

# Diagnóstico molecular de la Malaria

Carlos Toro Rueda

I Curso de Teórico-Práctico de Actualización en Malaria

Febrero 2010

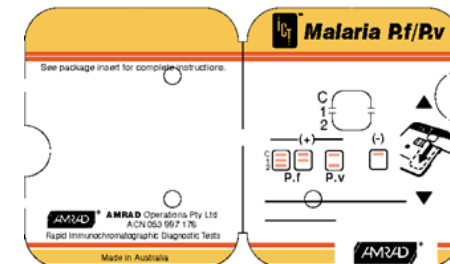
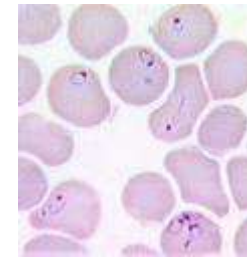
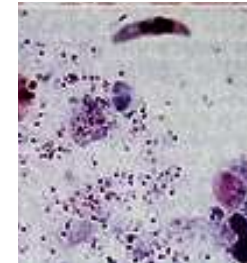
# Problemas de la microscopía

- Alta especialización del observador
- Bajas parasitemias indetectables
- Difícil diagnóstico de especie
- Diagnóstico de infecciones mixtas

Necesidad de nuevas técnicas diagnósticas más sensibles y específicas

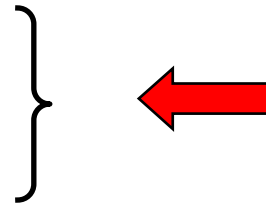
# Sensibilidad métodos diagnóstico malaria

- Gota gruesa: 5-100 parásitos/ $\mu$ L
- Extensión fina: 50-100 parásitos/ $\mu$ L
- Pruebas rápidas: <100 parásitos/ $\mu$ L
- **PCR: 0,04-20 parásitos/ $\mu$ L**



# Rendimiento PCR Malaria: Factores

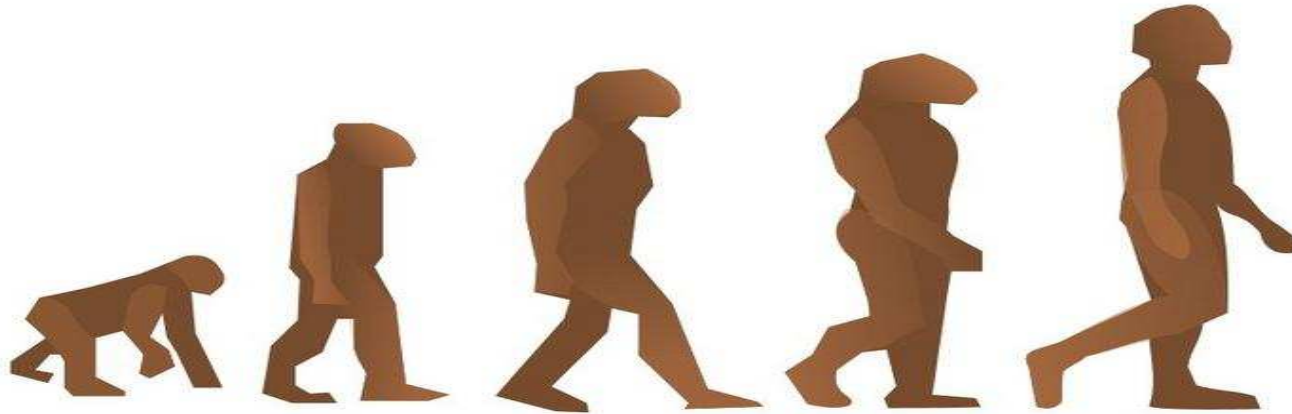
- Muestra
- Método de extracción
- Diana a amplificar
- Tipo de PCR



# Diana PCR Malaria

- ADN altamente repetido:  
*stevior*, ADN satélite
- **ADN medianamente repetido:**  
**ADN ribosómico (18S rRNA)**
- ADN de copia única:  
Genes específicos (msa-2)

# Evolución técnicas de diagnóstico molecular



RFLP  
PCR Simplex



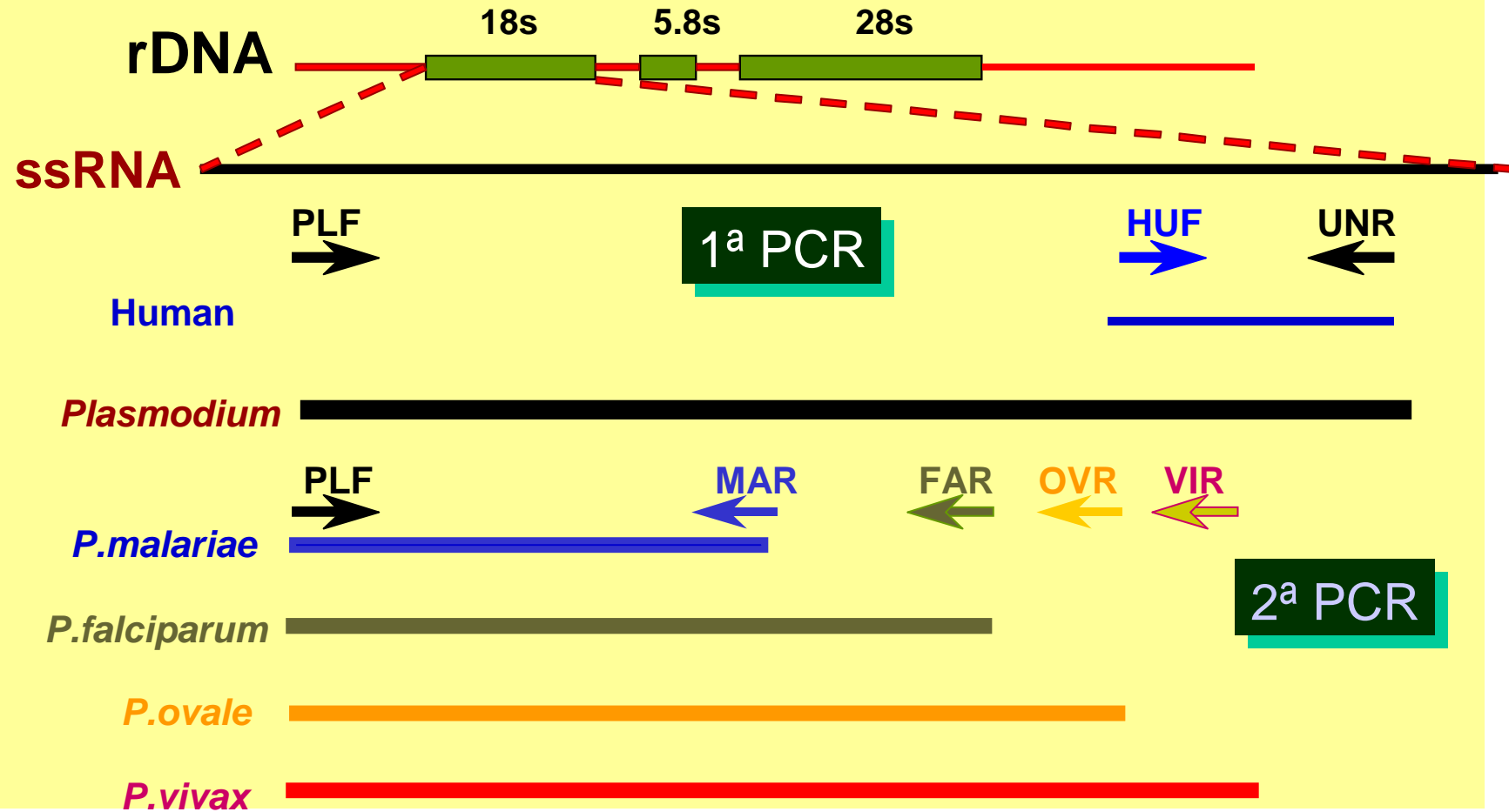
PCR Simplex sonda  
PCR ELISA  
Multiplex-PCR  
Nested-PCR



Real-time PCR



# Semi Nested Multiplex Malaria PCR

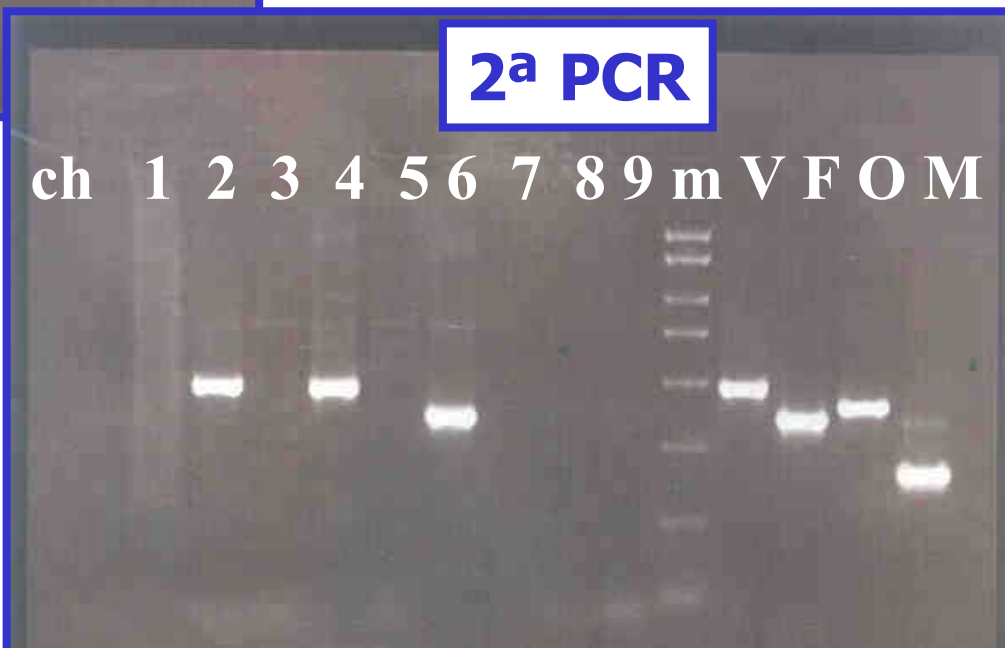


## 1ª PCR



**780-820pb** fragmento de  
*Plamodium* sp  
**231pb** el fragmento  
humano

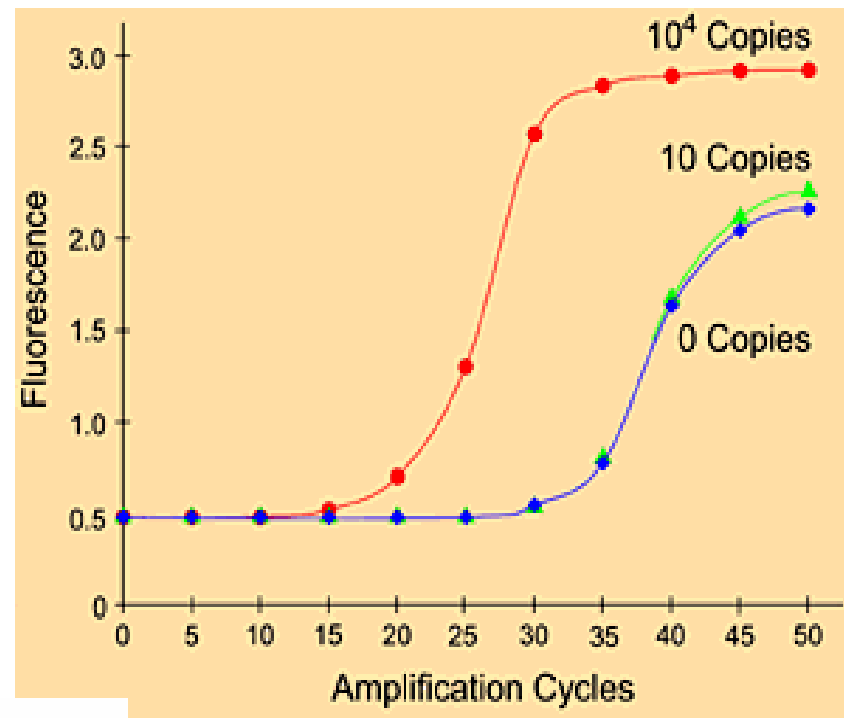
## 2ª PCR



**V: 500pb; F: 390-400pb; O: 450pb; M: 250pb**

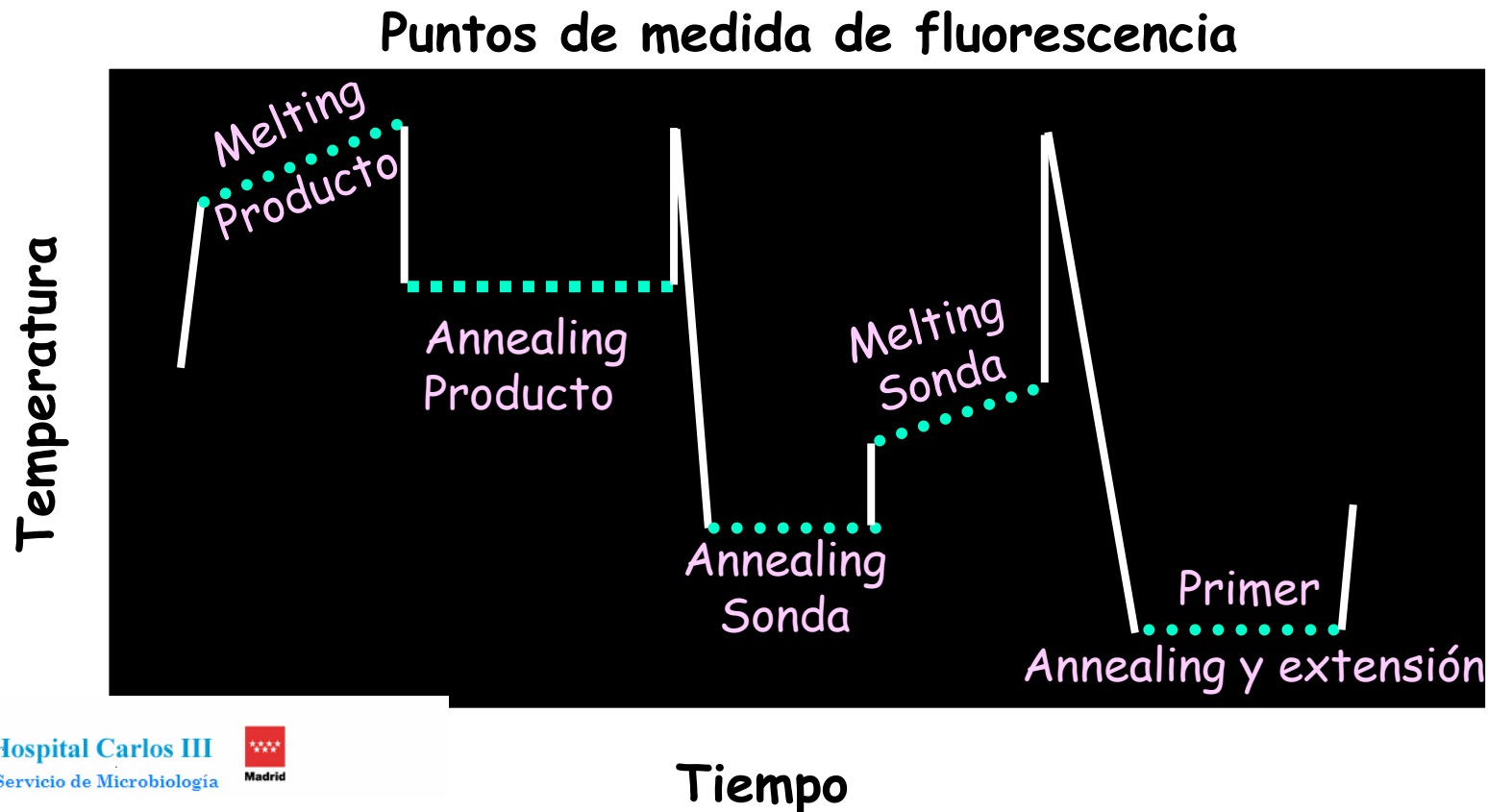
# PCR a Tiempo Real

- Amplificación y detección simultánea mismo vial (cerrado)
- Medir la amplificación en cada momento



**Método:** (amplificación y detección al mismo tiempo)

- PCR en capilares o placa
- Control de temperatura por aire o convencional
- Detección por fluorescencia



# Ventajas PCR a Tiempo Real vs PCR convencional

- Mayor rapidez
- Riesgo de contaminación muy disminuido
- Cuantificación del producto amplificado
- Determinación de mutaciones puntuales

# PCR a Tiempo Real: Tipos

## 1. Marcaje inespecífico

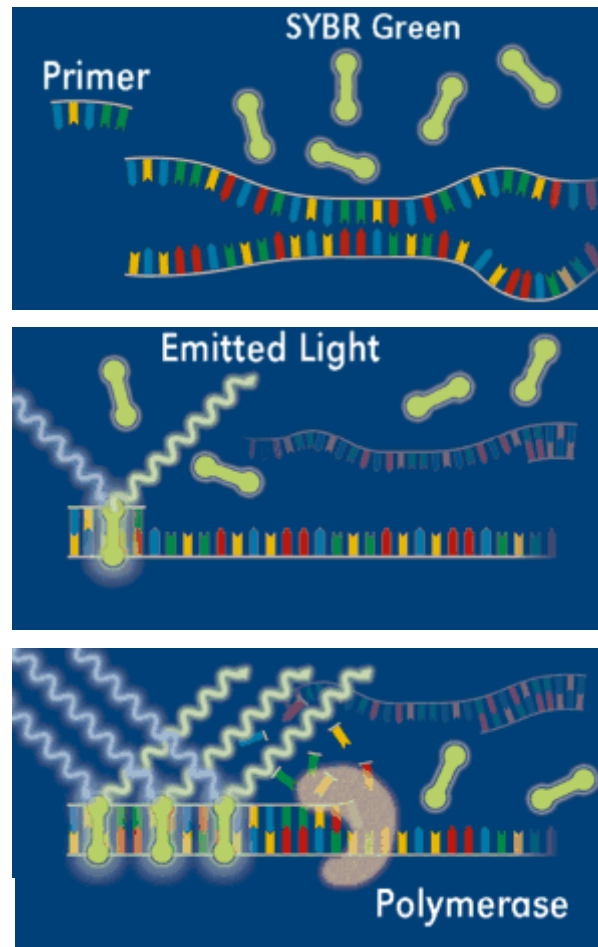
Agentes intercalantes que se unen al ADN de doble cadena

El más empleado: SYBR Green I

## 2. Marcaje específico

Sondas específicas de 3 tipos (Taqman, *molecular beacons*, FRET)

# PCR a Tiempo Real: Marcaje inespecífico



# PCR a Tiempo Real: Marcaje inespecífico

## •Ventajas

Barato

Fácil de optimizar

## •Inconvenientes

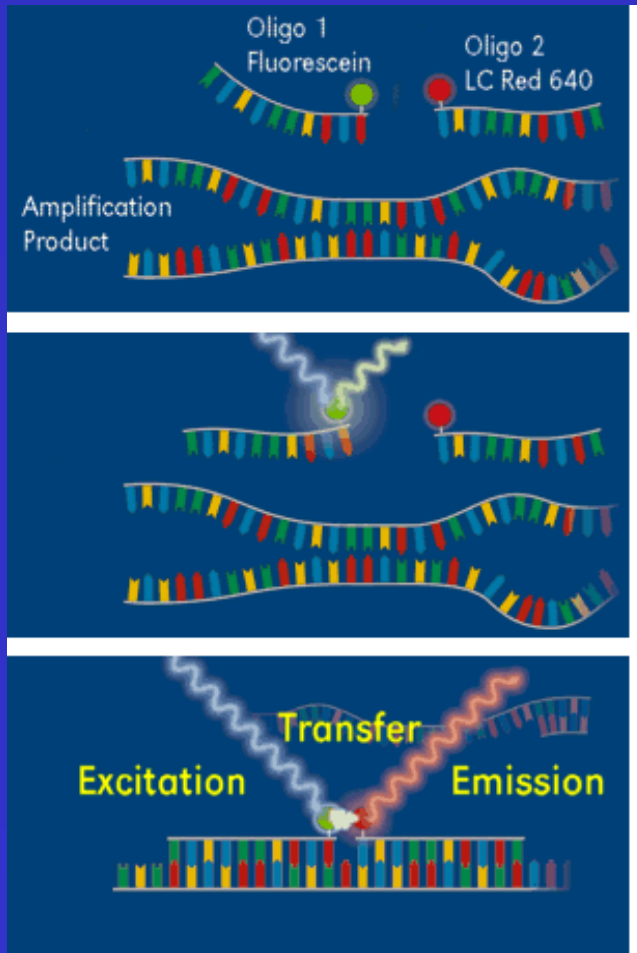
Baja especificidad (unión a productos inespecíficos, dímeros de cebadores)

Para incrementar la especificidad: emplear polimerasas *hot-start* y determinar  $T_m$

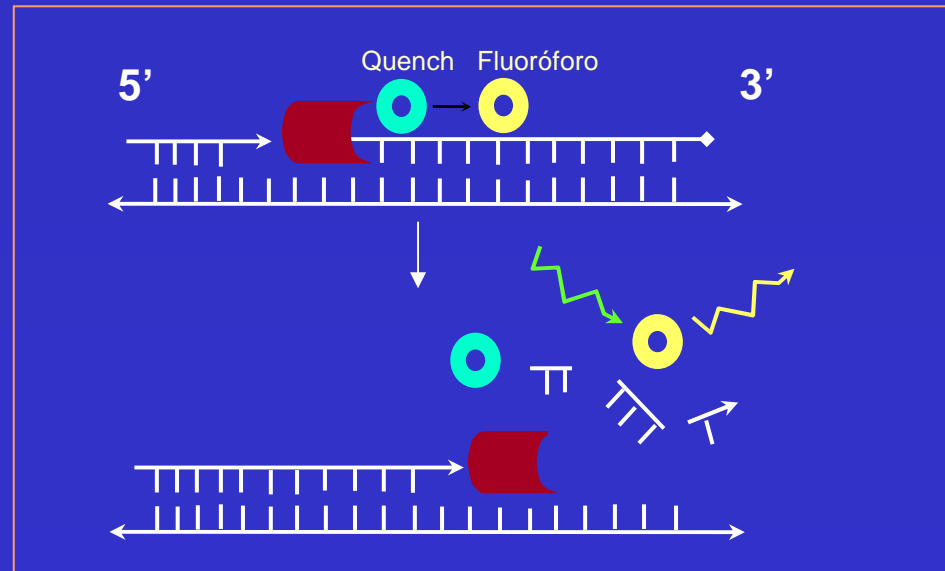
# PCR a Tiempo Real

## Marcaje específico con sondas

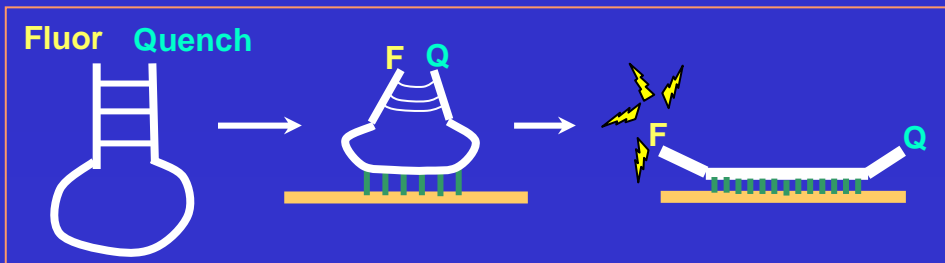
### FRET



### TaqMan



### Molecular Beacons



# PCR a Tiempo Real: Marcaje específico con sondas

- **Ventajas**

  - Específico

  - Identifica polimorfismos y mutaciones puntuales

- **Inconvenientes**

  - Mayor coste económico

# Equipos para PCR a Tiempo Real

Instrumento	Fabricante	Sistema térmico	Tiempo de reacción	Capacidad
Serie GeneAmp Serie AbiPrism	Applied Biosystems	Convencional	2 h	96
ICycler iQ	BioRad	Convencional	2 h	96-384
LightCycler	Roche Diagnostics	Aire	20-60 min	32
SmartCycler	Cepheid	Placa cerámica	40-60 min	16-96
MX4000	Stratagene	Convencional	90 min	96
Rotor Gene	Corbett Research	Aire	50 min	32

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

# PCR Malaria

Referencia	Tipo PCR	Detección señal	Especies detectadas	Diana	Sensibilidad Pf (parásitos/uL)
Arai 1994	Nested	BrEt (gel)	<i>Pf</i>	DHFR	1,3
Ciceron 1999	Simplex	Sonda (southern blot)	Genus, <i>Pf</i> , <i>Pv</i>	18S rRNA	3
Than 1999	Simplex	Sonda (gel)	Genus, <i>Pf</i> , <i>Po</i> , <i>Pv</i>	Cox1/Plastid	0,01
Fabre 2002	Tiempo real Simplex & Multiplex	Syber green	Genus, <i>Pm</i>	Cox1/Plastid	0,035
Myjak 2002	Nested	BrEt (gel)	4	18S rRNA	0,38
Rubio 2002	Nested & Mutiplex	BrEt (gel)	4	18S rRNA	0,01
Kho 2003	Multiplex	BrEt (gel)	<i>Pf</i> , <i>Pv</i>	18S rRNA	0,1
Calderaro 2004	Nested	Sonda (ELISA)	4	18S rRNA	0,07
Whiley 2004	Simplex	Sonda (ELISA)	4	18S rRNA	1,4
Mangold 2005	Tiempo real Simplex	Syber green	4	18S rRNA	1
Elayed 2006	Tiempo real Simplex	Probe (molecular beacon)	<i>Pf</i>	Cox1/Plastid	0,004
Gama 2007	Tiempo real Simplex	Sonda (Taqman)	<i>Pf</i>	18S rRNA	0,5
Safeuki 2008	Tiempo real Multiplex	Sonda (FRET)	Genus, 4	Cox1/rRNA	0,01

# PCR tiempo real paludismo: cribado y específica

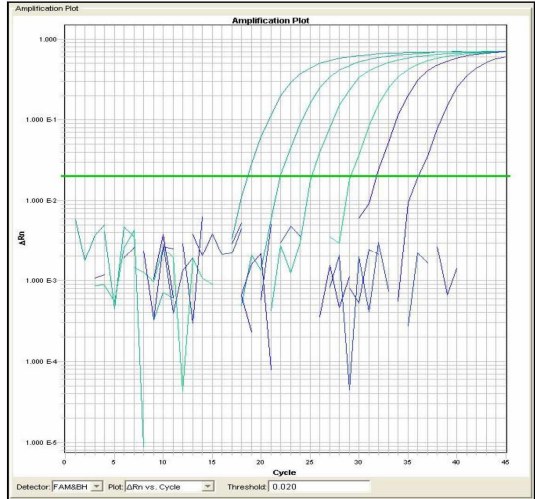
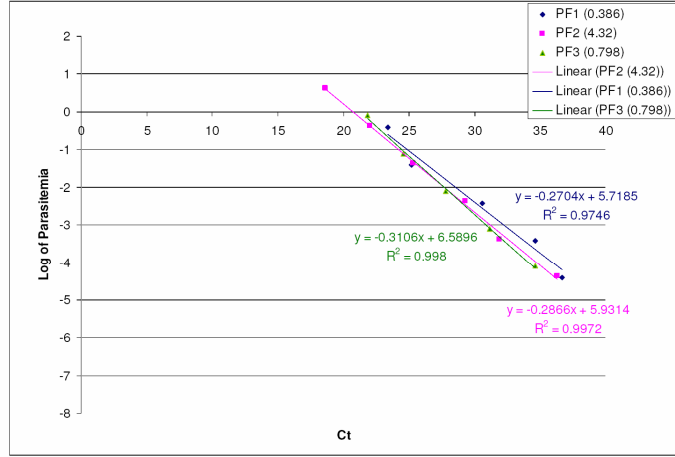
	Forward Primer (Plasmol)	Screening Probe (Plasprobe)
<i>P. falciparum</i> (M19172)	GTTAAGGGAGTGAAGACGATCAGATACCGTCGTAATCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGTGTTGGATGAAAGTGTTAAA	.....CT.....AT..T..
<i>P. vivax</i> (X13926)	.....	.....T.....AT..TT.
<i>P. ovale</i> (L48987)	.....	.....T..A..A...
<i>P. malariae</i> (AF488000)	.....	.....

	Species-Specific Probes	Reverse Primer (Plasmol2)
<i>P. falciparum</i> (M19172)	AATAAAAG-----TCATCTTTC-GAG-GTGACTTTTAGATTGCTTCCTTCAGTACCTTATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTT	.....
<i>P. vivax</i> (X13926)	.....G.A--TTT...-.....G...-T.T.T.C.....G.....	.....
<i>P. ovale</i> (L48987)	.....G.A--AAT...-.....G.G.-AAATT.C.....	.....
<i>P. malariae</i> (AF488000)	.....AGACAT....A.A.AT...T..TT.....A.....	.....

Alineamiento parcial de 18S rRNA

*Rougemont et al. JCM 2004*



# Detección de resistencias

**The Journal of Infectious Diseases** 2010;201:153–159

MAJOR ARTICLE

**Susceptibility of *Plasmodium falciparum* Isolates to Doxycycline Is Associated with *pftetQ* Sequence Polymorphisms and *pftetQ* and *pfmdt* Copy Numbers**

Sébastien Briolant,<sup>1,2</sup>  
Nathalie Wurtz,<sup>3</sup>  
Agnès Zettor,<sup>1,2</sup>  
Christophe Rogier,<sup>1,2</sup> and  
Bruno Pradines<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup>Unité de Recherche en Biologie et Epidémiologie Parasitaires, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Antenne de Marseille, Institut de Médecine Tropicale du Service de Santé des Armées, Allée du médecin colonel Eugène Jamot, <sup>2</sup>Unité de Recherche en Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes, Unité Mixte de Recherche 6236, <sup>3</sup>Unité de Recherche en Physiologie et Pharmacologie Parasitaires, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Antenne de Marseille, Institut de Médecine Tropicale du Service de Santé des Armées, Allée du médecin colonel Eugène Jamot, and <sup>4</sup>Centre National de Référence du Paludisme, Marseille, France

## Malaria Journal

 BioMed Central

Research

Open Access

***Pfmdr1* copy number and artemisinin derivatives combination therapy failure in falciparum malaria in Cambodia**

Pharath Lim\*<sup>1</sup>, Alisa P Alker<sup>2</sup>, Nimol Khim<sup>1</sup>, Naman K Shah<sup>2</sup>,  
Sandra Incardona<sup>1</sup>, Socheat Doung<sup>3</sup>, Poravuth Yi<sup>3</sup>, Denis Mey Bouth<sup>4</sup>,  
Christiane Bouchier<sup>5</sup>, Odile Mercereau Puijalon<sup>6</sup>, Steven R Meshnick<sup>2</sup>,  
Chansuda Wongsrichanalai<sup>7</sup>, Thierry Fandeur<sup>6</sup>, Jacques Le Bras<sup>8</sup>,  
Pascal Ringwald<sup>9</sup> and Frédéric Arieu<sup>1</sup>

Published: 12 January 2009

Received: 20 October 2008

*Malaria Journal* 2009, **8**:111 doi:10.1186/1475-2875-8-111

Accepted: 12 January 2009

# Cribado mediante PCR a tiempo real: sistema de “pooles”

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Feb. 2010, p. 512–519  
0095-1137/10/\$12.00 doi:10.1128/JCM.01800-09  
Copyright © 2010, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 48, No. 2

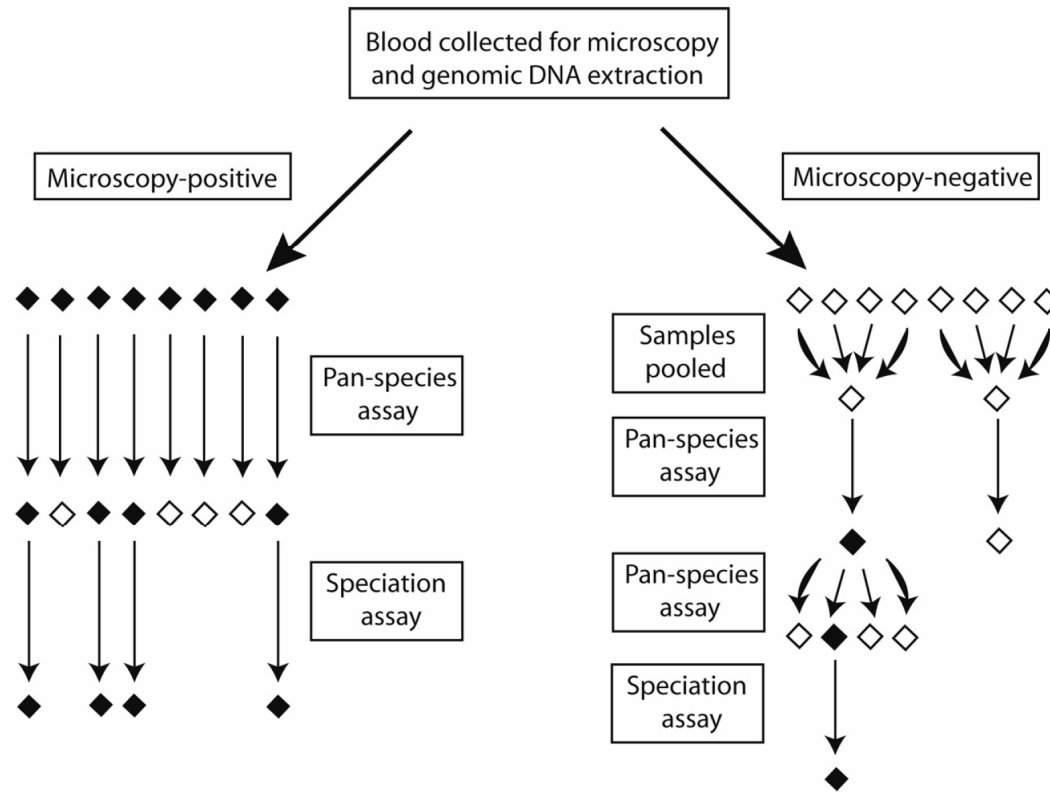
## High-Throughput Pooling and Real-Time PCR-Based Strategy for Malaria Detection<sup>▽</sup>

Steve M. Taylor,<sup>1,2\*</sup> Jonathan J. Juliano,<sup>3</sup> Paul A. Trottman,<sup>1</sup> Jennifer B. Griffin,<sup>1</sup> Sarah H. Landis,<sup>1†</sup>  
Paluku Kitsa,<sup>4</sup> Antoinette K. Tshefu,<sup>4</sup> and Steven R. Meshnick<sup>1</sup>

*Department of Epidemiology, Gillings School of Global Public Health, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina<sup>1</sup>;  
Division of Infectious Diseases and International Health, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina<sup>2</sup>; Division of  
Infectious Diseases, School of Medicine, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina<sup>3</sup>; and Ecole de  
Santé Publique, Faculté de Médecine, Université de Kinshasa, Kinshasa, Democratic Republic of the Congo<sup>4</sup>*

*Taylor et al. JCM 2010*

# Sistema de “pooles”



*Taylor et al. JCM 2010*

# Detección *P. falciparum* no invasiva por PCR

MAJOR ARTICLE

## Quantitative Detection of *Plasmodium falciparum* DNA in Saliva, Blood, and Urine

Davis C. Nwakanma,<sup>1</sup> Natalia Gomez-Escobar,<sup>1</sup> Michael Walther,<sup>1</sup> Sarah Crozier,<sup>1,a</sup> Filip Dubovsky,<sup>2,a</sup> Elissa Malkin,<sup>2</sup> Emily Locke,<sup>2</sup> and David J. Conway<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Medical Research Council (United Kingdom) Laboratories, Fajara, Banjul, The Gambia; and <sup>2</sup>Program for Appropriate Technology in Health Malaria Vaccine Initiative, Bethesda, Maryland

(See the editorial commentary by Sutherland and Hallett, on pages 1561–3.)

**Background.** Current methods for detecting malaria parasites are invasive and associated with poor compliance when repeated sampling is required. New methods to detect and quantify parasites in a less-invasive manner would greatly enhance the potential for longitudinal surveillance in clinical trials.

**Methods.** Saliva, urine, and blood samples from 386 Gambian outpatients with suspected malaria infections were analyzed by nested polymerase chain reaction (nPCR) to detect infection and to evaluate diagnostic accuracy in comparison to expert microscopy. The amount of parasite DNA in malaria-positive samples was estimated using real-time quantitative PCR (qPCR).

**Results.** Blood parasite density as estimated by qPCR correlated well with parasite counts established by microscopy ( $\rho = 0.94$ ;  $P < .001$ ). qPCR results for saliva had a significant correlation with microscopy counts ( $\rho = 0.58$ ;  $P < .001$ ), whereas qPCR results for urine had a positive but poor correlation with microscopy counts ( $\rho = 0.20$ ;  $P = .117$ ). The mean amounts of parasite DNA quantified in blood were greater than the mean amounts quantified in saliva and urine samples obtained concurrently from the same individual, by  $\sim 600$ -fold and  $\sim 2500$ -fold, respectively. When nPCR results were compared with microscopy results, nPCR of saliva had a sensitivity of 73% and a specificity of 97%; its sensitivity increased to 82% in samples with a parasite density of  $\geq 1000$  parasites/ $\mu\text{L}$ . nPCR of urine had a sensitivity of 32% and a specificity of 98%.

**Conclusion.** Saliva sampling is a promising less-invasive approach for detecting malaria infection.

# Pros y Contras PCR a tiempo real

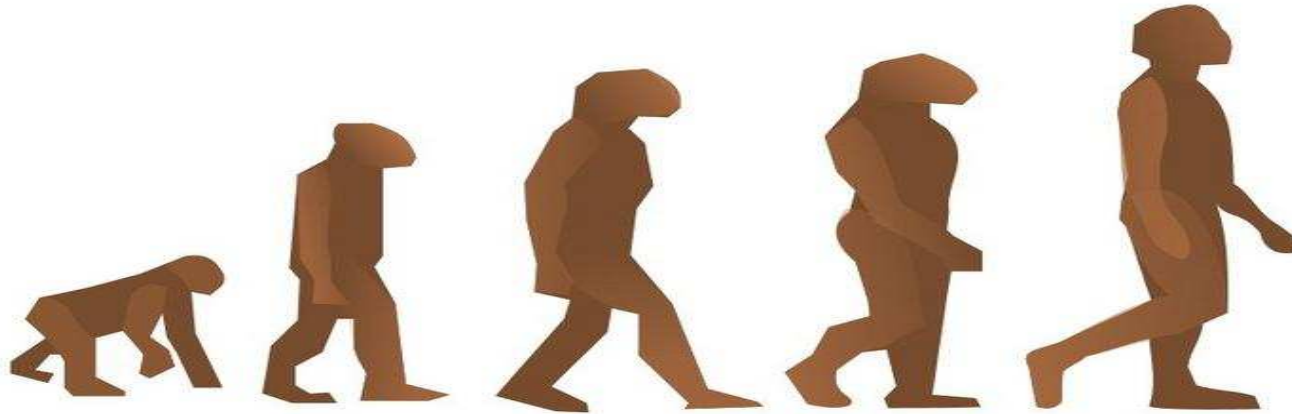
## Ventajas

- Mayor sensibilidad y especificidad
- Detecciones de parasitemias mixtas
- Objetividad en la interpretación
- Utilidad en muestras no invasivas
- Monitorización de tratamiento
- Detección de resistencias (polimorfismos y nº copias)

## Desventajas

- Coste e infraestructuras
- No en situaciones de urgencia
- PCR positiva para gametocitos

# Evolución técnicas de diagnóstico molecular



RFLP  
PCR Simplex



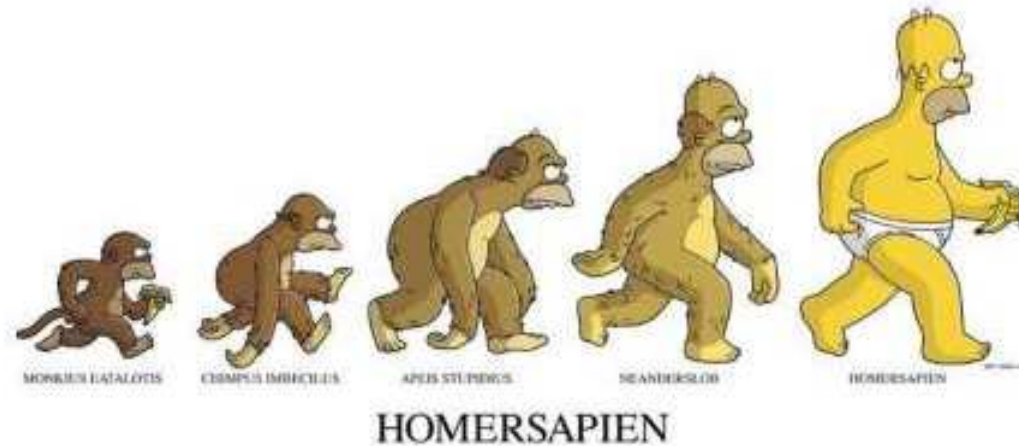
PCR Simplex sonda  
PCR ELISA  
Multiplex-PCR  
Nested-PCR



Real-time PCR



## En el futuro...



Real-time PCR



- High-resolution melting
- Espectrometría de masas
- Arrays
- Biosensores