

Autores: Dinamarca, Sofía; Salafia, Cesia y Quintero, Cristián

[Kits de detección de *Neisseria gonorrhoeae*](#)

Dinamarca, Sofía; Salafia, Cesia y Quintero, Cristián

Laboratorio de Biología Celular y Molecular - BIOCyM - Universidad Juan Agustín. Maza

Contacto: caquintero@hotmail.com; cquintero@umaza.edu.ar

Introducción

Neisseria gonorrhoeae es una bacteria patógena Gram negativa de transmisión sexual que causa la gonorrea. Principalmente, infecta el tracto urogenital aunque también otras localizaciones como el recto, faringe y conjuntiva. Es muy importante su detección precoz y certera para dar inicio al tratamiento, evitar complicaciones, y disminuir la posibilidad transmisión y contagio. La mayoría de las infecciones en mujeres, un 95%, son asintomáticas con grandes posibilidades de que la bacteria se propague al tracto genital superior, causando graves complicaciones como la Enfermedad Inflamatoria Pélvica, obstrucciones en las trompas de Falopio, infertilidad en ambos sexos y embarazos ectópicos. Además de todo esto, la situación se complica por un aumento en el número de casos de gonorrea y de otras Enfermedades de Transmisión Sexual (ETS) a nivel mundial y a la aparición de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* mutiresistentes a los antibióticos que se utilizan para tratarla.

Las pruebas diagnósticas o test rápidos, que proporcionan resultados inmediatos permitirían el diagnóstico sistemático y precoz de las ITS en todos los individuos sospechosos de padecerlas incluso aunque estén asintomáticos, administrar tratamientos a un mayor número de pacientes infectados y evitar nuevos contagios al interrumpir la cadena de transmisión de la infección. Actualmente, en Mendoza y en todo el país, no se cuenta con ese tipo de pruebas diagnósticas sencillas, si no que se cuenta con otras, como el cultivo tradicional o en algunos casos la PCR, que son técnicas más costosas y tardan más tiempo para obtener el resultado.



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons.
Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0
Internacional (CC BY-NC-ND 4.0)
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Autores: Dinamarca, Sofía; Salafia, Cesia y Quintero, Cristián

En este trabajo, describimos los pocos test rápidos que se utilizan en el mundo para el cribado de gonorrea.

Ensayo de Flujo Lateral – Detección de Antígeno.

El test rápido del antígeno *Neisseria gonorrhoeae* es una prueba inmunocromatográfica cualitativa de flujo lateral para la detección de antígenos de *Neisseria gonorrhoeae* en muestras de frotis endocervicales de mujeres y de frotis uretrales de hombres.

El kit está indicado como una ayuda para el diagnóstico de la gonorrea.

Principio:

Se detecta mediante la interpretación visual del cambio de color de una tira interna. El anticuerpo policlonal específico del antígeno gonocócico es inmovilizado en la zona de la membrana del test. Durante el análisis, el espécimen reacciona con anticuerpos monoclonales antigonocócicos conjugándose con partículas de color precubiertas en la plataforma para la muestra del test. Luego, la mezcla migra por capilaridad a través de la membrana e interacciona con los reactivos de la misma. Si el espécimen contiene un número suficiente de antígenos gonocócicos, se formará una banda coloreada en la zona de la membrana del test. La presencia de esta banda coloreada indica un resultado positivo, mientras que su ausencia indica un resultado negativo. La aparición de una banda coloreada en la zona de control sirve para controlar el procedimiento, e indica que se ha añadido el volumen adecuado de espécimen y que ha habido absorción en la membrana

Procedimiento:

- Extracción de antígenos gonococcicos desde el frotis que contiene la muestra
- La membrana contiene anticuerpo específico de antígeno gonocócico en la posición de prueba (T) y anticuerpos relacionados en la posición de control (C).
- La muestra se agrega al pocillo de muestra (S) y reacciona con el anticuerpo monoclonal anti-gonococo conjugado con la microesfera de látex de poliestireno

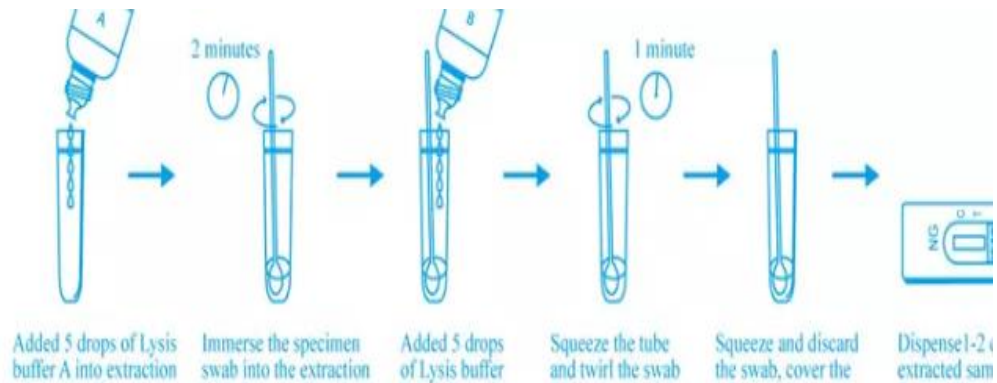


Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons.
Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0
Internacional (CC BY-NC-ND 4.0)
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

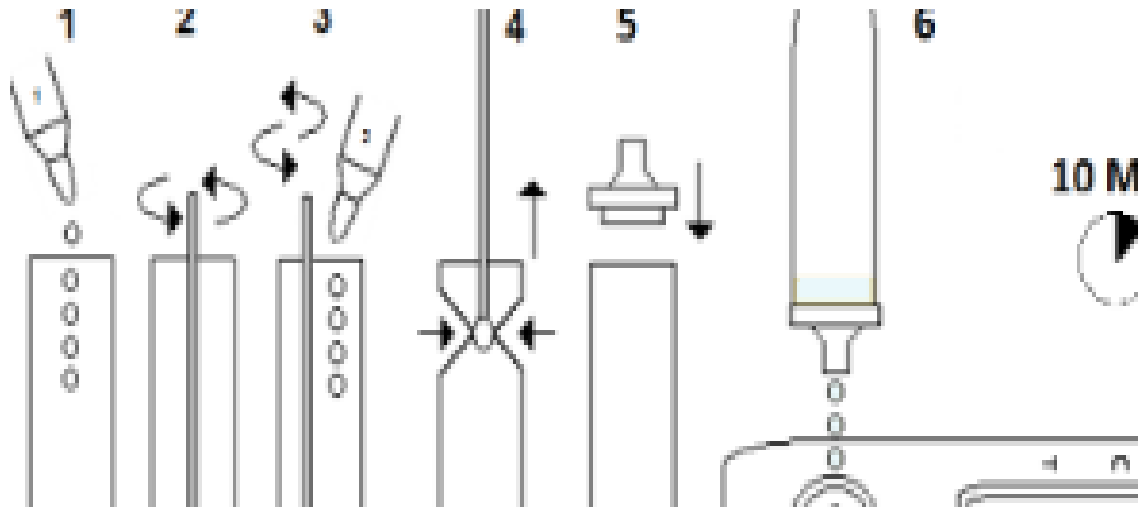
Autores: Dinamarca, Sofía; Salafia, Cesia y Quintero, Cristián

coloreado .La mezcla migra a través de la membrana por efecto capilar e interactúa con el anticuerpo monoclonal inmovilizado en la membrana.



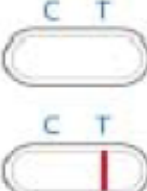
•Si hay suficientes antígenos de gonococo en la muestra, se formará una banda de color en el pozo de prueba (T) de la membrana. Esta banda de color indica un resultado positivo, mientras que su ausencia indica un resultado negativo. Una banda de color en la región de control sirve como control de procedimiento, lo que indica que se ha agregado el volumen adecuado de muestra y se ha producido la absorción de la membrana.



Autores: Dinamarca, Sofía; Salafia, Cesia y Quintero, Cristián



INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

<p>RESULTADO POSITIVO:</p> 	<p>Aparecen dos bandas coloreadas en la membrana: una banda en la zona de control (C) y otra en la zona de prueba (T).</p>
<p>RESULTADO NEGATIVO:</p> 	<p>Sólo aparece una banda coloreada en la zona de control (C). No aparece ninguna banda coloreada en la zona de prueba (T).</p>
<p>RESULTADO INVÁLIDO:</p> 	<p>No aparece la banda de control. Los resultados en los que no haya aparecido ninguna banda durante el tiempo especificado de lectura se consideran inválidos. Revise el procedimiento y repítalo con un nuevo test. Si el problema persiste, deje de usar el kit de diagnóstico y póngase en contacto con su distribuidor local.</p>

Limitaciones del test:

- Puede dar negativo en infecciones muy recientes o en casos asintomáticos

Autores: Dinamarca, Sofía; Salafia, Cesia y Quintero, Cristián

- El valor de sensibilidad de esta prueba en muestras uretrales masculinas y cervicales femeninas es de aproximadamente el 90%. El uso de estas pruebas no se recomienda para muestras orofaríngeas o rectales. Esto se debe a que la sensibilidad del test con estas es muy baja (el valor diagnóstico se reduce considerablemente).
- Sólo se debe emplear para la detección cualitativa de la *Neisseria gonorrhoeae*. No debe inferirse ningún significado a partir de la intensidad del color o la profundidad de las posibles bandas visibles.
- Indicará la presencia del antígeno gonocócico en especímenes de *Neisseria gonorrhoeae* viables e inviables.
- La detección de la gonorrea depende del número de microorganismos presentes en el espécimen. Ello podría resultar afectado por los métodos de recogida de la muestra y por factores del propio paciente, como la edad, los antecedentes de ETS, la presencia de síntomas, etc. El nivel mínimo de detección del test puede variar según serotipo
- El fracaso o el éxito terapéutico no puede determinarse, puesto que el antígeno puede persistir después de un tratamiento antimicrobiano adecuado.
- El exceso de sangre (>50 µL en caso de un frotis femenino y >20 µL en caso de un frotis masculino) puede causar falsos resultados positivos. No deben obtenerse muestras endocervicales de las pacientes durante el periodo menstrual.

Ensayo de Flujo Lateral basado en el sistema CRISPR/Cas. Detección de producto genómico.

El sistema CRISPR/Cas fue identificado como el sistema inmune adaptativo, específico de secuencia, de procariontes. La inmunidad basada en CRISPR actúa integrando secuencias cortas de virus o plásmidos en el locus CRISPR permitiendo que la célula recuerde, reconozca y elimine agentes extraños. Este *locus* está compuesto por



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons.
Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0
Internacional (CC BY-NC-ND 4.0)
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Autores: *Dinamarca, Sofía; Salafia, Cesia y Quintero, Cristián*

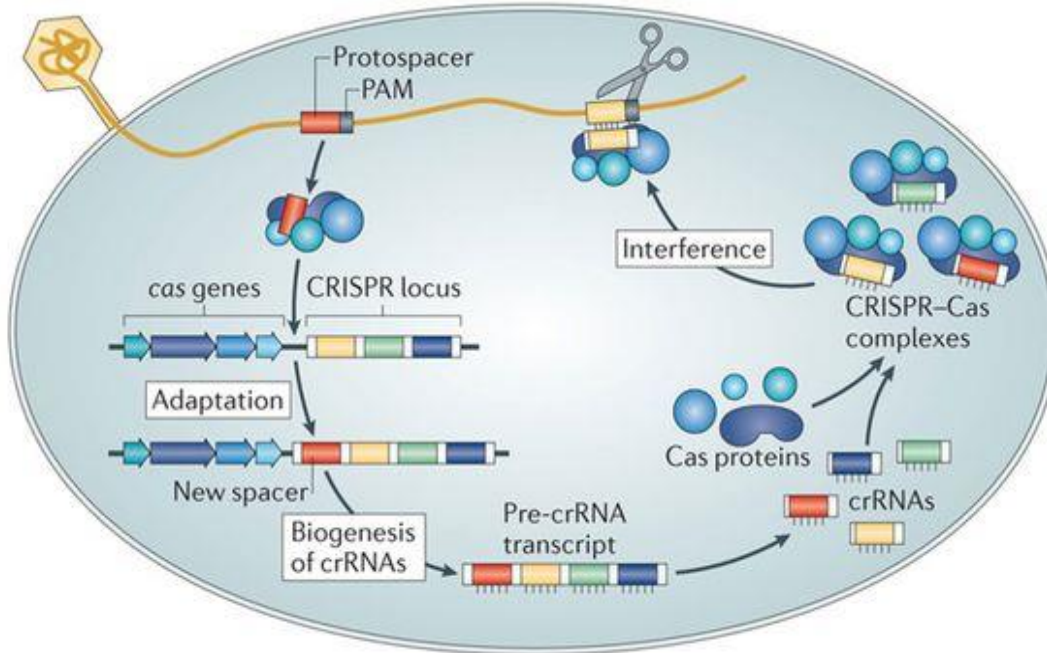
secuencias CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats), repeticiones palindrómicas cortas, separadas regularmente por secuencias únicas llamadas espaciadores. Estos derivan del ácido nucleico de virus y plásmidos provenientes de infecciones pasadas y se utilizan como elementos de reconocimiento para identificar genomas extraños coincidentes y destruirlos. Por otro lado, se encuentran los genes Cas, asociados a CRISPR, que codifican a endonucleasas, proteínas esenciales para la respuesta inmune. Las secuencias CRISPR son transcritas y procesadas generando pequeños crRNA que guían a las proteínas Cas para escindir ácidos nucleicos extraños complementarios de una manera específica de secuencia, evitando la reinfección.

A nivel molecular, los sistemas CRISPR-Cas funcionan a través de los procesos de adaptación, biogénesis o maduración de crRNA e interferencia. Durante la adaptación se produce el reconocimiento de los elementos genéticos extraños y se seleccionan y procesan secuencias protospaciadoras que serán integradas como un nuevo espaciador en CRISPR. Luego, se transcribe un pre-crRNA que es procesado originando múltiples segmentos de repetición y espaciadores, los crRNA maduros que guían cada uno a las proteínas Cas a su objetivo extraño. Por último, se produce una interferencia por apareamiento complementario entre Cas-crRNAm y la secuencia del genoma extraño, produciendo su escisión.



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons.
Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0
Internacional (CC BY-NC-ND 4.0)
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Autores: Dinamarca, Sofía; Salafia, Cesia y Quintero, Cristián



Funcionamiento de CRISPR/Cas

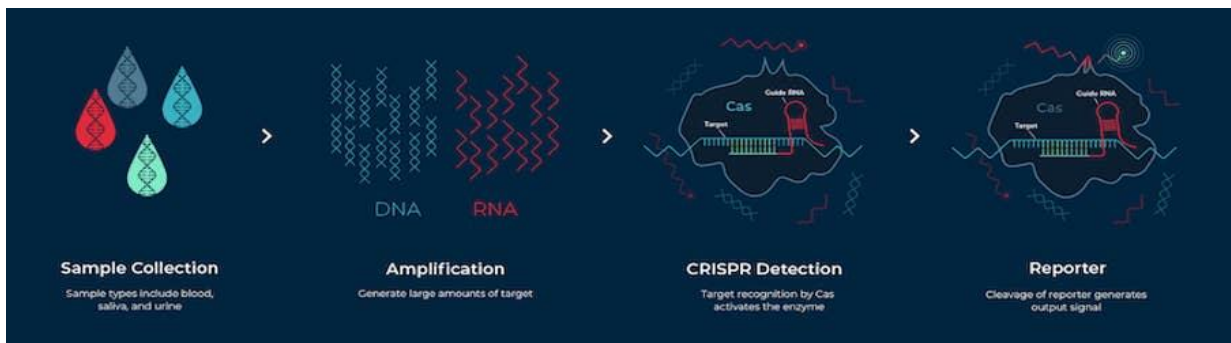
Samson JE, Magadán AH, Sabri M, Moineau S. (2013). Revenge of the phages: defeating bacterial defences. *Nat Rev Micro*. 11:675-687. doi: 10.1038/nrmicro3096. Actualmente, la tecnología CRISPR/Cas se la utiliza como una nueva herramienta para introducir modificaciones en el genoma de las células. La nucleasa Cas guiada por un RNA se puede utilizar para facilitar esta edición de forma eficiente simplemente especificando una secuencia de 20 nucleótidos dentro de su RNA guía. Una de sus múltiples aplicaciones es en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, donde se han utilizado CRISPR/Cas9 y variantes, Cas13 y Cas12, para desarrollar plataformas sencillas, portátiles y de bajo costo para detectar ácidos nucleicos con alta sensibilidad y especificidad.

Las pruebas de diagnóstico basadas en CRISPR poseen varias ventajas sobre los ensayos tradicionales:

Autores: Dinamarca, Sofía; Salafia, Cesia y Quintero, Cristián

1. **Única Reacción:** los ensayos tradicionales como la PCR requieren múltiples pasos, mientras que los ensayos de diagnóstico basados en CRISPR se pueden ejecutar como una prueba de reacción única.
2. **Equipamiento mínimo:** los diagnósticos CRISPR requieren un equipamiento mínimo o nulo.
3. **Velocidad:** estas pruebas se pueden ejecutar rápidamente, aproximadamente 30 a 60 minutos.
4. **Precisión:** las pruebas de diagnóstico CRISPR son más precisas que las pruebas tradicionales.
5. **Fácil de usar:** debido al mínimo equipo necesario, los diagnósticos CRISPR podrían estar disponibles como dispositivos portátiles, como tiras reactivas.

En los ensayos de detección se incubaba la muestra a 37°C, 30 minutos con fragmentos de RNA sintéticos que sirven como guía para las proteínas Cas y que están diseñados para coincidir con secuencias específicas del genoma del patógeno de interés. Después de que Cas se une a su objetivo, escinde a una construcción reportera, un ssDNA que está marcado en un extremo con un fluoróforo como FITC y en el otro con Biotina. Además, se incluye un paso de amplificación isotérmica por RPA (Recombinase polymerase amplification) a 42°C, 25 minutos para generar muchas más copias de la secuencia objetivo que las presentes en la muestra original.

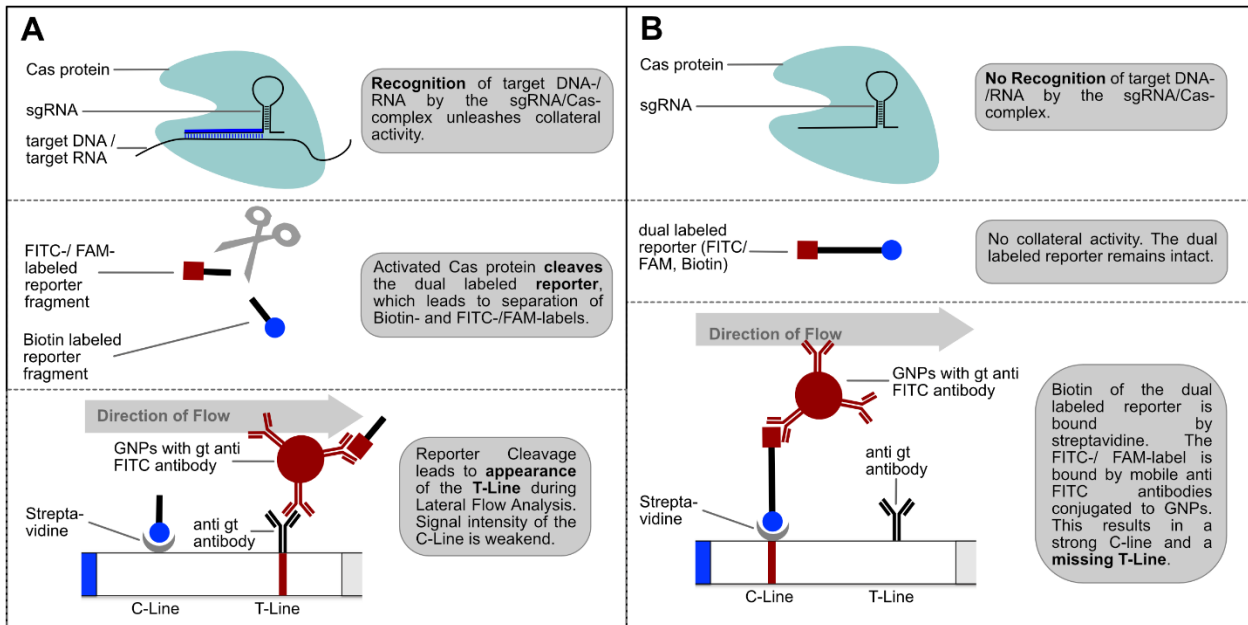


Autores: Dinamarca, Sofía; Salafia, Cesia y Quintero, Cristián



Tira reactiva

<https://www.milenia-biotec.com/en/lateral-flow-assays-using-genome-editing-tools/>



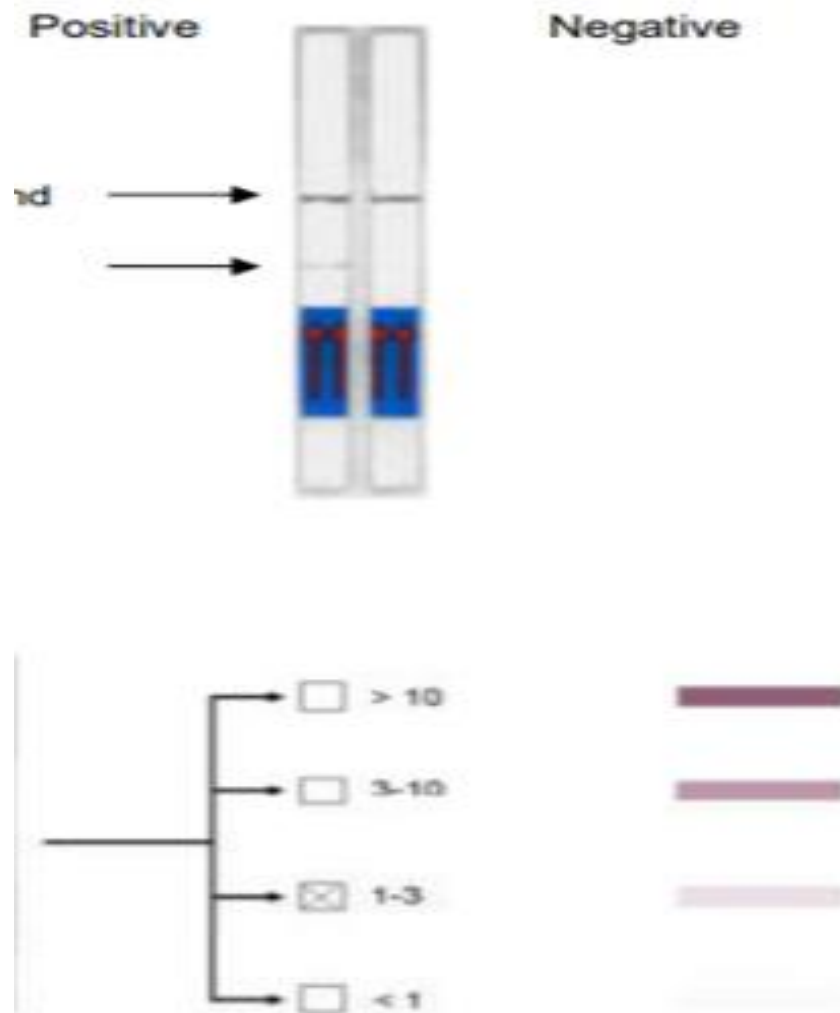
Mecanismo de detección CRISPR / Cas de ácidos nucleicos a través del flujo lateral.

A-Test positivo. Presencia de la secuencia blanco del patógeno.

B-Test Negativo. Ausencia de la secuencia blanco del patógeno.

<https://www.milenia-biotec.com/en/lateral-flow-assays-using-genome-editing-tools/>

Autores: Dinamarca, Sofía; Salafia, Cesia y Quintero, Cristián



Interpretación de los resultados.

A-Cualitativa.

B-Semi-cuantitativa.

<https://www.milenia-biotec.com/en/lateral-flow-assays-using-genome-editing-tools/>

Autores: *Dinamarca, Sofía; Salafia, Cesia y Quintero, Cristián*

Con respecto a los dos test descritos anteriormente se considera que las pruebas de diagnóstico basado en el sistema CRISPR/Cas tienen mayor sensibilidad y especificidad ya que en este caso se detecta el producto genómico del patógeno mientras que en la otra prueba diagnóstica de ensayo de flujo lateral se detectan antígenos mediante anticuerpos monoclonales dirigidos contra proteínas específicas de *N.gonorrhoeae*

Se puede concluir que estas pruebas diagnósticas o test rápidos, deberían implementarse en nuestro país y así agilizar los tiempos para llegar al diagnóstico, ya que hacer tests en pacientes sospechosos de padecer la infección siendo asintomáticos o no acorta los plazos para llegar a su diagnóstico definitivo, iniciar su tratamiento y tomar las medidas preventivas para que no se la transmita a otros. Ahorraría tiempos y costos ya que si bien no reemplaza al método de cultivo tradicional y diagnóstico por PCR pero podría descartar inicialmente otras infecciones que se presenten con una sintomatología similar.



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons.
Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0
Internacional (CC BY-NC-ND 4.0)
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Autores: Dinamarca, Sofía; Salafia, Cesia y Quintero, Cristián

Referencias

- Pinheiro Araldi R. et al. (2020). Medical applications of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR/Cas) tool: A comprehensive overview. Gene Volume 745. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144636>
- Chen , JS , Ma , E , Harrington , LB , DaCosta , M , Tian , X , Palefsky , JM y Doudna , JA (2018) La unión al objetivo CRISPR-Cas12a desata la actividad indiscriminada de ADNasa monocatenaria . Science 360, 436 – 439.
- Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, Dy AJ, Joung J, Verdine V, Donghia N, Daringer NM, Freije CA, Myhrvold C, Bhattacharyya RP, Livny J, Regev A, Koonin EV, Hung DT, Sabeti PC, Collins JJ, Zhang F. (2017) Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. Science. doi: 10.1126/science.aam9321
- Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ, Joung J, Collins JJ, Zhang F.(2018). Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. Science 360:439-444. doi:10.1126/science.aaq0179.
- Chen JS, Ma E, Harrington LB, DaCosta M, Tian X, Palefsky JM, Doudna JA.(2018). CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. Science 360:436-439. doi:10.1126/science.aar6245
- Donghia N, Fan M, Daringer NM, Bosch I, Dudley DM, O'Connor DH, Gehrke L, Collins JJ. (2016). Rapid, low-cost detection of Zika virus using programmable biomolecular components. Cell 165:1255-1266. doi:10.1016/j.cell.2016.04.059.
- Muller V, Rajer F, Frykholm K, Nyberg LK, Quaderi S, Fritzsche J, Kristiansson E, Ambjornsson, Sandegren L, Westerlund F. (2016). Direct identification of antibiotic resistance genes on single plasmid molecules using CRISPR/Cas9 in combination with optical DNA mapping. Sci Rep 6:37938. doi:10.1038/srep37938.
- https://www.who.int/medical_devices/diagnostics/selection_in-vitro/selection_in-vitro-meetings/00007_01_WHO_Laboratory_Manual_STIs.pdf
- <https://caspr.bio/>
- <https://www.who.int/es/news-room/detail/07-07-2017-antibiotic-resistant-gonorrhoea-on-the-rise-new-drugs-needed>
- <https://www.milenia-biotec.com/en/lateral-flow-assays-using-genome-editing-tools/>
- www.limingbio.com



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons.
Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0
Internacional (CC BY-NC-ND 4.0)
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>