



XXII Comunicaciones Científicas y Tecnológicas

Orden Poster: CM-015 (ID: 298)

Autor: Sotelo, Ailin Angelina

Título: Diseño y Validación de PCR en Tiempo Real para la detección de Chlamydia trachomatis

Director:

Palabras clave: ITS, diagnóstico, reacción en cadena de la polimerasa

Área de Beca: Cs. De La Salud

Tipo Beca: Iniciacion Tipo B

Periodo: 01/03/2016 al 01/03/2018

Lugar de trabajo: Facultad De Medicina

Proyecto: (13I004) Diseño de real time PCR para detección simultánea de microorganismos de transmisión sexual de difícil aislamiento.

Resumen:

Las infecciones de transmisión sexual (ITS) constituyen un problema no resuelto en el norte argentino. Chlamydia trachomatis (CT) es una bacteria pandémica (92 millones de nuevos casos anuales en todo el mundo) y es reconocida como la primer causa de infecciones del tracto genital inferior a nivel global. A pesar de ello, el diagnóstico de CT sigue teniendo complicaciones y las mismas son más bien inherentes a las técnicas disponibles en el laboratorio para su detección ya que, no es una bacteria que pueda ser aislada por técnicas bacteriológicas convencionales. La detección de ADN se transformó en el gold standard, sin embargo en nuestra región no es todavía de uso rutinario en el diagnóstico clínico. Con el fin de desarrollar un nuevo protocolo de detección en base a una PCR en tiempo real, se diseñó primers en forma conjunta con sondas de hidrólisis tipo TaqMan que amplificasen regiones del plásmido críptico de 7,5 KB específico de CT en regiones conservadas entre los diferentes serovares encontrados en GenBank del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) . En el presente trabajo se evalúan la performance de algunos primers diseñados. Para ello se utilizaron diferentes tipos de software de diseño y análisis de propiedades de los mismos. Para toda la puesta a punto se utilizó una mix de reacción 2x de FastStart SYBR Green de Roche Diagnosis que contiene polimerasa Taq, buffer de reacción, desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dUTP), SYBR Green I, primers en concentración 10 mM y el ciclado se realizó en el termociclador EcoTM RealTime PCR System (Illumina, Inc.). Como templado se utilizaron controles positivos concentrados (plásmido aislado) usados en metodologías de diagnóstico por PCR que se utilizan actualmente. De estos controles se realizaron diluciones (1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000) para testear la sensibilidad de la detección. La reacción se calculó para 10 µL finales (8,5 de Master Mix con 1,5 del control positivo) y el ciclado se seteó en 95°C por 10 min. y 40 ciclos de 95°C por 15 seg, 60°C por 30 seg. y 72°C por 30 seg. de acuerdo a recomendación de fabricantes. Por de cada uno de los cuatro pares de primers diseñados y en ensayos duplicados, se realizaron reacciones en diferentes concentraciones de los mismos (0.1 µl, 0.2 µl, 0.3 µl, y 0.4 µl por tubo de Foward más Reverse), para evaluar en cada reacción el comportamiento del pico de melting que exibe. La sensibilidad de detección se evaluó de acuerdo al índice de fluorescencia relativa (alto del pico de melting). Para confirmar la especificidad del aneling de los primers en el templado se sometió a los amplicones obtenidos a electroforesis en geles de agarosa al 3% a 100 voltios durante 60 minutos para confirmar que los mismos tengan la longitud en pares de bases que se diseñó para amplificar. De los cuatro pares de primers obtenidos el par BS3 en 0.2 µl por reacción presentó los picos de melting óptimos para cada una de las diluciones de los controles positivos analizados. El amplicón tiene una Tm (Temperatura de melting) de 73,8 °C en promedio y con un desvío estándar de 0,34 °C, reflejando una alta especificidad de amplificación. La corrida electroforética confirmó, a su vez, que el amplicón es del tamaño específico diseñado, en este caso 91 pares de bases. Los resultados del diseño y posteriormente validación técnica de esta metodología han resultado satisfactorios en el caso de un par de primers diseñados, manteniendo valores específicos y conservados. El siguiente paso sería la evaluación de la metodología desarrollada sobre muestras clínicas. Se planea, además, la incorporación de una sonda de hidrólisis, con los cambios metodológicos y moleculares necesarios para posteriormente combinar éste procedimiento con la detección de dos agentes infecciosos más para desarrollar in-house un protocolo de detección qPCR multiplex. Dado que las infecciones de transmisión sexual siguen siendo un problema de compleja resolución en el noreste argentino, región del país donde se registran las mayores tasas de incidencia anual de estas patologías, el posible desarrollo y posterior transferencia de éste tipo de metodologías al ámbito de los laboratorios clínicos para que se realicen de manera rutinaria implica un importante avance en lo que hace a la detección rápida, confiable y con adecuada relación costo-beneficio del diagnóstico. Y además, permitirá definir conductas más adecuadas para la caracterización, el control y el seguimiento de las pacientes con infecciones agudas y crónicas por CT.