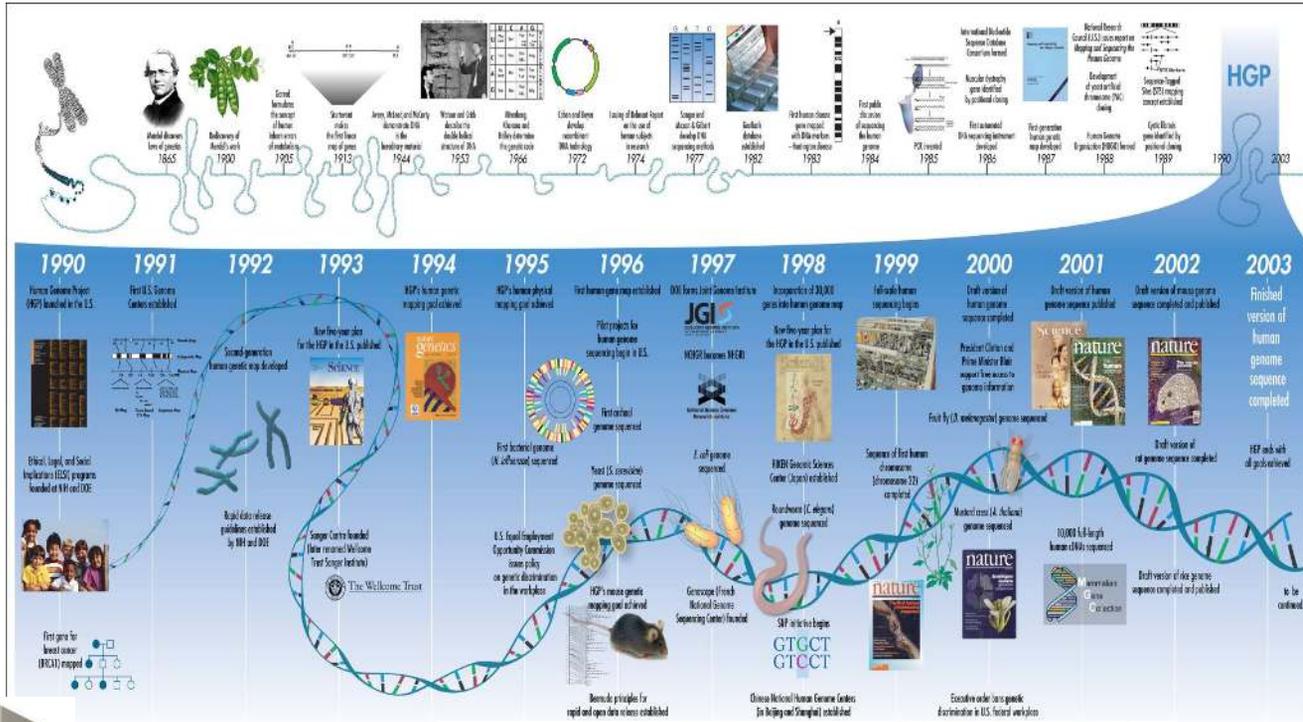


Herramientas y tecnologías de la biología molecular, aplicadas al diagnóstico y al tratamiento en medicina.



Herramientas y tecnologías



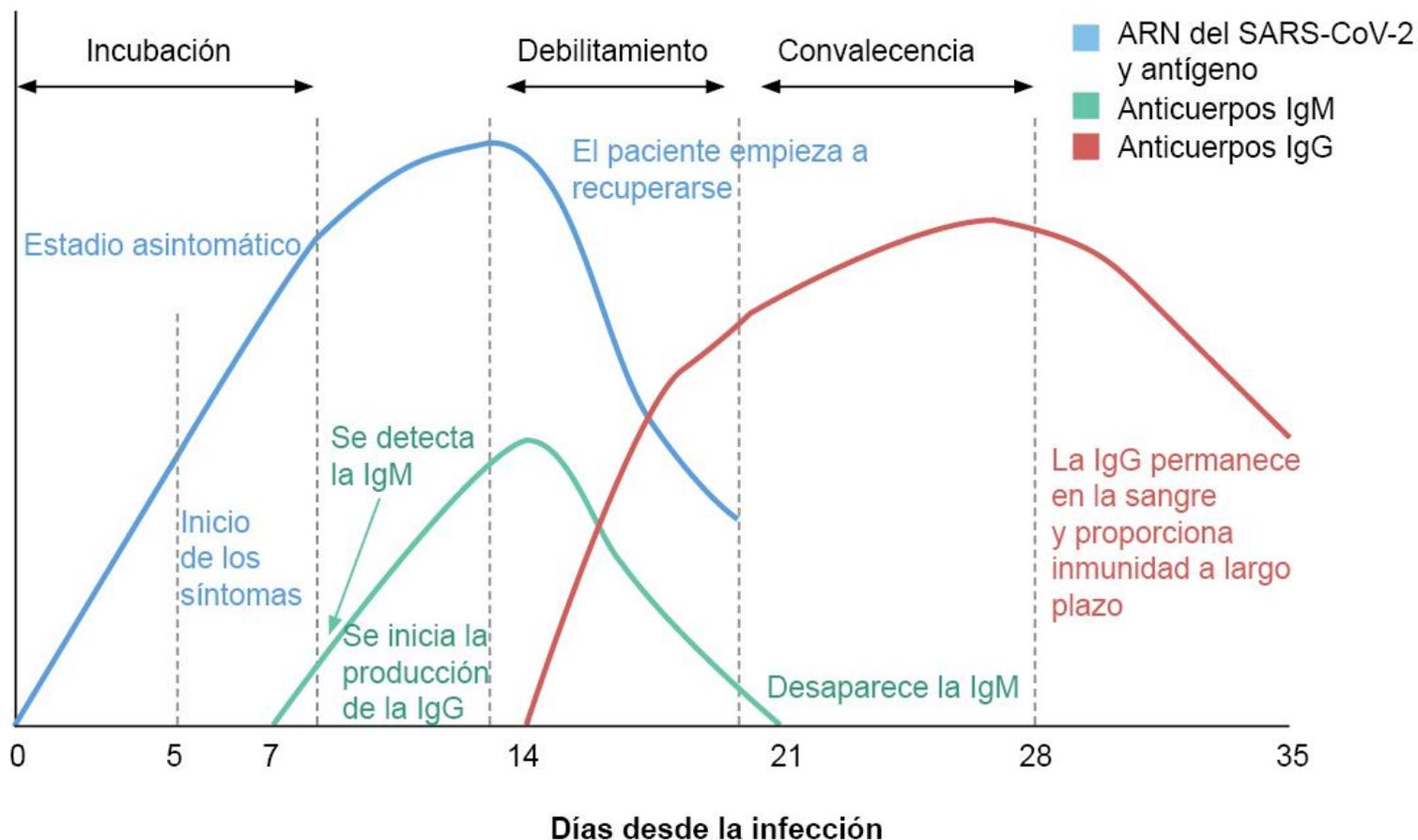
¿ Por qué se han desarrollado tantas **herramientas** para realizar diagnósticos utilizando la **biología molecular**?

Eficacia + Eficiencia = Efectividad

- **Eficacia:** Todo aquello que nos sirve para cumplir el objetivo que se ha planificado.
- **Eficiencia:** Consiste en utilizar los recursos adecuadamente.
- **Efectividad:** **Cumplir con los objetivos planteados utilizando la menor cantidad de recursos posibles.**

¿Cómo?

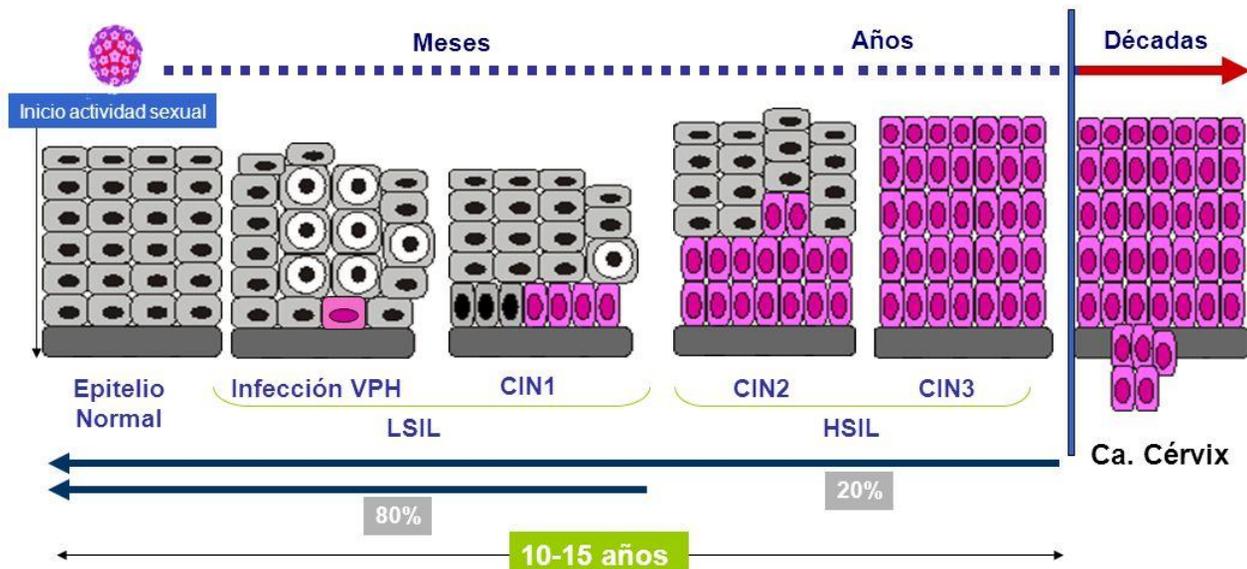
SARS-CoV-2



¿Cómo?

HPV

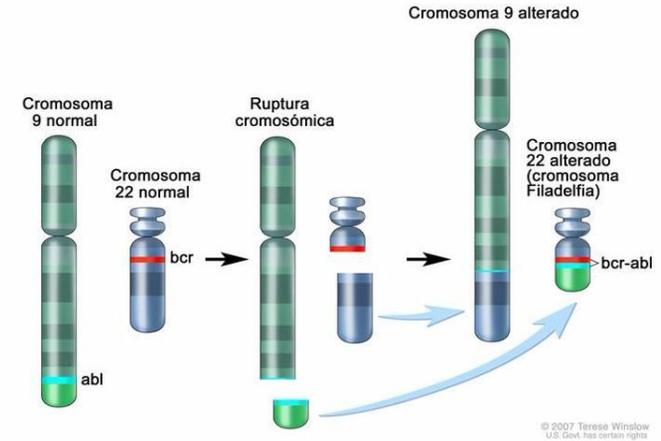
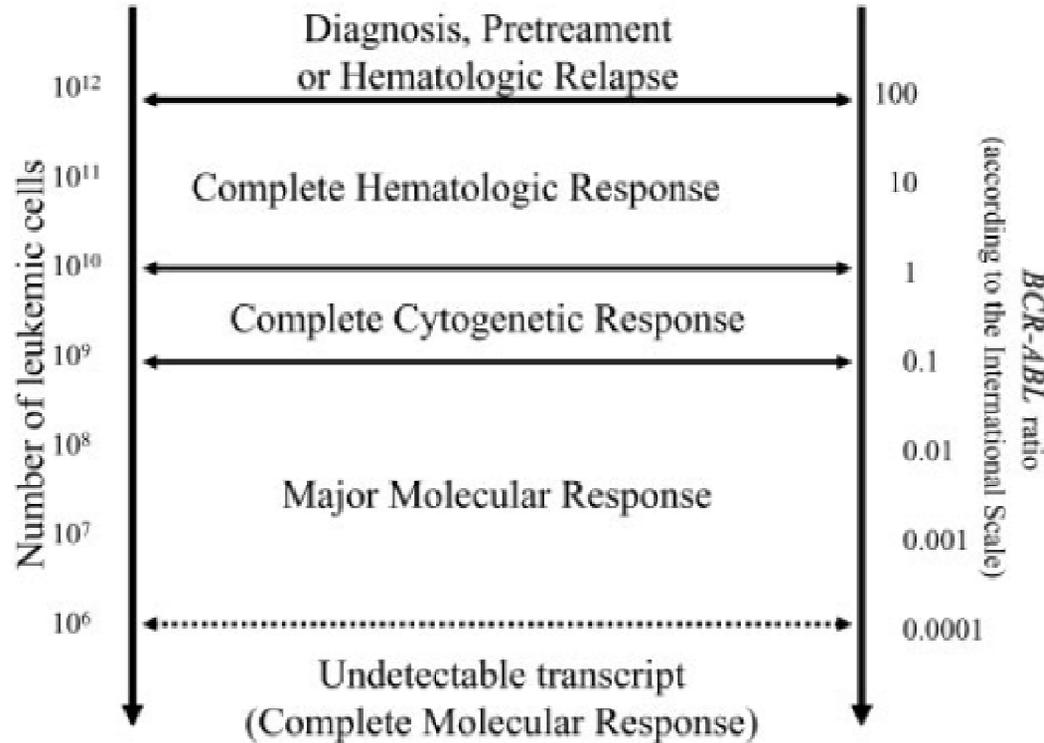
Historia natural de la infección por VPH



CIN= Cervical Intraepithelial Neoplasia
SIL= Squamous Intraepithelial Lesion

¿Cómo?

BCR-ABL



¿Entonces!...¿ Por qué se han desarrollado tantas **herramientas** para realizar diagnósticos utilizando la **biología molecular**?

Porque introducen un
cambio **positivo** en la vida de
los **pacientes**.

Tecnologías aplicadas al estudio de biomarcadores moleculares

1. Aspectos Pre-analíticos:

1. Toma de muestra
2. Conservación de la muestra
3. Preparación de la muestra para el análisis

1. Aspectos Técnicos:

1. Extracción de Ácidos nucleicos
2. PCR/ RT-PCR/ NESTED PCR
3. Real time PCR
4. Secuenciación Snger
5. NGS

2. Aspectos analíticos:

1. Controles de calidad
2. Validación técnica
3. Validación clínica

3. Aspectos Post- analíticos:

1. Modelo de informe
2. Interpretación del resultado

1. Aspectos Pre-análiticos:

Entre un **40 %** y un **70 %** de los errores cometidos en un laboratorio clínico se originan en esta etapa.

Los errores que pueden generarse son de significancia distinta y su medida es difícil ya que algunos de ellos se ponen de manifiesto en la fase analítica y otros no se evidenciarán.

Debe tenerse en cuenta que muchas veces, en la evolución de un paciente o en el monitoreo de la eficacia terapéutica, son muestras irrepetibles, es decir, que no pueden volver a tomarse.

***En Biología Molecular, los
ácidos nucleicos son el analito.
(ADN – ARN)***

Extracción manual de Ácidos Nucleicos:

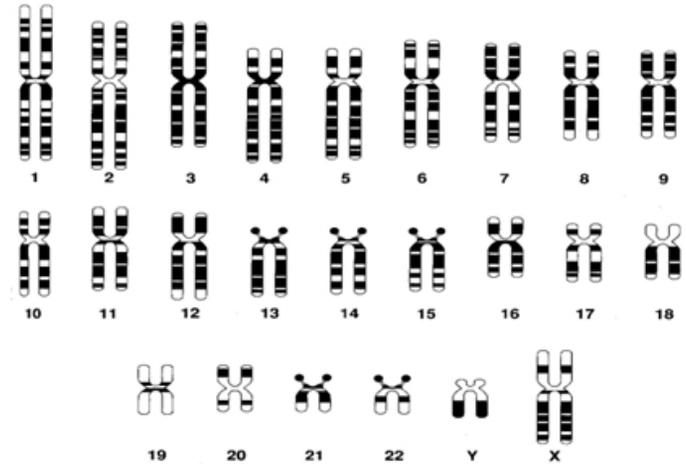
Los pasos necesarios para una correcta extracción y purificación mediante un procedimiento químico son:

1. Lisis de las células.

2. Degradación de la fracción proteica asociada al ADN.

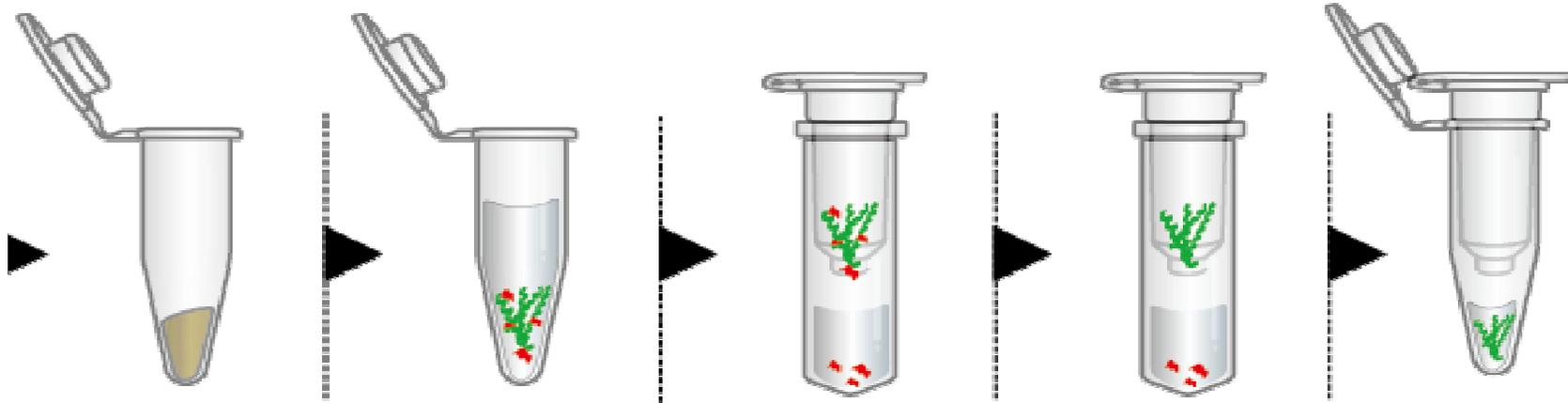
3. Purificación. Consta de 3 fases:

- a. Precipitación.
- a. Lavado del pellet
- a. Recuperación.



Extracción semi-automatizada de Ácidos Nucleicos:

El procedimiento puede realizarse por separación física con la ayuda de minicolumnas equipadas con una membrana de sílica que retiene específicamente los ácidos nucleicos.



Kits comerciales: High Pure Template (Roche), Stool Mini Kit (Quiagen)

Ej: CM V Cualitativo, CM V CV, EBV Cualitativo, EBV CV.

Extracción automatizada de Ácidos nucleicos:



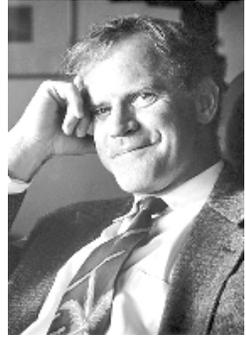
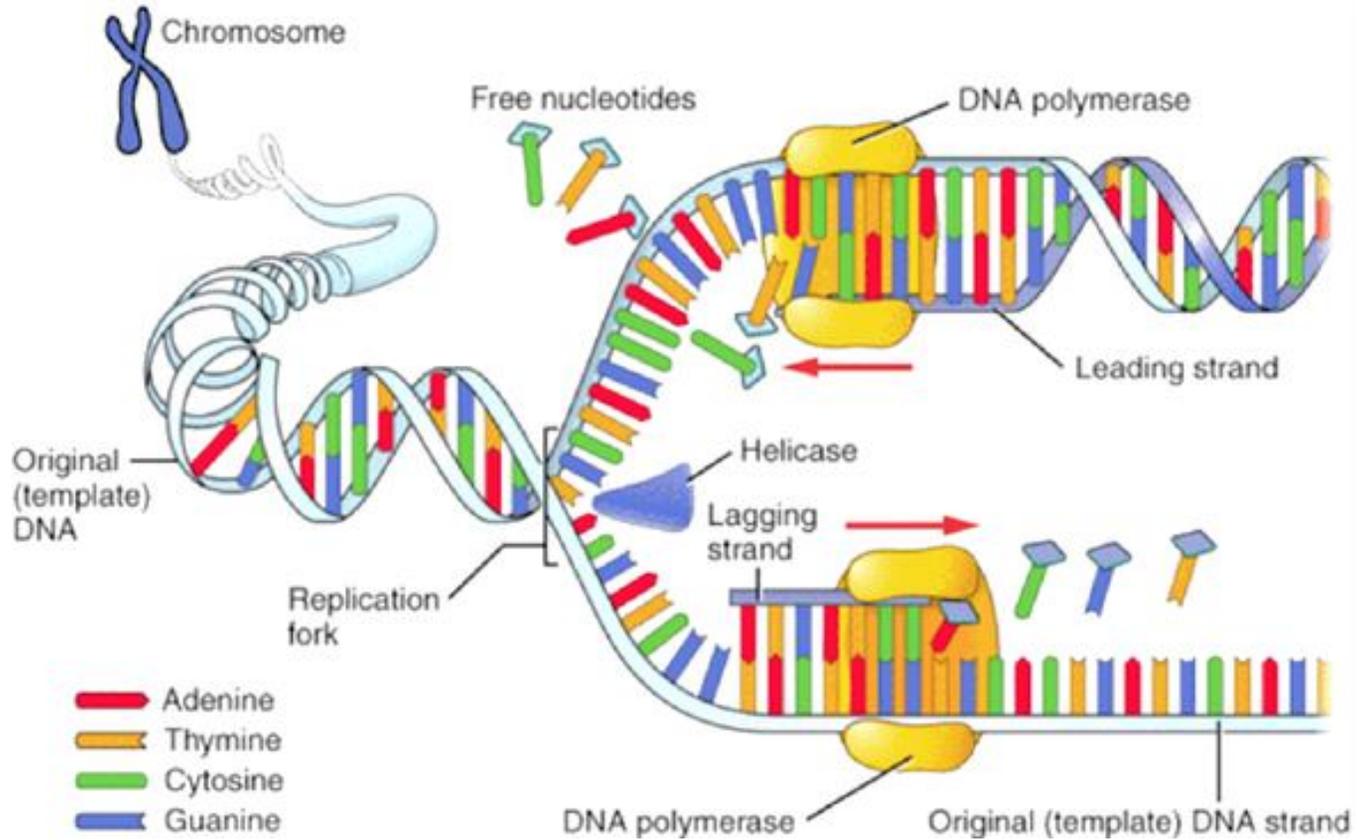
sistema de extracción basado en el uso de partículas magnéticas que permite el aislamiento rápido y automatizado de ácidos nucleicos.

El ácido nucleico obtenido es altamente puro y puede ser usado en múltiples aplicaciones, tales como PCR convencional o cuantitativa, secuenciación, análisis mediante arrays, etc.

Ej: MagNA Pure (Roche)

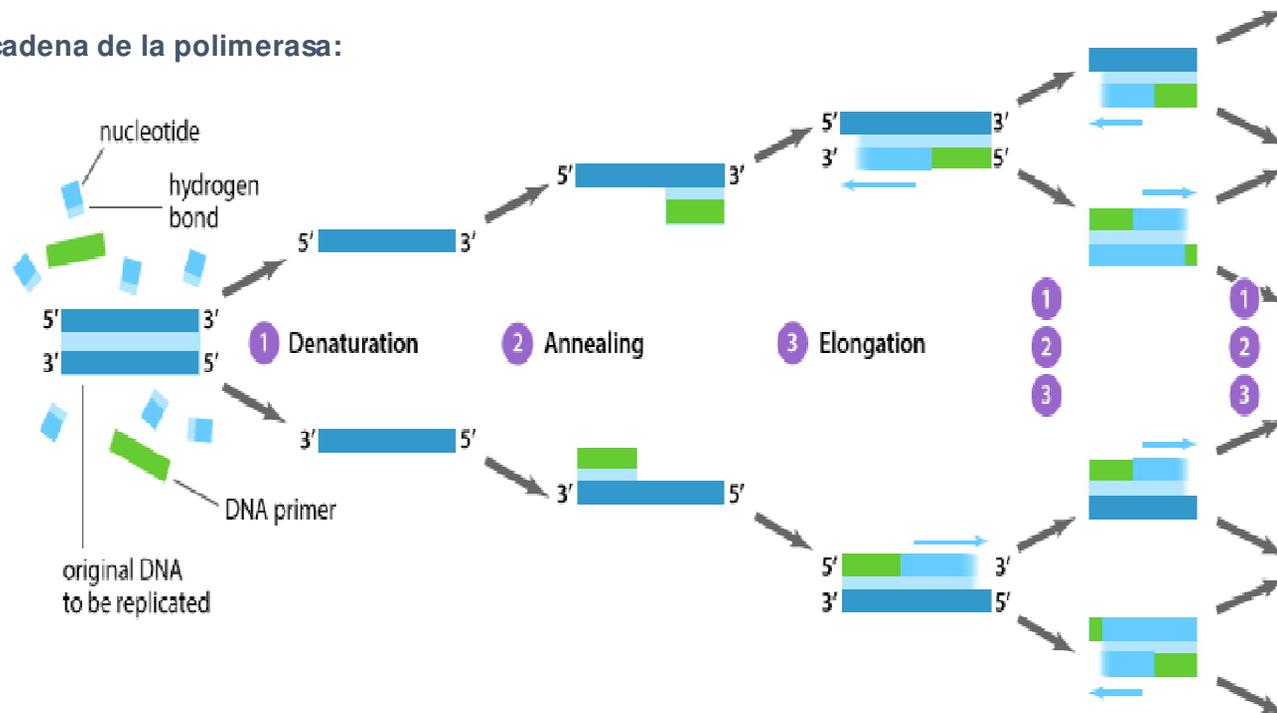


PCR – Reacción en cadena de la polimerasa:

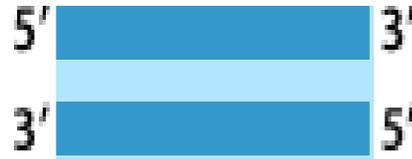
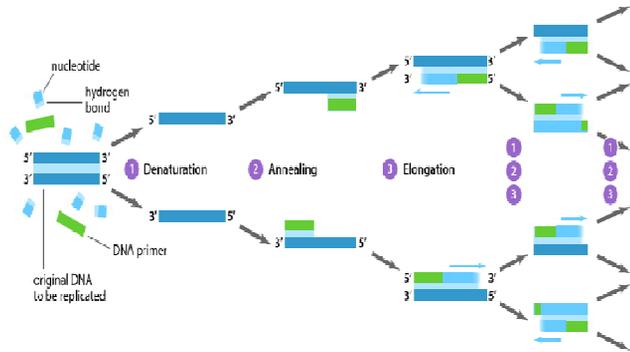


Kary Mullis

PCR – Reacción en cadena de la polimerasa:

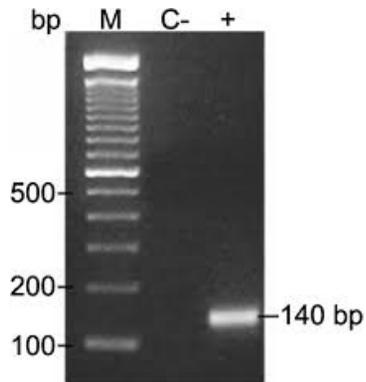


Kary Mullis

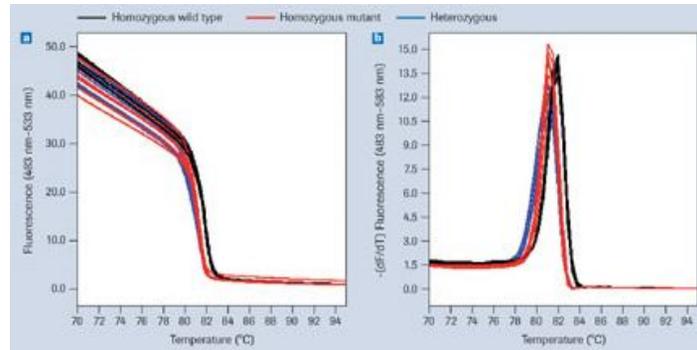


Amplicon = producto de la amplificación por Métodos Moleculares de un fragmento de ADN o ARN.

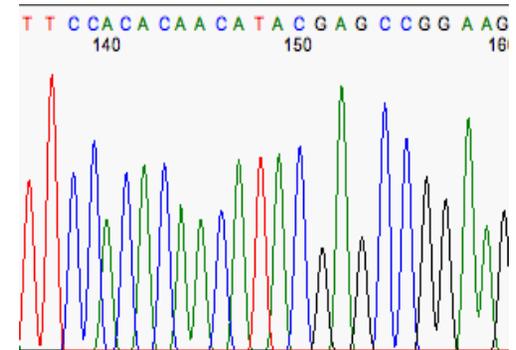
TAMAÑO:



TEMPERATURA DE MELTING:



SECUENCIA:



I	Sigmund Freud	Obras completas
II	Sigmund Freud	Obras completas
III	Sigmund Freud	Obras completas
IV	Sigmund Freud	Obras completas
V	Sigmund Freud	Obras completas
VI	Sigmund Freud	Obras completas
VII	Sigmund Freud	Obras completas
VIII	Sigmund Freud	Obras completas
IX	Sigmund Freud	Obras completas
X	Sigmund Freud	Obras completas
XI	Sigmund Freud	Obras completas
XII	Sigmund Freud	Obras completas
XIII	Sigmund Freud	Obras completas
XIV	Sigmund Freud	Obras completas
XV	Sigmund Freud	Obras completas
XVI	Sigmund Freud	Obras completas
XVII	Sigmund Freud	Obras completas
XVIII	Sigmund Freud	Obras completas
XIX	Sigmund Freud	Obras completas
XX	Sigmund Freud	Obras completas
XXI	Sigmund Freud	Obras completas
XXII	Sigmund Freud	Obras completas
XXIII	Sigmund Freud	Obras completas
XXIV	Sigmund Freud	Obras completas

Nota introductoria

«Bericht über meine mit Universitäts-Jubiläums-Reisestipendium unternommene Reise nach Paris und Berlin»

Primera edición

(1886 Fecha de redacción.)

1936 *Int. J. Psycho-Anal.*, 37, nº 1, págs. 2-7. Traducción de James Strachey.

Edición en alemán

1960 En J. y R. Gicklhorn, *Sigmund Freuds akademische Laufbahn im Lichte der Dokumente*, Viena, pág. 82.

Traducción en castellano *

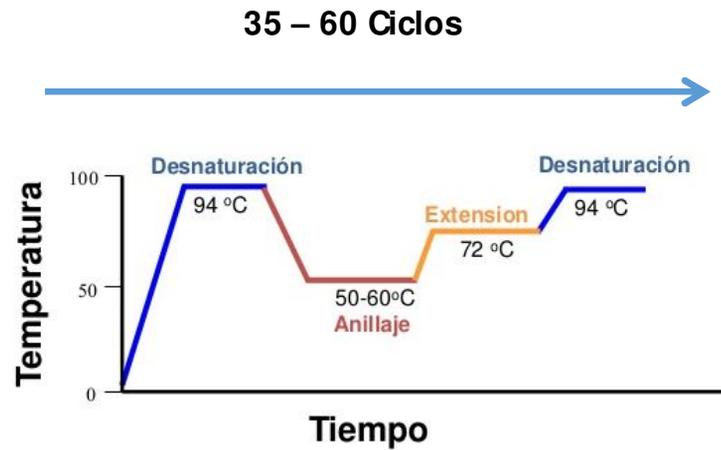
1956 «Informe sobre mis estudios en París y Berlín, realizados con la ayuda de una beca de viaje concedida por el Fondo de Jubileo universitario», *RP*, 13, nº 3, págs. 256-65. Traducción de Ladovico Rosenthal.

El informe con que comienzan, apropiadamente, estas *Obras completas* es el relato de un hecho histórico —el desplazamiento del interés científico de Freud de la neurología a la psicología— narrado por su protagonista en la misma época en que sucedió.

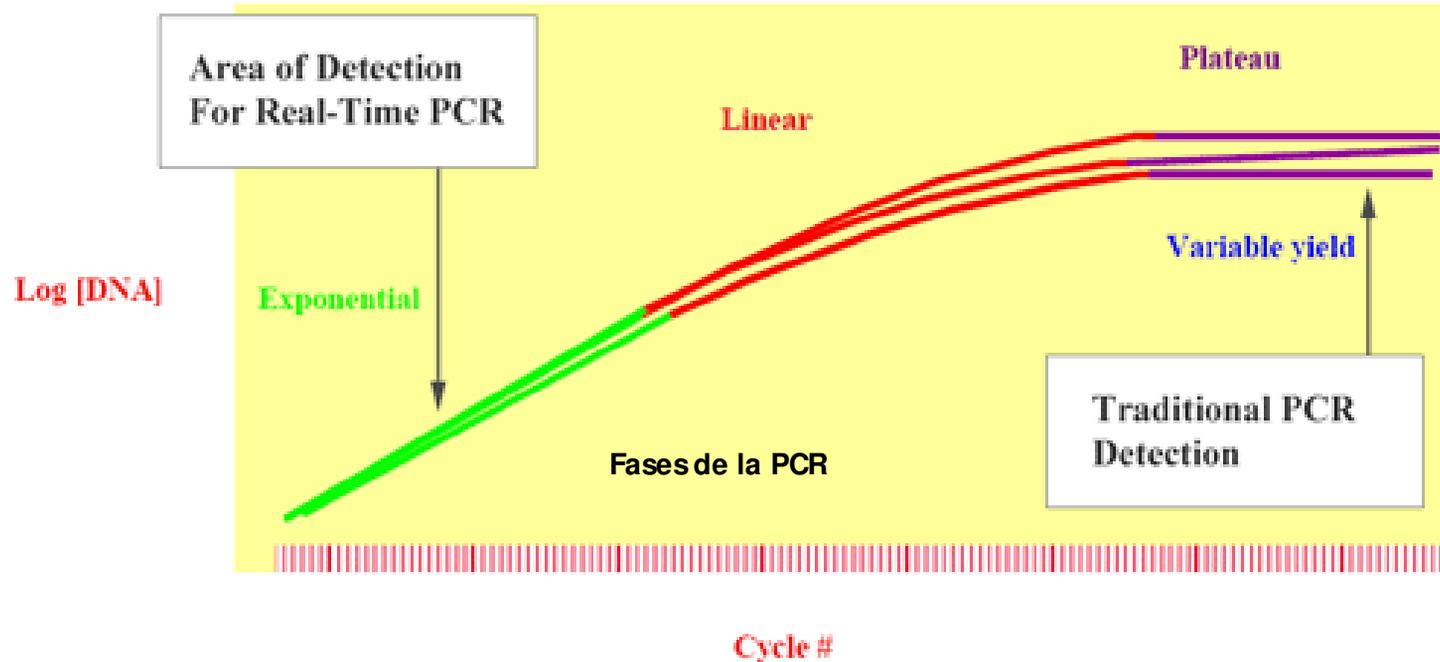
Las circunstancias en que Freud obtuvo, en 1885, una beca de viaje de la Universidad de Viena han sido relatadas en detalle por Ernest Jones (1953, págs. 82-4). La subvención

* (Cf. la «Advertencia sobre la edición en castellano, *supra*, págs. xxviii y n. 6.)

PCR – Reacción en cadena de la polimerasa:

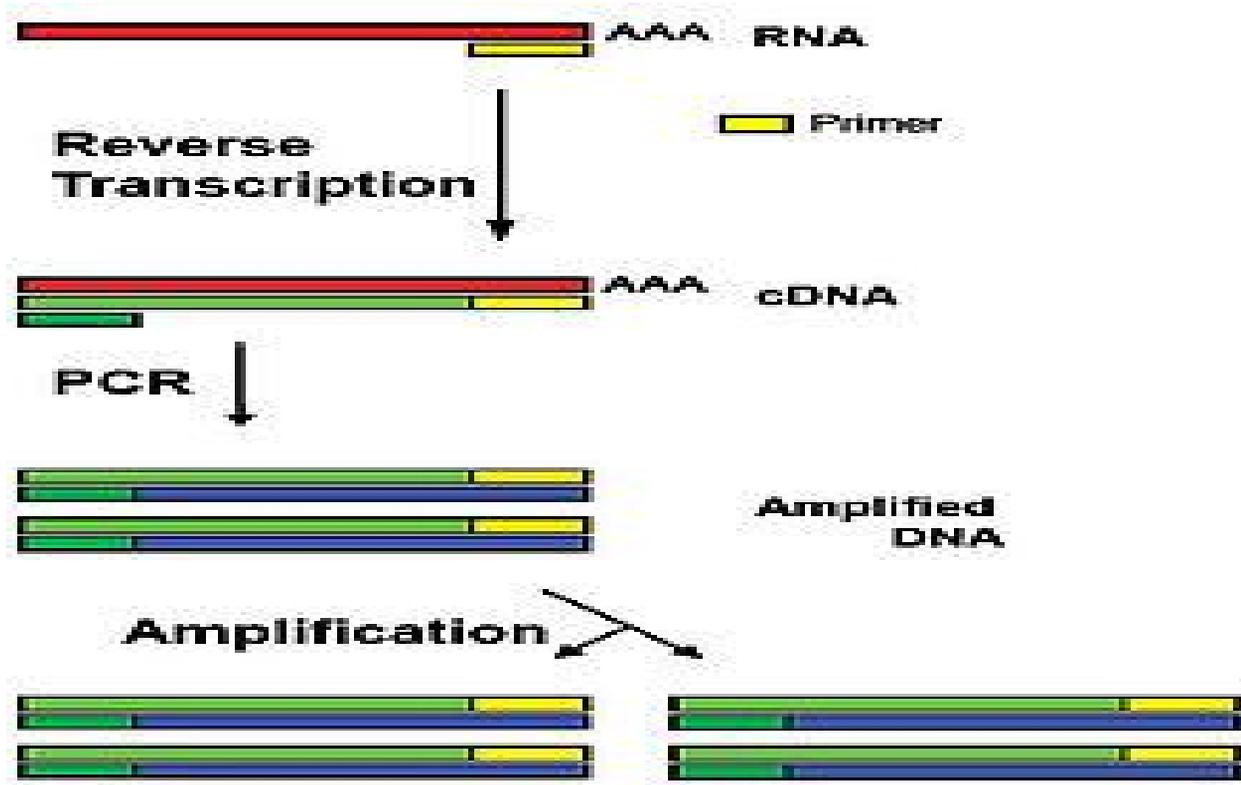


PCR – Reacción en cadena de la polimerasa:

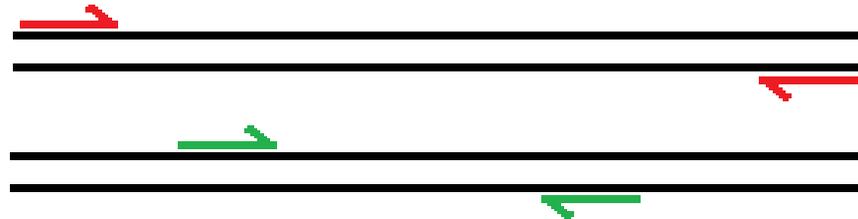


Una PCR ideal debería ser altamente **específica**, **sensible** y de **gran rendimiento**.

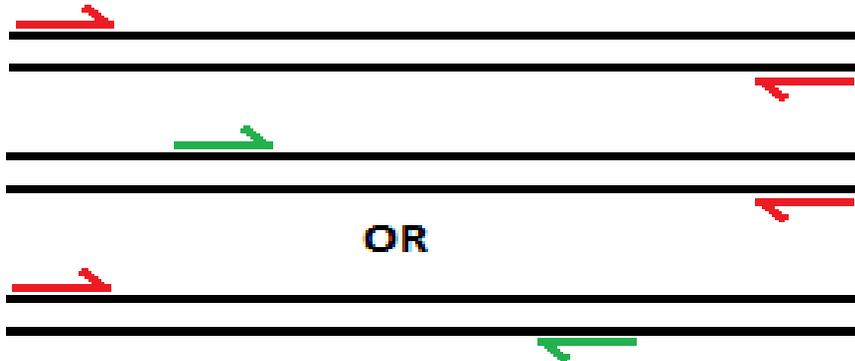
RT-PCR – Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa:



Seminested – Nested PCR:



Nested PCR

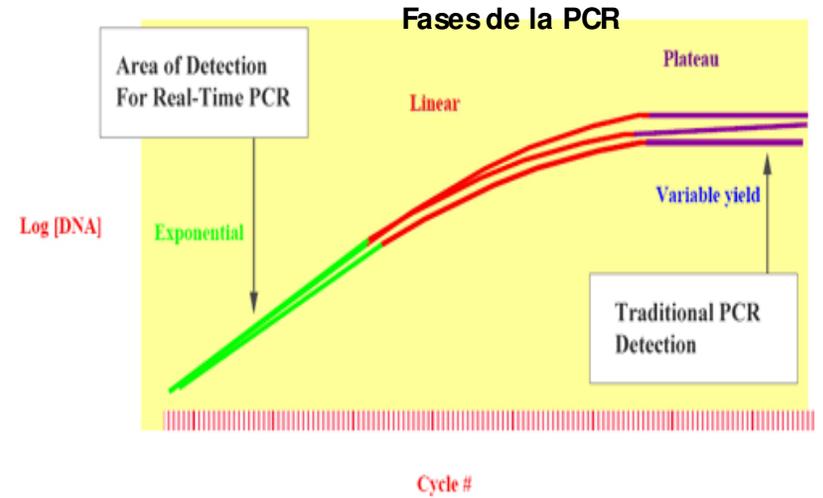


Semi-Nested PCR

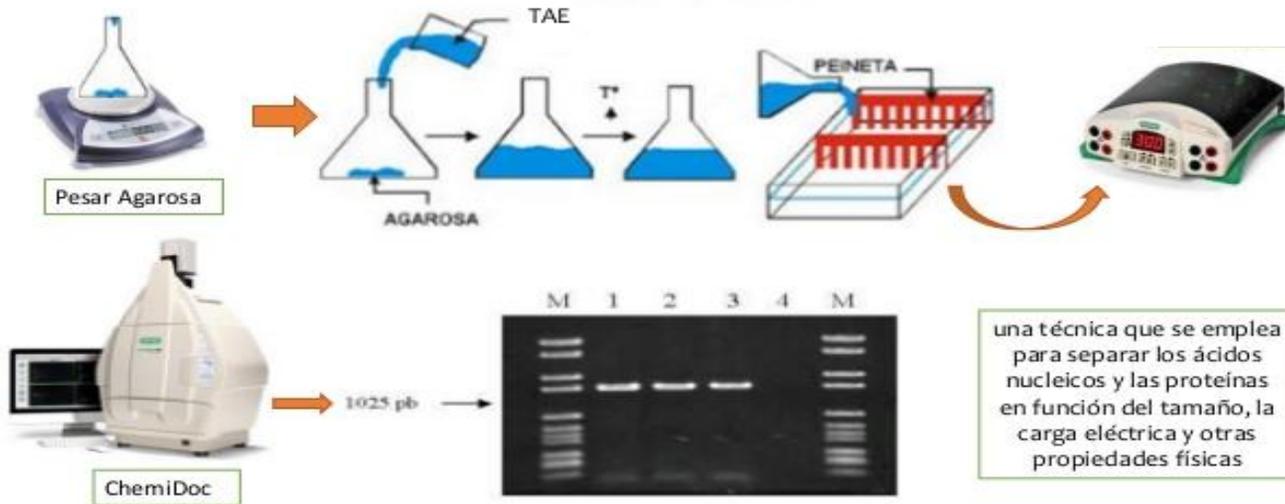
Se aumenta la **sensibilidad** y la **especificidad** de la PCR.

Electroforesis en gel de agarosa (PCR punto final) :

Los procesos de **amplificación** y **detección** ocurren desfasados.

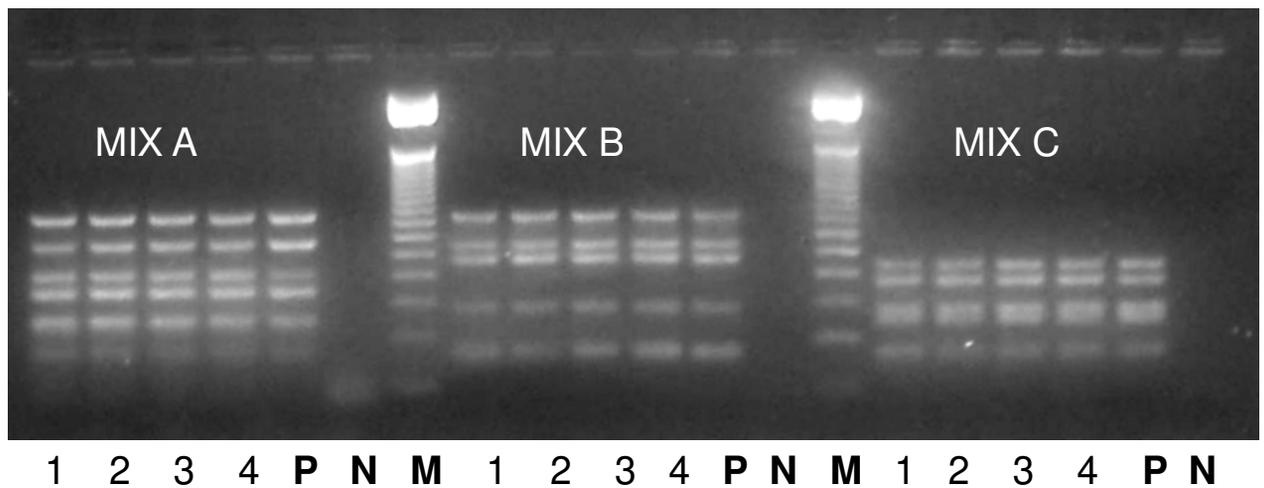
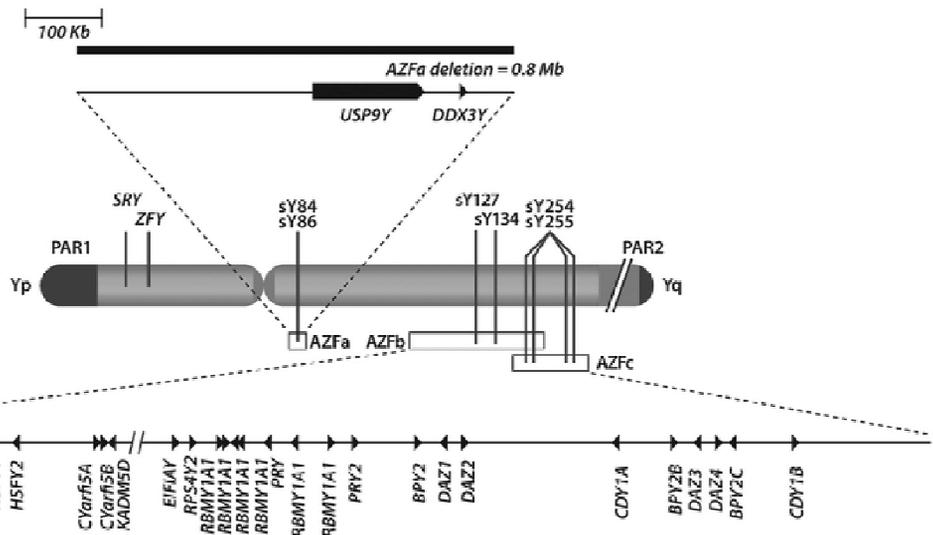
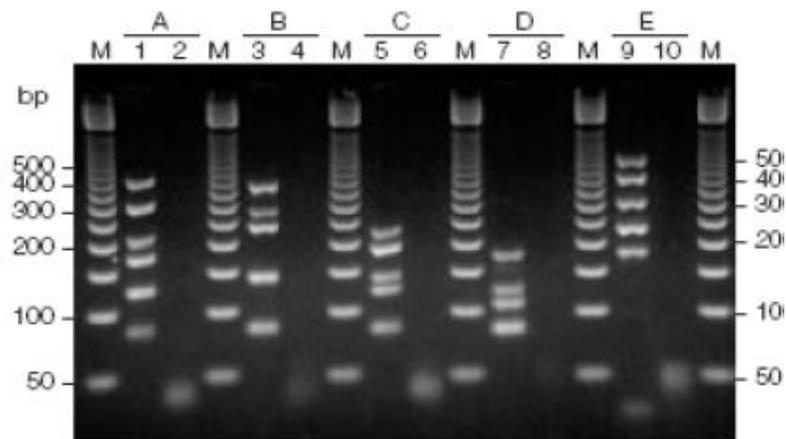


GEL DE AGAROSA



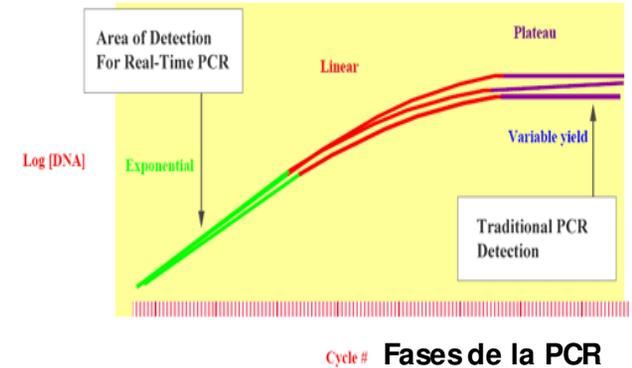
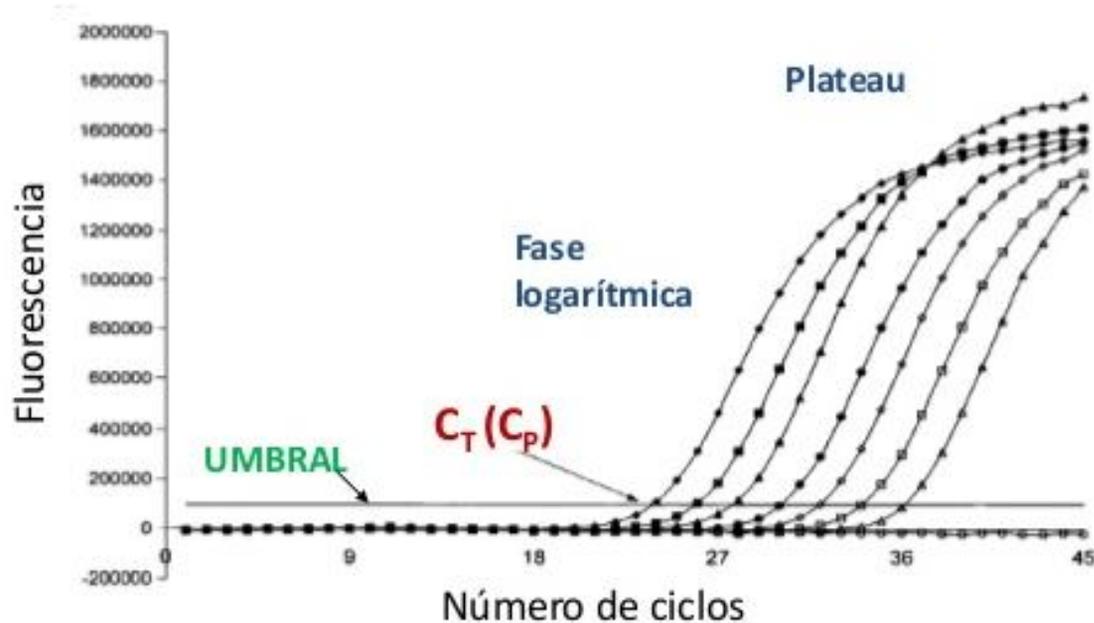
una técnica que se emplea para separar los ácidos nucleicos y las proteínas en función del tamaño, la carga eléctrica y otras propiedades físicas

PCR M ultiplex punto final :



Real time PCR:

La real time PCR es cinética: Los procesos de **amplificación** y **detección** ocurren dentro del mismo vial cerrado.

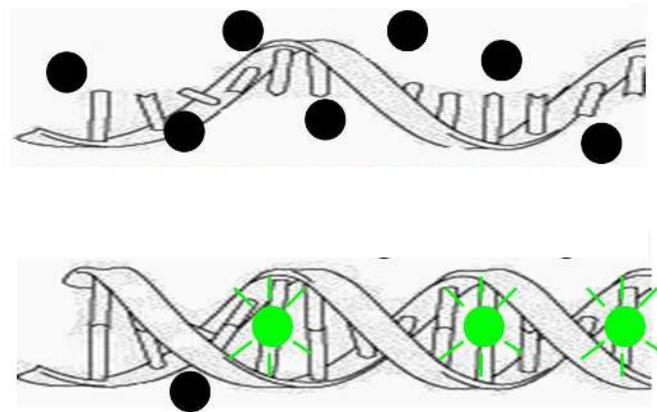


Existen dos métodos para la detección: 1- **Métodos No Específicos.**
2- **Métodos Específicos.**

Real time PCR:

Los **métodos no específicos** se basan en el uso de moléculas intercalantes que tienen afinidad por el ADN de doble cadena y que al ser oxidados generan una señal fluorescente (**SYBR**).

SYBR Green



The FilmArray® Respiratory Panel 2 (RP2)

Sample type: Nasopharyngeal Swab

Viruses

Adenovirus
 Coronavirus HKU1
 Coronavirus NL63
 Coronavirus 229E
 Coronavirus OC43
 Human Metapneumovirus
 Human Rhinovirus/Enterovirus
 Influenza A
 Influenza A/H1
 Influenza A/H1-2009
 Influenza A/H3
 Influenza B
 Parainfluenza Virus 1
 Parainfluenza Virus 2
 Parainfluenza Virus 3
 Parainfluenza Virus 4
 Respiratory Syncytial Virus

Bacteria

Bordetella parapertussis
Bordetella pertussis
Chlamydia pneumoniae
Mycoplasma pneumoniae



21 | 1
 Pathogens | Test

97.1%
 Sensitivity*
 99.3%
 Specificity*

FilmArray® Meningitis/Encephalitis Panel

1 Test. 14 Targets. All in about an hour.



Bacteria

Escherichia coli K1
Haemophilus influenzae
Listeria monocytogenes
Neisseria meningitidis
Streptococcus agalactiae
Streptococcus pneumoniae



Viruses

Cytomegalovirus (CMV)
 Enterovirus
 Herpes simplex virus 1 (HSV-1)
 Herpes simplex virus 2 (HSV-2)
 Human herpesvirus 6 (HHV-6)
 Human parechovirus
 Varicella zoster virus (VZV)



Fungi

Cryptococcus neoformans/gattii



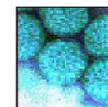
Bacteria

Campylobacter (jejuni, coli and upsaliensis)
Clostridium difficile (toxin A/B)
Plesiomonas shigelloides
Salmonella
Yersinia enterocolitica
Vibrio (parahaemolyticus, vulnificus and cholerae)
Vibrio cholerae
Diarrheagenic E. coli/Shigella
 Enteroaggregative *E. coli* (EAEC)
 Enteropathogenic *E. coli* (EPEC)
 Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) *lt/stx*
 Shiga-like toxin-producing *E. coli* (STEC) *stx1/stx2*
E. coli O157
Shigella/Enteroinvasive E. coli (EIEC)



Parasites

Cryptosporidium
Cyclospora cayetanensis
Entamoeba histolytica
Giardia lamblia

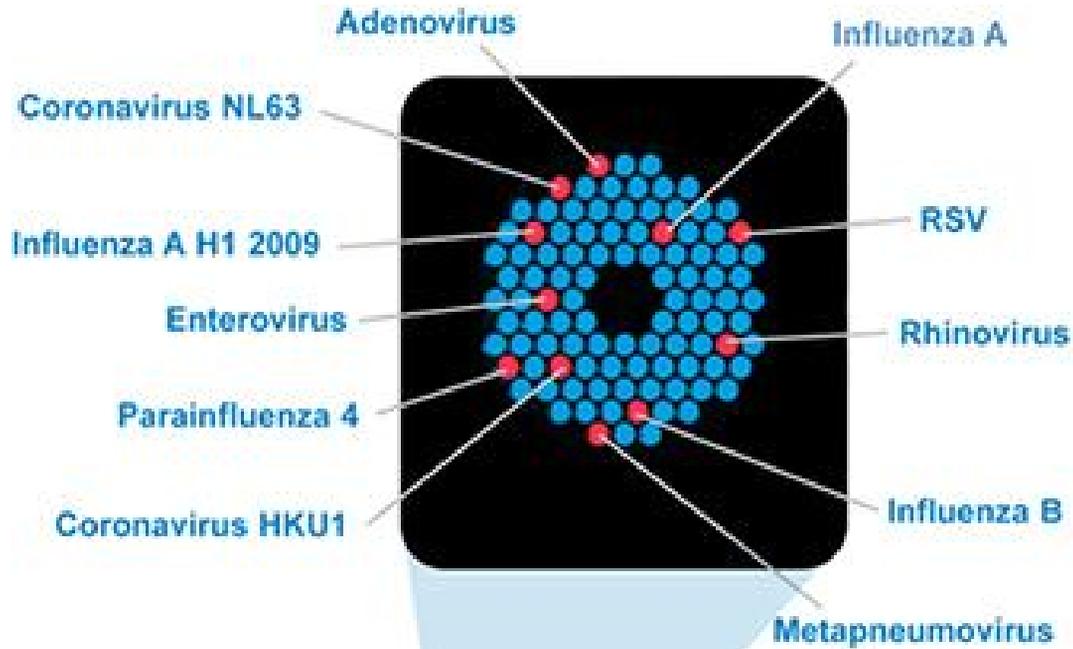


Viruses

Adenovirus F 40/41
 Astrovirus
 Norovirus GI/GII
 Rotavirus A
 Sapovirus (I, II, IV and V)

FilmArray® GI Panel		BIOFIRE	
www.BioFireDX.com			
Run Summary			
Sample ID:	4073046	Run Date:	09 Apr 2018 10:51 AM
Detected:	Enteroaggregative <i>E. coli</i> (EAEC) <i>Shigella/Enteroinvasive E. coli</i> (EIEC)	Controls:	Passed
Result Summary			
Bacteria			
Not Detected	<i>Campylobacter</i>		
Not Detected	<i>Clostridium difficile</i> toxin A/B		
Not Detected	<i>Plesiomonas shigelloides</i>		
Not Detected	<i>Salmonella</i>		
Not Detected	<i>Vibrio</i>		
Not Detected	<i>Vibrio cholerae</i>		
Not Detected	<i>Yersinia enterocolitica</i>		
Diarrheagenic E. coli/Shigella			
✓ Detected	Enteroaggregative <i>E. coli</i> (EAEC)		
Not Detected	Enteropathogenic <i>E. coli</i> (EPEC)		
Not Detected	Enterotoxigenic <i>E. coli</i> (ETEC) <i>lt/stx</i>		
Not Detected	Shiga-like toxin-producing <i>E. coli</i> (STEC) <i>stx1/stx2</i>		
⊖ N/A	<i>E. coli</i> O157		
✓ Detected	<i>Shigella/Enteroinvasive E. coli</i> (EIEC)		
Parasites			
Not Detected	<i>Cryptosporidium</i>		
Not Detected	<i>Cyclospora cayetanensis</i>		
Not Detected	<i>Entamoeba histolytica</i>		
Not Detected	<i>Giardia lamblia</i>		
Viruses			
Not Detected	Adenovirus F 40/41		
Not Detected	Astrovirus		
Not Detected	Norovirus GI/GII		
Not Detected	Rotavirus A		
Not Detected	Sapovirus		

PCR Multiplex Real Time No Especifico :



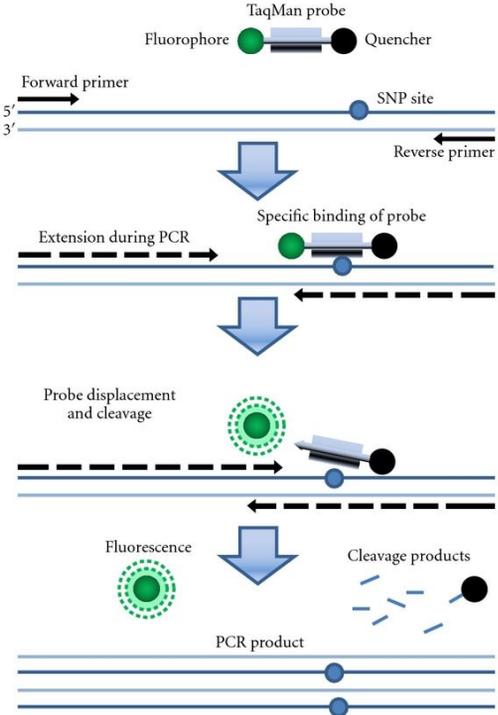
Real time PCR:

Los **métodos específicos** siguen el principio conocido como FRET para generar la señal.

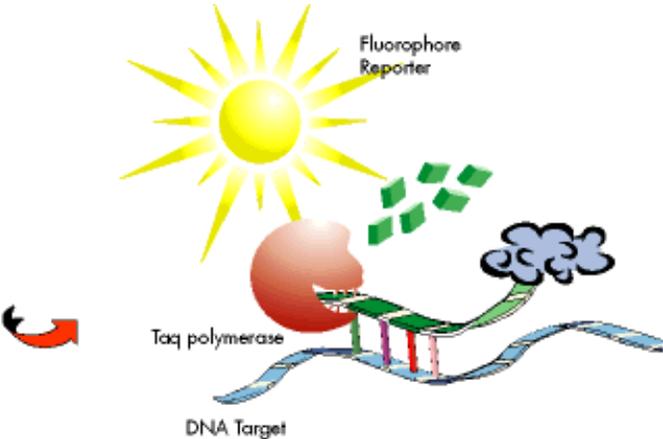
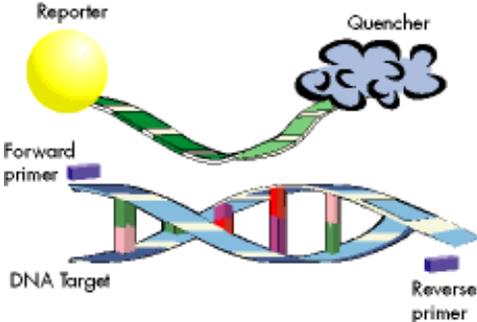
Utilizan **sondas** de secuencia conocida para realizar la detección.

Real time PCR:

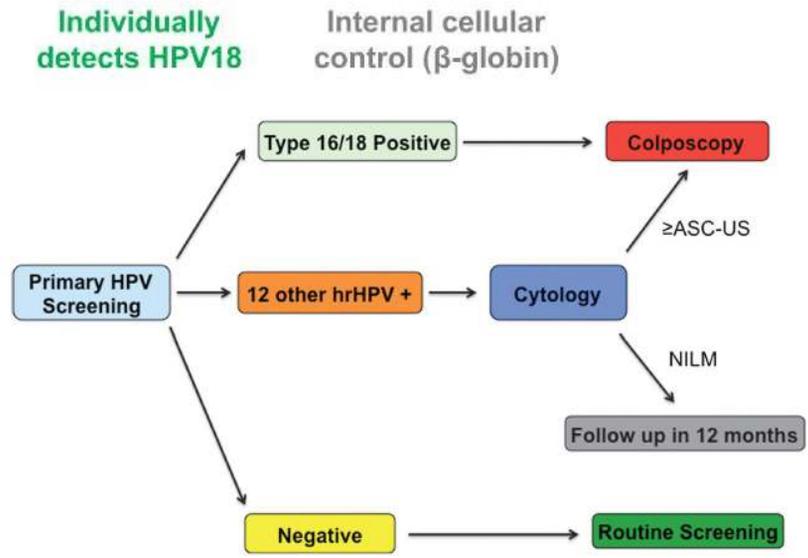
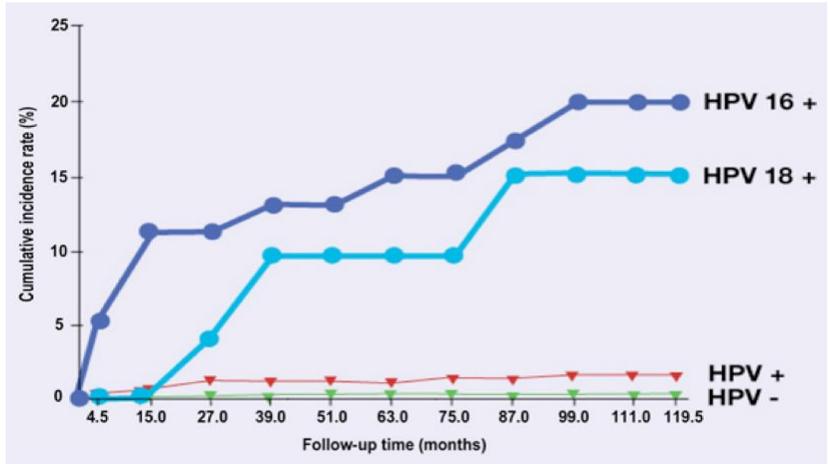
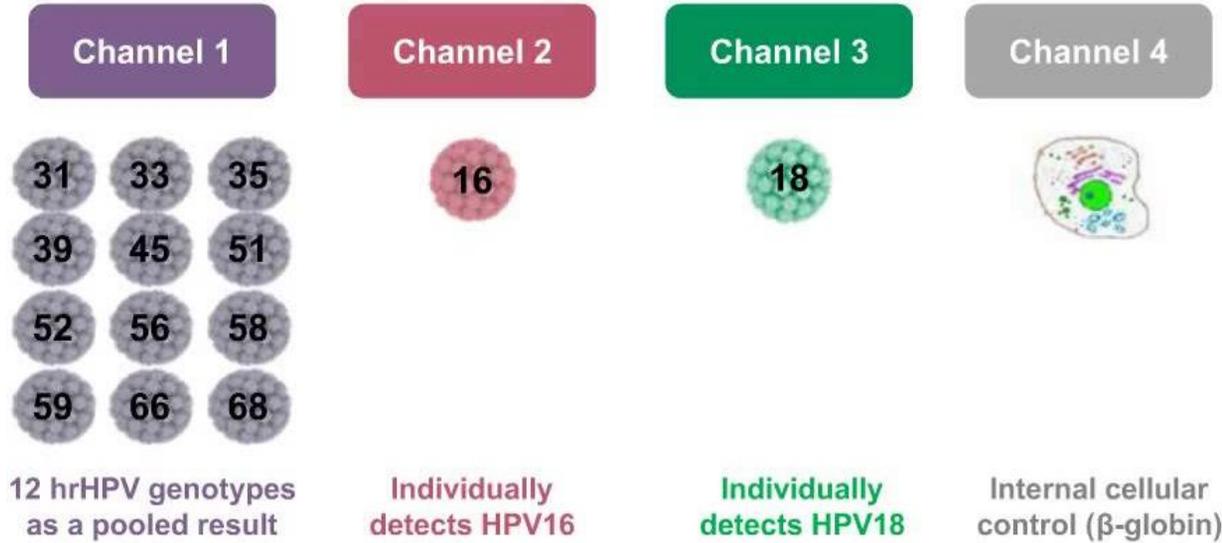
métodos específicos - TaqMan



Taqman™ probe

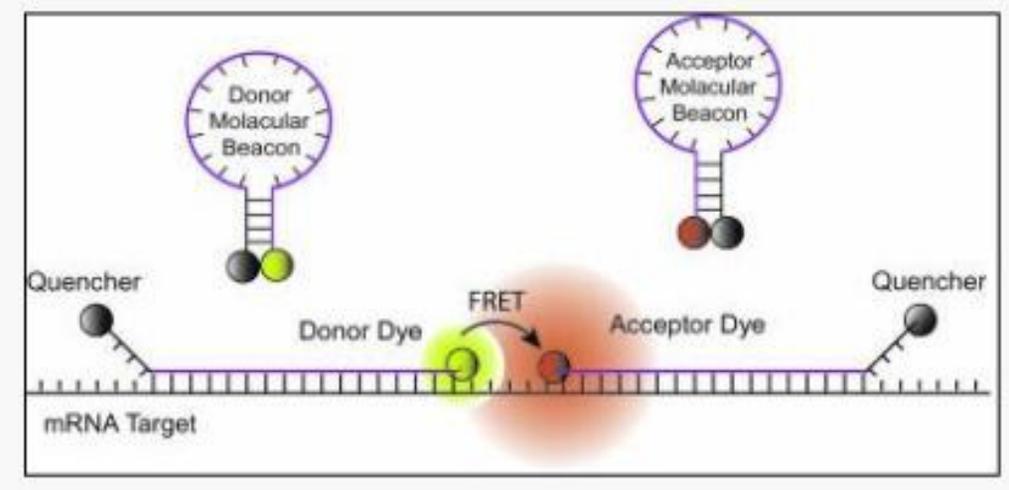


PCR Multiplex Real Time Especifico :

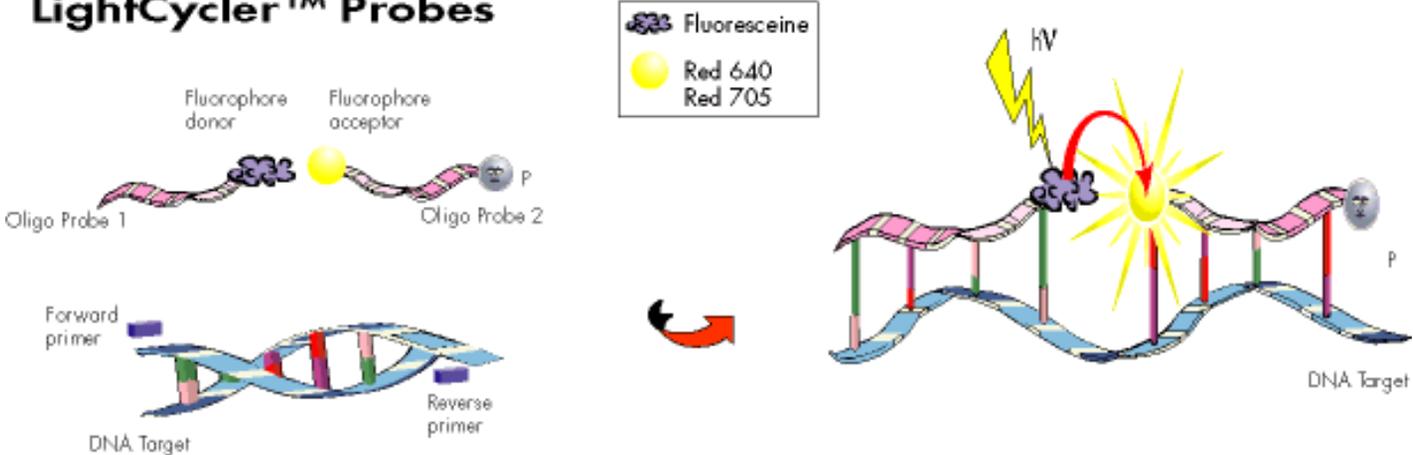


Real time PCR:

métodos específicos - Probes

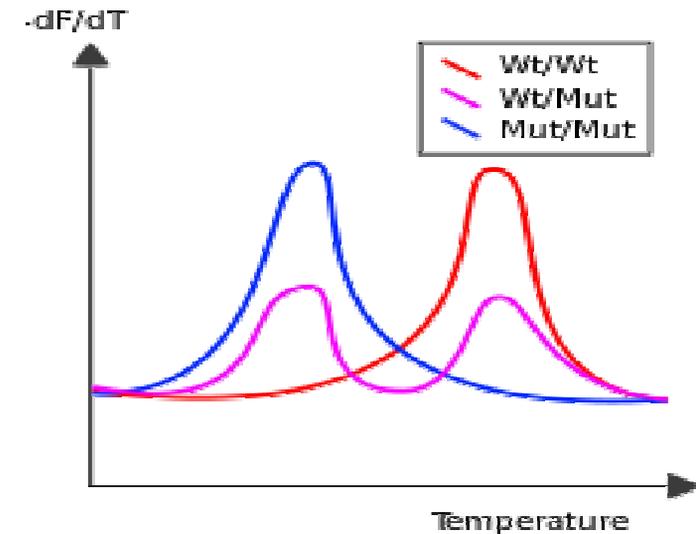
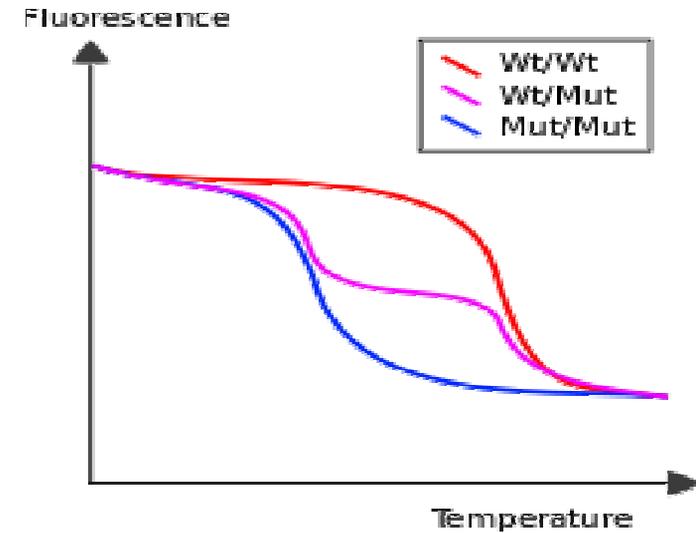
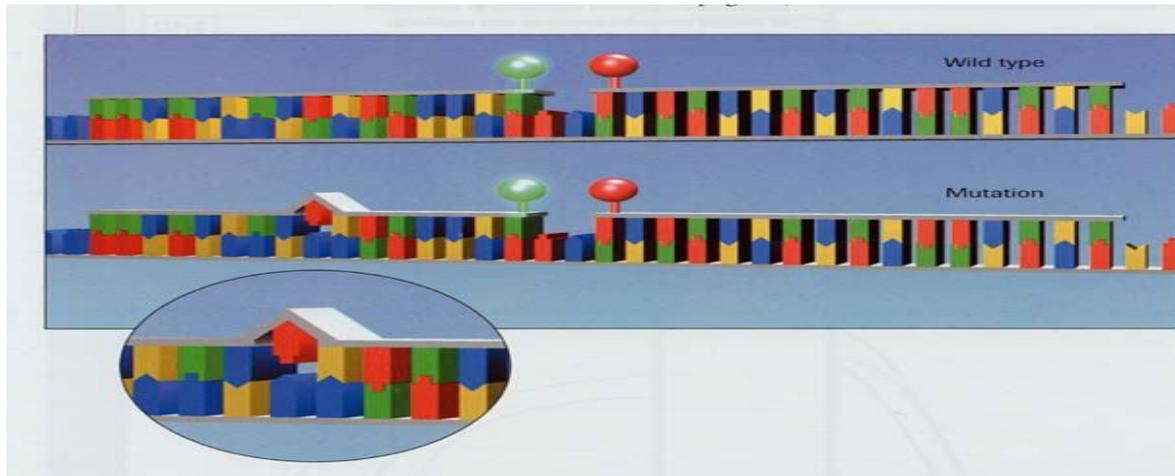


LightCycler™ Probes



Análisis de mutaciones y polimorfismos utilizando Curvas de Disociación:

- 1- Se realizan curvas de Fluorescencia vs. Temperatura luego de finalizada la reacción
- 2- De estas curvas se determina el **T_m** (temperatura de fusión de cada producto generado, que es directamente dependiente de la secuencia del mismo)
- 3- Tan solo la diferencia en una base entre dos secuencias genera una diferencia en la T_m, lo cual Nos permite diferenciarlos



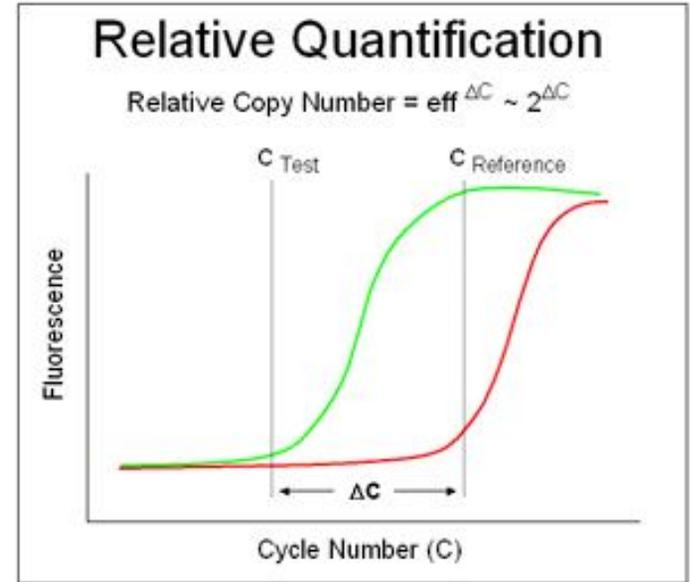
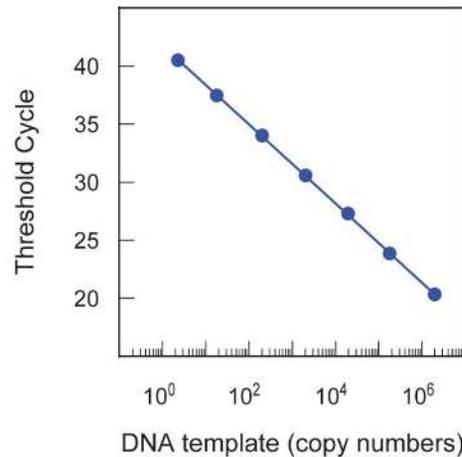
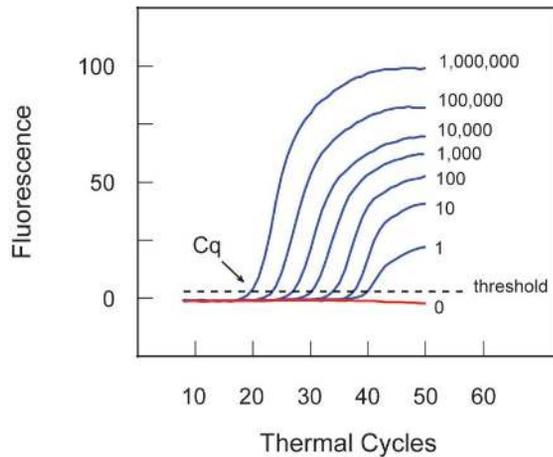
¿Como se **cuantifica** en la PCR Tiempo Real?

A través de STD o por medio de
un gen de expresión
constitutiva.

Cuantificación Absoluta

VS

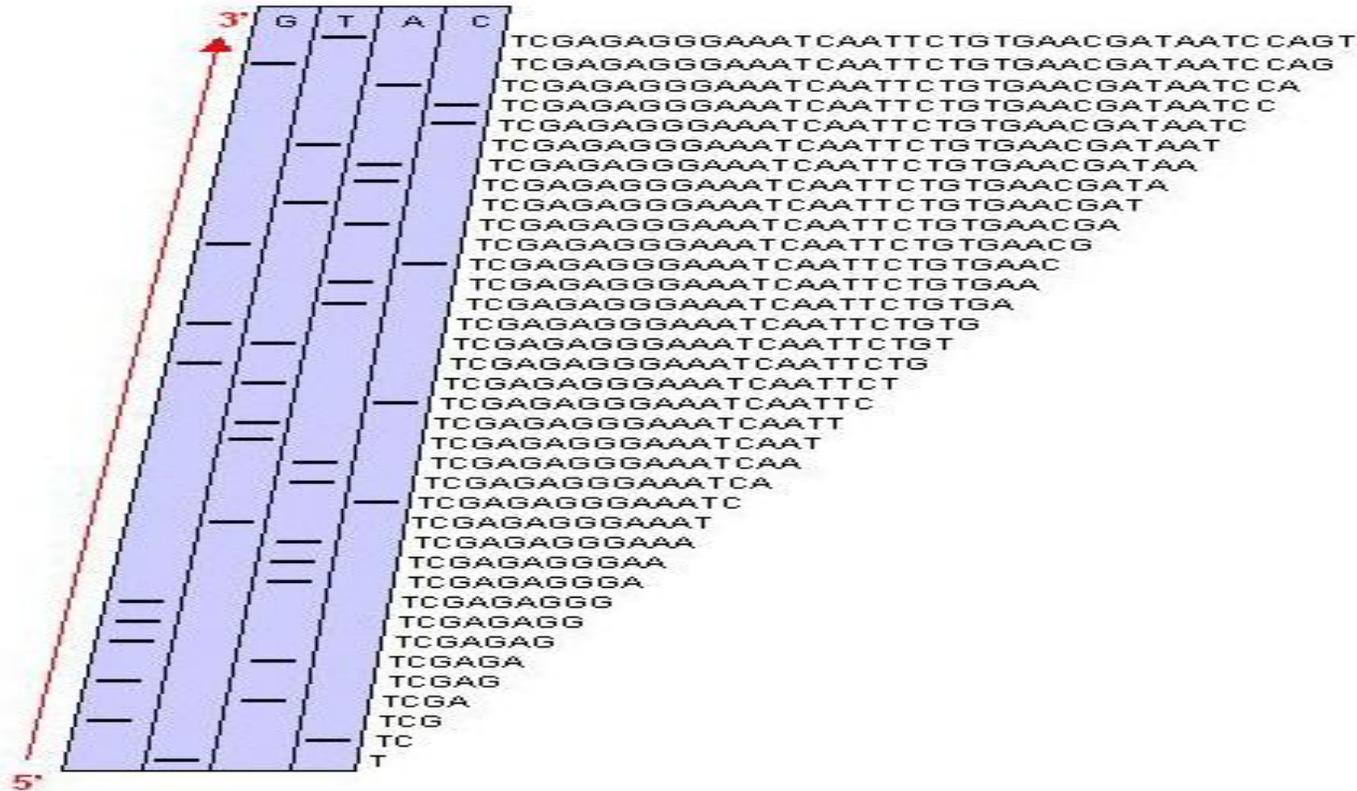
Cuantificación Relativa



Secuenciación por método enzimático:

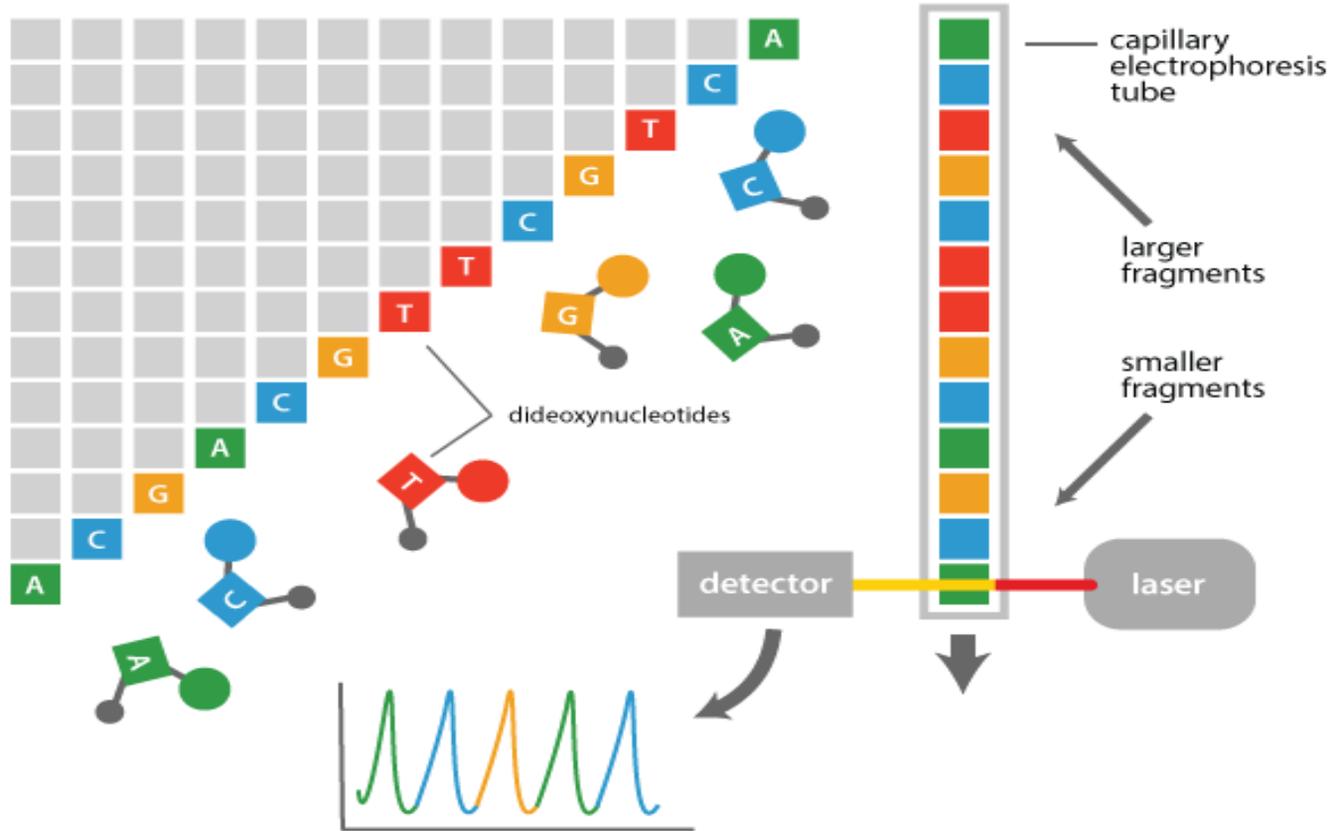
El método de **Sanger (1977)** se basa en el uso de la ADN polimerasa para sintetizar cadenas de ADN con una terminación específica.

Autorradiografía resultante

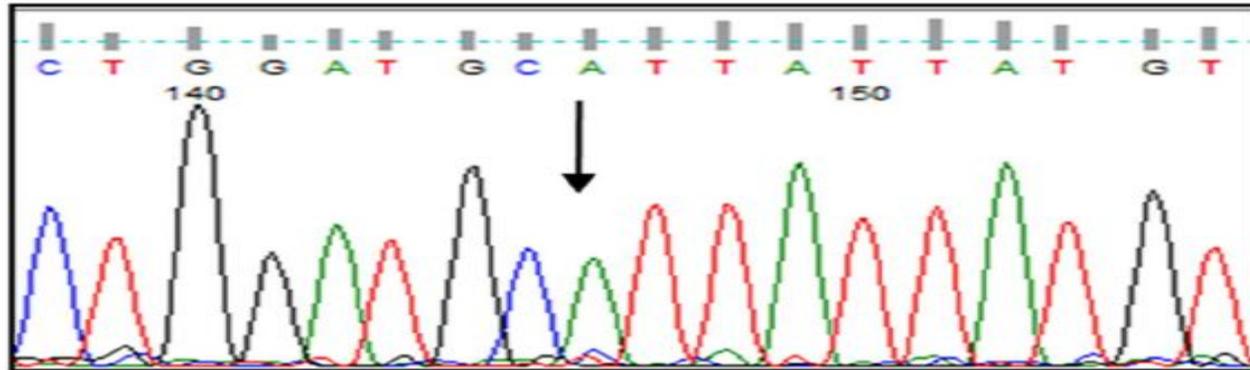


Secuenciación por método enzimático automatizado:

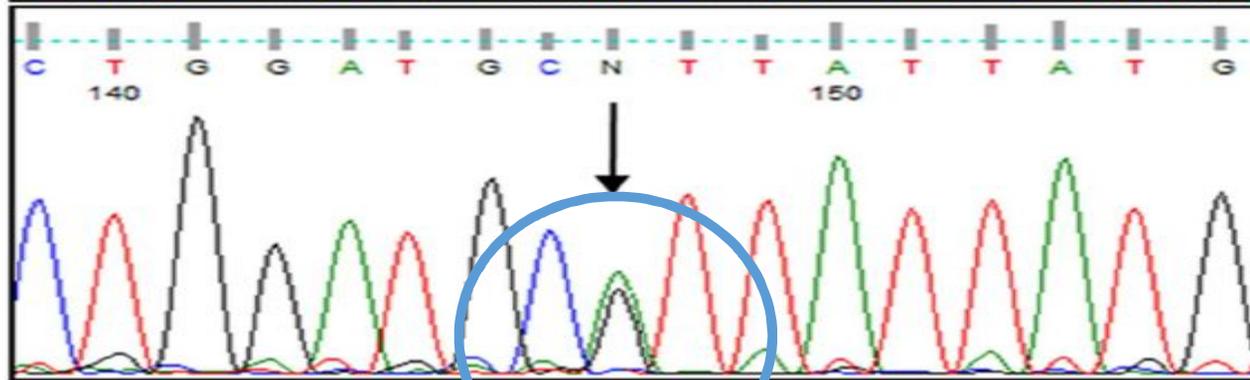
Secuenciación en electroforesis capilar: En la actualidad la reacción de secuenciación se basa en una modificación de la PCR con dideoxynucleótidos marcados con fluoróforos y se resuelve mediante una electroforesis capilar.



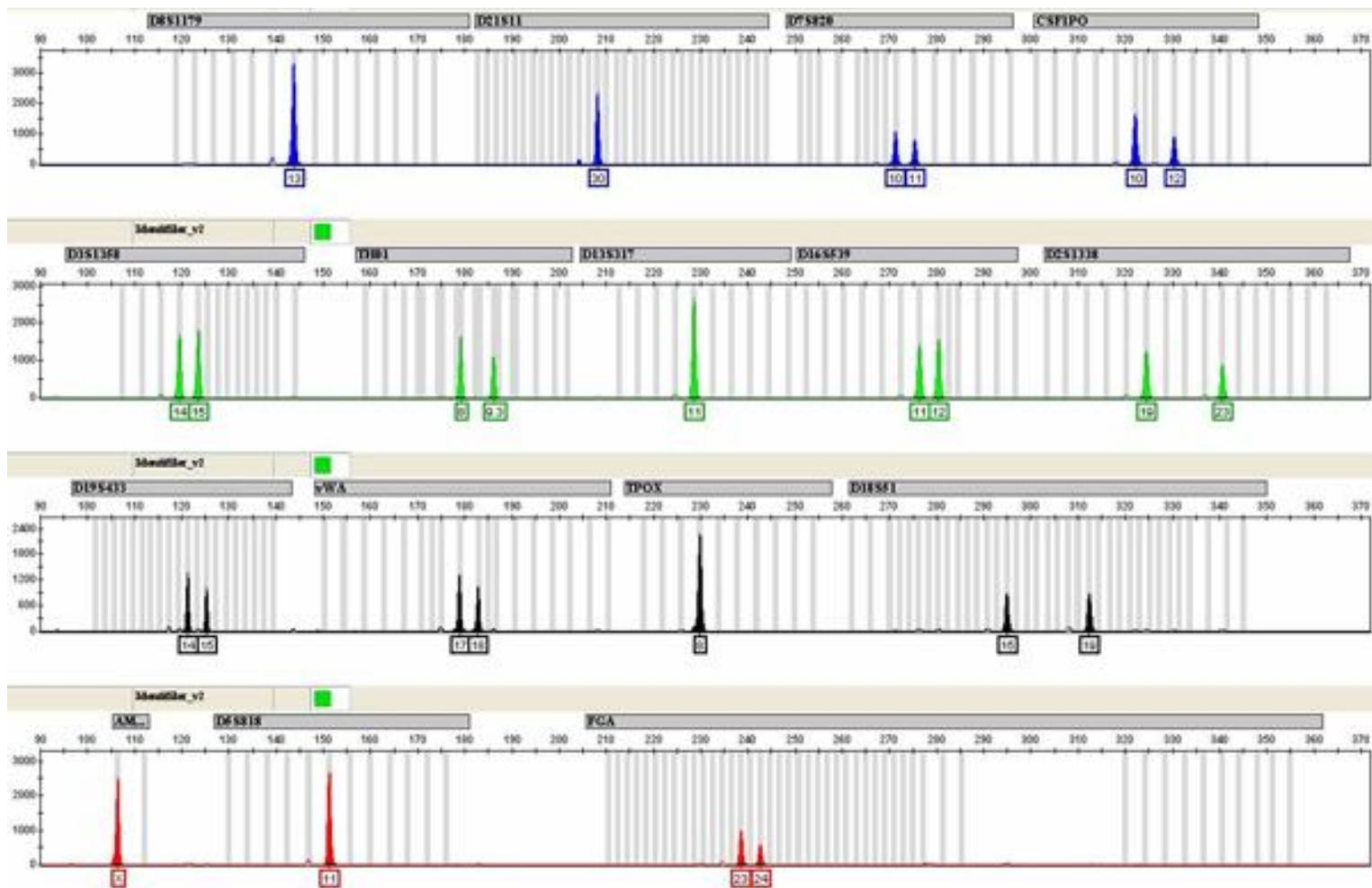
A



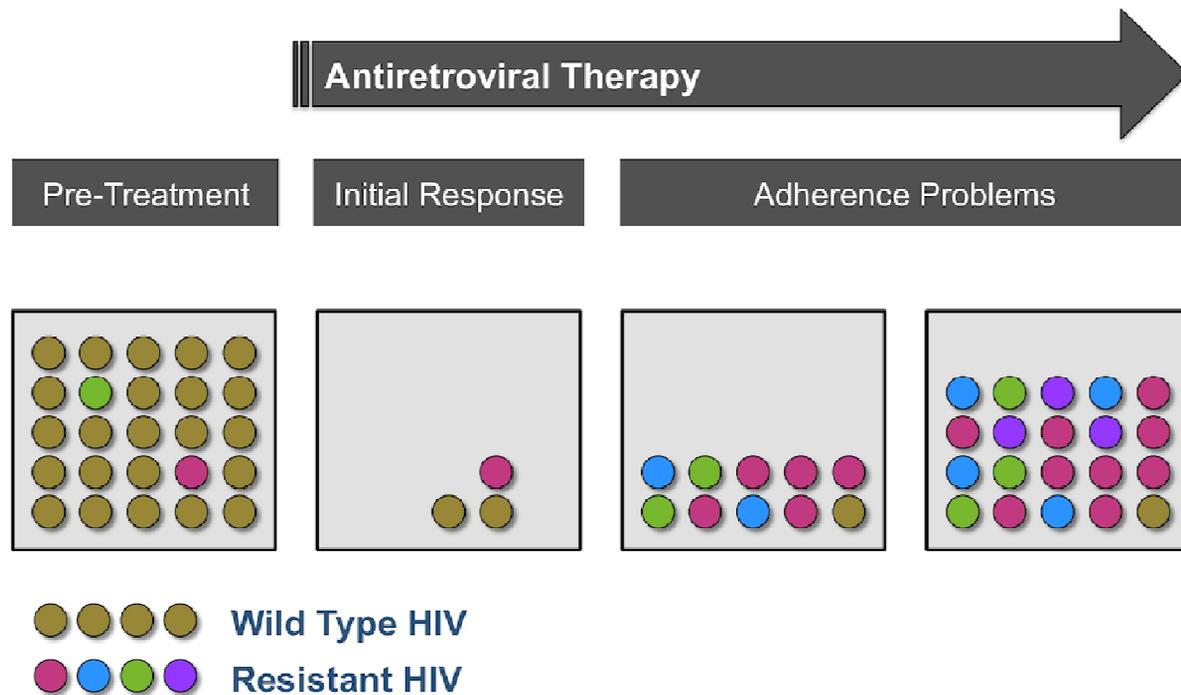
B



Genética forense:

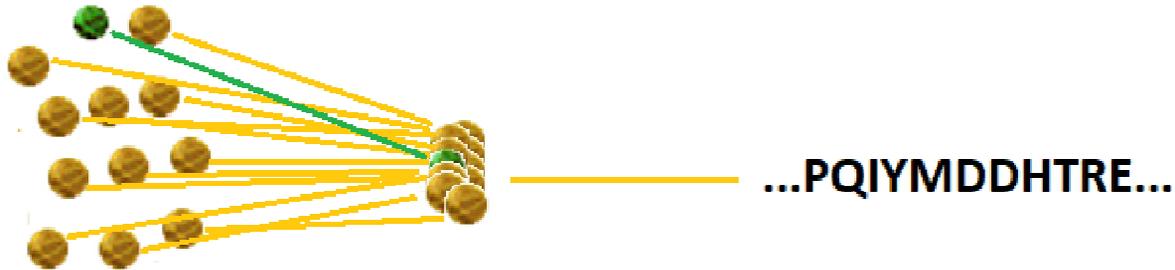


Secuenciación:

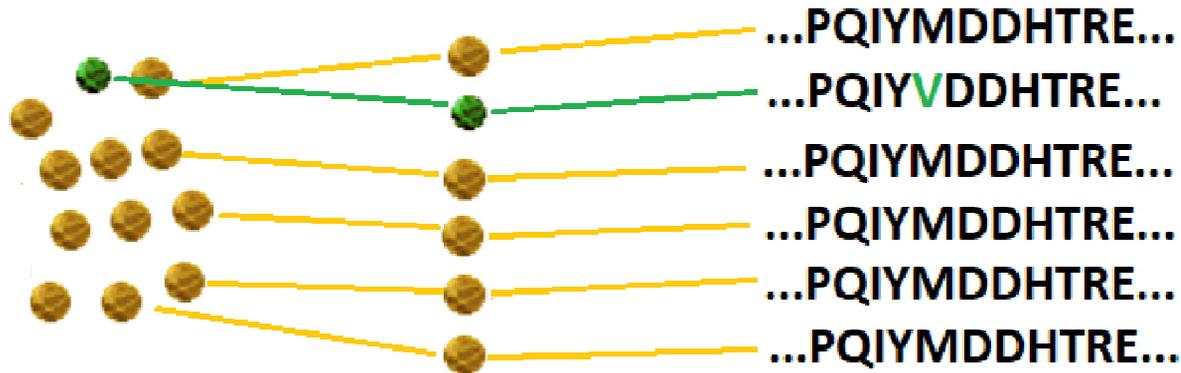


Secuenciación NGS (Next Generation Sequencing):

SECUENCIACION POBLACIONAL



SECUENCIACION NGS

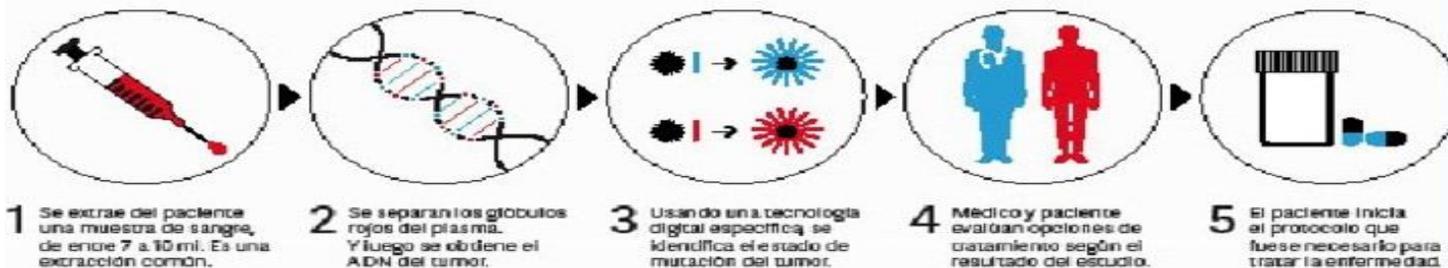


Secuenciación NGS:

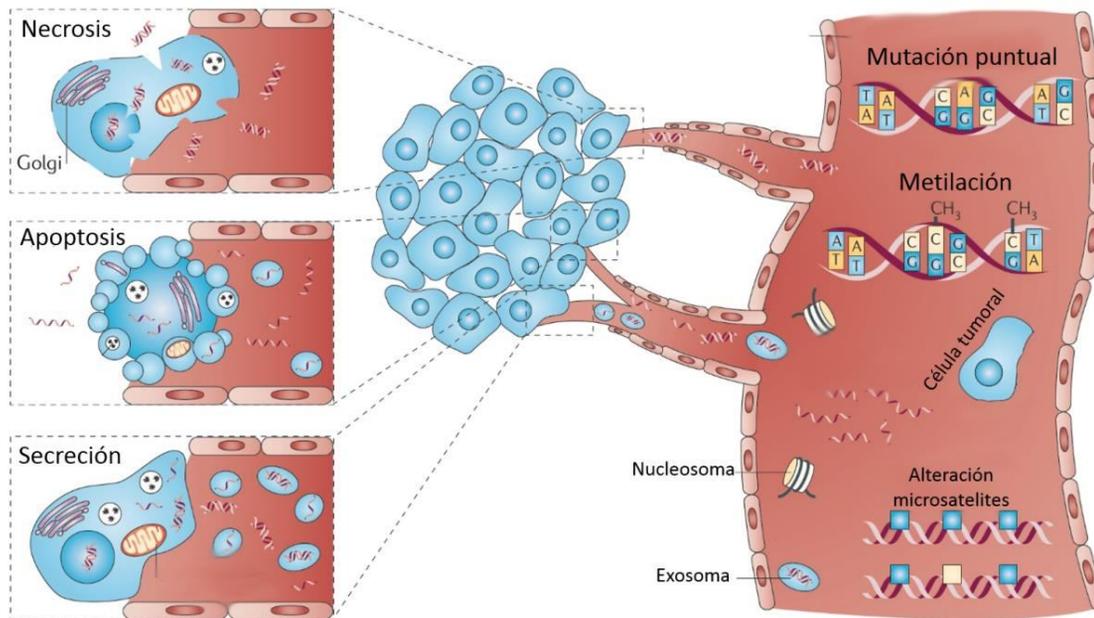
Drug	20%	10%	5%	1%
NRTI				
lamivudine (3TC)	M184V			
abacavir (ABC)	M184V			
zidovudine (AZT)	M184V			
stavudine (D4T)	M184V			
didanosine (DDI)	M184V			
emtricitabine (FTC)	M184V			
tenofovir (TDF)	M184V			
NNRTI				
efavirenz (EFV)		K103N		
etravirine (ETR)				
nevirapine (NVP)		K103N		
rilpivirine (RPV)				
PI				
atazanavir/r (ATV/r)				
darunavir/r (DRV/r)				
fosamprenavir/r (FPV/r)				
indinavir/r (IDV/r)				
lopinavir/r (LPV/r)				
nelfinavir (NFV)				
saquinavir/r (SQV/r)				
tipranavir/r (TPV/r)				
INSTI				
dolutegravir (DTG)				
elvitegravir (EVG)				
raltegravir (RAL)				

Table columns show additional mutations found at each threshold of sensitivity

Cómo es la biopsia líquida • Con un análisis de sangre se buscan células cancerosas. Es menos invasiva y más rápida.

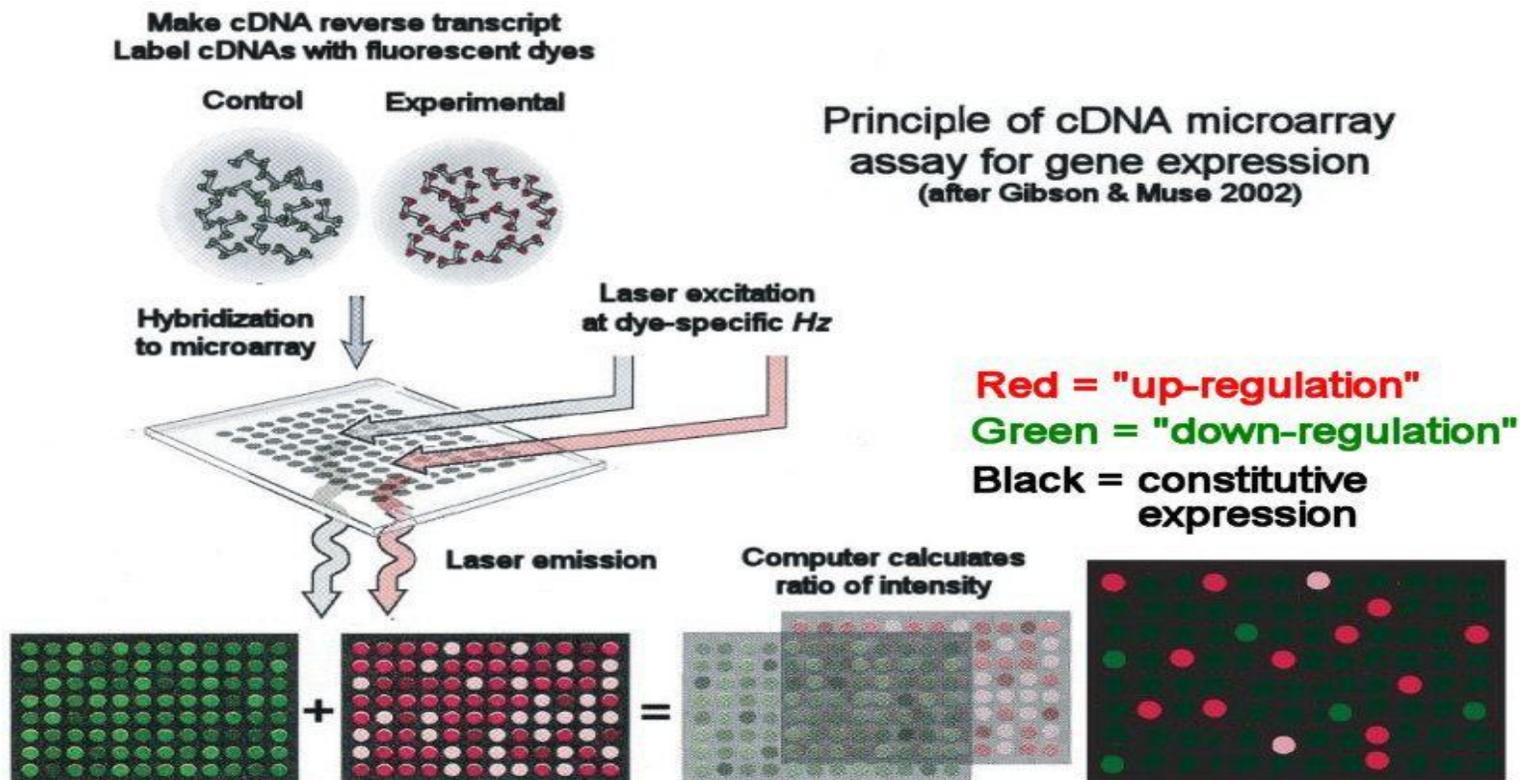


CLARIN



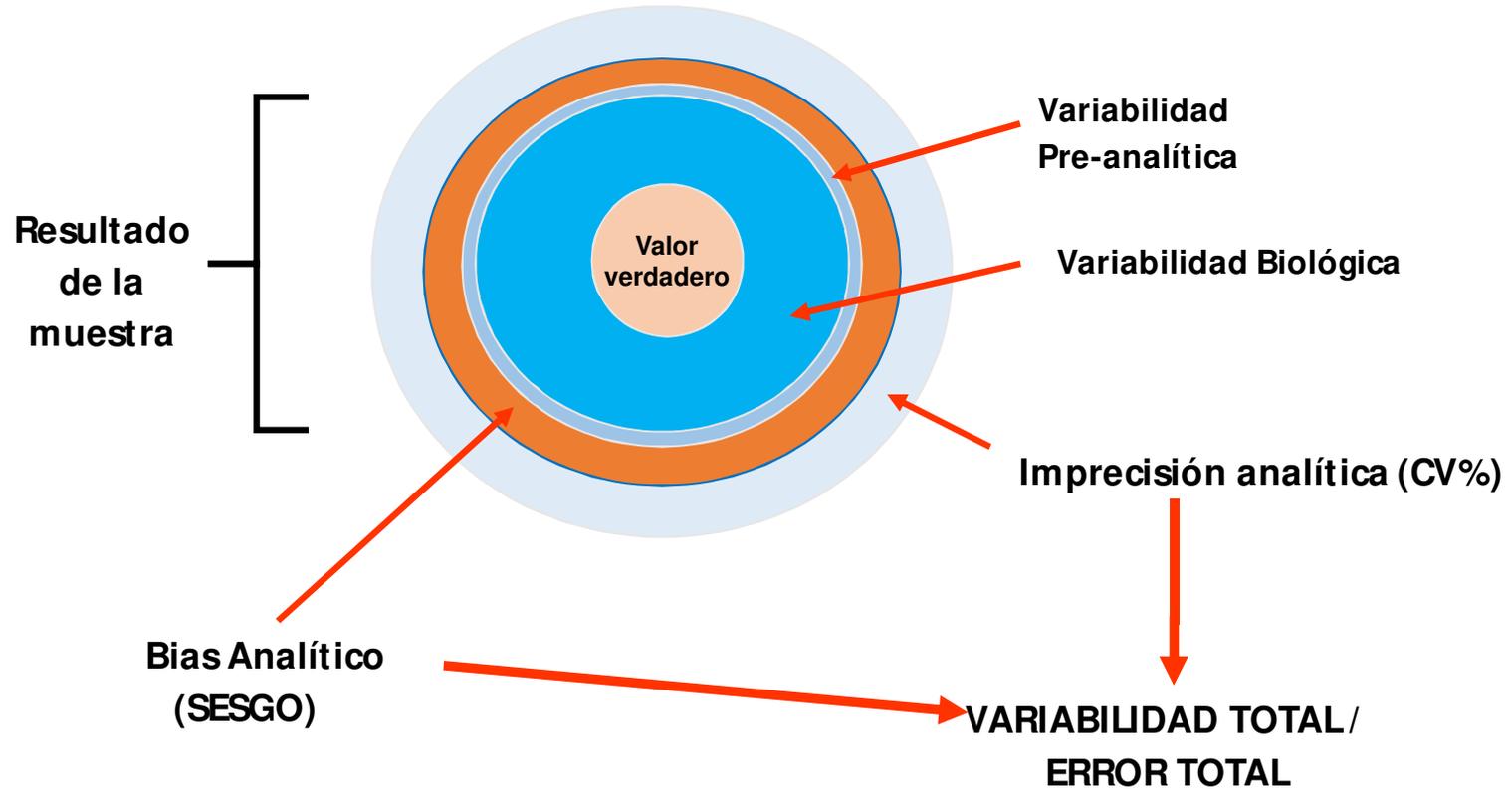
MicroArrays:

Es una superficie sólida a la cual se une una colección de fragmentos de ADN. Se usan para analizar expresión diferencial de genes. Su funcionamiento consiste en medir el nivel de hibridación entre la sonda específica, y su target, que se refleja comúnmente mediante análisis de imágenes de la intensidad de fluorescencia.

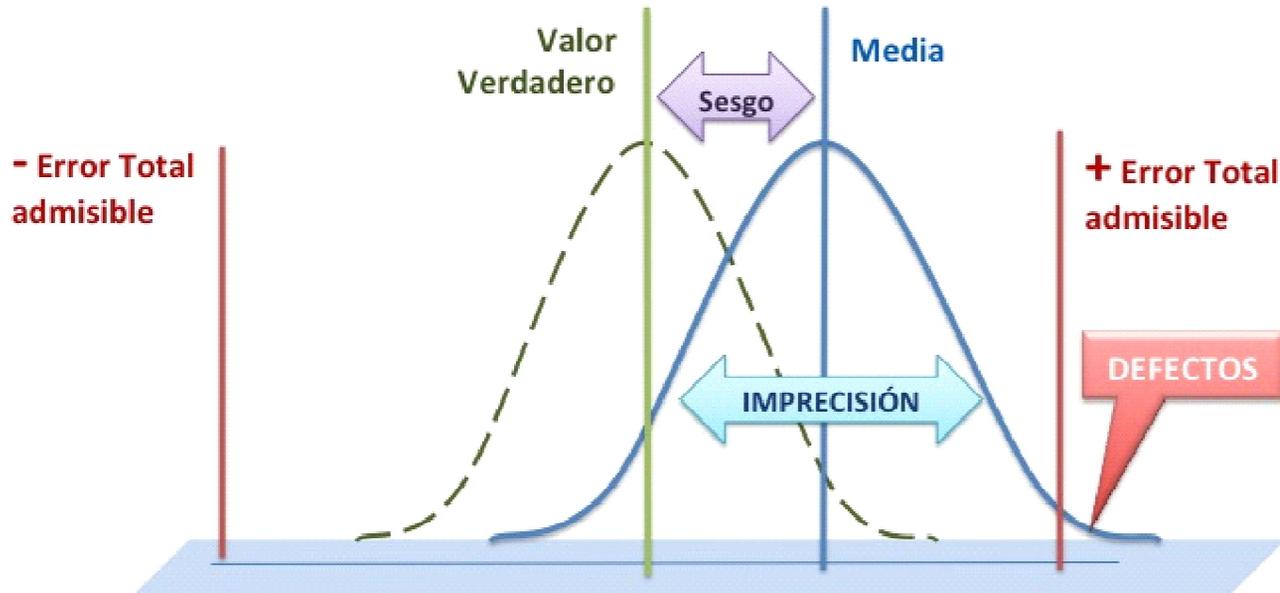
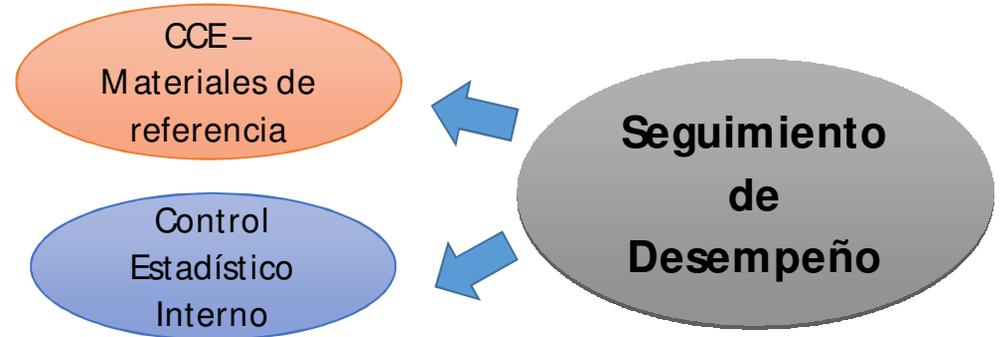


¿Para **informar - liberar** un
resultado debemos conocer
algo más?

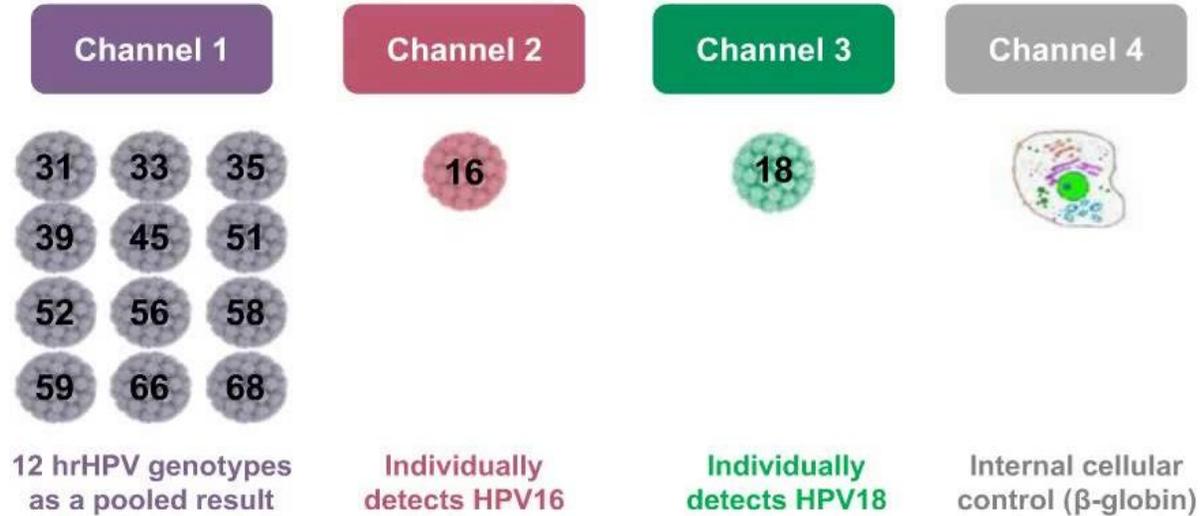
Debemos conocer la composición de un dato de Laboratorio...



Control de Calidad:



Validación Técnica:



El **control interno** debe haber amplificado.

El **control positivo** debe haber amplificado. Su desempeño se debe ajustar a los parámetros establecidos.

El **control negativo** no debe presentar amplificación.

Validación Clínica:

En este punto vuelven a ser importantes los aspectos Pre-analíticos, la información aportada por el medico en la orden es fundamental para la validación clínica.

Es necesario conocer el estado fisiológico del paciente, sexo, edad, medicación y adherencia a la misma y el diagnostico. Además de útil contar con los test realizados sobre la misma muestra (ej: serología, citogenética, etc.).

El resultado obtenido debe concordar el estado del paciente al momento del realizar el estudio y para eso es necesario cruzar toda la información disponible.

En caso de no tener información previa se deben realizar test reflejos para confirmar la validez de nuestro resultado.

La validación clínica es el paso mas importante en la generación de resultados, ya que engloba los aspectos pre-analíticos y analíticos, establecer criterios y el uso de test reflejos para la misma es indispensable para conseguir buenas practicas en el laboratorio de análisis clínicos.

Modelo de informe:

El modelo de informe debe tener las siguientes características:

- a. Test realizado:
- b. Tipo de muestra:
- c. Resultado:
- d. Observaciones:

Se debe dar información sobre el método utilizado para la obtención del resultado, y de ser necesario una aclaración de que los resultados obtenidos deben ser interpretados en función del estado fisiológico del paciente.

Ej: Tamizaje de HPV:

- a. Tipo de muestra: (Hisopo, cepillo, semen)
- b. HPV 16: (Detectable / No Detectable)
- c. HPV 18: (Detectable / No Detectable)
- d. Otros genotipos de alto riesgo: (Detectable / No Detectable)
- e. Observaciones:

Interpretación del resultado:

Detección cualitativa del ADN del virus del papiloma humano.

El estudio es realizado por medio de la plataforma Cobas 4800 (Roche) – Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

Se amplifica la región L1 del genoma de HPV.

El ensayo detecta los siguientes genotipos (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 66)

Aclaración: “Otros genotipos de alto riesgo” implica la detección de uno o más de los siguientes genotipos 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 66.

Nota: Los resultados obtenidos en este estudio deben interpretarse en conjunto con la información clínico-ginecológica, histológica, anatomopatológica y colposcópica del paciente.



Muchas gracias.....