,6,9*†] and Pedro Berzosa[4,6*†]

Abstract

Background Malaria remains a major cause of morbidity and mortality in Angola, where *Plasmodium falciparum* accounts for most infections. The widespread use of artemether–lumefantrine (AL) as first-line treatment and sulfadoxine–pyrimethamine (SP) for intermittent preventive treatment in pregnancy (IPTp) exerts selective pressure on local parasite populations. Molecular surveillance of drug resistance markers is essential to monitor susceptibility and anticipate changes that may influence treatment and prevention strategies. This study analyzed *pfk13*, *pfmdr1*, *pfdhfr*, and *pfdhps* polymorphisms in *P. falciparum* isolates from Cubal, Benguela province, to assess parasite genetic evolution under AL and SP pressure.

Methods A cross-sectional study was conducted between 2022 and 2023 at Hospital Nossa Senhora da Paz (Cubal). A total of 139 real-time PCR–confirmed *P. falciparum* infections were included. Dried blood spot samples underwent sequencing of the genes involved in resistance. Mutation and haplotype frequencies associated with antimalarial resistance were determined.

Results Among 120 *pfk13* sequences, mutations were detected in 12 isolates (10%), including five nonsynonymous variants, but none corresponded to validated or candidate markers of artemisinin resistance. In *pfmdr1* (100 sequences), Y184F was the most prevalent mutation (43%), N86Y was rare (1%), and D1246Y was not detected. Seven additional *pfmdr1* variants were identified.

†Elena Sulleiro and Pedro Berzosa have contributed equally to this work.

*Correspondence:
Elena Sulleiro
elena.sulleiro@vallhebron.cat
Pedro Berzosa
pberzosa@isciii.es
Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s) 2026. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License, which permits any non-commercial use, sharing, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if you modified the licensed material. You do not have permission under this licence to share adapted material derived from this article or parts of it. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/.

Of the 101 isolates correctly sequenced for *pfdhfr/pfdhps*, 77.2% carried the triple *pfdhfr* N51I/C59R/S108N mutation. In *pfdhps*, A437G was nearly fixed (98%), K540E showed moderate prevalence (23.8%), and A581G was absent. The most common *pfdhps* haplotypes were ISGKAA (64.4%) and ISGEAA (22.8%). Combined *pfdhfr/pfdhps* profiles classified 58.4% of isolates as "partially resistant" (IRNG) and 17.8% as "fully resistant" (IRNGE), with no "super-resistant" haplotypes. Additional single mutations not associated with SP resistance were also detected.

Conclusions This study provides an updated molecular profile of antimalarial resistance in a rural area of Angola. No validated or candidate *pfk13* markers of artemisinin resistance were identified. However, the predominance of *pfmdr1* haplotypes linked to reduced lumefantrine susceptibility raises concerns regarding AL efficacy. Although SP remains suitable for IPTp, the presence of the "fully resistant" haplotype (IRNGE) of *pfdhfr/pfdhps* highlight potential risks to long-term effectiveness. These findings reinforce the need for integrated molecular surveillance and periodic therapeutic efficacy studies to guide malaria control policies in rural Angola.

Keywords *Plasmodium falciparum*, Antimalarial resistance, *pfk13*, *pfmdr1*, *pfdhfr/pfdhps*, Artemether-lumefantrine, Sulfadoxine-pyrimethamine, Treatment, Chemoprevention, Angola

Introduction

Malaria remains a major global public health challenge, disproportionately affecting sub-Saharan Africa. In 2024, the World Health Organization (WHO) African Region accounted for approximately 94% of global malaria cases and 95% of malaria-related deaths [1]. Angola, located in Central Africa, reported nearly 10 million cases and 16,500 deaths in 2024, ranking sixth in terms of incidence and eighth in terms of morbidity caused by malaria worldwide [1]. Despite advances in malaria control policies, the disease remains a leading cause of morbidity and mortality in the country [2]. In 2022, 30% of all patients seeking healthcare were diagnosed with malaria, 5% of whom were diagnosed with severe malaria [3]. In 2011, malaria was responsible for 35% of outpatient visits, 40% of prenatal mortality, 25% of maternal mortality, and 35% of child mortality [4]; these are the most recent national data available.

The WHO strategy for malaria control emphasizes prompt and accurate diagnosis, timely treatment, and effective case management, complemented by preventive measures, such as vector control and chemoprophylaxis in vulnerable populations [5]. Currently, the first-line treatment for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria consists of artemisinin-based combination therapies (ACTs), while intravenous artesunate is recommended for severe cases [6]. Sulfadoxine-pyrimethamine (SP) is currently used as preventive therapy in areas with moderate-to-high *P. falciparum* transmission [7]. SP is recommended for pregnant women as intermittent preventive treatment in pregnancy (IPTp) [1]. In infants, it is administered as intermittent preventive treatment (IPTi), while in children aged 3–59 months, it is combined with amodiaquine (SP + AQ) for seasonal malaria chemoprevention (SMC) [8, 9]. Initially recommended for areas of highly seasonal malaria transmission in the African Sahel region, SMC is now progressively being extended to other endemic regions, where it has also demonstrated substantial effectiveness [8, 9].

The emergence of *P. falciparum* resistance to antimalarial drugs poses a major threat to malaria elimination [10]. Several molecular markers in the *P. falciparum* genome have been associated with resistance to artemisinins and partner drugs in ACTs [11]. Among them, the propeller domain of the *pfk13* gene has been identified as the primary marker of artemisinin resistance [12, 13]. Clinically, this phenotype is defined by delayed parasite clearance after artesunate or ACT administration [14]. In 2020, the WHO reported more than 260 nonsynonymous mutations in *pfk13* [15], of which 13 have been validated and 9 proposed as candidate resistance markers [16]. In Africa, and particularly in the southern and central regions, increasing evidence indicates the independent emergence of both validated and candidate *pfk13* resistance markers. Validated mutations such as R561H and the C469Y have been reported in the Democratic Republic of Congo (DRC) [17, 18] and M476I in Equatorial Guinea [19]. Moreover, a recent study conducted in Zambia have reported the presence of the candidate resistance marker P441L [20]. Additionally, the A578S mutation, the most frequently observed across the continent and reported in Central African countries [21], does not appear to be directly associated with delayed clearance according to some studies [22]. In Angola, available evidence indicates a predominance of wild-type *pfk13* parasites, suggesting maintained susceptibility to artemisinins [23]; however, isolated reports of validated resistance markers, including R539T and P553L, have been described in imported Angolan isolates [19, 24, 25]. Moreover, isolated cases of delayed parasite clearance and occasional ACTs treatment failure have been reported in different provinces of Angola [23, 26–29].

The *P. falciparum* multidrug resistance 1 gene (*pfmdr1*), which encodes P-glycoprotein homolog 1 (Pgh-1) [30],

harbors key polymorphisms—N86Y, Y184F, S1034C, N1042D, and D1246Y—associated with resistance to chloroquine, quinine, amodiaquine, lumefantrine, mefloquine, and piperaquine [31, 32]. The N86Y mutation is associated with resistance to chloroquine and amodiaquine, although it increases sensitivity to lumefantrine [32]. Y184F acts as a modulatory polymorphism that influences resistance when combined with other mutations; for example, the YFY haplotype (codons 86, 184, and 1246) is associated with reduced sensitivity to amodiaquine [33]. Geographically, N86Y and Y184F are more frequent in Asian and African isolates, whereas S1034C, N1042D, and D1246Y are more common in South America [32]. In Angola, a near-complete predominance of the wild-type N86 allele has been reported, a genetic background associated with reduced susceptibility to lumefantrine [23]. On the other hand, the *pfmdr1* D1246Y mutation has recently been detected in countries in West and Central Africa, including Guinea-Bissau, the DRC, and Angola [34].

Mutations in *pfdhfr* and *pfdhps* are linked to reduced sensitivity to SP [35]. In *pfdhfr*, substitutions C50R, N51I, C59R, S108N, and I164L confer pyrimethamine resistance, while in *pfdhps*, mutations S436A, A437G, K540E, A581G, and A613S/T are associated with sulfadoxine resistance [36]. The triple mutant *pfdhfr* haplotype (C**IRN**I) confers high-level pyrimethamine resistance, further intensified by the quadruple mutant (C**IRNL**) [37]. Regarding sulfadoxine resistance, the A437G mutation plays a central role, either alone or in combination with K540E; however, the triple mutant haplotype 437G/540E/581G is more strongly associated with high-level sulfadoxine resistance [38, 39]. The *pfdhps* I431V mutation, first described in 2009 [40], has been shown through crystallographic modeling to potentially reduce sulfadoxine binding and efficacy [41]. Initially detected in Nigeria, it often co-occurs with mutations 436A, 437G, 581G, and 613S [40–42], and displays a mutually exclusive distribution with K540E [38]. Until 2022, the WHO advised against the use of SP in chemoprevention strategies when the prevalence of K540E exceeded 50% for IPTi and ≥ 95% for IPTp [43, 44]; however, recent evidence suggests SP remains effective even in high-prevalence settings [45]. In contrast, areas where A581G prevalence is ≥ 10% may not be suitable for IPTp interventions [46]. In Angola and neighboring countries such as the DRC, resistance to SP is characterized by the near fixation of *pfdhfr* mutations (N51I, C59R, and S108N) and a high prevalence of the *pfdhps* A437G mutation, while critical high-level resistance markers such as *pfdhps* K540E and A581G remain at low to moderate frequencies [47, 48].

In Angola, *P. falciparum* accounts for more than 90% of malaria cases across multiple provinces [49–51]. ACTs were adopted as first-line treatment for uncomplicated malaria in 2004, with nationwide implementation of artemether-lumefantrine (AL) completed between 2007 and 2008 [52]. Benguela province, located in the central-western region of the country, reported a malaria transmission rate of 181 cases per 1000 inhabitants in 2018 [53]. In a study conducted between May and July 2022 in the rural municipality of Cubal, Benguela province, malaria prevalence in febrile patients reached 61.5% using a combined diagnostic approach based on field techniques (microscopy and rapid diagnostic test [RDT]) and real-time PCR. In that study, *P. falciparum* was identified in 100% of infections, followed by *P. malariae* (13.95%) and *P. ovale* (6.98%), detected as coinfections with *P. falciparum* [49]. The Hospital Nossa Senhora da Paz (HNSP) of Cubal—a referral hospital that treats around 22,000 patients annually and recorded a rate of 8.3% of deaths caused by malaria between 2009 and 2013—has used AL as the standard first-line treatment for uncomplicated malaria since 2012, following earlier protocols based on oral quinine plus clindamycin [54]. AL is the standard first-line treatment for uncomplicated malaria in Cubal and is therefore considered the main source of antimalarial selective pressure in this municipality. Similarly, national malaria control policies recommend the use of SP for IPTp across all transmission areas [2]. Despite having increased in recent years, IPTp coverage remains low in Angola, where only 31% of pregnant women received ≥ 3 doses in 2023–2024 [55]. On the other hand, IPTi or SMC campaigns targeting children have not yet been implemented in Angola [47], including Benguela province [56]. Moreover, no studies assessing the feasibility or effectiveness of these interventions have been conducted in rural areas, such as Cubal.

This study aimed to determine the frequency of mutations in key resistance-associated genes (*pfk13*, *pfmdr1*, *pfdhfr*, and *pfdhps*) and to characterize the molecular resistance profile related to AL and SP in the municipality of Cubal, Benguela province.

Material and methods

Study design

A cross-sectional, descriptive, convenience-based study was conducted between May and July 2022 and May 2023 at the HNSP of Cubal, in the east-central area of Benguela province, Angola (Fig. 1). Cubal has an estimated population of 300,000 inhabitants, is classified as a mesoendemic malaria area, and has a tropical climate with a low-transmission dry season (June–October) and a high-transmission rainy season (November–May) [50, 53, 54].

A total of 139 dried blood spot (DBS) samples, in which *P. falciparum* infection had been confirmed by real-time

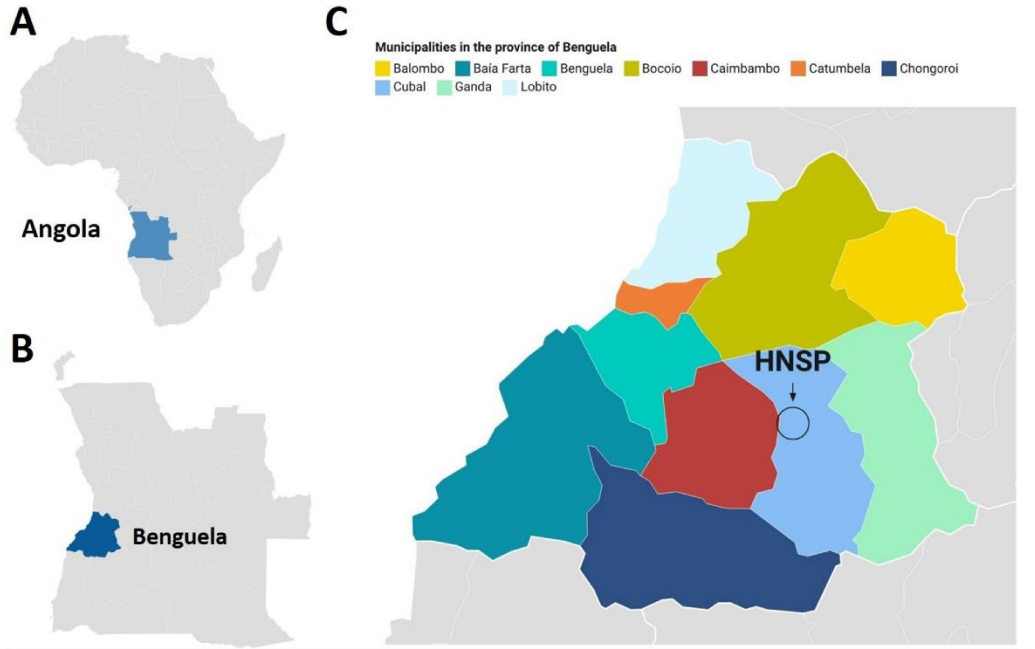


Fig. 1 Geographical location of the Hospital Nossa Senhora da Paz (HNSP). **A** Map of the African continent with Angola highlighted. **B** Map of Angola with Benguela province highlighted. **C** Municipalities of Benguela province, indicating the location of HNSP in the municipality of Cubal. The map was created using the free software Datawrapper (https://app.datawrapper.de/select/map) and Microsoft PowerPoint

PCR at the clinical laboratories of Vall d'Hebron University Hospital (HUVH, Barcelona, Spain), were analyzed [49]. The samples were obtained from febrile patients with suspected malaria who presented to the emergency department of the HNSP. Sampling was conducted in two campaigns: 86 samples were collected between May and July 2022, and 53 samples in May 2023. These sampling periods coincide with the transition from the end of the rainy season to the onset of the dry season, allowing the assessment of resistance marker dynamics during a phase of changing transmission intensity. Patients of all ages were included. The samples were sent to the HUVH for further molecular analysis. All samples were transported, stored, and processed under identical conditions, regardless of the sampling period.

Sample size calculation

The adequacy of the sample size was assessed using the standard formula for estimating proportions in cross-sectional studies, assuming a confidence level of 95%. The expected prevalences for resistance markers were obtained from data published in the study by Sitali et al. conducted in the Zambia [10]. A margin of error of 5% was applied for low- and moderate-prevalence mutations, while a wider margin of 7–9% was considered acceptable for high-prevalence markers, given the study's objective of identifying dominant or quasi-fixed resistance patterns. Under these assumptions, the number of samples successfully genotyped for each gene was sufficient to reliably characterize the molecular resistance profile in the study area.

Sample collection, diagnosis, and DNA extraction

Samples collected between May and July 2022 were obtained from venous blood by venipuncture, with 10 µL spotted onto each circle of Whatman 903™ filter paper cards (GE Healthcare Life Sciences, Cardiff, UK) for DBS preparation [49]. In May 2023, samples were obtained from capillary blood by finger prick, with whole circles of filter paper inoculated directly (each circle corresponding to 50 µL of blood). All filter paper cards were air dried for 24 h at room temperature and stored at 4 °C until shipment to the HUVH, where they were subsequently preserved at − 20 °C until molecular analysis [49]. Despite differences in sample collection, a comparable DBS volume (~ 20 µL) was used for DNA extraction in both

campaigns, ensuring result comparability; moreover, the analyses were based on nucleotide sequences, which are independent of the collection and extraction methods.

Field diagnosis of malaria (microscopy and RDT [STANDARD™ Q Malaria Pf/Pan Ag test, SD Biosensor, Republic of Korea, targeting *Pf*HRP2 and panmalarial pLDH]), DNA extraction from approximately 20 µL of blood per sample (obtained from two 10 µL spots in the first survey or from half a spot in the second), molecular detection of *Plasmodium* spp., and confirmation of *P. falciparum* infection by real-time PCR were performed following the procedures described by Mediavilla et al. [49].

Amplification, sequencing, and gene analysis

Amplification of the *pfk13*, *pfmdr1*, and *pfdhfr*/*pfdhps* genes was performed according to the protocols described by Ariey et al. [13], Li et al. [57], and Pearce et al. [58], respectively, with minor modifications. The primers used and PCR conditions for each reaction are detailed in Table S1 (Additional file 1). All PCR reactions were performed using SimpliAmp thermocyclers (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Amplicons from each genetic region were visualized on 1.5% agarose gels stained with CondaSafe Stain (Condalab, Madrid, Spain). The amplified samples for each gene were purified using Illustra™ Exoprostar™ 1 Step Kit (Avantor Science Central, Radnor, USA). They were sequenced using Sanger technology with the forward and reverse primers from the nested PCRs corresponding to each genetic fragment, following the protocol described by Molina-de la Fuente et al. [59].

Polymorphism analysis was performed on the obtained sequences using BioEdit v7.7.1 and compared to the reference sequence of the 3D7 clone. For *pfk13*, all detected mutations were evaluated and assessed for their correspondence to validated or candidate variants associated with artemisinin partial resistance, according to the WHO list [16]. For the other genes, all detected mutations were recorded, with the analysis focusing on standard resistance-associated codons in *pfmdr1*, *pfdhfr*, and *pfdhps*, as described by Martín-Ramírez et al. [60]. Samples in which the electropherograms showed peaks corresponding to different bases in the same position were classified as polyclonal infections.

SP resistance was classified according to the scheme proposed by Naidoo et al. [39]: "partially resistant", defined by the combination of *pfdhfr* 51I/59R/108N with *pfdhps* 437G (alone or together with 436A), corresponding to the **IRNG** haplotype; "fully resistant", when *pfdhfr* 51I/59R/108N is combined with *pfdhps* 437G/540E, corresponding to the **IRNGE** haplotype; and "super-resistant", defined by *pfdhfr* 51I/59R/108N associated with *pfdhps* 437G/540E/581G and/or the *pfdhfr* 164L mutation, corresponding to the **IRNGEG** haplotype [39].

When describing the different haplotypes for the *pfmdr1* and *pfdhfr*/*pfdhps* genes, if a single nucleotide polymorphism (SNP) was identified within a polyclonal infection—i.e., a mixed infection involving both wild-type and mutant *P. falciparum* populations—the haplotype considered for analysis was that of the mutant type. This approach was adopted because mutant alleles are commonly associated with antimalarial resistance and, in practice, such infections are likely to behave as drug-resistant.

Statistical analysis

Mutation and haplotype prevalences for each gene were calculated as the proportion of samples carrying the mutation relative to the total number of successfully genotyped samples. Qualitative variables were expressed as percentages and absolute frequencies, while quantitative variables were described using the mean or median and the standard deviation (SD) or interquartile range (IQR), depending on their distribution.

Results

Characteristics of the study population

A total of 139 participants positive for *P. falciparum* by real-time PCR were included in the study, of whom 78 (56.1%) were women, 42/139 (30.2%) were minors (< 18 years), and the median age was 9 years (IQR = 2–20.5).

Malaria diagnosis

Among the 139 PCR-confirmed malaria cases, 97/139 (69.8%) were positive by microscopy and 116/139 (83.5%) by RDT. The median parasite density determined by microscopy was 3,331 (IQR = 674–16,928) parasites/µL. Molecular species identification by real-time PCR showed that 117/139 (84.2%) were single *P. falciparum* infections, 14/139 (10.1%) were mixed infections with *P. falciparum* + *P. malariae*, 6/139 (4.3%) were mixed infections with *P. falciparum* + *P. ovale*, and 2/139 (1.4%) were triple infections with all three species.

Molecular markers analysis

pfk13

A total of 120/139 (86.3%) samples were successfully sequenced for *pfk13*. All sequences were submitted to the GenBank database (accession numbers: PX469096—PX469215). SNPs were detected in 12 (10%) of the samples, of which 6/12 (50%) were synonymous mutations. None of the SNPs corresponded to WHO-validated or candidate mutations associated with partial artemisinin resistance [16]. However, 5/12 (41.7%) were located

within five codons of regions where mutations are known to confer resistance. In addition, 9/12 (75%) of the SNPs were observed in mixed infections together with wild-type *P. falciparum* populations (Additional file 2). Table 1 summarizes the mutations identified in the *pfk13* sequences, along with their main characteristics.

pfmdr1

A total of 100/139 (71.9%) *pfmdr1* samples were successfully amplified and sequenced. All sequences were submitted to the GenBank database (accession numbers: PX469216—PX469315 and PX469316—PX469415). Among the markers associated with resistance to antimalarial drugs, the wild-type N86 allele was detected in all isolates. The only sample in which the N86Y mutation was observed was found in the form of a polyclonal infection together with the wild-type, and the Y184F mutation in 43/100 (43%) samples, of which 20/43 (46.5%) were mixed infections with the wild-type (Table 2; Additional file 3). The wild-type haplotype NEYSNVD was found in 57/100 (57%) isolates, the single mutant haplotype NE**F**SNVD in 42/100 (42%), and the double mutant haplotype **YEF**SNVD in only 1/100 (1%) cases (Fig. 2).

pfdhfr/pfdhps

A total of 101/139 (72.7%) samples were successfully sequenced for both *pfdhfr* and *pfdhps*. All sequences were submitted to the GenBank database (accession numbers: PX469416—PX469516 and PX469517—PX469617). In *pfdhfr*, the N51I and S108N mutations were detected in 101/101 (100%) isolates, while C59R was found in 78/101 (77.2%), and I164L was not detected in any sample (Fig. 3). The C59R mutation appeared as a mixed infection with the wild-type in 15/78 (19.2%) cases, and N51I did so in only one case. An additional mutation, L56R, not associated with pyrimethamine resistance, was detected in one sample as a polyclonal infection (Additional file 4). The triple mutant haplotype *pfdhfr* **IRNI** was observed in 78/101 (77.2%) isolates, while the double mutant haplotype **IC**N**I** was present in 23/101 (22.8%) (Table 3).

In *pfdhps*, the most frequent mutation was A437G, found in 99/101 (98%) isolates, followed by K540E in 24/101 (23.8%) and S436A in 11/101 (10.9%). Mutations I431V, A581G, and A613S were not detected in any isolate (Fig. 3). S436A occurred as a mixed infection with the wild-type in 5/11 (45.5%) cases, K540E in 7/24 (29.2%), and A437G in 2/99 (2%). The D598N mutation, not associated with sulfadoxine resistance, was observed in one isolate as a polyclonal infection (Additional file 5). The mutant haplotype IS**G**KAA was the most prevalent, detected in 65/101 (64.4%) isolates, followed by IS**GE**AA in 23/101 (22.8%), I**AG**-KAA in 10/101 (9.9%), the wild-type ISAKAA in 2/101 (2%), and the triple mutant I**AGE**AA in a single isolate (0.99%) (Table 3).

Table 1 Mutations detected in *pfk13* (n = 120)

Codon Nº	Wild-type Codon	Wild-type amino acid	Mutant codon	Mutant Amino acid	Mutation	Synonymous/ Non-synonymous	Near region implying resistance (< 5 codons) [a]	Nº of isolates n (%)	Polyclonal infection Wild-type/ mutated n (%) [b]
459	TCG	Serine	TC**A**	Serine	S459S	Yes	Yes (**N458Y**)	1 (0.8)	0 (0)
511	TAT	Tyrosine	TA**C**	Tyrosine	Y511Y	Yes	Yes (*R515K*)	1 (0.8)	1 (100)
573	ACC	Threonine	A**G**C	Serine	T573S	No	Yes (**P574L**)	1 (0.8)	1 (100)
578	GCT	Alanine	GC**C**	Alanine	A578A	Yes	Yes (**P574L**/**C580Y**)	1 (0.8)	1 (100)
581	GTT	Valine	G**C**T	Alanine	V581A	No	Yes (**C580Y**)	1 (0.8)	1 (100)
589	GTC	Valine	**A**TC	Isoleucine	V589I	No	No	1 (0.8)	0 (0)
613	CAA	Glutamine	**G**AA	Glutamate	Q613E	No	No	2 (1.7)	2 (100)
613	CAA	Glutamine	CA**G**	Glutamine	Q613Q	Yes	No	1 (0.8)	0 (0)
627	GCT	Alanine	GC**C**	Alanine	A627A	Yes	No	1 (0.8)	1 (100)
645	AAC	Asparagine	AA**T**	Asparagine	N645N	Yes	No	1 (0.8)	1 (100)
695	TCA	Serine	**A**CA	Threonine	S695T	No	No	1 (0.8)	1 (100)

[a] Validated mutations (bold) or candidate mutations (italics) whose affected codons are located within five positions of the identified SNPs

[b] Number of mutations detected in coinfection with the wild-type allele at the same position (polyclonal infections). The proportion of polyclonal infections relative to the total number of isolates carrying each mutation is shown in parentheses

Table 2 Frequency of SNPs identified in *pfmdr1* (n = 100)

	Mutation	Nº of isolates n (%)	Polyclonal infection Wild-type/ mutated n (%) [a]
Resistant mutations	N86Y	1 (1)	1 (100)
	E130K	0 (0)	–
	Y184F	43 (43)	20 (46.5)
	S1034C	0 (0)	–
	N1042D	0 (0)	–
	V1109I	0 (0)	–
	D1246Y	0 (0)	–
Non-resistant mutations	Y87C	1 (1)	1 (100)
	F103L	1 (1)	0 (0)
	D156N	1 (1)	1 (100)
	Q161Q	1 (1)	1 (100)
	N213S	1 (1)	1 (100)
	T1069T	6 (6)	2 (33.3)
	G1113D	2 (2)	1 (50)
	P1142P	2 (2)	2 (100)
	N1148N	1 (1)	1 (100)
	F1194L	1 (1)	0 (0)
	N1227N	2 (2)	2 (100)
	D1236D	1 (1)	1 (100)
	L1260L	1 (1)	1 (100)

[a] Number of mutations detected in coinfection with the wild-type allele at the same position (polyclonal infections). The proportion of polyclonal infections relative to the total number of isolates carrying each mutation is shown in parentheses

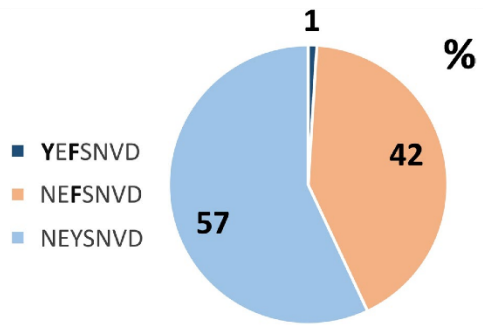


Fig. 2 Frequency of *pfmdr1* haplotypes (n = 100). The graph shows the proportions of the three *pfmdr1* haplotypes identified in the sequences analyzed: wild-type haplotype (NEYSNVD), single mutant haplotype (NEFSNVD), and double mutant haplotype (YEFSNVD). Each letter corresponds to an amino acid at the positions associated with resistance (86, 130, 184, 1034, 1042, 1109, and 1246)

Table 3 shows the combined *pfdhfr* and *pfdhps* haplotypes used for SP resistance classification. A total of 18/101 (17.8%) isolates were classified as "fully resistant" (**IRNGE**) and 59/101 (58.4%) as "partially resistant" (**IRNG**). No "super-resistant" haplotypes (**IRNGEG**) were identified. Only one sample presented the *pfdhfr* **IRN**I haplotype without any associated *pfdhps* mutations (**IRN**IISAKAA).

Discussion

Malaria, caused predominantly by *P. falciparum*, remains a major public health problem in Angola, where treatment of uncomplicated cases relies mainly on ACTs, particularly AL and artesunate-amodiaquine (ASAQ) [2, 23]. SP is also used for IPTp [2, 47]. Given the limited and geographically fragmented data on molecular markers of antimalarial resistance in Angola—especially in rural areas of Benguela province—this study provides new molecular evidence on resistance patterns to ACTs and SP through the analysis of *pfk13*, *pfmdr1*, *pfdhfr*, and *pfdhps* markers, in the rural municipality of Cubal, Benguela.

Since the adoption of ACTs (AL, Coartem®, Novartis, Basel) as first-line treatment in Angola between 2004–2008 [52], concerns have been raised about the potential selection of *pfk13* mutations under sustained drug pressure. Previous reports have identified *pfk13* mutations not linked to artemisinin resistance in the provinces of Zaire [26, 29], Lunda Sul [26], and Huambo [61]. Imported cases from Angola to China have revealed the presence of *pfk13* mutations, including the WHO-validated resistance markers R539T and P553L [19, 24, 25], as well as other variants not currently associated with artemisinin resistance [62, 63]. In the present study, five nonsynonymous *pfk13* mutations were identified, none of which correspond to validated or candidate markers of artemisinin resistance. Notably, mutation V589I and Q613E—also described in imported cases from Angola [19, 24, 25, 63]—were observed. Moreover, the detection of these nonsynonymous variants, in combination with reports of declining AL efficacy in Angola [23, 26, 29, 34, 64], emphasizes the importance for further studies to assess the potential association of SNPs, including T573S, V581A, and Q613E, with artemisinin partial resistance, which has not yet been investigated for these markers. By contrast, the A578S mutation—widespread across Africa but not linked to resistance, present in countries such as DRC, Republic of Congo, Equatorial Guinea, and Gabon [21]—was absent in our cohort, despite being reported in other Angolan provinces [26, 29, 61]. Interestingly, a synonymous substitution at the same position (A578A) was identified in a Cubal isolate, suggesting that this locus may be particularly prone to genetic modifications.

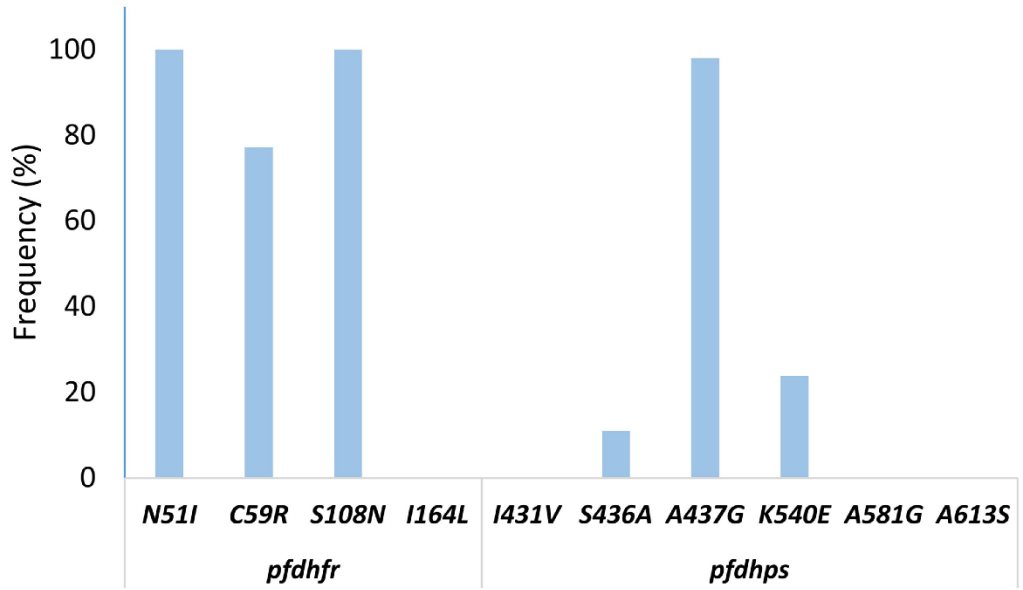


Fig. 3 Frequency of SNPs identified in *pfdhfr* and *pfdhps*. The graph shows the proportion of isolates carrying molecular markers associated with pyrimethamine resistance (*pfdhfr*: N51I, C59R, S108N, and I164L) and sulfadoxine resistance (*pfdhps*: I431V, S436A, A437G, K540E, A581G, and A613S). Numbers in parentheses indicate the number of isolates with each mutation relative to the total number of sequences analyzed (n = 101)

Table 3 Frequency of combined *pfdhfr/pfdhps* haplotypes (n = 101)

Haplotypes [a]	Type of resistance [b]	No of isolates n (%)
IRNI-I**AGE**AA	Fully	1 (1)
IRNI-IS**GE**AA	Fully	17 (16.8)
IRNI-I**AG**KAA	Partial	8 (7.9)
IRNI-IS**G**KAA	Partial	51 (50.5)
IRNI-ISAKAA	–	1 (1)
ICNI-IS**GE**AA	–	6 (5.9)
ICNI-I**AG**KAA	–	2 (2)
ICNI-IS**G**KAA	–	14 (13.9)
ICNI-ISAKAA	–	1 (1)

[a] Each letter indicates the amino acid present in the sequences at the corresponding positions (*pfdhfr*: codons 51, 59, 108, and 164; *pfdhps*: codons 431, 436, 437, 540, 581, and 613). Bold letters represent mutations, while non-bold letters correspond to the wild-type

[b] Type of sulfadoxine–pyrimethamine (SP) resistance according to the classification established by Naidoo et al.[39]

In this study, *pfmdr1* analysis—relevant for susceptibility to lumefantrine and amodiaquine [32]—showed a very low prevalence of N86Y (1%), a high prevalence of Y184F (43%), and no mutations at codon 1246. Accordingly, the dominant haplotypes were NFD and NYD, which have previously been associated with AL treatment failures in Angola [23, 26, 56]. In Cubal, the high frequency of Y184F combined with wild-type N86 and D1246 suggests selection of AL-tolerant parasites, consistent with reduced lumefantrine susceptibility reported in other provinces [23, 26, 64]. At the same time, these haplotypes are associated with increased sensitivity to amodiaquine, in line with the favorable performance of ASAQ in Angola [26, 64]. Nevertheless, despite this advantage, AL has been prioritized over ASAQ due to the latter's adverse effects and poor adherence in real-world practice [65]. The genetic profile observed highlights the need for therapeutic efficacy studies in rural settings such as Cubal—ideally conducted every two years—to assess AL performance in relation to the local *pfmdr1* background.

SP was withdrawn as first-line malaria treatment in Angola in 2006 due to widespread resistance and is currently used exclusively for chemoprevention, mainly in IPTp [47]. In Cubal, fixation of the triple *pfdhfr* mutant **IRN**I was observed, together with a very high prevalence of *pfdhps* A437G (98.0%) and a moderate prevalence of K540E (23.8%). No A581G mutations or "super-resistant" haplotypes were detected, indicating

that SP remains a viable preventive option in this rural setting. These findings are consistent with data from Benguela, Lunda Sul, and Zaire (2019), where K540E prevalence was low (10–14%) and A581G was either absent (Benguela, Lunda Sul) or < 5% (Zaire) [47]. Both values remain well below WHO thresholds (≥ 95% for K540E and ≥ 10% for A581G) that would compromise IPTp efficacy [44, 46]. Earlier surveys in Luanda and Lubango (2007–2011) reported a K540E prevalence of 6–11.7% and isolated cases of A581G (7%) [66–68]. The temporal increase in K540E prevalence from 2007 to the present suggests that ongoing SP use for IPTp may be exerting selective pressure favoring "fully resistant" parasites. If this trend continues and combines with the emergence of A581G—already reported in other provinces—the long-term effectiveness of SP-based preventive interventions in Angola could be compromised. For now, however, the absence of "super-resistant" haplotypes in Cubal supports the continued use of SP in maternal prevention programs.

The situation in Angola contrasts with that in East Africa, where the emergence of "super-resistant" parasites—particularly those carrying A581G at prevalences exceeding 40%—has severely compromised IPTp-SP efficacy, as in Uganda and Tanzania [39]. In comparison, Angola has a profile more similar to that of West and Central African countries. In Cubal, while the majority of isolates carried "partially resistant" haplotypes (58.4%), "fully resistant" parasites were detected at a significant frequency (17.8%). This places Angola between the scenarios in Nigeria or Ghana, where total resistance is rare and K540E is nearly absent [60, 69], and Equatorial Guinea, where partial resistance coexists with emerging foci of fully or even super-resistant haplotypes [36].

The molecular profile observed also suggests that SP-based chemoprevention could be considered for other strategies, such as IPTi or SMC in children, particularly in combination with amodiaquine, given the absence of *pfmdr1* resistance markers to this drug. Evidence from countries in the Sahel [8], and others such as South Sudan [9] has shown that SMC with SP + AQ significantly reduces childhood malaria, even in settings with moderate SP resistance, suggesting its potential potential applicability in Angola. However, continued SP use exerts selective pressure on *P. falciparum* [38]. The presence of a substantial proportion of "fully resistant" isolates in Cubal highlights the need for strengthened surveillance. Regular monitoring of molecular resistance markers, complemented by therapeutic efficacy studies, would be essential to detect early increases in key mutations such as K540E, A581G, or *pfdhfr* I164L and to ensure the sustained effectiveness of SP-based preventive interventions [39].

Limitations of this study

A limitation of this study is the absence of correlation analyses between the molecular markers detected and in vivo or in vitro phenotypes. Such analyses could contribute to a better understanding of the potential functional role of the *pfk13* mutations identified as markers of artemisinin resistance in Angola, as well as provide additional insight into lumefantrine response in the study area and its possible association with the *pfmdr1* genotypes detected. Future studies integrating molecular findings with therapeutic efficacy data will be necessary to better assess the clinical relevance of the variants identified. In addition, the variation in *pfmdr1* copy number, a factor associated with susceptibility to AL and potential influence on treatment efficacy [27], was not analyzed due to methodological and resource limitations. Polyclonal infections were operationally defined based on the presence of double peaks in Sanger sequencing electropherograms, as no genotyping or multiplicity of infection analyses were performed, which may have led to an underestimation of within-host parasite diversity. Another limitation was that participant recruitment took place at the end of the rainy season and the beginning of the dry season, which may have influenced parasite diversity and the observed prevalence of resistance markers; therefore, conducting similar studies during the high-transmission season is recommended to better capture seasonal variation.

Conclusions

This study provides updated information on the genetic profile of *P. falciparum* with respect to molecular markers associated with antimalarial drug resistance in the rural municipality of Cubal, Benguela province, Angola. The absence of validated or candidate *pfk13* markers of artemisinin resistance suggests that partial resistance has not yet emerged in this setting, while the patterns observed in *pfmdr1* and in the *pfdhfr*/*pfdhps* genes reflect sustained selective pressure by the antimalarial drugs currently used in the country.

The molecular profiles identified are consistent with a context in which AL, used as first-line curative treatment, and SP, currently deployed for chemoprevention in pregnant women, remain operationally effective, although early warning signals warrant continued vigilance. In this context, the resistance profile observed for SP supports its continued use in IPTp and suggests that the implementation of additional chemoprevention strategies, such as IPTi and/or SMC in children, should be considered in Angola. Overall, these findings emphasize the selective pressure exerted by AL and SP on local *P. falciparum* populations and highlight the

importance of sustained, integrated molecular surveillance, complemented by periodic therapeutic efficacy studies, to detect early changes in drug susceptibility and support timely, evidence-based malaria control and prevention strategies in rural Angola.

Abbreviations

ACTs	Artemisinin-based combination therapies
AL	Artemether-lumefantrine
ASAQ	Artesunate-amodiaquine
DBS	Dried blood spot
DRC	Democratic Republic of Congo
HNSP	Hospital Nossa Senhora da Paz
HUVH	Vall d'Hebron University Hospital
IQR	Interquartile range
IPTi	Intermittent preventive treatment in infants
IPTp	Intermittent preventive treatment in pregnancy
Pgh-1	P-glycoprotein homolog 1
pfmdr1	*P. falciparum* multidrug resistance gene
RDT	Rapid diagnostic test
SD	Standard deviation
SMC	Seasonal malaria chemoprevention
SNP	Single nucleotide polymorphism
SP	Sulfadoxine-pyrimethamine
SP + AQ	Sulfadoxine-pyrimethamine-amodiaquine
WHO	World Health Organization

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1186/s12936-026-05856-6.

Supplementary Material 1

Supplementary Material 2

Supplementary Material 3

Supplementary Material 4

Supplementary Material 5

Acknowledgements

We thank Helena Kruyer for reviewing and correcting the manuscript, ensuring that the language is comprehensible to all readers.

Author contributions

Conception and design of the study: AM, IMF, MLARA, IOS, IM, PB, and ES. Recruitment of participants and acquisition of laboratory data at the HNSP in Cubal, Angola: XG, BFS, AN, and JMC. Acquisition of molecular data and laboratory work at the Hospital Universitario Vall d'Hebron in Barcelona, Spain: AM, PMV, AS, and CRM. Drafting the manuscript and analyzing and interpreting the data: AM. Revising the article critically for important intellectual content: IMF, BFS, AS, KF, CRM, JFM, JMC, IOS, PB, and ES. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

Not applicable. The author(s) declared that no financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article.

Data availability

The data supporting the conclusions of this article are included in this manuscript. The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

This study was approved by the Vall d'Hebron University Hospital Drug Research Ethics Committee [PR(AG)79/2024] and by the Ethics Committee of the Angolan Ministry of Health (39 C.E/MINSA.INIS/2022). Each participant signed an informed consent form (in the case of minors, parental/guardian consent was obtained) after being informed of the objectives of the study. All procedures were performed according to the ethical guidelines of the 2013 Declaration of Helsinki.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Author details

[1]Microbiology Department, Vall d'Hebron University Hospital, Autonomous University of Barcelona, PROSICS Barcelona, Barcelona, Spain. [2]Department of Microbiology and Genetics, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain. [3]Diagnostic Nanotools Group, Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), 08035 Barcelona, Spain. [4]Laboratory for Scientific and Technical Cooperation on Tropical Diseases. National Centre for Tropical Medicine, Institute of Health Carlos III, Madrid, Spain. [5]Infectious and Tropical Diseases Research Group (E-INTRO), Biomedical Research Institute of Salamanca-Center for Research in Tropical Diseases of the University of Salamanca (IBSAL-CIETUS), Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, Salamanca, Spain. [6]Networked Biomedical Research Center—Infectious Diseases (CIBERINFEC), Institute of Health Carlos III, Madrid, Spain. [7]Programa Nacional de Controlo da Malária, PNCM, Luanda, Angola. [8]Hospital Nossa Senhora da Paz, Cubal, Angola. [9]International Health Unit Vall d'Hebron-Drassanes, Infectious Diseases Department, Vall d'Hebron University Hospital, PROSICS Barcelona, Barcelona, Spain.

Received: 22 November 2025 Accepted: 2 March 2026
Published online: 16 March 2026

References

1. World Health Organization (WHO). World malaria report 2025. Geneva: WHO; 2025. https://www.who.int/publications/i/item/9789240117822. Accessed 27 Jan 2026.
2. Ministério da Saúde de Angola. Manual de diagnóstico e tratamento da malária. Luanda; 2022. https://es.scribd.com/document/678479391/Manual-de-Diagno-stico-e-Tto-da-Mala-ria-2022-013722-formatado. Accessed 27 Jan 2026.
3. U.S. President's Malaria Initiative. Angola Malaria Operational Plan FY 2024. PMI; 2024. https://mesamalaria.org/wp-content/uploads/2025/04/ANGOLA-Malaria-Profile-PMI-FY-2024-1.pdf. Accessed 27 Jan 2026.
4. Ministério da Saúde de Angola. Plano Nacional de Desenvolvimento Sanitário 2012–2025, Volume II. Luanda; 2012. https://admin.mat.gov.ao/uploads/relatorio_final_comissao_multissectorial_pnds_2006631557 60b0a64397ffa_22f23d9be1.pdf. Accessed 27 Jan 2026.
5. World Health Organization. WHO guidelines for malaria. Geneva: WHO; 2024. https://media.malariaworld.org/B09146_eng_e61c150520.pdf. Accessed 27 Jan 2026.
6. Rosenthal PJ, Asua V, Conrad MD. Emergence, transmission dynamics and mechanisms of artemisinin partial resistance in malaria parasites in Africa. Nat Rev Microbiol. 2024;22:373–84.
7. World Health Organization. Directrices de la OMS sobre la malaria. Geneva: OMS; 2025. https://www.who.int/es/teams/global-malaria-programme/guidelines-for-malaria. Accessed 27 Jan 2026.
8. ACCESS-SMC Partnership. Effectiveness of seasonal malaria chemoprevention at scale in West and Central Africa: An observational study. Lancet. 2020;396:1829–40.
9. Molina-de la Fuente I, Sagrado Benito MJ, Lasry E, Ousley J, García L, González V, et al. Seasonal malaria chemoprevention in a context of high presumed sulfadoxine-pyrimethamine resistance: Malaria morbidity and molecular drug resistance profiles in South Sudan. Malar J. 2023;22:147.

10. Sitali L, Mwenda MC, Miller JM, Bridges DJ, Hawela MB, Hamainza B, et al. Surveillance of molecular markers for antimalarial resistance in Zambia: Polymorphism of *Pfkelch13*, *Pfmdr1* and *Pfdhfr/Pfdhps* genes. Acta Trop. 2020;212:105704.
11. Cui L, Mharakurwa S, Ndiaye D, Rathod PK, Rosenthal PJ. Antimalarial drug resistance: literature review and activities and findings of the ICEMR network. Am J Trop Med Hyg. 2015;93:57–68.
12. Miotto O, Amato R, Ashley EA, Macinnis B, Almagro-Garcia J, Amaratunga C, et al. Genetic architecture of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum*. Nat Genet. 2015;47:226–34.
13. Ariey F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois AC, Khim N, et al. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. Nature. 2014;505:50–5.
14. World Health Organization. World malaria report 2018. Geneva: WHO; 2018. https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2018. Accessed 27 Jan 2026.
15. World Health Organization. Report on antimalarial drug efficacy, resistance and response: 10 years of surveillance (2010–2019). Geneva: WHO; 2019. https://www.who.int/publications/i/item/9789240012813. Accessed 27 Jan 2026.
16. World Health Organization. Malaria: artemisinin partial resistance. Geneva: WHO; 2025. https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/artemisinin-resistance. Accessed 27 Jan 2026.
17. Mesia Kahunu G, Wellmann Thomsen S, Wellmann Thomsen L, Muhindo Mavoko H, Mitashi Mulopo P, Filtenborg Hocke E, et al. Identification of the *Pfk13* mutations R561H and P441L in the Democratic Republic of Congo. Int J Infect Dis. 2024;139:41–9.
18. van Loon W, Bisimwa BC, Byela V, Kirby R, Bugeme PM, Balagizi A, et al. Detection of artemisinin resistance marker Kelch-13 469Y in *Plasmodium falciparum*, South Kivu, Democratic Republic of the Congo, 2022. Am J Trop Med Hyg. 2024;110:653–5.
19. Huang F, Yan H, Xue JB, Cui YW, Zhou SS, Xia ZG, et al. Molecular surveillance of *pfcrt*, *pfmdr1* and *pfk13*-propeller mutations in *Plasmodium falciparum* isolates imported from Africa to China. Malar J. 2021;20:1–12.
20. Martin AC, Sadler JM, Simkin A, Musonda M, Katowa B, Matoba J, et al. Emergence and rising prevalence of artemisinin partial resistance marker Kelch13 P441L in a low malaria transmission setting in Southern Zambia. J Infect Dis. 2025;232:918–22.
21. Milong Melong CS, Peloewetse E, Russo G, Tamgue O, Tchoumbougnang F, Paganotti GM. An overview of artemisinin-resistant malaria and associated *Pfk13* gene mutations in Central Africa. Parasitol Res. 2024;123:1–12.
22. Das S, Kérah-Hinzoumbé C, Kebféné M, Srisutham S, Nagorngar TY, Saralamba N, et al. Molecular surveillance for operationally relevant genetic polymorphisms in *Plasmodium falciparum* in Southern Chad, 2016–2017. Malar J. 2022;21:1–12.
23. Dimbu PR, Horth R, Cândido ALM, Ferreira CM, Caquece F, Garcia LEA, et al. Continued low efficacy of artemether-lumefantrine in Angola in 2019. Antimicrob Agents Chemother. 2021;65:e01949-20.
24. She D, Wang Z, Liang Q, Lu L, Huang Y, Zhang K, et al. Polymorphisms of *pfcrt*, *pfmdr1*, and *K13-propeller* genes in imported falciparum malaria isolates from Africa in Guizhou province, China. BMC Infect Dis. 2020;20:228.
25. Zhou R, Yang C, Li S, Zhao Y, Liu Y, Qian D, et al. Molecular surveillance of drug resistance of *Plasmodium falciparum* isolates imported from Angola in Henan Province, China. Antimicrob Agents Chemother. 2019;63:e00552-19.
26. Plucinski MM, Dimbu PR, Macaia AP, Ferreira CM, Samutondo C, Quivinja J, et al. Efficacy of artemether-lumefantrine, artesunate-amodiaquine, and dihydroartemisinin-piperaquine for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Angola, 2015. Malar J. 2017;16:1–10.
27. Fançony C, Fortes-Gabriel E, Zage F, Alexiou E, Broumou I, Pernaute-Lau L, et al. Artemether-lumefantrine treatment selects *Plasmodium falciparum* multidrug resistance 1 (pfmdr1) increased copy number among African malaria infections. J Infect Dis. 2025;231:e1119–28.
28. Dimbu PR, Labuda S, Ferreira CM, Caquece F, André K, Pembele G, et al. Therapeutic response to four artemisinin-based combination therapies in Angola, 2021. Antimicrob Agents Chemother. 2024;68:e0152523.
29. Davlantes E, Dimbu PR, Ferreira CM, Florinda João M, Pode D, Félix J, et al. Efficacy and safety of artemether-lumefantrine, artesunate-amodiaquine, and dihydroartemisinin-piperaquine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in three provinces in Angola, 2017. Malar J. 2018;17:229.
30. Millogo KS, Kaboré B, Sondo P, Compaoré EW, Kouevi AFC, Kambou SAE, et al. Trend of N86Y and Y184F mutations in *Pfmdr1* gene in children under seasonal malaria chemoprevention coverage in Nanoro, Burkina Faso. Acta Parasitol. 2024;69:1967–76.
31. Ibraheem ZO, Abd Majid R, Noor SM, Sedik HM, Basir R. Role of different *pfcrt* and *pfmdr1* mutations in conferring resistance to antimalaria drugs in *Plasmodium falciparum*. Malar Res Treat. 2014;2014:1–9.
32. Veiga MI, Dhingra SK, Henrich PP, Straimer J, Gnädig N, Uhlemann AC, et al. Globally prevalent *Pfmdr1* mutations modulate *Plasmodium falciparum* susceptibility to artemisinin-based combination therapies. Nat Commun. 2016;7:11553.
33. Beshir KB, Muwanguzi J, Nader J, Mansukhani R, Traore A, Gamougam K, et al. Prevalence of *Plasmodium falciparum* haplotypes associated with resistance to sulfadoxine–pyrimethamine and amodiaquine before and after upscaling of seasonal malaria chemoprevention in seven African countries: a genomic surveillance study. Lancet Infect Dis. 2023;23:361–70.
34. Kiaco K, Teixeira J, Machado M, Do Rosário V, Lopes D. Evaluation of artemether-lumefantrine efficacy in the treatment of uncomplicated malaria and its association with *pfmdr1*, *pfatpase6* and *K13-propeller* polymorphisms in Luanda, Angola. Malar J. 2015;14:1018.
35. Quan H, Igbasi U, Oyibo W, Omilabu S, Chen SB, Shen HM, et al. High multiple mutations of *Plasmodium falciparum*-resistant genotypes to sulphadoxine-pyrimethamine in Lagos, Nigeria. Infect Dis Poverty. 2020;9:72.
36. Berzosa P, de la Fuente MI, Ta-Tang TH, González V, García L, Rodríguez-Galet A, et al. Temporal evolution of the resistance genotypes of *Plasmodium falciparum* in isolates from Equatorial Guinea during 20 years (1999 to 2019). Malar J. 2021;20:1–12.
37. Quan H, Yu P, Kassegne K, Shen HM, Chen SB, Chen JH. Polymorphism of drug resistance genes *dhfr* and *dhps* in *Plasmodium falciparum* isolates among Chinese migrant workers who returned from Ghana in 2013. Trop Med Infect Dis. 2023;8:1–11.
38. Guémas E, Coppée R, Ménard S, du Manoir M, Nsango S, Makaba Mvumbi D, et al. Evolution and spread of *Plasmodium falciparum* mutations associated with resistance to sulfadoxine–pyrimethamine in Central Africa: a cross-sectional study. Lancet Microbe. 2023;4:e983–93.
39. Naidoo I, Roper C. Mapping "partially resistant", "fully resistant", and "super resistant" malaria. Trends Parasitol. 2013;29:505–15.
40. Sutherland CJ, Fifer H, Pearce RJ, Bin Reza F, Nicholas M, Haustein T, et al. Novel *pfdhps* haplotypes among imported cases of *Plasmodium falciparum* malaria in the United Kingdom. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53:3405–10.
41. Oguike MC, Falade CO, Shu E, Enato IG, Watila I, Baba ES, et al. Molecular determinants of sulfadoxine–pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* in Nigeria and the regional emergence of *dhps* 431V. Int J Parasitol Drugs Drug Resist. 2016;6:220–9.
42. Adegbola AJ, Ijarotimi OA, Ubom AE, Adesoji BA, Babalola OE, Hocke EF, et al. A snapshot of the prevalence of dihydropteroate synthase-431V mutation and other sulfadoxine–pyrimethamine resistance markers in *Plasmodium falciparum* isolates in Nigeria. Malar J. 2023;22:1–10.
43. World Health Organization. WHO policy recommendation on intermittent preventive treatment during infancy with sulphadoxine–pyrimethamine (SP-IPTi) for *Plasmodium falciparum* malaria control in Africa. Geneva: WHO; 2010. https://www.who.int/publications/i/item/WHO-IVB-11.07. Accessed 27 Jan 2026.
44. World Health Organization. WHO Evidence Review Group on Intermittent Preventive Treatment (IPT) of malaria in pregnancy. Geneva: WHO; 2013. https://www.who.int/docs/default-source/malaria/mpac-documentation/mpac-sep13-erg-ipt-malaria-pregnancy-report.pdf. Accessed 27 Jan 2026.
45. World Health Organization. Updated WHO recommendations for malaria chemoprevention among children and pregnant women. Geneva: WHO; 2022. https://www.who.int/news/item/03-06-2022-Updated-WHO-recommendations-for-malaria-chemoprevention-among-children-and-pregnant-women. Accessed 27 Jan 2026.
46. van Eijk AM, Larsen DA, Kayentao K, Koshy G, Slaughter DEC, Roper C, et al. Effect of *Plasmodium falciparum* sulfadoxine–pyrimethamine resistance on the effectiveness of intermittent preventive therapy for malaria in pregnancy in Africa: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis. 2019;19:546–56.

47. Rosillo SR, Dimbu PR, Cândido ALM, Oh JHM, Ferreira CM, Andrade BN, et al. Molecular markers of sulfadoxine–pyrimethamine resistance in samples from children with uncomplicated *Plasmodium falciparum* at three sites in Angola in 2019. Antimicrob Agents Chemother. 2023;67:e01601-e1622.
48. Verity R, Aydemir O, Brazeau NF, Watson OJ, Hathaway NJ, Mwandagalirwa MK, et al. The impact of antimalarial resistance on the genetic structure of *Plasmodium falciparum* in the DRC. Nat Commun. 2020;11:2107.
49. Mediavilla A, Febrer-Sendra B, Silgado A, Crego-Vicente B, Martínez-Vallejo P, Nindia A, et al. Evaluation of dried blood spot sampling for real-time PCR malaria diagnostics in a rural setting in Angola. Parasit Vectors. 2025;18:44.
50. Mediavilla A, Silgado A, Febrer-Sendra B, Crego-Vicente B, Martínez-Vallejo P, Maturana CR, et al. Real-time PCR for malaria diagnosis and identification of *Plasmodium* species in febrile patients in Cubal. Angola Parasit Vectors. 2024;17:384.
51. Fançony C, Gamboa D, Sebastião Y, Hallett R, Sutherland C, Sousa-Figueiredo JC, et al. Various *pfcrt* and *pfmdr1* genotypes of *Plasmodium falciparum* cocirculate with *P. malariae*, *P. ovale* spp., and *P. vivax* in Northern Angola. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56:5271–7.
52. Rowe AK, De León GFP, Mihigo J, Santelli ACF, Miller NP, Van-Dnem P. Quality of malaria case management at outpatient health facilities in Angola. Malar J. 2009;8:275.
53. Tavares W, Morais J, Martins JF, Scalsky RJ, Stabler TC, Medeiros MM, et al. Malaria in Angola: recent progress, challenges and future opportunities using parasite demography studies. Malar J. 2022;21:1–12.
54. Salvador F, Cossio Y, Riera M, Sánchez-Montalvá A, Bocanegra C, Mendioroz J, et al. Changes in malaria epidemiology in a rural area of Cubal. Angola Malar J. 2015;14:1–6.
55. Instituto Nacional de Estatística (INE) Angola. Inquérito de Indicadores Múltiplos e de Saúde (IIMS) 2023–2024 Relatório de Indicadores Básicos. Luanda: INE; 2024. https://www.ine.gov.ao/Arquivos/arquivosCarregados//Carregados/Publicacao_63881879547585507 3.pdf. Accessed 27 Jan 2026.
56. Foumane Ngane V, Allico Djaman J, Culeux C, Piette N, Carnevale P, Besnard P, et al. Molecular epidemiology of drug-resistant *Plasmodium falciparum* in Benguela province. Angola Malar J. 2015;14:1–9.
57. Li J, Chen J, Xie D, Monte-Nguba SM, Eyi JUM, Matesa RA, et al. High prevalence of *pfmdr1* N86Y and Y184F mutations in *Plasmodium falciparum* isolates from Bioko Island. Equatorial Guinea Pathog Glob Health. 2014;108:339–44.
58. Pearce RJ, Drakeley C, Chandramohan D, Mosha F, Roper C. Molecular determination of point mutation haplotypes in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of *Plasmodium falciparum* in three districts of Northern Tanzania. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47:1347–54.
59. Molina-de la Fuente I, Sagrado Benito MJ, Ousley J, Gisbert FB, García L, Gonzalez V, et al. Screening for K13-propeller mutations associated with artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* in Yambio County (Western Equatoria State, South Sudan). Am J Trop Med Hyg. 2023;109:1072–6.
60. Martín Ramírez A, Akindele AA, González Mora V, García L, Lara N, de la Torre-Capitán ME, et al. Mutational profile of *pfdhfr*, *pfdhps*, *pfmdr1*, *pfcrt* and *pfk13* genes of *Plasmodium falciparum* associated with resistance to different antimalarial drugs in Osun State, Southwestern Nigeria. Trop Med Health. 2025;53:1–13.
61. Rodrigues ABB, de Abreu-Fernandes R, Neto Z, Jandondo D, Almeida-De-Oliveira NK, de Lavigne Mello AR, et al. Pfkelch13 *Plasmodium falciparum* mutations in Huambo, Angola. Pathogens. 2022;11:554.
62. Wang X, Ruan W, Zhou S, Huang F, Lu Q, Feng X, et al. Molecular surveillance of *Pfcrt* and *k13* propeller polymorphisms of imported *Plasmodium falciparum* cases to Zhejiang Province, China between 2016 and 2018. Malar J. 2020;19:314.
63. Zhang T, Xu X, Jiang J, Yu C, Tian C, Li W. Surveillance of antimalarial resistance molecular markers in imported *Plasmodium falciparum* malaria cases in Anhui, China, 2012–2016. Am J Trop Med Hyg. 2018;98:1132–6.
64. Fançony C, Brito M, Gil JP. *Plasmodium falciparum* drug resistance in Angola. Malar J. 2016;15:1–9.
65. Chatio S, Aborigo R, Adongo PB, Anyorigiya T, Akweongo P, Oduro A. Adherence and uptake of artemisinin-based combination treatments for uncomplicated malaria: a qualitative study in northern Ghana. PLoS ONE. 2015;10:e0116856.
66. Figueiredo P, Benchimol C, Lopes D, Bernardino L, Do Rosário VE, Varandas L, et al. Prevalence of *pfmdr1*, *pfcrt*, *pfdhfr* and *pfdhps* mutations associated with drug resistance in Luanda, Angola. Malar J. 2008;7:236.
67. Gama BE, Pereira-Carvalho GAL, Lutucuta Kosi FJI, De Oliveira ANK, Fortes F, Rosenthal PJ, et al. Molecular markers of antifolate resistance in *Plasmodium falciparum* isolates from Luanda, Angola. Malar J. 2011;10:248.
68. Kaingona-Daniel EPS, Gomes LR, Gama BE, Almeida-De-Oliveira NK, Fortes F, Ménard D, et al. Low-grade sulfadoxine-pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* parasites from Lubango, Angola. Malar J. 2016;15:1358.
69. Dakorah MP, Aninagyei E, Attoh J, Adzakpah G, Tukwarlba I, Acheampong DO. Profiling antimalarial drug-resistant haplotypes in *Pfcrt*, *Pfmdr1*, *Pfdhps* and *Pfdhfr* genes in *Plasmodium falciparum* causing malaria in the Central Region of Ghana: a multicentre cross-sectional study. Ther Adv Infect Dis. 2025;12:20499361251319665.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

6. Discusión

En este apartado se integran y discuten los principales hallazgos obtenidos en los cuatro estudios que componen la presente tesis doctoral, abordando de forma conjunta las aportaciones del diagnóstico molecular y de la caracterización genética de *P. falciparum* al conocimiento de la malaria en el municipio de Cubal (Angola).

6.1. Diagnóstico molecular de la malaria y estrategias de detección en contextos endémicos y rurales como Cubal

En regiones de AS con elevada carga de malaria como Angola, un diagnóstico temprano y preciso constituye un elemento clave para reducir la morbimortalidad, proporcionar un manejo clínico adecuado a cada paciente e interrumpir la transmisión mediante la aplicación de un tratamiento adecuado y seguro [208].

Tradicionalmente, el diagnóstico de la malaria se ha centrado en el uso de la microscopía, que continúa siendo la técnica *gold standard* en contextos endémicos, y las PDR, cuyas limitaciones se acentúan en escenarios donde se requiere un control más exhaustivo de la enfermedad [209]. La PCR en tiempo real se propone como una herramienta complementaria de alto rendimiento, capaz de detectar las infecciones submicroscópicas y de mejorar la identificación de especies e infecciones mixtas [210]. Además, permite una aproximación indirecta a la determinación de la carga parasitaria [211]. Por lo que es una herramienta ideal tanto en el ámbito clínico como en la investigación epidemiológica [212].

6.1.1. PCR en tiempo real para el diagnóstico e identificación de especies de *Plasmodium* en Cubal

El análisis del rendimiento de la PCR en tiempo real en pacientes febriles en Cubal sugiere una mejora en la detección de casos de malaria también en regiones endémicas, especialmente cuando se compara con los métodos diagnósticos convencionales. La PCR mostró una mayor capacidad para detectar infecciones que el examen microscópico por gota gruesa (tasas de positividad de 39,5% y 33,5%, respectivamente), lo que confirma su mayor sensibilidad, particularmente en casos de baja densidad parasitaria. Sin embargo, detectó una menor proporción de casos que la PDR (49%). Además, en comparación con la PDR, la PCR presentó mayor especificidad (72,9% y 82,7%, respectivamente) [93], teniendo en cuenta que las PDR pueden verse condicionadas por la persistencia del antígeno *Pf*HRP2 en sangre tras una infección pasada [85].

Uno de los hallazgos más relevantes fue la capacidad de la PCR para identificar infecciones submicroscópicas, elevando la tasa de positividad del 33,5% (microscopía) al 39,5% (PCR) e identificando un 6,5% (13/200) de casos positivos exclusivamente por la técnica molecular en relación a las técnicas convencionales (microscopía y PDR). Esta superioridad diagnóstica se fundamenta en su bajo límite de detección (< 0,5-5 parásitos/μL) [81] frente a los 50-100 parásitos/μL de la microscopía realizada por un microscopista experto [209] o a los 163 parásitos/μL de la PDR, lo cual se vio reflejado en los elevados valores de Ct (> 31,8) de las muestras positivas por PCR y negativas por microscopía y PDR. Estos resultados son consistentes con otros estudios realizados en Guinea Ecuatorial [213,214] y la RDC [214], en los cuales se confirmó que los métodos convencionales infraestiman la carga real de malaria con respecto a la PCR al no detectar las infecciones de baja densidad parasitaria. Gracias a esto, podemos comprender mejor los patrones de transmisión en Cubal, donde una proporción significativa de la población febril puede albergar parasitemias bajas con potencial para continuar la cadena de transmisión [59]. Además, si esta población no recibe tratamiento como consecuencia del infradiagnóstico de las técnicas convencionales puede desembocar en una evolución desfavorable de la enfermedad y la aparición de formas graves [81].

La PCR permitió identificar la gran mayoría de las especies de *Plasmodium* causantes de la infección, incluyendo las especies no *falciparum* como *P. malariae* y *P. ovale,* así como la detección de infecciones mixtas, habitualmente no detectadas mediante microscopía [90]. Por último, se utilizaron los valores de Ct para dar una aproximación indirecta de la densidad parasitaria, observándose una correlación lineal negativa significativa (r = -0,5, *P*-valor < 0,001) donde menores valores de Ct correspondían a mayores densidades parasitarias determinadas por microscopía, permitiendo diferenciar eficientemente entre las infecciones de baja o alta intensidad. Esta característica, refuerza el potencial de la PCR en tiempo real no solo como herramienta cualitativa, sino también semi-cuantitativa para monitorizar la respuesta al tratamiento y como criterio de gravedad en los casos de altas parasitemias, siendo aplicable tanto para el manejo clínico como para estudios epidemiológicos [215,216].

Las discrepancias observadas entre las tres técnicas diagnósticas utilizadas han de interpretarse teniendo en cuenta las limitaciones y condiciones operativas del estudio. Los 33 casos con resultados positivos por PDR y negativos por PCR pueden explicarse, en parte, por la posible persistencia de *Pf*HRP2 hasta varias semanas después de la curación clínica [85], además de por la posible degradación del ADN en los eluidos transportados. Sin embargo, los 11 casos positivos por microscopia y negativos por PCR podrían deberse

al factor subjetivo de la observación microscópica y la presencia de artefactos en la preparación de la muestra que induzcan a error [217]. Por el contrario, se observó una menor discordancia de resultados positivos por PCR y negativos por PDR (14 muestras). Teoricamente, la posible degradación del ADN parasitario se produjo durante el transporte de los eluidos desde Cubal al HUVH de Barcelona. La imposibilidad de mantener la cadena de frío en todo momento, además de un transporte o almacenamiento inadecuado puede causar la degradación del ADN y derivar en falsos negativos por PCR [91]. A ello se le suma la utilización de sangre venosa en lugar de sangre capilar, lo que pudo contribuir a una ligera pérdida de sensibilidad [218]. Por el contrario, los casos con PCR positiva y resultados negativos por los métodos convencionales reflejan, en su mayoría, infecciones submicroscópicas con cargas parasitarias inferiores al límite de detección de la gota gruesa o de las PDR [81]. En estos casos, la calidad del ADN fue suficiente para su amplificación mediante PCR. No obstante, en el momento del análisis aún no podía descartarse que parte de los falsos negativos por PDR estuvieran relacionados con la presencia de deleciones en los genes *pfhrp2*/*pfhrp3* [219]. Esta hipótesis motivó la realización posterior de un estudio específico para evaluar la frecuencia de dichas deleciones en Cubal.

En cuanto a la identificación de las infecciones mixtas, la frecuencia observada (15,6%) superó la esperada estadísticamente (7,2%) si siguiese una distribución aleatoria de las diferentes especies en la población. Este hallazgo sugiere la existencia de factores biológicos, epidemiológicos y conductuales que favorecen la coinfección, como las diferencias individuales en la exposición a los vectores o en la susceptibilidad del huésped. Asimismo, una mayor utilización de los servicios sanitarios por parte de pacientes con cuadros clínicos más graves podría contribuir a explicar esta asociación, ya que las infecciones mixtas podrían generar una sintomatología más intensa y, por tanto, una mayor probabilidad de consulta y diagnóstico [220,221]. En este último aspecto cabe destacar el predominio de las coinfecciones por *P. falciparum* y *P. malariae*, en las cuales mediante el análisis indirecto de la parasitemia por PCR se pudo observar un efecto sinérgico en cuanto a las densidades parasitarias de una y otra especie cuando actúan de forma conjunta, especialmente en el caso de *P. malariae* [220]. Este hallazgo podría estar relacionado con la biología particular de esta especie, capaz de establecer infecciones de curso más crónico, con bajas densidades parasitarias y frecuentemente con un cuadro clínico leve [40]. La adquisición posterior de *P. falciparum* podría favorecer la aparición de sintomatología clínica y provocar un aumento relativo de la densidad parasitaria de *P. malariae* al modificar la interacción previa huésped-parásito, lo que pondría de relieve la

complejidad clínica y biológica de las infecciones mixtas. Estas interacciones pueden influir tanto en la presentación clínica como en la evolución de la infección. Además, el infradiagnóstico de las infecciones mixtas mediante microscopía o PDR podría contribuir al mantenimiento de reservorios parasitarios [221]. Por ejemplo, en las coinfecciones por *P. falciparum* y *P. malariae* o *P. ovale*, las especies no *falciparum* pueden pasar desapercibidas, lo que impediría un seguimiento adecuado de estas infecciones y llevaría a subestimar su contribución a la epidemiología local [59].

Desde una perspectiva global, los resultados confirmaron que la PCR permite obtener una estimación más precisa de la carga real de malaria en la población estudiada que el resto de técnicas diagnósticas, siempre y cuando se lleve a cabo bajo unas condiciones de conservación y transporte adecuadas al tipo de muestra [91]. Mientras que la microscopía tiende a infraestimar la prevalencia debido a su alto límite de detección (80 parásitos µL en este estudio), las PDR pueden sobreestimarla en determinados contextos por la persistencia antigénica [222]. Es por ello que, la incorporación de técnicas moleculares mejora la confirmación diagnóstica, reduce la probabilidad de resultados falsos negativos y positivos, contribuye a un manejo clínico más adecuado al asegurar la identificación de las especies implicadas, y permite conocer la distribución real de especies en un área determinada [223].

Estos hallazgos fueron coherentes con estudios realizados en otros países de AS, donde se ha descrito la sensibilidad superior de la PCR frente a la microscopía y las limitaciones compartidas de las técnicas convencionales [224,225]. En cambio, nuestros resultados contrastan con estudios que informaron de una mayor sensibilidad de la PCR frente a la PDR [214,226]. Nuestra hipótesis es que estas diferencias pudieron deberse principalmente a la degradación del ADN durante el transporte. En Angola, los datos reflejan una alta prevalencia de malaria en pacientes febriles (58%) y el predominio de *P. falciparum*, coincidiendo con estudios nacionales previos realizados en la provincia de Bengo (noroeste de Angola) que también informaron sobre una presencia importante de infecciones mixtas y de especies no *falciparum*, incluyendo en este caso también infecciones por *P. vivax* [227,228].

No obstante, la implementación de la PCR en tiempo real en Cubal presenta serias dificultades. Su dependencia de infraestructuras especializadas impide su uso como herramienta de primera línea en entornos con recursos limitados [59,229]. Además, las dificultades logísticas asociadas al transporte y conservación de muestras, las cuales nos llevaron a hipotetizar la degradación del ADN en este estudio, subrayan la necesidad de

optimizar estrategias alternativas que garanticen la estabilidad del material genético. En este sentido, el uso de DBS se propone como una alternativa de fácil aplicabilidad para implementar la PCR en tiempo real en estudios de investigación y vigilancia epidemiológica en entornos rurales de Angola [89]. Por otro lado, la técnica LAMP surge como una solución diagnóstica adaptada al punto de atención (*point of care*), ya que permite un diagnóstico altamente sensible sin la necesidad de equipamiento específico como termocicladores. Un estudio previo llevado a cabo en Cubal [93] mostró resultados prometedores para la implementación del diagnóstico molecular de malaria en laboratorios rurales con recursos limitados.

6.1.2. Evaluación de las DBS para el diagnóstico molecular de la malaria mediante PCR en tiempo real en Cubal

Los resultados del primer estudio pusieron de manifiesto una discrepancia inesperada en el rendimiento diagnóstico, en las que la PDR parecía superar a la PCR en tiempo real realizada a partir de ADN extraído *in situ* [206]. Este hallazgo llevó a replantear las condiciones preanalíticas del proceso, sugiriendo como hipótesis la degradación del ADN parasitario durante el transporte del HNSP al HUVH. Por ello, se planteó validar el uso del DBS como una estrategia para resolver esta limitación y favorecer la aplicabilidad real del diagnóstico molecular en entornos rurales como Cubal.

La primera fase de optimización, realizada en el HUVH utilizando muestras de pacientes con malaria y controles de calidad que simulaban sangre infectada, confirmó que el volumen de sangre depositado en el papel de filtro constituye un factor clave en la sensibilidad analítica de la PCR, como ya se describió en estudios anteriores [230,231]. Se evidenció una relación directa entre el volumen inoculado y el rendimiento de la técnica molecular, estableciéndose como óptimos los volúmenes de 50-100 µL, en los que la pérdida de rendimiento respecto a la sangre total fue relativamente baja (~ 3 Ct). Esta pérdida de sensibilidad se puede atribuir a la recuperación incompleta del volumen sanguíneo inoculado y a los factores de dilución utilizados durante los procesos de recuperación de muestra y de extracción de ADN [89,232]. Esta limitación debe tenerse en cuenta en infecciones de muy baja densidad parasitaria en las cuales el uso de DBS puede dar lugar a falsos negativos. Se identificó un valor > 34 Ct en la PCR a tiempo real de muestra de sangre total como el umbral a partir del cual la PCR realizada a partir de DBS (PCR-DBS) era negativa.

Al contrastar estos resultados con estudios ya publicados, se confirmó que la pérdida de sensibilidad asociada al uso de DBS es un fenómeno ampliamente descrito y dependiente

de múltiples factores, como el volumen de muestra, las condiciones de secado y almacenamiento (tiempo, temperatura y humedad), o las características del papel de filtro (siendo Whatman 903 y 3MM los más adecuados) [89,233]. La proporción del número de casos no detectados con respecto a la extracción a partir de sangre total (14,3%) es concordante con los resultados reportados en otros estudios, que varían entre el 4% y el 27% de pérdida según el estudio [231,234]. Algunos autores han asociado la pérdida de sensibilidad del DBS a condiciones de altas temperaturas y humedad, llegando a describir una reducción de sensibilidad de la PCR entre 10-100 veces tras ser almacenados a 30 °C y 60% de humedad durante diferentes periodos de tiempo de hasta 30 días [232].

A la hora de identificar las especies de *Plasmodium* incluidas en esta fase del estudio (*P. falciparum* y *P. malariae*), el rendimiento de la PCR-DBS fue generalmente satisfactorio, aunque con una mayor efectividad aparente para *P. falciparum* al igual que en estudios anteriormente publicados [231,235]. Sin embargo, la PCR-DBS no pudo determinar la especie en todos los casos en los que sí lo había hecho la PCR a partir de sangre total. Este fenómeno parece atribuirse más bien a la menor sensibilidad de la PCR utilizada para determinar las especies con respecto la empleada para detectar la infección por *Plasmodium* spp., que del propio uso del DBS. Este mismo fenómeno se ha reportado con anterioridad en estudios que explican que la multiplexación de las PCR empleada para identificar las especies disminuye su sensibilidad analítica [230], e incluso establecen valores de corte de la PCR genérica > 36 Ct [231], cercanos a los nuestros (> 35 Ct) a partir de los cuales la PCR específica no es capaz de determinar la especie de *Plasmodium*. Por otro lado, estudios respaldan la idea de que la detección de otras especies no *falciparum* como *P. vivax* (no analizado en esta tesis) suele verse más comprometida debido a las parasitemias normalmente inferiores que presenta [235,236].

La validación de la utilización de las DBS en Cubal aportó resultados que respaldan su uso como herramienta para el transporte de muestras en las que se va a llevar a cabo el diagnóstico de la malaria por PCR en tiempo real. La PCR-DBS mostró una tasa de positividad (50%) similar a la PDR (49%) y superior a la microscopía (33,5%) considerados de forma individual. Sin embargo, al compararse con el diagnóstico combinado en terreno (microscopía + PDR) —cuya tasa de positividad fue del 51,5%—, su rendimiento aparente fue ligeramente menor, lo que refuerza la interpretación de que una proporción de los casos detectados por PDR podría corresponder a falsos positivos derivados de la persistencia de *Pf*HRP2 en sangre [237]. Paralelamente, la detección de casos positivos exclusivamente por PCR-DBS confirma la capacidad de esta herramienta

molecular para identificar infecciones submicroscópicas indetectables mediante las técnicas realizadas en terreno [236].

Al comparar estos resultados con los del primer estudio, en los que se analizaron las mismas muestras procedentes del mismo grupo de pacientes, se evidenció un rendimiento superior de la PCR-DBS frente a la PCR a partir de ADN extraído *in situ*. Este hallazgo confirmó la hipótesis de que la degradación del ADN parasitario durante el transporte de los eluidos al HUVH alteró en gran medida los resultados iniciales de la PCR en tiempo real. Además, el uso de DBS permitió una identificación más precisa de las especies, incluyendo la correcta identificación de infecciones mixtas que previamente habían sido clasificadas como infecciones individuales por *P. malariae* y *P. ovale* debido a la pérdida del ADN parasitario de *P. falciparum* al encontrarse en menor cantidad. Este fenómeno explica las discrepancias observadas con la PDR del primer estudio, concretamente en aquellos casos en los que se detectaba *Pf*HRP2 en ausencia aparente de material genético de *P. falciparum*. En cuanto a la cuantificación indirecta de la densidad parasitaria, la PCR-DBS también mostró una aproximación más fiable en comparación a la PCR realizada a partir de la extracción *in situ*.

La utilización de DBS aporta un valor logístico fundamental al permitir superar las principales limitaciones metodológicas asociadas a los entornos endémicos y rurales con recursos limitados, eliminando la cadena de frío y facilitando el transporte y almacenamiento de muestras en condiciones subóptimas [238]. Más allá de su utilidad para el transporte de muestras de diagnóstico, esta tecnología abre la puerta a la implementación de estudios de epidemiología molecular entornos como el de Cubal, incluyendo la vigilancia de marcadores moleculares de interés [89,239], que pueden ser utilizados para reforzar los programas de control y vigilancia en Angola.

6.2. Caracterización genética de *P. falciparum* para el manejo de la malaria en Angola

En la presente tesis, el estudio de epidemiología molecular se centra principalmente en dos líneas de investigación interrelacionadas entre sí —el diagnóstico y el tratamiento— desarrolladas en dos estudios en los que se analizaron muestras recogidas en el HNSP de Cubal. Por un lado, se analizó la presencia de deleciones en los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* y la variabilidad estructural de las proteínas que codifican, evaluando su impacto sobre el rendimiento de las PDR y por tanto en los posibles fallos diagnósticos. Por otro lado, se estudió el perfil molecular de resistencia a antimaláricos mediante el análisis de

mutaciones en genes clave como *pfk13*, *pfmdr1*, *pfdhfr* y *pfdhps*, lo que ha permitido analizar la presión selectiva ejercida por el uso de AL como tratamiento de primera línea para la malaria no complicada y de la SP en los programas de TPIe, y valorar la eficacia de estos fármacos que constituyen las principales estrategias terapéuticas y preventivas en Angola.

La vigilancia molecular de *P. falciparum* ha adquirido una importancia creciente en los programas de control de la malaria, debido a su capacidad para detectar cambios genéticos que pueden afectar tanto al rendimiento de las herramientas diagnósticas como a la eficacia de los tratamientos antimaláricos [240]. Los estudios incluidos en este bloque pretenden analizar la situación de estos marcadores en Cubal y contextualizarlos dentro del panorama epidemiológico regional.

6.2.1. Deleciones de los genes *pfhrp2*/*pfhrp3* y variabilidad de las proteínas *Pf*HRP2/*Pf*HRP3: impacto en los test de diagnóstico rápido

El diagnóstico de la malaria depende en gran medida de las PDR-*Pf*HRP2. Sin embargo, la aparición de cepas de *P. falciparum* con los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* delecionados en AS ha provocado una creciente preocupación por su impacto en la fiabilidad diagnóstica de las PDR, lo que ha motivado la necesidad de llevar a cabo estudios de vigilancia molecular que permitan monitorizar la aparición de estas alteraciones genéticas [160].

En este estudio no se identificaron deleciones de genes completos ni parciales en el exón 2 de ningún gen, y la frecuencia de deleciones dobles (en *pfhrp2* y *pfhrp3* simultáneamente) fue nula, siendo este último aspecto especialmente relevante dado que estas son las que comprometen de forma más directa el buen funcionamiento de las PDR [150]. Aunque sí se observaron deleciones parciales correspondientes al exón 1-2, estas fueron más frecuentes en *pfhrp3* (11,5%) que en *pfhrp2* (7,3%), lo cual está en línea con lo descrito en la literatura [157,166]. No obstante, su impacto clínico parece limitado, ya que no cumplieron los criterios establecidos por la OMS para explicar los fallos diagnósticos de las PDR [170]: la mayoría de estas deleciones fueron infecciones submicroscópicas (negativas por microscopía), reflejadas en valores de Ct altos de la PCR en tiempo real, o por el contrario no fueron discordantes con el resultado de la PDR (microscopía + y PDR -).

Es probable que se haya sobreestimado el número de estas deleciones parciales debido a la menor sensibilidad de la PCR dirigida al exón 1-2 con respecto a la PCR del exón 2, ya que el exón 1 cuenta con repeticiones ricas en adenina y timina que implican una baja

eficiencia de amplificación [152]. En las muestras con muy bajas densidades parasitarias, próximas o por debajo del límite de detección de la PDR utilizada (163 parásitos/µL), los bajos niveles de ADN pudieron desembocar en falsos negativos en la PCR [241].

La baja prevalencia de deleciones detectadas en Cubal está en consonancia con el estudio llevado a cabo por Plucinski *et al*. en otras regiones de Angola, en el que se detectaron en Uíge deleciones de *pfhrp2* y en Huambo deleciones dobles *pfhrp2*/*pfhrp3* en frecuencias inferiores al 1% [168]. Estos resultados sitúan al país angoleño en una posición más favorable respecto a los países del África oriental como Eritrea [242] y Etiopía [162], donde las deleciones de *pfhrp2* han superado el umbral de la OMS (5% de prevalencia de falsos negativos por PDR) comprometiendo seriamente el uso de las PDR-*Pf*HRP2. El patrón observado en Cubal es más similar al descrito en África occidental y central, donde las deleciones con impacto clínico siguen siendo menos frecuentes [243]. No obstante, la detección de deleciones en países de esta región como Nigeria, Gabón [243], Guinea Ecuatorial [166] o países vecinos como la RDC [244] obliga a mantener una vigilancia activa ante el riesgo de expansión regional.

Desde una perspectiva más evolutiva y epidemiológica, la baja frecuencia de deleciones en Cubal podría explicarse por dos motivos: en primer lugar, por la elevada tasa de transmisión que implica una elevada variabilidad genética que, sumada a la competencia entre las distintas cepas circulantes puede limitar la expansión de variantes con deleciones [169]; se ha postulado que las deleciones en *pfrhp2*/*pfhrp3* suponen una pérdida del *fitness* parasitario, lo que dificulta que estas cepas compitan con el tipo salvaje en ausencia de una presión selectiva diagnóstica extrema [156]. Además, se debe tener en cuenta que, la frecuente presencia de infecciones policlonales en regiones de alta transmisión como Cubal, puede provocar un enmascaramiento de estas deleciones al utilizar técnicas de PCR convencional, ya que la coexistencia de cepas con genes intactos permite mantener tanto la positividad de las PDR como la amplificación por PCR, pasando por alto la cepa portadora de la deleción [147]. En segundo lugar, el uso predominante de la microscopía para el diagnóstico de malaria estaría relacionado con una limitada presión selectiva sobre los parásitos con deleciones, ya que, a diferencia de las PDR-*Pf*HRP2, su capacidad de detección no se ve influenciada por la presencia de parásitos con o sin deleciones y, por tanto, no favorece diferencialmente su supervivencia y transmisión [244].

El análisis de la variabilidad estructural de las proteínas *Pf*HRP2 y *Pf*HRP3 en los aislados de Cubal, pone de manifiesto un elevado grado de polimorfismo en las repeticiones de aminoácidos, particularmente acentuado en *Pf*HRP2. En este estudio se identificaron

hasta 15 tipos de repeticiones en *Pf*HRP2, frente a 10 en *Pf*HRP3, mostrando una mayor variación en el número y frecuencias de cada tipo de repetición por aislado para *Pf*HRP2. Estos resultados apoyan una mayor variabilidad de esta proteína, en concordancia con lo descrito en diferentes regiones endémicas de África y Asia, donde *Pf*HRP2 siempre muestra un mayor polimorfismo y una mayor proporción de secuencias únicas que su homóloga *Pf*HRP3, sugiriendo una mayor plasticidad evolutiva [153]. En Cubal, destacó la identificación de la repetición tipo 11 en *Pf*HRP3, un hallazgo poco frecuente previamente descrito únicamente en Etiopía [157], lo que amplía el conocimiento sobre la diversidad de esta proteína en AS.

A pesar de esta elevada variabilidad, la organización general de las secuencias y los patrones de repetición se mantuvieron conservados, lo cual es coherente con estudios previos llevados a cabo en diferentes regiones de Asia, América y África [153,154,245–251], y sugiere que, más allá de la heterogeneidad de las secuencias, la arquitectura funcional de estas proteínas permanece relativamente estable. Esta conservación estructural condiciona la interacción con los MAb empleados en las PDR. Nuestros hallazgos confirmaron la presencia constante de los epítopos 3A4 y C1-13 en la totalidad de los aislados analizados para *Pf*HRP2, mostrando unas elevadas frecuencias por aislado (mediana de 15 y 18 repeticiones, respectivamente). Estos resultados son muy similares a los informados en otras regiones como Amhara (Etiopía) [157] y Madagascar [252], donde estos epítopos también fueron los más prevalentes. Tal y como señala Molina-de la Fuente *et al*. [157] la relevancia de estos epítopos no solo radica en su abundancia, sino en su accesibilidad estructural en la superficie de la proteína, lo que facilita la unión de los MAb utilizados en las PDR.

Existe la hipótesis de que, la variabilidad en el número y disposición de las repeticiones podría influir en el rendimiento diagnóstico de las PDR, especialmente en infecciones de baja parasitemia [171]. A pesar de ello, en este estudio no ha sido posible establecer una relación concluyente entre el polimorfismo de *Pf*HRP2 y los fallos diagnósticos observados, al igual que otros estudios realizados en países de AS como Madagascar [252], Kenia [253], India [249], diferentes regiones de Centroamérica [245] o incluso del mismo autor original que realizó esta hipótesis [153]. Esta limitación se debe en gran medida, al reducido número de casos con resultados discordantes encontrados en Cubal, lo que impidió realizar un análisis robusto. Por ello, los resultados no permitieron confirmar de manera definitiva el modelo previamente propuesto por Baker que relaciona la estructura de estas proteínas con la sensibilidad de las PDR [171], lo que pone de

manifiesto la necesidad de estudios adicionales con mayor tamaño muestral y un mayor número de falsos negativos de la PDR siguiendo los protocolos establecidos por la OMS.

Desde un punto de vista aplicado, la conservación y elevada frecuencia de epítopos, especialmente el 3A4 y el C1-13, observados en Cubal contribuyen a explicar el buen rendimiento observado de las PDR-*Pf*HRP2 en este municipio. Estas pruebas se mantienen como herramientas eficaces en pacientes sintomáticos y con densidades parasitarias moderadas o elevadas. No obstante, su interpretación ha de realizarse con cautela, y valorar la persistencia antigénica en pacientes que han pasado una infección reciente ya que, puede ser la causa de falsos positivos en entornos de alta transmisión [85]. Por otra parte, las especies no *falciparum* como *P. malariae* y *P. ovale* no pueden ser detectadas con las PDR que tienen como diana únicamente la proteína *Pf*HRP2, por lo que se recomienda la combinación de *Pf*HRP2 con otra proteína panmalárica como la pLDH o aldolasa [254], y realizar un diagnóstico microscópico de confirmación siempre y cuando sea posible.

La concordancia entre los hallazgos moleculares y el rendimiento clínico observado, junto con la elevada prevalencia de *P. falciparum* en Cubal respaldan la utilidad de las PDR-*Pf*HRP2 en la práctica asistencial y su continuidad como herramienta de primera línea en el manejo de la malaria en entornos rurales con recursos limitados.

Desde una perspectiva más epidemiológica, es importante considerar que la presión selectiva derivada del uso extendido de las PDR-*Pf*HRP2 puede favorecer la expansión de variantes parasitarias con deleciones o modificaciones estructurales que escapen a su detección y por tanto comprometan su rendimiento [169]. En este sentido, la variabilidad observada, junto con la sospecha de deleciones parciales, subraya la importancia de mantener sistemas de vigilancia molecular continuada. La implementación de estudios a mayor escala, siguiendo las pautas marcadas por la OMS [170], permitirá detectar de forma precoz posibles cambios en las poblaciones parasitarias y garantizar la eficacia sostenida de las estrategias diagnósticas en Angola.

6.2.2. Marcadores moleculares de resistencias a antimaláricos

La vigilancia de los marcadores moleculares de resistencia ha pasado de ser una herramienta de apoyo a un componente fundamental para el control de la malaria. La caracterización genética del parásito tiene un impacto directo en la adecuación de las pautas de tratamiento y en la eficacia de las estrategias quimioprofilácticas. En contextos de elevada presión farmacológica, el análisis de SNPs en genes clave posibilita la

detección precoz de cambios en la susceptibilidad a los distintos antimaláricos, permitiendo anticipar posibles fallos terapéuticos antes de que se manifiesten clínicamente [255].

En nuestro estudio, el análisis del gen *pfk13* en Cubal mostró una susceptibilidad conservada frente a los derivados de la artemisinina. No se identificaron mutaciones validadas ni candidatas relacionadas a la resistencia parcial a artemisininas según el listado de la OMS [173], lo que sugiere que la eficacia de estos fármacos se mantiene en esta región. No obstante, se detectaron mutaciones no sinónimas, entre las que destacan V589I y Q613E, cuyo significado clínico aún no ha sido definido. La presencia de estas mutaciones, previamente descritas en casos importados en China desde Angola [182], subraya la necesidad de investigar su posible asociación con un retraso en el aclaramiento parasitario tras el tratamiento, fenómeno cada vez más extendido en AS.

Un hallazgo interesante fue la identificación de la mutación sinónima A578A, la cual está localizada en la misma posición que la mutación A578S —ampliamente distribuida en AS y sin relación directa con resistencias a las artemisininas [256]—, lo que sugiere que este locus es genéticamente inestable y susceptible de sufrir mutaciones. En conjunto, los resultados del estudio llevado a cabo en Cubal, son coherentes con los estudios previos realizados en otras regiones de Angola, en los que se ha descrito una baja o incluso nula variabilidad en *pfk13* y la mayoría de las mutaciones descritas no parecen tener una relación con las resistencias a las artemisininas [128,131,183,184,257]. Aunque se debe de tener en cuenta que en casos aislados como los importados en China, se ha informado de mutaciones validadas como R539T y P553L [182]. Es por ello que, aunque la eficacia de las artemisininas parece preservada en Cubal, la detección de mutaciones no sinónimas y la presencia de marcadores validados en casos exportados, refuerzan la necesidad de mantener una vigilancia molecular ante posibles eventos emergentes de resistencia.

En cuanto a los fármacos acompañantes de las TCA, el perfil genético del gen *pfmdr1* observado en Cubal, sugiere una adaptación progresiva del parásito a la presión ejercida por el uso del AL como tratamiento de primera línea frente a la malaria no complicada. Se observó el predominio de los haplotipos N**F**D (42%) y NYD (57%) —codones 86, 184 y 1246—, aunque el primero indica un mayor grado de resistencia [258], ambos están asociados a una menor susceptibilidad a la lumefantrina [194], y de forma antagónica, a una mayor susceptibilidad a la amodiaquina [259].

Este patrón se ve reforzado por la casi fijación del alelo N86 (99%), la elevada frecuencia de la mutación 184F (43%) y la ausencia de D1246Y, configurando un perfil genético

característico de poblaciones parasitarias expuestas de forma sostenida a AL. Desde el punto de vista clínico, este perfil podría tener implicaciones en la eficacia terapéutica. Estudios previos en diferentes provincias de Angola como Zaire, Lunda Sul [131], Bengo [132] y Luanda [184], han asociado estos haplotipos con episodios de recrudescencia y tasas de curación inferiores o cercanas al umbral recomendado (< 90%). A pesar de ello, la ausencia de marcadores de resistencia a la artemisinina permite que el AL continúe siendo una opción válida como tratamiento de primera línea en Cubal. No obstante, estos hallazgos refuerzan la necesidad de implementar sistemas de vigilancia y EET cada dos años. Como alternativa a este problema, la combinación AS + AQ podría considerarse, dado el perfil molecular de susceptibilidad a la amodiaquina observado, aunque su uso puede verse limitado por problemas de tolerabilidad y adherencia [108].

Por otro lado, el análisis de los genes *pfdhfr* y *pfdhps* reveló un escenario de presión selectiva consolidada frente a la SP, derivada tanto de su uso histórico para el tratamiento tratamiento como de su aplicación actual en estrategias preventivas como el TPIe. En Cubal, el triple mutante **IRN** en *pfdhfr* —codones 51, 59 y 108— presentó una alta prevalencia (77,2%), mientras que en *pfdhps* la mutación K540E apareció con una frecuencia moderada pero relevante (23,8%). Fue notable la ausencia de la mutación A581G, asociada a niveles más elevados de resistencia a la sulfadoxina [200].

En cuanto a los haplotipos combinados, predominaron los parásitos parcialmente resistentes (58,4%), seguidos de los haplotipos totalmente resistentes (17,8%), sin evidenciarse la presencia de haplotipos superresistentes. Este perfil sitúa a Cubal en una posición intermedia dentro del contexto africano, más cercana a la observada en países del África occidental y central, donde predominan las formas parcialmente resistentes como Nigeria [195], Ghana [258], Guinea Ecuatorial [133] o la República del Congo [260], y alejada de la situación descrita en países del África oriental, como Uganda [177] o Tanzania [261], donde la elevada prevalencia de haplotipos superresistentes ha puesto en duda la eficacia preventiva de la SP.

La interpretación final sugiere que la SP continúa siendo una herramienta válida para el TPIe en Cubal. Sin embargo, la elevada frecuencia de mutaciones asociadas a resistencias, junto con la presencia no despreciable de haplotipos totalmente resistentes y, el aumento de la mutación K540E —superior a los niveles descritos en Angola entre los años 2008 y 2011 [126,198,262,263]— constituyen señales de alerta. La aparición o expansión de mutaciones adicionales como A581G (*pfdhps*) [262] o I164L (*pfdhfr*) [126], ya descritas

en otras regiones del país, podría comprometer la eficacia de esta estrategia a medio o largo plazo.

La elevada frecuencia de mutaciones asociadas a resistencia a SP observada en Cubal resulta especialmente relevante si se considera que la cobertura del TPIe en Angola durante los años 2023-2024 fue del 31% [66]. Aunque los datos disponibles no permiten identificar el origen de esta presión selectiva, no puede descartarse que el uso de SP fuera de las indicaciones recomendadas, utilizándolo como tratamiento curativo, pueda contribuir al mantenimiento y expansión de estos genotipos resistentes. Esta hipótesis ha sido planteada en otros contextos africanos donde se ha documentado la persistencia del uso de SP pese a no formar parte de las recomendaciones terapéuticas vigentes [135]. En consecuencia, sería recomendable desarrollar estudios específicos que evalúen los patrones locales de prescripción y utilización de antimaláricos, con el fin de determinar si el uso inapropiado de SP podría estar favoreciendo la selección de mutaciones de resistencia en Cubal y otras regiones de Angola.

A pesar de esto, las prevalencias observadas en los marcadores moleculares de resistencia a SP en Cubal están muy por debajo de los umbrales recomendados para el cambio de estrategia en el TPIe (K540E ≥ 95% y A581G ≥ 10%) [204,264] y la QPM (K540E > 50%) [265]. Es por ello que, al margen de continuar con el TPIe, se podría considerar su extensión a otras estrategias preventivas como la QPM, y la QEM en regiones donde se haya demostrado la estacionalidad de la transmisión. Asimismo, la combinación de sulfadoxina-pirimetamina-amodiaquina (SP + AQ), ampliamente utilizada en la región del Sahel [144], podría constituir una opción viable, dado el perfil de susceptibilidad observado, y evitando así la aparición de nuevas resistencias al tratarse de una terapia combinada de fármacos con diferentes mecanismos de acción [199].

Los perfiles genéticos observados en Cubal, reflejan de manera consistente el impacto de la presión farmacológica sostenida. El uso extendido de AL ha favorecido la selección de haplotipos específicos en *pfmdr1*, mientras que la utilización continuada de SP, ha impulsado la acumulación de mutaciones en *pfdhfr* y *pfdhps*. Estos procesos ilustran una dinámica evolutiva continuada basada en la selección de haplotipos y la adaptación progresiva del parásito, que ajusta su genoma para sobrevivir en presencia de los fármacos empleados para la prevención y el tratamiento de la malaria [124].

En este contexto, la vigilancia molecular se consolida como una herramienta clave para detectar cambios tempranos en la susceptibilidad del parásito a los antimaláricos y anticipar posibles fallos terapéuticos antes de su traducción clínica [127]. Su integración

con los EET y con los programas nacionales de control garantizará una toma de decisiones basada en la evidencia científica.

6.3. Limitaciones de la tesis

A pesar de la relevancia de los hallazgos presentados en esta tesis doctoral, es necesario considerar una serie de limitaciones que pueden influir en la interpretación de los resultados.

6.3.1. Limitaciones logísticas y epidemiológicas

Las condiciones logísticas propias de entornos rurales con recursos limitados como Cubal influyeron principalmente en el desarrollo del primer estudio. La imposibilidad de mantener una cadena de frío adecuada durante el transporte de los eluídos de ADN pudo haber favorecido la degradación del material genético, afectando negativamente al rendimiento de la PCR y, potencialmente, subestimando su sensibilidad diagnóstica.

Aunque la introducción del uso de muestras en formato de DBS permitió mejorar significativamente la conservación del ADN parasitario, el volumen de sangre disponible para su procesamiento estuvo condicionado a los protocolos preanalíticos y analíticos del HNSP, y al estado nutricional de la población estudiada, especialmente en niños. Esta restricción hizo que el volumen de sangre recogido (20 µl) fuera inferior al óptimo (50-100 µl) y pudo haber reducido la capacidad de detección de infecciones con muy baja parasitemia.

Por último, el diseño de los muestreos realizados en el HNSP presenta una posible limitación en cuanto a la representatividad temporal de la transmisión. La recogida de muestras se realizó principalmente durante el periodo de transición entre la estación lluviosa y la seca. Dado a la variación en la transmisión observada en Cubal según la época del año, es posible que la prevalencia de la infección, la distribución de especies y la frecuencia de determinados marcadores moleculares varíen durante los picos de máxima y mínima transmisión, lo cual no se ha podido constatar con exactitud en estos estudios.

6.3.2. Limitaciones técnicas y de rendimiento diagnóstico

Se observó una diferencia de sensibilidad entre la PCR en tiempo real genérica para *Plasmodium* spp. y la PCR múltiple para la identificación de las distintas especies, siendo esta última menos sensible. Esta limitación afectó principalmente a la capacidad de

identificación de la especie de *Plasmodium* en infecciones con parasitemias muy bajas, asociadas a valores elevados de Ct de la PCR genérica (Ct > 34-35).

Por otro lado, el rendimiento diferencial observado en los ensayos de PCR a tiempo real utilizados para el análisis de deleciones en los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* ha de tenerse en cuenta a la hora de interpretar los resultados de las deleciones parciales observadas. En particular, la PCR dirigida al exón 1-2 sugirió una menor sensibilidad en comparación con la PCR que amplificaba el exón 2. Esta diferencia en la eficiencia de amplificación podría haber llevado a una sobreestimación de algunas de las deleciones parciales observadas, especialmente en muestras con baja densidad parasitaria, donde la ausencia de amplificación podría deberse a limitaciones técnicas más que a la verdadera deleción de ese fragmento génico.

6.3.3. Limitaciones en la caracterización molecular

La elevada tasa de transmisión en Cubal frecuentemente conlleva a una alta frecuencia de infecciones policlonales. La coexistencia de cepas con y sin deleciones en los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* puede dar lugar a fenómenos de enmascaramiento de deleciones cuando se emplean técnicas de PCR convencional, ya que se amplifica la región no delecionada, dejando enmascarada la delecionada, por lo que no podemos asegurar que se hayan pasado por alto algunas deleciones. Sin embargo, a efectos prácticos, estas deleciones no explicarían las discordancias entre la PDR y el resto de métodos, ya que, en estos casos, las PDR deberían detectar las proteínas sintetizadas por las cepas sin deleción.

Otra limitación importante fue el no poder llevar a cabo un estudio de correlación entre los SNPs observados en *pfk13* y los fenotipos clínicos o experimentales (*in vivo* o *in vitro*) en relación con las resistencias a las artemisininas. Esta circunstancia restringe principalmente la capacidad de establecer el posible impacto de las mutaciones no sinónimas detectadas. Asimismo, no fue posible evaluar el número de copias del gen *pfmdr1*, un factor importante en la susceptibilidad a la lumefantrina, ni analizar los marcadores de resistencia en *pfcrt*, lo que limita la interpretación completa del perfil de resistencia a este fármaco. No obstante, este último aspecto se pretende incluir en las líneas de investigación futuras, con el objetivo de obtener una caracterización más completa de los marcadores moleculares asociados a resistencia a los antimaláricos en Cubal.

Estas limitaciones ponen de manifiesto la necesidad de futuros estudios que integren un muestreo longitudinal, metodologías más sensibles y una mayor correlación con los datos

clínicos, con el fin de profundizar en la compresión de la epidemiología de la malaria en Cubal y otros entornos rurales de Angola.

7. Conclusiones

I. La proporción de casos de malaria en la población febril de Cubal, calculada a partir de los resultados de todas las técnicas diagnósticas utilizadas es muy elevada (61,5%). *P. falciparum* es la especie más prevalente (100%), mientras que *P. malariae* (17,2%) y *P. ovale* (9,4%) se detectaron exclusivamente en coinfección con *P. falciparum*. La elevada frecuencia de infecciones mixtas (18,6%) resalta la complejidad epidemiológica local.

II. La PCR en tiempo real presenta un mayor rendimiento diagnóstico que la microscopía, especialmente en la detección de infecciones de baja densidad parasitaria. Además, permite detectar infecciones submicroscópicas e identificar especies e infecciones mixtas con mayor exactitud.

III. El uso de DBS facilita el transporte y la conservación de muestras sin necesidad de cadena de frío. Esta metodología presenta mejores resultados de PCR en tiempo real que la extracción de ADN *in situ* y su transporte posterior, aunque conlleva una pérdida de sensibilidad analítica respecto a la sangre total.

IV. En Cubal, no se han detectado deleciones en los genes *pfhrp2*/*pfhrp3* que expliquen los resultados falsos negativos de la PDR-*Pf*HRP2, lo que indica que estas pruebas continúan siendo adecuadas para su uso.

V. No se identificaron mutaciones validadas ni candidatas en el gen *pfk13*, lo que sugiere la ausencia actual de evidencia molecular de resistencia parcial a las artemisininas en Cubal.

VI. La elevada frecuencia de los haplotipos N**F**D y NYD en el gen *pfmdr1* indica una posible disminución de la susceptibilidad a la lumefantrina, lo que podría comprometer la eficacia futura del tratamiento con AL en Cubal.

VII. La presencia de haplotipos *pfdhfr*/*pfdhps* asociados a resistencias parciales y totales a la SP, sin alcanzar los umbrales establecidos que comprometen su eficacia, y la ausencia de haplotipos superresistentes, sugiere que este fármaco mantiene su efectividad para el TPIe en Cubal, existiendo la posibilidad de ampliar su uso a otras estrategias preventivas.

VIII. La integración de las técnicas moleculares y el uso de DBS para la vigilancia genética de la malaria constituye un enfoque eficaz y aplicable en entornos endémicos de recursos limitados como Cubal. Este modelo permite estimar con mayor precisión la carga de la enfermedad y generar evidencia para adaptar las estrategias diagnósticas y terapéuticas a la evolución genética del parásito.

8. Perspectivas futuras

Las líneas de investigación desarrolladas en esta tesis establecen una base para la implementación de estrategias avanzadas de vigilancia y control de la malaria en Angola. Las perspectivas futuras se orientan tanto a la consolidación de sistemas de monitorización de las variantes genéticas que afectan al diagnóstico y al tratamiento a mayor escala como a la aplicación directa de estos conocimientos en la práctica clínica, con especial relevancia en entornos rurales como Cubal.

Implementación de la vigilancia de deleciones de *pfhrp2* y *pfhrp3*

A pesar de la baja prevalencia de posibles deleciones detectadas en Cubal, resulta prioritario ampliar esta línea de investigación a nivel nacional siguiendo las directrices establecidas en el "Master protocol for surveillance of *pfhrp2*/*3* deletions and biobanking to support future research" editado por la OMS [266]. La implementación de estudios multicéntricos que incluyan centros de distintas provincias permitiría obtener una visión más representativa del país, identificar posibles focos emergentes y monitorizar el umbral del 5% que condiciona cambios en las políticas diagnósticas. Esta estrategia, concebida como un proyecto a medio-largo plazo, resulta indispensable para preservar la eficacia de las PDR-*Pf*HRP2 y anticipar posibles fallos diagnósticos a gran escala.

Expansión de un sistema estructurado de vigilancia de resistencias a antimaláricos que incluya entornos rurales

Actualmente, Angola dispone de un sistema estructurado para el monitoreo de la eficacia de los antimaláricos mediante la colaboración del INIS, el Instituto Nacional de Salud Pública y el PNCM. Este marco institucional permite la realización periódica de EET y vigilancia de marcadores moleculares de resistencia. No obstante, estos estudios se limitan geográficamente solo a centros urbanos localizados en tres provincias: Benguela, Lunda Sul y Zaire; existiendo un vacío de datos provenientes del resto del país y de entornos rurales. La variabilidad de la transmisión en el territorio angoleño, sumada a las disparidades en las condiciones de vida de la población, condiciona drásticamente la forma en que los pacientes buscan atención y reciben tratamiento. En entornos rurales, factores como el desabastecimiento de fármacos orales, el uso frecuente de terapias parenterales sin completar la pauta completa de TCA posterior y la automedicación modifican la presión farmacológica que recibe el parásito, con lo que se podrían observar perfiles de resistencia diferentes en referencia a los entornos urbanos. Por lo tanto, se

debería expandir este sistema a un mayor número de regiones y, específicamente, a los entornos rurales.

Implementación de QPM

El proyecto "Kula Ciwa", financiado por la Fundación la Caixa, actualmente en fase previa a la implementación, representa una oportunidad para la integración de la SP en programas preventivos infantiles (niños menores de 2 años) siguiendo las visitas programadas en el calendario vacunal. Este proyecto permitirá analizar el impacto sobre la selección de marcadores de resistencia en los genes *pfdhfr*/*pfdhps*. El diseño contempla un seguimiento longitudinal pre- y post-intervención utilizando DBS, lo que facilitará una evaluación precisa de la dinámica evolutiva del parásito bajo la presión farmacológica sostenida.

Investigación aplicada a poblaciones especiales

Existen tres líneas de investigación ya iniciadas en Cubal que abren nuevas oportunidades para profundizar en el manejo clínico de la malaria en poblaciones vulnerables e individuos asintomáticos.

- **Malaria y malnutrición:** se analizará la interacción entre ambas condiciones en niños menores de cinco años con desnutrición aguda severa ingresados en la Unidad Especial de Nutrición del HNSP, con el fin de evaluar cómo el estado nutricional influye en la progresión de la malaria y, principalmente optimizar una estrategia de manejo clínico de la sospecha por esta enfermedad en esta población.
- **Coinfección malaria-VIH:** se investigará acerca de la interacción entre ambas infecciones desde un enfoque clínico y diagnóstico, analizando la posible relación del estado inmunológico del huésped y la presentación clínica de la malaria.
- **Portadores asintomáticos:** se estudiará el rendimiento de las PDR en la población asintomática comparándolo con la microscopía de forma que podamos cuantificar el número de falsos positivos y negativos de esta técnica y el papel de esta población como reservorio de la transmisión en Cubal

Las campañas de recolección de muestras en Cubal de estas tres líneas de investigación ya se ha llevado a cabo durante el periodo de realización de la presente tesis doctoral, gracias a las dos becas de movilidad concedidas las cuales se detallan en el Anexo III.

9. Referencias bibliográficas

1. Miller RL, Ikram S, Armelagos GJ, Walker R, Harer WB, Shiff CJ, et al. Diagnosis of *Plasmodium falciparum* infections in mummies using the rapid manual ParaSight-F test. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1994;88:31–2.

2. Cox FE. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. Parasit Vectors. 2010;3:5.

3. Institute of Medicine (US) Committee on the Economics of Antimalarial Drugs, Arrow KJ., Panosian C, Gelband H. Saving lives, buying time: economics of malaria drugs in an age of resistance. Washington (DC): National Academies Press (US); 2004.

4. Nosten F, Richard-Lenoble D, Danis M. A brief history of malaria. Presse Med. 2022;51:104130.

5. Talapko J, Škrlec I, Alebić T, Jukić M, Včev A. Malaria: The past and the present. Microorganisms. 2019;7:179.

6. Ledermann W. Laveran, Marchiafava y el paludismo. Rev chil infecto. 2008;25:216-21.

7. Capanna E. Grassi *versus* Ross: who solved the riddle of malaria? Int Microbiol. 2006;9:69-74.

8. Earle DP. Presidential address a history of malaria and its ironies. Trans Am Clin Climatol Assoc. 1979;90:1-26.

9. Angulo E. Historias de la malaria: Charles Louis Alphonse Laveran y el protozoo. La biología estupenda. 2017.

10. Achan J, Talisuna AO, Erhart A, Yeka A, Tibenderana JK, Baliraine FN, et al. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: Role in the treatment of malaria. Malar J. 2011;10:144.

11. Wellems TE, Plowe CV. Chloroquine-Resistant Malaria. J Infect Dis. 2001;184:770-6.

12. Nájera JA, González-Silva M, Alonso PL. Some lessons for the future from the global malaria eradication programme (1955-1969). PLoS Med. 2011;8:e1000412.

13. Wernsdorfer WH, Payne D. The dynamics of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. Pharmacol Ther. 1991;50:95-121.

14. Hoffman SL, Dimpudus AJ, Campbell JR, Marwoto HA, Sukri N, Rustama D, et al. RII and RIII type resistance of *Plasmodium falciparum* to combination of mefloquine and sulfadoxine/pyrimethamine in Indonesia. Lancet. 1985;326:1039–40.

15. Ashley EA, Pyae Phyo A, Woodrow CJ. Malaria. Lancet. 2018;391:1608–21.

16. Lengeler C. Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria. Cochrane Database Syst Rev. 2004;CD000363.

17. Miller LH, Su X. Artemisinin: Discovery from the Chinese herbal garden. Cell. 2011;146:855-8.

18. White NJ. Antimalarial drug resistance. J Clin Invest. 2004;113:1084–92.

19. World Health Organization. Antimalarial drug combination therapy: Report of a WHO Technical Consultation. Geneva: WHO; 2001. Available from: https://iris.who.int/server/api/core/bitstreams/131ff74d-7458-4513-be64-79d2d9628016/content. Accessed 16 Jun 2026.

20. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria. Geneva: WHO; 2015. Available from: https://www.afro.who.int/sites/default/files/2017-06/9789241549127_eng.pdf. Accessed 16 Jun 2026.

21. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, et al. Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. N Engl J Med. 2009;361:455–67.

22. World Health Organization. Malaria rapid diagnostic test performance: results of WHO product testing of malaria RDTs: round 8 (2016–2018). Geneva: WHO; 2018. Available from: https://iris.who.int/server/api/core/bitstreams/123148ec-c00a-42cd-b471-0fdd743447a2/content. Accessed 16 Jun 2026.

23. Turrientes C, López-Vélez R. Aspectos prácticos del diagnóstico de laboratorio y profilaxis de la malaria. Madrid: Control Calidad SEIMC. Available from: https://controldecalidad.seimc.org/wp-content/uploads/contenidos/revisionestematicas/parasitologia/malaria.pdf. Accessed 16 Jun 2026.

24. Tangpukdee N, Duangdee C, Wilairatana P, Krudsood S. Malaria diagnosis: a brief review. Korean J of Parasitol. 2009;47:93–102.

25. World Health Organization. Estrategia Técnica Mundial contra la Malaria 2016–2030. Ginebra: WHO; 2021. Available from:

https://iris.who.int/server/api/core/bitstreams/a857ad0a-51e2-4593-8c88-1e00a249cada/content. Accessed 16 Jun 2026.

26. Jaramillo Ponce JR, Frugier M. *Plasmodium*, the Apicomplexa Outlier When It Comes to Protein Synthesis. Biomolecules. 2023;14:46.

27. Galen SC, Borner J, Martinsen ES, Schaer J, Austin CC, West CJ, et al. The polyphyly of *Plasmodium*: Comprehensive phylogenetic analyses of the malaria parasites (Order Haemosporida) reveal widespread taxonomic conflict. R Soc Open Sci. 2018;5:171780.

28. Woldegerima E, Getachew F, Misganaw M, Belete D, Aemiro M, Sisay T, et al. Cellular and Molecular mechanisms for invasion, growth and pathogenesis of *Plasmodium* species in human. J Life Sci Biomed. 2025;15:49–61.

29. Francis SE, Sullivan DJ Jr, Goldberg DE. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Annu Rev Microbiol. 1997;51:97–123.

30. Slater AFG. Malaria pigment. Exp Parasitol. 1992;74:362–5.

31. Li Q, Liu T, Lv K, Liao F, Wang J, Tu Y, et al. Malaria: past, present, and future. Signal Transduct Target Ther. 2025;10:188.

32. Sato S. *Plasmodium*—a brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology. J Physiol Anthropol. 2021;40:1.

33. Giribaldi G, D'Alessandro S, Prato M, Basilico N. Etiopathogenesis and Pathophysiology of Malaria. In: Prato M, editor. Human and Mosquito Lysozymes. Cham: Springer Nature; 2014. p. 1-18.

34. Rougeron V, Boundenga L, Arnathau C, Durand P, Renaud F, Prugnolle F. A population genetic perspective on the origin, spread and adaptation of the human malaria agents *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. FEMS Microbiol Rev. 2022;46:fuab047.

35. Poespoprodjo JR, Douglas NM, Ansong D, Kho S, Anstey NM. Malaria. Lancet. 2023;402:2328–45.

36. World Health Organization. World Malaria Report 2025. Geneva; WHO; 2025. Available from: https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2025. Accessed 16 Jun 2026.

37. Siagian FE, Isham D, Ronny, Alfarabi M, Nainggolan S, Daroedono E, et al. The profile of erythrocyte enlargement due to imported cases of *Plasmodium vivax* infection:

its impact to the patient and the community. Int J Community Med Public Health. 2020;7:2499-505.

38. Howes RE, Battle KE, Mendis KN, Smith DL, Cibulskis RE, Baird JK, et al. Global epidemiology of *Plasmodium vivax*. Am J Trop Med Hyg. 2016;95:15–34.

39. Bourgard C, Albrecht L, Kayano ACAV, Sunnerhagen P, Costa FTM. *Plasmodium vivax* biology: Insights provided by genomics, transcriptomics and proteomics. Front Cell Infect Microbiol. 2018;8:34.

40. Sutherland CJ. Persistent Parasitism: The Adaptive Biology of Malariae and Ovale Malaria. Trends Parasitol. 2016;32:808-19.

41. Nolder D, Oguike MC, Maxwell-Scott H, Niyazi HA, Smith V, Chiodini PL, et al. An observational study of malaria in British travellers: *Plasmodium ovale wallikeri* and *Plasmodium ovale curtisi* differ significantly in the duration of latency. 2013;3:e002711.

42. Fuehrer HP, Campino S, Sutherland CJ. The primate malaria parasites *Plasmodium malariae*, *Plasmodium brasilianum* and *Plasmodium ovale* spp.: genomic insights into distribution, dispersal and host transitions. Malar J. 2022;21:138.

43. Collins WE, Jeffery GM. *Plasmodium malariae*: Parasite and disease. Clin Microbiol Rev. 2007;20:579-92.

44. Imwong M, Madmanee W, Suwannasin K, Kunasol C, Peto TJ, Tripura R, et al. Asymptomatic natural human infections with the simian malaria parasites *Plasmodium cynomolgi* and *Plasmodium knowlesi*. J Infect Dis. 2019;219:695–702.

45. Hang JW, Tukijan F, Lee EQH, Abdeen SR, Aniweh Y, Malleret B. Zoonotic malaria: Non-*Laverania Plasmodium* biology and invasion mechanisms. Pathogens. 2021;10:889.

46. Gething P, Rumisha S. Malaria Atlas Project: *Plasmodium falciparum* clinical cases in all age groups. Available from: https://malariaatlas.org/. Accessed 16 Jun 2026.

47. Centers for Disease Control and Prevention. Malaria Lifecycle. Atlanta: CDC. Available from: https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/parasitos/plasmodium-falciparum. Accessed 16 Jun 2026.

48. Vaughan AM, Kappe SHI. Malaria parasite liver infection and exoerythrocytic biology. Cold Spring Harb Perspect Med. 2017;7:a025486.

49. Baum J, Maier AG, Good RT, Simpson KM, Cowman AF. Invasion by *P. falciparum* merozoites suggests a hierarchy of molecular interactions. PLoS Pathog. 2005;1:e37.

50. Yan Y, Verzier LH, Cheung E, Appetecchia F, March S, Craven AR, et al. Mapping *Plasmodium* transitions and interactions in the *Anopheles* female. Nature. 2025;648:451–8.

51. Meibalan E, Marti M. Biology of malaria transmission. Cold Spring Harb Perspect Med. 2017;7:a025452.

52. Verra F, Angheben A, Martello E, Giorli G, Perandin F, Bisoffi Z. A systematic review of transfusion-transmitted malaria in non-endemic areas. Malar J. 2018;17:36.

53. Pierrotti LC, Levi ME, Di Santi SM, Segurado AC, Petersen E. Malaria disease recommendations for solid organ transplant recipients and donors. Transplantation. 2018;102:S16–26.

54. Saito M, Briand V, Min AM, McGready R. Deleterious effects of malaria in pregnancy on the developing fetus: a review on prevention and treatment with antimalarial drugs. Lancet Child Adolesc Health. 2020;4:761–74.

55. Farrar J, Hotez PJ, Junghanss T, Kang G, Lalloo D, White NJ, et al. Manson's Tropical Diseases E-Book. 23rd ed. Philadelphia: Elsevier Health Sciences; 2013.

56. World Health Organization. WHO guidelines for malaria, 30 November 2024. Geneva: WHO; 2024. Available from: https://media.malariaworld.org/B09146_eng_e61c150520.pdf. Accessed 16 Jun 2026.

57. World Health Organization. Global Malaria Programme operational strategy 2024-2030. Geneva: WHO; 2024. Available from: https://iris.who.int/server/api/core/bitstreams/b7e557ae-2b5b-4a1d-8aca-5985d3e36ac5/content. Accessed 16 Jun 2026.

58. Anjorin S, Okolie E, Yaya S. Malaria profile and socioeconomic predictors among under-five children: an analysis of 11 sub-Saharan African countries. Malar J. 2023;22:55.

59. Li J, Docile HJ, Fisher D, Pronyuk K, Zhao L. Current Status of Malaria Control and Elimination in Africa: Epidemiology, Diagnosis, Treatment, Progress and Challenges. J Epidemiol Glob Health. 2024;14:561-79.

60. Villena OC, Arab A, Lippi CA, Ryan SJ, Johnson LR. Influence of environmental, geographic, socio-demographic, and epidemiological factors on presence of malaria at the community level in two continents. Sci Rep. 2024;14:16734.

61. Degarege A, Fennie K, Degarege D, Chennupati S, Madhivanan P. Improving socioeconomic status may reduce the burden of malaria in sub Saharan Africa: A systematic review and meta-analysis. PLoS One. 2019;14:e0211205.

62. U.S. President's Malaria Initiative. Angola Malaria Operational Plan FY 2024. PMI; 2024. Available from: https://mesamalaria.org/wp-content/uploads/2025/04/ANGOLA-Malaria-Profile-PMI-FY-2024-1.pdf. Accessed 17 Jun 2026.

63. Gil E. Incidencia de malaria y factores de riesgo asociados a cambios socioeconómicos en cubal, zona mesoendemica estable de malaria en Angola. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona; 2024.

64. Tavares W, Morais J, Martins JF, Scalsky RJ, Stabler TC, Medeiros MM, et al. Malaria in Angola: recent progress, challenges and future opportunities using parasite demography studies. Malar J. 2022;21:396.

65. Domingos ES. Rethinking malaria elimination: a perspective on challenges and solutions in Angola. Malar J. 2025;24:214.

66. Instituto Nacional de Estatística (INE) Angola. Inquérito de Indicadores Múltiplos e de Saúde (IIMS) 2023–2024 Relatório de Indicadores Básicos. Luanda: INE; 2024. Available from: https://www.ine.gov.ao/Arquivos/arquivosCarregados//Carregados/Publicacao_638818795475855073.pdf. Accessed 16 Jun 2026.

67. Ministério da Saúde de Angola. Manual de diagnóstico e tratamento da malária. Luanda; 2022. Available from: https://es.scribd.com/document/678479391/Manual-de-Diagno-stico-e-Tto-da-Mala-ria-2022-013722-formatado. Accessed 17 Jun 2026.

68. Salvador F, Cossio Y, Riera M, Sánchez-Montalvá A, Bocanegra C, Mendioroz J, et al. Changes in malaria epidemiology in a rural area of Cubal, Angola. Malar J. 2015;14:21.

69. Tarimo D. Challenges of malaria diagnosis in clinical settings and disease surveillance under reduced malaria burden in Tanzania. Asian Pac J Trop Dis. 2017;7:1-7.

70. Diagne A, Sambe BS, Gaba FM, Sarr I, Diatta AS, Sadio O, et al. Variable effects of non-*falciparum* species infections on malaria disease severity in high transmission regions in Senegal. Trop Med Health. 2024;52:93.

71. Long B, MacDonald A, Liang SY, Brady WJ, Koyfman A, Gottlieb M, et al. Malaria: A focused review for the emergency medicine clinician. Am J Emerg Med. 2024;77:7-16.

72. World Health Organization. WHO guidelines for malaria, 13 August 2025. Geneva: WHO; 2025. Available from: https://iris.who.int/server/api/core/bitstreams/26a6af2d-060c-4449-8207-1f25e63c6cc3/content. Accessed 17 Jun 2026.

73. Dayananda KK, Achur RN, Gowda DC. Epidemiology, drug resistance, and pathophysiology of *Plasmodium vivax* malaria. J Vector Borne Dis. 2018;55:1-8.

74. Arévalo-Herrera M, Lopez-Perez M, Medina L, Moreno A, Gutierrez JB, Herrera S. Clinical profile of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections in low and unstable malaria transmission settings of Colombia. Malar J. 2015;14:154.

75. Dauby N, Martin C. Re: 'How to manage adult patients with malaria in the non-endemic setting' by Antinori et al. Clin Microbiol Inf. 2025;31:298-9.

76. Charoenwisedsil R, Asawapaithulsert P, Pisutsan P, Chotivanich K, Matsee W. Challenges of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* co-infection. J Travel Med. 2023;30:taad120.

77. Kassie GA, Azeze GA, Gebrekidan AY, Lombebo AA, Adella GA, Haile KE, et al. Asymptomatic malaria infection and its associated factors among pregnant women in Ethiopia; a systematic review and meta-analysis. Parasite Epidemiol Control. 2024;24:e00339.

78. World Health Organization. Programa Mundial Sobre Malaria: Pruebas diagnósticas. Available from: https://www.who.int/es/teams/global-malaria-programme/case-management/diagnosis. Accessed 17 Jun 2026.

79. Maturana CR, de Oliveira AD, Nadal S, Bilalli B, Serrat FZ, Soley ME, et al. Advances and challenges in automated malaria diagnosis using digital microscopy imaging with artificial intelligence tools: A review. Front Microbiol. 2022;13:1006659.

80. Sathpathi S, Mohanty AK, Satpathi P, Mishra SK, Behera PK, Patel G, et al. Comparing Leishman and Giemsa staining for the assessment of peripheral blood smear preparations in a malaria-endemic region in India. Malar J. 2014;13:512.

81. Mbanefo A, Kumar N. Evaluation of malaria diagnostic methods as a key for successful control and elimination programs. Trop Med Infect Dis. 2020;5:102.

82. Kavanaugh MJ, Azzam SE, Rockabrand DM. Malaria rapid diagnostic tests: Literary review and recommendation for a quality assurance, quality control algorithm. Diagnostics (Basel). 2021;11:768.

83. Poti KE, Sullivan DJ, Dondorp AM, Woodrow CJ. HRP2: Transforming Malaria Diagnosis, but with Caveats. Trends Parasitol. 2020;36:112-26.

84. World Health Organization. Transporting, Storing, and Handling Malaria Rapid Diagnostic Tests in Health Clinics. Geneva: WHO; 2009. Available from: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/documents/publications/gmp/malaria-rdt-remote-2009.pdf?sfvrsn=375f8b6c_2&download=true. Accessed 17 Jun 2026.

85. Plucinski MM, Dimbu PR, Fortes F, Abdulla S, Ahmed S, Gutman J, et al. Posttreatment HRP2 clearance in patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. J Infect Dis. 2018;217:685–92.

86. Gatton ML, Chaudhry A, Glenn J, Wilson S, Ah Y, Kong A, et al. Impact of *Plasmodium falciparum* gene deletions on malaria rapid diagnostic test performance. Malar J. 2020;19:392.

87. Kato Jumba K. Narrative Review of Diagnostic Innovations in Malaria. Res Invent J Sci Exp Sci. 2025;5:181-94.

88. Adams M, Joshi SN, Mbambo G, Mu AZ, Roemmich SM, Shrestha B, et al. An ultrasensitive reverse transcription polymerase chain reaction assay to detect asymptomatic low-density *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections in small volume blood samples. Malar J. 2015;14:520.

89. Nain M, Sinsha A, Sharma A. Dried blood spots: a robust tool for malaria surveillance in countries targeting elimination. J Vector Borne Dis. 2023;60:11–7.

90. López AC, Quan JC, Mejía RE, Banegas E, Fontecha G. Comparación de gota gruesa y PCR para la detección de infecciones maláricas en Honduras. Rev cienc tecnol. 2012;9:68-81.

91. CerTest BIOTEC. VIASURE Malaria Real Time PCR Detection Kits. Zaragoza: CerTest Biotec. Available from: https://www.certest.es/wp-content/uploads/2023/02/VIASURE_MALARIA_SP.pdf. Accessed 17 Jun 2026.

92. Que cumplan muchas más. Evaluación de nuevas técnicas en DBS. Available from: https://www.quecumplanmuchosmas.com/dbs-2/. Accessed 17 Jun 2026.

93. Febrer-Sendra B, Crego-Vicente B, Nindia A, Martínez-Campreciós J, Aixut S, Mediavilla A, et al. First field and laboratory evaluation of LAMP assay for malaria diagnosis in Cubal, Angola. Parasit Vectors. 2023;16:343.

94. Ocker R, Prompunjai Y, Chutipongvivate S, Karanis P. Malaria diagnosis by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in Thailand. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2016;58:27.

95. Mangano VD, Pinto B, Marotta R, Galli L, Moscato GA, Lupetti A, et al. Prevention of Transfusion-Transmitted Malaria and Chagas Disease in Non-Endemic Countries: An 8-Year Study of Seroprevalence Among Donors at Risk in Tuscany (Central Italy). Pathogens. 2026; 15:20.

96. Das D, Vongpromek R, Assawariyathipat T, Srinamon K, Kennon K, Stepniewska K, et al. Field evaluation of the diagnostic performance of EasyScan GO: a digital malaria microscopy device based on machine-learning. Malar J. 2022;21:122.

97. Maturana CR, de Oliveira AD, Nadal S, Serrat FZ, Sulleiro E, Ruiz E, et al. iMAGING: a novel automated system for malaria diagnosis by using artificial intelligence tools and a universal low-cost robotized microscope. Front Microbiol. 2023;14:1240936.

98. Faratisha IFD, Yunita KC, Rahmawati HR, Fitri LE, Winaris N, Muflikah L. Diagnostic Accuracy of Utilizing Artificial Intelligence for Malaria Diagnostic: A Systematic Review and Meta-Analysis. Infect Dis Rep. 2026;18:11.

99. Tan AF, Thota P, Sakam SSB, Lew YL, Rajahram GS, William T, et al. Evaluation of a point-of-care haemozoin assay (Gazelle device) for rapid detection of *Plasmodium knowlesi* malaria. Sci Rep. 2023;13:4760.

100. Orbán Á, Longley RJ, Sripoorote P, Maneechai N, Nguitragool W, Butykai Á, et al. Sensitive detection of *Plasmodium vivax* malaria by the rotating-crystal magneto-optical method in Thailand. Sci Rep. 2021;11:18547.

101. Yadem AC, Armstrong JN, Sarimollaoglu M, Kiki Massa C, Ndifo JM, Menyaev YA, et al. Noninvasive in vivo photoacoustic detection of malaria with Cytophone in Cameroon. Nat Commun. 2024;15:9228.

102. O'Neill PM, Barton VE, Ward SA. The molecular mechanism of action of artemisinin - The debate continues. Molecules. 2010;15:1705–21.

103. Hanboonkunupakarn B, White NJ. Advances and roadblocks in the treatment of malaria. Br J Clin Pharmacol. 2022;88:374–82.

104. Petersen I, Eastman R, Lanzer M. Drug-resistant malaria: Molecular mechanisms and implications for public health. FEBS Lett. 2011;585:1551-62.

105. Popovici J, Tebben K, Witkowski B, Serre D. Primaquine for *Plasmodium vivax* radical cure: What we do not know and why it matters. Int J Parasitol Drugs Drug Resist. 2021;15:36–42.

106. Marwa K, Kapesa A, Baraka V, Konje E, Kidenya B, Mukonzo J, et al. Therapeutic efficacy of artemether-lumefantrine, artesunate-amodiaquine and dihydroartemisinin-piperaquine in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Sub-Saharan Africa: A systematic review and meta-analysis. PLoS One. 2022;17:e0264339.

107. Molina-de la Fuente I. Herramientas de epidemiología molecular para mejorar el control de la malaria desde la salud pública en africa subsahariana. Alcalá de Henares: Universidad de Alcalá; 2014.

108. Chatio S, Aborigo R, Adongo PB, Anyorigiya T, Akweongo P, Oduro A. Adherence and uptake of artemisinin-based combination treatments for uncomplicated malaria: A qualitative study in northern Ghana. PLoS One. 2015;10:e0116856.

109. Zani B, Gathu M, Donegan S, Olliario PL, Sinclair D. Dihydroartemisinin-piperaquine for treating uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. Cochrane Database Syst Rev. 2014;2014:CD010927.

110. Wasakul V, Verschuuren TD, Thuy-Nhien N, Booth E, Quang HH, Thang ND, et al. Genetic surveillance of *Plasmodium falciparum* populations following treatment policy revisions in the Greater Mekong Subregion. Nat Commun. 2025;16(1):4689.

111. Nosten F, van Vugt M, Price R, Luxemburger C, Thway KL, Brockman A, et al. Effects of artesunate-mefloquine combination on incidence of *Plasmodium falciparum* malaria and mefloquine resistance in western Thailand: A prospective study. Lancet. 2000;356:297–302.

112. Muñoz J, Rojo-Marcos G, Ramírez-Olivencia G, Salas-Coronas J, Treviño B, Perez Arellano JL, et al. Diagnosis and treatment of imported malaria in Spain: Recommendations from the Malaria Working Group of the Spanish Society of Tropical Medicine and International Health (SEMTSI). Enferm Infecc Microbiol Clin. 2015;33:e1-e13.

113. Moehrle JJ. Development of New Strategies for Malaria Chemoprophylaxis: From Monoclonal Antibodies to Long-Acting Injectable Drugs. Trop Med Infect Dis. 2022;7:58.

114. Nana RRD, Hawadak J, Foko LPK, Kumar A, Chaudhry S, Arya A, et al. Intermittent preventive treatment with Sulfadoxine pyrimethamine for malaria: a global overview and challenges affecting optimal drug uptake in pregnant women. Pathog Glob Health. 2023;117:462-75.

115. van Eijk AM, Stepniewska K, Khairallah C, Rodriguez E, Ahn J, Gutman JR, et al. The impact of sulfadoxine–pyrimethamine resistance on the effectiveness of intermittent preventive treatment for the prevention of malaria in pregnancy in Africa: an updated systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis. 2025;25:1336–46.

116. Schneider ZD, Shah MP, Boily MC, Busbee AL, Hwang J, Lindblade KA, et al. Mass Drug Administration to Reduce Malaria Transmission: A Systematic Review and Meta-Analysis. Am J Trop Med Hyg. 2023;110:17-29.

117. Cowell AN, Winzeler EA. The genomic architecture of antimalarial drug resistance. Brief Funct Genomics. 2019;18:314–28.

118. Fidock DA, Rosenthal PJ. Artemisinin resistance in Africa: How urgent is the threat? Med. 2021;2:1287–8.

119. Apinjoh TO, Mugri RN, Miotto O, Chi HF, Tata RB, Anchang-Kimbi JK, et al. Molecular markers for artemisinin and partner drug resistance in natural *Plasmodium falciparum* populations following increased insecticide treated net coverage along the slope of mount Cameroon: Cross-sectional study. Infect Dis Poverty. 2017;6:136.

120. Milong Melong CS, Peloewetse E, Russo G, Tamgue O, Tchoumbougnang F, Paganotti GM. An overview of artemisinin-resistant malaria and associated *Pfk13* gene mutations in Central Africa. Parasitol Res. 2024;123:277.

121. Hodoameda P. *P. falciparum* and Its Molecular Markers of Resistance to Antimalarial Drugs. In: Tyagi RK. *Plasmodium* Species and Drug Resistance. London: IntechOpen; 2021. p. 115-128.

122. Balikagala B, Fukuda N, Ikeda M, Katuro OT, Tachibana S-I, Yamauchi M, et al. Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Africa. N Engl J Med. 2021;385:1163-71.

123. Ariey F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois AC, Khim N, et al. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. Nature. 2014;505:50-55.

124. Haldar K, Bhattacharjee S, Safeukui I. Drug resistance in *Plasmodium*. Nat Rev Microbiol. 2018;16:156-70.

125. Ibraheem ZO, Abd Majid R, Noor SM, Sedik HM, Basir R. Role of different *pfcrt* and *pfmdr-1* mutations in conferring resistance to antimalaria drugs in *Plasmodium falciparum*. Malar Res Treat. 2014;2014:950424.

126. Kaingona-Daniel EP, Gomes LR, Gama BE, Almeida-De-Oliveira NK, Fortes F, Ménard D, et al. Low-grade sulfadoxine-pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* parasites from Lubango, Angola. Malar J. 2016;15:309.

127. Das S, Kérah-Hinzoumbé C, Kebféné M, Srisutham S, Nagorngar TY, Saralamba N, et al. Molecular surveillance for operationally relevant genetic polymorphisms in *Plasmodium falciparum* in Southern Chad, 2016–2017. Malar J. 2022;21:83.

128. Davlantes E, Dimbu PR, Ferreira CM, Florinda Joao M, Pode D, Félix J, et al. Efficacy and safety of artemether-lumefantrine, artesunate-amodiaquine, and dihydroartemisinin-piperaquine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in three provinces in Angola, 2017. Malar J. 2018;17:144.

129. Dimbu PR, Labuda S, Ferreira CM, Caquece F, André K, Pembele G, et al. Therapeutic response to four artemisinin-based combination therapies in Angola, 2021. Antimicrob Agents Chemother. 2024;68:e0152523.

130. Adegbite BR, Edoa JR, Honkpehedji YJ, Zinsou FJ, Dejon-Agobe JC, Mbong-Ngwese M, et al. Monitoring of efficacy, tolerability and safety of artemether-lumefantrine and artesunate-amodiaquine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Lambaréné, Gabon: an open-label clinical trial. Malar J. 2019;18:424.

131. Dimbu PR, Horth R, Cândido ALM, Ferreira CM, Caquece F, Garcia LEA, et al. Continued low efficacy of artemether-lumefantrine in Angola in 2019. Antimicrob Agents Chemother. 2021;65:e01949-20.

132. Fançony C, Fortes-Gabriel E, Zage F, Alexiou E, Broumou I, Pernaute-Lau L, et al. Artemether-Lumefantrine Treatment Selects *Plasmodium falciparum* Multidrug Resistance 1 (*pfmdr1*) Increased Copy Number Among African Malaria Infections. J Infect Dis. 2025;231:e1119-28.

133. Berzosa P, Esteban-Cantos A, García L, González V, Navarro M, Fernández T, et al. Profile of molecular mutations in *pfdhfr*, *pfdhps*, *pfmdr1*, and *pfcrt* genes of *Plasmodium falciparum* related to resistance to different anti-malarial drugs in the Bata District (Equatorial Guinea). Malar J. 2017;16:28.

134. Florimond C, de Laval F, Early AM, Sauthier S, Lazrek Y, Pelleau S, et al. Impact of piperaquine resistance in *Plasmodium falciparum* on malaria treatment effectiveness in The Guianas: a descriptive epidemiological study. Lancet Infect Dis. 2024;24(2):161-171.

135. Berzosa P, Molina de la Fuente I, Ta-Tang TH, González V, García L, Rodríguez-Galet A, et al. Temporal evolution of the resistance genotypes of *Plasmodium falciparum* in isolates from Equatorial Guinea during 20 years (1999 to 2019). Malar J. 2021;20:463.

136. Deen JL, von Seidlein L, Pinder M, Walraven GE, Greenwood BM. The safety of the combination artesunate and pyrimethamine-sulfadoxine given during pregnancy. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2001;95:424–8.

137. Kamya MR, Nankabirwa JI, Ebong C, Asua V, Kiggundu M, Orena S, et al. Efficacies of artemether–lumefantrine, artesunate–amodiaquine, dihydroartemisinin–piperaquine, and artesunate–pyronaridine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in children aged 6 months to 10 years in Uganda: a randomised, open-label, phase 4 clinical trial. Lancet Infect Dis. 2026;26:67-78.

138. Pryce J, Hine P. Pyronaridine-artesunate for treating uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. Cochrane Database Syst Rev. 2019;1:CD006404.

139. Sinclair D, Donegan S, Lalloo DG. Artesunate versus quinine for treating severe malaria. Cochrane Database Syst Rev. 2011;3:CD005967.

140. Esu E, Effa EE, Opie ON, Uwaoma A, Meremikwu MM. Artemether for severe malaria. Cochrane Database Syst Rev. 2014;2014:CD010678.

141. Cui L, Mharakurwa S, Ndiaye D, Rathod PK, Rosenthal PJ. Antimalarial drug resistance: Literature review and activities and findings of the ICEMR network. Am J Trop Med Hyg. 2015;93:57-68.

142. Nomura T, Carlton JM, Baird JK, Del Portillo HA, Fryauff DJ, Rathore D, et al. Evidence for Different Mechanisms of Chloroquine Resistance in 2 *Plasmodium* Species That Cause Human Malaria. J Infect Dis. 2001;183:1653-61.

143. Ciavarella C, Drakeley C, Price RN, Mueller I, White M. Quantifying *Plasmodium vivax* radical cure efficacy: a modelling study integrating clinical trial data and transmission dynamics. Lancet Infect Dis. 2025;25:668-677.

144. Beshir KB, Muwanguzi J, Nader J, Mansukhani R, Traore A, Gamougam K, et al. Prevalence of *Plasmodium falciparum* haplotypes associated with resistance to

sulfadoxine–pyrimethamine and amodiaquine before and after upscaling of seasonal malaria chemoprevention in seven African countries: a genomic surveillance study. Lancet Infect Dis. 2023;23:361-70.

145. Staines HM, Burrow R, Teo BH, Chis Ster I, Kremsner PG, Krishna S. Clinical implications of *Plasmodium* resistance to atovaquone/proguanil: A systematic review and meta-analysis. J Antimicrob Chemother. 2018;73(3):581-595.

146. Mockenhaupt FP. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum*. Parasitol Today. 1995;11:248-53.

147. Riley LW, Blanton RE. Advances in Molecular Epidemiology of Infectious Diseases: Definitions, Approaches, and Scope of the Field. Microbiol Spectr. 2018;6:10.1128/microbiolspec.ame-0001-2018.

148. Escalante AA, Pacheco MA. Malaria Molecular Epidemiology: An Evolutionary Genetics Perspective. 2019;7:10.1128/microbiolspec.ame-0010-2019.

149. Dalmat R, Naughton B, Kwan-Gett TS, Slyker J, Stuckey EM. Use cases for genetic epidemiology in malaria elimination. Malar J. 2019;18(1):163.

150. Cheng Q, Gatton ML, Barnwell J, Chiodini P, McCarthy J, Bell D, et al. *Plasmodium falciparum* parasites lacking histidine-rich protein 2 and 3: A review and recommendations for accurate reporting. Malar J. 2014;13:283.

151. Kong A, Wilson SA, Ah Y, Nace D, Rogier E, Aidoo M. HRP2 and HRP3 cross-reactivity and implications for HRP2-based RDT use in regions with *Plasmodium falciparum hrp2* gene deletions. Malar J. 2021;20:207.

152. Beshir KB, Parr JB, Cunningham J, Cheng Q, Rogier E. Screening strategies and laboratory assays to support *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein deletion surveillance: where we are and what is needed. Malar J. 2022;21(1):201.

153. Baker J, Ho M-F, Pelecanos A, Gatton M, Chen N, Abdullah S, et al. Global sequence variation in the histidine-rich proteins 2 and 3 of *Plasmodium falciparum*: implications for the performance of malaria rapid diagnostic tests. Malar J. 2010;9:129.

154. Fontecha G, Mejía RE, Banegas E, Ade MP, Mendoza L, Ortiz B, et al. Deletions of *pfhrp2* and *pfhrp3* genes of *Plasmodium falciparum* from Honduras, Guatemala and Nicaragua. Malar J. 2018;17:320.

155. Lê HG, Kang JM, Lee J, Yoo WG, Myint MK, Lin K, et al. Genetic variations in histidine-rich protein 2 and histidine-rich protein 3 of Myanmar *Plasmodium falciparum* isolates. Malar J. 2020;19:388.

156. Nair S, Li X, Nkhoma SC, Anderson T. Fitness Costs of *pfhrp2* and *pfhrp3* Deletions Underlying Diagnostic Evasion in Malaria Parasites. J Infect Dis. 2022;226:1637-45.

157. Molina-de la Fuente I, Yimar M, García L, González V, Amor A, Anegagrie M, et al. Deletion patterns, genetic variability and protein structure of *pfhrp2* and *pfhrp3*: implications for malaria rapid diagnostic test in Amhara region, Ethiopia. Malar J. 2022;21:287.

158. Martiáñez-Vendrell X, Skjefte M, Sikka R, Gupta H. Factors Affecting the Performance of HRP2-Based Malaria Rapid Diagnostic Tests. Trop Med Infect Dis. 2022;7:265.

159. Gamboa D, Ho MF, Bendezu J, Torres K, Chiodini PL, Barnwell JW, et al. A large proportion of *P. falciparum* isolates in the Amazon region of Peru lack *pfhrp2* and *pfhrp3*: Implications for malaria rapid diagnostic tests. PLoS One. 2010;5:e8091.

160. Thomson R, Parr JB, Cheng Q, Chenet S, Perkins M, Cunningham J. Prevalence of *Plasmodium falciparum* lacking histidine-rich proteins 2 and 3: A systematic review. Bull World Health Organ. 2020;98:558-68F.

161. Menegon M, L'Episcopia M, Nurahmed AM, Talha AA, Nour BYM, Severini C. Identification of *Plasmodium falciparum* isolates lacking histidine-rich protein 2 and 3 in Eritrea. Infect Genet Evol. 2017;55:131-34.

162. Feleke SM, Reichert EN, Mohammed H, Brhane BG, Mekete K, Mamo H, et al. *Plasmodium falciparum* is evolving to escape malaria rapid diagnostic tests in Ethiopia. Nat Microbiol. 2021;6:1289-99.

163. Iriart X, Menard S, Chauvin P, Mohamed HS, Charpentier E, Mohamed MA, et al. Misdiagnosis of imported *falciparum* malaria from African areas due to an increased prevalence of *pfhrp2*/*pfhrp3* gene deletion: the Djibouti case. Emerg Microbes Infect. 2020;9:1984-1987.

164. Amoah LE, Abankwa J, Oppong A. *Plasmodium falciparum* histidine rich protein-2 diversity and the implications for *Pf*HRP 2: Based malaria rapid diagnostic tests in Ghana. Malar J. 2016;15:101.

165. Koita OA, Doumbo OK, Ouattara A, Tall LK, Konaré A, Diakité M, et al. False-negative rapid diagnostic tests for malaria and deletion of the histidine-rich repeat region of the *hrp2* gene. Am J Trop Med Hyg. 2012;86:194-8.

166. Berzosa P, González V, Taravillo L, Mayor A, Romay-Barja M, Garciá L, et al. First evidence of the deletion in the *pfhrp2* and *pfhrp3* genes in *Plasmodium falciparum* from Equatorial Guinea. Malar J. 2020;19:99.

167. Parr JB, Verity R, Doctor SM, Janko M, Carey-Ewend K, Turman BJ, et al. *Pfhrp2*-Deleted *Plasmodium falciparum* Parasites in the Democratic Republic of the Congo: A National Cross-sectional Survey. J Infect Dis. 2017;216:36-44.

168. Plucinski MM, Herman C, Jones S, Dimbu R, Fortes F, Ljolje D, et al. Screening for *Pfhrp2*/*3*-Deleted *Plasmodium falciparum*, Non-*falciparum*, and Low-Density Malaria Infections by a Multiplex Antigen Assay. Journal of Infectious Diseases. J Infect Dis. 2019;219:437-47.

169. Watson OJ, Slater HC, Verity R, Parr JB, Mwandagalirwa MK, Tshefu A, et al. Modelling the drivers of the spread of *Plasmodium falciparum hrp2* gene deletions in sub-Saharan Africa. Elife. 2017;6:e25008.

170. World Health Organization. Surveillance template protocol for *pfhrp2*/*pfhrp3* gene deletions: Second edition. Geneva: WHO; 2024. Available from: https://iris.who.int/server/api/core/bitstreams/a9a8afca-eec4-4d19-ac77-88934d9f57b2/content. Accessed 17 Jun 2026.

171. Baker J, Mccarthy J, Gatton M, Kyle DE, Belizario V, Luchavez J, et al. Genetic Diversity of *Plasmodium falciparum* Histidine-Rich Protein 2 (*Pf*HRP2) and Its Effect on the Performance of *Pf*HRP2-Based Rapid Diagnostic Tests. J Infect Dis. 2005;192:870-7.

172. Lee N, Baker J, Andrews KT, Gatton ML, Bell D, Cheng Q, et al. Effect of sequence variation in *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 on binding of specific monoclonal antibodies: Implications for rapid diagnostic tests for malaria. J Clin Microbiol. 2006;44:2773-78.

173. World Health Organization. Malaria: Artemisinin partial resistance. Available from: https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/artemisinin-resistance. Accessed 17 Jun 2026.

174. World Health Organization. World malaria report 2023. Geneva: WHO; 2023. Available from: https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2023. Accessed 16 Jun 2026.

175. Uwimana A, Legrand E, Stokes BH, Ndikumana JM, Warsame M, Umulisa N, et al. Emergence and clonal expansion of in vitro artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum kelch13* R561H mutant parasites in Rwanda. Nat Med. 2020;26:1602-8.

176. Bwire GM, Ngasala B, Mikomangwa WP, Kilonzi M, Kamuhabwa AAR. Detection of mutations associated with artemisinin resistance at *k13*-propeller gene and a near complete return of chloroquine susceptible *falciparum* malaria in Southeast of Tanzania. Sci Rep. 2020;10:3500.

177. Asua V, Conrad MD, Aydemir O, Duvalsaint M, Legac J, Duarte E, et al. Changing Prevalence of Potential Mediators of Aminoquinoline, Antifolate, and Artemisinin Resistance across Uganda. J Infect Dis. 2021;223:985-94.

178. L'Episcopia M, Talha AA, Nour BYM, Sana IMA, Caspar E, Thiebaut L, et al. High Prevalence of Artemisinin- Resistant *Plasmodium falciparum*, Southeastern Sudan. Emerg Infect Dis. 2025;31:1211-5.

179. Bayih AG, Getnet G, Alemu A, Getie S, Mohon AN, Pillai DR. A unique *Plasmodium falciparum K13* gene mutation in Northwest Ethiopia. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Am J Trop Med Hyg. 2016;94:132-135.

180. Mihreteab S, Platon L, Berhane A, Stokes BH, Warsame M, Campagne P, et al. Increasing Prevalence of Artemisinin-Resistant HRP2-Negative Malaria in Eritrea. N Engl J Med. 2023;389:1191-202.

181. van Loon W, Bisimwa BC, Byela V, Kirby R, Bugeme PM, Balagizi A, et al. Detection of Artemisinin Resistance Marker *Kelch-13* 469Y in *Plasmodium falciparum*, South Kivu, Democratic Republic of the Congo, 2022. Am J Trop Med Hyg. 2024;110:653-5.

182. Huang F, Yan H, Xue JB, Cui YW, Zhou SS, Xia ZG, et al. Molecular surveillance of *pfcrt*, *pfmdr1* and *pfk13*-propeller mutations in *Plasmodium falciparum* isolates imported from Africa to China. Malar J. 2021;20:73.

183. Fançony C, Brito M, Gil JP. *Plasmodium falciparum* drug resistance in Angola. Malar J. 2016;15:74.

184. Kiaco K, Teixeira J, Machado M, Do Rosário V, Lopes D. Evaluation of artemether-lumefantrine efficacy in the treatment of uncomplicated malaria and its association with *pfmdr1*, *pfatpase6* and *K13*-propeller polymorphisms in Luanda, Angola. Malar J. 2015;14:504.

185. Rodrigues ABB, de Abreu-Fernandes R, Neto Z, Jandondo D, Almeida-De-oliveira NK, de Lavigne Mello AR, et al. *Pfkelch13 Plasmodium falciparum* Mutations in Huambo, Angola. Pathogens. 2022;11:554.

186. Zhang T, Xu X, Jiang J, Yu C, Tian C, Li W. Surveillance of antimalarial resistance molecular markers in imported *Plasmodium falciparum* malaria cases in Anhui, China, 2012-2016. Am J Trop Med Hyg. 2018;98:1132-6.

187. Wang X, Ruan W, Zhou S, Huang F, Lu Q, Feng X, et al. Molecular surveillance of *Pfcrt* and *k13* propeller polymorphisms of imported *Plasmodium falciparum* cases to Zhejiang Province, China between 2016 and 2018. Malar J. 2020;19:59.

188. Mesia Kahunu G, Wellmann Thomsen S, Wellmann Thomsen L, Muhindo Mavoko H, Mitashi Mulopo P, Filtenborg Hocke E, et al. Identification of the *PfK13* mutations R561H and P441L in the Democratic Republic of Congo. Int J Infect Dis. 2024;139:41-9.

189. She D, Wang Z, Liang Q, Lu L, Huang Y, Zhang K, et al. Polymorphisms of *pfcrt*, *pfmdr1*, and *K13*-propeller genes in imported *falciparum* malaria isolates from Africa in Guizhou province, China. BMC Infect Dis. 2020;20:513.

190. Martin AC, Sadler JM, Simkin A, Musonda M, Katowa B, Matoba J, et al. Emergence and Rising Prevalence of Artemisinin Partial Resistance Marker *Kelch13* P441L in a Low Malaria Transmission Setting in Southern Zambia. J Infect Dis. 2025;232:918-22.

191. Baina MT, Djontu JC, Mbama Ntabi JD, Mfoutou Mapanguy CC, Lissom A, Vouvoungui CJ, et al. Polymorphisms in the *Pfcrt*, *Pfmdr1*, and *Pfk13* genes of *Plasmodium falciparum* isolates from southern Brazzaville, Republic of Congo. Sci Rep. 2024;14:27988.

192. Veiga MI, Dhingra SK, Henrich PP, Straimer J, Gnädig N, Uhlemann AC, et al. Globally prevalent *PfMDR1* mutations modulate *Plasmodium falciparum* susceptibility to artemisinin-based combination therapies. Nat Commun. 2016;7:11553.

193. Okell LC, Reiter LM, Ebbe LS, Baraka V, Bisanzio D, Watson OJ, et al. Emerging implications of policies on malaria treatment: Genetic changes in the *Pfmdr-1* gene affecting susceptibility to artemether–lumefantrine and artesunate–amodiaquine in Africa. BMJ Glob Health. 2018;3:e000999.

194. Venkatesan M, Gadalla NB, Stepniewska K, Dahal P, Nsanzabana C, Moriera C, et al. Polymorphisms in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter and multidrug resistance 1 genes: Parasite risk factors that affect treatment outcomes for *P. falciparum* malaria after artemether-lumefantrine and artesunate-amodiaquine. Am J Trop Med Hyg. 2014;91:833-43.

195. Martín Ramírez A, Akindele AA, González Mora V, García L, Lara N, de la Torre-Capitán Matías E, et al. Mutational profile of *pfdhfr*, *pfdhps*, *pfmdr1*, *pfcrt* and *pfk13* genes of *P. falciparum* associated with resistance to different antimalarial drugs in Osun state, southwestern Nigeria. Trop Med Health. 2025;53:49.

196. Sitali L, Mwenda MC, Miller JM, Bridges DJ, Hawela MB, Hamainza B, et al. Surveillance of molecular markers for antimalarial resistance in Zambia: Polymorphism of *Pfkelch 13*, *Pfmdr1* and *Pfdhfr*/*Pfdhps* genes. Acta Trop. 2020;212: 105704.

197. Sidhu AB, Uhlemann AC, Valderramos SG, Valderramos JC, Krishna S, Fidock DA. Decreasing *pfmdr1* copy number in *Plasmodium falciparum* malaria heightens susceptibility to mefloquine, lumefantrine, halofantrine, quinine, and artemisinin. J Infect Dis. 2006;194:528–35.

198. Figueiredo P, Benchimol C, Lopes D, Bernardino L, Do Rosário VE, Varandas L, et al. Prevalence of *pfmdr1*, *pfcrt*, *pfdhfr* and *pfdhps* mutations associated with drug resistance, in Luanda, Angola. Malar J. 2008;7:236.

199. Guémas E, Coppée R, Ménard S, du Manoir M, Nsango S, Makaba Mvumbi D, et al. Evolution and spread of *Plasmodium falciparum* mutations associated with resistance to sulfadoxine–pyrimethamine in central Africa: a cross-sectional study. Lancet Microbe. 2023;4:e983-93.

200. Naidoo I, Roper C. Mapping "partially resistant", "fully resistant", and "super resistant" malaria. Trends Parasitol. 2013;29:505–15.

201. Rosillo SR, Dimbu PR, Cândido ALM, Oh JHM, Ferreira CM, Nieto Andrade B, et al. Molecular Markers of Sulfadoxine-Pyrimethamine Resistance in Samples from

Children with Uncomplicated *Plasmodium falciparum* at Three Sites in Angola in 2019. Antimicrob Agents Chemother. 2023;67:e0160122.

202. Flegg JA, Humphreys GS, Montanez B, Strickland T, Jacome-Meza ZJ, Barnes KI, et al. Spatiotemporal spread of *Plasmodium falciparum* mutations for resistance to sulfadoxine-pyrimethamine across Africa, 1990–2020. PLoS Comput Biol. 2022;18(8):e1010317.

203. World Health Organization. Intermittent preventive treatment for infants using sulfadoxine-pyrimethamine (SP-IPTi) for malaria control in Africa : Implementation field guide. Geneva: WHO; 2011. Available from: https://iris.who.int/server/api/core/bitstreams/fc0b6b77-dd0b-40fc-98c1-dee196f7ff84/content. Accessed 17 Jun 2026.

204. World Health Organization. WHO Evidence Review Group on Intermittent Preventive Treatment (IPT) of malaria in pregnancy. Geneva: WHO; 2013. Available from: https://www.who.int/docs/default-source/malaria/mpac-documentation/mpac-sep13-erg-ipt-malaria-pregnancy-report.pdf. Accessed 17 Jun 2026.

205. Hocke EF, Hansson H, Chopo-Pizarro A, Adegbola AJ, Bolaji O, Ngwa Niba PT, et al. A novel intron variant is associated with emerging *pfdhps* mutant haplotypes in West and Central African *Plasmodium falciparum*. Int J Parasitol Drugs Drug Resist. 2025;29:100611.

206. Mediavilla A, Silgado A, Febrer-Sendra B, Crego-Vicente B, Martínez-Vallejo P, Maturana CR, et al. Real-time PCR for malaria diagnosis and identification of *Plasmodium* species in febrile patients in Cubal, Angola. Parasit Vectors. 2024;17:384.

207. Mediavilla A, Febrer-Sendra B, Silgado A, Martínez-Vallejo P, Crego-Vicente B, Nindia A, et al. Evaluation of dried blood spot sampling for real-time PCR malaria diagnostics in a rural setting in Angola. Parasit Vectors. 2025;18:44.

208. Oyegoke OO, Maharaj L, Akoniyon OP, Kwoji I, Roux AT, Adewumi TS, et al. Malaria diagnostic methods with the elimination goal in view. Parasitol Res. 2022;121:1867-85.

209. Wongsrichanalai C, Barcus MJ, Muth S, Sutamihardja A, Wernsdorfer WH. A review of malaria diagnostic tools: Microscopy and rapid diagnostic test (RDT). American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Am J Trop Med Hyg. 2007;77:119-27.

210. Hawkes M, Kain KC. Advances in malaria diagnosis. Expert Rev Anti Infect Ther. 2014;5:485–95.

211. Vafa Homann M, Emami SN, Yman V, Stenström C, Sondén K, Ramström H, et al. Detection of Malaria Parasites After Treatment in Travelers: A 12-months Longitudinal Study and Statistical Modelling Analysis. EBioMedicine. 2017;25:66-72.

212. Reller ME, Chen WH, Dalton J, Lichay MA, Dumler JS. Multiplex 5′ nuclease quantitative real-time PCR for clinical diagnosis of malaria and species-level identification and epidemiologic evaluation of malaria-causing parasites, including *Plasmodium knowlesi*. J Clin Microbiol. 2013;51:2931-8.

213. Berzosa P, De Lucio A, Romay-Barja M, Herrador Z, González V, García L, et al. Comparison of three diagnostic methods (microscopy, RDT, and PCR) for the detection of malaria parasites in representative samples from Equatorial Guinea. Malar J. 2018;17:333.

214. Doctor SM, Liu Y, Whitesell A, Thwai KL, Taylor SM, Janko M, et al. Malaria surveillance in the Democratic Republic of the Congo: comparison of microscopy, PCR, and rapid diagnostic test. Diagn Microbiol Infect Dis. 2016;85:16-8.

215. Kamau E, Alemayehu S, Feghali KC, Saunders D, Ockenhouse CF. Multiplex qPCR for Detection and Absolute Quantification of Malaria. PLoS One. 2013;8:e71539.

216. Kamaliddin C, Joste V, Hubert V, Kendjo E, Argy N, Houze S. Evaluation of PCR to monitor *Plasmodium falciparum* treatment efficacy in a nonendemicity setting. J Clin Microbiol. 2019;58:e01080-19.

217. Mutabazi T, Arinaitwe E, Ndyabakira A, Sendaula E, Kakeeto A, Okimat P, et al. Assessment of the accuracy of malaria microscopy in private health facilities in Entebbe Municipality, Uganda: a cross-sectional study. Malar J. 2021;20:250.

218. Mischlinger J, Pitzinger P, Veletzky L, Groger M, Zoleko-Manego R, Adegnika AA, et al. Use of capillary blood samples leads to higher parasitemia estimates and higher diagnostic sensitivity of microscopic and molecular diagnostics of malaria than venous blood samples. J Infect Dis. 2018;218:1296-305.

219. Nsobya SL, Walakira A, Namirembe E, Kiggundu M, Nankabirwa JI, Ruhamyankaka E, et al. Deletions of *pfhrp2* and *pfhrp3* genes were uncommon in rapid diagnostic test-negative *Plasmodium falciparum* isolates from Uganda. Malar J. 2021;20:4.

220. Holzschuh A, Gruenberg M, Hofmann NE, Wampfler R, Kiniboro B, Robinson LJ, et al. Co-infection of the four major *Plasmodium* species: Effects on densities and gametocyte carriage. PLoS Negl Trop Dis. 2022;16:e0010760.

221. Kotepui M, Kotepui KU, De Jesus Milanez G, Masangkay FR. *Plasmodium* spp. mixed infection leading to severe malaria: a systematic review and meta-analysis. Sci Rep. 2020;10:11068.

222. Kyabayinze DJ, Tibenderana JK, Odong GW, Rwakimari JB, Counihan H. Operational accuracy and comparative persistent antigenicity of HRP2 rapid diagnostic tests for *Plasmodium falciparum* malaria in a hyperendemic region of Uganda. Malar J. 2008;7:221.

223. van Bergen K, Stuitje T, Akkers R, Vermeer E, Castel R, Mank T. Evaluation of a novel real-time PCR assay for the detection, identification and quantification of *Plasmodium* species causing malaria in humans. Malar J. 2021;20:314.

224. Saha S, Narang R, Deshmukh P, Pote K, Anvikar A, Narang P. Diagnostic efficacy of microscopy, rapid diagnostic test and polymerase chain reaction for malaria using Bayesian latent class analysis. Indian J Med Microbiol. 2017;35:376-80.

225. Badiane A, Thwing J, Williamson J, Rogier E, Diallo MA, Ndiaye D. Sensitivity and specificity for malaria classification of febrile persons by rapid diagnostic test, microscopy, parasite DNA, histidine-rich protein 2, and IgG: Dakar, Senegal 2015. Int J Infect Dis. 2022;121:92-7.

226. Schachterle SE, Mtove G, Levens JP, Clemens EG, Shi L, Raj A, et al. Prevalence and density-related concordance of three diagnostic tests for malaria in a region of Tanzania with hypoendemic malaria. J Clin Microbiol. 2011;49:3885-91.

227. Fançony C, Sebastião YV, Pires JE, Gamboa D, Nery SV. Performance of microscopy and RDTs in the context of a malaria prevalence survey in Angola: A comparison using PCR as the gold standard. Malar J. 2013;12:284.

228. Fançony C, Gamboa D, Sebastião Y, Hallett R, Sutherland C, Sousa-Figueiredo JC, et al. Various *pfcrt* and *pfmdr1* genotypes of *Plasmodium falciparum* cocirculate with *P. malariae*, *P. ovale* spp., and *P. vivax* in Northern Angola. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56:5271-7.

229. Berbudi A, Khairani S, Kwarteng A, Otuonye NM. Hemozoin as a Diagnostic Biomarker: A Scoping Review of Next-Generation Malaria Detection Technologies. Biosensors (Basel). 2026;16:48.

230. Proux S, Suwanarusk R, Barends M, Zwang J, Price RN, Leimanis M, et al. Considerations on the use of nucleic acid-based amplification for malaria parasite detection. Malar J. 2011;10:323.

231. Canier L, Khim N, Kim S, Eam R, Khean C, Loch K, et al. Malaria PCR detection in Cambodian low-transmission settings: Dried blood spots versus venous blood samples. Am J Trop Med Hyg. 2015;92:573-7.

232. Färnert A, Arez AP, Correia AT, Björkman A, Snounou G, do Rosário V. Sampling and storage of blood and the detection of malaria parasites by polymerase chain reaction. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1999;93:50-3.

233. Schwartz A, Baidjoe A, Rosenthal PJ, Dorsey G, Bousema T, Greenhouse B. The effect of storage and extraction methods on amplification of *Plasmodium falciparum* DNA from dried blood spots. Am J Trop Med Hyg. 2015;92:922-5.

234. Ataei S, Nateghpour M, Hajjaran H, Edrissian GH, Foroushani AR. High specificity of semi-nested multiplex PCR using dried blood spots on DNA Banking Card in comparison with frozen liquid blood for detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. J Clin Lab Anal. 2011;25:185-90.

235. Mahittikorn A, Masangkay FR, Kotepui KU, De Jesus Milanez G, Kotepui M. Comparative performance of PCR using DNA extracted from dried blood spots and whole blood samples for malaria diagnosis: a meta-analysis. Sci Rep. 2021;11:4845.

236. Zainabadi K, Adams M, Han ZY, Lwin HW, Han KT, Ouattara A, et al. A novel method for extracting nucleic acids from dried blood spots for ultrasensitive detection of low-density *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections. Malar J. 2017;16:377.

237. Moody A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. Clin Microbiol Rev. 2002;15:66-78.

238. Panda BB, Meher AS, Hazra RK. Comparison between different methods of DNA isolation from dried blood spots for determination of malaria to determine specificity and cost effectiveness. J Parasit Dis. 2019;43:337-42.

239. Quan H, Igbasi U, Oyibo W, Omilabu S, Chen SB, Shen HM, et al. High multiple mutations of *Plasmodium falciparum*-resistant genotypes to sulphadoxine-pyrimethamine in Lagos, Nigeria. Infect Dis Poverty. 2020;9:91.

240. Ruybal-Pesántez S, McCann K, Vibin J, Siegel S, Auburn S, Barry AE. Molecular markers for malaria genetic epidemiology: progress and pitfalls. Trends Parasitol. 2024;40:147-63.

241. Nundu SS, Arima H, Simpson S V., Chitama BYA, Munyeku YB, Muyembe JJ, et al. Low prevalence of *Plasmodium falciparum* parasites lacking *pfhrp2*/*3* genes among asymptomatic and symptomatic school-age children in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. Malar J. 2022;21:126.

242. Berhane A, Anderson K, Mihreteab S, Gresty K, Rogier E, Mohamed S, et al. Major threat to malaria control programs by *Plasmodium falciparum* lacking histidine-rich protein 2, Eritrea. Emerg Infect Dis. 2018;24:462-70.

243. Krueger T, Ikegbunam M, Lissom A, Sandri TL, Ntabi JDM, Djontu JC, et al. Low Prevalence of *Plasmodium falciparum* Histidine-Rich Protein 2 and 3 Gene Deletions—A Multiregional Study in Central and West Africa. Pathogens. 2023;12:455.

244. Munyeku YB, Musaka AA, Ernest M, Smith C, Mansiangi PM, Culleton R. Prevalence of *Plasmodium falciparum* isolates lacking the histidine rich protein 2 gene among symptomatic malaria patients in Kwilu Province of the Democratic Republic of Congo. Infect Dis Poverty. 2021;10:77.

245. Fontecha G, Pinto A, Escobar D, Matamoros G, Ortiz B. Genetic variability of *Plasmodium falciparum* histidine-rich proteins 2 and 3 in Central America. Malar J. 2019;18:31.

246. Addai-Mensah O, Dinko B, Noagbe M, Ameke SL, Annani-Akollor ME, Owiredu EW, et al. *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 diversity in Ghana. Malar J. 2020;19:256.

247. Alemayehu GS, Messele A, Blackburn K, Lopez K, Lo E, Janies D, et al. Genetic variation of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 and 3 in Assosa zone, Ethiopia: its impact on the performance of malaria rapid diagnostic tests. Malar J. 2021;20:394.

248. Kumar N, Singh JP, Pande V, Mishra N, Srivastava B, Kapoor R, et al. Genetic variation in histidine rich proteins among Indian *Plasmodium falciparum* population:

Possible cause of variable sensitivity of malaria rapid diagnostic tests. Malar J. 2012;11:298.

249. Kumar Bharti P, Singh Chandel H, Krishna S, Nema S, Ahmad A, Udhayakumar V, et al. Sequence variation in *Plasmodium falciparum* Histidine Rich Proteins 2 and 3 in Indian isolates: Implications for Malaria Rapid Diagnostic Test Performance. Sci Rep. 2017;7:1308.

250. Nderu D, Kimani F, Thiong'o K, Akinyi M, Karanja E, Meyer CG, et al. *Pf*HRP2-*Pf*HRP3 diversity among Kenyan isolates and comparative evaluation of *Pf*HRP2/pLDH malaria RDT with microscopy and nested PCR methodologies. Parasitol Int. 2018;67:793-9.

251. Mussa A, Talib M, Mohamed Z, Hajissa K. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 (*Pf*HRP2) and its effect on the performance of *Pf*HRP2-based rapid diagnostic tests. BMC Res Notes. 2019;12:334.

252. Willie N, Mehlotra RK, Howes RE, Rakotomanga TA, Ramboarina S, Ratsimbasoa AC, et al. Insights into the performance of sD Bioline malaria ag *P.f*/Pan rapid diagnostic test and *Plasmodium falciparum* histidine-Rich protein 2 gene variation in Madagascar. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Am J Trop Med Hyg. 2018;98:1683-91

253. Nderu D, Kimani F, Thiong'o K, Karanja E, Akinyi M, Too E, et al. *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein (*Pf*HRP2 and 3) diversity in Western and Coastal Kenya. Sci Rep. 2019;9:1709.

254. Gatton ML, Rees-Channer RR, Glenn J, Barnwell JW, Cheng Q, Chiodini PL, et al. Pan-*Plasmodium* band sensitivity for *Plasmodium falciparum* detection in combination malaria rapid diagnostic tests and implications for clinical management. Malar J. 2015;14:115.

255. Intharabut B, Kingston HW, Srinamon K, Ashley EA, Imwong M, Dhorda M, et al. Artemisinin Resistance and Stage Dependency of Parasite Clearance in *Falciparum* Malaria. J Infect Dis. 2019;219:1483-9.

256. Ménard D, Khim N, Beghain J, Adegnika AA, Shafiul-Alam M, Amodu O, et al. A Worldwide Map of *Plasmodium falciparum K13*-Propeller Polymorphisms. N Engl J Med. 2016;374:2453-64.

257. Plucinski MM, Dimbu PR, Macaia AP, Ferreira CM, Samutondo C, Quivinja J, et al. Efficacy of artemether-lumefantrine, artesunate-amodiaquine, and dihydroartemisinin-piperaquine for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Angola, 2015. Malar J. 2017;16:62.

258. Dakorah MP, Aninagyei E, Attoh J, Adzakpah G, Tukwarlba I, Acheampong DO. Profiling antimalarial drug-resistant haplotypes in *Pfcrt*, *Pfmdr1*, *Pfdhps* and *Pfdhfr* genes in *Plasmodium falciparum* causing malaria in the Central Region of Ghana: a multicentre cross-sectional study. Ther Adv Infect Dis. 2025;12:20499361251319665.

259. Humphreys GS, Merinopoulos I, Ahmed J, Whitty CJM, Mutabingwa TK, Sutherland CJ, et al. Amodiaquine and artemether-lumefantrine select distinct alleles of the *Plasmodium falciparum mdr1* gene in Tanzanian children treated for uncomplicated malaria. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51:991-7.

260. Djontu JC, Baina MT, Mbama Ntabi JD, Lissom A, Umuhoza DM, Assioro Doulamo NV, et al. Profile of molecular markers of Sulfadoxine-Pyrimethamine-resistant *Plasmodium falciparum* in individuals living in southern area of Brazzaville, Republic of Congo. Int J Parasitol Drugs Drug Resist. 2024;26:100569.

261. Kavishe RA, Kaaya RD, Nag S, Krogsgaard C, Notland JG, Kavishe AA, et al. Molecular monitoring of *Plasmodium falciparum* super-resistance to sulfadoxine-pyrimethamine in Tanzania. Malar J. 2016;15:335.

262. Gama BE, Pereira-Carvalho GAL, Lutucuta Kosi FJI, Almeida De Oliveira NK, Fortes F, Rosenthal PJ, et al. Molecular markers of antifolate resistance in *Plasmodium falciparum* isolates from Luanda, Angola. Malar J. 2011;10:248.

263. Fortes F, Dimbu R, Figueiredo P, Neto Z, do Rosário VE, Lopes D. Evaluation of prevalence's of *pfdhfr* and *pfdhps* mutations in Angola. Malar J. 2011;10:22.

264. Chico RM, Cano J, Ariti C, Collier TJ, Chandramohan D, Roper C, et al. Influence of malaria transmission intensity and the 581G mutation on the efficacy of intermittent preventive treatment in pregnancy: systematic review and meta-analysis. Trop Med Int Health . 2015;20:1621–33.

265. World Health Organization. WHO Policy recommendation on Intermittent Preventive Treatment during infancy with sulphadoxine-pyrimethamine (SP-IPTi) for *Plasmodium falciparum* malaria control in Africa. Geneva: WHO; 2010.

https://iris.who.int/server/api/core/bitstreams/d5cd88b9-03c7-42e4-90dc-f80e2d7139c5/content. Accessed 18 Jun 2026.

266. World Health Organization. Master protocol for surveillance of *pfhrp2*/*3* deletions and biobanking to support future research, second edition. Geneva: WHO; 2024. https://www.who.int/publications/i/item/9789240099951. Accessed 17 Jul 2026.

267. Lee N, Gatton ML, Pelecanos A, Bubb M, Gonzalez I, Bell D, et al. Identification of optimal epitopes for *Plasmodium falciparum* rapid diagnostic tests that target histidine-rich proteins 2 and 3. J Clin Microbiol. 2012;50:1397-405.

10. Anexos

Anexo I. Material suplementario

Tablas suplementarias

Tabla S1. Repeticiones de aminoácidos y epítopos de unión a los MAb de *Pf*HRP2 y *Pf*HRP3 [153,267].

Repeticiones aminoacídicas		**Epítopos de unión a los MAb**	
Tipo repetición	Secuencia	MAb	Secuencia
1	AHHAHHVAD	3A4	AHHAHHA
2	AHHAHHAAD	2G12-1C12	DAHHAADAHH
3	AHHAHHAAY	1E1-A9	AHHAHHV
4	AHH	A6-4	HATDAHH
5	AHHAHHASD	C1-13	AHHAADAHH
6	AHHATD	N7	DAHHAADAHHA
7	AHHAAD	PTL-3	YAHHAHHA
8	AHHAAY	S2-5	AHHASDAHHA
9	AAY	TC-10	TDAHHAADAHHAADA
10	AHHAAAHHATD	C2-3	HAHHAHHAADAHH
11	AHN	Genway	AHHAHHAAY
12	AHHAAAHHEAATH		
13	AHHASD		
14	AHHAHHATD		
15	AHHAHHAAN		
16	AHHAAN		
17	AHHDG		
18	AHHDD		
19	AHHAA		
20	SHHDD		
21	AHHAHHATY		
22	AHHAHHAGD		
23	ARHAAD		
24	AHHTHHAAD		

MAb: anticuerpo monoclonal; *Pf*HRP2/3: proteínas ricas en histidina 2 y 3 de *P. falciparum*.

Material suplementario: artículos de la tesis

En este apartado no se incluyen la totalidad de los archivos adicionales de los artículos 3 y 4 incluidos en esta tesis doctoral, ya que dichos documentos corresponden a protocolos de PCR, códigos Python y secuencias asociadas a infecciones policlonales que se encuentran disponibles en línea en plataformas de acceso abierto, por lo que su reproducción íntegra no se considera necesaria en este anexo.

Material suplementario artículo 3

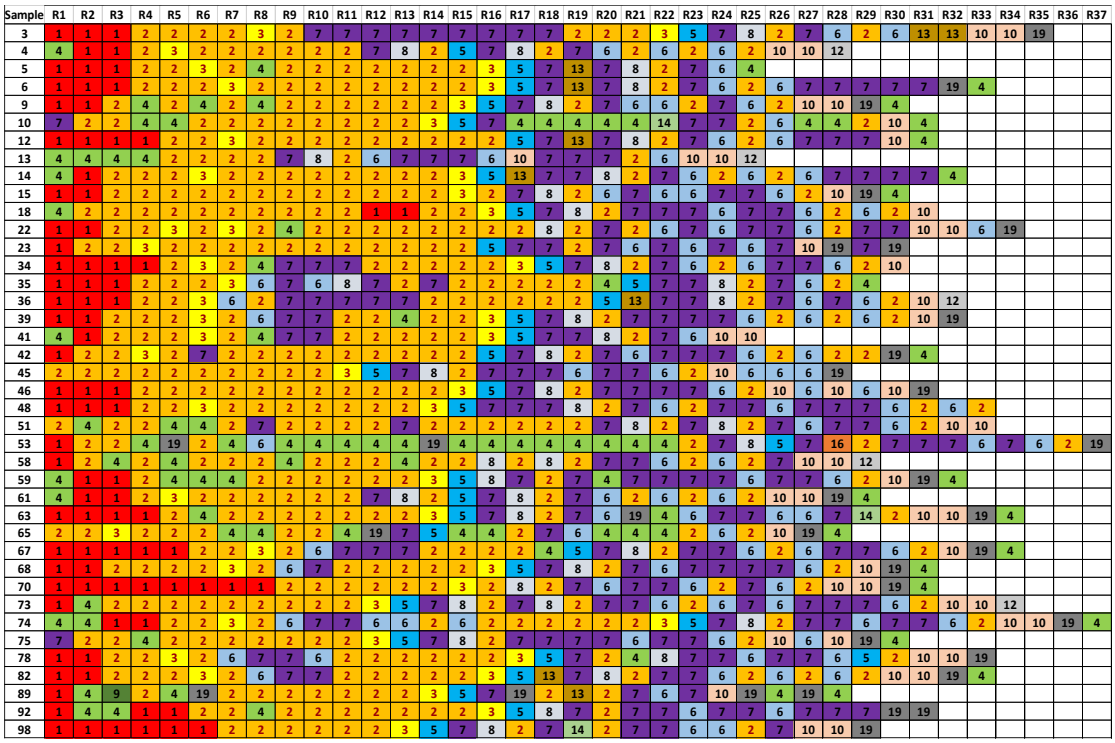
A continuación, se adjunta el archivo adicional 4 del artículo titulado "Analysis of *pfhrp2* and *pfhrp3* gene deletions, and the structure and variability of *Pf*HRP2 and *Pf*HRP3 proteins: implications for the performance of malaria rapid diagnostic tests in Cubal, Angola" en el que se detalla la estructura y organización y patrones de repeticiones aminoacídicas de las proteínas *Pf*HRP2 y *Pf*HRP3 analizadas en el estudio.

Additional file 4

***Pf*HRP2 and *Pf*HRP3 structure, organization and repeat patterns**

*Pf*HRP2

Most of the sequences started with the Type 1 repeat (27/40, 67.5%), otherwise the repeats appearing at the beginning of the sequence were Type 4 (8/40, 20%), Type 2 (3/40, 7.5%) or Type 7 (2/40, 5%). Type 19 and 12 repeats were never found in the same sequence, and were almost always located in the last position (10/40, 25%; and 5/40; 12.5%, respectively). Other Types of repeats were also observed in last position: Type 4 (20/40; 50%), Type 10 (4/40, 10%), and Type 2 (1/40, 2.5%). Common patterns were observed in some Types of repeats: Type 1 appeared in tandem near the N-terminal end, Type 2 was distributed throughout the sequence in tandem at the beginning and with greater separation at the end, Types 3, 5, 8 were usually found uniquely in the central part, Type 6 and 7 were distributed throughout the end half separated from each other by more than 10 amino acids, Types 10, 12, and 19 appeared individually near the C-terminal end, and Types 13 and 14 were located in the end half uniquely.



Sample	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12	R13	R14	R15	R16	R17	R18	R19	R20	R21	R22	R23	R24	R25	R26	R27	R28	R29	R30	R31	R32	R33	R34	R35	R36	R37
3	1	1	1	2	2	2	2	3	2	7	7	7	7	7	7	7	7	7	2	2	2	3	5	7	8	2	7	6	2	6	13	13	10	10	19		
4	4	1	1	2	3	2	2	2	2	2	2	7	8	2	5	7	8	2	7	6	2	6	2	6	2	10	10	12									
5	1	1	1	2	2	3	2	4	2	2	2	2	2	2	2	3	5	7	13	7	8	2	7	6	4												
6	1	1	1	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	3	5	7	13	7	8	2	7	6	2	6	7	7	7	7	7	19	4				
9	1	1	2	4	2	4	2	4	2	2	2	2	2	2	3	5	7	8	2	7	6	6	2	7	6	2	10	10	19	4							
10	7	2	2	4	4	2	2	2	2	2	2	2	2	3	5	7	4	4	4	4	4	14	7	7	2	6	4	4	2	10	4						
12	1	1	1	1	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	5	7	13	7	8	2	7	6	2	6	7	7	7	10	4						
13	4	4	4	4	2	2	2	2	7	8	2	6	7	7	7	6	10	7	7	7	2	6	10	10	12												
14	4	1	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	3	5	13	7	7	8	2	7	6	2	6	2	6	7	7	7	7	4					
15	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	7	8	2	6	7	6	6	7	7	6	2	10	19	4							
18	4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	3	5	7	8	2	7	7	7	6	7	7	6	2	6	2	10							
22	1	1	2	2	3	2	3	2	4	2	2	2	2	2	2	2	2	8	2	7	2	6	7	6	7	7	6	2	7	7	10	10	6	19			
23	1	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	5	7	7	2	7	6	7	6	7	6	7	6	10	19	7	19							
34	1	1	1	1	2	3	2	4	7	7	7	2	2	2	2	2	3	5	7	8	2	7	6	2	6	7	7	6	2	10							
35	1	1	1	2	2	2	3	6	7	6	8	7	2	7	2	2	2	2	2	4	5	7	7	8	2	7	6	2	4								
36	1	1	1	2	2	3	6	2	7	7	7	7	7	2	2	2	2	2	2	5	13	7	7	8	2	7	6	7	6	2	10	12					
39	1	1	2	2	2	3	2	6	7	7	2	2	4	2	2	3	5	7	8	2	7	7	7	7	6	2	6	2	6	2	10	19					
41	4	1	2	2	2	3	2	4	7	7	2	2	2	2	2	3	5	7	7	8	2	7	6	10	10												
42	1	2	2	3	2	7	2	2	2	2	2	2	2	2	2	5	7	8	2	7	6	7	7	7	6	2	6	2	2	19	4						
45	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	5	7	8	2	7	7	7	6	7	7	6	2	10	6	6	6	19									
46	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	5	7	8	2	7	7	7	7	6	2	10	6	10	6	10	19						
48	1	1	1	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	3	5	7	7	7	8	2	7	6	2	7	7	6	7	7	7	6	2	6	2				
51	2	4	2	2	4	4	2	7	2	2	2	2	7	2	2	2	2	2	2	7	8	2	7	8	2	7	6	7	7	6	2	10	10				
53	1	2	2	4	19	2	4	6	4	4	4	4	4	19	4	4	4	4	4	4	4	4	2	7	8	5	7	16	2	7	7	7	6	7	6	2	19
58	1	2	4	2	4	2	2	2	4	2	2	2	4	2	2	8	2	8	2	7	7	6	2	6	2	7	10	10	12								
59	4	1	1	2	4	4	4	2	2	2	2	2	2	3	5	8	7	2	7	4	7	7	7	7	6	7	7	6	2	10	19	4					
61	4	1	1	2	3	2	2	2	2	2	2	7	8	2	5	7	8	2	7	6	2	6	2	6	2	10	10	19	4								
63	1	1	1	1	2	4	2	2	2	2	2	2	2	3	5	7	8	2	7	6	19	4	6	7	7	6	6	7	14	2	10	10	19	4			
65	2	2	3	2	2	2	4	4	2	2	4	19	7	5	4	4	2	7	6	4	4	4	2	6	2	10	19	4									
67	1	1	1	1	1	2	2	3	2	6	7	7	7	2	2	2	2	4	5	7	8	2	7	7	6	2	6	7	7	6	2	10	19	4			
68	1	1	2	2	2	2	3	2	6	7	2	2	2	2	2	3	5	7	8	2	7	6	7	7	7	7	6	2	10	19	4						
70	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	3	2	8	2	7	6	7	7	6	2	7	6	2	10	10	19	4						
73	1	4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	5	7	8	2	7	8	2	7	7	6	2	6	7	6	7	7	7	6	2	10	10	12			
74	4	4	1	1	2	2	3	2	6	7	7	6	6	2	6	2	2	2	2	2	2	3	5	7	8	2	7	7	6	7	7	6	2	10	10	19	4
75	7	2	2	4	2	2	2	2	2	2	3	5	7	8	2	7	7	7	7	6	7	7	6	2	10	6	10	19	4								
78	1	1	2	2	3	2	6	7	7	6	2	2	2	2	2	2	3	5	7	2	4	8	7	7	6	7	7	6	5	2	10	10	19				
82	1	1	2	2	2	3	2	6	7	7	2	2	2	2	2	3	5	13	7	8	2	7	7	6	2	6	2	6	2	10	10	19	4				
89	1	4	9	2	4	19	2	2	2	2	2	2	2	3	5	7	19	2	13	2	7	6	7	10	19	4	19	4									
92	1	4	4	1	1	2	2	4	2	2	2	2	2	2	2	3	5	8	7	2	7	7	6	7	7	6	7	7	7	19	19						
98	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	3	5	7	8	2	7	14	2	7	7	6	6	2	7	10	10	19								

Fig. S1. Distribution of the amino acid repeats of *Pf*HRP2. Each row corresponds to a different isolate. The columns indicate the positions of each type of repeat in the amino acid sequence. Each type of amino acid repeat is marked with a different color.

*Pf*HRP3

Whenever the Type 1 repeat was present it appeared in the first position, otherwise the sequences started with the Type 4, 16 or 15 repeat (7/41, 17.07%; 4/41, 9.76%; and 1/41, 2.44% of the cases, respectively). A total of 39/41 (95.12%) sequences had the Type 4 repeat last and only 2/41 (4.88%) sequences ended with the Type 17 repeat. Different patterns were observed in the distribution of certain Types of repeats: Type 15 was always found close to the N-terminal end after the Type 1 or 4 repeat, Type 16 appeared in tandem usually after the Type 15 repeat up to the central region, Type 7 was always found after the last Type 16 repeat and preceded the Type 20 repeat, Types 17 and 18 were interspersed in tandem after the Type 20 repeat up to the final half of the sequences and as the repeats were closer to the C-terminal end only Type 17 appeared.

Sample	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12	R13	R14	R15	R16	R17	R18	R19	R20	R21	R22	R23	R24	R25	R26	R27	R28	R29	R30	R31
3	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	7	20	18	17	18	17	4													
4	1	15	16	16	16	16	16	16	16	16	16	7	20	17	18	17	18	17	17	17	17	17	4								
6	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	7	20	17	18	17	18	17	4										
12	1	1	1	15	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	7	20	17	18	17	18	17	17	17	17	4						
13	1	15	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	7	20	17	18	17	18	17	17	17	17	4				
14	1	15	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	7	20	17	18	17	18	17	17	17	17	4				
15	4	19	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	7	20	18	17	18	17	17	17	4	17	4							
18	1	15	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	7	20	17	18	17	18	17	18	17	17	17	17	17	4				
19	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	7	20	17	18	17	18	17	18	17	17	17	17	4							
22	1	1	1	15	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	7	20	17	18	17	18	17	17	17	4				
24	1	15	16	16	16	16	16	16	16	16	7	20	17	18	17	18	4	4	4	4											
25	16	16	16	16	16	16	16	16	16	7	20	17	18	17	18	17	18	17	17	17	4										
26	1	4	4	4	19	16	4	16	19	19	16	16	16	7	20	17	18	17	18	4											
27	4	15	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	7	20	17	18	17	18	4	17	4									
30	1	15	16	16	16	16	16	16	16	16	16	7	20	17	18	17	4	17	17	4											
32	1	15	16	16	16	16	16	16	16	16	16	7	20	17	18	17	17	17	17	17	4										
37	1	15	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	7	20	17	18	17	18	17	17	17	17	4					
39	1	15	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	7	20	17	18	17	18	17	17	17	17	4						
40	1	15	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	7	20	17	18	17	18	17	17	17	17	17	4							
42	4	11	4	15	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	7	20	17	18	17	18	17	17	17	17	17	17	4				
45	1	15	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	7	20	17	18	17	18	17	17	17	17	17	17	17	4					
48	1	15	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	7	20	17	18	17	18	17	17	17	17	17	4					
50	1	15	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	7	20	17	18	17	18	17	18	17	17	17	17	17	4				
51	1	15	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	7	20	17	18	17	18	17	17	17	17	4			
57	1	15	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	7	20	17	18	17	17	17	17	4										
61	1	15	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	7	20	17	18	18	17	17	17	17	4									
62	1	1	15	16	16	16	16	16	16	16	4	16	16	7	20	17	18	17	17	17	4										
63	1	1	15	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	7	20	17	18	17	18	17	17	17	17	4							
65	4	15	16	16	16	16	16	16	16	16	16	7	20	17	18	17	18	17	17												
67	1	15	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	7	20	17	18	17	18	17	17	17	4								
70	1	15	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	7	20	17	4	17	18	17	17	17	17	4							
73	1	15	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	7	20	17	18	17	18	17	17	17	17	4						
74	1	15	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	7	20	17	18	17	18	17	17	17	17	4					
82	1	15	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	7	20	18	17	18	17	17	17	17	4								
83	1	15	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	7	20	17	18	17	18	17	17	17	4								
85	4	15	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	7	20	17	18	17	18	17	17	17	4						
88	4	15	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	7	20	17	18	17	17	17	17	17	17	17	17	17	4
90	15	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	7	20	17	18	17	18	17	17	17	17	17	17	4		
92	4	4	15	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	7	20	17	18	17	18	17	17	17									
98	1	15	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	7	20	17	18	17	18	17	17	17	4					
100	1	15	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	7	20	17	18	17	18	17	17	17	17	4								

Fig. S2 Distribution of the amino acid repeats of *Pf*HRP3. Each row corresponds to a different isolate. The columns indicate the positions of each type of repeat in the amino acid sequence. Each type of amino acid repeat is marked with a different color.

Material suplementario artículo 4: análisis de las infecciones policlonales

A continuación, se presenta un ejemplo del análisis del electroferograma obtenido mediante secuenciación Sanger y visualizado con el software BioEdit v7.7.1. En él se observan picos dobles en la misma posición tanto en la secuencia *forward* como en la *reverse*, correspondientes a nucleótidos adenina y timina, lo que indica la presencia de una infección policlonal por *P. falciparum*, con coexistencia de alelos en estado salvaje y alelos portadores de la mutación. Este mismo criterio de interpretación se aplicó de forma consistente a todos los genes analizados para la identificación de infecciones policlonales.

Forward *Reverse*

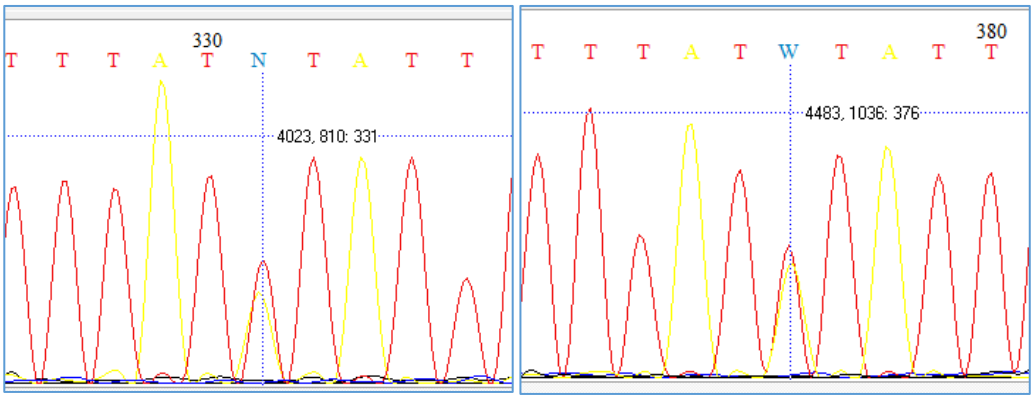


Figura S3. Identificación de una infección policlonal de *P. falciparum* indicadas como N y W en las hebras *forward* y *reverse*, respectivamente.

Anexo II. Artículos adicionales publicados durante la tesis

Artículos relacionados con malaria

Los artículos que se muestran a continuación abordan tanto el diagnóstico de la malaria desde diferentes propuestas tecnológicas como estudios de prevalencia en población migrante. En primer lugar, se validó la técnica molecular LAMP en el HNSP de Angola, mostrando una alta sensibilidad (98,5%) en terreno y reproducibilidad en laboratorios de referencia. En segundo lugar, se analizó la presencia de la infección malárica en migrantes asintomáticos en la Unidad de Salud Internacional y Medicina Tropical Vall d'Hebron-Drassanes de Barcelona, España, mediante PCR en tiempo real, detectando una prevalencia subclínica del 5%, y destacando la utilidad de las técnicas moleculares para identificar infecciones por *P. falciparum* y *P. malariae* que pasan desapercibidas en exámenes rutinarios. En tercer lugar, se evaluó el sistema iMAGING, una herramienta basada en inteligencia artificial y microscopía robotizada, que demostró una sensibilidad del 81,25% y una especificidad del 92,11% en la identificación automatizada de parásitos. Finalmente, se analizó la epidemiología de *P. malariae* en la Unidad de Salud Internacional Vall d'Hebron-Drassanes de Barcelona, evidenciando una elevada proporción de infecciones crónicas asintomáticas de baja parasitemia, principalmente en migrantes procedentes de África subsahariana.

- Pérez-Ugarte A, Sulleiro E, Rovira-Plujà J, Bayram M, Zarzuela F, Maturana CR, Serre-Delcor N, Aznar ML, Pou D, Goterris L, Salvador F, **Mediavilla A**, Bosch P, Martinez-Campreciós J, Treviño B, Martínez-Vallejo P, Silgado A, Molina I, Oliveira-Souto I. Ten years of *Plasmodium malariae* infections in an International Health Reference Center in Barcelona: temporal trends and insights. Malar J. 2026 Jun 3. doi: 10.1186/s12936-026-05964-3.

- Rubio Maturana C, de Oliveira AD, Zarzuela F, **Mediavilla A**, Martínez-Vallejo P, Silgado A, Goterris L, Muixí M, Abelló A, Veiga A, López-Codina D, Sulleiro E, Sayrol E, Joseph-Munné J. Evaluation of an artificial intelligence-based tool and a universal low-cost robotized microscope for the automated diagnosis of malaria. Int J Environ Res Public Health. 2024 Dec 31;22(1):47. doi:10.3390/ijerph22010047.

- Pérez-Ugarte A, Oliveira-Souto I, Nadal-Baron P, Zarzuela F, Serre-Delcor N, Treviño B, Aznar ML, Pou D, **Mediavilla A**, Rubio-Maturana C, Belsol-Alfonso M, Ruiz

E, Goterris L, Sulleiro E. High malaria PCR positivity in asymptomatic migrants from sub-Saharan Africa. J Travel Med. 2024 Aug 3;31(6):taae087. doi:10.1093/jtm/taae087.

- Febrer-Sendra B, Crego-Vicente B, Nindia A, Martínez-Campreciós J, Aixut S, **Mediavilla A**, Silgado A, Oliveira-Souto I, Salvador F, Molina I, Muro A, Sulleiro E, Fernández-Soto P. First field and laboratory evaluation of LAMP assay for malaria diagnosis in Cubal, Angola. Parasit Vectors. 2023 Oct 3;16(1):343. doi:10.1186/s13071-023-05942-7.

Artículos adicionales de enfermedades tropicales y parasitología

Artículos de primer autor

El siguiente estudio evalúo la utilidad de la PCR en tiempo real como técnica diagnóstica para la esquistosomiasis urogenital en niños de edad preescolar en Cubal. Los hallazgos más representativos destacan la mayor sensibilidad de la PCR frente a la microscopía (99,45% frente a 54,55%, respectivamente), lo que permite identificar una prevalencia real de la enfermedad y puede facilitar un diagnóstico temprano con el fin de reducir la morbilidad asociada a la infección crónica.

- **Mediavilla A**, Silgado A, Sánchez-Marqués R, Bocanegra C, Nindia A, Salvador F, Pintar Z, Martínez-Vallejo P, Rubio Maturana C, Goterris L, Martínez-Campreciós J, Aixut S, Oliveira-Souto I, Aznar-Ruiz-de-Alegría ML, Espiau M, Molina I, Sulleiro E. Usefulness of real-time PCR for urogenital schistosomiasis diagnosis in preschool children in a high-prevalence area in Angola. PLoS Negl Trop Dis. 2024 Aug 14;18(8):e0012384. doi:10.1371/journal.pntd.0012384.

Artículos como colaborador

Los siguientes artículos científicos, se corresponden a investigaciones orientadas a optimizar el diagnóstico de parasitosis y enfermedades tropicales desatendidas en diferentes contextos. Los trabajos incluyen: la evaluación en terreno (Cubal) del ensayo molecular Strong-LAMP para la detección de *Strongyloides stercolaris* en áreas endémicas, así como el análisis de rendimiento de la PCR en tiempo real y técnicas serológicas para el cribado de la esquistosomiasis urogenital e intestinal importada en entornos no endémicos. Asimismo, se ha explorado el uso de la inteligencia artificial y microscopía robotizada para automatizar la detección de huevos de *S. haematobium* en muestras de orina, así como la comparación de métodos de concentración como Midi Parasep® SF y la técnica de Ritchie para mejorar la visualización de helmintos y protozoos

en muestras de heces. Además, se evaluó el rendimiento de un nuevo inmunoensayo de quimioluminiscencia basado en antígenos excretados-secretados de *Trypanosoma cruzi* (TESA), que mostró una elevada precisión diagnóstica (sensibilidad del 92% y especificidad del 100%) y una mayor capacidad para detectar el descenso de anticuerpos tras el tratamiento. Por último, se validó el sistema Techcyte de microscopía asistida por inteligencia artificial para el diagnóstico de parasitosis intestinales.

- Rubio Maturana C, Sulleiro E, Zarzuela F, Martínez-Vallejo P, **Mediavilla A**, Silgado A, Turró C, Balladares M, Gracia A, Paz C, García-Vega D, José-Villar SMS, Blanco-Grau A, Moreno F, Larrosa N, Goterris L. Performance of the Techcyte AI-based imatge analysis System for coproparasitological diagnosis in clinical stool specimens: a retrospective evaluation study. J Clin Microbiol. 2026 Jun 22:e0043126. doi: 10.1128/jcm.00431-26.

- Silgado A, **Mediavilla A**, Martínez-Vallejo P, Bosch-Nicolau P, Rubio-Maturana C, Goterris L, Oliveira-Souto I, Serre-Delcor N, Joseph-Munné J, Molina I, Sulleiro E. Evaluation of Chagas TESA VirClia assay for chronic *Trypanosoma cruzi* infection diagnosis and post-treatment follow-up. J Clin Microbiol. 2026 Jul 8;64(7):e0173925. doi: 10.1128/jcm.01739-25.

- Rubio Maturana C, Zarzuela Serrat F, Goterris L, Martínez-Vallejo P, **Mediavilla A**, Silgado A, Rovira-Plujà J, Muixí M, Vila-Olmo N, José-Villar SMS, Larrosa N, Sulleiro E. Comparative evaluation of Midi Parasep® Solvent Free and the Ritchie concentration technique for helminth and protozoa visualisation in clinical stool samples. Parasit Vectors. 2026 Mar 3;19(1):148. doi:10.1186/s13071-026-07317-0.

- Martínez-Vallejo P, Silgado A, **Mediavilla A**, Rubio Maturana C, Zarzuela F, Muixí M, Goterris L, Rodríguez E, Vázquez S, Salvador F, Oliveira-Souto I, Molina I, Serre-Delcor N, Sotillo J, Sulleiro E. Comparison of three real-time polymerase chain reaction protocols for the diagnosis of imported schistosomiasis in a non-endemic setting. Parasit Vectors. 2025 Dec 29;19(1):57. doi:10.1186/s13071-025-07203-1.

- Rubio Maturana C, de Oliveira AD, Zarzuela F, Ruiz E, Sulleiro E, **Mediavilla A**, Martínez-Vallejo P, Nadal S, Pumarola T, López-Codina D, Abelló A, Sayrol E, Joseph-Munné J. Correction: Development of an automated artificial intelligence-based system for urogenital schistosomiasis diagnosis using digital image analysis techniques

and a robotized microscope. PLoS Negl Trop Dis. 2025 Oct 28;19(10):e0013643. doi:10.1371/journal.pntd.0013643.

- Martínez-Vallejo P, **Mediavilla A**, Silgado A, Zarzuela F, Goterris L, Maturana CR, Serre-Delcor N, Oliveira-Souto I, Salvador F, Joseph-Munne J, Aznar ML, Pou D, Treviño B, Molina I, Sotillo J, Sulleiro E. Evaluation of molecular and serological testing for imported urogenital schistosomiasis screening in a referral tropical medicine centre in Barcelona, Spain. Parasit Vectors. 2025 May 30;18(1):196. doi:10.1186/s13071-025-06832-w.

- Crego-Vicente B, Febrer-Sendra B, Nindia A, Pessela A, Aixut S, Martínez-Campreciós J, **Mediavilla A**, Silgado A, Sulleiro E, Treviño B, Molina I, Muro A, Salvador F, Fernández-Soto P. First field study using Strong-LAMP for diagnosis of strongyloidiasis in Cubal, Angola. Parasit Vectors. 2023 Oct 31;16(1):393. doi:10.1186/s13071-023-06009-3.

Anexo III. Becas concedidas durante la tesis

Beca de movilidad SOCEPA. Estancia 2024

La concesión de la beca de movilidad de la Sociedad Española de Parasitología (SOCEPA) en 2024 financió una estancia en el HNSP de Cubal con el objetivo de llevar a cabo un estudio de investigación internacional relacionado con el ámbito de la parasitología. El estudio se centró en determinar la prevalencia y optimizar el circuito diagnóstico de la malaria en niños menores de cinco años que padecían malnutrición aguda severa, un grupo altamente vulnerable atendido en la Unidad Especial de Malnutrición del hospital. Además de este proyecto, se realizaron actividades complementarias como campañas de cribado en el municipio, apoyo técnico al laboratorio en el diagnóstico clínico de rutina de otras parasitosis, y la participación como ponente en las XI Jornadas Científicas del HNSP para divulgar los hallazgos sobre la caracterización genética de *P. falciparum* presentados en esta tesis.

A continuación, se adjunta el certificado de concesión de la beca y el justificante de la estancia expedido por la dirección del HNSP como justificante de la actividad realizada.



La Sociedad Española de Parasitología ha seleccionado la Solicitud de D. ALEJANDRO MEDIAVILLA PÉREZ para una BECA DE MOVILIDAD SOCEPA 2024 destinada a realizar una estancia en el Hospital Nossa Senhora da Paz (HNSP) de Cubal, Angola.

El importe financiado será de 1500 €.

Una vez concluida la estancia el becario deberá presentar los documentos que figuran en las bases de la convocatoria:

1. Facturas que justifiquen sus gastos. Si los gastos indicados en las facturas proporcionadas son inferiores al monto adjudicado, el Becario deberá reembolsar la diferencia a la SOCEPA. Si los gastos no se justifican correctamente, la beca debe ser reembolsada a la SOCEPA.

2. Memoria de las actividades realizadas y resultados obtenidos.

3. Video (máximo 5 minutos) comentando los beneficios de la estancia.

4. Reconocimiento de la Beca de Movilidad SOCEPA en cualquier publicación o resumen que incluya los datos obtenidos durante la estancia.

Madrid a 24 de junio de 2024

Fdo: MARÍA DEL CARMEN CUÉLLAR DEL HOYO

Secretaria-Tesorera

SOCEPA

REPÚBLICA DE ANGOLA
MINISTÉRIO DA SAÚDE
HOSPITAL NOSSA SENHORA DA PAZ - CUBAL

Certificado

Eu, ***Maria Rosalina Praia***, com BI (Bilhete de Identidade) Nº 001663424HA035, emitido pelo Arquivo de Identificação de Benguela em Angola, aos 29/05/2020, Médica, com nº de Ordem dos Médicos de Angola 6757, **Directora Geral do Hospital Nossa Senhora da Paz**, sita no Município do Cubal, província de Benguela, com NIF 5000344834, Rua da Missão Católica, s/n, CP 960, na Província de Benguela.

Certifico que:

Alejandro Mediavilla Pérez, de nacionalidade Espanhola, com Passaporte nº PAQ129944 emitido em Espanha.

Passou pelo nosso Hospital como Biólogo, nos períodos de 08 a 24 de Outubro de 2024 tendo passado Laboratório de Estudos, Pesquisas e Análises Clínicas do Hospital Missionário Nossa Senhora da Paz, tendo feito pesquisa de: Diagnóstico de Malária em Crianças com Mal Nutrição Aguda. Trabalhou com excelência, competência e muita habilidade, tendo demonstrado experiência e domínio da matéria.

Participou em todas as actividades formativas promovidas por este Hospital com muito afinco e dedicação.

Por ser verdade e por me ter sido solicitado, passei o presente certificado, que por mim vai assinado e carimbado com o selo em uso nesta Instituição.

CUBAL, ANGOLA, OUTUBRO DE 2024.

A Directora Geral

Dra. Maria Rosalina Praia, Med.
\\Ced. 6757//

Beca de movilidad SEMTSI-PROBITAS. Estancia 2025

La beca de movilidad internacional otorgada por la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEMTSI) y la Fundación PROBITAS permitió realizar una estancia en 2025 orientada al fortalecimiento de las capacidades locales y al desarrollo de investigación aplicada en el HNSP. Durante la estancia, se llevaron a cabo dos estudios específicos: uno destinado a evaluar el rendimiento de las PDR en población asintomática en Cubal y otro centrado en el análisis de la coinfección malaria-VIH en seguimiento y nuevos diagnósticos de VIH en el HNSP. La estancia incluyó también prácticas asistenciales y actividades docentes, mediante el apoyo diario a las unidades hospitalarias involucradas en la investigación (laboratorio y consultas externas de VIH) y la impartición de sesiones formativas al personal local centradas en el diagnóstico de enfermedades tropicales.

Como cierre de este apartado, se aporta el justificante de resolución de la beca y el certificado de la estancia en el HNSP.



RESOLUCIÓN CONVOCATORIA DE 2 BECAS SEMTSI-PROBITAS 2024

EN SALUD INTERNACIONAL

Tras evaluar las solicitudes recibidas, el Comité Evaluador ha estimado conceder las becas tal y como sigue:

Hospital Nossa Senhora da Paz de Cubal (Angola)

Alejandra de Elías

Alejandro Mediavilla

CARACTERÍSTICAS DE LA BECAS

1. Cuantía. Cada beca estará dotada de 2.000 €.
2. Duración. La estancia en el centro receptor comprenderá un período de 2 a 3 meses.

REPÚBLICA DE ANGOLA

GOVERNO PROVINCIAL DE BENGUELA
ADMINISTRAÇÃO MUNICIPAL DO CUBAL
DIREÇÃO MUNICIPAL DA SAÚDE
HOSPITAL NOSSA SENHORA DA PAZ - CUBAL

Certificado

Eu, Nicolau Maliengue Sikaleta, com Bilhete de Identidade Nº 001614764BA031, emitido pelo Arquivo de Identificação de Benguela em Angola, aos 15/05/2017, Médico pediatra e Director Geral do Hospital Nossa Senhora da Paz, sita no Município do Cubal, província de Benguela, com NIF 5000344834, Rua da Missão Católica, s/n, CP 960, na Província de Benguela.

Certifico que:

Alejandro Mediavilla Perez, de nacionalidade Espanhola, com Passaporte nº PAQ129944 emitido na Espanha.

Passou pelo nosso Hospital fazendo actividades clínicas, como Biomédico, entre os dias 25 de Outubro a 16 de Dezembro de 2025, tendo tendo passado no seguinte serviço: **Laboratório.**

Certificamos também que participou em todas as formações de capacitação clínica promovidas pelo Hospital, com assiduidade, respeito, dedicação e muita competência. e também participou como formador dando os seguintes temas na equipa de Laboratório: Manuseo clínico e laboratorial de casos de Malária, Técnicas de diagnósticos para análise de parasitas intestinais, Manejo e diagnóstico de tuberculose, informatização de Laboratório: programa ARIS, formação de pessoal pré contratado para apoio na prestação de serviço e pesquisa do laboratório da referipda Instituição. Pesquisa da população assintomática do Cubal utilizando o Teste de Diagnóstico Rápido de Malária(TDR).

Por ser verdade e por me ter sido solicitado, passei o presente certificado, que por mim vai assinado e carimbado com o selo em uso nesta Instituição.

ANGOLA, CUBAL, AOS 16 DE DEZEMBRO DE 2025.

O Director Geral

Dr.Nicolau Maliengue Sikaleta