

Legiofast[®], una nova eina per a la detecció de *Legionella pneumophila* per PCR a temps real

X. Bonjoch; O. Ruiz-Rueda; M. Soler; N. Poblet;
L. Calvó; L.J. García-Gil



La PCR a temps real

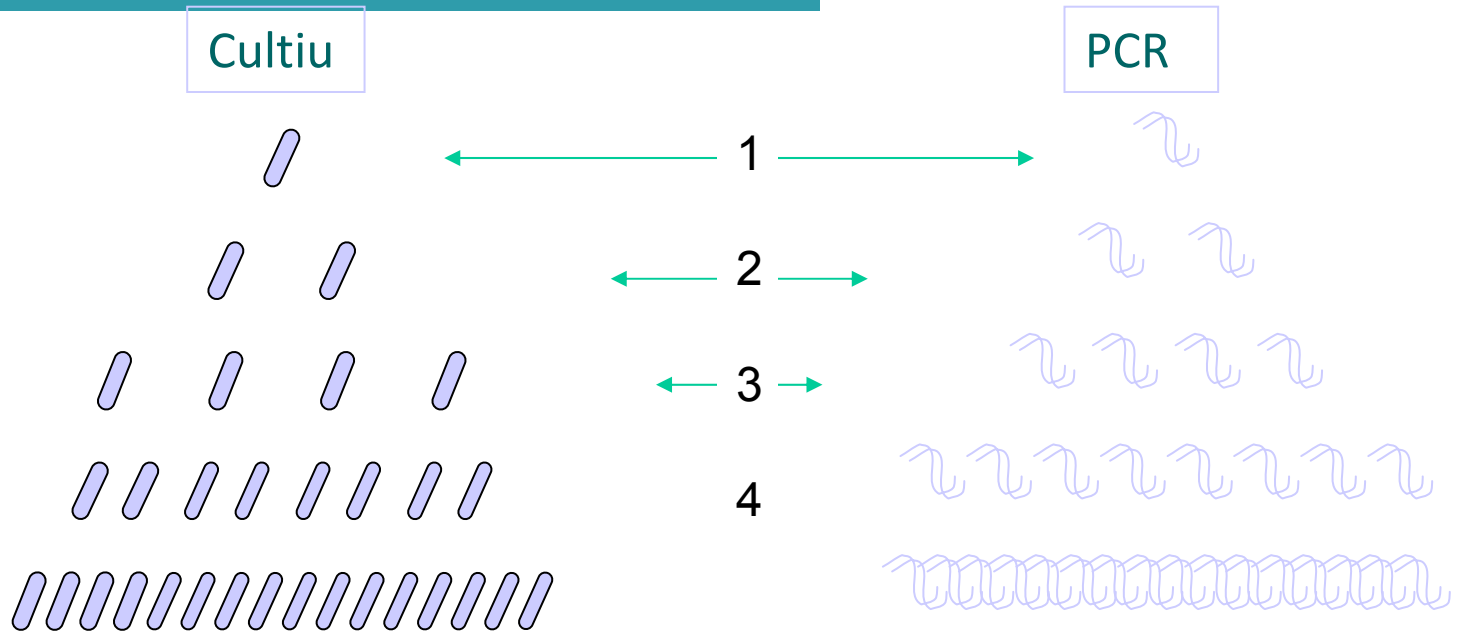
La tecnologia de la PCR suposa una revolució en les anàlisis microbiològiques que ofereix:

	PCR a temps real	Mètodes tradicionals
Temps	Curt	Llarg
Especificitat	Alta	Baixa
Sensibilitat	Alta	Baixa
Cost	Baix	Alt
Reproductibilitat	Alta	Alta
Objectivitat	Sí	No
Automàtic	Sí	No

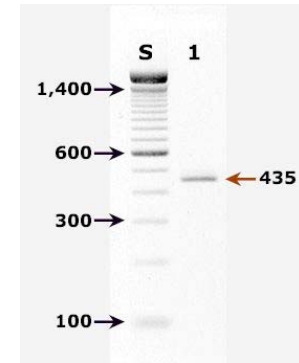
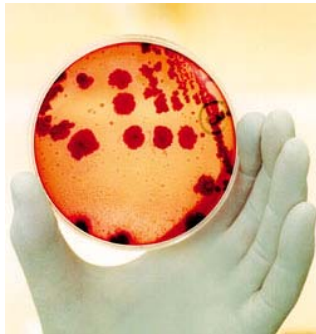
La PCR

- La PCR és una tècnica de Biologia molecular que ens permet obtenir grans quantitats d'un fragment de ADN, utilitzant una ADN polimerasa. Aquest enzim és ADN-dependent, de forma que no comença a copiar si prèviament no hi ha un encebador
- Procediment:
 - Desnaturalitzar (obrir) el DNA (>94 °C)
 - Unir l'encebador a la seva cadena complementària (50 a 60 °C)
 - La DNA polimerasa copia el DNA de la diana
 - Tot aquest procés es repeteix N cicles

Cultiu i PCR: amplificació exponencial



2^n

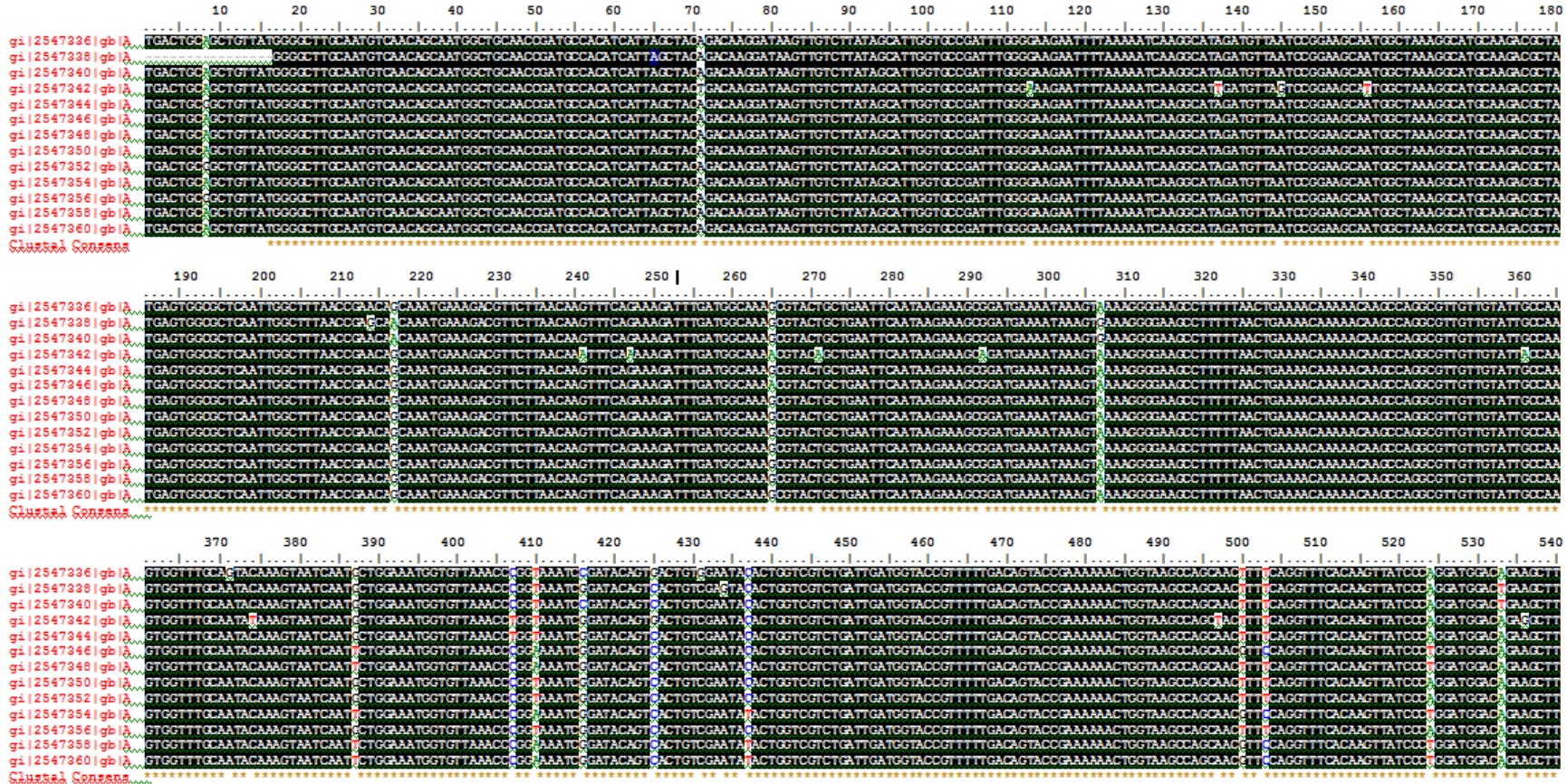


2^n

Desenvolupament de Legiofast[®]:

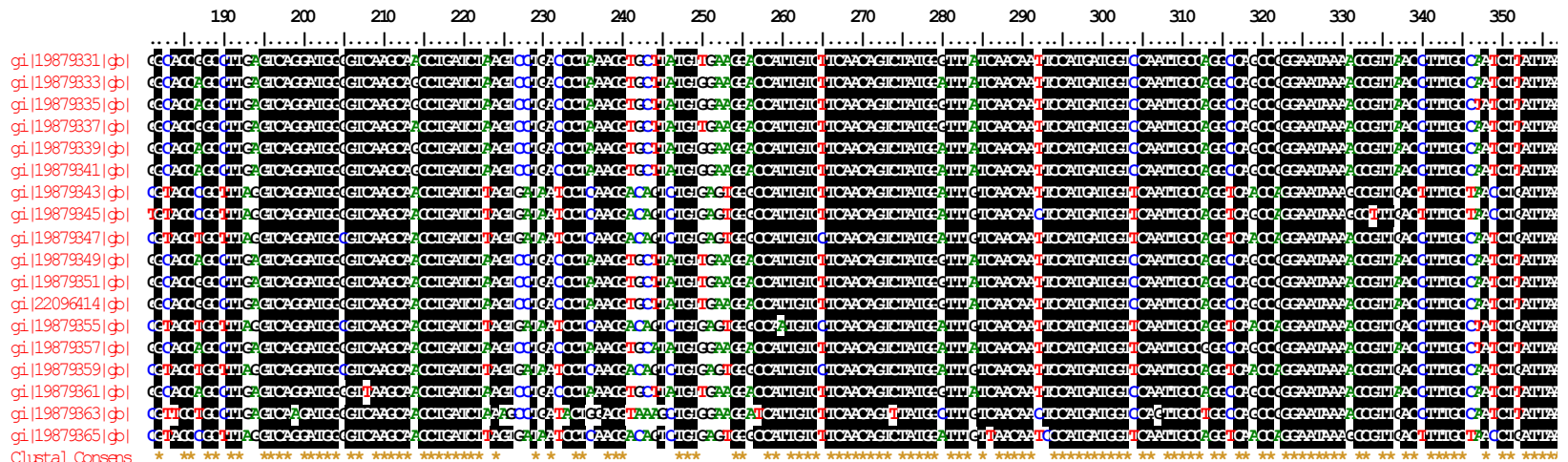
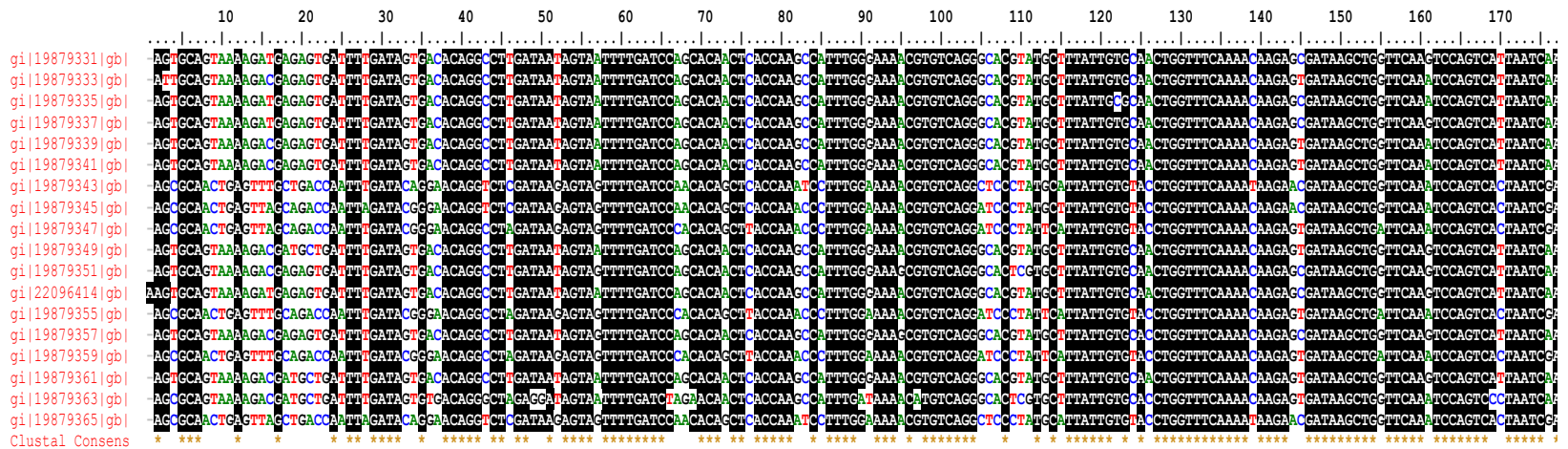
- Estudi de la diana genètica
- Disseny primers
- Condicions de PCR
- Especificitat dels primers:
 - Inclusivitat: TOTS els serogrupos de *L. pneumophila*
 - Exclusivitat: Altres microorganismes
- Límit d'amplificació de la PCR a temps real
- Control intern (protegeix de resultats falsos negatius)
- Extracció DNA
- Validació del mètode: ISO 11731:1998

Diana genètica: Gen *mip*



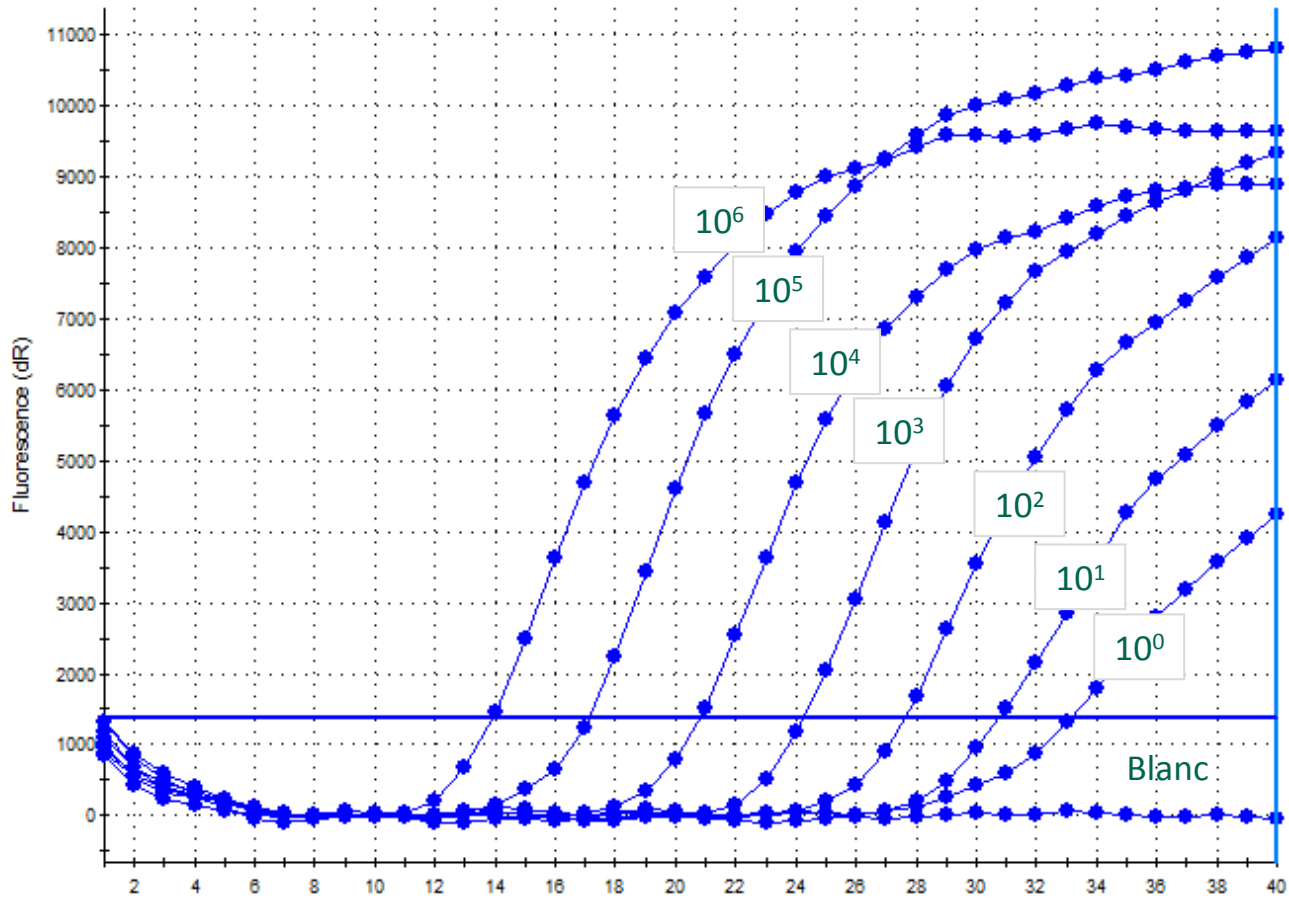
- Aurell, H., Farge, P., Meugnier, H., Gouy, M., Forey, F., Lina, G., Vandenesch, F., Etienne, J. and Jarraud, S. (2005) Clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila* serogroup 1 cannot be distinguished by sequence analysis of two surface protein genes and three housekeeping genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (1), 282-289
- Joly et al. (2006) Quantitative Real-Time *Legionella* PCR for Environmental Water Samples: Data Interpretation. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (4). 2801-2808

Diana genètica: Gen dotA



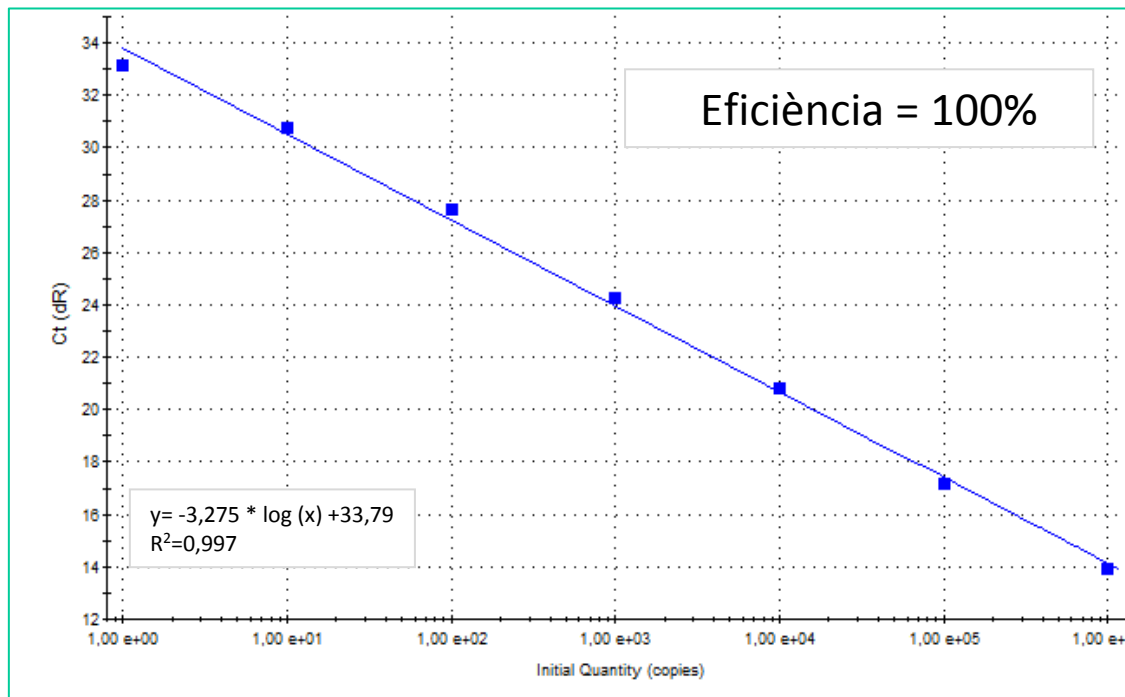
Ko, K.S., Miyamoto, H., Lee, H.K., Park, M.Y., Fukuda, K., Park, B.J. and Kook, Y.H. (2006) Genetic diversity of *Legionella pneumophila* inferred from rpoB and dotA sequences. J. Clin. Microbiol. Infect. 12 (3), 254-261

Límit d'amplificació de Legiofast®

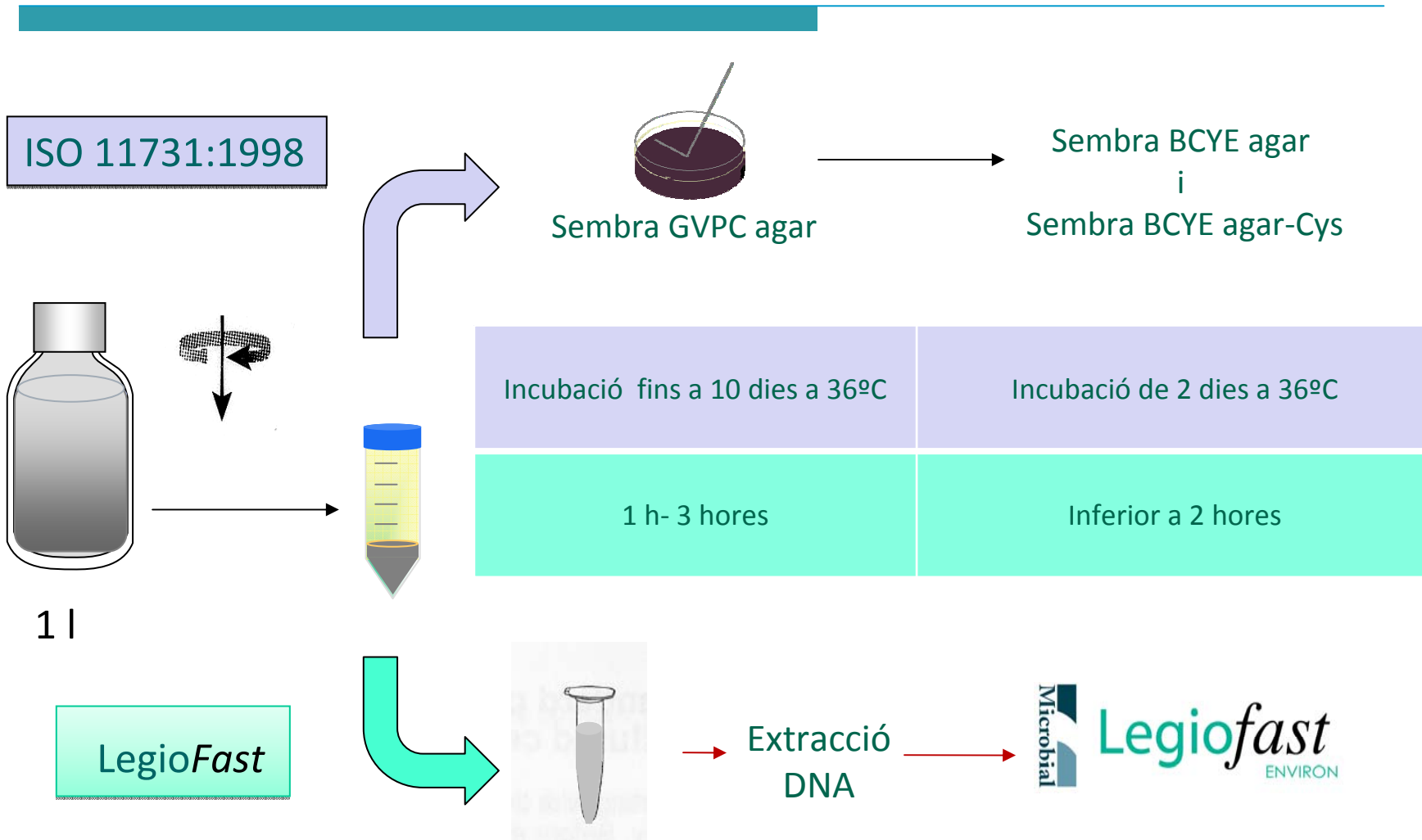


Límit d'amplificació: 1 còpia/reacció

Linealitat i eficiència



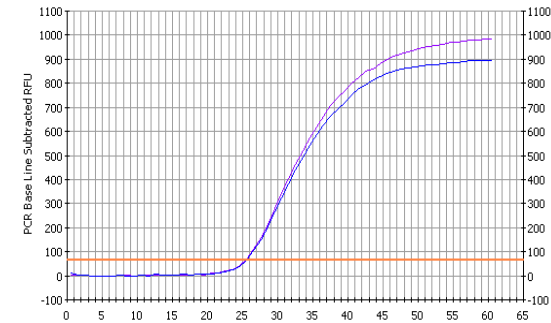
Validació del mètode



Resum

Microbial

Legiofast
ENVIRON



- Resultats en menys de 4 hores
- Límit d'amplificació 1 còpia/reacció
- Inclusió d'un control intern que ens permet la detecció de falsos negatius
- 100% d'inclusivitat (detecta els 15 serogroups *L. pneumophila*) i d'exclusivitat
- 100% d'eficiència de la tècnica
- En fase de validació enfront la ISO 11731 en mostres d'aigües de dutxes, torres de refrigeració i conductes de distribució d'aigua.



Parc Científic i Tecnològic de Girona

Pic de Peguera, 15. Edifici Jaume Casademont, E

E-17003 Girona

Tel. +34 972 183236

Fax. +34 972 183256

www.microbial-systems.com

info@microbial-systems.com

