

PCR en tiempo real: fundamentos y aplicaciones en investigación, diagnóstico clínico y ambiental



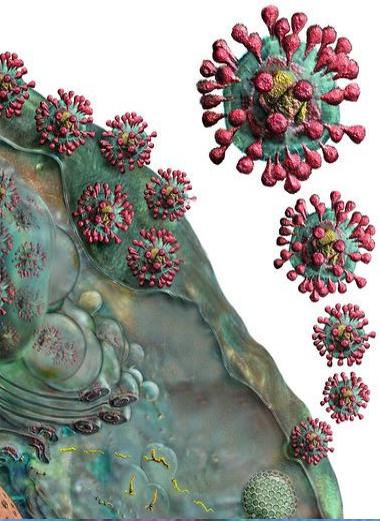
tanirel
BIOTECNOLOGÍA


EDUCACION PERMANENTE
Universidad de la República


FACULTAD DE
CIENCIAS
DISEÑAR | Saber. Actuar.

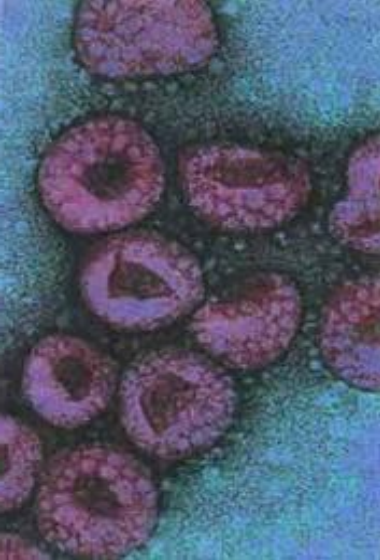


UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



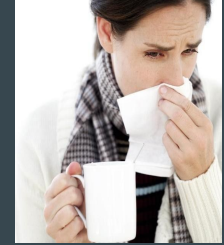
Módulo III

Detección de virus respiratorios



Lic. Virginia Bengochea

Infecciones Respiratorias



- Las infecciones respiratorias (IR) se presentan con una elevada frecuencia en la población.
- Constituyen un problema prioritario de salud a nivel mundial.
- Sintomatología variada y la gravedad del cuadro clínico depende de varios factores (patógeno, inmunidad, etc). Mayor relevancia en adultos mayores y niños.

¿Cómo se clasifican?

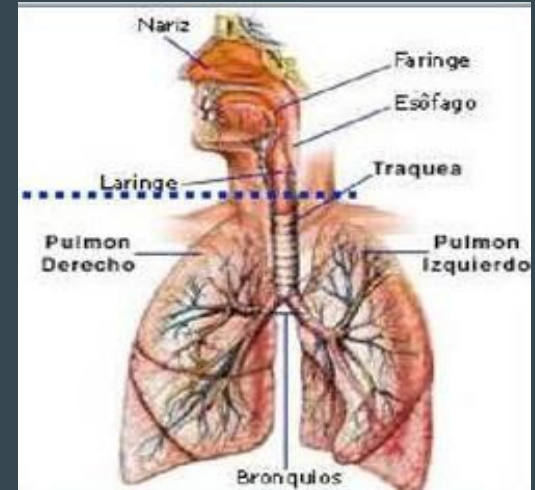
Según la etiología:

- Bacterianas, virales, parasitarias.
- Específicas, inespecíficas.

Altas

Según localización:

Bajas

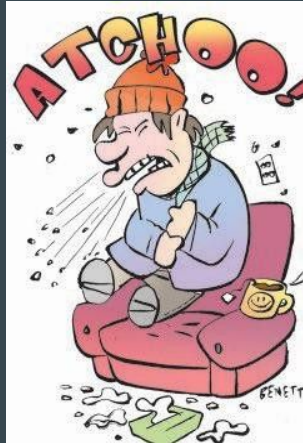


Infecciones respiratorias virales

Principal causa de internación en invierno.

Existen más de 150 virus con potencial patógeno.

Desde un resfriado común hasta neumonías graves.



Infecciones respiratorias virales

¿Cómo se transmiten?

Contaminación de
manos por contacto



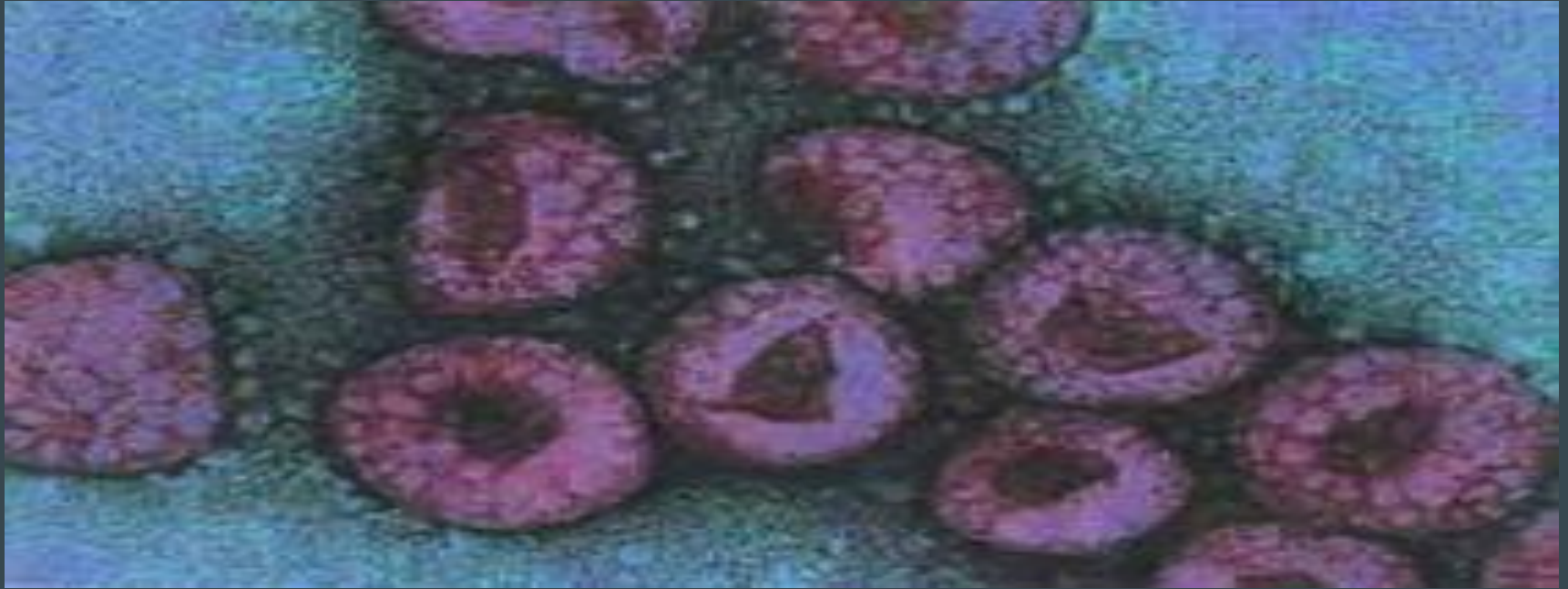
El virus se transmite
por inhalación de las
gotas de saliva que se
expelen al hablar , por
la tos y los estornudos



También se puede transmitir a
través de “fómites” es decir
objetos de diversa índole:
juguetes, perillas contaminadas.



INFLUENZA



INFLUENZA

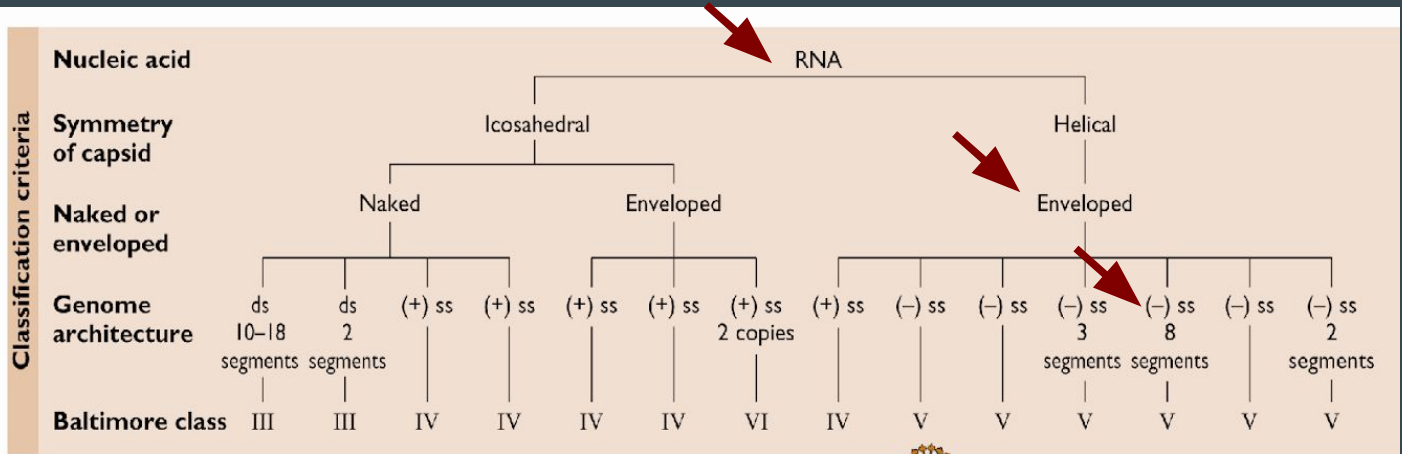
Antecedentes:



Los registros parecen indicar que la **primera pandemia** fue en Asia en el año 1580. Hay reportes de pandemias en los años: 1729, 1789, 1830 y 1898.

En los últimos 300 años han ocurrido alrededor de 10 pandemias.

La etiología de la influenza permaneció desconocida hasta **1930** en que **se logró aislar por primera vez en el laboratorio**, primero en cerdos y después en humanos.



Properties	Family name	Reo	Birna	Calici	Picorna	Flavi	Toga	Retro	Corona	Filo	Rhabdo	Bunya	Orthomyxo	Paramyxo	Arena
	Virion polymerase	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	Virion diameter (nm)	60-80	60	35-40	28-30	40-50	60-70	80-130	80-160	80 x 790-14,000	70-85 x 130-380	90-120	90-120	150-300	50-300
	Genome size (total in kb)	22-27	7	8	7.2-8.4	10	12	3.5-9	16-21	12.7	13-16	13.5-21	13.6	16-20	10-14

Influenza

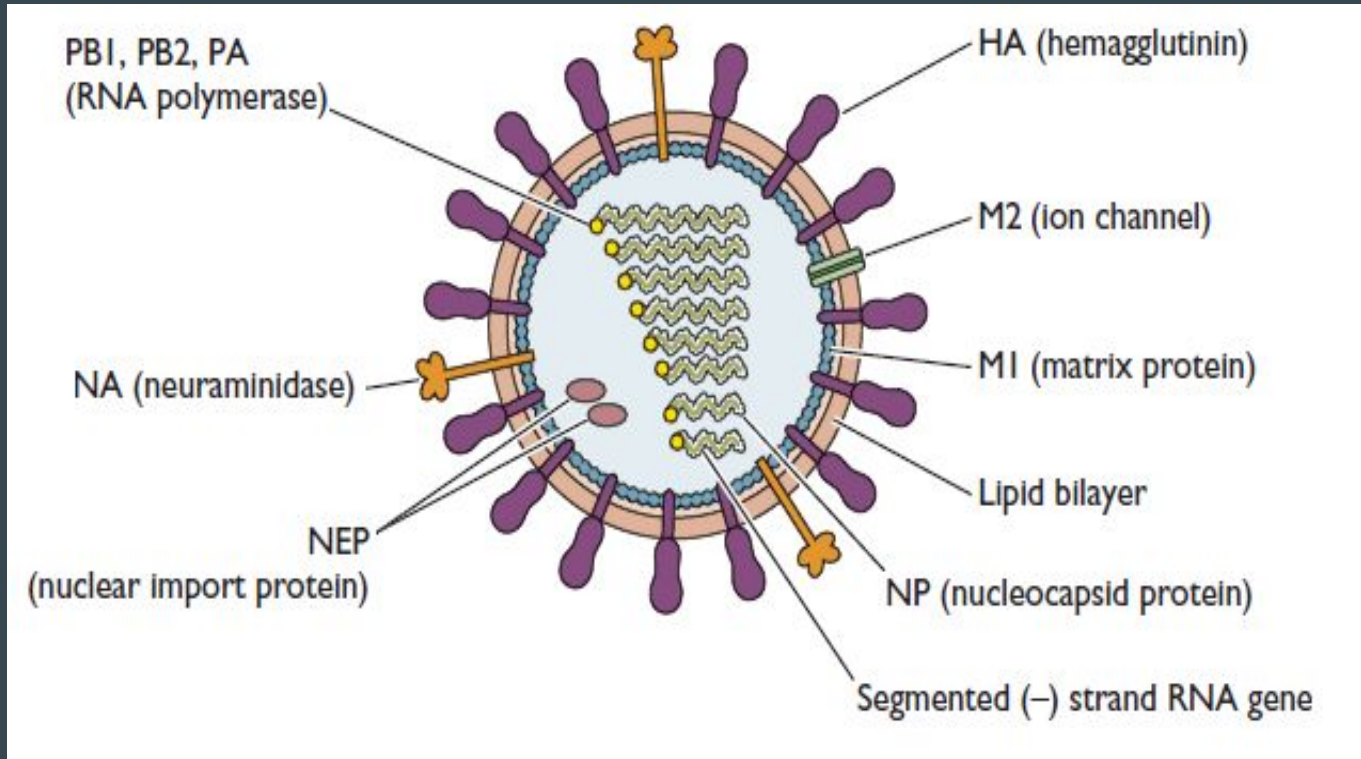
Familia *Orthomixoviridae* (*mixo* proviene del griego: *mixa*) y refiere a la afinidad por los mucopolisácaridos y glicoproteínas, en particular células que presentan Ac. Siálico en el extremo de sus glicanos.

Morfológicamente variable (pleomórficos) con un diámetro que varía entre los 80 y 200 nm.

Genoma ARNsh (-), con 8 segmentos y 7 para Influenza C

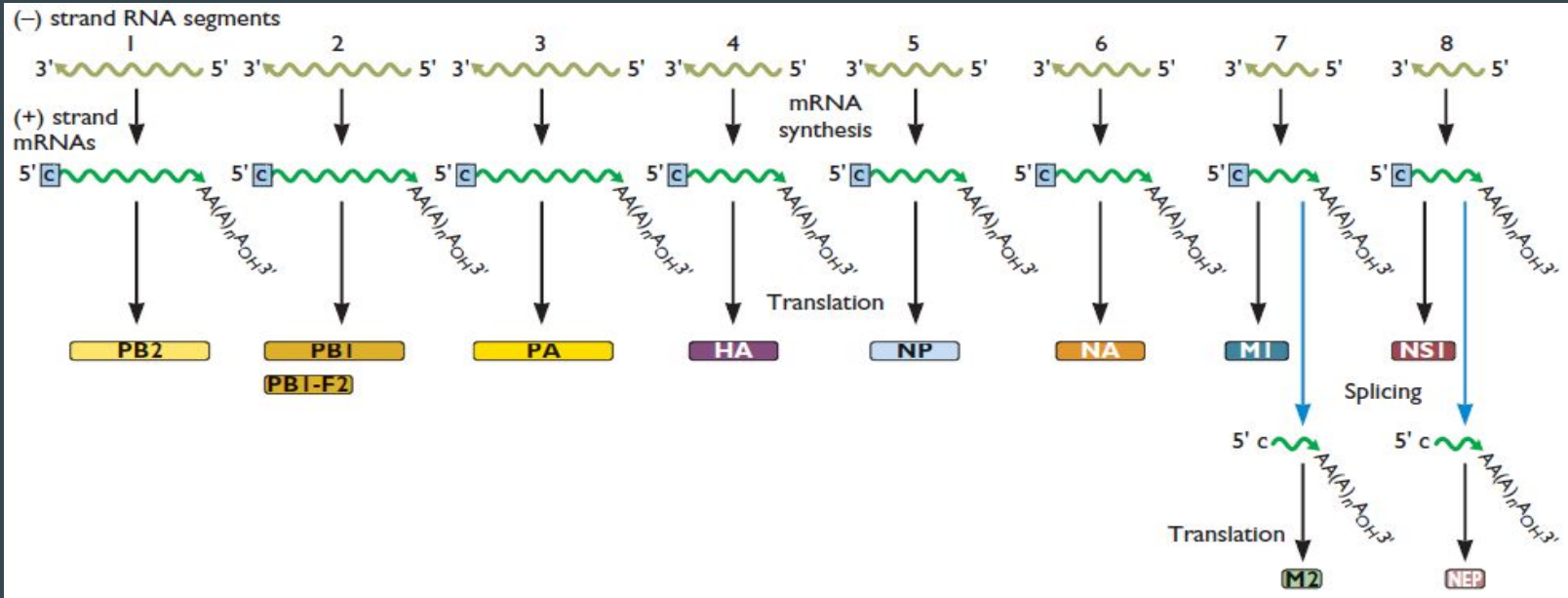
Virus envuelto con nucleocápside helicoidal.

Influenza



Organización genómica

Influenza

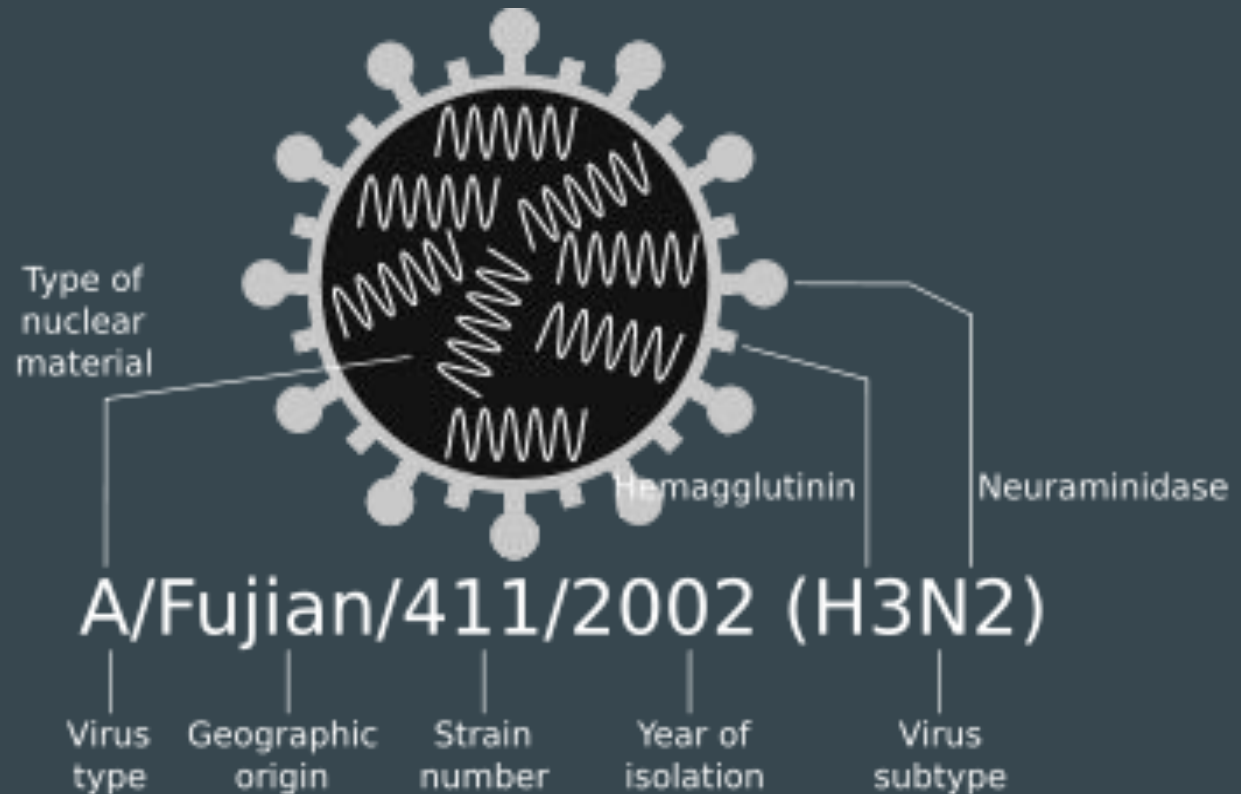


Involucrada en la modulación de la expresión génica (cliva el CAP de los ARNm cel y promueve la traducción viral)

Seg 2 tiene un corrimiento del marco de lectura y traduce 2 proteínas

Splicing
alternativo

Nomenclatura



Profilaxis: Vacunación

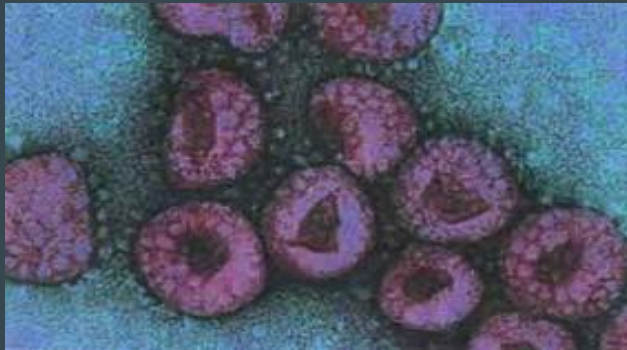
Composición de la vacuna recomendada por la OMS para el hemisferio sur (huevos embrionados/cultivo celular):

A/Victoria/2570/2019(H1N1)pdm09-likevirus/A/Wisconsin/588/2019
(H1N1)pdm09-like

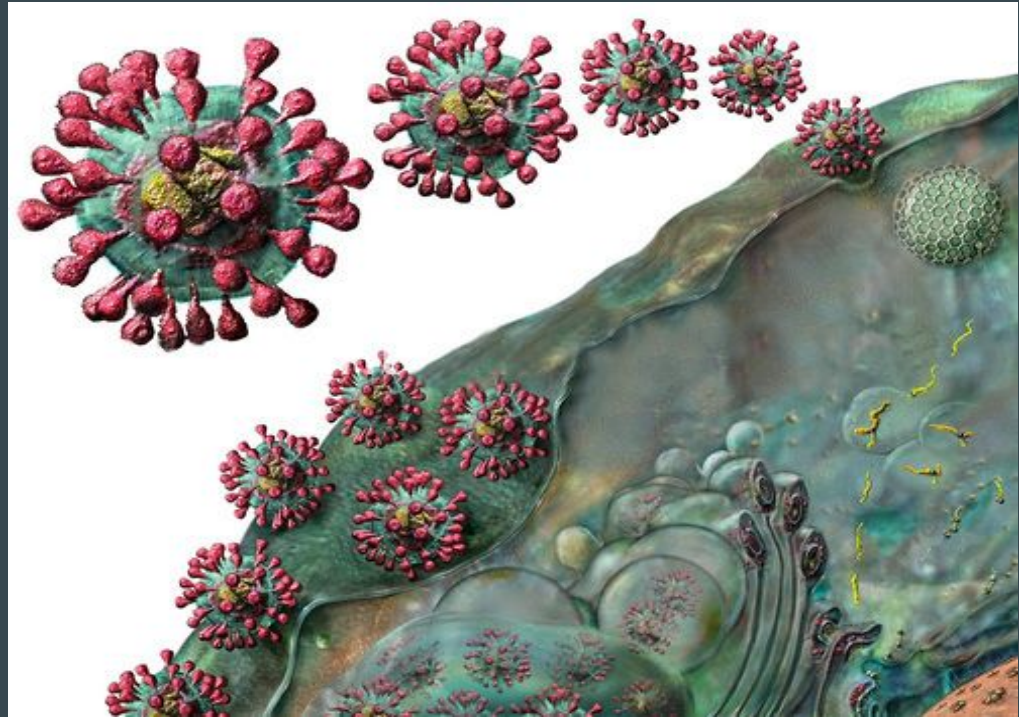
A/Darwin/9/2021(H3N2)-like virus/A/Darwin/6/2021(H3N2)-like virus

B/Austria/1359417/2021-like virus (Victoria)

B/Phuket/3073/2013-like virus (Yamagata)



CORONAVIRUS

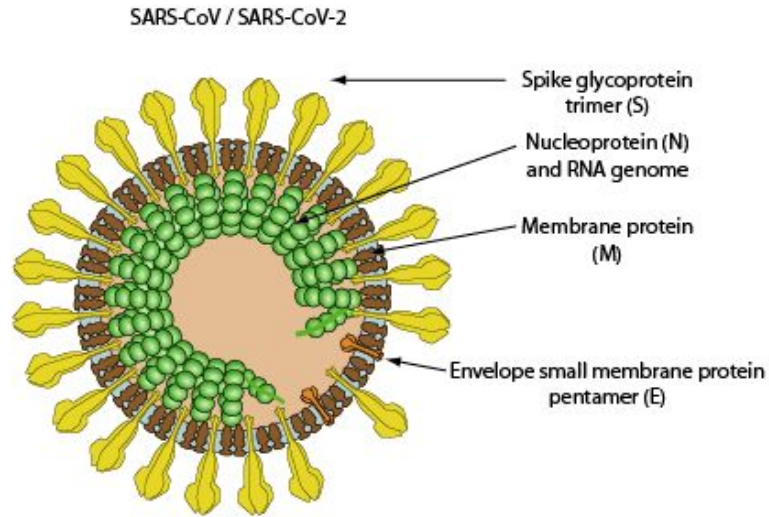


En contexto...

- El 31 de diciembre de 2019 la OMS era alertada de un brote de neumonía en Wuhan (CHINA), de etiología desconocida.
- Rápidamente se identifica como el agente causal perteneciente al género *Betacoronavirus* y se le asigna la nominación de SARS-CoV 2.
- A mediados de enero de 2020 ya se disponía de la secuencia completa del genoma de ARN del virus.
- La OMS publica los protocolos autorizados para facilitar la implementación del diagnóstico en todo el mundo.
- Marzo 2020 la OMS declara la pandemia por este virus.
- **Primeros casos en nuestro país: 13 de marzo 2020**



SARS-CoV 2



© ViralZone 2020
SIB Swiss Institute of Bioinformatics

Virus envuelto, esférico,
120nm diámetro.

Genoma ARNsc asociado a proteína N formando nucleocápside.

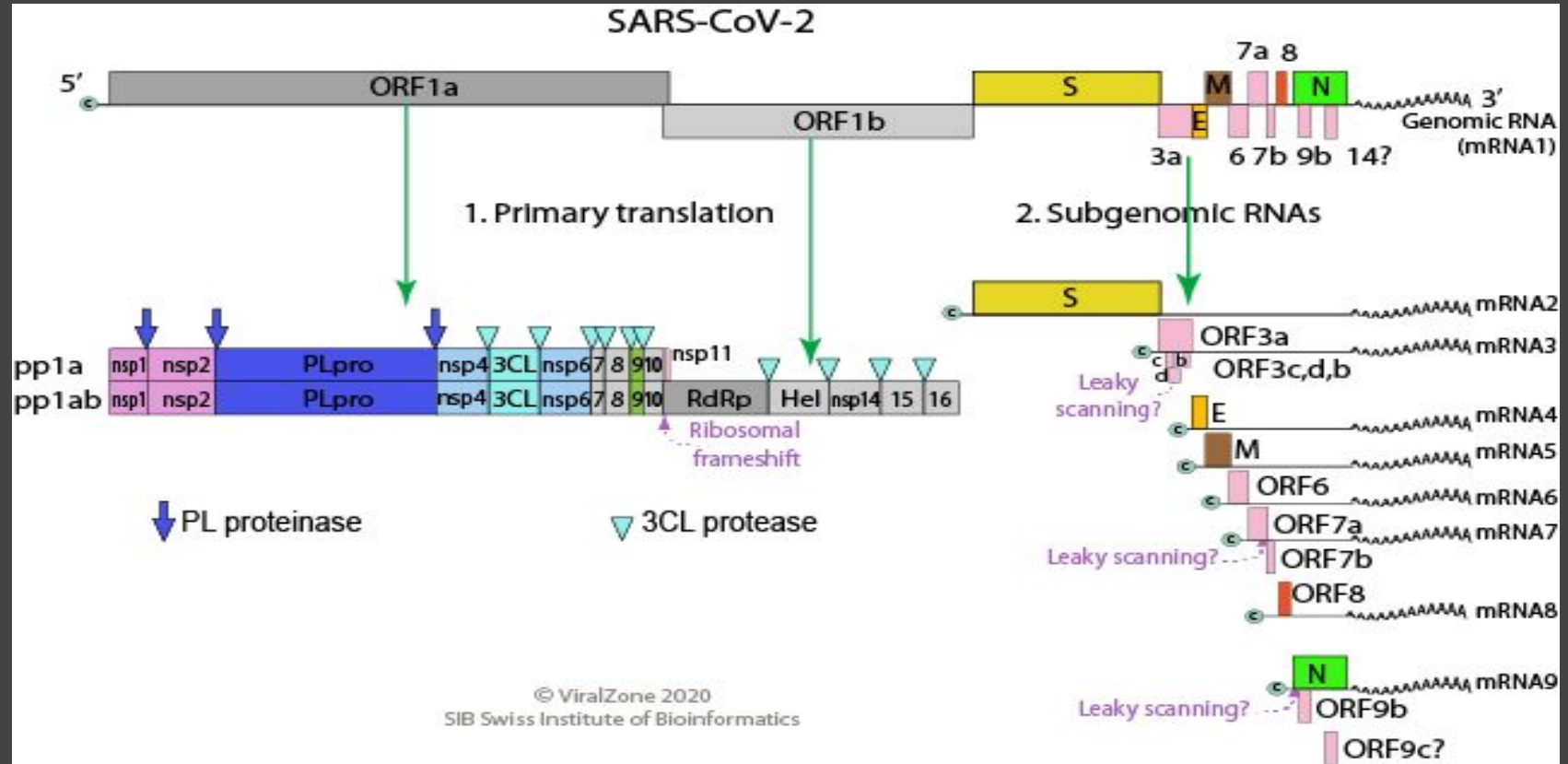
Glicoproteína S (*Spike*), trímero que hace contacto con el receptor celular.

Diagnóstico de SARS-CoV 2

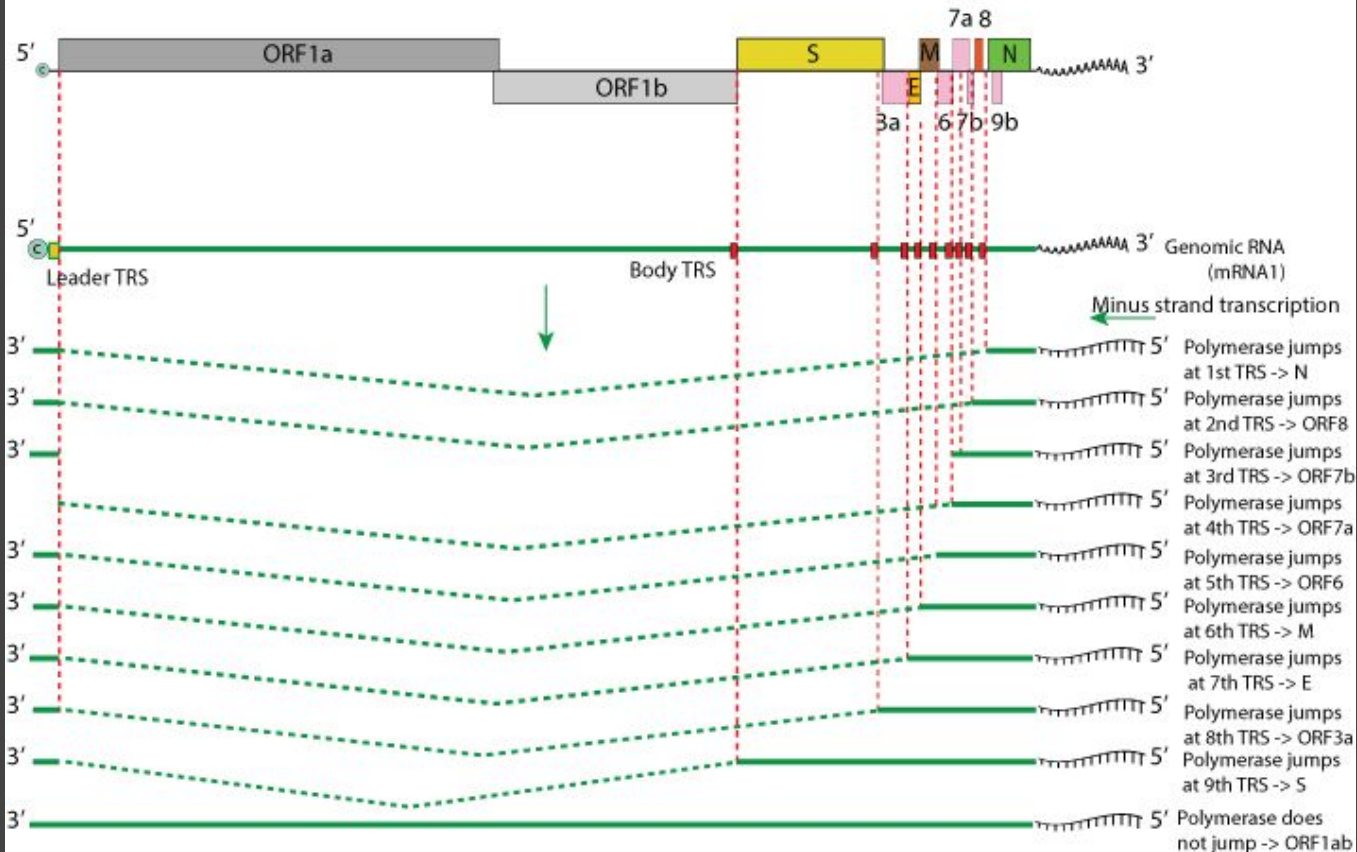
Summary table of available protocols in this document

Institute	Gene targets
China CDC, China	ORF1ab and N
Institut Pasteur, Paris, France	Two targets in RdRP
US CDC, USA	Three targets in N gene
National Institute of Infectious Diseases, Japan	Pancorona and multiple targets, Spike protein
Charité, Germany	RdRP, E, N
HKU, Hong Kong SAR	ORF1b-nsp14, N
National Institute of Health, Thailand	N

Diagnóstico de SARS-CoV 2



Discontinuous transcription



En contexto...

[NOSOTROS](#)[SALUD HUMANA](#)[COVID-19](#)[PRENATAL](#)[SALUD VETERINARIA](#)[BIOTECH](#)[CO-WORK](#)[CONTACTO](#)[ENGLISH](#)

NOSOTROS

[🏠 → Nosotros](#)

¿QUIÉNES SOMOS?

Empresa

Somos una empresa biotecnológica de capitales nacionales, fundada en el año 2001. El origen de ATGen como el primer *spin off* incubado en la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República determina el carácter innovador que la define y le ha valido múltiples premios y reconocimientos.

En la actualidad contamos con 3 divisiones, **Salud Humana**, **Salud Veterinaria** y **Co-Work** abocadas en conjunto al desarrollo, la fabricación y representación de productos biotecnológicos innovadores, así como a brindar servicios a instituciones de salud pública y privada, nacionales y regionales. Somos la única empresa



Salud humana y animal

- Diagnóstico (salud humana)
 - Herpes – CMVq – EBVq
 - HIVc y HIVq
 - HBVc y q – HCVc y q
 - Bordetella
 - HPVd y HPV genotipificación (alto y bajo riesgo).
 - Mutaciones genómicas

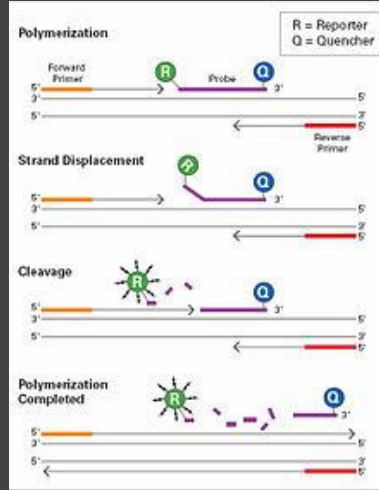
Optimización de Multiplex RTqPCR para detección simultánea de Influenza y Covid

Múltiplex FluAB CoV



Oligont

+



+

Retrotranscriptasa

+

TaqPolimerasa

+

dNTPs

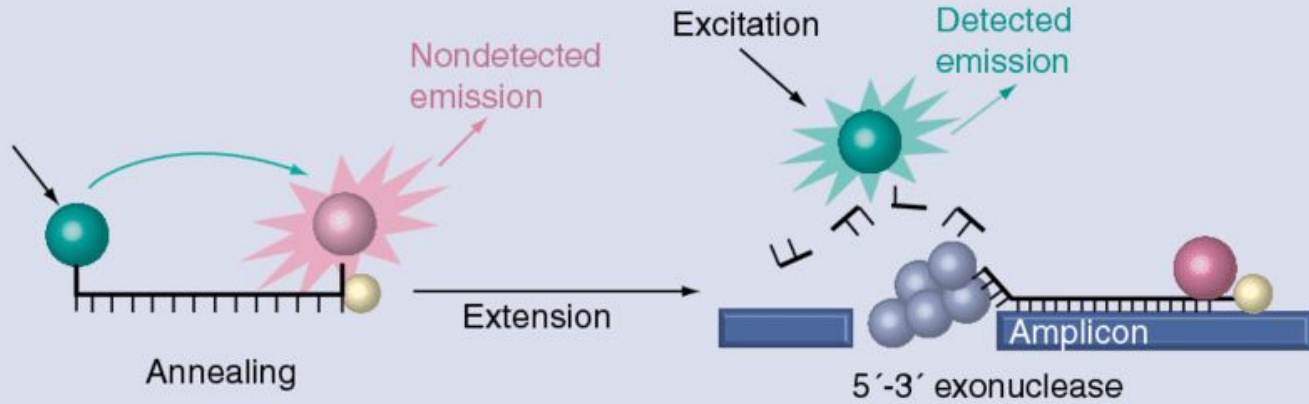
+

Buffers

Sonda TaqMan

Diagnóstico *In House*

Multiplex FluAB CoV



Reporter



Quencher



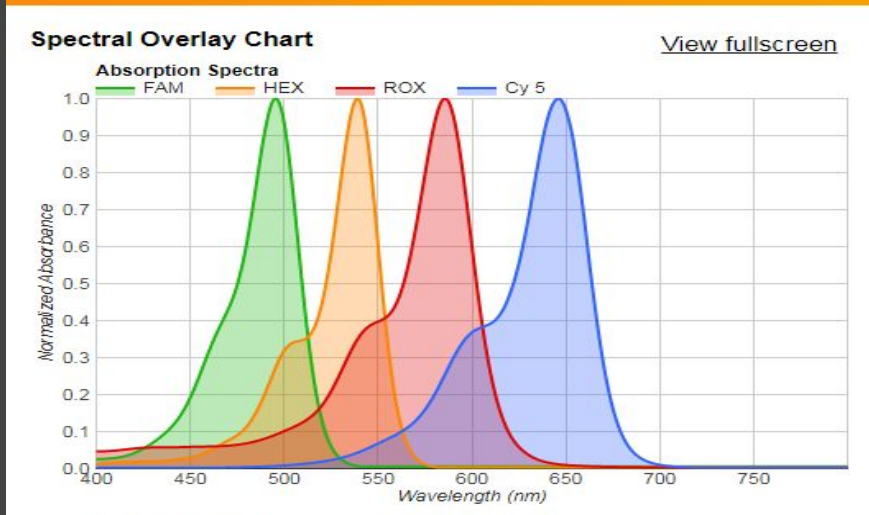
Taq polymerase



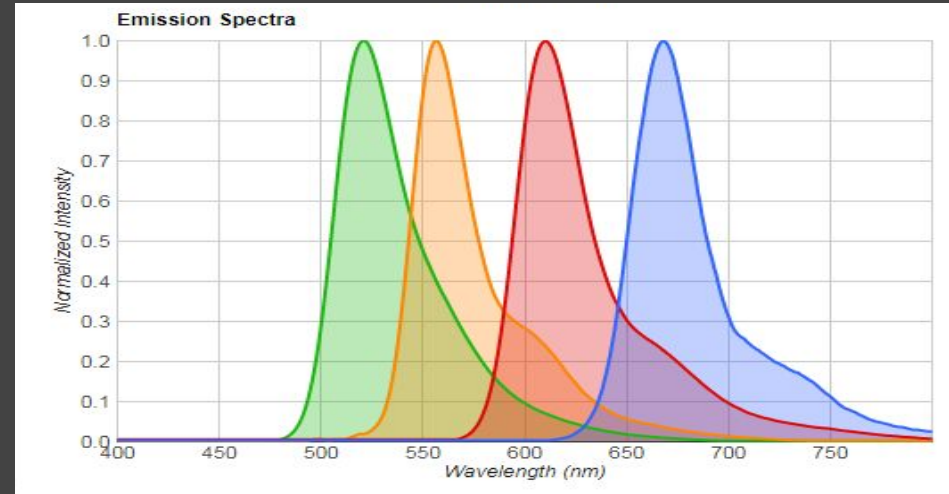
Phosphate



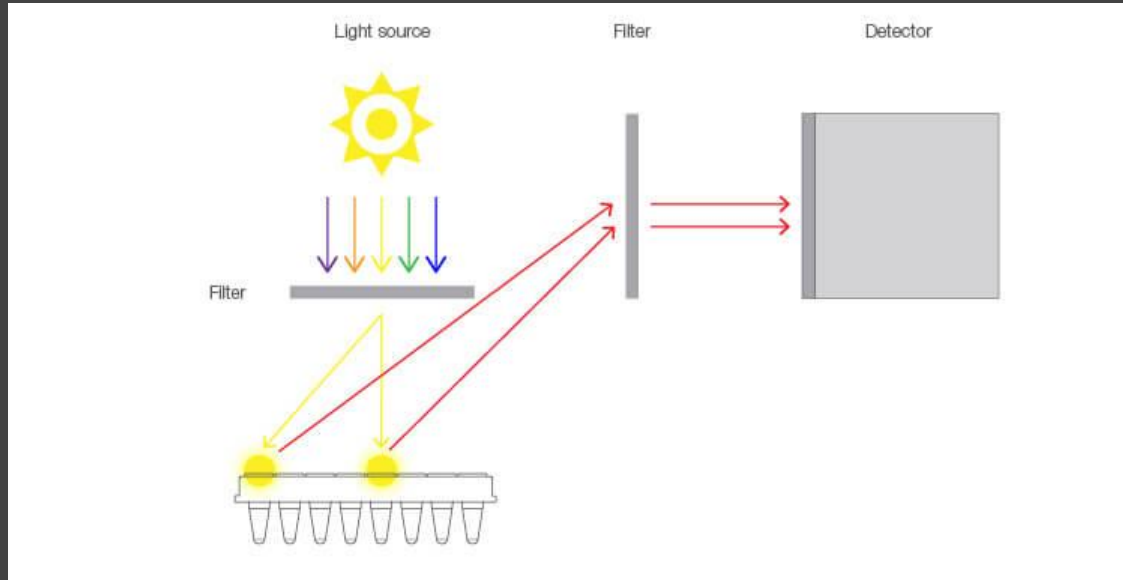
Multiplex FluAB CoV



Multiplex??

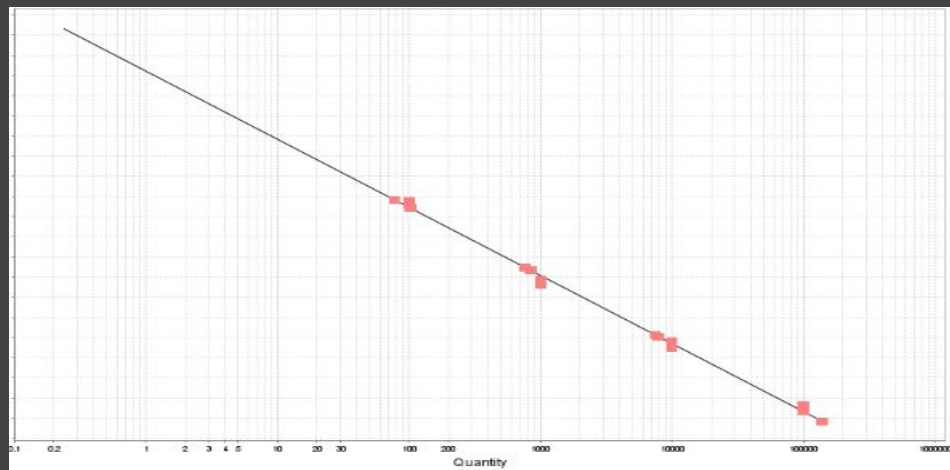
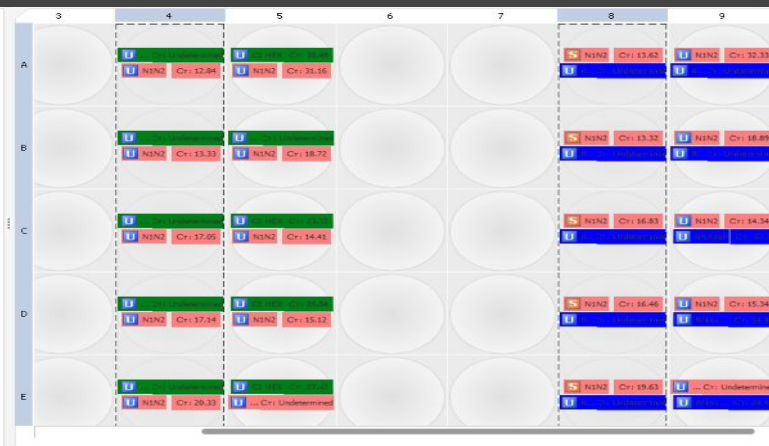
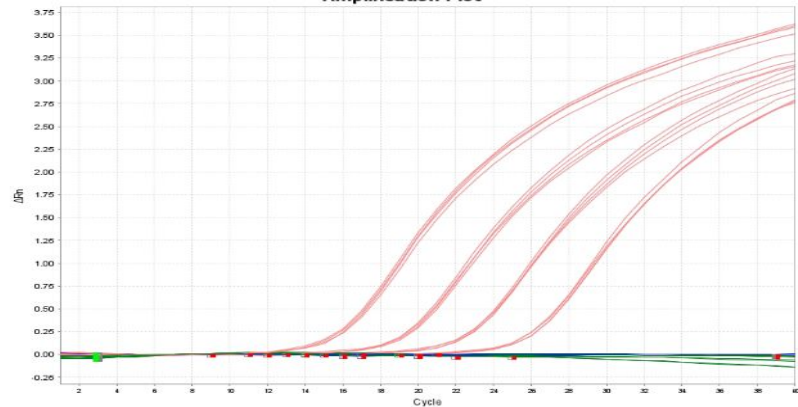


Multiplex FluAB CoV

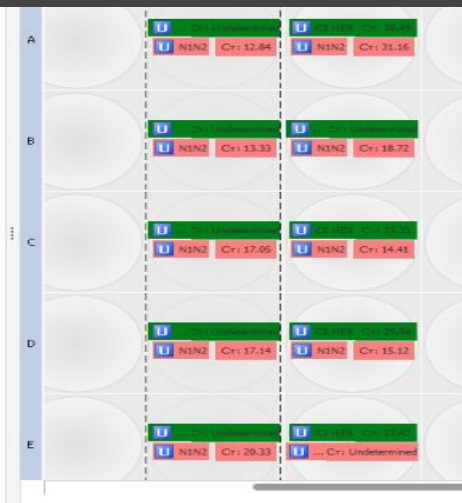


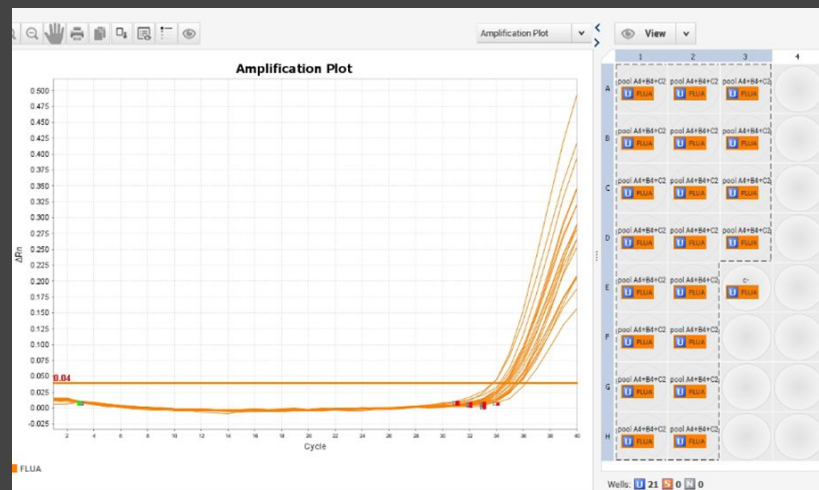
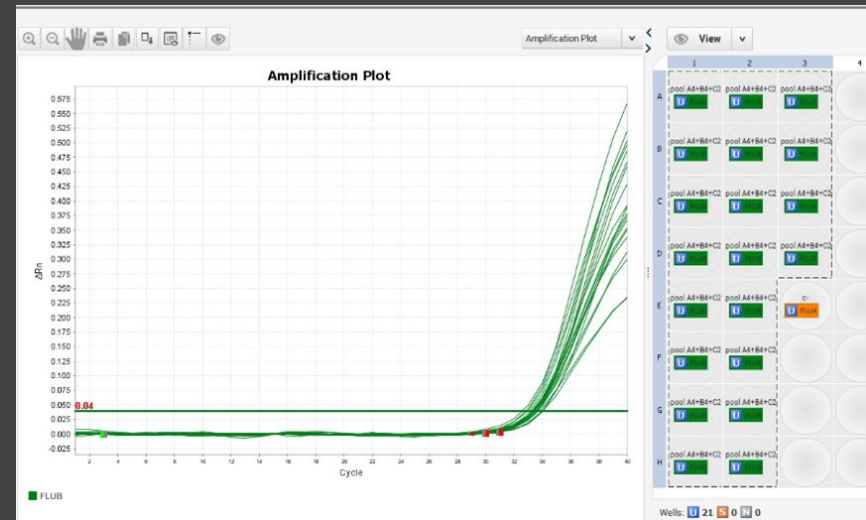
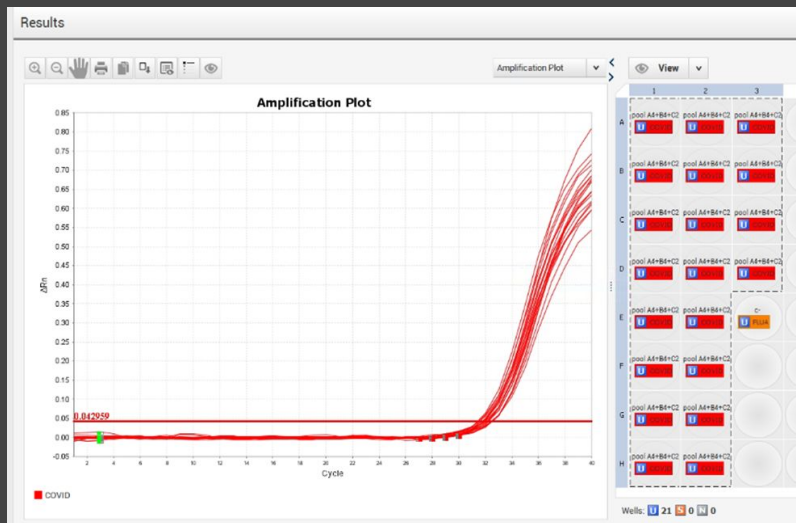
Para que usar una referencia pasiva?

Amplification Plot



Target: N1N2 Slope: -3.381 Y-Inter: 30.227 r^2 : 0.995 Eff_{95%}: 97.593 Error: 0.096





Interpretación de Resultados

	FAM (FLU A)	HEX (FLU B)	ROX (SARS CoV2)	Cy5 (Control Interno)
Control negativo	No amplifica	No amplifica	No amplifica	No amplifica
Control positivo	$Ct \leq 30$	$Ct \leq 30$	$Ct \leq 30$	No amplifica
Muestra positiva	$Ct < 35$	$Ct < 35$	$Ct < 35$	Irrelevante
Muestra negativa	No amplifica	No amplifica	No amplifica	$Ct \leq 35$
Muestra Indeterminada*	$35 \leq Ct \leq 39$	$35 \leq Ct \leq 39$	$35 \leq Ct \leq 39$	$Ct \leq 35$
Muestra Invalida*	No amplifica	No amplifica	No amplifica	>35 o No amplifica