



tecnolab
s.a.

Nuevas metodologías diagnósticas para micobacterias

 7 min.



En esta nota la Bioquímica Mónica Rodríguez, coordinadora de la División Patología y Anticuerpos de TecnoLab nos explica detalladamente nuevas metodologías diagnósticas para detectar micobacterias.



Bioq. Mónica Rodríguez
Coordinadora División Patología y Anticuerpos



E-mail: mrodriguez@tecnolab.com.ar



La tuberculosis es causada por *Mycobacterium tuberculosis*, una bacteria que casi siempre afecta a los pulmones. La afección es curable y se puede prevenir. Es la segunda causa mundial de mortalidad, después del sida, causada por un agente infeccioso. Hoy existen nuevas alternativas diagnósticas, como Real Time PCR para la

Iris[®]
Diagnostics Division

Sistema Automatizado de Urinalysis



BIODIAGNOSTICO

Av. Ing. Huergo 1437 P.B. "I" C1107APB - Buenos Aires Argentina Tel./Fax: +54 11 4300-9090

info@biodiagnostico.com.ar www.biodiagnostico.com.ar

detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y Amplificación por PCR seguida de hibridación para micobacterias atípicas como así también la posibilidad de evaluar fármaco resistencia.

Desarrollo

La tuberculosis es causada por *Mycobacterium tuberculosis*, una bacteria que casi siempre afecta a los pulmones. La afección es curable y se puede prevenir.

La tuberculosis es la segunda causa mundial de mortalidad, después del sida, causada por un agente infeccioso.

En 2010, 8,8 millones de personas enfermaron de tuberculosis y 1,4 millones murieron por esta causa en el mundo.

Más del 95% de las muertes por tuberculosis ocurrieron en países de ingresos bajos y medianos, y esta enfermedad es una de las tres causas principales de muerte en las mujeres entre los 15 y los 44 años.

La tuberculosis es la causa principal de muerte de las personas infectadas por el HIV, pues causa una cuarta parte de las defunciones en este grupo.

La tuberculosis multirresistente se ha encontrado en casi todos los países estudiados. (1)

En Argentina, la tasa de notificación de casos de tuberculosis (TB) es 26,3 casos por 100.000 habitantes, informándose durante el año 2008, un total de 10.452 casos.

El principal objetivo del Programa Nacional de Control de Tuberculosis (PNCTB) en Argentina, es diagnosticar los pacientes infecciosos en un estadio temprano de la enfermedad y tratarlos efectivamente utilizando la estrategia de Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado (TAES). (2)

El diagnóstico de laboratorio de la tuberculosis (TBC) habitualmente se realiza mediante la visualización de los bacilos ácido-alcohol resistente (BAAR) de muestras sometidas a la coloración de Ziehl Neelsen o con Auramina-Rodamina y mediante el cultivo de las mismas en medios adecuados.

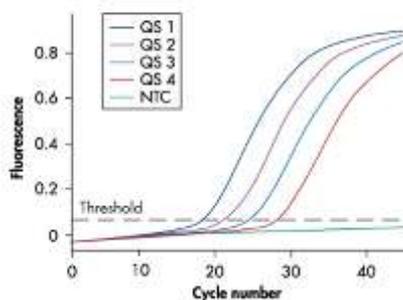
Hoy existen nuevas alternativas diagnósticas, como Real Time PCR para la detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y Amplificación por PCR seguida de hibridación para micobacterias atípicas como así también la posibilidad de evaluar fármaco resistencia.



Artus | Qiagen



artus®



Real Time PCR, Detecta los miembros del complejo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. microti* y *M. pinnipedii*) en muestras de esputo, BAL, secreción bronquial, LCR, lavados gástricos y peritoneales.

El producto amplificado se detecta mediante el fluorocromo acoplado a la sonda de oligonucleótido que se va ligando específicamente a la secuencia que se amplifica. La intensidad de la fluorescencia se detecta en el transcurso de la PCR a tiempo real con lo cual puede cuantificarse el producto sin necesidad de abrir los tubos tras realizar la PCR.

El gen target se detecta en FAM, fragmento de 159 pb del genoma micobacteriano.

Además el kit incluye un segundo sistema de amplificación heterólogo para evaluar posible inhibición de PCR (Control Interno) que se detecta en el canal JOE. Se suministran cuatro controles positivos con cuatro concentraciones que permiten cuantificar la cantidad de ADN presente en la muestra.

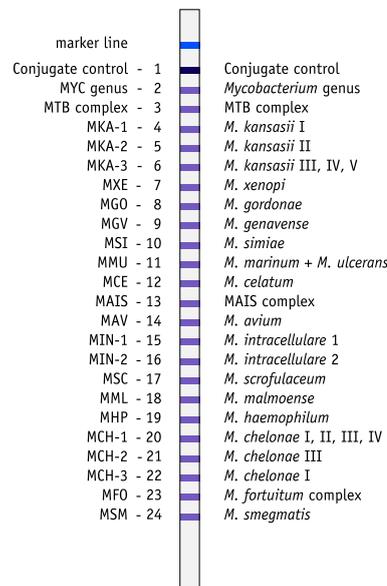
En el caso de esputos el material se

descontamina con NaOH y luego se procede a la concentración por centrifugación. Posteriormente se realiza la extracción con una columna QIA amp DNA mini kit (51304), se emplea carrier de ARN, para aumentar la eficiencia de la extracción.

El límite de detección es de 1,23 copias/ μ l (p: 0,05) con RQG 6000



Innogenetics



- INNOLipa Mycobacteria, Identificación de 16 especies de Mycobacterias incluyendo el complejo. Consta de amplificación e hibridación reversa.

El primer paso es el aislamiento del DNA bacteriano del medio de cultivo ya sea sólido o líquido.

El DNA muestra se introduce en una mezcla conteniendo todos los componentes esenciales para la amplificación incluyendo los dNTPs, primers biotinilados y DNA polimerasa. Los primers empleados por el test amplifican la región 16S-23S RNA ribosomal. Por calentamiento la doble hélice se desnaturaliza y queda expuesta la secuencia target a los primers biotinilados, posteriormente se va produciendo el annealing, la extensión y finalmente luego de 40 ciclos se obtiene la amplificación del producto.

A posteriori se emplea el kit de detección que está basado en el principio de hibridación reversa. El material DNA

biotinilado es hibridado con sondas de oligonucleótidos inmovilizadas como líneas paralelas sobre tiras de membrana. Luego de la hibridación la estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina es adicionada al híbrido previamente formado. El sustrato es BCIP/NBT resultando precipitado visible.

Este procedimiento permite la automatización por medio de AUTO Lipa.

La sensibilidad diagnóstica reportada es del 98,8%.

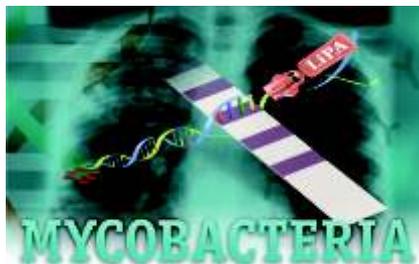
- INNOLipa Rif TB, Detección del complejo Mycobacterium tuberculosis y Resistencia a la Rifampicina.

Está basado en el principio de hibridación reversa, el gen target de la amplificación es el rpoB.

El producto de la amplificación se emplea como diana para la detección de la presencia de alguna de las especies correspondientes al complejo M. tuberculosis por la presencia de una sonda

específica en la tira del MTB. Simultáneamente se detecta la presencia de una mutación puntual, inserción o deleción del rpoB (codones 509 al 534) mediante cinco sondas S superpuestas que abarcan la región relevante del gen.

Estas sondas S se hibridan exclusivamente a la secuencia wild type. Si existe una mutación no hay hibridación, en consecuencia la ausencia de una sonda de hibridación indica la presencia de mutación y por lo tanto un genotipo resistente.



tecnolab
S.a.

Bibliografía

- (1). WHO, Tuberculosis, marzo 2012
- (2). Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Dr. Emilio Coni" Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis



LABORATORIO DE MEDICINA
ANÁLISIS CLÍNICOS | Dr. Raul Gutman



ACREDITADOS BAJO LA NORMA
NM ISO 15189:2008
Consulte alcance acreditación en: www.oaa.org.ar

MAS DE 30 AÑOS DE TRAYECTORIA REFERENTES NACIONALES EN CALIDAD Y SERVICIO

- Provisión de insumos para garantizar la etapa pre-analítica
- Consulta de resultados on-line
- Recolección diaria de muestras con logística propia
- Asesoramiento bioquímico especializado en cada área

