

Desarrollo de un formato estabilizado de PCR en tiempo real para el diagnóstico molecular

A.A. Benito, J.L. Arnal, B. García, J.D. Serrano, L. Pradas, F. Beiloune, G. Chacón y R. Baselga

EXOPOL S. L. Pol. Rio Gállego, D/8, San Mateo de Gállego. Zaragoza

www.exopol.com

abenito@exopol.com



Equipo EXOPOL.

EXOPOL S.L., es una spinoff de la Universidad de Zaragoza con más de 20 años de experiencia en diagnóstico y producción de autovacunas en sanidad animal; áreas a las que dedica más del 50% de su esfuerzo en I+D+i y en las que mantiene colaboraciones con más de 25 grupos de investigación a nivel nacional e internacional.

A lo largo de su trayectoria, la empresa ha obtenido financiación para llevar a cabo diversos proyectos de investigación (CDTI) destinados principalmente a mejorar el diagnóstico actual y la producción de vacunas en el ámbito veterinario.

La gran experiencia de EXOPOL en estas áreas, incluido el diagnóstico molecular mediante PCR en tiempo real (qPCR), ha permitido que la empresa lleve a cabo el diseño y la validación de sus propios ensayos, a los que ha designado como «**EXOone qPCR**» y que cuentan con importantes ventajas comparado a la mayoría de kits comerciales de este tipo disponibles en el mercado. El ensayo **EXOone**

qPCR, hace uso de una nueva tecnología para estabilizar todos los reactivos necesarios de la reacción en los pocillos de una placa o tiras de qPCR, lo que ha permitido obtener un producto «ready to use», con almacenamiento a 4°C, además de otras ventajas.

Actualmente, la empresa continúa diseñando nuevos productos y buscando colaboraciones con grupos de investigación interesados en aplicar esta tecnología en otras áreas del diagnóstico molecular como son salud humana, agro-alimentaria o medio ambiente entre otras.

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE EXOone qPCR KIT

La identificación molecular de agentes infecciosos ha incrementado considerablemente debido a la mejor sensibilidad y especificidad de estas técnicas en comparación

con los métodos tradicionales de detección. Sin embargo, aunque numerosas qPCR son utilizadas para este fin, tanto comerciales como de desarrollo propio, la mayoría tiene escasa o nula validación para su utilización como adecuadas herramientas de diagnóstico.

Con la finalidad de cumplir los estándares internacionales de acreditación de laboratorios clínicos, varios países han empezado a implementar normativas para regular el diseño y la validación de las técnicas moleculares como herramientas de diagnóstico, tal como lo han descrito recientemente Burd et al (2010) y Saunders et al (2013). En EXOPOL hemos seguido estos criterios con la finalidad de brindar un producto de calidad y que sea a la vez rápido y sencillo de utilizar.

Los resultados de la validación de ensayos **EXOone qPCR** para la identificación de patógenos relevantes en nuestro sector como son: *Coxiella burnetii* (Villa et al, 2012a), *Leptospira* patógena (Villa et al, 2012b), *Toxoplasma gondii* (Benito et al, 2012), *Mycoplasma agalactiae* (Villa et la 2011), *Mycoplasma bovis* (Villa et al, 2013), etc; han sido presentados en varios congresos nacionales e internacionales de gran relevancia como son el WAVLD, EAVLD, AVEDILA, SEM, entre otros. Adicionalmente, se ha realizado desarrollo de otros ensayos de qPCR para la identificación de patógenos bacterianos, parasitarios o virales de interés veterinario, cuyos resultados se encuentran actualmente en proceso de publicación (para una lista detallada visite: www.exopol.com).

La validación de los ensayos **EXOone qPCR** incluyen la determinación de:

- **Sensibilidad analítica:** El rango reportable de cuantificación fue calculado utilizando controles positivos sintéticos previamente diseñados y validados (Villa et al, 2012c) para cada ensayo, los cuales han permitido determinar unos límites mínimos (LLOQ) y máximos de cuantificación (ULOQ) de entre 10^1 hasta 10^9 copias del patógeno/reacción, con una buena linealidad (Figura 1).
- **Estudios de intra e inter-ensayo para determinar la Precisión:** Encontrándose en estos ensayos, coeficientes de variación (CV) de entre un 0,5% a un 12%, con los mayores niveles de variación en las muestras con concentraciones más bajas (10^1 copias/reacción). Estos resultados demuestran una excelente repetibilidad y reproducibilidad de los ensayos **EXOone qPCR** (Figura 2).
- **Estudios de concordancia:** Mediante la evaluación de un panel de cepas de referencia, cepas vacunales, cepas de campo y casos clínicos positivos y negativos a cada patógeno; los cuales son evaluados en paralelo con los ensayos comerciales de qPCR más importantes en el mercado (LSI, Adiagen, Ingentix, etc) para determinar el nivel de concordancia. Los ensayos **EXOone qPCR** han demostrado tener una excelente concordancia (Kappa 0,87 a 1,0) con los kits de qPCR ofrecidos por las empresas relevantes en nuestro sector.
- **Estudios de especificidad:** En un estudio que incluye la evaluación de un panel de entre 25 a 45 microor-

ganismos (bacterias, virus y parásitos) relacionados genéticamente, que causan enfermedades relacionadas o co-infecciones, o que pueden encontrarse como microbiota natural en las muestras seleccionadas.

PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LOS ENSAYOS EXOone qPCR

La nueva tecnología empleada en los ensayos **EXOone qPCR**, al estabilizar todos los reactivos necesarios en poc-

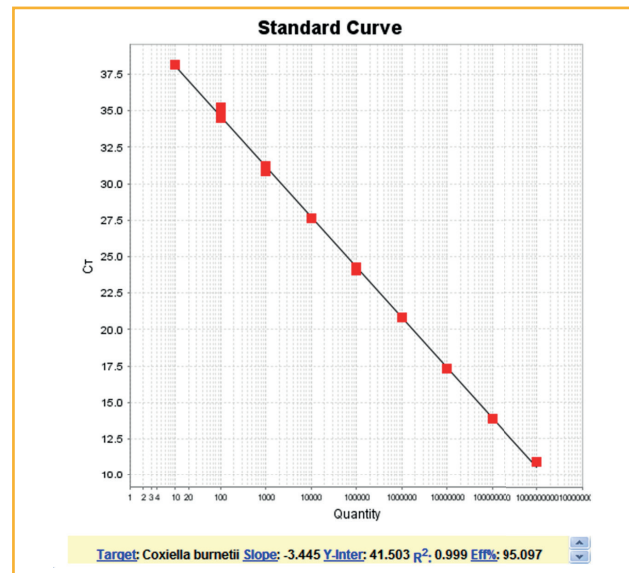


Figura 1. Rango reportable de cuantificación para el ensayo *Coxiella burnetii* EXOone qPCR. El LLOQ determinado fue de 10^1 copias/reacción.

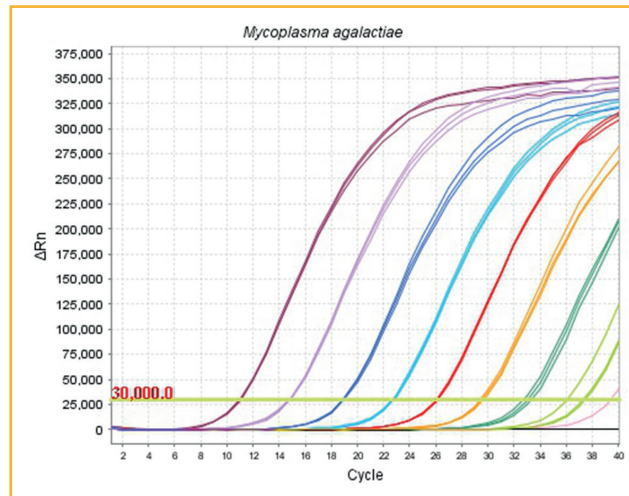


Figura 2. Estudio de intra-ensayo para el *Mycoplasma agalactiae* EXOone qPCR. Cada dilución del standard (CP) fue evaluada por triplicado.

llos, permite una preparación más rápida de la qPCR; puesto que sólo necesita la adición de agua DEPC (suministrada con el kit) y la muestra de ácidos nucleicos, antes de llevar la reacción al termociclador. Esto hace que la labor del técnico sea mucho más sencilla y evita además los posibles errores de pipeteo durante la preparación del ensayo, con la consecuente mejora en la repetibilidad y reproducibilidad del mismo.

El estabilizado permite también almacenar estos kits de qPCR a temperaturas de refrigeración (+4°C a +8°C) sin la necesidad de congelarlos; lo que supone una gran ventaja práctica puesto que facilita el transporte y evita el tedioso proceso de descongelación de los diferentes reactivos necesarios para preparar una mezcla en un ensayo de qPCR habitual.

Otra característica importante de los ensayos **EXOone qPCR** es que todos han sido diseñados para utilizar el mismo protocolo térmico; lo que permite la posibilidad de evaluar en una misma carrera de amplificación varios patógenos, reduciendo costes y recursos. Esta ventaja de nuestros ensayos permite diseñar paneles específicos de diagnóstico al gusto del cliente, tal como el que se aprecia a continuación (Figura 3).

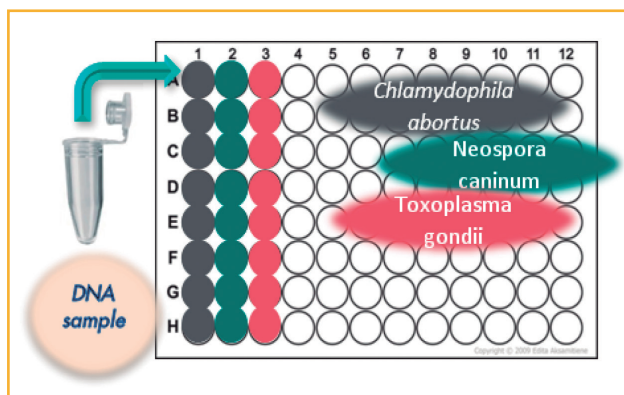


Figura 3. Panel reproductivo para la evaluación simultánea (multiparamétrica) de *Chlamydomphila abortus*, *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii*.

La detección de resultados falsos negativos es de gran importancia en cualquier técnica de diagnóstico. Por este motivo, los ensayos **EXOone qPCR**, llevan incluidos para cada reacción un control endógeno (detectado mediante el canal HEX/VIC), el cual ha sido diseñado y validado para la identi-

ficación de un gen constitucional (β -actina) en los diferentes tipos de muestras de las especies animales de mayor relevancia en el diagnóstico veterinario (Benito et al., 2013). La amplificación del control endógeno está ajustada para no interferir con la amplificación específica del patógeno a evaluar. El uso de estos controles endógenos permite verificar el proceso de extracción y la ausencia de posibles inhibidores en la reacción de amplificación. Tal como se viene haciendo en el diagnóstico rutinario realizado en nuestro laboratorio.

Por otro lado, el uso de un control positivo sintético, específico para cada uno de nuestros ensayos, y el cual se suministra en una concentración determinada, permite el uso de estos ensayos para la cuantificación absoluta o relativa del patógeno a evaluar.

En resumen, el ensayo estabilizado **EXOone qPCR**, debido a su formato «ready to use» y su cuidada validación, son una excelente herramienta diagnóstica para la identificación o cuantificación de patógenos de interés veterinario, destacando no sólo por su sensibilidad y especificidad sino también por su facilidad de uso.

BIBLIOGRÁFICA

- Benito AA, Arnal JL, de Tomas E, et al. (2013). Internal controls for reliable results in real-time pcr diagnostic assays. WAVLD, Berlín.
- Benito AA, Villa A, Serrano JD, et al. (2012). Desarrollo de una PCR en Tiempo Real para el diagnóstico de *Toxoplasma gondii*. SEM IX reunión grupo Microbiología Molecular. Mallorca.
- Burd Eileen M. (2010). Validation of Laboratory-Developed Molecular Assays for Infectious Diseases. Clinical Microbiology Reviews. 550-576
- Saunders N, Zambon M, Sharop I, et al. (2013). Guidance on the development and validation of diagnostic tests that depend on nucleic acid amplification and detection. Journal of Clinical Virology 56:260-270.
- Villa A, Arnal JL, Serrano DJ, et al. (2012). Development and validation of a Real-Time PCR Zen Gel Mix for the diagnosis and quantification of *Coxiella burnetii*. EAVLD, Polonia.
- Villa A, Benito AA, Bernal JL et al. (2012). Leptospirosis: Diagnóstico mediante PCR en tiempo real y aislamiento microbiológico. AVEDILA, Badajoz.
- Villa A, De Tomás E, Benito AA, Arnal JL, Serrano JD. (2012). Evaluation of cloned genes as quantitative controls in Real-Time assays for infectious diseases with veterinary importance. SEBBM, Sevilla.
- Villa A, Fernández A, JL Arnal, et al. (2011). Desarrollo y validación de una ZEN Real Time PCR Gel Mix para la detección y cuantificación del gen (mp81) de *Mycoplasma agalactiae*. AVEDILA, Tenerife.
- Villa A, Serrano JD, Benito AA, et al. (2013). Targeting *uvrC* gene for *Mycoplasma bovis* Gel Mix Real Time PCR. WAVLD, Berlín.