

# Pruebas de laboratorio en el descubrimiento, diagnóstico y respuesta a los brotes

**Andrés G. (Willy) Lescano, PhD, MHS, MHS**  
Jefe, Departamento de Parasitología, y  
Director, Entrenamiento en Salud Pública

Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales  
de la Marina de los Estados Unidos (NAMRU-6),  
Perú

**Auspiciado por el programa NIH/FIC 2D43 TW007393**





# Descargo de Responsabilidades

- Las opiniones expresadas hoy son sólo mías y no reflejan necesariamente la política oficial o la posición del Departamento de la Marina, el Departamento de Defensa ni del Gobierno de los EEUU
- Soy un empleado del gobierno de los EEUU y este trabajo fue preparada como parte de mis funciones. El título 17 USC § 105 indica que “bajo la protección de derechos de autor, este título no está disponible para cualquier trabajo del gobierno de los EEUU“. El Título 17 USC § 101 define una obra del gobierno de EEUU. como un trabajo preparado por un miembro del servicio militar o un empleado del gobierno de EE.UU. como parte de sus funciones oficiales
- Esta presentación fue desarrollada por el programa de entrenamiento 2D43 TW007393 financiado por los Institutos Nacionales de Salud de los EEUU y que auspicia la Maestría en Investigación Epidemiológica



# Contenidos

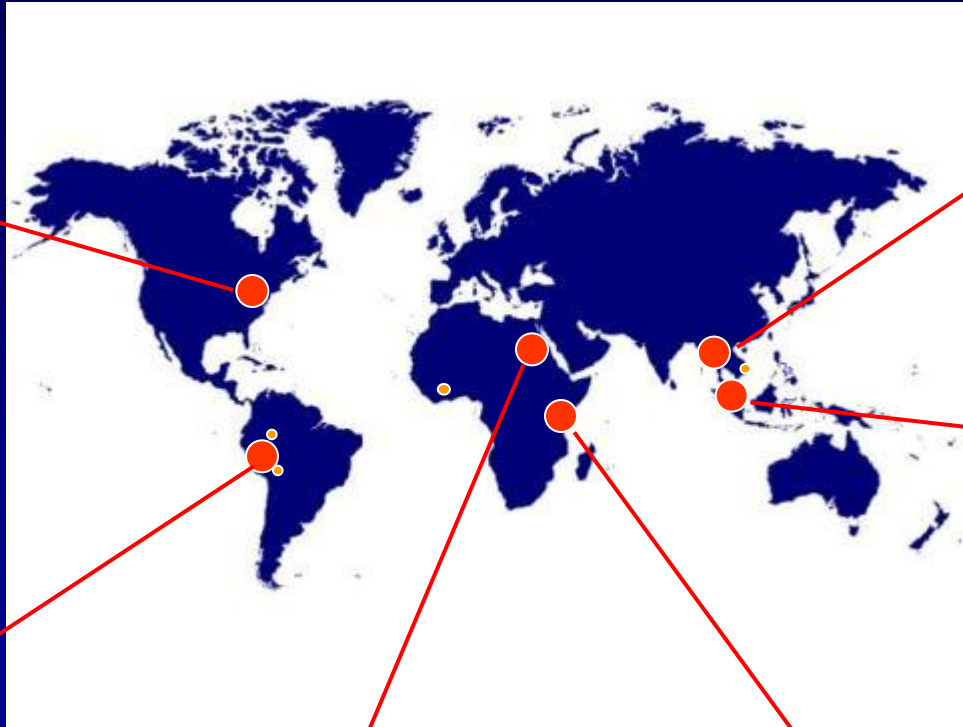
- NAMRU-6 (N6 para las amistades)
- Experiencia en investigaciones de brotes
- Contexto y necesidades
- Rol de las pruebas



# N6, uno de los cinco laboratorios de investigación en enfermedades infecciosas de las Fuerzas Armadas de los EEUU (DoD)



Sede central  
 NMRC / WRAIR  
 Silver Spring, MD



AFRIMS  
 Tailandia  
 1959



NMRC-Asia  
 Singapur  
 (Camboya)  
 1945



NAMRU-6  
 Perú  
 1983




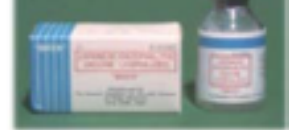






NAMRU-3  
 Egipto (Ghana)  
 1946



USAMRU-K  
 Kenia  
 1969



# Productos para Enfermedades Infecciosas Desarrollados por Investigadores del DoD

	Research Effort	Advanced Development	Fielded Products
Antiparasitic Drugs	Malaria (CDD)	Intravenous Artesunate (CPD) Tafenoquine	Atovaquone/Proguanil (Malarone®, 2000) Doxycycline (Vibramycin®, 1992) Halofantrine (Halfan®, 1992) Mefloquine (Lariam®, 1989) Sulfadoxine-Pyrimethamine (1983) Chloroquine-Primaquine Tablets (1969) Primaquine (1952) Chloroquine (1949)
	Leishmaniasis	Topical Paromomycin drug (CPD)	
Vaccines	Malaria (CDD) Diarrhea (CDD) Dengue Hemorrhagic fevers Scrub Typhus HIV Global (CDD)	Dengue Tetravalent (CDD) HIV Regional (CDD)	Adenovirus 4 & 7 (1980) – (2011) Japanese Encephalitis - cell based (2009) Hepatitis A (1995) Japanese Encephalitis (1992) Oral Live Typhoid Ty21A (1989) Hepatitis B (1981) Meningococcus (A, C, Y, W-135) (1981)
			    
Diagnostics	Laboratory-based assays Point-of-need devices (CDD)	Leishmania Rapid Diagnostic Device Dengue Rapid Diagnostic Device	SMART Leish PCR Diagnostic Test (2011) Scrub Typhus JBAIDS (2010) Malaria Rapid Diagnostic Test (2007) Scrub Typhus Diagnostic Kit (1998)
			
Vector Control & Radioprotecta	Repellents/Insect control Insect identification Vector Diagnostics (CDD)	Combined Camouflage Face Paint Bednet Alternate Repellent System	Arthropod Vector Rapid Detection Device for Dengue (2012) Rift Valley Fever virus Vector Detection Assay (2011) West Nile Virus Diagnostic Kit (2001) Ethyal® (1995) DEET-based Insect Repellent (1946)
			



# N6: Personal, Sedes y Estudios

- **Personal**

- 18 norteamericanos, 13 militares
- 309 investigadores y personal peruanos

- **Sedes**

- Lima (BSL-3)
  - 3,760 m<sup>2</sup> de laboratorios
  - Bioterio con certificado AAALAC
  - Acreditación CAP/CLIP
- Iquitos (BSL-2)
  - 460 m<sup>2</sup> de laboratorios
  - Insectario de *Anopheles darlingi*
- Puerto Maldonado (BSL-1)
  - 180 m<sup>2</sup> de laboratorios

- **Investigación**

- Departamentos: Bacteriología, Entomología, **Parasitología** y Virología/Infecciones Emergentes
- Prioridades: investigación, vigilancia, desarrollo de productos, **respuesta a brotes**, desarrollo de capacidades, colaboración



Lima



Iquitos



Puerto Maldonado





# Protocolos N6 en América Latina



- 144 estudios en seres humanos
- 29 estudios en animales
- Comité internacional de revisión científica
- Comité de ética siguiendo normas peruanas y EEUU
- Comité de bienestar animal desde 1995



## OUTBREAK OF CYCLOSPORIASIS AT A NAVAL BASE IN LIMA, PERU

PAOLA A. TORRES-SLIMMING, CARMEN C. MUNDACA, MANUEL MORAN, JOSE QUISPE, OLGA COLINA, DAVID J. BACON, ANDRES G. LESCANO, ROBERT H. GILMAN, AND DAVID L. BLAZES\*

*Alerta-DISAMAR System Peruvian Navy; Naval Medical Research Center Detachment, Peru; DoD-Global Emerging Infections System (GEIS); Department of International Health, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health; Uniformed Services University*

**Algunas experiencias en estudios de brotes apoyando al sector público**

### Cartas / Letters

*The Revista Panamericana de Salud Pública/Pan American Journal of Public Health publishes letters from readers for the purpose of stimulating dialogue on various aspects of public health in the Americas and of constructively clarifying, discussing, and critiquing the ideas expressed throughout its pages. Letters should be signed by the author and include his or her professional affiliation and mailing address. If a commentary on a given article requires a reply from the author, an effort will be made to obtain the reply and to publish both letters. The editorial team reserves the right to edit all letters received and to condense them so as to improve their clarity.*

#### OUTBREAK OF HAFF DISEASE IN THE BRAZILIAN AMAZON

Haff disease, first reported along the Baltic coast in 1924, is unexplained rhabdomyolysis in a person who ate fish in the 24 hours before onset of illness (1). Outbreaks resembling Haff disease were described in

along with a technical note to all hospitals in Manaus, instructions on how to report suspected cases, and suggestions for their management. The cases were defined as those who were hospitalized on or after 1 June 2008 with a diffuse myalgia of sudden onset who ate fish in the 24 hours before onset of illness and CK serum activity that exceeded five times the upper limit

OPEN ACCESS Freely available online



#### Diarrhea Outbreak during U.S. Military Training in El Salvador

Matthew R. Kasper<sup>1\*</sup>, Andres G. Lescano<sup>1,4</sup>, Carmen Lucas<sup>1</sup>, Duncan Gilles<sup>2</sup>, Brian J. Biese<sup>3</sup>, Gary Stolovitz<sup>3</sup>, Erik J. Reaves<sup>1</sup>

### Molecular Epidemiology of *Plasmodium falciparum* Malaria Outbreak, Tumbes, Peru, 2010–2012

G. Christian Baldeviano, Sheila Akinyi Okoth, Nancy Arrospide, Rommel V. Gonzalez, Juan F. Sánchez, Silvia Macedo, Silvia Conde, L. Lorena Tapia, Carola Salas, Dionicia Gamboa, Yeni Herrera, Kimberly A. Edgel, Venkatachalam Udhayakumar, Andrés G. Lescano

American Journal of Tropical Medicine & Hygiene

Outbreak of Cutaneous Leishmaniasis in Peruvian Military Personnel Undertaking Training Activities in the Amazon Basin, 2010

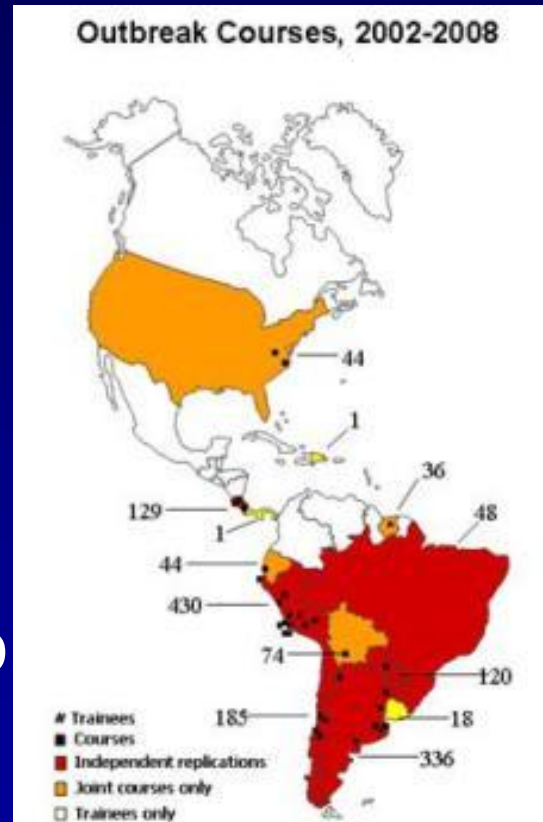
Marianela Oré<sup>1</sup>, Eliana Sáenz<sup>2</sup>, Rufino Cabrera<sup>3,4</sup>, Juan F. Sanchez<sup>5</sup>, Maxy De Los Santos<sup>5</sup>, Carmen M. Lucas<sup>5</sup>, Jorge Núñez<sup>5</sup>, Kimberly A. Edgel<sup>5</sup>, Justino Sopan<sup>6</sup>, Jorge Fernández<sup>1</sup>, Andres M. Camero<sup>5,7</sup>, G. Christian Baldeviano<sup>5</sup>, Juan C. Arrasco<sup>3</sup>, Paul C.F. Graf<sup>5</sup>, Andres G. Lescano<sup>5,7</sup>





# Curso N6 en Investigación de Brotes

- Curso practico, 5 días en aula
- >1600 alumnos de 15 países entrenados en >40 cursos
- Curricula estandarizada y validada en multiple formatos e idiomas
- Colaboración con Ministerios de Salud, OPS, CDC y USAID
- Sirvió de modelo a múltiples otros programas educativos:  
Maestría en epidemiología, curso en Epidemiología de Campo, etc





# Validación Internacional (Lescano et al, Science 2007)

- Impacto demostrado:
  - Alumnos conducen mas investigaciones de brotes, identifican causas y reportan mas eventos
  - Impacto a nivel nacional reportado en cuatro países
- Autosostenible:
  - Alumnos organizaron réplicas independientes en 4 países
  - Insertado en maestrías en tres países
  - Capacitó alumnos de tres programas FETP (Epi de Campo)

## EDUCATIONFORUM

EPIDEMIOLOGY

### Outbreak Investigation and Response Training

Short courses that build skills for investigating and responding to disease outbreaks may enhance response to potential epidemics in resource-limited settings.

Andres G. Lescano,<sup>1\*</sup> Gabriela Salmon-Mulanovich,<sup>1</sup> Elena Pedroni,<sup>2</sup> David L. Blazes<sup>1</sup>



# ¿Qué es un brote?

- Número de casos de una enfermedad o condición de salud que es mayor de lo que se esperaba
- Casos se presentan en un tiempo, lugar o población delimitada y bien definida
- No hay un número mínimo de casos: **un caso de chikungunya, sarampión o ébola**
- Los brotes no son solo de enfermedades infecciosas, pueden ser intoxicaciones, y en salud humana, podrían ser accidentes, violencia, etc.
- Términos relacionados: epidemia, pandemia, endemia



# Objetivos de la investigación según la respuesta al brote

Para implementar esta **RESPUESTA**

La investigación debe tener como **OBJETIVOS** principales:

Optimizar el manejo de casos



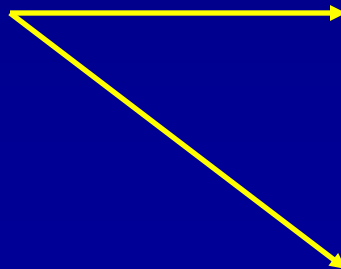
Determinar el agente etiológico involucrado

Interrumpir la cadena de transmisión



Determinar la posible fuente

Prevenir brotes futuros



Determinar el mecanismo de transmisión

los tres objetivos



# Pruebas laboratoriales en brotes

- Identificar el agente etiológico es un objetivo primario en brotes, usualmente es algo **urgente**
- Criterio clínico y experiencia no reemplaza a un diagnóstico altamente sensible y específico
- Tecnología actual permite responder otras preguntas importantes en un brote
- Recursos, geografía e infraestructura condicionan lo que se puede hacer en el terreno

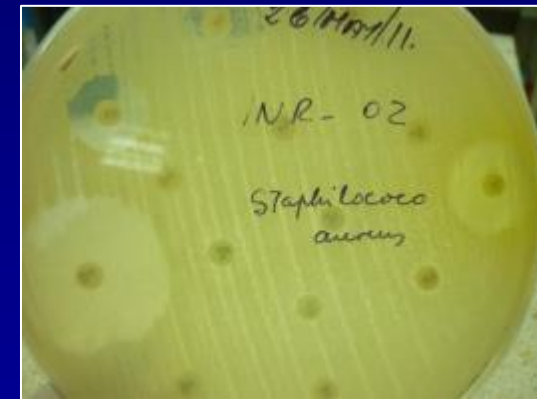
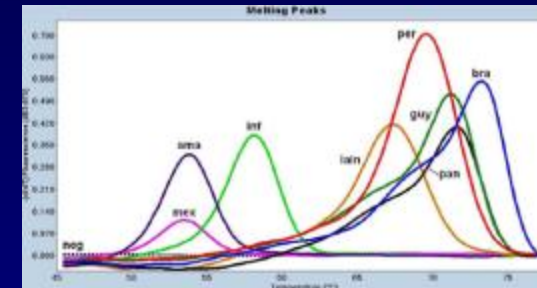
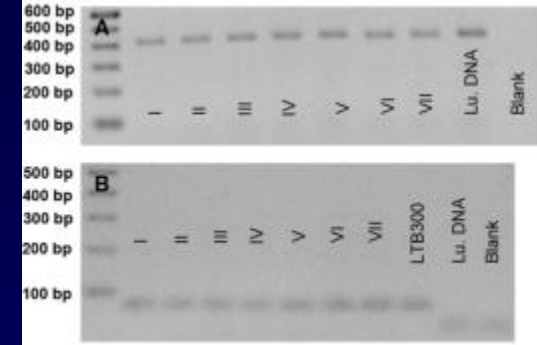






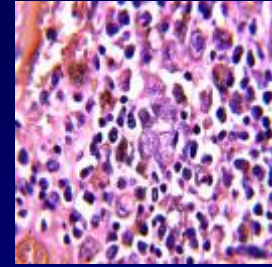
# Utilidad de pruebas de laboratorio

- Diagnóstico individual o detección del agente etiológico del brote
- Efectividad de tratamiento y/o resistencia: fenotipo o genotipo
- Análisis de estructura poblacional (diversidad genética)

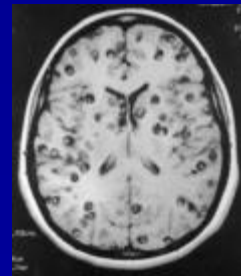
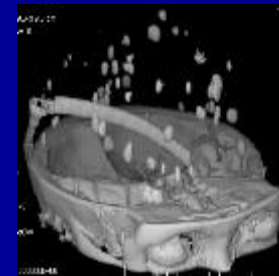
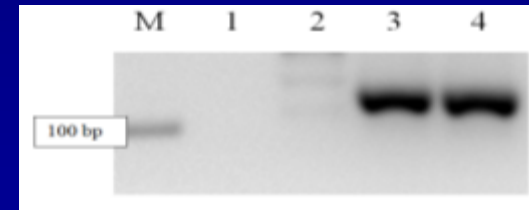
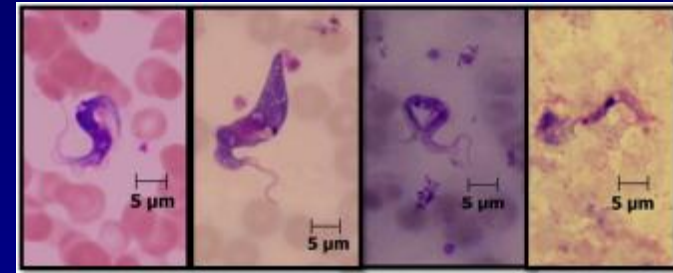




# Tipos de Pruebas



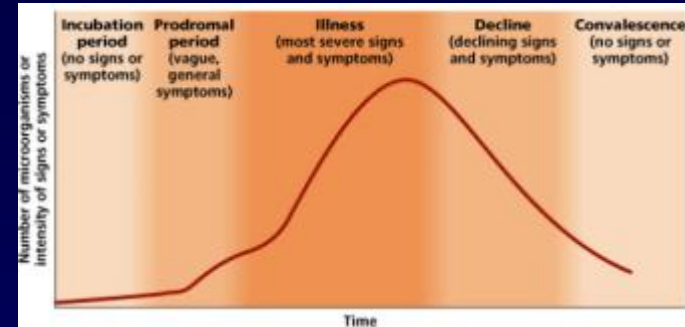
- Clínicas: signos y síntomas
- Laboratoriales
  - Microscópicas
  - Patológicas
  - Cultivo celular y aislamiento
  - Inmunológicas
  - Moleculares
- Radiológicas



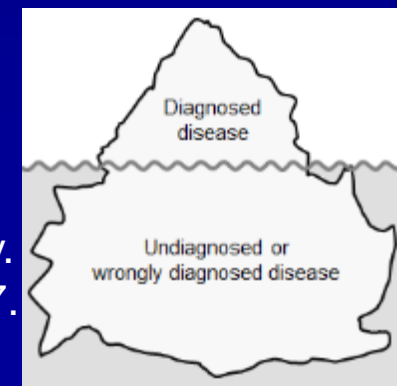
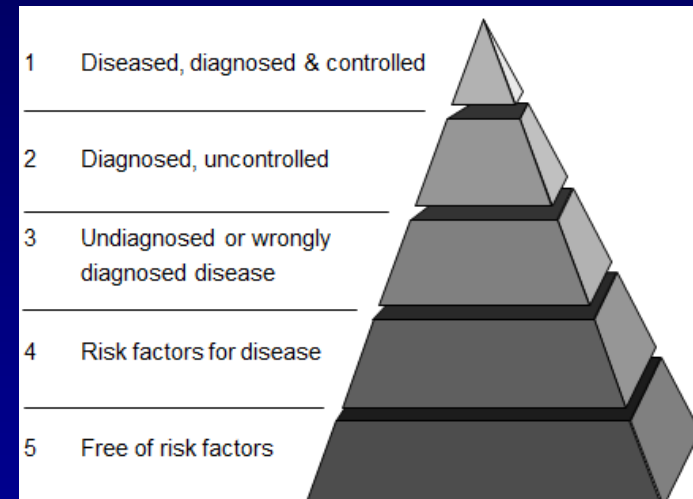


# Estadío de detección

- Exposición: anticuerpos
- Infección: microscopía para giardiasis
- Enfermedad: lesiones de leishmania
- Correlato biológico: hemozoina para malaria



© 2006 Pearson Education Inc., publishing by Benjamin Cummings



From: Bhopal R S. Concepts of Epidemiology. Oxford, Oxford University Press, 2002, pp317. Slides supporting the book + class at U Pitt.



# Características relevantes de una prueba

- Sensibilidad y especificidad
- Nivel de detección: prueba dorada?
- VPP/VPN en población de interés
- Duración de positividad post-tratamiento
  
- Costo
- Complejidad/requisitos: electricidad, AC, etc
- Tiempo de respuesta
- Uso: tamizaje? diagnóstico? Epidemiológico?

Cuál es la pregunta u objetivo?



# Contextos diferentes

- Hospital en ciudad moderna como Lima o zonas circundantes con acceso el mismo día a laboratorio
- Zonas remotas sin electricidad ni posibilidad de acceso el mismo día a laboratorios o refrigeración, pero con posibilidad de ingresos periódicos
- Lugares muy remotos con una sola posibilidad de ingreso y salida para una investigación de brotes







# Estandarización, QA/QC

- Existe y se sigue un SOP?
- Personal con capacidades documentadas
- Estandarización de materiales
- Acreditación formal

U.S. NAVAL MEDICAL RESEARCH CENTER  
UNIT 6:  
Sample collection from human cutaneous leishmaniasis

SOP #: _____	Effective Date: _____	Version: English	Page: 1 of 13
--------------	-----------------------	------------------	---------------

Authors: Carmen Lusas, Erika Perez, Maye De los Santos – Modified by Bruno Travi  
QA Approver: \_\_\_\_\_ Department Head: Andres G. Lescano  
Lab. Medical Director: \_\_\_\_\_ Section Parasitology

**1. PURPOSE.**  
To obtain *Leishmania* parasites from skin lesions and ulcerated or granulomatous mucosal tissues of patients

**2. APPLICABILITY.**  
Determine the presence of amastigotes form by direct microscopic examination from cutaneous and mucosal lesions.

Microscopy Proficiency Test Status NAMRU-6

Table 1: NAMRU-6 Refresher Proficiency Test Summary

Competency (acceptance score)	Dolores Rimarachin	Leonila Ricopa	Carola Salas	Greys Braga
Specificity <sup>2</sup> (≥ 94%)	100%	100%	100%	100%
Sensitivity <sup>2</sup> (≥ 90%)	100%	100%	100%	100%
Species identification <sup>2</sup> (≥ 75%)	100% <sup>3</sup>	90% <sup>3,4</sup>	100% <sup>3</sup>	100% <sup>3</sup>
Parasite count <sup>4</sup> (≥ 75%)	78.6%	85%	93%	63%
Results	Pass	Pass	Pass	CA <sup>7</sup>



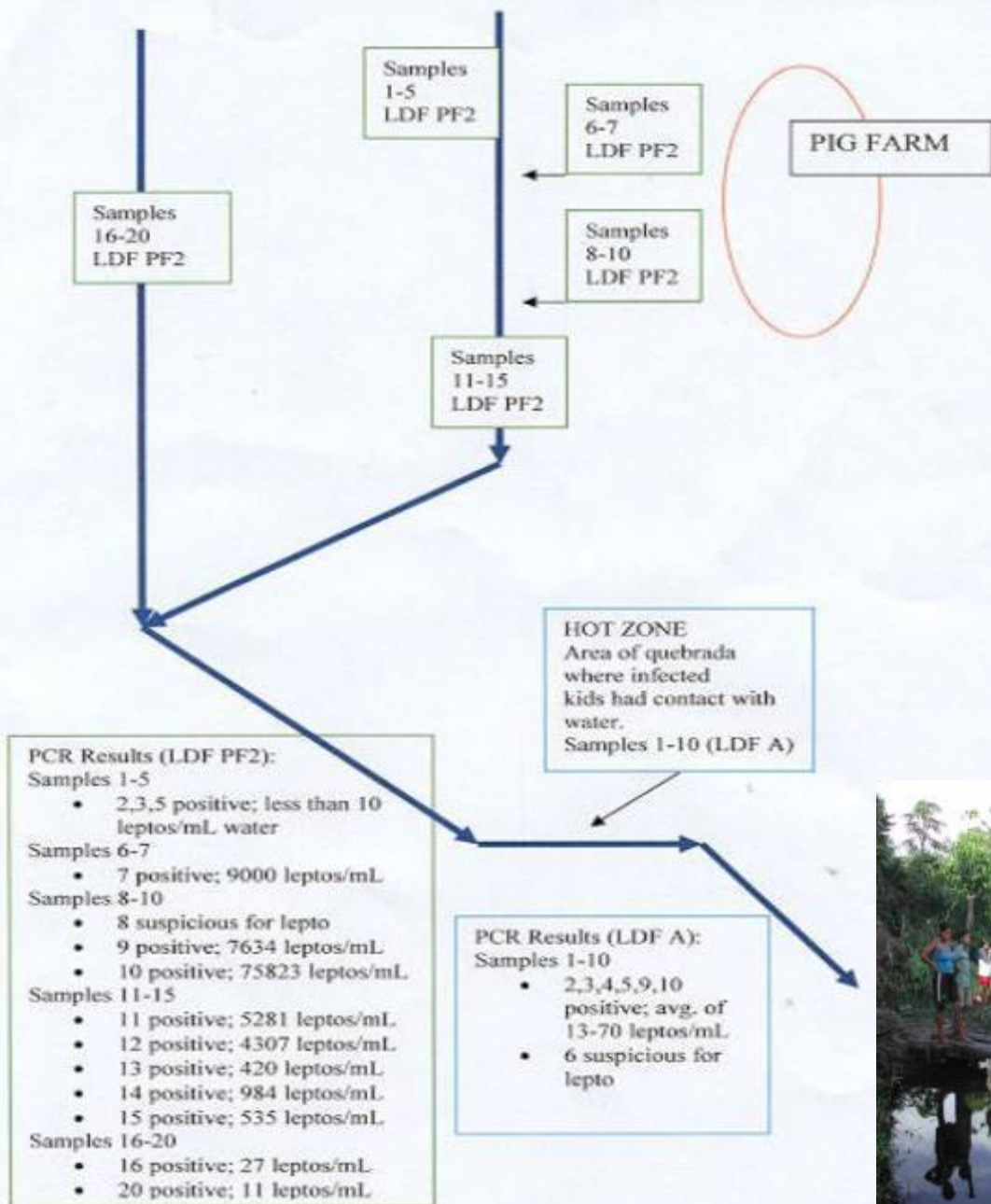


# Ejemplo 1

## Brote de Enfermedad Febril en Los Delfines, Abril-Mayo 2004



Outbreak of Leptospirosis: Las Delfinas, Loreto, Peru. April 2004.  
General Map of streams and samples taken from Las Delfinas Pig Farm #2 (LDF PF2)



# MAT/RT PCR para leptospirosis

- Objetivos: confirmar etiología, identificar fuente y mecanismo
- Alta prevalencia en personas, perros y cerdos
  - Aún en asintomáticos
- Serovariedad frecuente: icterohemorrágico
- Más leptospiras después de chanchería (RT PCR)







## Ejemplo 2

### Kasper PLoS One 2012

OPEN ACCESS Freely available online

PLoS one

## Diarrhea Outbreak during U.S. Military Training in El Salvador

Matthew R. Kasper<sup>1\*</sup>, Andres G. Lescano<sup>1,4</sup>, Carmen Lucas<sup>1</sup>, Duncan Gilles<sup>2</sup>, Brian J. Biese<sup>3</sup>, Gary Stolovitz<sup>3</sup>, Erik J. Reaves<sup>1</sup>

- Multiples casos de diarrea en militares norteamericanos bajo entrenamiento de corto plazo en El Salvador
- **Objetivos: determinar etiología del brote y la fuente a fin de prevenir casos futuros**
- *Cyclospora cayetanensis* detectada en caso sintomático que tomaba ciprofloxacina y metronidazole. Multiples bacterias y parásitos incluyendo *C. cayetanensis* son detectados por PCR.
- Ingesta de múltiples alimentos locales dentro y fuera de la base es asociada a diarrea representando posibles exposiciones





# Ejemplo 3

## Baldeviano EID 2015

### Molecular Epidemiology of *Plasmodium falciparum* Malaria Outbreak, Tumbes, Peru, 2010–2012

G. Christian Baldeviano, Sheila Akinyi Okoth, Nancy Arrospide, Rommell V. Gonzalez, Juan F. Sánchez, Silvia Macedo, Silvia Conde, L. Lorena Tapia, Carola Salas, Dionicia Gamboa, Yeni Herrera, Kimberly A. Edgel, Venkatachalam Udhayakumar, Andrés G. Lescano

- Dos casos de Pf en Tumbes después de 4 años de silencio
- **Objetivos: confirmar reintroducción de Pf y determinar patrón de resistencia**
- Casos confirmados en dos días por PCR (N6)
- Médicos tratan con terapia amazónica (AS+MQ) obtenida pronto al no disponer de esquema regional (AS+SP)
- Días después, marcadores moleculares indican triple mutación en genes Pfdhfr & Pfdhps y confirman resistencia a SP

<i>Pfdhfr</i>							<i>Pfdhps</i>				
A 16 V	Bolivia Repeat	C 50 R	N 51 I	C 59 R	S 108 N/T	I 164 L	S 436 A/V	A 437 G	K 540 E	A 581 G	A 613 S/T
A	NO	R	I	C	N	I	S	G	E	G	A
A	NO	R	I	C	N	I	S	G	E	G	A

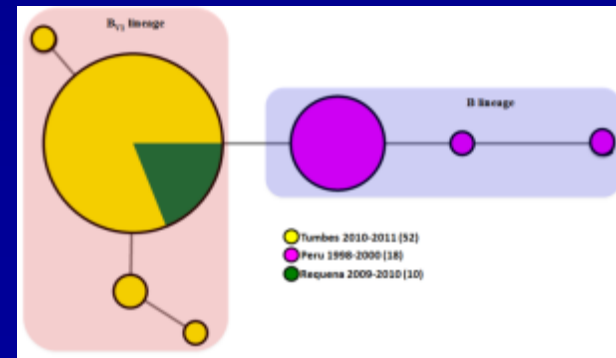




# Introducción única, cepa bien adaptada

- Marcadores de microsatélites conservados indican similitud de casos iniciales
  - confirmada en siguientes casos con análisis mas amplios
- Parásito introducida circulaba en la Amazonía, consistente con viajes de casos iniciales
- Cepa muy adaptable:
  - resistente a SP,
  - deleción en HRP2, indetectable por ciertas pruebas rápidas
  - infecta a diferentes vectores, causó brote en Cusco también

Chromosome 2			Chromosome 3		
302	319	380	383	335	429
187	98	104	134	133	137
187	98	104	134	133	137
187	98	104	134	133	137
187	98	104	134	133	137





# Ejemplo 4

## Ore AJTMH 2015

- Cadetes presentan lesiones compatibles con leishmania despues de entrenamiento en la Amazonía
- **Objetivos: confirmar el diagnóstico y determinar la forma de transmisión para prevenir brotes futuros**
- PCR detecta 20% de casos negativos por microscopía en <72 horas, tasa de ataque estimada: 25%
- RT PCR detecta infección por *Leishmania (Viannia) braziliensis* y *L. (V.) guyanensis*. Microsatelites sugieren dos cepas de *L. (V.) braziliensis* con diferente fenotipo
- Estudio indica alta exposición en múltiples puntos
  - Prevención reduce incidencia en año siguiente

American Journal of Tropical Medicine & Hygiene

Outbreak of Cutaneous Leishmaniasis in Peruvian Military Personnel Undertaking

Training Activities in the Amazon Basin, 2010

Marianela Ore<sup>1</sup>, Eliana Sáenz<sup>2</sup>, Rufino Cabrera<sup>3,4</sup>, Juan F. Sanchez<sup>5</sup>, Maxy De Los Santos<sup>5</sup>, Carmen M. Lucas<sup>5</sup>, Jorge Núñez<sup>5</sup>, Kimberly A. Edgel<sup>5</sup>, Justino Sopan<sup>6</sup>, Jorge Fernández<sup>1</sup>, Andres M. Camero<sup>5,7</sup>, G. Christian Baldeviano<sup>5</sup>, Juan C. Arrasco<sup>3</sup>, Paul C.F. Graf<sup>5</sup>, Andres G. Lescano<sup>5,7</sup>.



OPEN ACCESS Freely available online

PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES

**A FRET-Based Real-Time PCR Assay to Identify the Main Causal Agents of New World Tegumentary Leishmaniasis**

Pablo Tsukayama<sup>1,2</sup>, Jorge H. Núñez<sup>1,2</sup>, Maxy De Los Santos<sup>1</sup>, Valeria Soberón<sup>1</sup>, Carmen M. Lucas<sup>5</sup>, Greg Matlashewski<sup>2</sup>, Alejandro Llanos-Cuentas<sup>3</sup>, Marianela Ore<sup>4</sup>, G. Christian Baldeviano<sup>1</sup>, Kimberly A. Edgel<sup>1</sup>, Andres G. Lescano<sup>1,2</sup>, Paul C. F. Graf<sup>1,5</sup>, David J. Bacon<sup>1,6</sup>



# Resumen

- Pruebas de laboratorio juegan rol muy importante en brotes
- Necesidades varían según las hipótesis de cada brote, que pueden ser muy diferentes
- Pruebas pueden ayudar a determinar la etiología del brote, fuente y mecanismo de transmisión pueden
- Pruebas inmunológicas y moleculares pueden responder preguntas adicionales de importancia
- Recursos, disponibilidad, tiempo de respuesta y portabilidad condicionan posibilidad de usar pruebas



**Muchas gracias**