



# Mejoramiento de las herramientas diagnósticas para la eliminación de la malaria

Iveth J. González

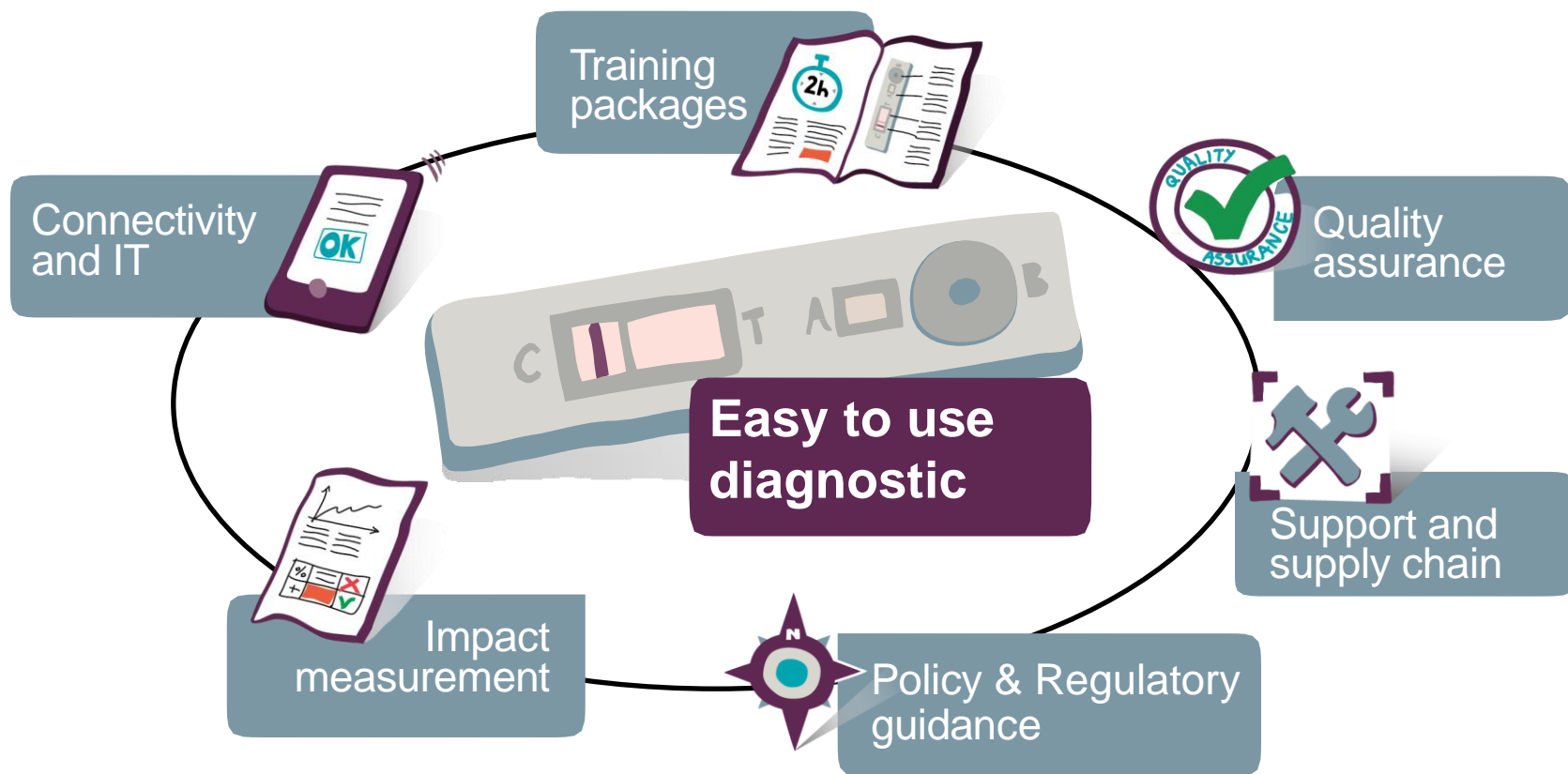
RAVREDA; 25 de marzo de 2015



# FIND – Foundation for Innovative New Diagnostics

## Organización sin ánimo de lucro creada en 2003

Transformando retos diagnósticos complejos en soluciones simples para transformar vidas y vencer a las enfermedades asociadas con la pobreza



Hacia un mundo donde el diagnostico guía la salud para todos



# Acelerando la eliminación de la malaria

## CONTROL



## ELIMINACION

Detección pasiva



Busqueda activa

Detección de casos



Detección de infectados  
(sintomáticos a  
asymptomáticos)

Tratamiento de síntomas



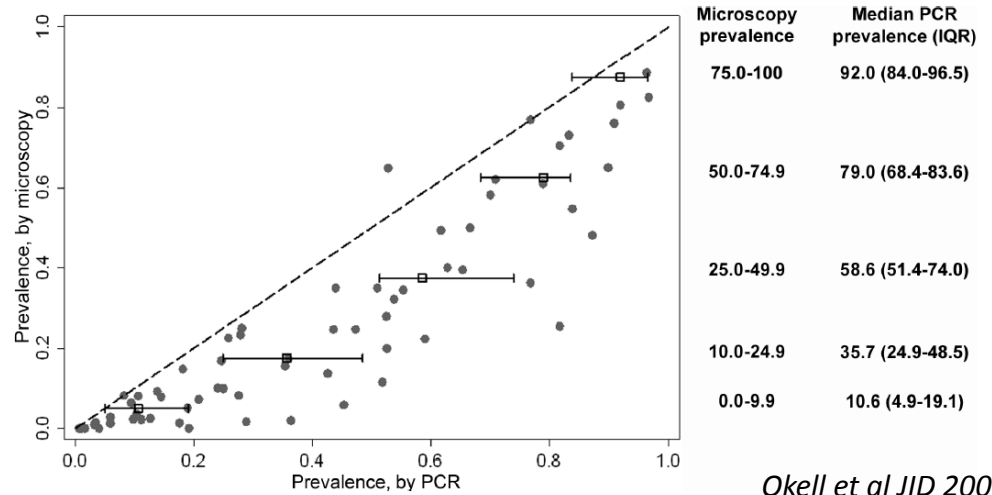
Cura radical  
(parar la transmisión)



# Presencia e infectividad de infecciones sub-microscópicas

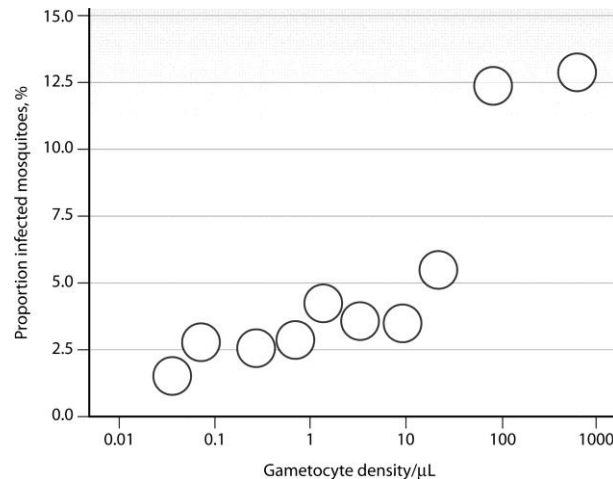
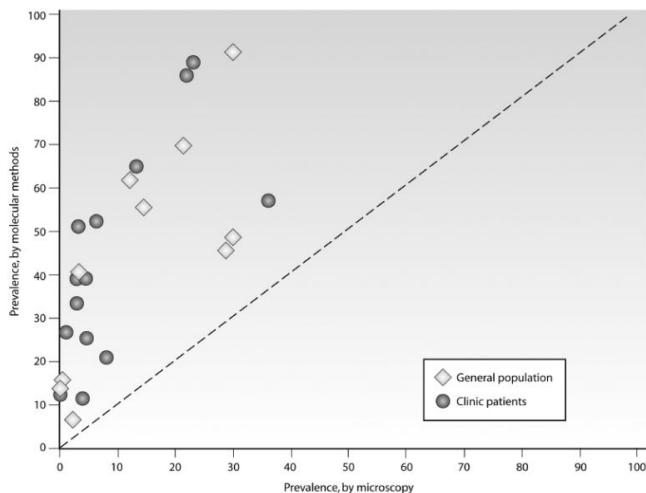
Meta-análisis de 72 publicaciones de microscopía vs PCR:

**Microscopía no detecta 25.5% y 88% de las infecciones en áreas de alta y baja transmisión respectivamente.**



*Okell et al JID 2009*

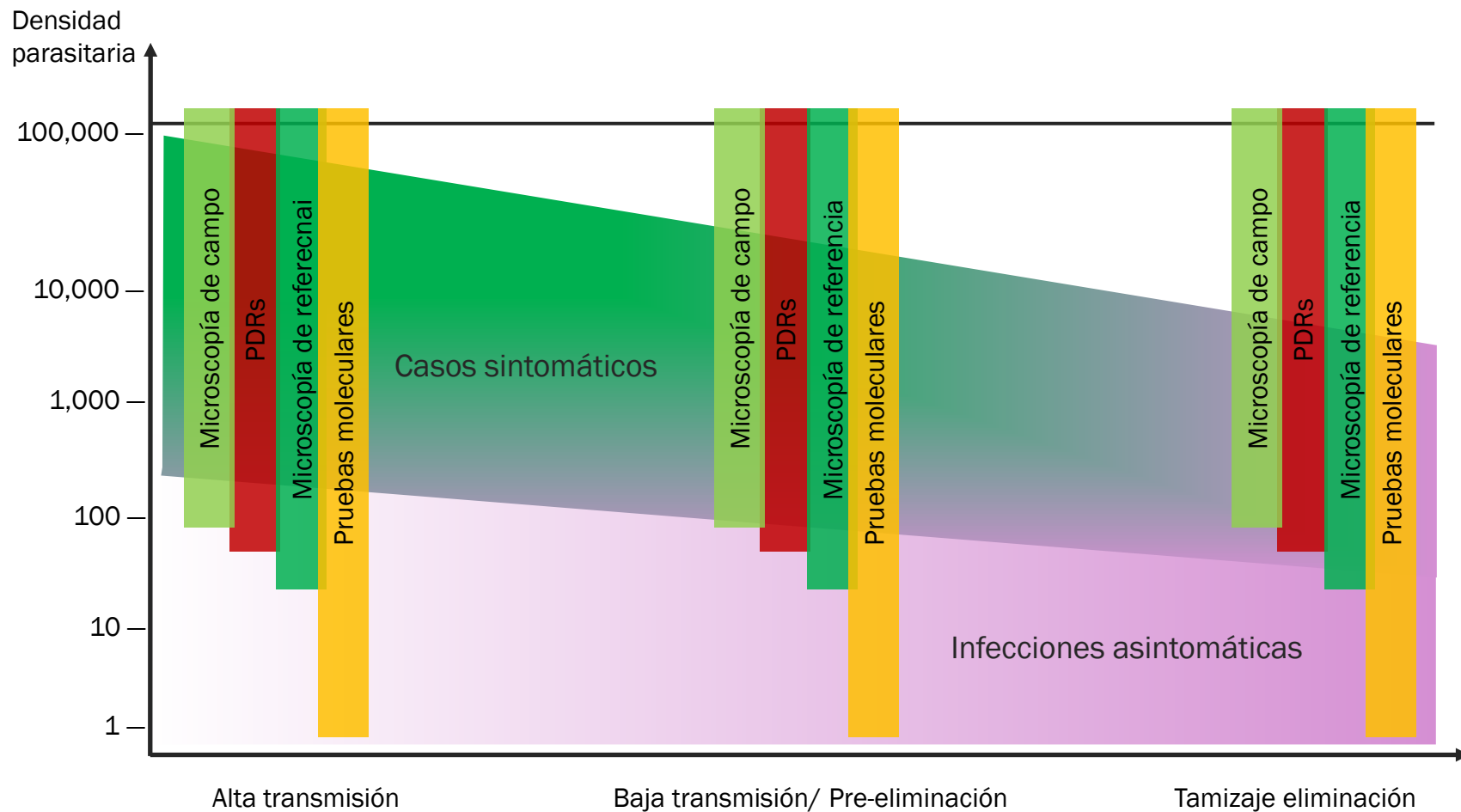
Presencia de gametocitos e infectividad



*Bousema and Drakeley 2011*



# Diagnóstico en diferentes niveles de transmisión



David Bell



# Cómo mejorar la microscopía?

## Ventajas de la microscopía:

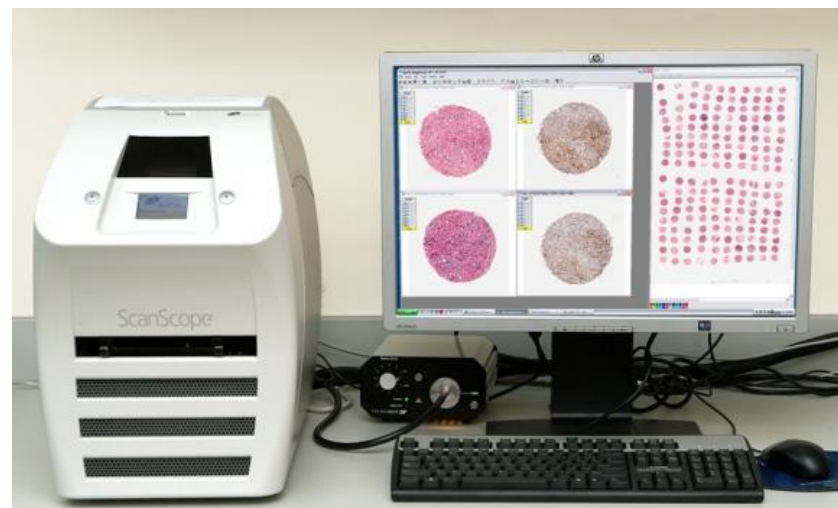
- Detección de especies
- Diferenciación de estadios
- Cuantificación

## Mejoras para eliminación:

- Limite de detección > 1 parasito/ul
- Alto rendimiento

## Microscopía computarizada:

- Altamente dependiente de la calidad de la lamina y de la tinción
- Especificidad afectada por artefactos
- Costos





# PDRs para la eliminación de la malaria?

Una proporción importante de asintomáticos no es detectada por PDRs – Etiopia

**Table 4 Prevalence of microscopic and sub-microscopic *Plasmodium falciparum* by age group as diagnosed by rapid diagnostic test, blood film (microscopy) and polymerase chain reaction**

Age group, years	Prevalence of microscopic infections ( <i>P. f</i> and mixed), n = 1, 453		Prevalence of sub-microscopic infections ( <i>P. f</i> & mixed), n = 400
	Microscopy,% (N)	RDT,% (N)	PCR*,% (N)
2-5	7.0 (15/214)	12.6 (27/214)	10.2 (5/49)
6-15	3.9 (19/485)	9.1 (44/485)	20.1 (29/144)
16-25	2.7 (9/331)	5.4 (18/331)	20.8 (16/77)
26-35	4.1 (11/268)	4.9 (13/268)	22.7 (20/88)
>35	1.9 (3/155)	1.9 (3/155)	16.7 (7/42)

\*are PCR- positive samples that were negative by both microscopy and RDT and it does not include PCR positives that were also positive by microscopy or RDT.

Golassa et al. 2013

## Ventajas de las PDRs

Fáciles de usar y rápidas

No necesita equipos

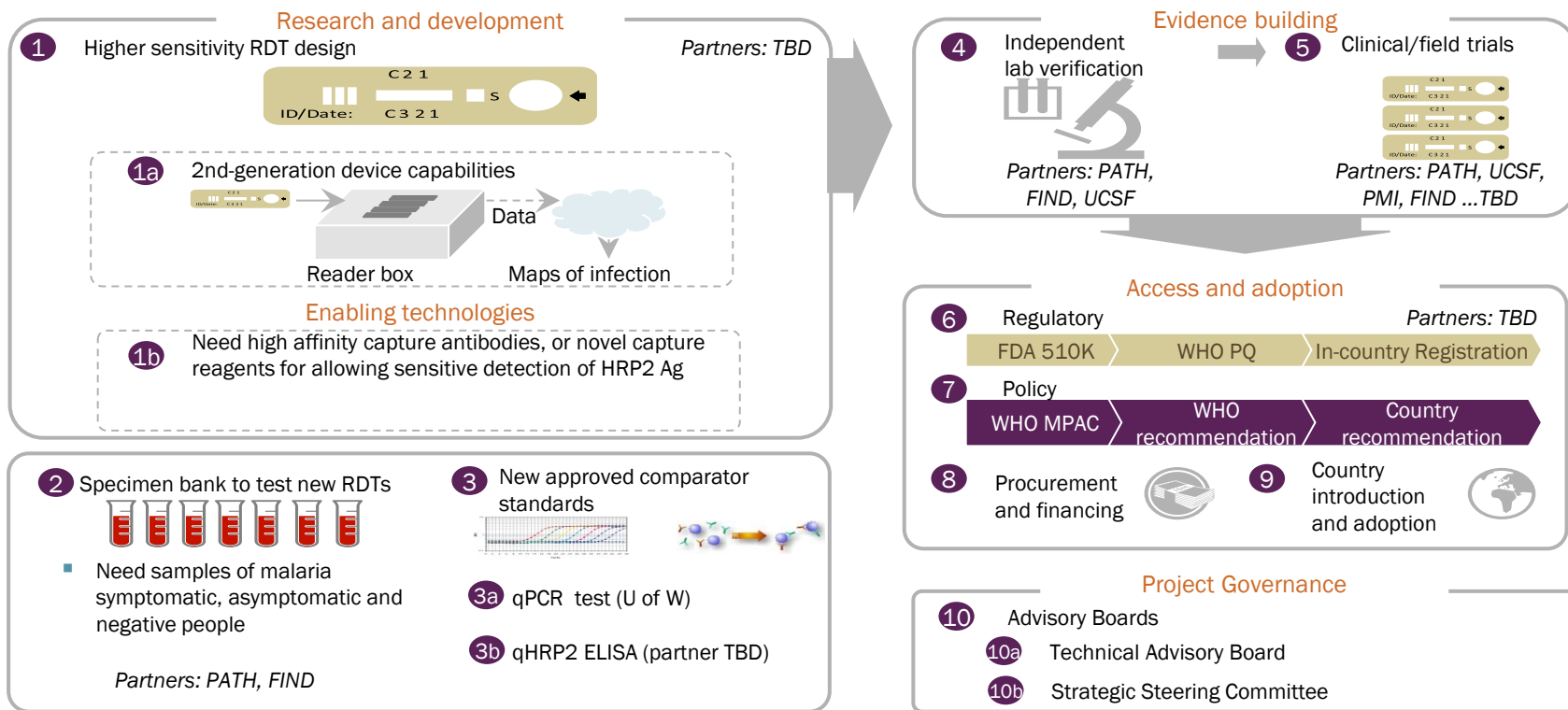
Transporte y almacenamiento a T° ambiente

Pueden mejorarse las PDRs?



# Iniciativa IDT de la Fundación Gates

Desarrollo de una PDR 10 a 100 veces mas sensible que las PDR en el mercado

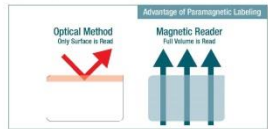






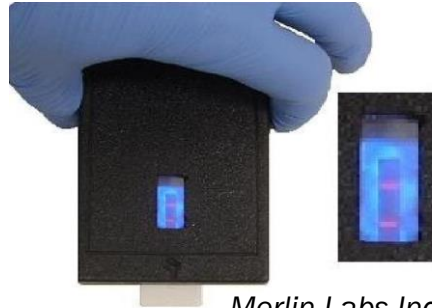
# Lectores y conectividad

## Marcadores paramagnéticos



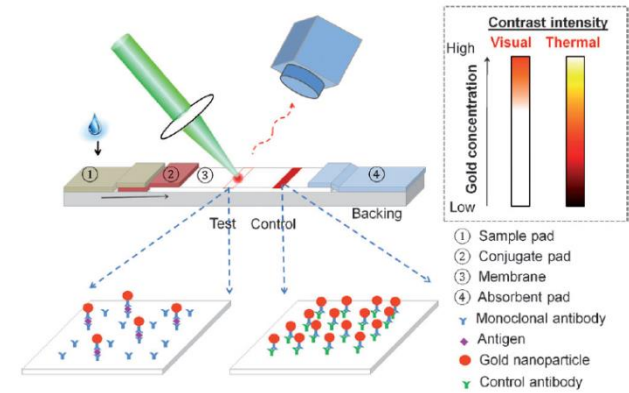
Magnasense Tech.

## Marcadores fluorescentes



Merlin Labs Inc.

## Contraste térmico

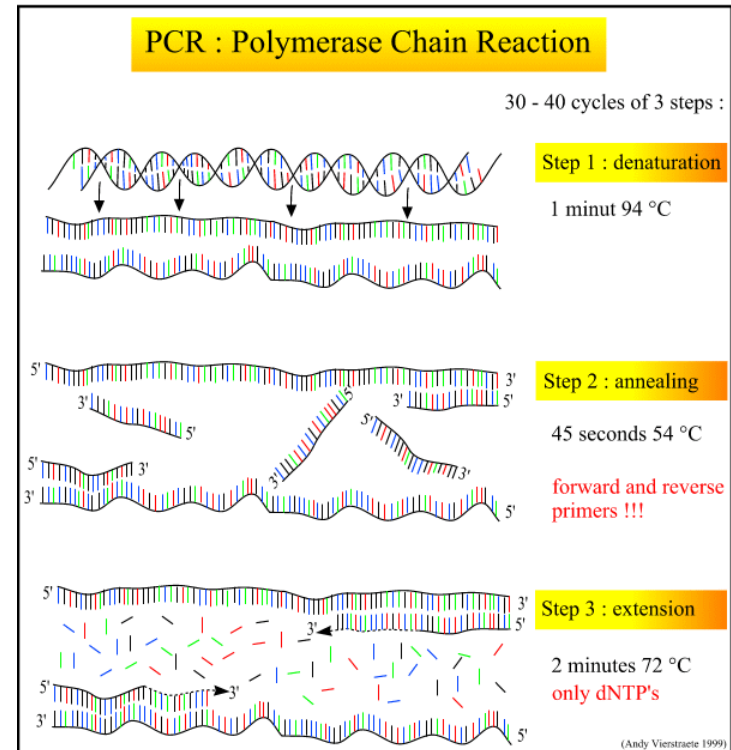
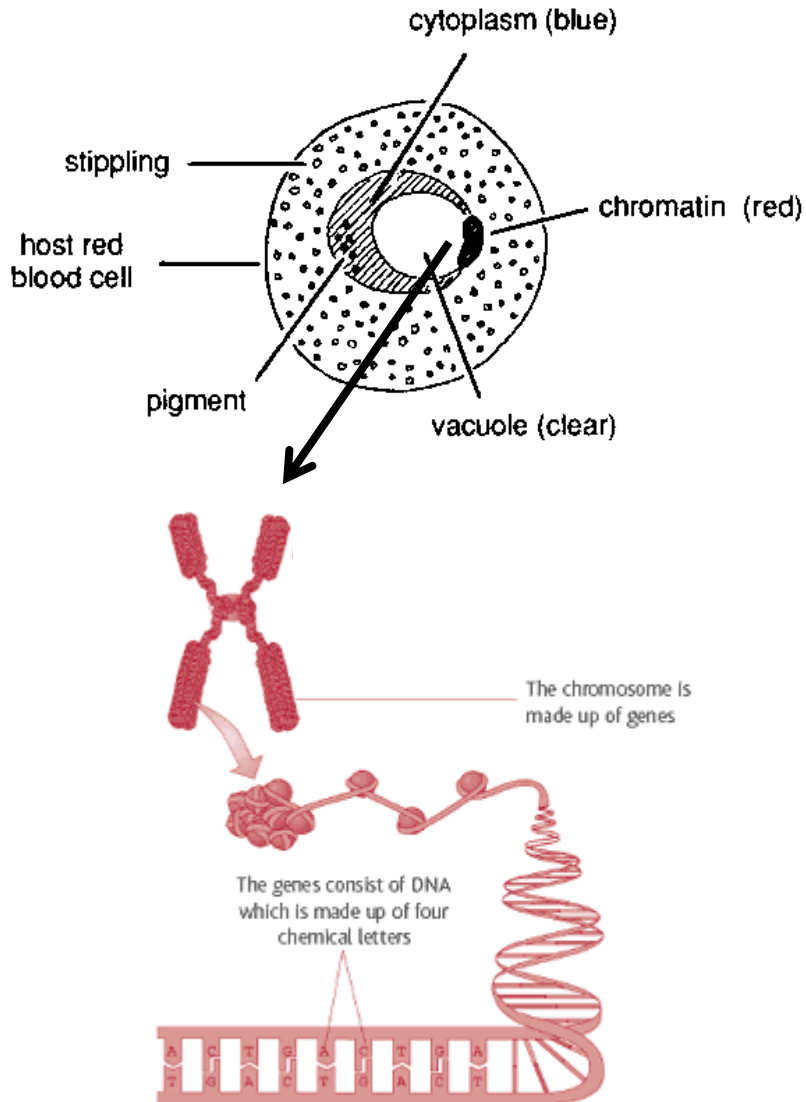


Qin et al. 2012

Factibilidad y costos?



# Pruebas moleculares para eliminación



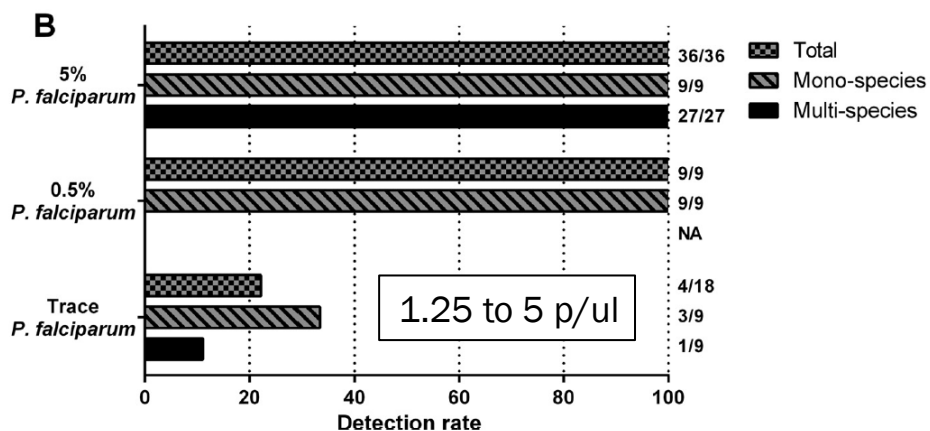
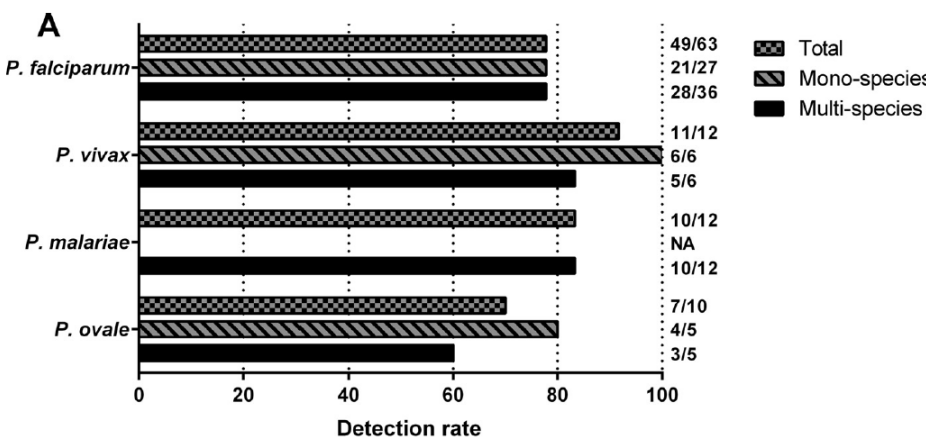
- PCR:**
- Alta complejidad
  - Requiere equipos e infraestructura
  - Resultados en más de 4 horas



# Evaluación del desempeño de diferentes métodos moleculares para malaria

TABLE 2 Protocols employed to detect *Plasmodium* spp. parasites at an internal laboratory and 9 collaborating laboratories

Lab	gDNA extraction	PCR chemistry	No. of cycles	Positive criterion	Gene target	No. of replicates	No. of targets	Species targeted	Reference(s)
UNC	QIAamp DNA minikit	Real-time PCR with TaqMan probes	40	$C_T < 40$	<i>Plasmodium</i> 18S rRNA	2	Duplex/monoplex	<i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i> , <i>P. malariae</i> , <i>P. ovale</i>	22
UNC	QIAamp DNA minikit	Real-time PCR with TaqMan probe	40	$C_T < 40$	<i>P. falciparum</i> lactate dehydrogenase	2	Monoplex	<i>P. falciparum</i>	14
A	QIAamp DNA blood kit	Nested PCR	30/30	Agarose gel electrophoresis	<i>Plasmodium</i> 18S rRNA	1	Monoplex	<i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i> , <i>P. malariae</i>	25, 26
B	QIAamp DNA minikit	Real-time PCR with TaqMan probe	40	$C_T < 40$	<i>Plasmodium</i> 18S rRNA	2	Duplex	<i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i> , <i>P. malariae</i> , <i>P. ovale</i>	25, 26
C	Chelex protocol	Real-time PCR with TaqMan probes	40	$C_T < 40$	<i>Plasmodium</i> 18S rRNA	2	Multiplex	<i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i> , <i>P. malariae</i> , <i>P. ovale</i>	27
D	QIAamp DNA minikit	Real-time PCR with XS probes	50	$C_T < 50$	<i>Plasmodium</i> 18S rRNA	2	Multiplex	<i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i> , <i>P. malariae</i> , <i>P. ovale</i>	28, 29
E	QIAamp DNA minikit	Real-time PCR with TaqMan probes	40	$C_T < 40$	<i>P. falciparum</i> 18S rRNA	2	Monoplex	<i>P. falciparum</i>	30
F	Invitrogen PureLink genomic DNA kit	Real-time PCR with TaqMan probes	50	$C_T < 45$	<i>Plasmodium</i> 18S rRNA	2	Multiplex	<i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i> , <i>P. malariae</i> , <i>P. ovale</i>	13, 27
G	QIAamp DNA minikit	Real-time PCR with TaqMan probe	40	$C_T < 40$	<i>P. falciparum</i> 18S rRNA	2	Monoplex	<i>P. falciparum</i>	25
H	QIAamp DNA minikit	Real-time PCR with TaqMan probe	40	$C_T < 40$	<i>P. falciparum</i> 18S rRNA	2	Monoplex	<i>P. falciparum</i>	30
J	QIAextractor	Nested PCR	24/29	Capillary gel electrophoresis	<i>Plasmodium</i> 18S rRNA	1	Monoplex	<i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i> , <i>P. malariae</i> , <i>P. ovale</i>	22, 23



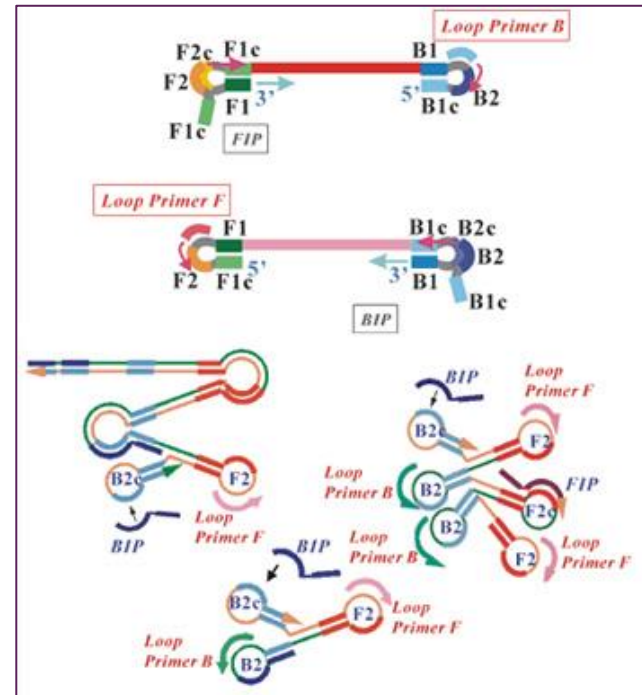
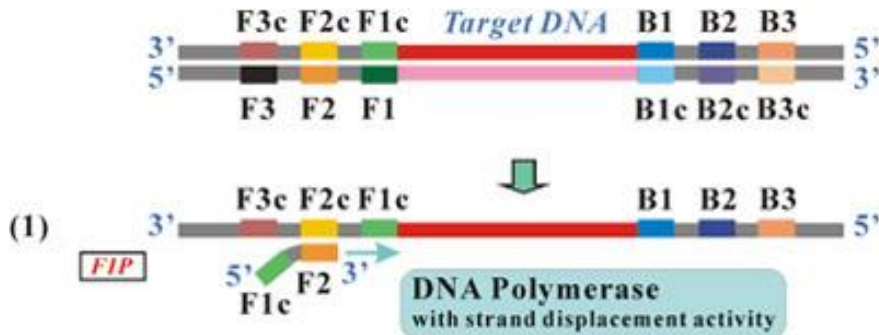


# Nuevos métodos moleculares isotérmicos

Métodos de amplificación de ácidos nucleicos que no necesitan termocicladores y usan proteínas accesorias que imitan la replicación de DNA *in vivo*

Technique	Target	Primers/ design	Enzymes	T° (°C)	Multiplex	Detection	Tolerance to contaminants	Denaturing agent	LOD (copy)
PCR	DNA/ RNA	2 Simple	1	94, 55-60, 72	Yes	Fluorescence Gel ELISA	Low	Heat	1
HDA	DNA (RNA)	2 Simple	2	37, 60-65	Yes	Fluorescence	High	Helicase	1
LAMP	DNA (RNA)	4-6 Complex	1	60-65	Yes	Fluorescence Turbidity	High	Betaine	5
NASBA	RNA (DNA)	2 Simple	2-3	65-95, 37- 42	Yes	Fluorescence	Low	RNaseH	1
RCA	DNA (RNA)	1 Simple	1	30-65	No	Fluorescence	Low	Φ29 DNA polymerase	10
SMART	DNA/ RNA	2 Complex	2-3	41	No	Fluorescence	Low	RNaseH	
SDA	DNA (RNA)	4 complex	2	37	No	Fluorescence	Low	Restriction enzymes	10

# LAMP (amplificación mediada por bucles)



## Características:

- Alta especificidad (4 to 6 cebadores)
- Rápida (15 – 60 minutos)
- Isotérmica (Bst DNA polimerasa)
- Detección visual (turbidez, fluorescencia)
- Sistema cerrado (baja contaminación)
- Robusta (métodos simples de extracción de DNA)



# LAMP ampliamente utilizada para malaria

Sensitive and

Rapid identification of *Plasmodium*-carrying mosquitoes using loop-mediated isothermal amplification

*Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 77(5), 2007

*Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 83(1), 2010, pp. 56-60  
doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0630  
Copyright © 2010 by The American Society of Tropical Medicine and Hygiene

Real-Time  
Amplification  
(RT-LAMP)

*Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 85(4), 2011, pp. 594-596  
doi:10.4269/ajtmh.2011.10-0676  
Copyright © 2011 by The American Society of Tropical Medicine and Hygiene

Application of loop-mediated isothermal amplification for malaria diagnosis during a follow-up study in Sao Tome

Short Report: Evaluation of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for Malaria Diagnosis in a Field Setting

Simple, rapid, inexpensive platform for the diagnosis of malaria by loop mediated isothermal amplification (LAMP)

Han, Wachira Suktawonjaroenpon, Sattamon Sattabongkot

Rambabu Surabattula<sup>a,b,\*</sup>, Manju Pradeep Vejandla<sup>a</sup>, Prudhvi Chand Mallepaddi<sup>a</sup>, Konrad Faulstich<sup>b</sup>, Rathnagiri Polavarapu<sup>a</sup>

Species-Specific  
Molecular Diagnosis<sup>∇</sup>

Hiroka Aonuma<sup>a</sup>, Bryce Nelson<sup>a</sup>, Hiroaka Kanaka<sup>a</sup>, Shinya Takamoto

Sattabongkot,<sup>3</sup> Benjawan Khuntirat,<sup>3</sup> Iriko,<sup>5</sup> Ling Jin,<sup>5</sup> Tsuboi<sup>1,5\*</sup>

Student Researcher: Andrew Ken Stridiron, Kapolei High School  
Mentor: Diane W. Taylor, PhD, John A. Burns School of Medicine, Honolulu, Hawaii

## En general:

- Desempeño comparable a PCR.
- Limite de deteccion entre 1 y 125 parasitos/ul.
- Volumen de muestra pequeño.

## Sin embargo:

- Sólo en laboratorios de referencia.
- Con reactivos que requieren cadena de frio.



Como adaptar LAMP a áreas remotas?



# Desarrollo de un kit Pan/Pf LAMP

## Extracción de DNA

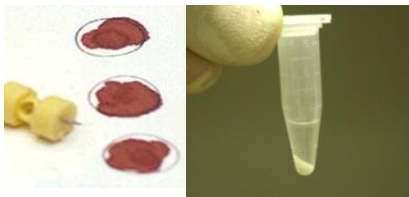
Boil&Spin – 60 ul sangre  
(~10 min)



PURE – 35 ul sangre  
(~10 min)

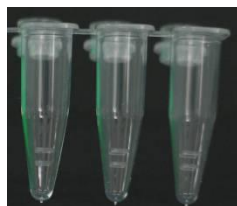


Otros



## Reactivos secos

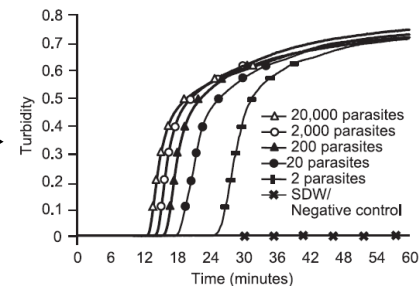
Estables a <math><30^{\circ}\text{C}</math>



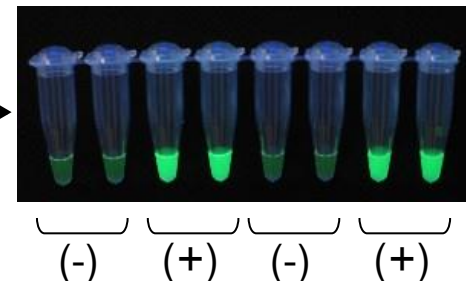
## Amplificación y detección

(65°C – 40 min)

LA-500 turbidimeter

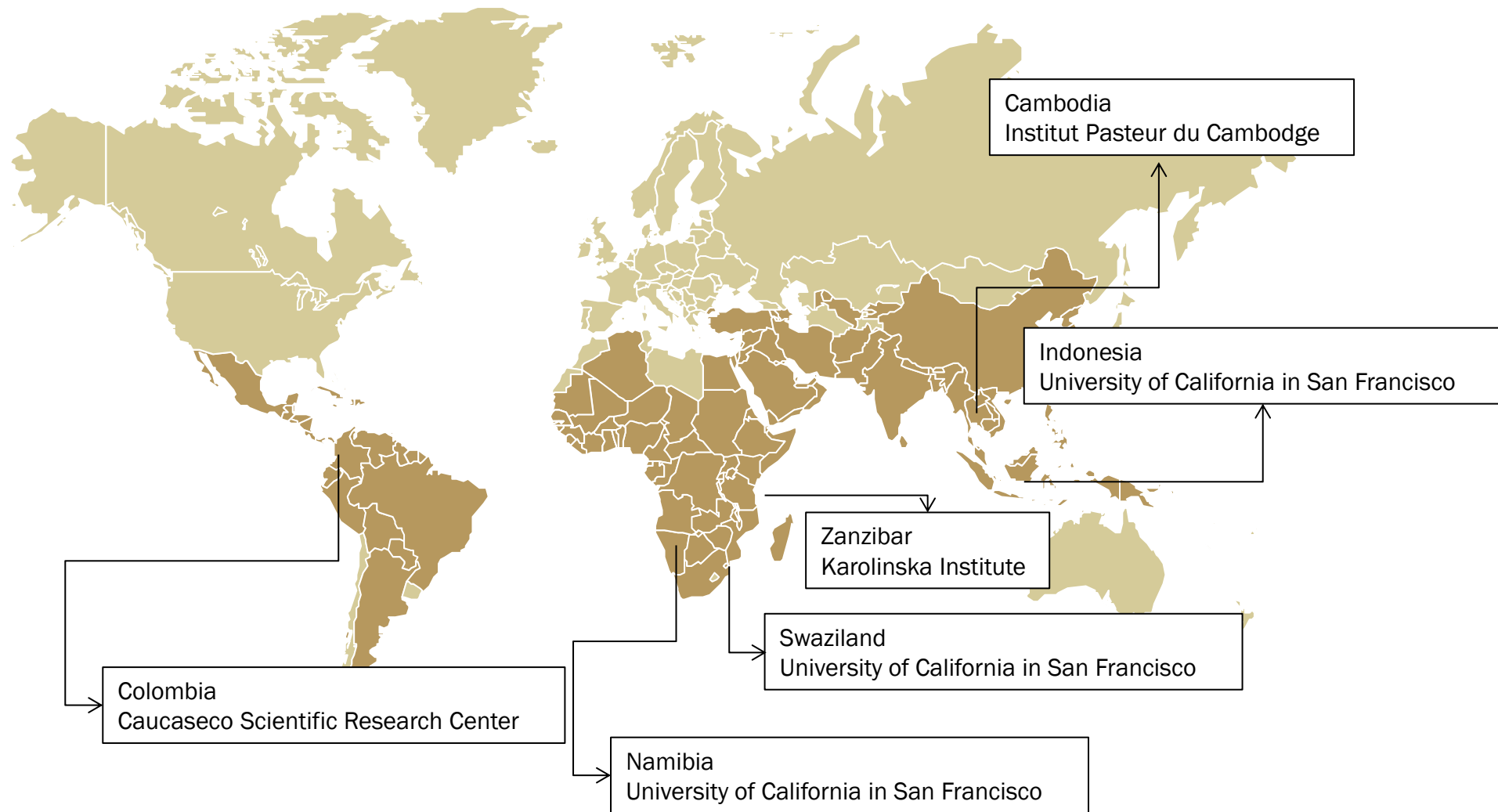


Loopamp LF-160





# Kit LAMP para la detección de asintomáticos







# Desempeño del kit LAMP para detección de infecciones asintomáticas

Pais	Tamaño de muestra	Porcentaje de positivos	Sensibilidad (%) IC95%	Especificidad
Camboya	516	19,8	93.3 90.5-95.4	86.4 76.6-92.7
Zanzíbar	996	1.8 (LAMP) 1.0% (PDR)	83.3 58.6-96.4	99.7 99.1-99.9
Colombia	980	6.6 (LAMP) 0.2 (microscopia)	90.9 80.0-97.0	99.5 98.7-99.8
Suazilandia	~7000	1.2 (LAMP) 0.5 (PDR)		





# Potenciales usos de las pruebas moleculares en eliminación de malaria

## ■ Picos de transmisión

- Tamizaje y tratamiento durante temporada de baja transmisión para reducir casos durante la temporada de alta transmisión

## ■ Áreas de baja transmisión en vía de eliminación

- Tamizaje y tratamiento focal (FSAT)
- Prevención de la re-introducción: tamizaje y tratamiento de personas procedentes de áreas de alta transmisión (ej. mineros, militares, etc.)
- Determinar la verdadera prevalencia para medir impacto (MDA)

## ■ Otros

- Tamizaje de mujeres embarazadas
- Ensayos clínicos de medicamentos y vacunas
- Estándar de referencia para otras pruebas diagnósticas



# Recomendaciones de la OMS - Pruebas moleculares en baja transmisión – Marzo 2014

1. La detección y tratamiento pasivos y activos de casos clínicos debe continuar basada en **microscopía y PDRs** de calidad asegurada.
2. Los métodos diagnósticos más sensibles se recomiendan en áreas con **prevalencia de parásitos <10%**. El uso de métodos moleculares no debe desviar los recursos destinados a prevención, control y vigilancia.
3. Los **métodos moleculares** se recomiendan para investigación epidemiológica, mapeo de infecciones sub-microscópicas, y para la identificación y eliminación de focos de transmisión.
4. Toda infección (incluyendo sub-microscópicas) deben considerarse como **potencialmente infecciosas** y capaz e contribuir a la transmisión. La detección específica de gametocitos no es necesaria como actividad de rutina.
5. Un **sistema externo de aseguramiento de la calidad** y materiales y métodos estándar deben implementarse para garantizar la comparabilidad de los diferentes métodos moleculares existentes.
6. La estandarización y validación de métodos y reactivos de **serología** es necesaria para definir su rol en evaluaciones epidemiológicas.



# Características preferidas - Pruebas moleculares en baja transmisión – Marzo 2014

## Características ideales de pruebas moleculares:

- Detección de < 2 parásitos/ul
- Volumen de muestra < 50 ul de sangre
- No requiere equipo único / equipo portátil
- Flexibilidad en suministro eléctrico
- Detección de género con especiación de positivos
- Resultados disponibles en 16 horas (máximo 24 horas)
- Procesamiento de > 48 muestras/persona/platforma/día
- Reactivos estables a 4°C por < 1 año o a T° ambiente por < 6 meses
- Transporte > 4°C
- Entrenamiento < 5 días
- Sin desechos tóxicos
- Bajo riesgo de contaminación
- Asequible
- Lectura de resultado automático
- Resultados fáciles de interpretar
- Idealmente con conexión a la red
- Especificidad > 95%



# Cual es el límite de detección requerido para parar la transmisión y tener impacto?

Transmisión a partir de casos clínicos

Paciente con síntomas y es tratado

Grupo de asintomáticos que podrían detectarse por pruebas moleculares

Individuo asintomático que no busca tratamiento

Límite de detección de microscopía y PDR

Límite de detección de pruebas moleculares (~1p/ul)

X% de infecciones por debajo de 0.02p/ul y no detectadas por PCR de alto volumen?

X% por debajo de 1p/ul ?



**Muchas gracias**