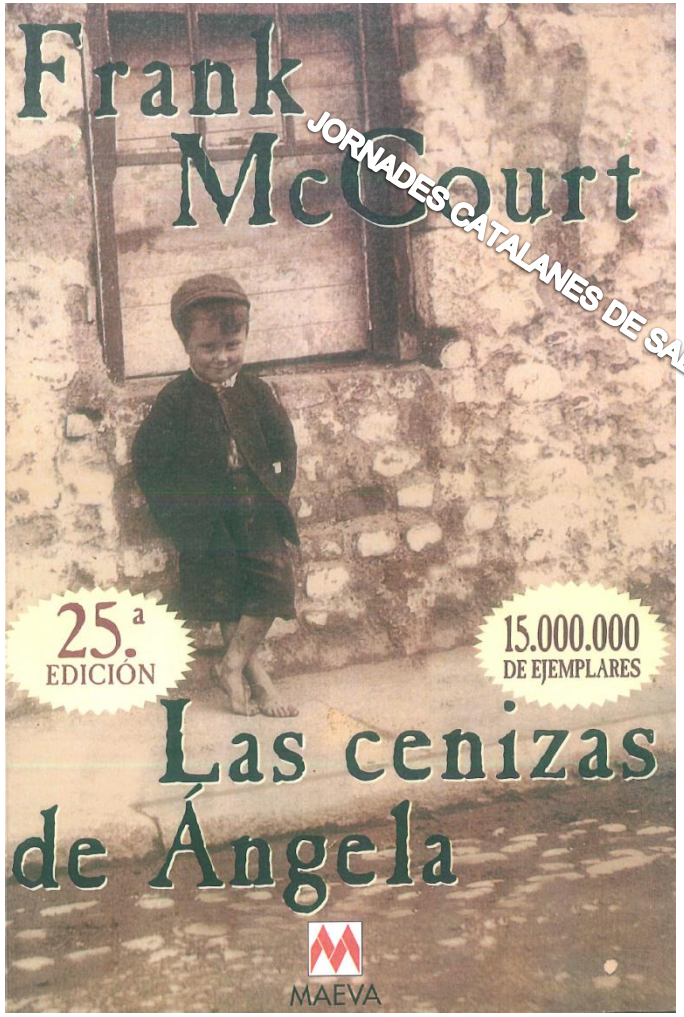
VII Jornadas Catalanas de Salud Internacional

NOVEDADES DIAGNÓSTICAS EN HELMINTIASIS

Esperanza Rodríguez
Servicio de Parasitología
Centro Nacional de Microbiología
Instituto de Salud Carlos III



JORNADES CATALANES DE SALUT INTERNACIONAL 2014 PROSICS BARCELONA

I

Mi padre y mi madre debieron haberse quedado en Nueva York, donde se conocieron, donde se casaron y donde nací yo. En vez de ello, volvieron a Irlanda cuando yo tenía cuatro años, mi hermano Malachy tres, los gemelos, Oliver y Eugene, apenas uno, y mi hermana Margaret ya estaba muerta y enterrada.

Cuando recuerdo mi infancia me pregunto cómo pude sobrevivir siquiera. Fue, naturalmente, una infancia desgraciada, se entiende: las infancias felices no merecen que les prestemos atención. La infancia desgraciada irlandesa es peor que la infancia desgraciada corriente, y la infancia desgraciada irlandesa católica es peor todavía.

VII Jornadas Catalanas de Salud Internacional

Enfermedad	Personas en riesgo	Personas Infectadas	Muertes anuales	Personas sintomas/ discapacidad
Malaria	2.200 millones	500 millones	1,5 -2,7 millones	200 -500 millones
E. de Chagas	100 millones	18 millones	45.000	3 millones
Esquistosomiasis	600 millones	200 millones	20.000	20 millones
Trematodos (alimentos)	730 millones	40 millones	10.000	Hígado/ diarrea
Parasitosis Intestinales	4.000 millones	3.500 millones	135,000 (Helm) 50.000 (Protoz)	450 millones 48 millones
Filariasis linfáticas	1.100 millones	120 millones	Alta mortalidad pacientes elefantiasis	Discapacidad crónica (44 millones)
Oncocercosis	120 millones	18 millones	Alta mortalidad en pacientes con ceguera	270.000 personas con ceguera
Leishmaniasis	350 millones	12 millones	VL: 75.000 -80.000 CL: menor nº	Frecuente en pacientes de VL pacientes de LC con múltiples lesiones
E. sueño	55 millones	300.000	20.000	300.000 personas síntomas/ discapacidad

Fuente= WHO-CTD

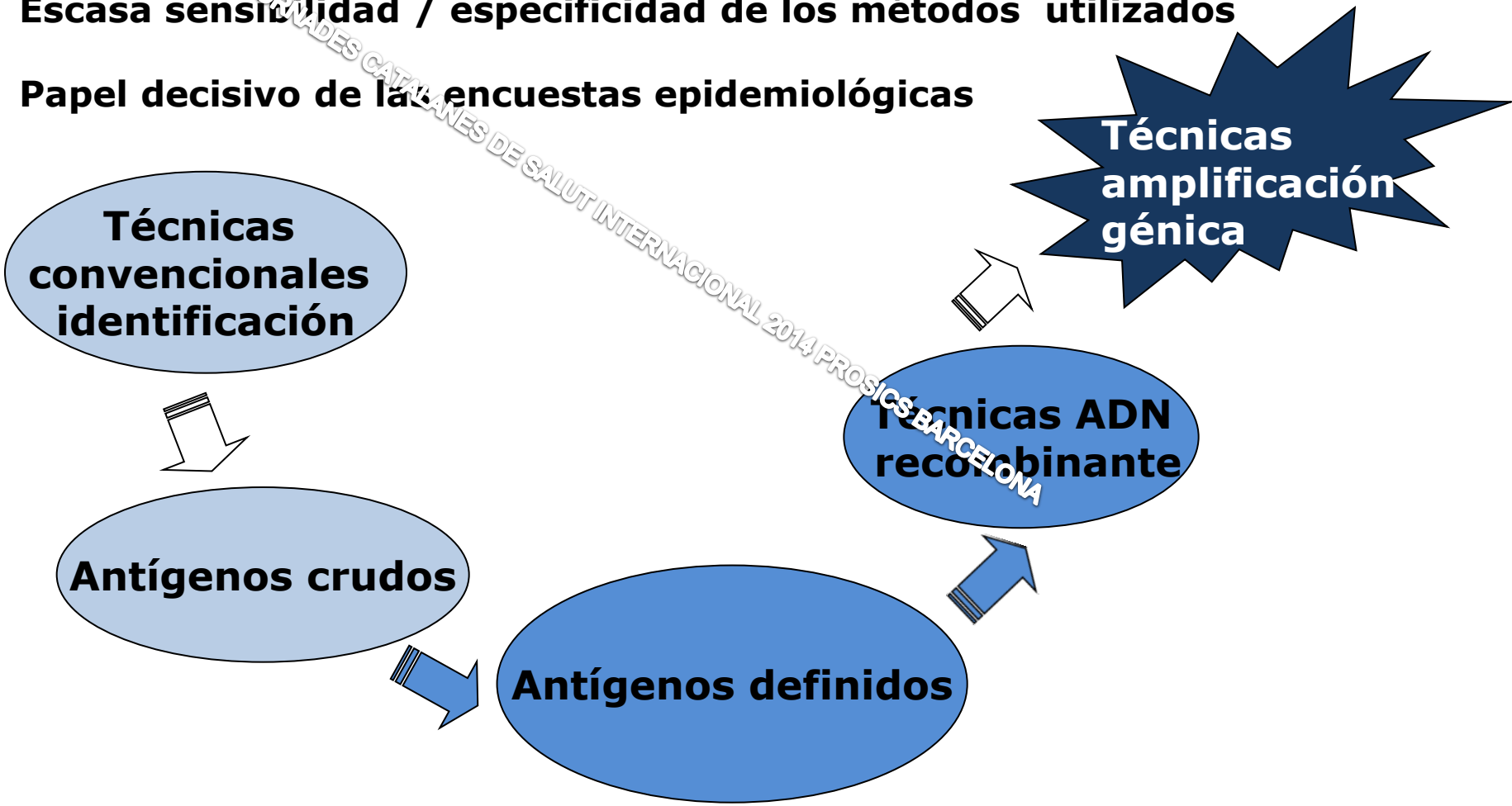
JORNADES CATALANES DE SALUT INTERNACIONAL 2014 PROSICS BARCELONA

DIAGNÓSTICO

Escasa sensibilidad / especificidad de los métodos utilizados

Papel decisivo de las encuestas epidemiológicas

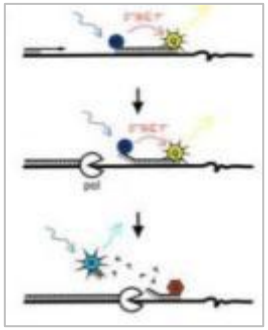
JORNADES CATALANES DE SALUT INTERNACIONAL 2014 PROSICS BARCELONA



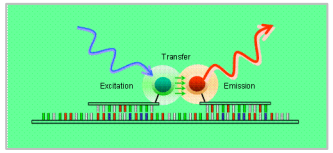
PCR a tiempo real

Incremento de la velocidad (reducción nº de ciclos, eliminación del análisis electroforético de los amplicones)
Aumento de la sensibilidad y análisis de la amplificación a tiempo real
Reproducibilidad
Menor riesgo de contaminación

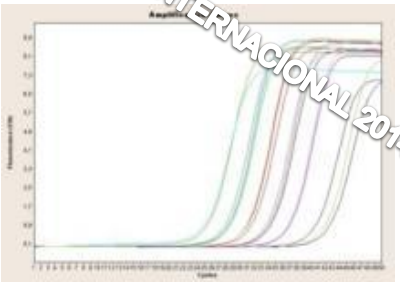
JORNADES CATALANES DE SALUT INTERNACIONAL 2014 PROSICS BARCELONA

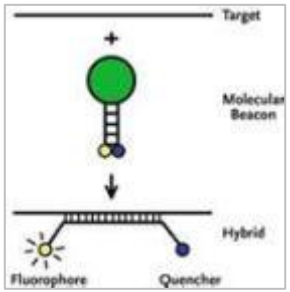


Sondas TaqMan

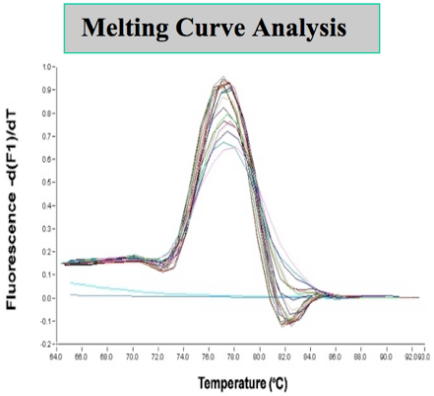


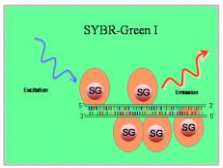
Sondas FRET





Molecular Beacons





Multiplex-PCR

Utiliza diversos sets de primers para la amplificación de múltiples templados dentro de una sola reacción

Diferentes dianas:
DNA ribosomal
ITS1-ITS2
DNA mitocondrial
Secuencias de DNA repetidas

Diferentes tipos de muestras:

Nucleic acid origins
Fa[illegible]
Animal [illegible]
Urban sludge
Microbial cultures
Solid tissues
Cerebrospinal fluid
Peripheral blood mononuclear cells
Bone marrow
Whole blood
Plasma
Serum
Swabs
Bronchoalveolar lavage
Amniotic fluid
Saliva and sputum
Faeces
Urine

MacKay IM. 2004 *Clin Microbiol Infect* 10:190-212

Am. J. Trop. Med. Hyg., 84(2), 2011, pp. 338–343
doi:10.4269/ajtmh.2011.10-0499
Copyright © 2011 by The American Society of Tropical Medicine and Hygiene

A Pentaplex Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of Four Species of Soil-Transmitted Helminths

Madihah Basuni, Jamail Muhi, Nurulhasanah Othman, Jaco J. Verweij, Maimunah Ahmad, Noorizan Miswan, Anizah Rahumatullah, Farhanah Abdul Aziz, Nurul Shazalina Zainudin, and Rahmah Noordin*

Institute for Research in Molecular Medicine, Universiti Sains Malaysia (USM), Penang, Malaysia; Sarawak Health Department, Kuching, Sarawak, Malaysia; Department of Parasitology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands

Organism
Hookworm;
1. *Necator americanus*
2. *Ancylostoma*
Ascaris lumbricoides
Strongyloides stercoralis

Variable	N	Positive frequency (%)	Negative frequency (%)	χ^2 statistic (df)	P value
Detection method used					
Microscopy	77	6 (8.0)	71 (92.0)	3.931(1)	< 0.05*
Real-time PCR		48 (62.3)	29 (37.7)		

* Chi-square test.

	PCR convencional	PCR tiempo real	Técnicas convencionales
Costo	6 ,5 $	3 $	2,6 $
Tiempo	3 h 30 min	2h	2h 30 min

VII Jornadas Catalanas de Salud Internacional

Molecular & Biochemical Parasitology 189 (2013) 33–37

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Molecular & Biochemical Parasitology

Short communication

A TaqMan-based multiplex real-time PCR assay for the simultaneous detection of *Wuchereria bancrofti* and *Brugia malayi*

N. Pilotte[a,b,*], M. Torres[a], F.R. Tomaino[a], S.J. Laney[a,1], S.A. Williams[c]

[a] Department of Biological Sciences, Smith College, Ford Hall, 100 Green Street, Northampton, MA 01063, USA
[b] Department of Natural Sciences, Math and Technology, Elms College, 291 Springfield Street, Chicopee, MA 01013, USA
[c] Molecular and Cellular Biology Program, University of Massachusetts, 637 North Pleasant Street, Amherst, MA 01003, USA

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS | NEGLECTED TROPICAL DISEASES

Diagnostic Performance of *Schistosoma* Real-Time PCR in Urine Samples from Kenyan Children Infected with *Schistosoma haematobium*: Day-to-day Variation and Follow-up after Praziquantel Treatment

Natalie V. S. Vinkeles Melchers[1], Govert J. van Dam[1], David Shaproski[1], Anthony L Kahama[2*], Eric A. T. Brienen[1], Birgitte J. Vennervald[3], Lisette van Lieshout[1*]

1 Leiden University Medical Centre, Department of Parasitology, Centre of Infectious Diseases, Leiden, The Netherlands, 2 Division of Vector Borne Diseases, Ministry of Health, Nairobi, Kenya, 3 Section for Parasitology and Aquatic Diseases, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS | NEGLECTED TROPICAL DISEASES

Evaluation of Urine CCA Assays for Detection of *Schistosoma mansoni* Infection in Western Kenya

Hillary L. Shane[1], Jennifer R. Verani[1], Bernard Abudho[2], Susan P. Montgomery[1], Anna J. Blackstock[1,3], Pauline N. M. Mwinzi[2], Sara E. Butler[1], Diana M. S. Karanja[2], W. Evan Secor[1]*

1 Division of Parasitic Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, United States of America, 2 Centre for Global Health Research, Kenya Medical Research Institute, Kisumu, Kenya, 3 Atlanta Research and Education Foundation, Decatur, Georgia, United States of America

Acta Tropica 136 (2014) 50–57

Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica

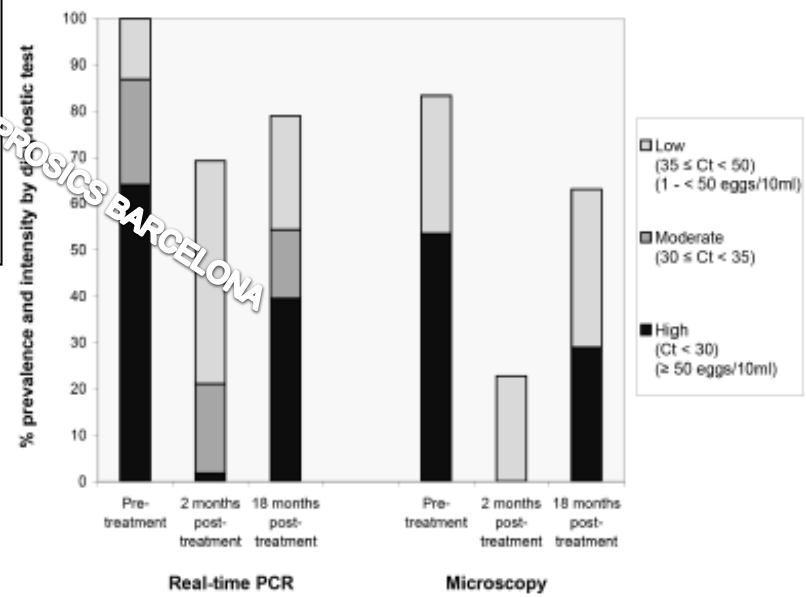
Evaluation of circulating cathodic antigen (CCA) urine-cassette assay as a survey tool for *Schistosoma mansoni* in different transmission settings within Bugiri District, Uganda

M. Adriko[a,b], C.J. Standley[c], B. Tinkitina[a,b], E.M. Tukahebwa[a], A. Fenwick[d], F.M. Fleming[d], J.C. Sousa-Figueiredo[e,f], J.R. Stothard[e], N.B. Kabatereine[b,d,*]

[a] Makerere University School of Public Health, P.O. Box 7026, Kampala, Uganda
[b] Vector Control Division, Ministry of Health, P.O. Box 1661, Plot 15 Bombo Road, Kampala, Uganda
[c] Ecology & Evolutionary Biology, Princeton University, Princeton, NJ 08544, USA
[d] Schistosomiasis Control Initiative, Department of Infectious Disease Epidemiology, Imperial College London, St Mary's Campus, Norfolk Place, London W2 1PG, UK
[e] Parasitology Department, Liverpool School of Tropical Medicine, Liverpool L3 5QA, UK
[f] Department of Infectious and Tropical Diseases, London School of Hygiene and Tropical Medicine, Keppel Street, London WC1E 6HT, UK

CAA/Kato Katz

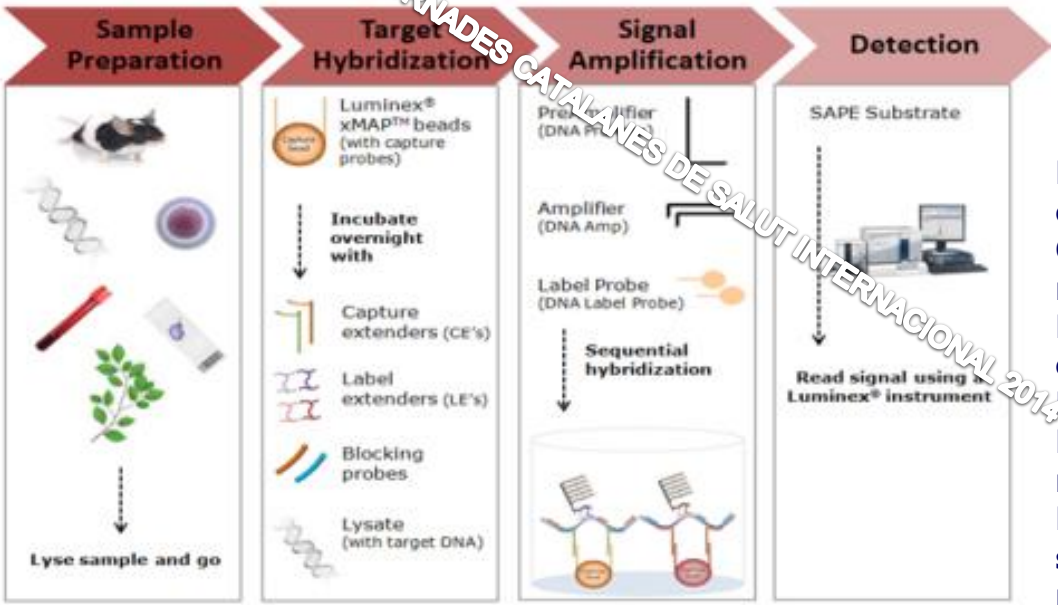
S: 94%/ 74%
E: 60%



Sensibilidad 92% PCR / 74% microscopía a los 18 m post-tto

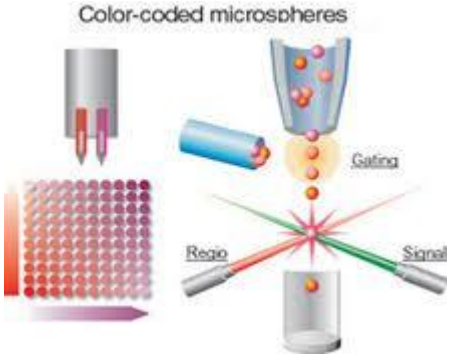
JORNADES CATALANES DE SALUT INTERNACIONAL 2014 PROSICS BARCELONA

PCR a tiempo real- Sistema Luminex ®de detección



JORNADES CATALANES DE SALUT INTERNACIONAL 2014 PROSICS BARCELONA

Microesfereas de poliestireno marcadas con dos fluoróforos.
Clasificadas de acuerdo al ratio de su marcaje interno.
Las sondas se unen a las microesferas por enlaces covalentes
Los primers marcados con biotina
Los productos de PCR se hibridan a las microesferas
Detección de los amplicones utilizando la streptavidina PE como molécula reportadora



1er laser detecta el tipo de bola con la sonda correspondiente
2º laser detecta el amplicon Biotina-Streptavidina PE
Los resultados se dan en MIF (intensidad media de fluorescencia)

PCR a tiempo real- Sistema Luminex ® de detección

Am. J. Trop. Med. Hyg., 84(2), 2011, pp. 332–337
doi:10.4269/ajtmh.2011.10-0461
Copyright © 2011 by The American Society of Tropical Medicine and Hygiene

High Throughput Multiplex PCR and Probe-based Detection with Luminex Beads for Seven Intestinal Parasites

Mami Taniuchi,* Jaco J. Verweij, Zannatun Noor, Shihab U. Sobuz, Lisette van Lieshout, William A. Petri Jr., Rashidul Haque, and Eric R. Houpt

Division of Infectious Diseases and International Health, University of Virginia, Charlottesville, Virginia; Departments of Parasitology and Medical Microbiology (Clinical Microbiology Laboratory), Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands; Parasitology Lab, International Centre for Diarrhoeal Diseases and Research, Dhaka, Bangladesh

JORNADES CATALANES DE SALUT INTERNACIONAL 2014 PROSICS BARCELONA

Organism	Target
Cryptosporidium spp.	COWP
Entamoeba histolytica	18S rRNA
Giardia lamblia	18S rRNA
Ascaris lumbricoides	ITS1
Ancylostoma duodenale	ITS2
Necator americanus	ITS2
Strongyloides stercoralis	18S rRNA
Extraction control (phocine herpes virus)	Glycoprotein B

*Biotinylated primer in the PCR-Luminex assay.

Sensibilidad del 83 % y 100 % de especificidad
(multiplex real time PCR *versus* multiplex PCR-Luminex)

Gold stantard PCR a tiempo real y utilizando como cut-off:

cMIF: ≥2,5 para *Ascaris*, *Ancylostoma*, *Necator* y *Giardia*
cMIF: 7,3 para *Cryptosporidium*
cMIF: 9 para *Strongyloides* y *Entamoeba*

MÉTODOS DE AMPLIFICACIÓN EN CONDICONES ISOTÉRMICAS

Rev. Med. Virol. 2008; **18**: 407–421.
Published online 20 August 2008 in Wiley InterScience
(www.interscience.wiley.com).
DOI: 10.1002/rmv.593

Reviews in Medical Virology

REVIEW

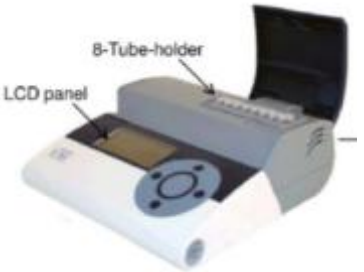
Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases

Manmohan Parida[1]*, Santhosh Sannarangaiah[1], Paban Kumar Dash[1], P. V. L. Rao[1] and Kouichi Morita[2]

[1]*Division of Virology, Defence Research & Development Establishment, Gwalior 474002, MP, India*
[2]*Department of Virology, Institute of Tropical Medicine and Hygiene, Nagasaki University, Nagasaki, Japan*

JORNADES CATALANES DE SALUT INTERNACIONAL 2014 PROSICS BARCELONA

- **Utiliza una polimerasa con desplazamiento de hebra : *Bst* (*Bacillus stearothermophilus*)**
- **Set de 6 primers : 2 externos, 2 internos y 2 loop-primers que reconocen 8 regiones de la secuencia diana**
- **El proceso de amplificación consta de una Fase Inicial y una Fase de Amplificación y Elongación**
- **La temperatura óptima para el LAMP es 63º C**
- **Tiempo de reacción de 30-60 min. Hasta 10^9 copias.**



Nkouawa A *et al.* 2009. *J Clin Microbio*l 47: 168-174
Nkouawa A *et al.* 2010. *J Clin Microbio*l 48: 3350-3352
Nkouawa A *et al.* 2012. Parasitol Int 61: 723-725
Sako Y & Nkouawa A. *et al*. 2013. M.Mol. Biol, 1039: 109-120

cox1: 5 huevos / gramo de heces
clp : 10 huevos / gramo de heces

T. solium, T. saginata, T. asiatica

88, 4 % SENSIBILIDAD FRENTE A multiplex-PCR

OPEN ACCESS Freely available online — PLOS | ONE

2014

Development of a Highly Sensitive Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Method for the Detection of *Loa loa*

Pedro Fernández-Soto[1]*, Prosper Obolo Mvoulouga[1], Jean Paul Akue[2], Julio López Abán[1], Belén Vicente Santiago[1], Miguel Cordero Sánchez[3], Antonio Muro[1]

1 IBSAL-CIETUS (Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca-Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca), Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain, 2 Deparment of Medical Parasitology, Centre International de Recherches Medicales de Franceville (CIRMF), Franceville, Gabon, 3 Department of Infectious Diseases, Service of Internal Medicine, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain

Sensibilidad analítica= 0,5 ag

1 ag = 0,000 000 000 000 000 001 g (un trillonésimo de gramo) = 10^{-18} g

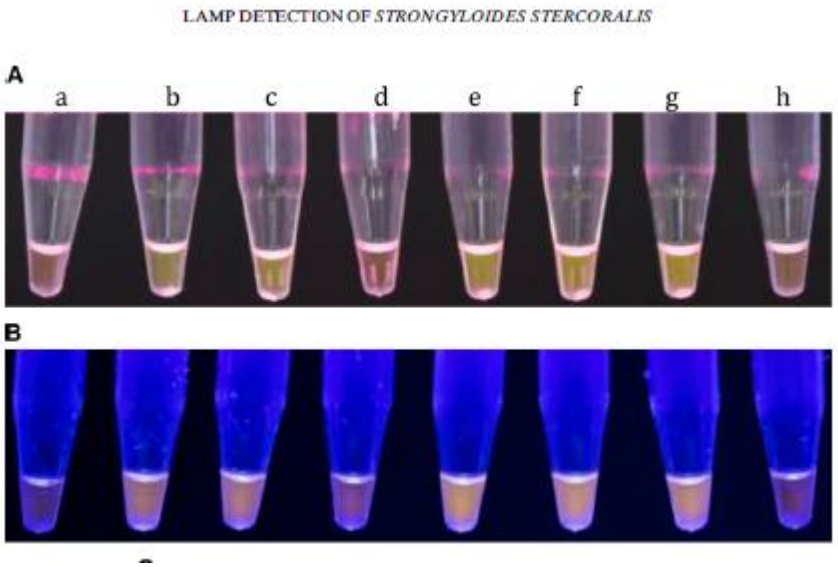
Am. J. Trop. Med. Hyg., 90(2), 2014, pp. 306–311
doi:10.4269/ajtmh.13-0583
Copyright © 2014 by The American Society of Tropical Medicine and Hygiene

A Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for *Strongyloides stercoralis* in Stool That Uses a Visual Detection Method with SYTO-82 Fluorescent Dye

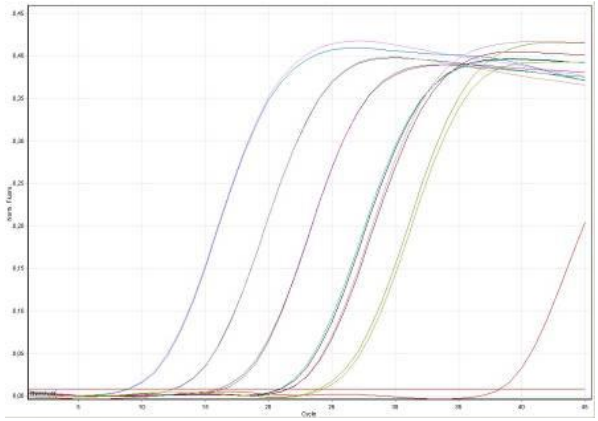
Matthew R. Watts,* Gregory James, Yasmin Sultana, Andrew N. Ginn, Alexander C. Outhred, Fanrong Kong, Jaco J. Verweij, Jonathan R. Iredell, Sharon C-A. Chen, and Rogan Lee

Centre for Infectious Diseases and Microbiology Public Health; Pathology West - Institute of Clinical Pathology and Medical Research, Westmead Hospital, New South Wales, Australia; Marie Bashir Institute for Infectious Diseases and Biosecurity and Centre for Research Excellence in Critical Infection, University of Sydney, New South Wales, Australia; Department of Zoology, University of Dhaka, Dhaka, Bangladesh; Department of Parasitology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands

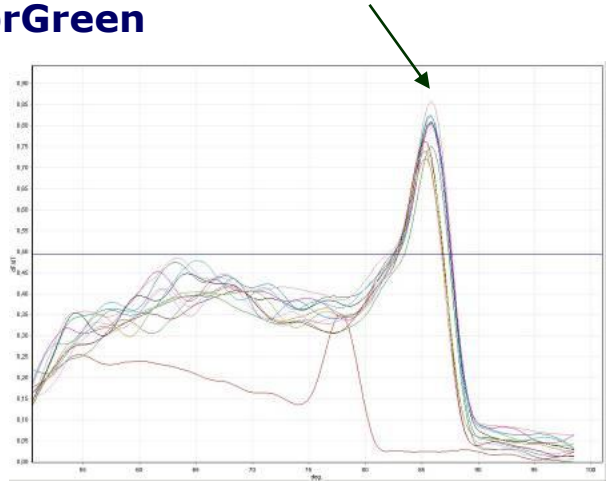
Diana: DNA ribosomal de la subunidad 28S.
Detección: Fluoróforo SYTO-82. Visual y real-time
Sensibilidad analítica: dilución 1/100 DNA de 1 larva
Especificidad: no amplificación de DNA de parásitos, hongos y bacterias



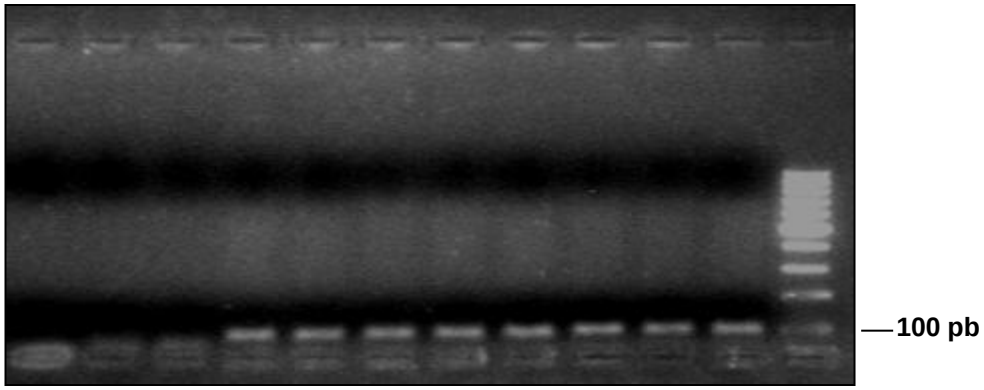
PCR a tiempo real



SybrGreen

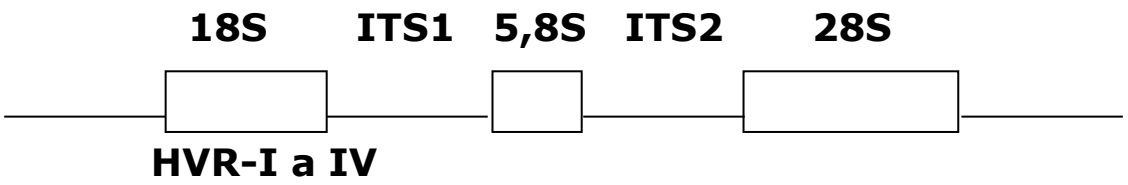


Melting



PCR: Sensibilidad analítica 0,1 pg

Especificidad analítica: *Giardia duodenalis*, *Entamoeba histolytica*, *E. dispar*, *Cryptosporidium parvum*, *Trichinella spiralis*, *Anisakis simplex* ,*Taenia saginata* ,*Trichuris trichura*, *Schistosoma mansoni*, *Ascaris lumbricoides*, *Wuchereria bancrofti*, *Loa loa*, uncinarias.



VALIDACIÓN

Muestras clínicas de pacientes

-Hospital Severo Ochoa (Madrid)
-Hospital Gregorio Marañón (Madrid)

Proyecto Investigación ISCIII

Red de Investigación Cooperativa en Enfermedades Tropicales (RICET)

JORNADES CATALANES DE SALUT INTERNACIONAL 2014 PROSICS BARCELONA

	PCR *vs* OM	PCR *vs* CA	PCR *vs* HM	PCR *vs* CTP
Sensibilidad (%)	100,00	92,31	100,00	93,75
Especificitdad (%)	83,86	85,32	82,74	86,51
Prevalencia (%)	3,46	5,63	2,16	6,93
VPP (%)	18,17	27,28	11,34	34,10
VNP (%)	100,00	99,47	100,00	99,46

OM:Observación microscópica
HM: Harada Mori
CA: Cultivo en agar

1)- El diagnóstico por técnicas moleculares es suficientemente bueno?

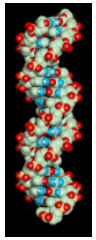
Nematodes		
A. lumbricoides	ITS	(Pecson BM *et al*. 2006; Wiria *et al*. 2010; Basuni *et al*. 2011; Hamid *et al*. 2011; Arndt *et al*. 2013; Mejia *et al*. 2013; Wiria *et al*. 2013)
Hookworm	ITS	(Verweij *et al*. 2007*a*; Basuni *et al*. 2011; Hamid *et al*. 2011; Jonker *et al*. 2012; Arndt *et al*. 2013; Mejia *et al*. 2013; Schar *et al*. 2013; Wiria *et al*. 2013)
S. stercoralis	SSU rDNA	(ten Hove *et al*. 2009; Basuni *et al*. 2011; Kramme *et al*. 2011; Mejia *et al*. 2013; Schar *et al*. 2013; Sultana *et al*. 2013)
T. trichiura	SSU rDNA, ITS-1	(Liu *et al*. 2013; Mejia *et al*. 2013)
Trematodes		
C. sinensis	ITS-1,ITS-2, NAD-2	(Kim *et al*. 2009; Cai XQ *et al*. 2012; Sanpool O *et al*. 2012)
O. viverrini	*O. viverrini* specific repetitive DNA fragment, NAD-2	(Suksumek *et al*. 2008; Intapan *et al*. 2009; Sanpool O *et al*. 2012)
Paragonimus	ITS-2	(Tan[illegible]atpan *et al*. 2013)
Schistosoma	SSU rDNA, ITS-2,NADH-1, Cox1, *S. mansoni* tandem repeat	(Gomes [illegible] 2006; Obeng *et al*. 2008; ten Hove *et al*. 2008; Kjetland *et al*. 2009; Wichmann *et al*. 2009; Clerinx *et al*. 2011; [illegible]ps *et al*. 2012; Arndt *et al*. 2013; Aryeetey YA *et al*. 2013; Downs JA *et al*. 2013; Wichmann *et al*. 2013)
Cestodes		
T. solium	Tsol9 repeat sequence, ITS-1	(Yera *et al*. 2011; Praet [illegible] *al*. 2013)
T. saginata	ITS-1	(Praet *et al*. 2013)

JORNADES CATALANES DE SALUT INTERNACIONAL 2014 PROSICS BARCELONA

2)- Las técnicas moleculares son tan buenas como para ser verdad?

Estamos ante falsos positivos?. Al comparar nuevas técnicas con "gold standard" es difícil definir claramente verdadero positivo y verdadero negativo. La baja especificidad de las técnicas moleculares al compararlas con las convencionales es debido a la baja sensibilidad de estas últimas.

3)- Futuras direcciones



Plataformas de automatización
Detección simultanea de patógenos
Secuenciación masiva

VII Jornadas Catalanas de Salud Internacional

JORNADES CATALANES DE SALUT INTERNACIONAL 2014 PROSICS BARCELONA

MUCHAS GRACIAS POR LA ATENCIÓN