



Diagnóstico Molecular: Una nueva herramienta en la detección de patógenos. PCR en Tiempo Real



 8 min.



La biología molecular es una herramienta utilizada en el diagnóstico clínico o biomédico en muchos laboratorios de microbiología, oncología, oncohematología y genética. En la siguiente nota Tecnolab nos presenta la utilización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real, para la detección de patógenos, su fundamento, sus ventajas y los requisitos necesarios para llevar a cabo esta técnica en el laboratorio. Esta empresa por intermedio de Qiagen, provee todos los elementos para poder implementar este tipo de diagnóstico.



Lic. Florencia Bialade
División Biología Molecular



E-mail: fbialade@tecnolab.com.ar



En los últimos años, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real "Real Time PCR" ha surgido como una metodología robusta y extensamente utilizada para la investigación biológica, ya que puede identificar y cuantificar cantidades muy pequeñas de Ácidos Nucleicos (ADN y ARN) en forma específica.

Su tecnología permite determinar en forma rápida y exacta cambios en la expresión génica resultantes de fenómenos fisiológicos o patológicos. De esta manera es posible correlacionar la fisiopatología con los eventos moleculares, lo que permite

un mayor entendimiento de los procesos biológicos.

En la PCR en tiempo real, los procesos de amplificación del ADN o ARN y la detección, se producen de manera simultánea dentro del mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción se relaciona con la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación.

El diagnóstico clínico o biomédico, algunos años más tarde, ha tomado esta metodología también como herramienta de trabajo, y hoy en día es habitual encontrar que se lleva a cabo en muchos laboratorios de microbiología, oncología, oncohematología, genética, etc., para aplicaciones tales como diagnóstico e identificación de patógenos, medición de carga virales y bacterianas, identificación de resistencia a los tratamientos, medición de la expresión génica, determinación y cuantificación de translocaciones, entre muchísimas otras.

Métodos de detección directa o indirecta de los agentes infecciosos: El paso hacia el diagnóstico molecular

El diagnóstico de las enfermedades infecciosas se realiza mediante la detección directa o indirecta de los agentes infecciosos. Mediante los métodos directos, se detectan los agentes y/o sus componentes, tales como los ácidos nucleicos, las proteínas estructurales y no estructurales, las enzimas, etc. Mediante los métodos indirectos, se detectan los anticuerpos

inducidos por las infecciones.

Los métodos más frecuentes de detección directa son el aislamiento del virus, el cultivo de bacterias (las dos pruebas de referencia), la microscopía electrónica, la inmunofluorescencia, la inmunohistoquímica, el enzimo-inmunoensayo de detección de antígeno, la hibridación del ácido nucleico (NAH) y la amplificación del ácido nucleico, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Como las técnicas NAH y PCR se centran en las moléculas, también se las conoce como técnicas o métodos de diagnóstico molecular. Los métodos indirectos más comúnmente utilizados para la detección de los agentes infecciosos son la neutralización vírica, la detección de anticuerpos mediante el ELISA y las pruebas de inhibición de la hemoaglutinación.

Por lo general, los laboratorios aplican de forma simultánea los métodos directos e indirectos, a fin de asegurar la fiabilidad del diagnóstico.

Es un hecho cierto que en muchos laboratorios de diagnóstico las técnicas PCR están reemplazando al aislamiento vírico o al cultivo de bacterias en los casos de detección de agentes que resultan difíciles o imposibles de cultivar. Y si nos basamos en las experiencias de la última década todo parece indicar que la técnica de PCR, terminará por imponerse a muchos de los clásicos métodos directos de detección del agente infeccioso, en el corto plazo. Son varias las razones que explican esa tendencia; una de ellas es que el aislamiento vírico requiere: i) la presencia de virus replicantes; ii) cultivos celulares y medios de mantenimiento que resultan caros; iii) un tiempo de no menos de varias semanas para completar el diagnóstico; y iv)



Automatización
Informatización
Estandarización
Calidad

a su alcance.

Soluciones diagnósticas innovadoras
adaptadas a todo tipo y tamaño de laboratorio

Calidad y flexibilidad
en inmunoanálisis

miniVIDAS

La solución adaptada a todo tipo
y tamaño de laboratorios

Completo panel con más de 80 parámetros

Línea de tests rápidos:
Máxima flexibilidad, calidad bioMérieux

QUICKVue+ VIKIA/ bioNexia™

Eficacia y seguridad
en serología transfusional

DaVinci / WASHER / READER

La línea más completa
de microbiología

BacT/ALERT

Sistema automatizado para
hemocultivos y otros líquidos de punción

VITEK 2

Identificación y sensibilidad
automatizada

chromID

Medios de cultivos listos para usar

Métodos manuales de identificación
y pruebas de sensibilidad antibiótica

Innovación en
biología molecular

NucliSENS Easy Q

Soluciones innovadoras a su alcance.

Tecnología BOOM y NASBA Real-Time.

MINIMAG / EASYMAG

diversilab

Genotipificación bacteriana

GENOMICA

Clinical Array Technology

conocimiento de experto innecesario en muchos laboratorios.

Aunque inicialmente la utilización de los ensayos PCR era cara y compleja, en la actualidad son relativamente más económicos, seguros y fáciles de utilizar en los laboratorios de diagnóstico, además de aportar un resultado en tiempos muchísimo más cortos.

PCR en Tiempo Real

La PCR en tiempo real es una amplificación en la que los productos de la PCR se detectan de forma directa durante los ciclos de amplificación utilizando sondas marcadas con fluorescencia. Diversos métodos en tiempo real, tales como los que se realizan con las sondas fluorescentes TaqMan o Molecular Beacon, se han convertido en herramientas populares para la detección de agentes infecciosos. La PCR en tiempo real se ha utilizado para la detección de bacterias, virus o parásitos de una amplia variedad de especies animales. Estos nuevos ensayos tienen varias ventajas sobre los métodos "clásicos" de la PCR simple o anidada (PCR cualitativa).

La primera gran ventaja de la PCR a tiempo real es su rapidez, puesto que no se necesita ningún proceso adicional de detección. La fluorescencia, que indica la presencia del producto amplificado se mide a través de la tapa o de un lado del recipiente de reacción (según el modelo del termociclador), de forma que no es necesario el manejo posterior de los productos de la PCR. Estos procedimientos, por lo tanto, llevan un tiempo considerablemente menor si se compara con la detección tradicional de los productos de la PCR en geles de agarosa, seguidos de la tinción con bromuro de etidio, con lo que, también se reduce el riesgo de contaminación. Gracias a la rapidez de obtención del resultado, los equipos se pueden rentabilizar al máximo, permitiendo un flujo mucho mayor de muestras y de ensayos.

Otra ventaja muy importante de la PCR en tiempo real es que al utilizar sistemas cerrados, el riesgo de contaminación disminuye de forma muy importante. Pero, en comparación con los métodos clásicos de amplificación, la ventaja fundamental de la técnica de la PCR en tiempo real es que es posible realizar ensayos cuantitativos. Se puede cuantificar la concentración inicial de ácido nucleico presente en las muestras de manera mucho más sencilla, más precisa y sobretodo en un

rango dinámico mucho mayor que en los procedimientos convencionales. Además el diagnóstico se puede automatizar posteriormente utilizando robots para las extracciones de ADN/ARN y el pipeteo.

Requisitos para llevar a cabo un ensayo en Tiempo Real

Los termocicladores para llevar a cabo la PCR en Tiempo Real incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación. El número de canales de lectura que presentan los equipos también es importante. Disponer de varios canales de lectura permite detectar la emisión de distintos fluorocromos a la vez de esta manera se pueden usar varias sondas marcadas con distintos fluorocromos para identificar diferentes tipos de ADN blanco en la misma reacción (PCR múltiple o multiplex) o por ejemplo incorporar controles internos a la reacción, para detectar la presencia de inhibidores.

Los termocicladores en Tiempo Real tienen además una capacidad elevada (variable en los distintos modelos y marcas) y permiten llevar a cabo con el mismo instrumento distintos tipos de ensayos como ser cualitativos, cuantitativos, multiplex.

Por otra parte las sondas para el PCR en tiempo real pueden marcarse con un gran número de fluoróforos diferentes que funcionan como colorantes indicadores. El uso de sondas fluorescentes que emiten diferentes colores permite el "multiplexado" de los ensayos. En la PCR múltiple se pueden detectar y diferenciar de forma simultánea varios agentes infecciosos en un único recipiente de reacción individual, proporcionando resultados muy sensibles

Validación de los ensayos de Diagnóstico Molecular

Cuando se realizan análisis diagnósticos de material clínico es importante producir datos de buena calidad. Para esto, hay que cumplir algunos criterios clave. Es necesario establecer los sistemas de garantía de calidad (GC) y de control de calidad (CC), es decir, un juego de protocolos de calidad, incluyendo el empleo de muestras de control, que aseguren que el

sistema está funcionando adecuadamente y que confirme la calidad de los datos.

La validación de los ensayos es otro factor fundamental para garantizar que los resultados de las pruebas reflejan el estado real de las muestras.

La validación es la evaluación de una prueba de diagnóstico con el fin de determinar su idoneidad para una utilización concreta.

Implementación de Diagnóstico Molecular en el laboratorio

Tecnolab, por intermedio de Qiagen, provee las herramientas necesarias para implementar el diagnóstico molecular en el laboratorio, proveyendo no sólo el termociclador Real Time sino también kits validados para la cuantificación de carga viral de distintos virus, bacterias etc.

El Rotor-Gene Q es el termociclador en Tiempo Real de Qiagen que combina características de diseño optimizadas para tener una excelente performance y brindar resultados confiables, tal como lo demanda el diagnóstico molecular. Posee un único diseño rotatorio centrífugo donde cada tubo gira en una cámara de aire en movimiento, manteniendo las muestras precisamente a la misma temperatura. Cuando cada tubo se alinea con la óptica de detección la muestra es iluminada y la señal fluorescente es rápidamente colectada. Esto resulta en un análisis de PCR sensible, preciso y rápido, y además, elimina las variaciones muestra a muestra y los efectos borde.

El equipo además, dado que algunos laboratorios certificados requieren validación térmica del instrumento, posee la posibilidad de validarlo fácilmente, sin necesidad de solicitar un servicio de validación, a través del uso del Rotor-Disc OTV (Optical Temperature Certification), el cual automáticamente testea la temperatura.

Junto con el Rotor-Gene Q, validado para diagnóstico molecular, Qiagen provee los Artus PCR kit. Estos kits proveen todos los reactivos necesarios optimizados para la detección rápida y sensible de patógenos, a partir de una amplia variedad de muestras con una precisa cuantificación de los mismos. Adicionalmente, todos los kits Artus Real time PCR contienen un segundo sistema de amplificación heteróloga, para identificar posibles inhibiciones de la PCR. Este control interno (IC) se detecta en un

canal de fluorescencia separado del rotor Gene Q y permite tener un control fidedigno de los resultados obtenidos.



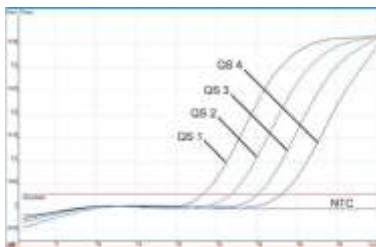
Resultados confiables, la solución a sus necesidades de diagnóstico

El Rotor-Gene Q es un instrumento de precisión, diseñado específicamente y validado para el diagnóstico molecular, con una excelente performance.



Los kits Artus PCR kit están diseñados y validados para tener una óptima performance en el Rotor-Gene Q, así como en otros instrumentos.

La combinación del Rotor-Gene Q y los kits Artus PCR Real Time proveen una solución analítica completa para la detección de patógenos por PCR en Tiempo Real, tanto para el diagnóstico como para el seguimiento y monitoreo de los pacientes.



Detección de los Estándares de cuantificación en el canal de fluorescencia. Cycling A.FAM. NTC: non-template control (control negativo).

Todos los kits tienen marcación CE-IVD para el uso diagnóstico in Vitro en el

Rotor Gene Q y en otras plataformas del mercado.

Bibliografía

1. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. SciAm 262: 5661, 1990.
2. Mullis KB and Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol 155: 335-350, 1987.
3. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, and Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230: 1350-1354, 1985.
4. Ausubel FM, Brent R, Ballagi-Pordany A. & Belak S. The use of mimics as internal standards to avoid false negatives in diagnostic PCR. Mol. Cell. Probes, 10, 159-164, 1996.
5. Belak S. & Thoren P. Molecular diagnosis of animal diseases. Expert Rev. Mol. Diagn., 1, 434-444, 2001.
6. Burkhardt H.J. Standardization and quality control of PCR analyses. Clin. Chem. Lab. Med., 38, 87-91, 2000.
- Chapter 1.1.3. - Validación y control de calidad de los PCR utilizado para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. 32 Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos 2006.
7. Elnifro E.M., Ashshi A.M., Cooper R.J., & Klapper P.E. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. Clin. Microbiol. Rev., 13, 559-570, 2000.
8. Jungkind D. Automation of laboratory testing for infectious diseases using the polymerase chain reaction — our past, our present, our future. Journal of Clinical Virology Volume 20, Issues 1-2, 2001.

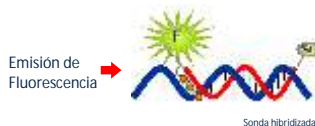
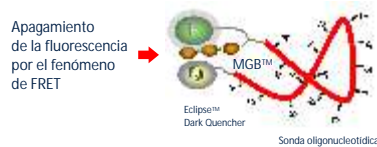


- Diagnóstico Clínico
- Investigación Científica
- Biología Molecular
- Genética
- Biotecnología
- Identificación Humana
- Genética Forense



Los productos incluyen las mejores ventajas técnicas disponibles en kits de diagnóstico por PCR en tiempo real

- Química de Sondas de Hibridación (Pleiades) química propia patentada con sondas MGB cortas y altamente específicas
- Tecnología de Superbases™ para incrementar la sensibilidad y especificidad de los primers y sondas
- Formato de Monoreactivo incrementa la flexibilidad de trabajo. Facilita la automatización



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

