

Espectroscopía Raman como método de apoyo en el diagnóstico de Malaria

Ing. Diana Marcela Rojas Campiño

Directores

PhD. Juan Carlos Salcedo Reyes

PhD. Daniel Ricardo Suárez Venegas

PhD Liliana Jazmín Cortes Cortes

Maestría en Bioingeniería

Facultad de ingeniería

Pontificia Universidad Javeriana

Resumen

La malaria es una enfermedad parasitaria transmitida por un mosquito vector que causa miles de muertes anuales a nivel mundial y la manera adecuada para interrumpir su transmisión es el diagnóstico y tratamiento temprano. Se propone la implementación de la espectroscopia micro Raman como método alternativo de detección de la malaria. Para esto se prepararon placas mediante las técnicas de extendido y gota gruesa, con sangre sana y con malaria, siguiendo los parámetros establecidos por el Instituto Nacional de Salud (INS). Luego, se seleccionaron 10 láminas con muestras infectadas de malaria en extendido y 10 en gota gruesa, así como 4 láminas con sangre sana. En cada lámina se identificaron 20 campos ópticos para ser analizados mediante espectroscopia micro-Raman con un láser de 785 nm. Una vez obtenidos los espectros se calculó la desviación estándar para determinar si un conjunto de valores cercanos a un número de onda determinado corresponden o no a un pico, asociado a cada grupo. En particular para las muestras infectadas con malaria, preparadas mediante la técnica de extendido, se encontró una banda localizada en 1321 cm^{-1} asociada con la presencia de hemozoina en la sangre.

Tabla de contenido

Resumen	2
1. Introducción	5
2. Objetivos	9
2.1. Objetivo general	9
2.2. Objetivos específicos	10
3. Metodología	10
3.1. Preparación de las muestras sanguíneas	12
3.1.1. Extendido de sangre periférica	12
3.1.2. Gota gruesa	13
3.2. Tinción Romanowsky modificada.....	13
3.2.1. Gota gruesa	14
3.2.2. Extendido de sangre periférica	15
3.3. Medición de los espectros Raman	15
4. Resultados	19
5. Conclusiones	24
Anexo revisión de literatura.....	26
A. Malaria	26
A.1. Parásito del <i>Plasmodium</i>	27
A.1.1. Cifras mundiales del paludismo	27
A.1.2. Técnicas actuales de detección de la malaria	28
A.1.3. La espectroscopía como una técnica alternativa de medición	30
A.1.4. Tratamientos.....	31
A.2. Instrumentación.....	31
A.2.1. La espectroscopía Raman	31
A.2.2. Aplicaciones de la espectroscopía Raman.....	32
A.3. Aplicaciones de la espectroscopía Raman en el análisis de la malaria.....	33
A.3.1. Caracterización de células sanguíneas por espectroscopía Raman	34
A.3.2. Visualización de glóbulos rojos infectados con malaria por medio de espectroscopía Raman	34
A.4. Diagnóstico de la malaria mediante espectroscopía Raman.....	35
A.4.1. Visualización de glóbulos rojos infectados con malaria por medio de espectroscopía Raman	35

A.4.2. Detección de la malaria por espectroscopía Raman	35
A.5. Detección de la malaria por espectroscopía Raman	36
6. Referencias.....	39

1. Introducción

La malaria es una enfermedad causada por parásitos del género *Plasmodium* transmitida por mosquitos del género *Anopheles*, de la cual se registran aproximadamente 228 millones de contagios que generan en promedio 400 000 muertes anuales a nivel mundial. La región africana es la más afectada pues representa el 93% de las infecciones a nivel mundial y la misma cantidad del total de defunciones. La población más vulnerable es la infantil menor de 5 años, pues para el 2018 representaban el 67% de las muertes mundiales. En el 2018, las regiones de república democrática del Congo, Uganda, Nigeria, Mozambique, Niger y Costa de Marfil tuvieron la mitad de la población mundial infectada (WHO, 2019).

Especialmente en Colombia, durante el 2018 se contabilizaron, 62141 casos de malaria, de los cuales, 61178 fueron malaria no complicada y 953 complicada. De estos casos de contagio, el 50,1% pertenecen a infección por *Plasmodium vivax*, 47, 9% por *Plasmodium falciparum* y el 2% restante por infección mixta (INS, 2019). Para la semana 21 del 2020, Colombia reportó una reducción general en los contagios, sin embargo, se presentaron incrementos en algunos municipios como Norte de Santander, Cauca, Nariño, Antioquia, Córdoba, Guaviare, Bolívar y Meta, acompañado de brotes relacionados con la actividad minera (OMS 2020).

El *Plasmodium falciparum* y el *vivax* son los tipos más relevantes, ya que son los causantes de la mayoría de las muertes causadas por la malaria (Hastings, 2015). Este tipo de parásito invade las células hepáticas y luego se multiplica en los glóbulos rojos. Sin embargo, la propagación en el cuerpo puede tardarse hasta 15 días, lo que hace que el diagnóstico de la infección sea complicado en las primeras etapas (Paul, 1981).

La resistencia a los medicamentos antipalúdicos y a los insecticidas han hecho que la terapia actual sea ineficaz y que la tasa de contagio y supervivencia de los mosquitos agentes de transmisión aumente (Fairhurst, 2012). En la actualidad no hay una prueba diagnóstica única, ya que las pruebas actuales no cumplen a cabalidad con todos los indicadores que permitan identificar esta patología, por lo que generalmente deben ser combinadas. Existen diversas formas para la detección de la malaria, cada una con diferentes capacidades de detección, por ejemplo, algunas pueden identificar las cuatro especies más relevantes de malaria, pero no las diferencian. Las pruebas más comunes son: la de gota gruesa, extensión y la prueba de diagnóstico rápido (Mendoza et al., 2011). La sensibilidad de estas técnicas depende de varios factores como el tiempo transcurrido después de la transmisión y del estado (gestación, VIH, edad, etc.) en el que se encuentre el paciente (Ministerio de Salud de Colombia y Protección Social, 2020) También influye la experiencia del técnico encargado de realizar el conteo manual de los parásitos en las muestras, y su capacidad para identificar la presencia y la especie del parásito causante de la enfermedad (WHO, 2009).

Actualmente, el diagnóstico de la malaria se da por medio del hallazgo de los parásitos del *Plasmodium* en sangre. Esta identificación se realiza mediante la tinción del parásito, la cual generalmente ocasiona que se presente deshemoglobinización, es decir, este proceso tiende a disminuir la cantidad de sangre en las muestras, permitiendo una mejor visualización mediante microscopia del parásito y así la caracterización del tamaño, la forma y el color de la célula hospedadora (Cortés et al., 2018).

En este trabajo nos enfocaremos en el análisis del *plasmodium falciparum* ya que es la especie que ocasiona más muertes a nivel mundial. Para la preparación de las muestras se seguirán los parámetros establecidos por el INS para lo cual se emplearán las técnicas de gota gruesa

y extendido en lugar de gotas húmedas de sangre, ya que se desea replicar las condiciones establecidas en los laboratorios clínicos de detección de la enfermedad para que el profesional encargado pueda emplear las mismas láminas tanto en el conteo manual como en el análisis de los espectros Raman.

Debido a que el análisis actual de la malaria se realiza mediante conteo manual del parásito por parte de un técnico especializado, y en ocasiones se presentan fallas humanas que podrían dar como resultados falsos negativos, la tipificación del espectro Raman del parásito del *Plasmodium falciparum* sería de gran utilidad, pues permitirá la identificación del mismo en corto tiempo. La detección temprana de esta enfermedad ayuda a evitar que este avance y pueda presentar mayores complicaciones inclusive mortales, por otra parte, contribuye a que el paciente deje de ser un potencial foco de contagio (OPS et al. 2010).

Durante las últimas décadas técnicas espectroscópicas como la infrarroja y la Raman están siendo cada vez más empleadas en el análisis de compuestos biológicos, gracias a que su funcionamiento se basa en las vibraciones moleculares de las muestras, permitiendo conocer la estructura química de los compuestos analizados. La espectroscopía infrarroja es una técnica prometedora, sin embargo, se ve limitada, ya que solo se puede emplear en muestras secas (Khoshmanesh, 2014). Por otro lado, la espectroscopía Raman es una técnica químicamente selectiva y no invasiva que puede ser empleada en muestras biológicas con altos contenidos de agua sin verse afectado el resultado (Keiner, 2015). Un avance en la caracterización de la malaria a través de esta técnica es la identificación de la hemozoína, la cual posee un espectro característico gracias a su estructura cristalina que se debe a sus unidades diméricas de hemo (Butler, 2016).

La hemozoína es un producto tóxico de desecho que excreta el parásito para protegerse, su estructura es idéntica a la hematina β fabricada de forma artificial por lo que al momento del análisis puede ser empleada como referencia en la identificación de picos relevantes en el estudio (Wood et al., 2004). Es por esto que la hemozoína se convierte en un componente clave para la detección de la malaria. En general, los espectros Raman de la hemoglobina y la hemozoína presentan grandes similitudes en sus estructuras.

Otros beneficios de implementar la espectroscopía Micro Raman son la identificación de los modos de frecuencia y de vibración intermolecular, los cuales proporcionan información específica de la composición y de la estructura molecular del material analizado. Además, otra ventaja es su facilidad a la hora de ser transportado, ya que un microscopio convencional tiene un tamaño aproximado de 432 mm (altura) x 233 mm (ancho) x 367.5 mm (profundidad), y 8.5 kg (Técnica, s. f.), con respecto a un espectrómetro Raman presenta las siguientes dimensiones 88.9 mm (altura) x 63.5 mm (ancho) x 52.4 mm (profundidad) y 0.4 kg (*Ocean HDX Raman Spectrometers Ocean Insight*, s. f.) lo cual podría tener un gran impacto en un país como Colombia, en donde un gran porcentaje de las zonas con mayor presencia de la enfermedad se encuentran ubicadas en lugares de difícil acceso.

Esta investigación hace parte de la fase inicial del proyecto “Desarrollo e implementación de un sistema basado en espectroscopia Raman e inteligencia artificial como método complementario para el diagnóstico de Malaria”, elaborado en colaboración con el Instituto Nacional de Salud y Oak Ridge National Laboratory (USA) el cual tiene como objetivo diseñar, implementar, estandarizar y validar un sistema portátil con las técnicas SERS y gota gruesa como métodos alternativos de detección de malaria utilizando inteligencia artificial.

Para esto se realizarán una serie de pruebas que permitan la estandarización para el acondicionamiento de las muestras y el análisis de resultados de los espectros Raman. Las muestras se prepararán mediante Gota gruesa, la cual es la prueba estándar recomendada por la OMS, y el extendido quien es empleado como prueba de confirmación (Ver anexo A.1.2). Además, se tendrán en cuenta protocolos adicionales como la tinción de las muestras, para lo que se utilizará la tinción de Romanovsky modificada, ya que es la técnica recomendada en Colombia por el Instituto Nacional de Salud (Ver sección 3.2). Una vez obtenidas las muestras serán analizadas bajo espectroscopia Raman permitiendo caracterizar el espectro correspondiente al parásito del *plasmodium*, a la vez se tomarán imágenes digitales de muestras sanas e infectadas con un microscopio óptico digital logrando micrografías de alta resolución, posteriormente se seleccionarán campos ópticos específicos permitiendo caracterizar tanto los glóbulos rojos como los parásitos. Luego se implementará una base de datos con un gran volumen tanto de las micrografías como de los espectros Raman para que puedan ser analizados mediante inteligencia artificial. Finalmente, todos estos resultados serán integrados al sistema de un equipo portátil que determine si la muestra de sangre se encuentra infectada por malaria o no, complementando el diagnóstico del profesional encargado.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

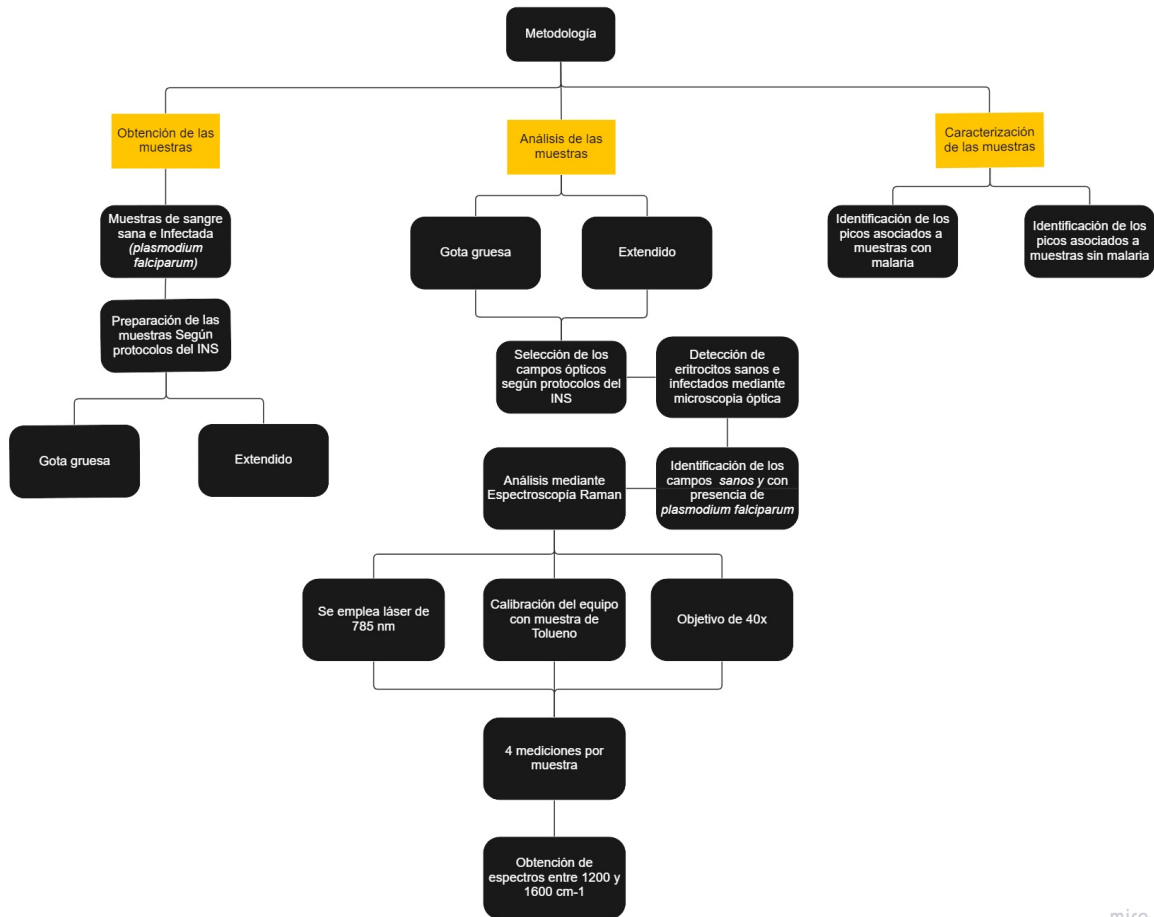
Evaluar la espectroscopía micro Raman como método de apoyo en el diagnóstico de la malaria.

2.2. Objetivos específicos

1. Implementar las técnicas de extensión, gota gruesa y tinción de *Romanowsky* modificada sobre muestras de sangre sana y con malaria (*Plasmodium falciparum*) para someterlas al análisis bajo microscopía óptica y Raman.
2. Determinar los espectros Raman característicos del parásito del *Plasmodium falciparum* para que posteriormente puedan ser implementados en una técnica de apoyo en el diagnóstico temprano de la enfermedad.

3. Metodología

El objetivo de esta investigación es analizar como la espectroscopía Raman puede ser empleada en el apoyo de la detección temprana de la malaria. Para esto se tienen muestras de sangre sana e infectada de malaria en porta muestras diseminadas bajo las técnicas de gota gruesa y extendido, las cuales fueron analizadas mediante microscopía Raman y comparada con espectros de investigaciones previas. La metodología empleada puede ser apreciada en la Figura 1.



miro

Figura 1. . Metodología empleada para la obtención, análisis y caracterización de las muestras de sangre sana e infectadas con malaria.

Para el desarrollo de este proyecto de investigación se contó con la colaboración del Instituto Nacional de Salud, quien es la entidad encargada de acreditar los procesos a nivel nacional en el análisis de muestras parasitarias. Por lo tanto, se emplearon los protocolos establecidos por esta entidad en la elaboración de las placas con muestras sanguíneas tanto en gota gruesa como en extendido teñidas con la solución de Romanovsky modificado (INS 2015). De igual forma, se establecieron los parámetros de medición empleados en el microscopio Raman para obtener los picos característicos de este tipo de muestras biológicas.

Para la obtención de las muestras se emplearon técnicas de extensión, gota gruesa y tinción de *Romanowsky* modificada sobre muestras de sangre sana y con malaria, para esto se realizaron 10 placas de extendido y 10 de gota gruesa con sangre infectada de malaria y 4 con sangre sana en colaboración con el personal de parasitología del Instituto Nacional de Salud quien aprovisionó cultivos de sangre con *Plasmodium falciparum* y capacitó a D.M. Rojas para la elaboración de las muestras como se muestra en la Figura 2.

A continuación, se realizará una descripción detallada de los procesos.

3.1. Preparación de las muestras sanguíneas

3.1.1. Extendido de sangre periférica

Según (INS, 2015), la elaboración de placas en extendido de muestras sanguíneas infectadas con el parásito del *Plasmodium falciparum* en diferentes estadios, como el de trofozoítos, se realiza siguiendo los pasos mencionados a continuación:

1. Se mezcla cuidadosamente la muestra para que tenga una distribución equitativa de las células.
2. Se coloca una pequeña gota de sangre de 5 µl que no quede demasiado gruesa sobre el extremo de una placa totalmente limpio (aunque sean nuevos se recomienda que se sometan previamente a un proceso de limpieza con alcohol y una gasa nueva).
3. Se ubica otra placa delante de la gota de sangre con un ángulo entre los 30° y 45°, la cual se desplaza ligeramente hacia la gota provocando que esta distribuya a lo largo de la placa, seguidamente se desliza suavemente y con rapidez la lámina hacia

adelante hasta llegar al extremo opuesto. (debe tener una distribución uniforme, sin huecos ni surcos).

4. Una vez extendida la sangre en la muestra, se deja secar al aire.
5. Finalmente, se marca la placa con un lápiz (ya que las marcas realizadas con tintas pueden desaparecer cuando se someten a procesos de tinción).

3.1.2. Gota gruesa

1. Para este tipo de muestras es recomendable elaborar dos láminas por paciente.
2. Se vierte una gota de sangre de 3 μ l y ayudado con otra lámina portaobjeto se extiende de manera adecuada la muestra de sangre logrando un área aproximada de 1 cm x 1 cm o de 1 cm x 1,5 cm.
3. Se recomienda hacer movimientos oscilatorios para obtener muestras homogéneas, esto se puede verificar si la sangre no es lo suficientemente escasa como para no cubrir el vidrio o lo suficientemente gruesa como para no leer la letra de un periódico puesto detrás de la muestra.
4. Una vez elaboradas las gotas gruesas se dejan secar a temperatura ambiente aproximadamente por 20 minutos, en un mesón horizontal.



Figura 2. Fotografías del proceso de realización de las muestras de gota gruesa tomadas en Instituto Nacional de Salud.

3.2. Tinción Romanowsky modificada

3.2.1. Gota gruesa

Después de la preparación de las placas con extendido y gota gruesa, las muestras se someten a un tratamiento de tinción con Romanowsky modificada, la cual se encuentra compuesta por cuatro soluciones descritas a continuación.

1. Azul de metileno fosfatado.
2. A de Romanowsky modificado.
3. Solución B de Romanowsky modificado.
4. Solución fosfatada o buffer.

La preparación se lleva a cabo en 3 pasos fundamentales, los cuales serán descritos a continuación:

- a. Precoloración: se introducen las láminas en azul de metileno fosfatado por un tiempo no superior a tres segundos para deshemoglobinizar los glóbulos rojos, se eliminan los residuos con un papel absorbente.
- b. Enjuague: se emplea el buffer fosfato durante un segundo para enjuagar el azul de metileno, se escurre con ayuda de un papel absorbente. Se ubican las láminas en posición completamente horizontal para ser sometidas al proceso de coloración.
- c. Coloración: Para realizar la coloración se debe preparar la solución de trabajo inmediatamente antes de colorear la muestra. Para esto, en un tubo con tapa rosca se realiza en orden la siguiente mezcla por cada lámina que se requiera teñir: 3 µl de solución fosfatada, una gota de solución A y una de solución B.
- d. El tiempo de coloración es de aproximadamente 10 minutos, sin embargo, este puede variar de acuerdo con posible cambio de lotes de la coloración.

- e. Si la lámina presenta precipitado enjuague con buffer fosfato durante un segundo y deje escurrir, si la muestra está libre de excesos solo posicione la lámina en posición vertical y deje escurrir.

3.2.2. Extendido de sangre periférica


Para la tinción en un extendido de sangre periférica se siguen los mismos pasos que en la gota gruesa, a excepción que esta no requiere de precoloración y que el tiempo de estandarización es de aproximadamente 35 a 40 minutos.

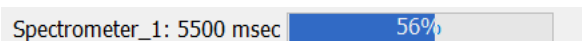
3.3. Medición de los espectros Raman


Luego de obtener las láminas requeridas para su análisis, se empleó el equipo IDRAMAN micro Ocean Optics, de la Pontificia Universidad Javeriana, ubicado en el laboratorio de películas delgadas y nanofotónica, Este cuenta con un láser de 785 nm para la excitación de la muestra y un objetivo de 40X en retrodispersión además posee una resolución de adquisición de datos con un rango entre 200 a 3200 números de onda.

Para realizar el análisis de la muestra en el microscopio IDRAMAN micro Ocean Optics se debe contar con un computador al que previamente se le ha instalado el software OceanView (requiere licencia) y se realizan los siguientes pasos:

1. Verificar que los equipos IDRAMAN micro Ocean Optics y el computador se encuentren conectados de forma adecuada a una fuente eléctrica.
2. Encender los equipos, para el IDRAMAN se gira la llave (vertical apagado - Horizontal encendido) que se encuentra en la parte posterior del equipo.
3. Comprobar que el microscopio se encuentra conectado correctamente al computador.

4. Ingresar al software de microscopía de su preferencia en nuestro estudio se trabajó con Toupview.
5. Encender el microscopio del equipo con el botón de color gris que se encuentra en la parte superior (una vez encendido de presentar una luz azul de fondo).
6. Realizar el ajuste de balance de blancos y negros para obtener la mejor resolución posible en su imagen (los parámetros varían con cada muestra).
7. Enfocar correctamente el objetivo desplazando la plataforma de forma vertical para acercar o alejar y de forma horizontal para trasladar la muestra.
8. Una vez seleccionada la muestra, apagar el microscopio para que la luz de este no interfiera con la medición del espectroscopio.
9. Ingresar al software OceanView mediante la clave de activación (adquirida por el usuario) y seleccionar la opción Espectroscopía Raman.
10. Dirigirse a la parte superior izquierda y en el control principal, ingresar los parámetros de adquisición requeridos para la toma del espectro, para nuestro caso particular son: tiempo de integración 11 segundos, escaneos promedio 5 y una potencia de láser de 1.5 mW.
11. Después de haber establecido los parámetros, seleccionar el botón “Play”  (Observe que la luz roja que encuentra en el costado derecho está encendida, esto le permitirá verificar que el láser está funcionando) y esperar que la medición se haya completado, puede verificar en la parte inferior derecha donde encontrará una barra de progreso.



12. Obtener la información del espectro en el icono de copiar datos  y guardarlo en un archivo .txt.

13. Finalmente, graficar los datos en un software de su preferencia, en nuestro caso se empleó Origin Pro.

Se realizaron las mediciones de los espectros Raman empleando un microscopio (IDRAMAN micro Ocean Optics) de 3 MP que emplea técnicas de epi-iluminación para mejorar la resolución, empleando un láser de excitación de 785 nm. Las imágenes tanto de frotis como de gota gruesa fueron obtenidas mediante un objetivo de 40X con una potencia de laser de 1,5 mW y un tiempo de integración de 11 segundos con 5 escaneos promedio. En las muestras de sangre sin infección se empleó el mismo objetivo, sin embargo, para este caso los espectros adquiridos con una potencia de laser de 1,5 mW presentaban interferencia por esto se realizaron mediciones con diferentes potencias, siendo la potencia de laser de 2 mW quien arrojó los espectros más definidos, con un tiempo de integración de 30 s con 5 escaneos promedio. En la calibración del equipo se empleó una muestra de tolueno que viene incorporada al equipo de la cual se obtuvo el espectro mostrado en la Figura 3, el cual coincide con el espectro de referencia encontrado en la base de datos de RammanSystems, 2018.

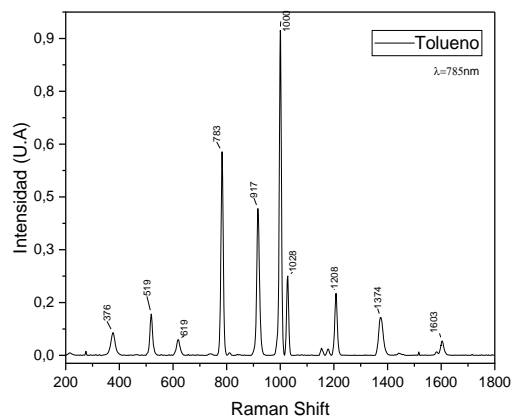


Figura 3. Espectro Raman del Tolueno

Se compararon los cambios bioquímicos presentes en la sangre asociados a la infección por malaria en las placas de sangre sana e infectada. Cada una de las muestras fue analizada en diferentes campos microscópicos y para confirmar la presencia de hemozoína se apuntó directamente mediante el microscopio del equipo (IDRAMAN micro Ocean Optics) permitiendo enfocar los glóbulos rojos infectados como se aprecia en la Figura 4. Finalmente se seleccionaron al azar 20 puntos de las láminas de extendido y 20 de gota gruesa, para ser observados mediante microscopia Raman.

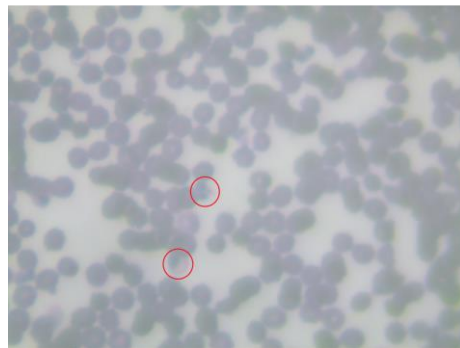


Figura 4. micrografía lamina infectada con parásitos de Plasmodium falciparum

4. Resultados

En esta sección se presentan las señales Raman obtenidas para las muestras estudiadas, sanas y con malaria, tanto en gota gruesa como en extendido. Para determinar si los valores cercanos a un número de onda determinado corresponden o no a un pico se analizó la dispersión de los datos obtenidos para cada uno de los grupos mediante el cálculo de la desviación estándar (ver apéndice 5). Luego, teniendo en cuenta la concentración de los picos resultantes se fijó el rango entre 1220 cm^{-1} y 1640 cm^{-1} , el cual se encuentra asociado a porfirinas, lípidos, timinas y proteínas (Varela-Fonseca et al., 2019). En la Figura 5 se puede observar el espectro obtenido para cuatro puntos seleccionados de forma aleatoria de las muestras infectadas y procesadas mediante la técnica de extendido.

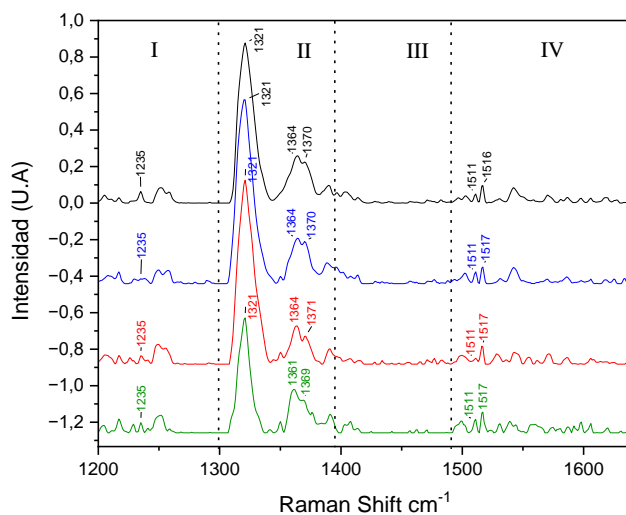


Figura 5 Raman para muestras de malaria elaboradas mediante extendido

De igual forma se seleccionaron cuatro puntos para las muestras con malaria elaboradas mediante gota gruesa, como se observa en la Figura 6.

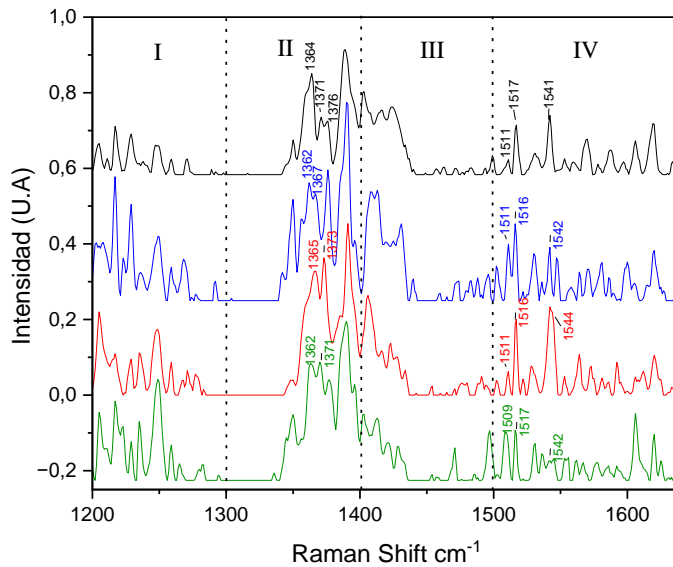


Figura 6. Espectros Raman de muestras de malaria elaboradas mediante gota gruesa

Como se puede observar en las Figuras 5 y 6, los espectros pertenecientes a las muestras preparadas mediante la técnica de gota gruesa no presentan picos definidos en comparación con los espectros pertenecientes a las muestras elaboradas mediante extendido. Esto mismo sucede para las muestras de sangre sana, en donde los espectros más definidos se obtienen por la técnica de extendido. Por lo anterior, de ahora en adelante nos enfocaremos en los resultados obtenidos para la técnica de extendido.

Como se puede apreciar en la Figura 5, el intervalo de estudio se ha dividido en cuatro regiones notablemente importantes en cuanto a las variaciones entre muestras sanas y con malaria las cuales fueron agrupadas de la siguiente manera: la Región I corresponde a los picos ubicados entre 1200 cm^{-1} y 1300 cm^{-1} , la Región II entre 1300 cm^{-1} y 1400 cm^{-1} , la región III entre 1400 cm^{-1} y 1500 cm^{-1} y la Región IV entre 1500 cm^{-1} y 1640 cm^{-1} .

A continuación, presentamos una descripción de los resultados obtenidos para las muestras con malaria (Figura 5):

- En la Región I en 1235 cm^{-1} se encuentran enlaces de C-H los cuales son sensibles a la conformación de hemoglobina gracias a la influencia de la unión del oxígeno con el hierro del hemo (Jacob et al., 2022).
- En la región II se encuentran dos zonas relevantes, una alrededor de 1321 cm^{-1} fue sometida a una deconvolución para restaurar los valores que componen esta señal obteniendo los números de onda 1320 cm^{-1} y 1333 cm^{-1} como se muestra en la Figura 7. Según el estudio de Goodall et al. 2007, el pico ubicado en 1320 cm^{-1} se puede asociar a Fe_2O_3 el cual, por encontrarse en esta región, indica la presencia de porfirinas, permitiendo relacionarlo con la hemozoína, mientras que el número de onda en 1333 cm^{-1} sugiere la existencia de triptófanos. La segunda zona en esta región comprende el intervalo entre 1344 cm^{-1} y 1382 cm^{-1} . Aquí, el primer pico ubicado en 1362 cm^{-1} corresponde a las bandas de agregación del hemo y al estado de "oxidación" del hierro (Jacob et al., 2022b), mientras que el pico ubicado en 1370 cm^{-1} se relaciona con la vibración correspondiente a los 4 pirroles que se superponen alrededor del enlace formando el dímero de la hemozoína en la parte donde se unen las dos hematinas (Frosch et al., 2009).
- La región III no presenta picos significativos por lo que no será tomada en cuenta en esta investigación.
- En la región IV los picos ubicados en 1511 cm^{-1} y 1517 cm^{-1} se asocian a los β -carotenoides presentes en la sangre, quienes por ser antioxidantes protegen al organismo y al sistema inmunológico de los radicales libres (Bilal et al., 2015).

5. Discusión y resultados

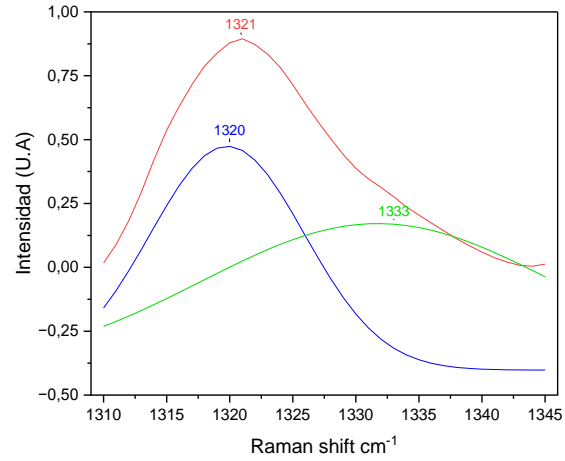


Figura 7. Deconvolución del pico ubicado en 1321 cm⁻¹ del espectro Raman de la figura 5.

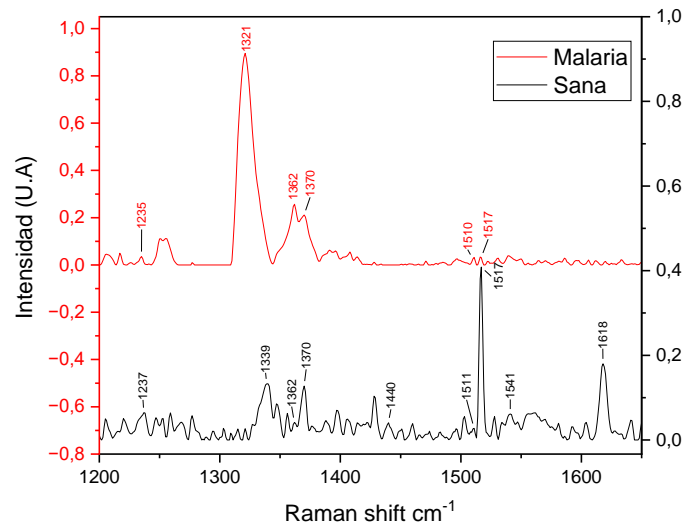


Figura 7 Raman de las muestras de sangre infectadas con malaria (rojo) y sangre sana (negro)

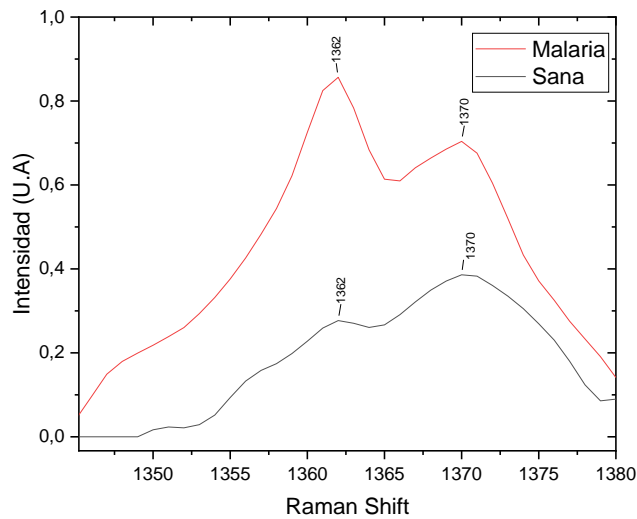


Figura 9. Ampliación del Espectro Raman de la Figura 8.

Con la anterior descripción de los resultados obtenidos para la sangre infectada con malaria procedemos a realizar la respectiva comparación con el espectro obtenido para sangre sana como se puede observar en la Figura 8.

Los picos ubicados en 1235 cm^{-1} , 1541 cm^{-1} y 1618 cm^{-1} se encuentran asociados a la composición de la hemoglobina. Los dos últimos solo se presentan en las muestras de sangre sin malaria. Sin embargo, la banda localizada en 1235 cm^{-1} se puede observar en las muestras con sangre infectada, aunque con una menor intensidad que se puede asociar al daño que ocasiona el parásito en la estructura molecular de la hemoglobina.

En las muestras sanas podemos notar la ausencia de la banda ubicada en 1320 cm^{-1} (valor proveniente de la deconvolución) la cual se puede interpretar como una característica de la hemozoina. Por su parte, los valores ubicados alrededor de 1333 cm^{-1} (Figura 7) y 1440 cm^{-1} se asocian a la presencia de triptófanos. Sin embargo, se puede observar que la intensidad de dichas bandas en las muestras infectadas es menor. En este caso la hemozoina agota el hierro disponible en la sangre, lo cual conduce a una disminución de

la producción del triptófano, quien también necesita de este compuesto para su formación. Un comportamiento inverso ha sido reportado en algunas terapias antipalúdicas en donde aumenta la producción de triptófanos a medida que la malaria disminuye (Islahudin et al., 2012).

Para el pico ubicado en 1370 cm^{-1} (asociado al hemo) se puede aplicar un análisis similar, en donde la intensidad de esta banda en las muestras sanas es mayor comparada con aquellas que tienen paludismo. Por el contrario, para el número de onda de 1362 cm^{-1} (asociado a pirroles) la mayor intensidad se encuentra en las muestras de sangre con malaria.

Por su parte, los picos que están ubicados en 1510 cm^{-1} y 1517 cm^{-1} indican la presencia de carotenoides y presentan una mayor intensidad en la sangre sana mientras que en las muestras con malaria disminuye debido a la disminución del líquido celular ocasionado por el rompimiento de la membrana celular.

6. Conclusiones

Después de preparar 10 láminas con muestras infectadas de malaria en extendido y 10 en gota gruesa, así como 4 láminas con sangre sana, se identificaron 20 campos ópticos para ser analizados mediante espectroscopia micro-Raman. Se observó que los picos más definidos fueron los pertenecientes a las muestras realizadas mediante la técnica de extendido. Se identificaron los valores en los cuales se ubican los picos Raman característicos de sangre sana y con malaria preparados mediante extendido. En particular, para las muestras infectadas se encontró una banda principal ubicada en 1321 cm^{-1} correspondiente a la presencia de hemozoína. También es importante destacar una

reducción considerable en la intensidad de las bandas características del hemo y los triptófanos en las muestras con malaria comparadas con las de sangre sana.

Las muestras no fueron expuestas a tratamientos alternativos como centrifugación, exposición a compuestos químicos ajenos a la tinción o portaobjetos con mejoramiento de superficie como el tratamiento SERS. El espesor de la muestra, tanto en gota gruesa como en extendido, incrementan la precisión del estudio ya que evitan la presencia de elementos que interfieran en el análisis de esta. Una ventaja adicional es que las láminas pueden ser guardadas por periodos extensos para posteriores estudios.

Esta técnica sirve de apoyo en la detección de la malaria mediante la automatización de las señales Raman características de la hemozoína reduciendo así el grado de error humano causado por parte del personal de salud encargado de su diagnóstico.

Por medio de la estandarización presentada en este trabajo, tanto de la preparación de las muestras como de los parámetros empleados para la obtención de los espectros Raman, se pretende continuar con un análisis de muestras con un volumen significativo de datos que permita sistematizar la caracterización del parásito del *plasmodium falciparum* a través inteligencia artificial. Posteriormente, se propone diseñar un equipo portátil que emplee espectroscopia Raman y que mediante el escaneo de muestras de sangre identifique la presencia o no del parásito y de esta forma ayude al diagnóstico de la enfermedad en un intervalo de tiempo corto.

Anexo revisión de literatura

A. Malaria

El paludismo es una enfermedad producida por parásitos del género *Plasmodium*, por medio de la picadura de un mosquito hembra infectado del género *Anopheles*, quien habita en todo el mundo y presenta predominancia en zonas tropicales y templadas. En la actualidad se conocen 465 especies de *Anopheles* de las cuales 50 pueden transmitir los diferentes tipos de *Plasmodium* causantes de la malaria humana (Chavatte et al. 2007).

La transmisión depende de factores como el medio ambiente, el huésped, el vector y el parásito y el tiempo de vida de los mosquitos, ya que este último permite que el parásito tenga más tiempo para su desarrollo. Estos factores sumados a una gran preferencia por la picadura en humanos hacen que África sea la región donde se presenta la mayor tasa de casos de malaria en el mundo, representando más del 90% de los casos (Phillips et al. 2017).

Otro factor no menos importante es la inmunidad, ya que después de realizar varios estudios se ha encontrado que los adultos residentes en zonas de alto contagio han ido creando inmunidad a lo largo de los años. Esto ha generado que el riesgo de infección sea cada vez menor en personas adultas y que la población infantil represente el mayor porcentaje de muertes por año. Este factor no aplica en zonas donde la transmisión es pequeña pues por su baja tasa de incidencia no se han encontrado reportes de inmunidad (WHO, 2019).

Es importante tener en cuenta las recomendaciones de la OMS para la prevención de esta enfermedad, como el uso de mosquiteros tratados con insecticidas, fumigación de acción

residual en el interior de las casas, ropa que cubra brazos y piernas, etc. ya que si no es diagnosticada a tiempo puede tener graves consecuencias (WHO, 2019).

A.1. Parásito del *Plasmodium*

Este parásito pertenece al género de los protistas y hace parte de la familia *plasmodidae*, del cual se conocen actualmente más de 175 especies. Al menos diez de estas infectan al hombre, de las cuales cinco provocan malaria o paludismo: *P. Falciparum*, *P. Vivax*, *P.Ovale*, *P. Malariae* y *P.Knoelesi*. El *Plasmodium Falciparum* es causante de la malaria terciaria maligna, el *P. Vivax* es la causa más frecuente de la malaria terciaria benigna, el *P. Ovale* es la causa menos frecuente de la malaria terciaria benigna, la *P. Malariae* causa malaria cuaternaria benigna y la *P.Knoelesi* es una especie particular ya que hasta el momento había sido hallada en algunos macacos, pero en el 2004 se produjeron un millón de casos en la isla de Borneo y durante los últimos años ha sido encontrado en varias zonas de sudeste asiático. Cabe la pena destacar que el *Plasmodium* más relevante hasta el momento es el *Falciparum* ya que es el causante del 90% de las muertes por malaria a nivel mundial y se encuentra en el 99,7% de la población infectada en África. La sigue el *Plasmodium vivax* quien representan 60% de la población infectada en las Américas (Loy *et al*, 2017).

A.1.1. Cifras mundiales del paludismo

Según el último informe presentado por la OMS durante el 2018 se presentaron 228 millones de casos de malaria con aproximadamente 405 000 muertes, las cuales disminuyeron un poco con respecto al año anterior puesto que en 2017 se presentaron 231 millones de infectados y 416 000 muertes. La región africana es la más afectada pues representa el 93% de las infecciones a nivel mundial y la misma cantidad del total de defunciones. La población más

vulnerable es la infantil menor de 5 años, pues para el 2018 representaban el 67% de las muertes mundiales. En el 2018 las regiones de república democrática del Congo, Uganda, Nigeria, Mozambique, Niger y Costa de Marfil tuvieron la mitad de la población mundial infectada (WHO, 2019).

A.1.2. Técnicas actuales de detección de la malaria

En la actualidad existen diversas formas para detectar la malaria cada una con diferentes capacidades de detección, por ejemplo, algunas pueden identificar las cuatro especies más relevantes de malaria, pero no las diferencian. Otras por el contrario pueden identificar la especie del parásito, pero no pueden determinar con facilidad si existe o no la enfermedad. (WHO, 2009)

Dentro de las más comunes están el frotis de gota gruesa y el extendido y las pruebas rápidas, las cuales permiten realizar el análisis y la visualización del parásito en la sangre. Para el caso de la gota gruesa y el frotis se emplean técnicas de microscopía excepto en el caso de *Plasmodium Knowlesi*, ya que este únicamente se puede identificar mediante técnicas de biología molecular (Torrús et al. 2015).

La gota gruesa es el método más utilizado y recomendado en el mundo y debe ser la primera opción en el proceso del diagnóstico. Esta técnica permite detectar densidades entre 5-20 parásitos/ μ l, pues emplea mayor cantidad de sangre en cada muestra. La preparación de las muestras se realiza de tal forma que se produzca rotura de los glóbulos rojos permitiendo así la detección del parásito y la identificación de la especie (Turrientes, 2000). Esta técnica concentra entre 20 y 30 veces más el número de capas de glóbulos rojos por lo que realizada

de forma adecuada permite tener resultados con mayor sensibilidad y se estima que es 15 veces más sensible que el extendido (Turrientes, 2000).

Aunque la gota gruesa es la técnica de diagnóstico más empleada, presenta inconvenientes ya que es muy laboriosa, pues requiere de técnicos expertos que puedan detectar los parásitos en sangre de forma manual y además necesita que haya gran presencia de parásitos en la muestra, es decir, que la enfermedad esté un poco avanzada (Martín, 2010).

Para el extendido se emplea una pequeña muestra de sangre y se esparce por la lámina de vidrio y se fija con metanol. Después, se pone sobre una solución colorante que permite que se tiñan los componentes celulares acidófilos y biofílicos respectivamente. El citoplasma se colorea de azul, la cromatina de rojo y el pigmento malárico pardo amarillo. En esta técnica se visualizan los glóbulos rojos parasitados y sus fases de crecimiento, lo que permite identificar la especie, sin embargo, necesita de gran presencia parasitaria en la muestra por lo que es recomendada como técnica complementaria en la detección de la malaria (Turrientes, 2000).

En los casos donde no es posible contar con un microscopio se emplean las pruebas rápidas de diagnóstico, las cuales detectan los antígenos de la malaria en sangre. Para este tipo de prueba se recoge la muestra generalmente mediante la punción en el dedo, la cual es ubicada en la platina del test y los reactivos que vienen incorporados en el kit mezclan los anticuerpos marcados de forma libre. En cada banda de control se encontrará un anticuerpo contra el antígeno quien se unirá dejando atrapado parte del anticuerpo marcado en la banda de prueba y generando además un color en la misma, indicando que hay presencia de parásitos en la sangre (WHO, 2013). Este tipo de herramienta es muy útil como técnica complementaria, ya que su sensibilidad se puede variar por múltiples factores, como la presencia de otras

enfermedades, alteraciones genéticas, consumo de medicamentos antimaláricos, etc. (Mishra, 1999).

Las pruebas moleculares se realizan mediante la reacción en cadena de la polimerasa, la cual funciona como amplificador del ADN del parásito, permitiendo la identificación y detección de las especies de *Plasmodium* presentes en la muestra. Es empleada como una técnica de confirmación en los laboratorios donde el personal no tiene suficiente experiencia en el examen microscópico o para la identificación de la especie del *Plasmodium* en los casos donde los resultados del frotis no son muy claros (Chen, 2016).

A.1.3. La espectroscopía como una técnica alternativa de medición

Para realizar diagnósticos de malaria con certeza, es necesario aplicar nuevas técnicas que sean muy sensibles, rápidas y económicas, las cuales permitan no solo conocer la existencia del *Plasmodium* sino también obtener información acerca de la especie de forma simultánea mediante pequeñas muestras de sangre. Espectroscopias como la Raman y la infrarroja se basan en la identificación de macromoléculas específicas. Estas técnicas son vibratorias no destructivas que permiten la recopilación de espectros característicos que son únicos de cada sistema molecular, permitiendo la identificación de los compuestos de las muestras analizadas (Baker, 2014).

Tanto la espectroscopía FTIR como la Raman dependen de las vibraciones moleculares, la primera es adecuada para realizar análisis de macromoléculas como carbohidratos, lípidos, proteínas, etc. por lo que posee gran capacidad para realizar diagnósticos donde sea necesario distinguir glóbulos rojos infectados y sanos (Clemens, 2014). Por otra parte, la espectroscopia Raman analiza la señal de moléculas que suelen ser muy simétricas ya que

tienden a ser buenos dispersores Raman. La hemozoína que es un pigmento producido por el paludismo es un gran dispersor Raman gracias a sus unidades diméricas de hemo (Butler, 2016). Ambas técnicas poseen una resolución limitada, por lo que sus resoluciones laterales dependen de la longitud de onda de la luz empleada para excitar la muestra. El agua tiene un alto coeficiente de extinción molar, pero es un débil dispersor de Raman, lo que convierte la espectroscopía Raman en la mejor opción para analizar células vivas (Lasch, 2006).

A.1.4. Tratamientos

Para evitar que la enfermedad avance y el paciente pueda presentar mayores complicaciones, además ser un potencial foco de contagio, el tratamiento debe suministrarse inmediatamente se conozcan los resultados de parasitología de las pruebas. En general el tratamiento no necesita de prescripción médica lo que hace que este sea de fácil acceso. En Colombia el tratamiento se realiza mediante la eliminación de los síntomas, la prevención de las recrudescencias por medio de la administración de medicamentos antimaláricos eficaces. Estos proveen de una curación total, ya que además de la curación de la enfermedad causada también elimina todas las formas de *Plasmodium* en el organismo humano, evitando posibles recaídas en la enfermedad por la interacción con nuevos vectores *anophelinos* (OPS et al. 2010).

A.2. Instrumentación

A.2.1. La espectroscopía Raman

La Espectroscopía Raman es una técnica de dispersión molecular que usa la interacción de la luz con la materia para obtener la información de la composición o las características de un material. Esta información se obtiene por la incidencia de un haz de luz monocromática de una fuente laser, sobre una muestra ubicada a 90° con respecto al laser.

Esta técnica proporciona información característica de los modos vibracionales de las moléculas que componen las sustancias analizadas, permitiendo conocer su composición química, su estructura molecular y adicionalmente su red cristalina.

Este tipo de espectroscopía se basa en la dispersión de los fotones incidentes sobre una muestra. El mayor porcentaje de los fotones se dispersan con la misma energía de los fotones incidentes, lo cual se conoce como dispersión Rayleigh. Sin embargo, un pequeño número de estos fotones se dispersa con una frecuencia diferente ya que hay un intercambio de energía provocado por un choque inelástico. Este último tipo se conoce como dispersión Raman. Para el caso en que la frecuencia es mayor se denomina Raman Stokes y cuando es menor anti-Stokes, como se muestra en la Figura A.1. Tanto los anti-Stokes como los Stokes son simétricos pero este último es más intenso por lo que es más útil a la hora de realizar análisis, mientras que los anti-Stokes son más empleados en estudios de fluorescencia (Albrecht, 1961).

A.2.2. Aplicaciones de la espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman es una técnica de dispersión en la que se hace incidir una luz laser para crear cambios en los niveles de energía vibracionales de las moléculas, los cuales son característicos de cada una de ellas, permitiendo la identificación de la composición química de una muestra, por lo que puede ser empleada en muestras biológicas para obtener información sobre estas. Este tipo de espectroscopía ha demostrado ser eficiente al momento de analizar compuestos de un material en los campos de la geología, polímeros, semiconductores y elementos biológicos. Una de las ventajas que tiene este tipo de técnica es la muestra no debe ser sometida a una amplia preparación, por lo que generalmente no se contamina (Gellini, 2021).

Los sustratos utilizados en el SERS permiten detectar biomoléculas que se encuentran en baja cantidad, es decir, permite observar proteínas en fluidos corporales por medio de la excitación de plasmones de superficie localizados. Esta técnica permite detectar moléculas individuales por lo cual puede ser utilizada como herramienta de diagnóstico in situ para la detección de diferentes sustancias. Por este hecho viene siendo usada como método experimental en detección temprana de enfermedades como cáncer de páncreas, diabetes tipo II y enfermedades donde se pueda emplear un chip microfluidico que detecte varios biomarcadores proteicos para predecir el tipo de enfermedad (Han, 2014).

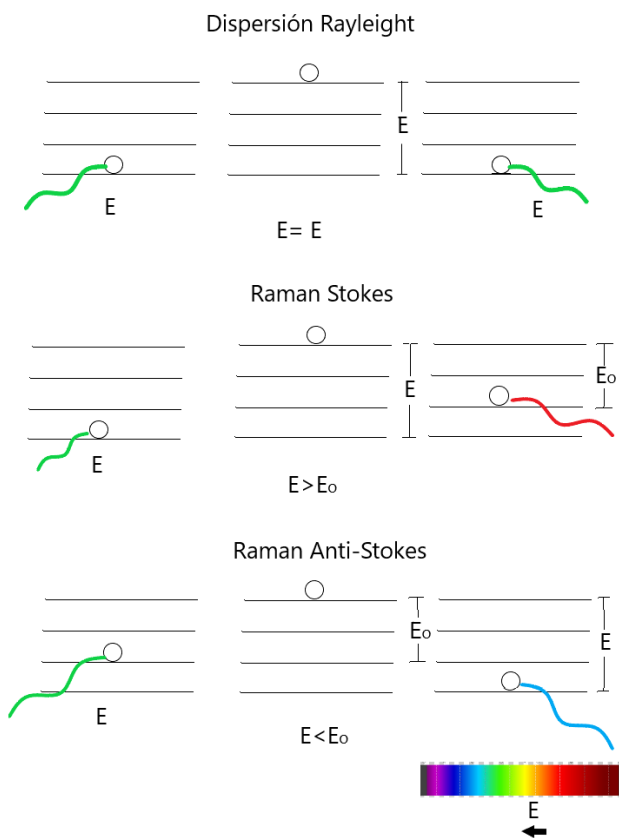


Figura A.1. Representación de los tipos de dispersión

A.3. Aplicaciones de la espectroscopía Raman en el análisis de la malaria

A.3.1. Caracterización de células sanguíneas por espectroscopía Raman

La hemoglobina es la proteína de la sangre compuesta por hierro que encargada de transportar el oxígeno en el cuerpo. Cuando el parásito de *Plasmodium* ataca, se producen hemozoínas, quienes resultan de la catalización de la hemoglobina en la vacuola digestiva del parásito. Este producto de desecho del parásito es tóxico ya que es liberado en forma cristalina insoluble, un gran dispersor Raman. Esta propiedad es gracias a la simetría de las unidades dimericas de hemo y a la estructura cromofórica de la protoporfirina IX permitiendo que haya una gran dispersión Raman cuando se excita la muestra, generando un espectro con picos característicos de la misma (Stiles, 2008).

A.3.2. Visualización de glóbulos rojos infectados con malaria por medio de espectroscopía Raman

Para obtener el espectro Raman de un objetivo in vivo se debe enfocar el láser directamente en la célula empleando un microscopio óptico visible y un objetivo de inmersión en agua, lo que permite tener una buena resolución. El tiempo de adquisición de los datos debe ser corto pues debido a la exposición prolongada al láser se puede desnaturalizar la célula y por lo tanto dañar la muestra. Por otro lado, si la potencia del láser es muy alta se pueden presentar fotodenaturaciones, agregaciones y el efecto de las líneas base del espectro. Es por esto que al realizar mediciones Raman en glóbulos rojos vivos se debe controlar la potencia del láser sobre la muestra y el tiempo de exposición.

La espectroscopia Raman proporciona la información sobre los cristales de la hemozoína con una resolución espacial submicrométrica. Los espectros Raman de los glóbulos rojos en la etapa de trofozoíto del *Plasmodium* muestran bandas intensas de hemozoínas en rangos de excitación con longitudes de onda tales como: 406, 514, 568, 633, 674, 676, 780, 830 y 1064

cm^{-1} . Para el caso de los glóbulos rojos no infectados los espectros contienen bandas fuertes de oxihemoglobina (Wood, 2004)

A.4. Diagnóstico de la malaria mediante espectroscopía Raman

A.4.1. Visualización de glóbulos rojos infectados con malaria por medio de espectroscopía Raman

Para realizar el análisis se debe ubicar el objetivo en la parte central de la muestra ya que en la parte periférica hay gran presencia de gametocitos, pero poca de hemozoína, las cuales son el marcador referente para el paludismo. Se emplea la espectroscopía Raman para detectar la presencia de la hemozoína basándose en las bandas de las porfirinas, las cuales se encuentran en la 1569 cm^{-1} (Wood, 2009).

La espectroscopia Raman también se puede emplear como método de vigilancia de la progresión de la enfermedad en el cuerpo, ya que a medida que esta avanza los picos son cada vez más definidos. De acuerdo con estudios previos se ha podido ver que las bandas proporcionadas por pacientes infectados con malaria se pueden diferenciar de los espectros proporcionados por pacientes sanos (Wood, 2004)

A.4.2. Detección de la malaria por espectroscopía Raman

Gracias a la gran dispersión que produce la hemozoína, el diagnóstico de malaria mediante espectroscopía Raman es una buena opción, sin embargo, al momento de realizar el análisis se debe tener en cuenta que dependiendo del sitio que vaya a ser analizado los parámetros de medición cambian ya que si el análisis se realiza en la parte central de la muestra se analizan las hemozoínas de la muestra, pero si es en la sangre se verificará la concentración de gametocitos ya que la concentración de hemozoína es poca en esta zona (Wood, 2009).

La principal desventaja que presenta esta técnica es el tiempo que se puede tardar en analizar una muestra con una capa delgada buscando células infectadas. Por esto se recomienda realizarla de manera conjunta con microscopía de campo oscuro, reflectancia confocal o microscopía de contraste de fase cuantitativa para acelerar el proceso seleccionando los glóbulos rojos sospechosos (Kang, 2011).

La espectroscopía Raman también puede ser empleada para observar el progreso de la enfermedad en el cuerpo, estudiando la dinámica de la oxidación-reducción de los ciclos de la hemoglobina en los glóbulos rojos para determinar las hemozoinas en los lisados de trofozoítos, aumentando así la probabilidad de detección de células infectadas (Hobro, 2013). De igual manera se puede emplear la espectroscopía Raman para diferenciar los espectros entre glóbulos rojos infectados y sanos, se ha podido evidenciar que en los espectros Raman de plasma se pueden diferenciar entre pacientes sanos y enfermos (Bilal, 2015).

La espectroscopía óptica empleada como método diagnóstico en la detección de la malaria presenta grandes ventajas, pues genera señales características o propias o de los compuestos de la sangre permitiendo la identificación y caracterización de las muestras. Para casos en que no sea posible identificar los parásitos con gran facilidad se puede mejorar la resolución acondicionando la técnica con otro tipo de microscopía como las mencionadas anteriormente.

A.5. Detección de la malaria por espectroscopía Raman

Teniendo en cuenta el gran número de datos procedemos a determinar la correlación entre estos calculando su desviación estándar. Esta nos indicará si los valores cercanos a un

número de onda determinado corresponden o no a un pico. Entre más alejados se encuentren (los datos asociados a un número de onda específico) de su media o valor esperado, su dispersión será mayor e indicará que no existe un pico en ese caso. En este estudio, se descartaron aquellos picos cuya desviación fuera mayor a uno. Los datos obtenidos se muestran en las tablas A.1- A.4.

Longitud de onda (cm^{-1})	Desviación estándar
1235	0.23
1321	0.60
1362	0.88
1370	0.85
1511	0.38
1516	0.50

Tabla A. 1 Picos seleccionados en las Muestras de Extendido infectadas con malaria.

Longitud de onda (cm^{-1})	Desviación estándar
1362	0.89
1370	0.82
1511	1
1516	0.50
1542	0.70

Tabla A. 2. Picos seleccionados en las Muestras de gota gruesa infectadas con malaria.

Longitud de onda (cm^{-1})	Desviación estándar
1427	0.70
1516	0.54

Tabla A. 3. Picos seleccionados en las Muestras de gota gruesa sanas

Longitud de onda (cm ⁻¹)	Desviación estándar
1235	0
1339	0.59
1362	0.90
1370	0.87
1440	0.75
1511	0.43
1517	0.58
1541	0.68
1618	0.87

Tabla A. 4 Picos seleccionados en las Muestras de extendido sanas

7. Referencias

- Albrecht, A. C. (1961). On the Theory of Raman Intensities. *The Journal of Chemical Physics*, 34(5), 1476-1484. <https://doi.org/10.1063/1.1701032>
- Baker, M. J., Trevisan, J., Bassan, P., Bhargava, R., Butler, H. J., Dorling, K. M., Fielden, P. R., Fogarty, S. W., Fullwood, N. J., Heys, K. A., Hughes, C., Lasch, P., Martin-Hirsch, P. L., Obinaju, B., Sockalingum, G. D., Sulé-Suso, J., Strong, R. J., Walsh, M. J., Wood, B. R., ... Martin, F. L. (2014). Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nature Protocols*, 9(8), 1771-1791. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.110>
- Bilal, M., Saleem, M., Amanat, S. T., Shakoor, H. A., Rashid, R., Mahmood, A., & Ahmed, M. (2015). Optical diagnosis of malaria infection in human plasma using Raman spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 20(1), 017002. <https://doi.org/10.1117/1.jbo.20.1.017002>
- Butler, H. J., Ashton, L., Bird, B., Cinque, G., Curtis, K., Dorney, J., Esmonde-White, K., Fullwood, N. J., Gardner, B., Martin-Hirsch, P. L., Walsh, M. J., McAinsh, M. R., Stone, N., & Martin, F. L. (2016). Using Raman spectroscopy to characterize biological materials. *Nature Protocols*, 11(4), 664-687. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.036>
- Clemens, G., Hands, J. R., Dorling, K. M., & Baker, M. J. (2014). Vibrational spectroscopic methods for cytology and cellular research. *The Analyst*, 139(18), 4411-4444. <https://doi.org/10.1039/c4an00636d>

- Chavatte, J. M., Chiron, F., Chabaud, A., & Landau, I. (2007). Fidélisation du couple hôte-vecteur facteur probable de spéciation: 14 espèces de Plasmodium de la Pie. *Parasite*, *14*(1), 21-37.
<https://doi.org/10.1051/parasite/2007141021>
- Chen, J., Li, S., Luo, J., Wang, R., & Ding, W. (2016). Enhancement of the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles against Phytopathogenic Bacterium *Ralstonia solanacearum* by Stabilization. *Journal of Nanomaterials*, *2016*, 1-15. <https://doi.org/10.1155/2016/7135852>
- Cialla-May, D., Zheng, X.-S., Weber, K., & Popp, J. (2017). Recent progress in surface-enhanced Raman spectroscopy for biological and biomedical applications: from cells to clinics. *Chemical Society Reviews*, *46*(13), 3945-3961. <https://doi.org/10.1039/c7cs00172j>
- Clemens, G., Hands, J. R., Dorling, K. M., & Baker, M. J. (2014). Vibrational spectroscopic methods for cytology and cellular research. *The Analyst*, *139*(18), 4411-4444. <https://doi.org/10.1039/c4an00636d>
- Cortés, L. J., Muñoz, L., & Ayala, M. S. (2018). Comparación entre metodologías para el diagnóstico microscópico de malaria. *Biomédica*, *38*(2), 244–252. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.3803>
- El paludismo (malaria) en el mundo: informe OMS 2020*. (2020, 7 diciembre). Comité Asesor de Vacunas de la AEP. <https://vacunasaep.org/profesionales/noticias/el-paludismo-malaria-en-el-mundo-informe-oms-2020>

Frosch, T., Koncarevic, S., Becker, K., & Popp, J. (2009). Morphology-sensitive Raman modes of the malaria pigment hemozoin. *The Analyst*, 134(6), 1126-1132. <https://doi.org/10.1039/b821705j>

Fairhurst RM, Nayyar GML, Breman JG, Hallett R, Vennerstrom JL, Duong S, Ringwald P, Wellems TE, Plowe CV, Dondorp AM. (2012) Artemisinin-resistant malaria: research challenges, opportunities, and public health implications. *Am J Trop Med Hyg*. 2012 Aug;87(2):231-241. doi: 10.4269/ajtmh.12-0025. PMID: 22855752; PMCID: PMC3414557.

Fujihara, J., Fujita, Y., Yamamoto, T., Nishimoto, N., Kimura-Kataoka, K., Kurata, S., Takinami, Y., Yasuda, T. & Takeshita, H. (2016). Blood identification and discrimination between human and nonhuman blood using portable Raman spectroscopy. *International Journal of Legal Medicine*, 131(2), 319-322. <https://doi.org/10.1007/s00414-016-1396-2>

Gellini, C., Muniz-Miranda, M., Pagliai, M., & Salvi, P. R. (2021). Spectroscopic studies on antimalarial Artesunate: Raman and surface-enhanced Raman scattering and adsorption geometries of Artesunate on silver nanoparticles. *Journal of Molecular Structure*, 1224, 129020. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129020>

Instituto Nacional de Salud. (2015, febrero). *Manual para el diagnóstico de malaria no complicada en puestos de diagnóstico y tratamiento* (N.º 1). Milenio

Editores e impresores. <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/manual-diagnostico-malaria-no-complicada.pdf>

Instituto Nacional de Salud. (2019, febrero). *Comportamiento de la notificación malaria 2018* (Semana epidemiológica 04). <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2019%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%204.pdf>

Islahudin, F., Pleass, R. J., Avery, S. V. & Ting, K. N. (2012). Quinine interactions with tryptophan and tyrosine in malaria patients, and implications for quinine responses in the clinical setting. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(10), 2501-2505. <https://doi.org/10.1093/jac/dks253>

Han, Y.-A., Ju, J., Yoon, Y., & Kim, S.-M. (2014). Fabrication of Cost-Effective Surface Enhanced Raman Spectroscopy Substrate Using Glancing Angle Deposition for the Detection of Urea in Body Fluid. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 14(5), 3797-3799. <https://doi.org/10.1166/jnn.2014.8184>

Hobro, A. J., Konishi, A., Coban, C., & Smith, N. I. (2013). Raman spectroscopic analysis of malaria disease progression via blood and plasma samples. *The Analyst*, 138(14), 3927. <https://doi.org/10.1039/c3an00255a>

Jacob, S. S., Lukose, J., Bankapur, A., Mithun, N., Vani Lakshmi, R., Acharya, M., Rao, P., Kamath, A., Baby, P. M., Rao, R. K. & Chidangil, S. (2022). Micro-

Raman spectroscopy study of optically trapped erythrocytes in malaria, dengue, and leptospirosis infections. *Frontiers in Medicine*, 9.
<https://doi.org/10.3389/fmed.2022.858776>

Kang, J. W., Lue, N., Kong, C.-R., Barman, I., Dingari, N. C., Goldfless, S. J., Niles, J. C., Dasari, R. R., & Feld, M. S. (2011). Combined confocal Raman and quantitative phase microscopy system for biomedical diagnosis. *Biomedical Optics Express*, 2(9), 2484. <https://doi.org/10.1364/boe.2.002484>

Lasch, P., & Naumann, D. (2006). Spatial resolution in infrared microspectroscopic imaging of tissues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(7), 814-829. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.06.008>

Loy, D. E., Liu, W., Li, Y., Learn, G. H., Plenderleith, L. J., Sundararaman, S. A., Sharp, P. M., & Hahn, B. H. (2017). Out of Africa: origins and evolution of the human malaria parasites *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *International Journal for Parasitology*, 47(2-3), 87-97. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.05.008>

Martín-Rabadán, P., Martínez-Ruiz, R., Cuadros, J., & Cañavate, C. (2010). El laboratorio de microbiología ante las enfermedades parasitarias importadas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(10), 719-725.
<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.03.013>

Mendoza, N. M., Rosas, N. M., & Burgos, J. D. (2011). Evaluación de la aplicación de pruebas de diagnóstico rápido para malaria como parte de una estrategia integral para su control en Colombia. *Biomédica*, 31(1), 55. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v31i1.336>

Ministerio de salud de Colombia y protección social. (2020, agosto). *Guía de Práctica Clínica Diagnóstico y tratamiento de la malaria Guía 2020*.

Mishra, B., Samantaray, J. C., Kumar, A., & Mirdha, B. R. (1999). Study of False Positivity of Two Rapid Antigen Detection Tests for Diagnosis of Plasmodium falciparum Malaria. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(4), 1233. <https://doi.org/10.1128/jcm.37.4.1233-1233.1999>

Mosier-Boss, P. (2017). Review on SERS of Bacteria. *Biosensors*, 7(4), 51. <https://doi.org/10.3390/bios7040051>

Ocean HDX Raman Spectrometers / Ocean Insight. (s. f.). Ocean Insight.

Recuperado 1 de agosto de 2022, de <https://www.oceaninsight.com/products/spectrometers/raman/ocean-hdx-raman-series/>

Organización panamericana de Salud, Instituto Nacional de Salud, & Ministerio de la Protección Social de la República de Colombia. (2010). *GUÍA PARA LA ATENCIÓN CLÍNICA INTEGRAL DEL PACIENTE CON MALARIA*. <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/ET/Guia-atencion-clinica-malaria-2011.pdf>

Paul F, Roath S, Melville D, Warhurst DC, Osisanya JO. (1981). Separation of malaria-infected erythrocytes from whole blood: use of a selective high-gradient magnetic separation technique. *Lancet*. Jul 11;2(8237):70-1. doi: 10.1016/s0140-6736(81)90414-1. PMID: 6113443.

Phillips, M. A., Burrows, J. N., Manyando, C., van Huijsduijnen, R. H., Van Voorhis, W. C., & Wells, T. N. C. (2017). Malaria. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 1-24. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.50>

Saleem, M., Bilal, M., Anwar, S., Rehman, A. & Ahmed, M. (2013). Optical diagnosis of dengue virus infection in human blood serum using Raman spectroscopy. *Laser Physics Letters*, 10(3), 035602. <https://doi.org/10.1088/1612-2011/10/3/035602>

Stiles, P. L., Dieringer, J. A., Shah, N. C., & Van Duyne, R. P. (2008). Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 1(1), 601-626. <https://doi.org/10.1146/annurev.anchem.1.031207.112814>

Técnica, C. I.-S. I. I. S. L.-. (s. f.). *Microscopio binocular biológico CX-31*, OLYMPUS®. Instrumentación científico técnica. Recuperado 31 de julio de 2022, de <http://www.ictsl.net/productos/aparatos/microscopiobinocularbiologicocx31olympus.html>

Torrús, D., Carranza, C., Manuel Ramos, J., Carlos Rodríguez, J., Rubio, J. M., Subirats, M., & Ta-Tang, T.-H. (2015). Diagnóstico microbiológico de la malaria importada. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33, 40-46. [https://doi.org/10.1016/s0213-005x\(15\)30014-8](https://doi.org/10.1016/s0213-005x(15)30014-8)

Turrientes, M., & López-Vélez, R. (2000). *ASPECTOS PRÁCTICOS DEL DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO Y PROFILAXIS DE LA MALARIA*. <https://seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/parasitologia/malaria.pdf>

VARELA-FONSECA, Stephanie et al. (2019). Análisis de ADN mediante espectroscopía Raman utilizando el método SERS. *Tecnología en Marcha* [online]., vol.32, n.3, pp.118-125. ISSN 0379-3982. <http://dx.doi.org/10.18845/tm.v32i2.4501>

Wassmer, S. C., & Grau, G. E. R. (2017). Severe malaria: what's new on the pathogenesis front? *International Journal for Parasitology*, 47(2-3), 145-152. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.08.002>

Wood, B. R., Hermelink, A., Lasch, P., Bambery, K. R., Webster, G. T., Khiavi, M. A., Cooke, B. M., Deed, S., Naumann, D., & McNaughton, D. (2009). Resonance Raman microscopy in combination with partial dark-field

microscopy lights up a new path in malaria diagnostics. *The Analyst*, 134(6), 1119. <https://doi.org/10.1039/b822603b>

Wood, B. R., Langford, S. J., Cooke, B. M., Lim, J., Glenister, F. K., Duriska, M., Unthank, J. K., & McNaughton, D. (2004). Resonance Raman Spectroscopy Reveals New Insight into the Electronic Structure of β -Hematin and Malaria Pigment. *Journal of the American Chemical Society*, 126(30), 9233-9239. <https://doi.org/10.1021/ja038691x>

World Health Organization. (2009). *Malaria Rapid Diagnostic Test Performance: Results of Who Product Testing of Rdt's*. World Health Organization.

World Health Organization. (2013, 9 julio). *OMS / La OMS publica unas nuevas directrices sobre el paludismo relacionadas con el tratamiento y la adquisición de medicamentos*. Organización Mundial de la Salud. https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2010/malaria_20100308/es/

World Health Organization. (2019, 9 diciembre). *El Informe mundial sobre el paludismo 2019 de un vistazo*. Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/malaria/media/world-malaria-report-2019/es/>