

Jornadas Provinciales de
Enfermedades Transmitidas por Alimentos
SUH-BOTULISMO

Brotes Alimentarios
23 y 24 de Abril 2015

BOTULISMO DIAGNÓSTICO IN VITRO VENTAJAS Y DESVENTAJAS.

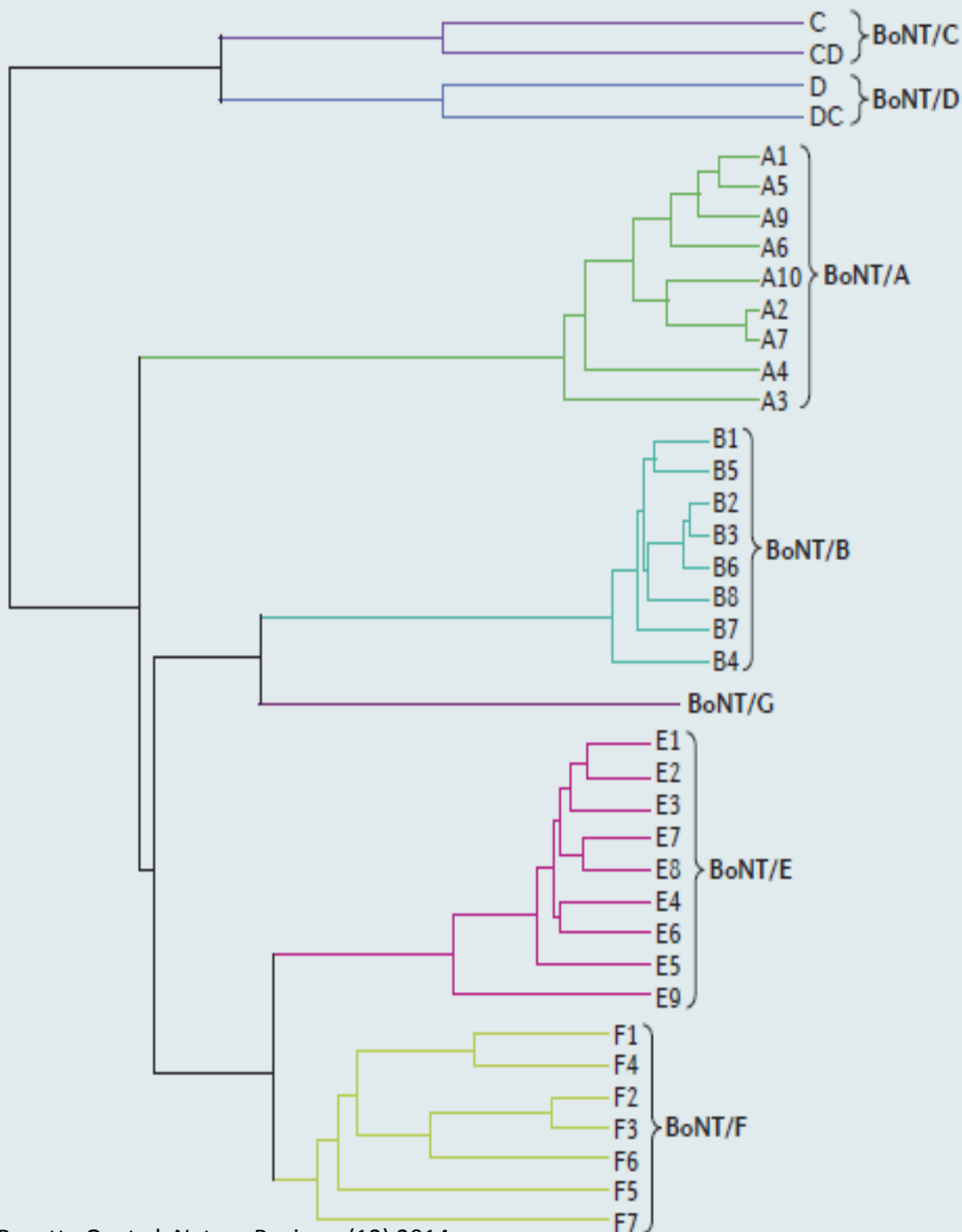
Bioquímica M. Paula Cuervo

Área de Microbiología – Depto. Patología – FCM – UNCuyo

Email: paulacuervo84@gmail.com

TOXINAS BOTULÍNICAS

- A, B, C, D, E, F, G, ¿H?
- Ab, Ba, Bf, Af
- A(B)
- Antitoxinas producidas a partir de la primer cepa descubierta de cada toxina
- Las antitoxinas constan de Ac específicos contra cada toxina
- Existen toxinas que consumen distintos niveles de antitoxinas para su neutralización



Subtipos de toxina Árbol filogenético

Toxina A

A1-A2-A3-A4-A5
A6-A7-A9-A10

Toxina B

B1-B2-B3-B4-B5
B6-B7-B8

Toxina E

E1-E2-E3-E4-E5
E6-E7-E8-E9

Toxina F

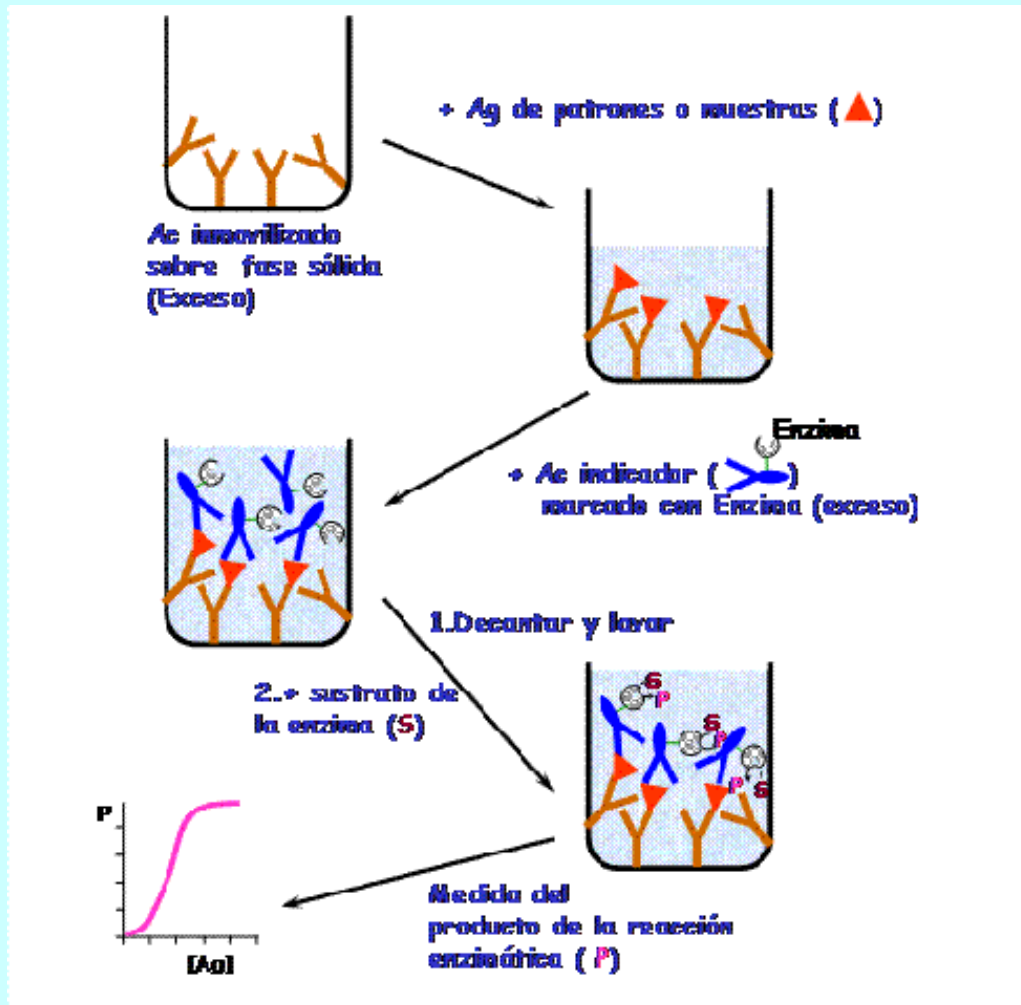
F1-F2-F3-F4-F5
F6-F7

DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO

- ELISA "sandwich"
- ELISA modificado (actividad enzimática de NTBo sobre complejo SNARE)
- ECLIA
- ALISSA
- LUMINEX
- ENSAYOS INMUNOCROMATOGRÁFICOS

DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO

ELISA "sandwich"



DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO

ELISA "sandwich"

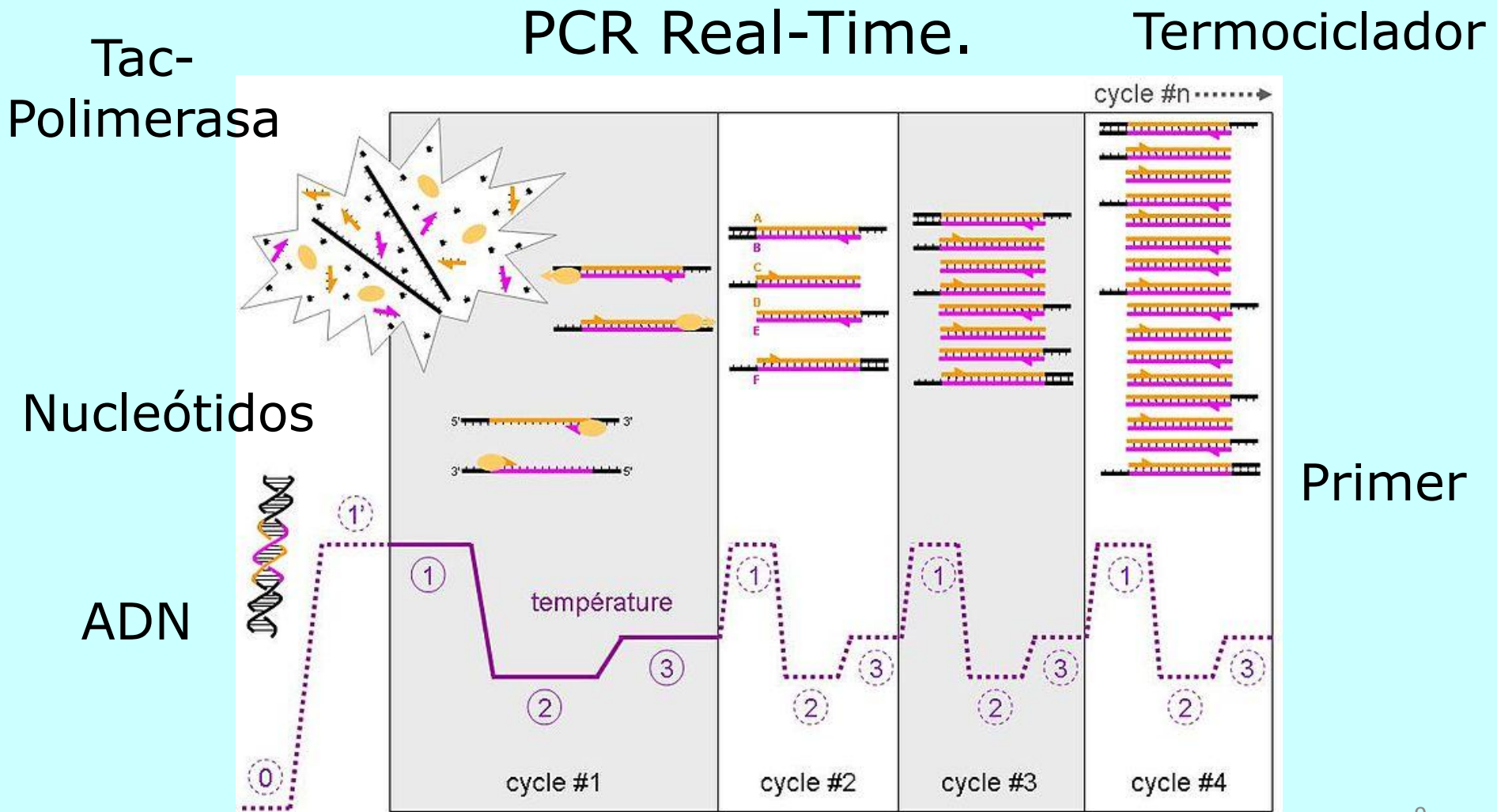
VENTAJAS	DESVENTAJAS
• No utiliza animales • Disponibilidad • Resultado en 5 horas • Sensibilidad ≤ 1 DL50 ($\approx$ratón)	• Reacción cruzada entre subtipos de NTBo • Imposibilidad de detectar una NTBo desconocida • Equipos comerciales sólo detectan cuatro tipos: A, B, E, F • Mayor potencial de efectos de matriz (falsos +/-) • Equipamiento

DIAGNÓSTICO MOLECULAR

- Detecta genes de *C. botulinum* (gen *bont* o gen *ntnh*)
- PCR
- PCR real-time
- Southern blot
- Reverse Transcription PCR
- Nested-PCR
- Inmuno-PCR

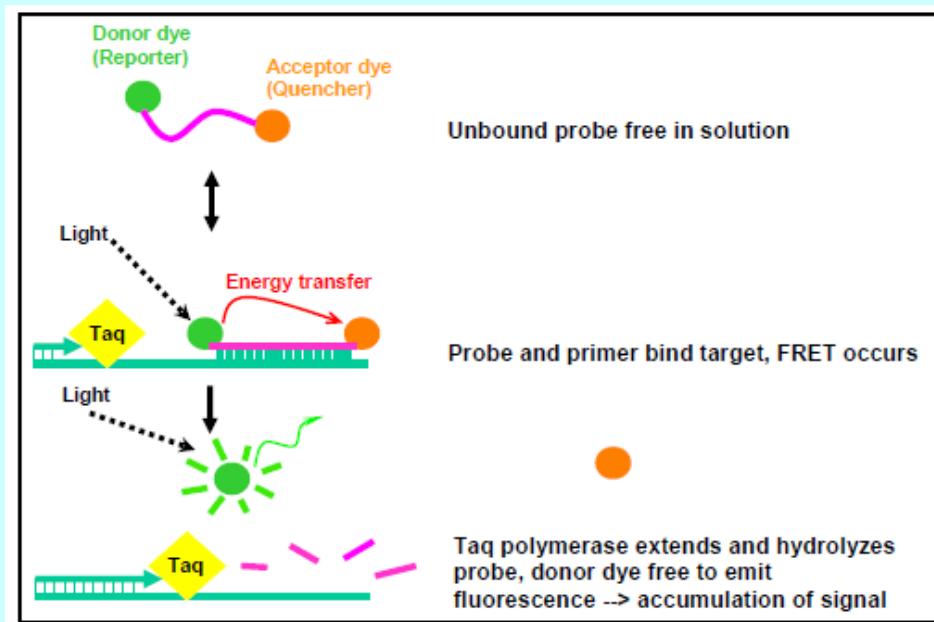
E

DIAGNÓSTICO MOLECULAR

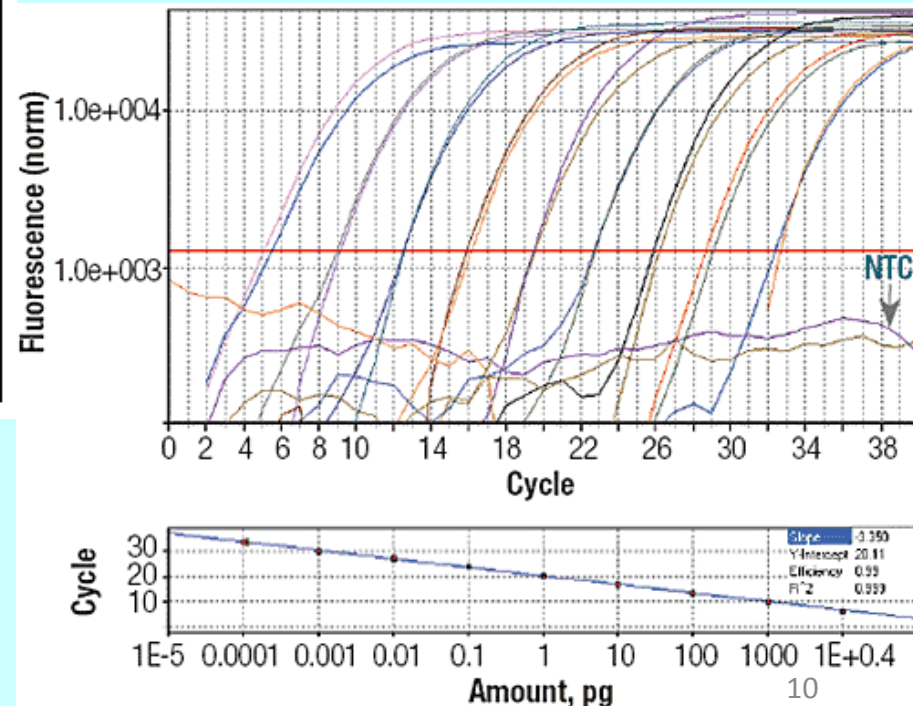


DIAGNÓSTICO MOLECULAR

PCR Real-Time.



<http://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt10-pcr.html>



DIAGNÓSTICO MOLECULAR

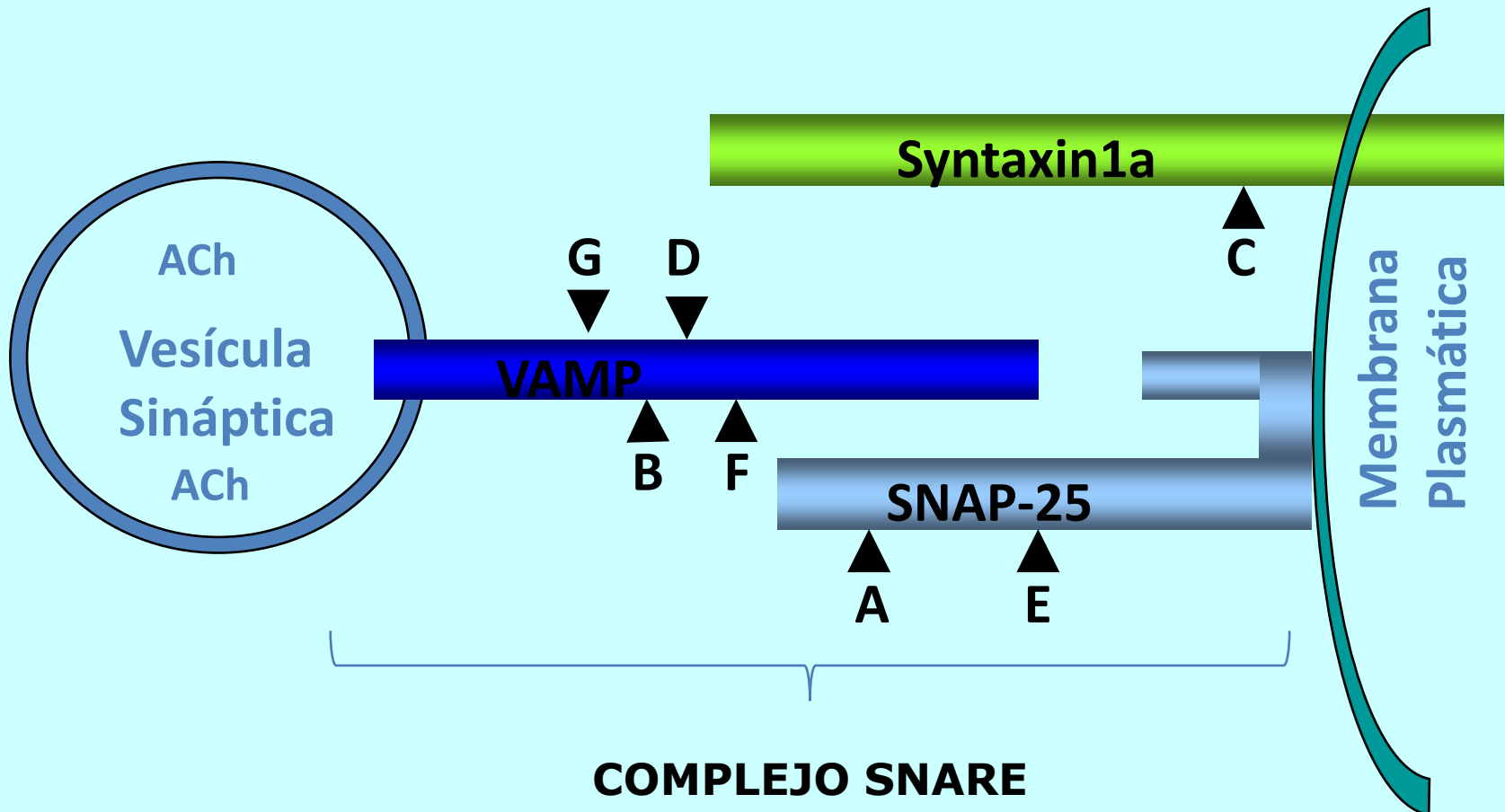
PCR Real-Time.

VENTAJAS	DESVENTAJAS
• Elevada sensibilidad y especificidad • Se puede detectar el ADN tanto en muestras como en cultivos • Detecta los 7 tipos de toxinas • Identifica cepas productoras de 2 tipos de toxina • Rapidez del análisis • Disponibilidad	• Escasa concentración de esporas en la muestra directa • Interferencia que ejerce la matriz (falsos NEG) • Imposibilidad de detectar nuevas toxinas • Detecta ADN, no toxina • No puede diferenciar genes silenciosos A(B)

ENDOPEP-MS

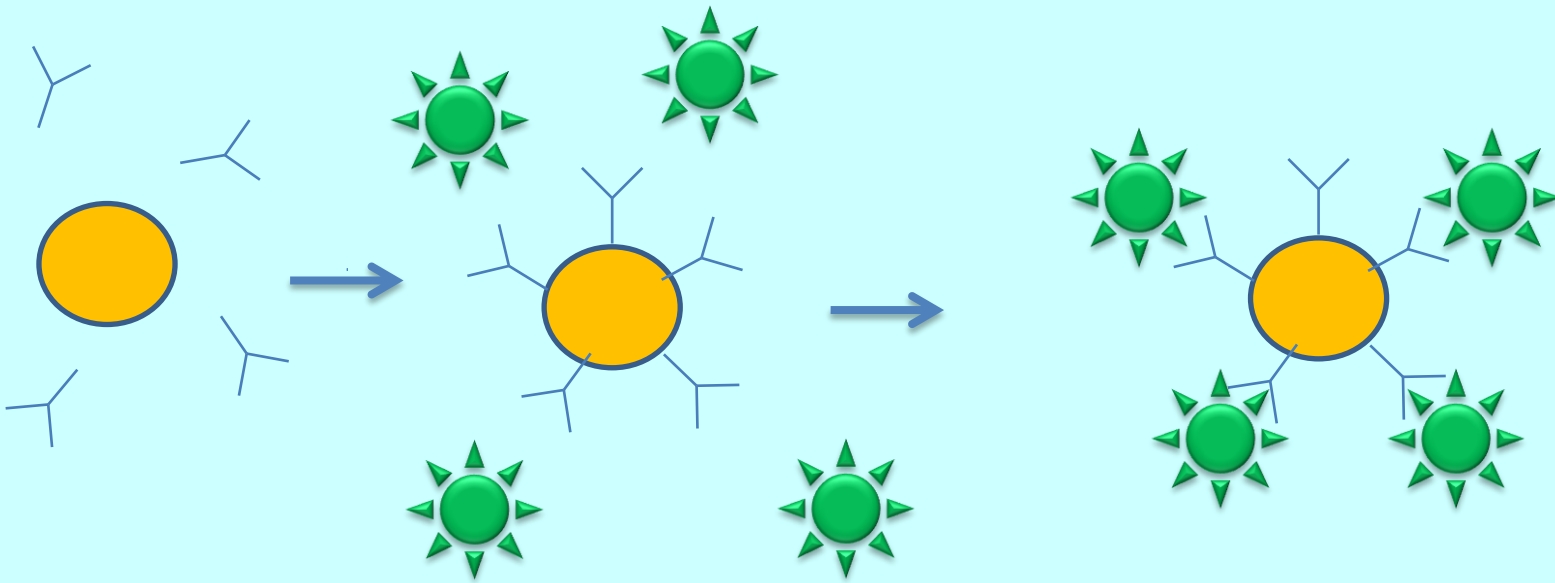
- Espectrometría de Masa utilizando equipo MALDI-TOF
Matrix Asisted Laser Desorption Ionization–
Time Of Flight
- Elevada especificidad y sensibilidad
- Detecta NTBo activa cuali-cuantitativamente

ENDOPEP-MS

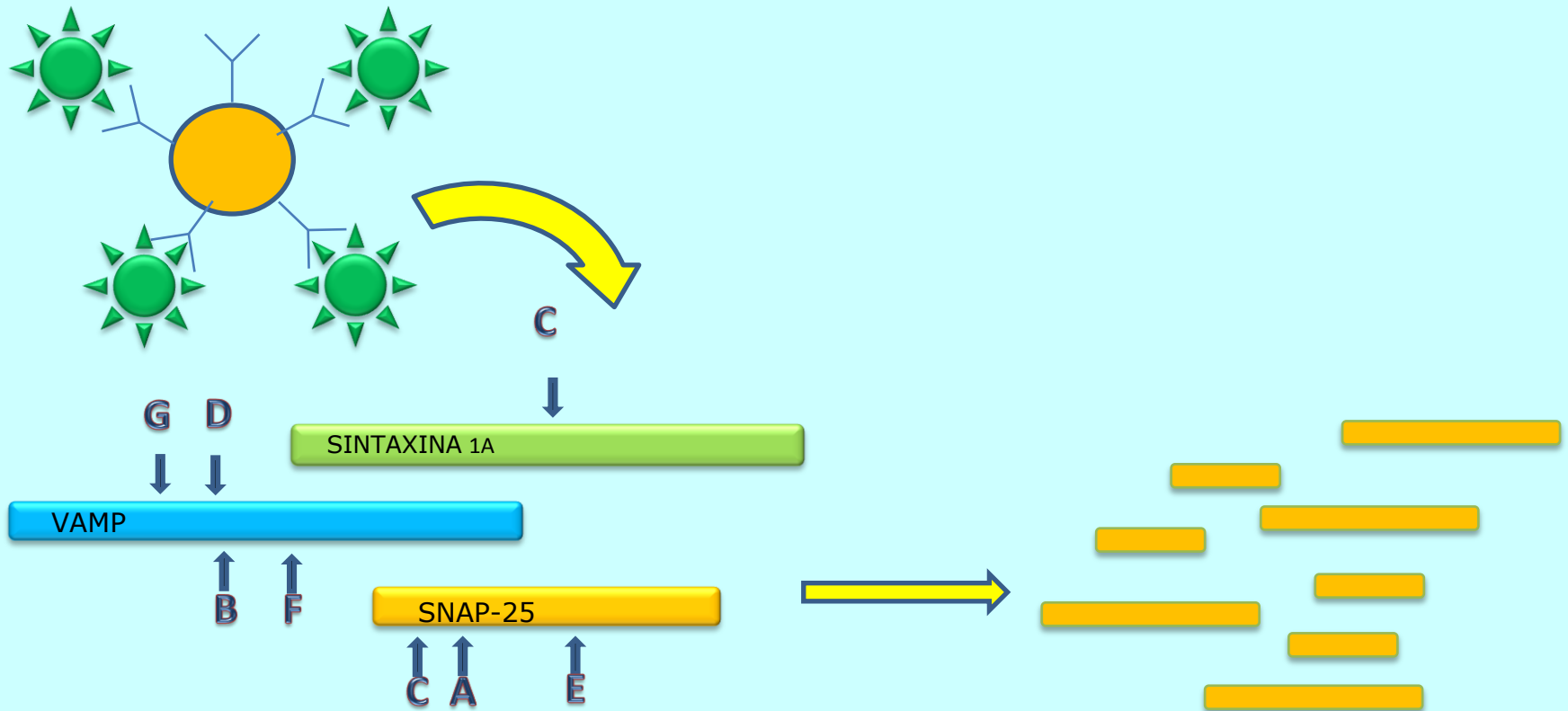


ENDOPEP-MS

- PROCEDIMIENTO.



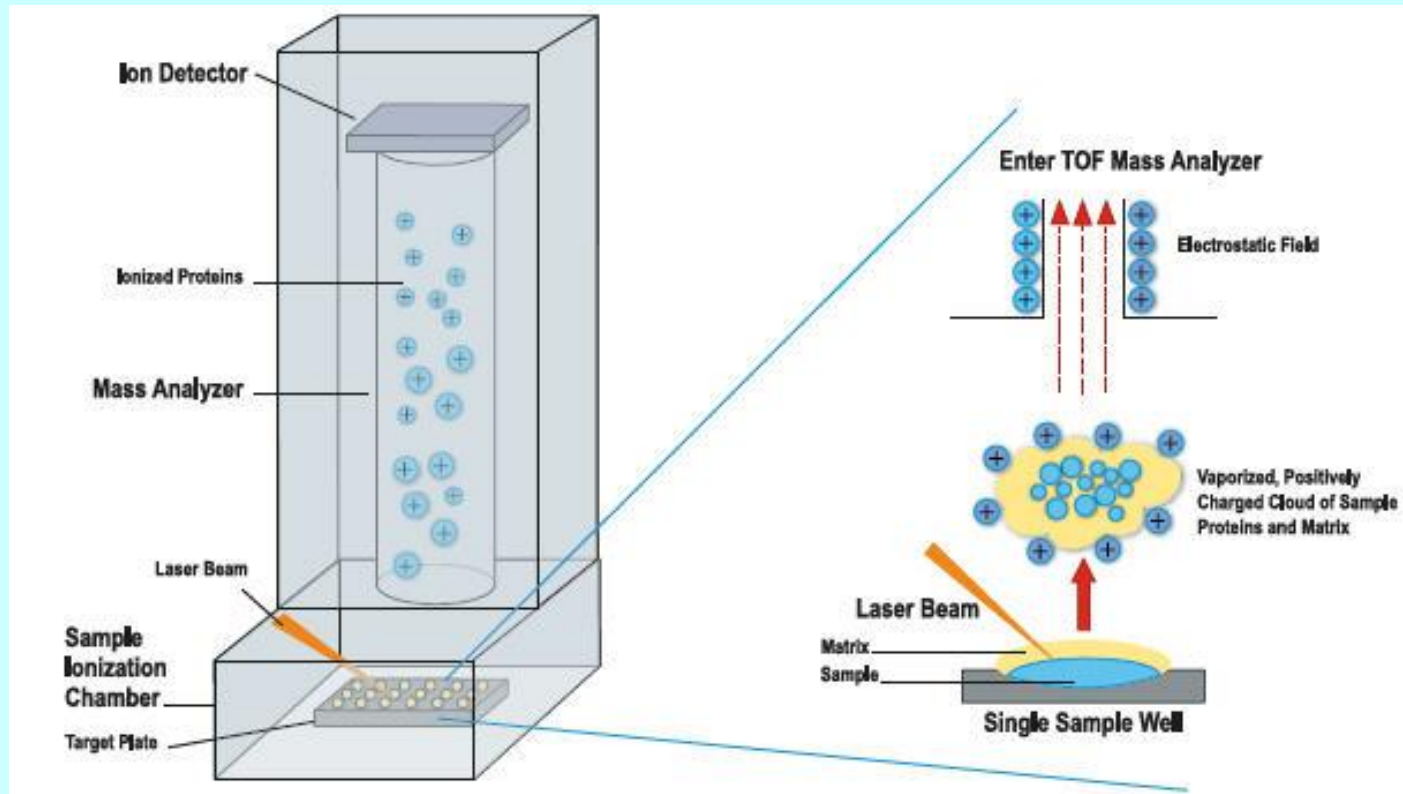
ENDOPEP-MS



Producto del clivaje.

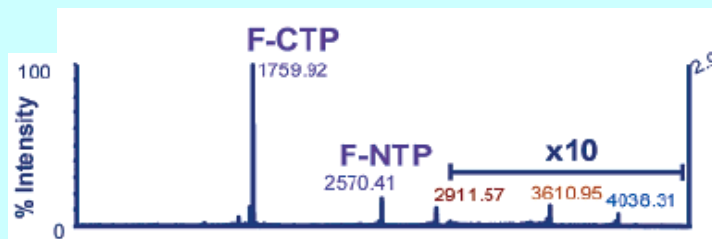
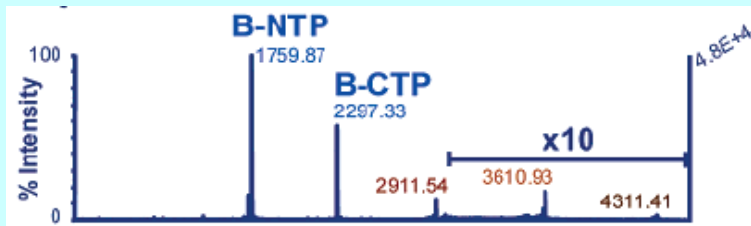
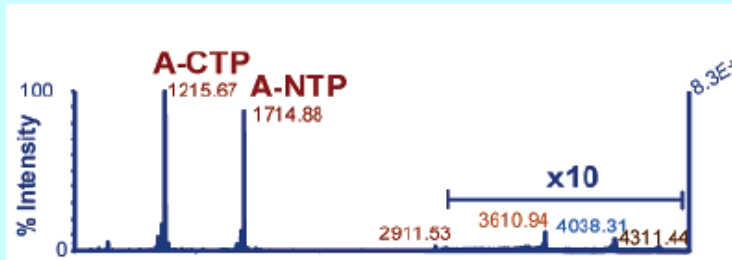
ENDOPEP-MS

MALDI-TOF



<http://www.mayomedicallaboratories.com/articles/communique/2013/01-maldi-tof-mass-spectrometry/index.html>

ENDOPEP-MS



Boyer AE et al, Anal Chem 77 (13) 2005

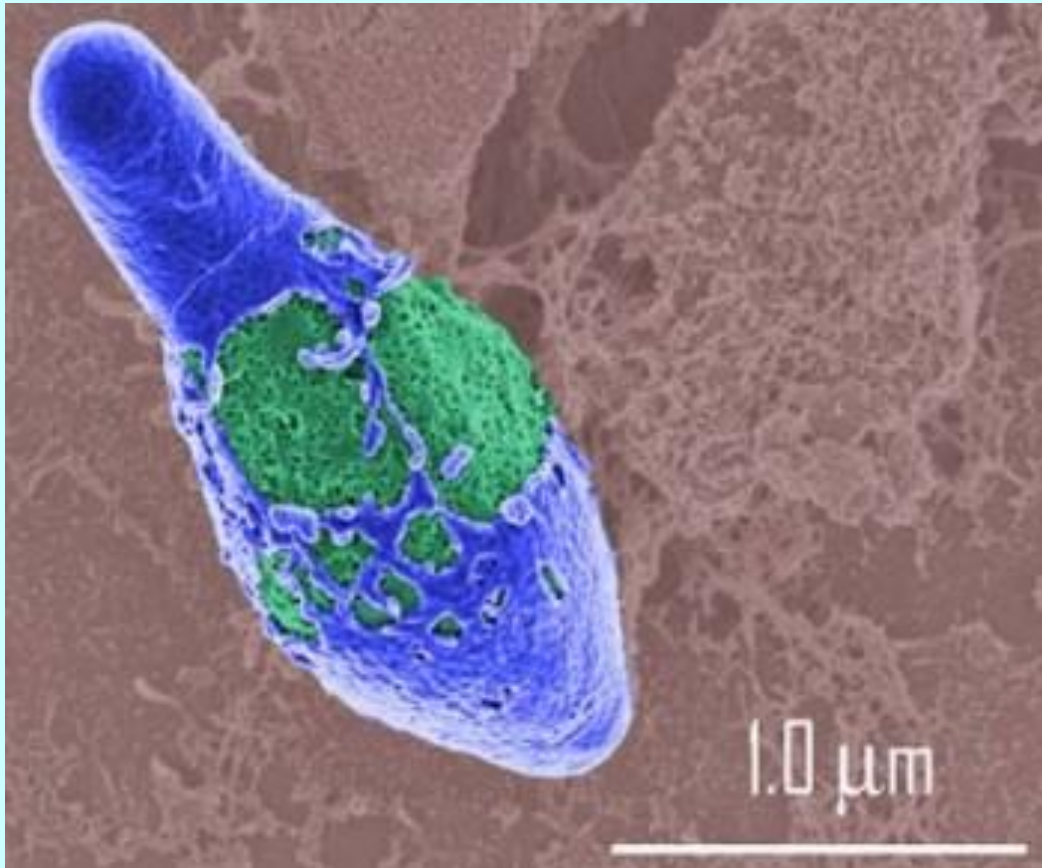
BoNT-A		
BoNT-A	Biotin-KGSNRTRIDEANQRATRMLGGK-Biotin	Mass
Substrate	Biotin-KGSNRTRIDEANQ	2912.6
	RATRMLGGK-Biotin	1713.8
		1215.3
BoNT-B		
BoNT-B	LSELDDRADALQAGASQFETSAAKLKRKYWWKNLK	4039.6
Substrate	LSELDDRADALQAGASQ	1759.8
	FETSAAKLKRKYWWKNLK	2297.7
BoNT-F		
BoNT-F	AQVDEVVDIMRVNVDKVLERDQKLSELDDRADALQAGAS	4312.8
Substrate	AQVDEVVDIMRVNVDKVLERDQ	2570.9
	KLSELDDRADALQAGAS	1759.9
BoNT-E		
BoNT-E	IIGNLRHMALDMGNEIDTCNRQIDRIMEKAD	3612.1
Substrate	IIGNLRHMALDMGNEIDTCNRQIDR	2924.3
	IMEKAD	705.8

Barr JR et al, Emerg Infect Dis 11 (10) 2005

ENDOPEP-MS

VENTAJAS	DESVENTAJAS
• No requiere animales • Potencial de detección de varios tipos en una sola muestra • Rápida detección e identificación (2-6h) • Detecta tanto especificidad inmunológica como actividad de la toxina • Permite cuantificar los niveles de toxina	• Es dependiente de Ac (sensibilidad variable a subtipos) • Requiere validación para ser aplicado a muestras clínicas • Equipo de alto costo • Requiere entrenamiento específico • Potencial imposibilidad de detectar nuevos tipos de toxinas

¡GRACIAS POR SU ATENCIÓN!



¿PREGUNTAS?