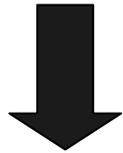


Métodos Alternativos en la
Detección de *Legionella*
LA PCR

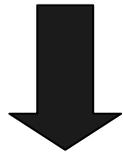
Jordi Dellundé. LABORATORIS ALTIMIR S.L.

LA PCR

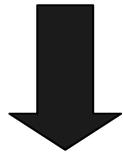
**Extracción de ADN de los
microorganismos presentes en la
muestra**



Selección de una región de su ADN
*Región del gen *Lmip* específico de *L. pneumophila**



Realización de múltiples copias



Revelado



LA PCR: Principales Ventajas

1. Mayor sensibilidad que el método oficial (I SO 11731)
2. Especificidad. La utilización de iniciadores “primers” específicos conjuntamente con unas condiciones adecuadas de estringencia hacen que la sea muy específica
3. Rapidez. Se pueden obtener resultados en dos días como máximo y procesar un elevado número de muestras
4. Posibilidad de detectar más de un microorganismo en la misma reacción mediante (Multiplex PCR)
5. Bajo coste de los reactivos en comparación con los medios de cultivo utilizados en el método oficial (I SO 11731)

LA PCR: Principales Inconvenientes

1. Imposibilidad de distinguir entre microorganismos viables y no viables ya que lo que se detecta son secuencias de ADN
2. Es un método cualitativo por lo que no permite realizar la cuantificación de los microorganismos presentes en la muestra
3. El elevado número de pasos que se han de realizar hasta la obtención del resultado pueden favorecer que se produzca alguna contaminación cruzada
4. La necesidad de disponer en el laboratorio de unos espacios bien delimitados para cada proceso
5. Necesidad de disponer de personal cualificado, lo que encarece el coste del análisis

LA PCR: Alternativas a Dos de los Principales Inconvenientes

QUANTIFICACIÓ DELS MICROORGANISMES

- Simulación de la técnica del número más probable
- Introducción de controles de amplificación de ácidos nucleicos internos que al ser revelados conjuntamente con los amplificados se pueda comparar el producto de hibridación

DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD

- ARN mensajero (ARNm)
- ARN ribosómico (ARNr)

La detección se realiza mediante la RT-PCR, variante de la PCR convencional. Inconvenientes:

- Incremento de la complejidad de la técnica
- Realización de un mayor número de pasos con lo que se aumenta el riesgo de contaminaciones
- En muchas ocasiones, disminución de la sensibilidad de detección

LA PCR: Otros puntos a tener en cuenta

1. La baja concentración de patógenos en las muestras ambientales. La realización de una única PCR será insuficiente en la mayoría de las ocasiones para determinar la presencia o ausencia del microorganismo en cuestión
 - PCR anidada (Nested-PCR)
 - Técnicas de Hibridación
2. La presencia de sustancias inhibidoras de la PCR en las muestras ambientales:
 - Ácidos húmicos
 - Metales pesados
 - Sales minerales
 - Polisacáridos

LA PCR: Otros puntos a tener en cuenta

3. Limitaciones en su aplicación

- De gran ayuda para obtener resultados en un corto período de tiempo y poder descartar la presencia de *Legionella* en la instalación investigada (Caso de Brotes Epidémicos)
- No sirve para valorar un proceso de desinfección dado que no se detectan unidades funcionales (microorganismos) sino secuencias de ADN
- La detección de un positivo por PCR implica realizar el análisis por el método tradicional para determinar de si se trata de microorganismos viables o por el contrario, de microorganismos que no tienen la capacidad de multiplicarse o de simples cadenas de ADN

CONCLUSIÓN

En conclusión, la PCR es una nueva herramienta de investigación y diagnóstico de laboratorio muy potente que abre todo un nuevo mundo de posibilidades. Su aplicación ha de ser limitada a aquellos casos o estudios que lo permitan y en ningún momento su aplicación ha de desmerecer y suplir la técnica oficial de detección y enumeración de *Legionella* (ISO 11731)