

Taller

Diagnóstico microbiológico en ITS

Dra. Núria Borrell Solé

María Cristina Taboada Ruiz

Susana Renee Avella Klaassen

Ester del Barrio Tofiño

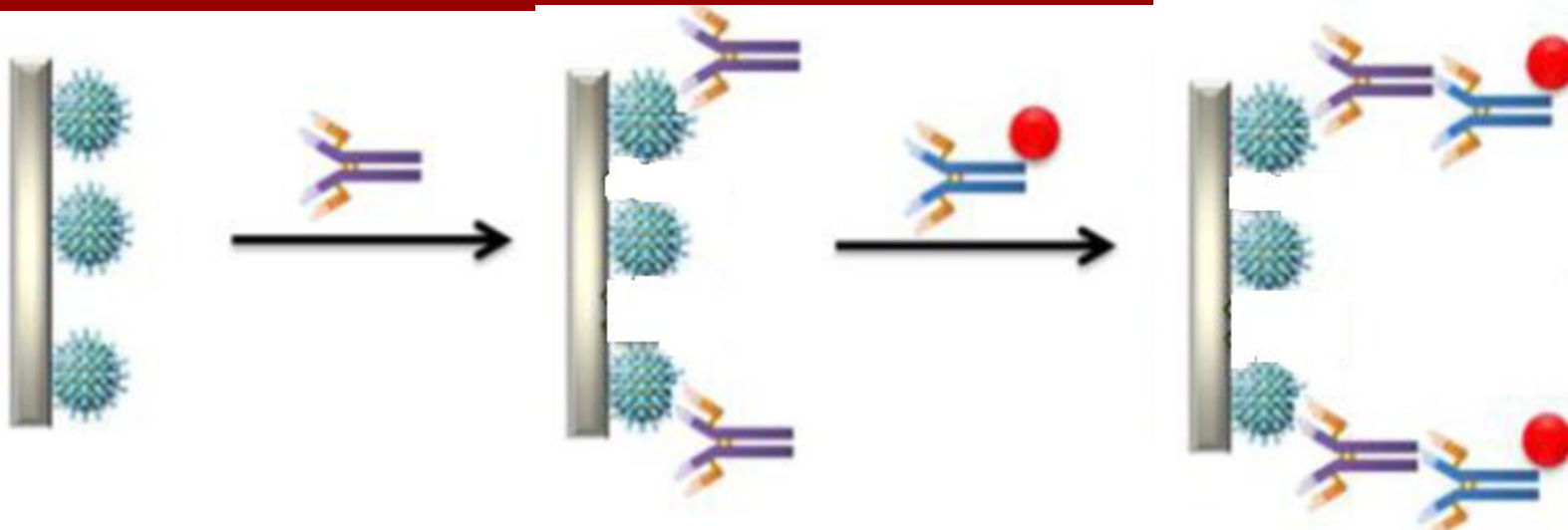
Patricia Llull Sánchez

S. Microbiología Clínica HUSE

TÉCNICAS SEROLÓGICAS

- Permite detección de anticuerpos o antígenos en suero o plasma de pacientes infectados
- Diferentes técnicas con diferentes sensibilidades y especificidades (ELISA, RIA, Western Blot, CLIA)
- **CLIA**
 - alta sensibilidad y especificidad para el cribado de ITS (VIH, hepatitis B, hepatitis C, sífilis, y hepatitis A)
 - Límites de detección muy superiores al ELISA y otras técnicas serológicas, del orden de 10^{-18} a 10^{-21} mol/mL
 - Acortamiento del periodo ventana hasta a 15 días en VIH y sífilis

CLIA: quimioluminiscencia

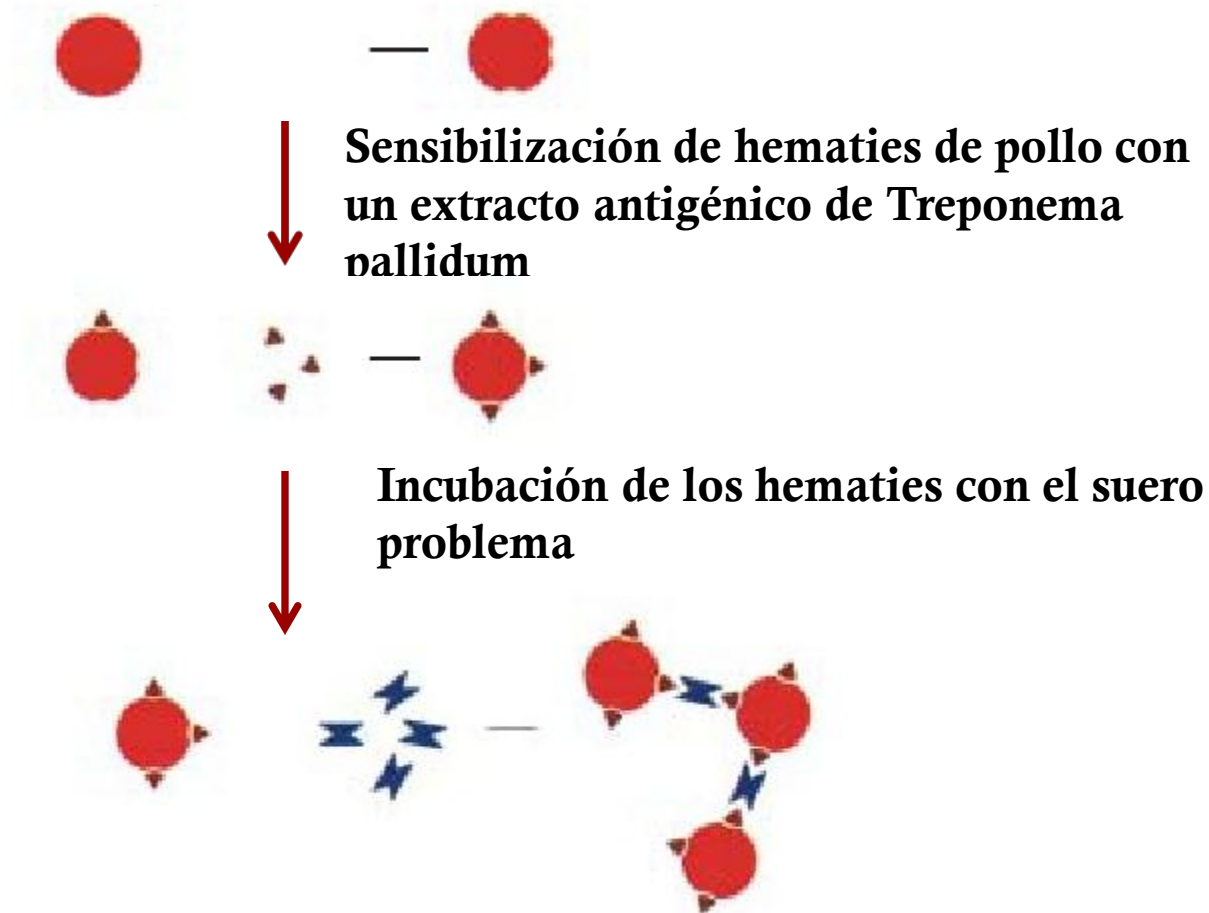


ACRIDINA

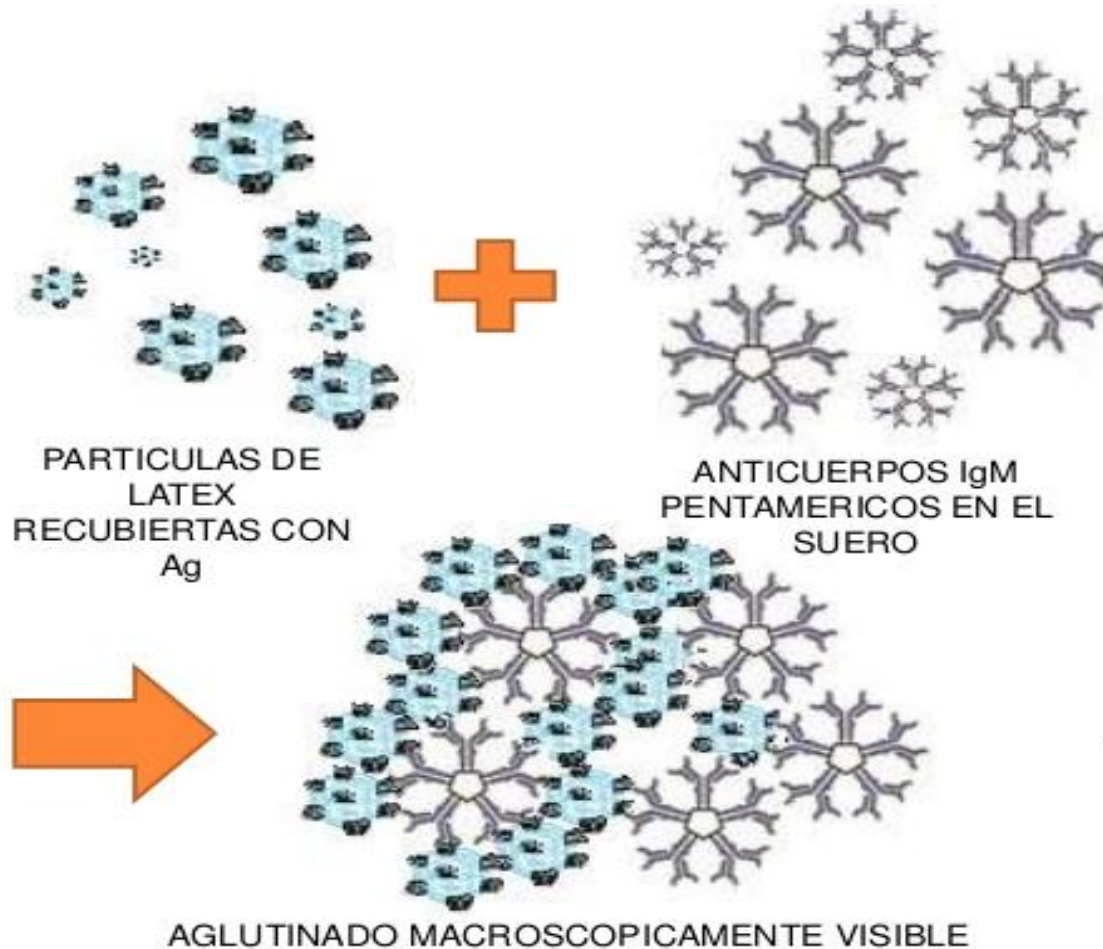
NaOH

**N-METIL
ACRIDINA**

TPHA: hemaglutinación indirecta



RPR: aglutinación



Western Blot

Detection in Western Blots

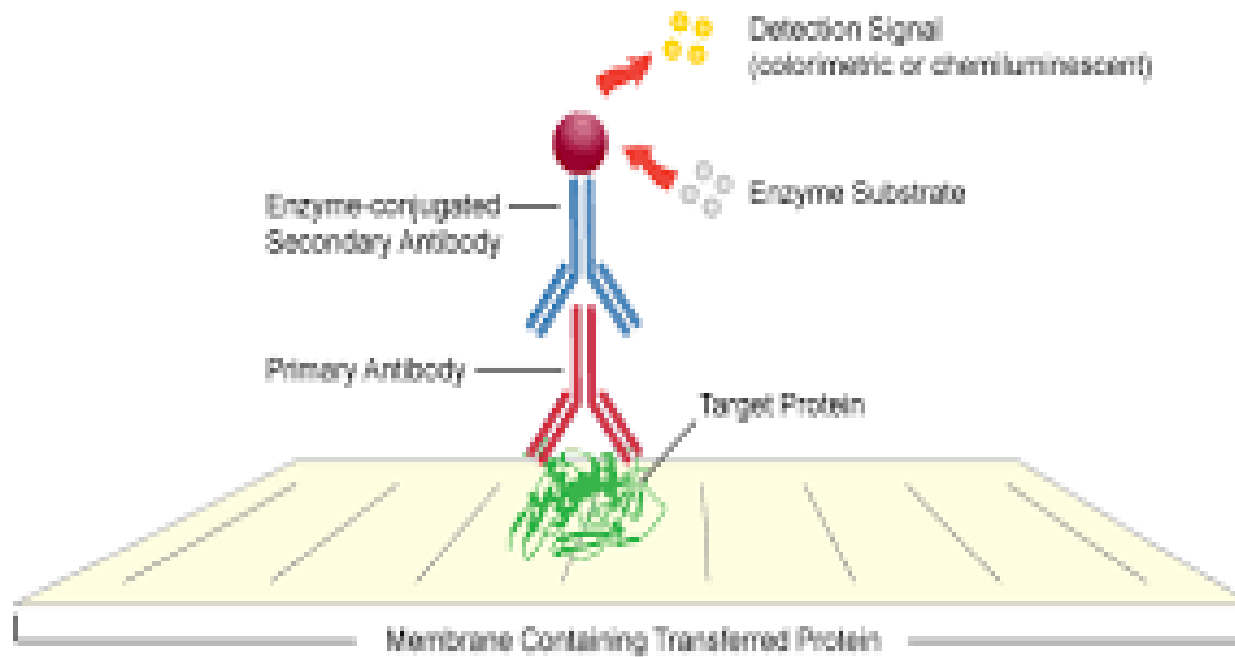


Diagram 2: Illustration of detection in Western Blots.

Técnicas moleculares

- **Útil en caso de microorganismos no cultivables, lábiles o de cultivo lento y difícil**
- **Permite**
 - **Detección microorganismos directamente de muestras**
 - **Detección de múltiples patógenos (PCR-multiplex)**
 - **Identificación de especies, genotipos y estudios epidemiológicos**
 - **Cuantificación para seguimiento**
 - **Estudios de resistencia**
- **Tipos**
 - **Hibridación**
 - **Amplificación ADN/ARN**

Técnicas moleculares

- **Extracción ADN/ARN**
 - **Hibridación: no amplificación de material genético. Uso de sondas específicas (ADN/ARN) específicas para microorganismo a detectar**
 - **PCR: Amplificación de ácidos nucleicos (NAATs)**
 - **Convencional: amplificación y detección en 2 pasos**
 1. **Amplificación**
 2. **Detección**
 - **por hibridación con arrays**
 - **secuenciación**
 - **Tiempo real: amplificación y detección en 1 paso**

Técnicas moleculares

PCR convencional

- **Ventajas**
 - Uso posterior de ADN amplificado
- **Inconvenientes**
 - Riesgo contaminación
 - Tiempo: 2-8 d

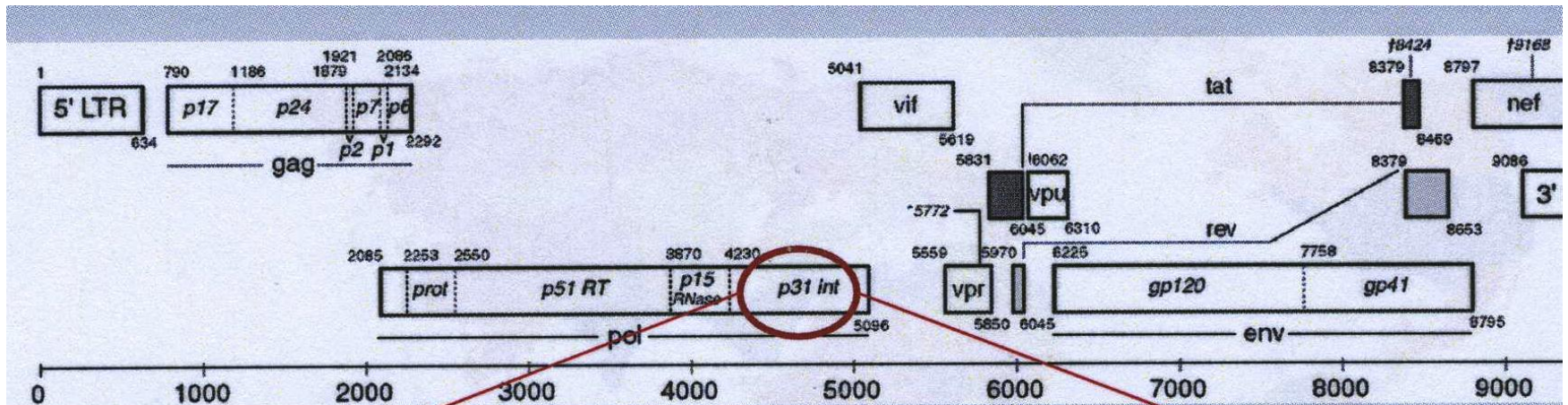
PCR a tiempo real

- **Ventajas**
 - Menor riesgo de contaminación
 - Más rápidas: 3-4 h
 - Mayor sensibilidad
 - Mejor cuantificación
- **Inconvenientes**
 - No permite uso de ADN amplificado para análisis

PCR a tiempo real

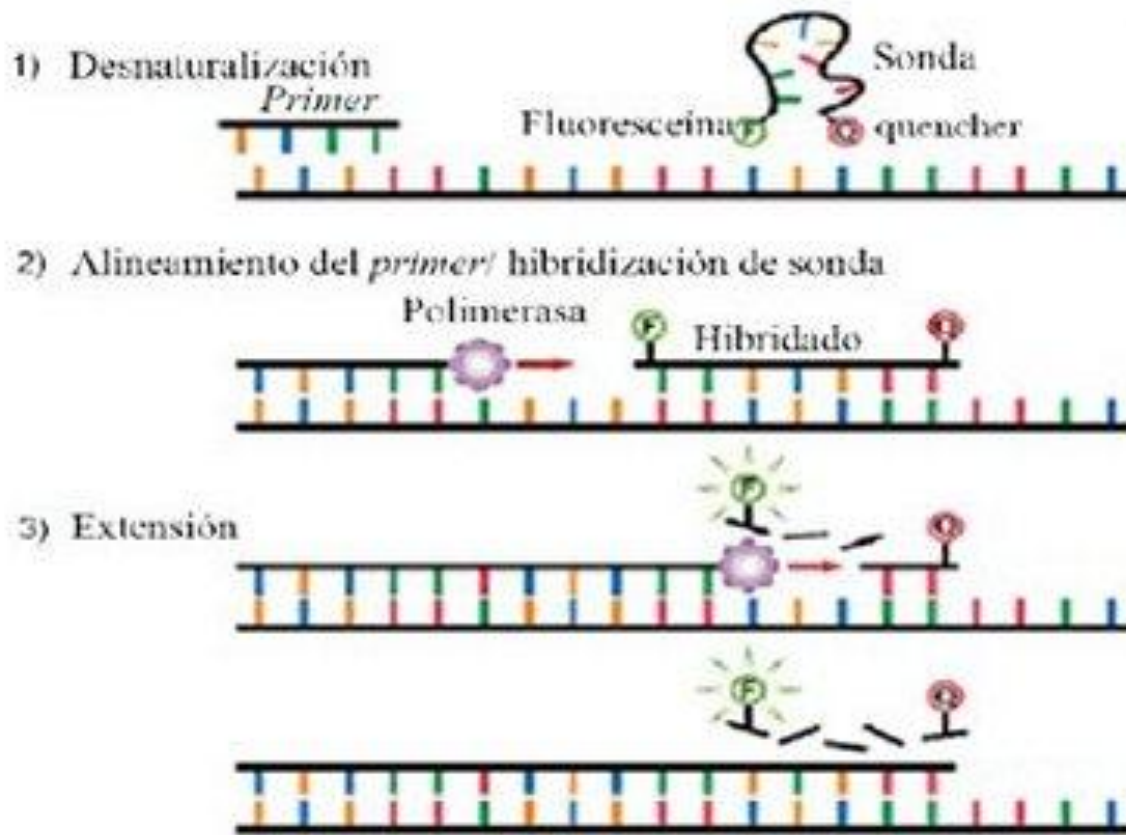
- Cuantificació RNA VIH (carga viral)
- Cuantificación VHC, VHB
- Detecció de *Chlamydia trachomatis* (CT/GC)
- Detección VHS tipo 1 y 2

PCR a tiempo real VIH

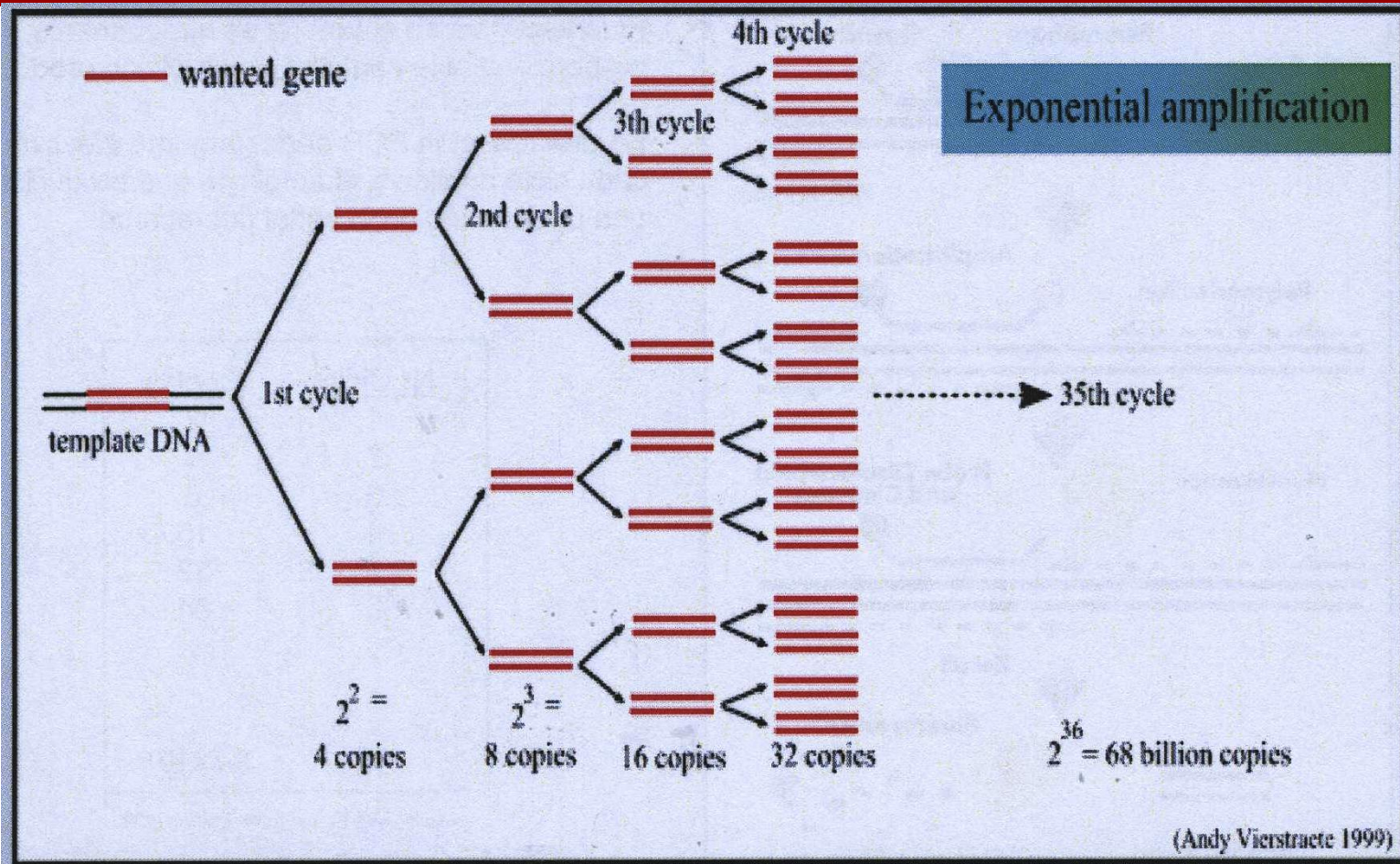


La secuencia diana del HIV-1 es una porción altamente conservada del gen *pol integrase*.

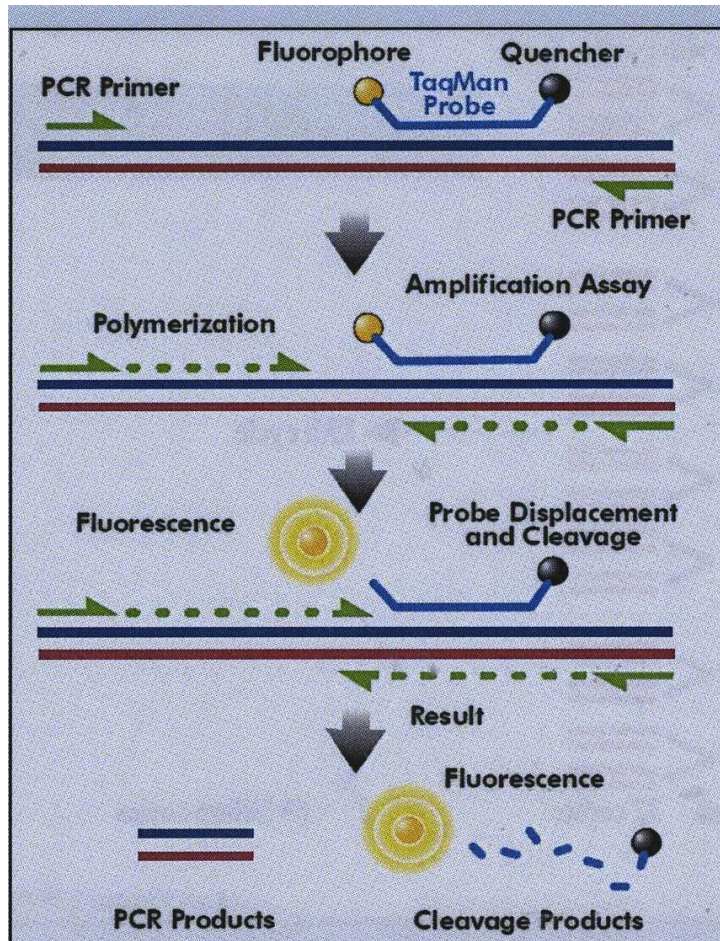
PCR a tiempo real VIH



PCR tiempo real VIH



PCR a tiempo real



Fluorescencia en el umbral es directamente proporcional a la cantidad de amplicón producida.

En una reacción PCR perfectamente efectiva cada ciclo duplicará el amplicón que producirá una duplicación de la señal fluorescente.

<u>Nº Ciclo.</u>	<u>Copias</u>
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
.	.
.	.
.	.
45	3.5×10^{13}

Starting with 1 copy , 100% efficient PCR