



Últimas tendencias en el diagnóstico de enfermedades infecciosas



16 min.

(011) 4771 3783 / 7171

Email: ventas@bioars.com.ar



Bioars le acerca una posibilidad de diagnóstico por Biología Molecular, la PCR, y sus cualidades pensadas en función del laboratorio clínico. Una alternativa pensada para incorporar de manera sencilla nuevas tecnologías.



Dra. Patricia Etchevés
Bioars



Para mayor información visite nuestro sitio
web: www.bioars.com.ar o comuníquese a:



En el momento actual, la tendencia en el diagnóstico consiste en emplear tecnologías de detección de antígenos y de investigación de ácidos nucleicos nuevas y más sensibles, con el propósito de lograr un diagnóstico más rápido. El desarrollo de tratamientos efectivos es responsable de esta tendencia que hace de la identificación rápida, sensible y específica, una necesidad.

Hace algún tiempo, el aislamiento de los patógenos era la técnica estándar sobre la cual se medían todas las otras pruebas de diagnóstico, pero hoy en día, con el desarrollo de las nuevas técnicas de Biología Molecular, ya no es la más sensible. Debido a que la Biología Molecular permite

amplificar sólo un determinado agente infeccioso, se aumenta la sensibilidad sin disminuir la especificidad. Además, existen otras ventajas de la Biología Molecular: el proceso suele ser más rápido y, en consecuencia, el diagnóstico puede estar disponible a tiempo para influir en la atención del paciente. Además, es un proceso menos laborioso y más barato. Por otra parte, el uso de técnicas de Biología Molecular evita el uso de sistemas de cultivo específicos. Por ejemplo, no se necesitan varias líneas celulares para la detección óptima de virus.

Dentro de la Biología Molecular, la PCR aparece como la herramienta de diagnóstico más poderosa. Sin embargo, hasta el momento, el principal inconveniente de la detección de ácidos nucleicos y de la PCR en particular ha sido el revelado,

ACTIM™ FECAL BLOOD

Detección de sangre oculta en materia fecal



- . No requiere dieta previa
- . Higiénico y limpio
- . Sencillo
- . Rápido
- . Presentación: Equipo por 20 determinaciones



ETC Internacional S.A. Tel (54 11) 4639 3488
etcventa@etcint.com.ar etcinfo@etcint.com.ar
www.etcint.com.ar Autorizado por ANMAT
 Certificado N° 4106/00

debido a la necesidad de personal especializado para la interpretación de resultados, el tiempo necesario, la necesidad de manejar productos tóxicos o la excesiva manipulación.

Alternativas de revelado de la PCR

Cada vez son más las empresas biotecnológicas que comienzan a diseñar nuevas herramientas de diagnóstico basadas en técnicas de Biología Molecular. En la actualidad existen en el mercado diferentes tecnologías aplicadas a la detección de ácidos nucleicos:

- Electroforesis de ácidos nucleicos: Es posiblemente la técnica más tradicional y extendida para la detección de ácidos nucleicos.
- PCR-ELISA: Consiste en la detección de productos de PCR mediante una técnica automatizable como es el ELISA. Esta tecnología se basa en la hibridación de productos de PCR con sondas marcadas.
- PCR-Line blot: En esta técnica el revelado de los productos de PCR es visualizado en una tira. Presenta la peculiaridad de que puede acoplarse al revelado de PCR múltiple, si bien tiene el inconveniente de la excesiva manipulación y tiempo (2 horas) requeridos para su realización.
- PCR en tiempo real (Real time PCR o qPCR): Se trata quizás de la tecnología más novedosa, ya que el resultado de la misma es visualizado directamente en el ordenador. Sin embargo, presenta el inconveniente de ser una técnica cara de implantar y difícil de adaptar a pruebas multitest.

Speed-oligo® (quick visual oligo-chromatography): Técnica de revelado de PCR mediante un test rápido. Esta tecnología desarrollada recientemente por Vircell permite un análisis visual y directo, de forma que podemos conocer el resultado en tan solo unos minutos. Además, la interpretación del resultado es muy sencilla, incluso más que en PCR en tiempo real.

Posición de la PCR en el laboratorio clínico

A pesar de su gran potencial de diag-



Fig 1 - Alternativas de revelado de la PCR

| | Electroforesis | Southern blot | ELISA | Line blot | qPCR sondas | Speed-oligo® |
|------------------------------|----------------|---------------|-------|-----------|-------------|--------------|
| Especificidad | ↓ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑↑ |
| Coste | ↓ | ↑↑ | ↑ | ↑ | ↑↑ | ↓ |
| Tiempo | 1h | noche | 2-4h | 2-4h | 0 | 10 min |
| Equipamiento: coste | ↓ | ↑↑ | ↑ | ↓ | ↑↑ | ↓ |
| Equipamiento: exclusividad | Si | Si | No | No | Si | No |
| Complejidad técnica | 😊 | 😞 | 😊 | 😊 | 😊 | 😊😊 |
| Manipulación | 😞 | 😞 | 😊 | 😊 | 😊😊 | 😊 |
| Peligro | ⚠️ | ⚠️ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |
| Adecuado para automatización | 😞 | 😞 | 😊 | 😊 | 😊😊 | 😊 |
| Adecuado para multitest | 😞 | 😞 | 😊 | 😊 | 😊😊 | 😊 |

nóstico y sus inestimables cualidades técnicas, en muchos casos la PCR tiene un uso limitado en la rutina asistencial de los laboratorios de microbiología clínica. Algunos de los motivos de esta situación son los siguientes:

- Falta de linealidad con la concentración inicial de diana.
- Tiempo global extracción + PCR + detección: 2 jornadas laborales.
- Dificultad en las técnicas de extracción.
- Dificultades en las técnicas de detección.

Algunos avances como los kits comerciales de extracción o la qPCR han paliado algunos de estos inconvenientes. Otros, como la duración o la dificultad de los procesos de detección, continúan presentes. Conscientes de esta realidad, Speed-oligo® nace para acercar las técnicas de biología molecular al diagnóstico asistencial, aportando la reproducibilidad, sensibilidad y especificidad de la que, en algunos casos, adolecen los métodos "caseros".

Speed-Oligo: una tecnología pensada para un tipo de cliente específico

"... la aplicación de la PCR en el laboratorio de microbiología asistencial se ha restringido a un pequeño grupo de agentes infecciosos de gran interés económico para las empresas de diagnóstico microbiológico, como por ejemplo virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), de la hepatitis C (VHC), de la

hepatitis B (VHB) o Citomegalovirus, para los que se han comercializado sistemas bien estandarizados y, en mayor o menor medida, automatizados. Para otros agentes infecciosos con menor interés económico, para los que no hay kits comerciales para llevarlos a cabo o, si los hay, no son de fácil aplicación, se emplean métodos no comercializados, optimizados en los propios laboratorios, aunque, en general, su uso se ha limitado a centros de referencia o a grandes hospitales."

Costa, J. 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 22 (5): 299-305

Los métodos propios de cada laboratorio pueden incumplir en algunos casos las condiciones mínimas de repetitividad y reproducibilidad necesarias en el diagnóstico asistencial. Speed-oligo® viene a cubrir esta necesidad aportando un método estandarizado que incluye, en un solo producto con marca CE, todos los reactivos necesarios para la reacción de PCR y la detección mediante tira de revelado para desarrollar con garantías el diagnóstico específico y plenamente sensible propio de las técnicas de biología molecular.

El rango de productos Speed-oligo® comprende agentes infecciosos con interés en el diagnóstico asistencial pero que otras compañías no contemplan o, si lo hacen, no con las características de simplicidad, rapidez y consistencia que los clientes necesitan.

Características de Speed-Oligo

- Speed-oligo® es la técnica más específica por su doble hibridación

Los oligonucleótidos de las sondas complementarias del amplicón específico y control, se inmovilizan en la membrana. El método de detección se lleva a cabo por una doble hibridación, por una parte con las sondas inmovilizadas y por otra, con un marcador de oro coloidal. La doble hibridación evita la detección de fragmentos inespecíficos amplificados que conduciría a falsos positivos en cualquier otra técnica.

- Speed-oligo®- equipamiento mínimo

- Speed-oligo también se considera una técnica asequible por el escaso equipamiento que requiere. Con tan solo un termociclador y un termobloque, instrumentos muy habituales en los laboratorios de hoy en día, es posible realizar la técnica completa. Además, estos instrumentos pueden ser compartidos con otras técnicas que se

realicen en el laboratorio, evitando así problemas de espacio.

- Speed-oligo® destaca por su rapidez

En tan solo 5 minutos se produce la hibridación de las tiras y se da paso a la lectura e interpretación de los resultados de una manera sencilla, usando la tarjeta de lectura e interpretación que se incluye en el kit.

- Speed-oligo® es una tecnología muy sencilla que requiere muy poca manipulación

El Departamento de Investigación y Desarrollo de Vircell ha buscado el máximo de prestaciones pero siempre manteniendo la simplicidad de la técnica. No se requieren conocimientos específicos ni experiencia previa para llevar a cabo e interpretar la técnica.

Otro de los principales intereses del equipo que ha desarrollado Speed-oligo® ha sido mantener el nivel de manipulación al mínimo. El producto contiene todos los reactivos necesarios para desarrollar la técnica, incluyendo PCR mix preparado, en

presentación liofilizada. Esta característica supone un importante ahorro de tiempo y evita posibles contaminaciones.

- Speed-oligo® evita el uso de sustancias peligrosas

- Speed-oligo® incorpora todas las ventajas de la biología molecular a un test rápido, evitando el uso del bromuro de etidio, empleado tradicionalmente en la detección de productos de PCR. Su nueva tecnología resuelve de una manera rápida y sencilla el revelado y la interpretación de la técnica de PCR.

- Speed-oligo® ofrece posibilidades de diagnóstico multitest

La doble hibridación que caracteriza la tecnología Speed-oligo® permite ofrecer el diagnóstico de varios parámetros en una misma tira. Este concepto puede resultar muy útil en casos como la identificación de micobacterias o en la detección del agente causal de la meningitis bacteriana.

Ayudando a las personas
a vivir saludablemente



BD Preanalytical Systems

Experiencia al servicio
de la calidad y bioseguridad.

BD Diagnostic Systems

Asesoramiento integral para
obtener resultados confiables.

BD Biosciences

Excelencia en herramientas
para investigación y diagnóstico.

Contactenos al:

e-mail: crc_argentina@bd.com

tel: 0800 444 55BD (23)

Usuarios potenciales de la técnica Speed-oligo®

- Laboratorios de diagnóstico que desean incorporar técnicas de Biología Molecular a su rutina de trabajo. Ofrecemos una técnica sencilla para aquellos clientes que no estén familiarizados con el diagnóstico molecular.
- Laboratorios que usen técnicas de PCR y que necesiten un método de revelado rápido y sencillo con la máxima reproducibilidad, sensibilidad y especificidad.
- Laboratorios en servicio de urgencias.
- Laboratorios de referencia especializados que, o bien busquen una alternativa comercial a una PCR "casera", o procesen parámetros exóticos con un número de determinaciones que no compensen una RT-PCR por coste y caducidad de los kits.

Fundamentos técnicos de Speed-oligo
Una técnica sencilla llena de posibilidades

Basado en una técnica de PCR, Speed-oligo aporta todas las ventajas de la Biología Molecular a un Test Rápido permitiendo una detección inmediata, altamente sensible y específica.

Esta novedosa técnica, tiene lugar en 3 pasos; extracción de ADN, amplificación con un par de oligonucleótidos específicos (PCR) y detección del producto amplificado mediante una tira de prueba.

Speed-oligo contiene todos los reactivos necesarios para la reacción de PCR y la detección del producto amplificado.



Los productos desnaturalizados de la PCR (amplicón específico del microorganismo y amplicón control) se diluyen en solución de hibridación y se ponen en contacto con la tira.

Al difundirse a lo largo de la tira, los amplicones específicos y control reaccionan con las sondas complementarias unidas a oro coloidal.

Al alcanzar la zona de visualización, los complejos de amplicones específicos y control con los conjugados de oro, reaccionan con una segunda sonda fijada sobre la membrana originando la banda coloreada. El exceso de conjugado libre reacciona con una sonda complementaria en la línea control.



Parámetros de interés en una técnica de detección inmediata, altamente sensible y

específica

Las micobacterias son un grupo de microorganismos de gran importancia clínica por ser agentes causales de diversas infecciones humanas con gran morbilidad y mortalidad. En la actualidad, constituyen uno de los problemas sanitarios de mayor gravedad a nivel mundial. Se calcula que alrededor de un tercio de la población mundial está infectada por el bacilo tuberculoso.

SPEED-OLIGO® MYCOBACTERIA (ref.SP005)

La infección por estreptococo del grupo B (EGB) continúa siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad neonatal, a pesar de la reducción en su incidencia debido al cribado prenatal rutinario. Para las estrategias de prevención basadas en el cribado rutinario de mujeres embarazadas, es fundamental disponer de técnicas con un nivel de detección máximo. Un método rápido de detección del EGB podría ayudar a la identificación de niños colonizados con riesgo de enfermedad invasiva para un adecuado seguimiento y monitorización. SPEED-OLIGO® GROUP B STREPTOCOCCUS (ref.SP004)

A pesar de la disponibilidad de antibióticos eficientes y de la existencia de vacunas contra algunos de los principales agentes causales de la meningitis bacteriana, ésta sigue siendo una causa importante de mortalidad y secuelas neurológicas a largo plazo en el mundo. Sigue siendo una de las 10 principales causas de muerte en niños en países desarrollados.

SPEED-OLIGO® BACTERIAL MENINGITIS (ref.SP006)*

Mycoplasma pneumoniae es un patógeno común causante del 10-30% de los casos de neumonía adquirida en la comunidad. La mayoría de ellos son relativamente leves, pero también pueden ocasionar cuadros graves e incluso fatales. La neumonía producida por M. pneumoniae es más frecuente en niños y adolescentes.

El aislamiento del organismo por cultivo y la detección mediante tests serológicos han sido los métodos diagnósticos clásicos pero la naturaleza fastidiosa del patógeno y la alta seroprevalencia son los principales inconvenientes de estos procedimientos. La PCR es el método de elección para la detección de *M. pneumoniae* en muestras respiratorias, reemplazando otros métodos directos de diagnóstico debido a su alta sensibilidad basada en la amplificación. Esto posibilita la detección del patógeno en secreciones respiratorias durante los estadios tempranos de la enfermedad, cuando no hay respuesta de anticuerpos.

SPEED-OLIGO® MYCOPLASMA PNEUMONIAE (ref. SP001)

SPEED-OLIGO® BACTERIAL PNEUMONIA COMBI (ref. SP008)*

Chlamydia pneumoniae es una bacteria intracelular obligada, relacionada con una amplia variedad de enfermedades agudas y crónicas como la neumonía y la bronquitis.

Aproximadamente el 10% de los casos de neumonía adquirida en la comunidad están asociados con este patógeno. Las infecciones respiratorias con *C. pneumoniae* ocurren en todo el mundo y afectan a todos los grupos de edad. Los estudios seroepidemiológicos muestran que entre el 50 y el 75% de los adultos tienen anticuerpos frente a *C. pneumoniae*. La mayoría de las personas sufren infecciones y reinfecciones a lo largo de su vida.

SPEED-OLIGO® CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE (ref. SP003)

SPEED-OLIGO® BACTERIAL PNEUMONIA

COMBI (ref. SP008)*

A pesar de que se han descrito más de 50 especies, *L. pneumophila* es responsable de más del 90% de los casos de la enfermedad del legionario. Los métodos directos de diagnóstico incluyen el cultivo, la tinción de fluorescencia directa y la detección de antígeno en orina. Mientras que los primeros dos presentan una sensibilidad baja y variable, el último se ha convertido en la técnica de referencia en la mayoría de los laboratorios. Sin embargo, la antigenuria no siempre está presente en todos los pacientes, y el uso único de este ensayo diagnóstico podría suponer no diagnosticar hasta el 40% de los casos de legionelosis.

La detección de material genético de *L. pneumophila* en esputos, orina o sangre basada en técnicas de PCR, se ha usado satisfactoriamente en laboratorios de referencia e investigación. Puesto que la mayoría de los test rápidos sólo detectan infecciones debidas a *L. pneumophila* serogrupo 1, un test de PCR que abarque todos los serogrupos podría aumentar la capacidad de diagnosticar estas infecciones. SPEED-OLIGO® LEGIONELLA PNEUMOPHILA (ref. SP002)

SPEED-OLIGO® BACTERIAL PNEUMONIA COMBI (ref. SP008)*

A finales de abril de 2009, la OMS anunció la aparición de un nuevo virus de la gripe A. Se trata de una cepa de H1N1 que no había circulado anteriormente en la especie humana, un virus completamente nuevo frente al que no se tiene respuesta inmune previa. El virus es contagioso y se propaga

fácilmente entre las personas, y de un país a otro. A día de hoy se han notificado casi 71.000 casos confirmados en más de 100 países.

Hasta el momento, sólo la secuenciación y RT-PCR dirigida a la secuencia específica, permiten diferenciar este nuevo virus de las cepas estacionales que actualmente circulan. Sólo un número limitado de centros disponen de estas herramientas. Por tanto, se hace necesario un nuevo método de diagnóstico, sensible y específico, que sea de fácil ejecución en cualquier laboratorio.

SPEED-OLIGO® NOVEL INFLUENZA A H1N1 (ref. SP015)*

* Productos en trámite de registro ANMAT a la fecha de Septiembre 2009.

Referencias bibliográficas

- Carrillo J.A. et al. Rapid oligochromatographic assay for the detection of GBS (group B streptococcus) in vaginal samples. Poster presented at ECCMID 2009.

- Jesus de la Calle, I. et al. Evaluation of two real-time PCR methods to direct detection of group B Streptococci against conventional chromogenic cultures. Presented at ECCMID 2009.

- Martínez-Lirola, M.J. et al. Evaluation of an oligochromatographic test for identification of mycobacteria most frequently isolated in human from liquid and solid culture media. Poster presented at ECCMID 2009.



Av. Dorrego 673 (C1414CKB) Buenos Aires - Argentina
Tel: 54-11-4854-7775 (rot.) Fax: 54-11-4857-0884
ameras@biosyst.com.ar - www.biosyst.com.ar

DENGUE - DIAGNÓSTICO MOLECULAR



Detección del Virus de Dengue
por PCR en Tiempo Real Subtipos 1,2,3y 4

