

Curso

Biología molecular aplicada al diagnóstico médico

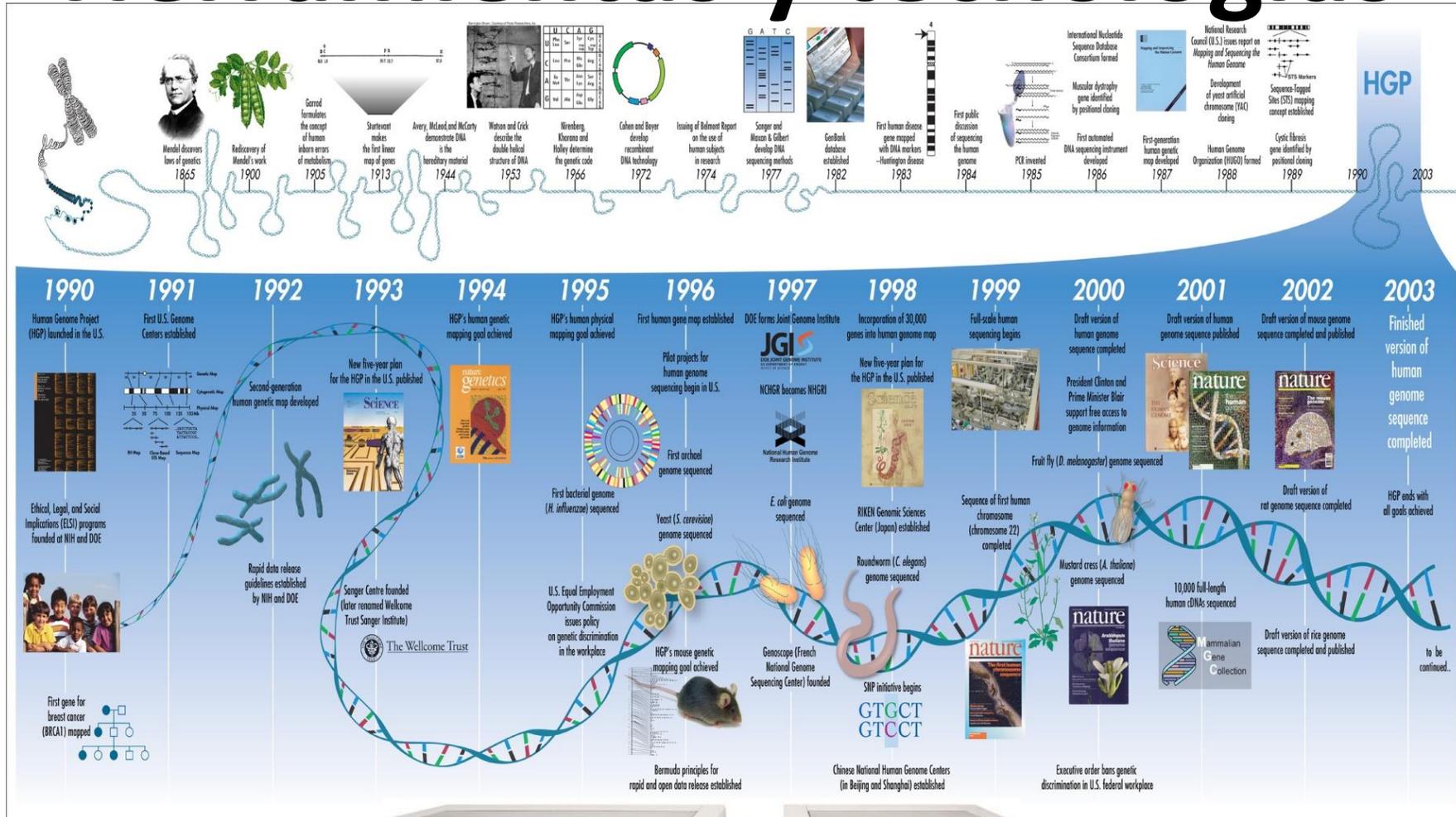
2021

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



Lic. Ezequiel Zubillaga
ezubillaga@cibic.com.ar

Herramientas y tecnologías

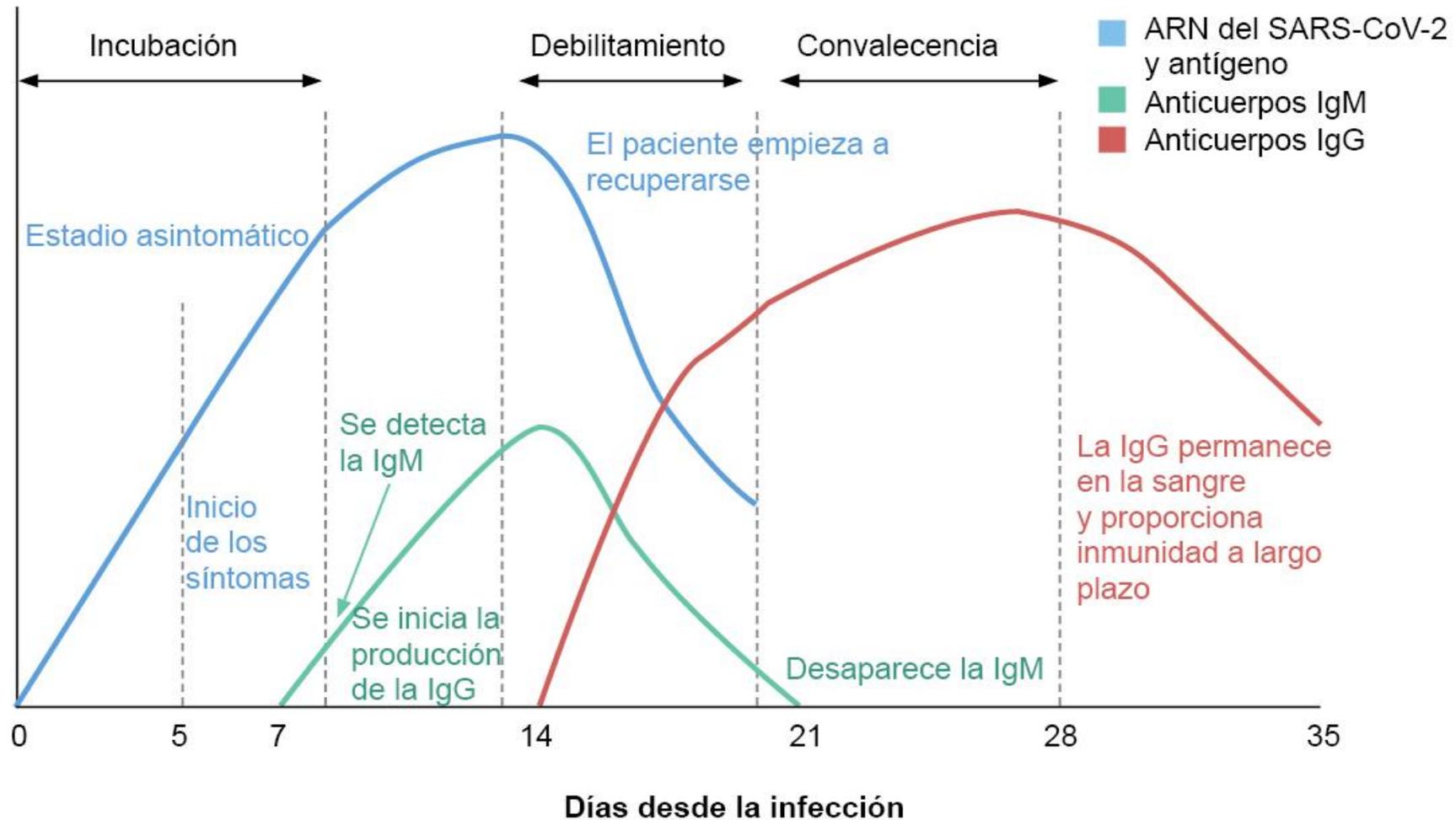


¿ Por qué se han desarrollado tantas **herramientas** para realizar diagnósticos utilizando la **biología molecular**?

Eficacia + Eficiencia = Efectividad

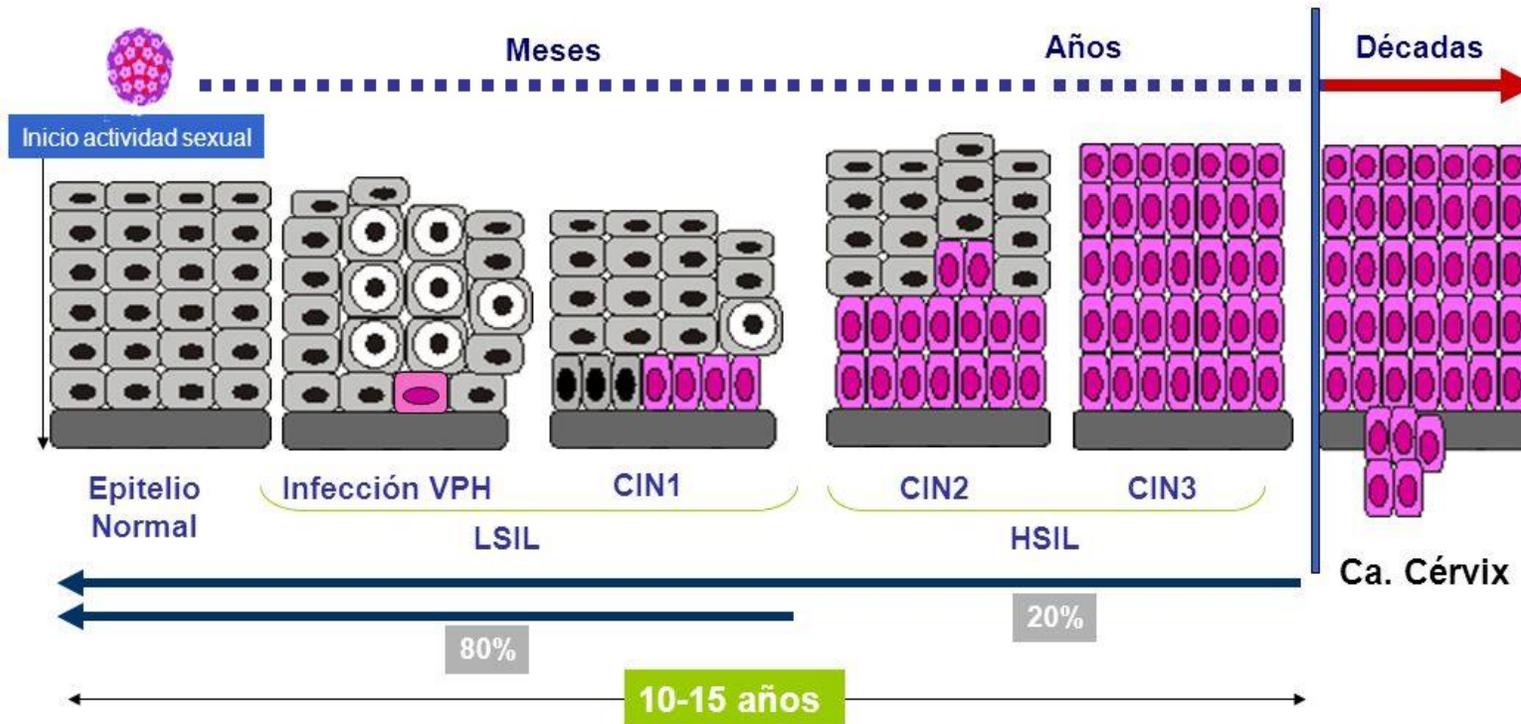
- **Eficacia:** Todo aquello que nos sirve para cumplir el objetivo que se ha planificado.
- **Eficiencia:** Consiste en utilizar los recursos adecuadamente.
- **Efectividad:** **Cumplir con los objetivos planteados utilizando la menor cantidad de recursos posibles.**

¿Cómo?

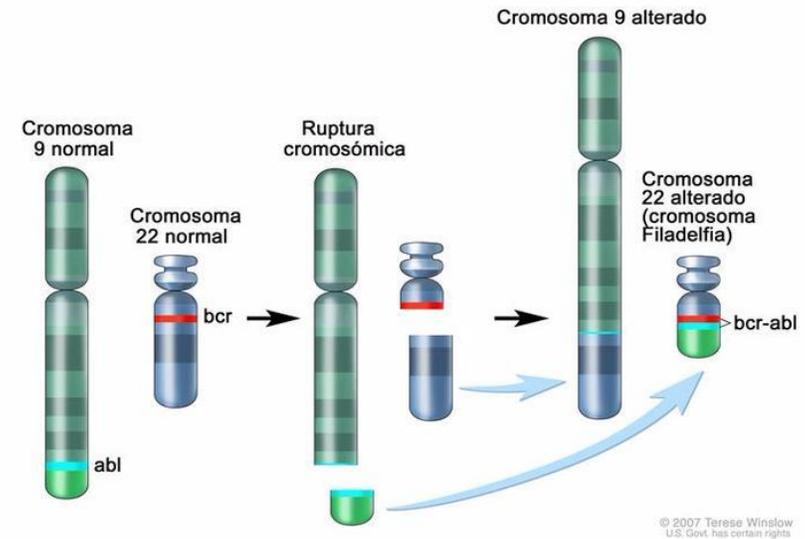
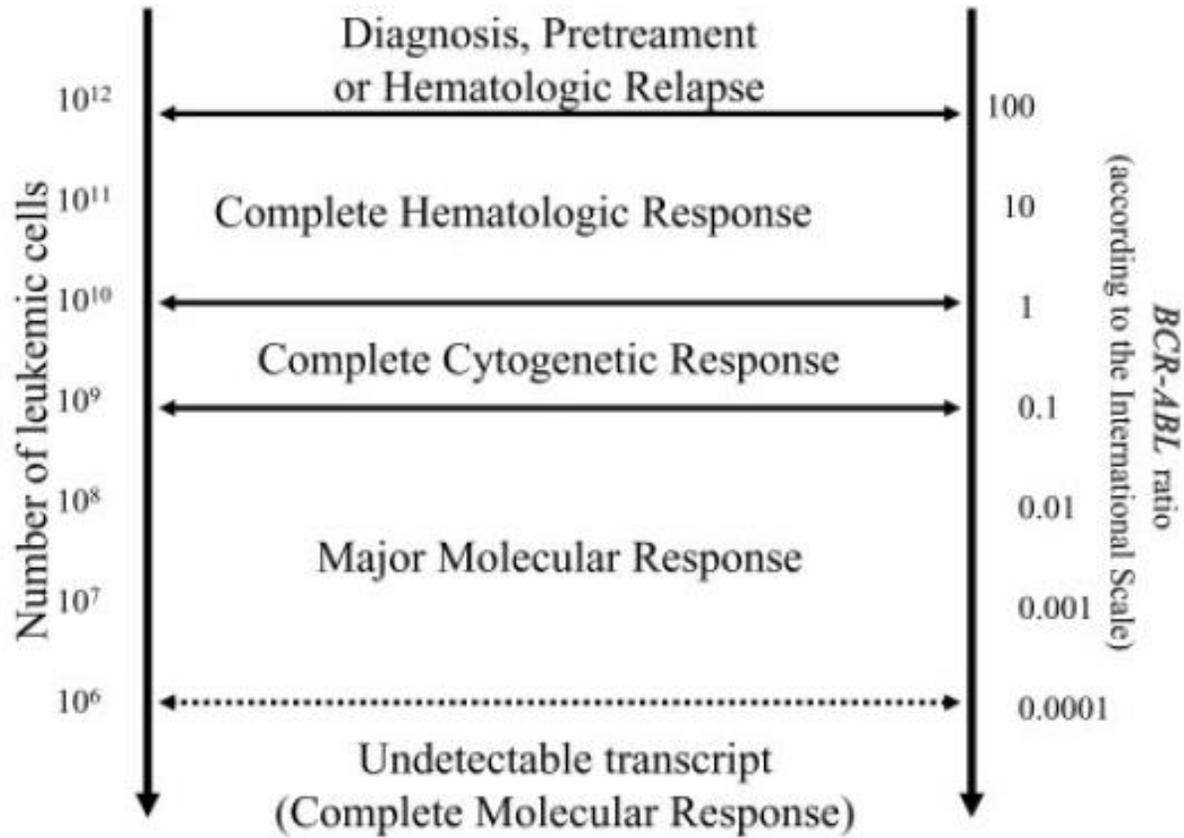


¿Cómo?

Historia natural de la infección por VPH



¿Cómo?



¡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**.

- 1. Aspectos Pre-analíticos**
- 2. Aspectos Técnicos:**
 1. Extracción de Ácidos nucleicos
 2. PCR / RT-PCR / NESTED PCR
 3. Real time PCR
 4. Secuenciación Sanger
 5. NGS
- 3. Aspectos analíticos:**
 1. Controles de calidad
 2. Validación técnica
 3. Validación clínica
- 4. Aspectos Post- analíticos:**
 1. Modelo de informe
 2. Interpretación del resultado

1. Aspectos Pre-analíticos:

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.

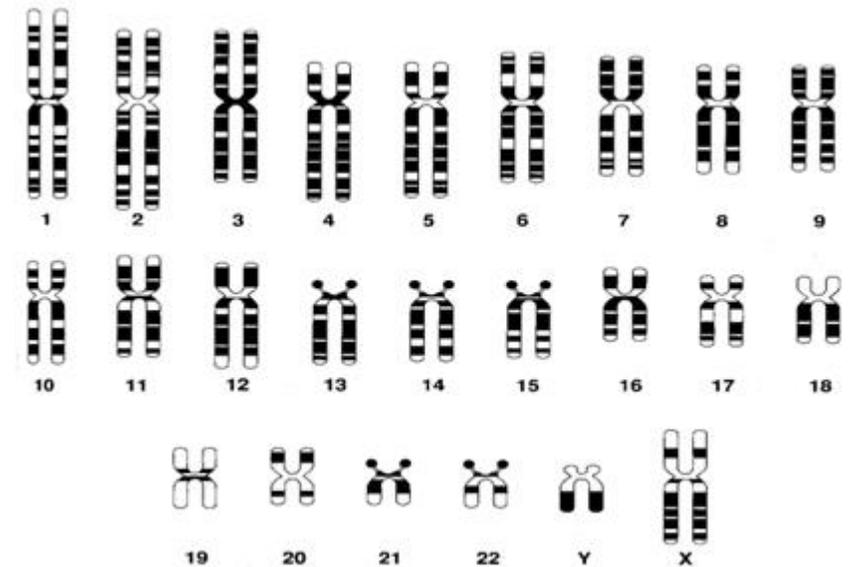
Debe tenerse en cuenta que muchas veces, en la evolución de un paciente o en el monitoreo de la eficacia terapéutica, son muestras irrepetibles, es decir, que no pueden volver a tomarse.

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

Extracción manual de Ácidos Nucleicos:

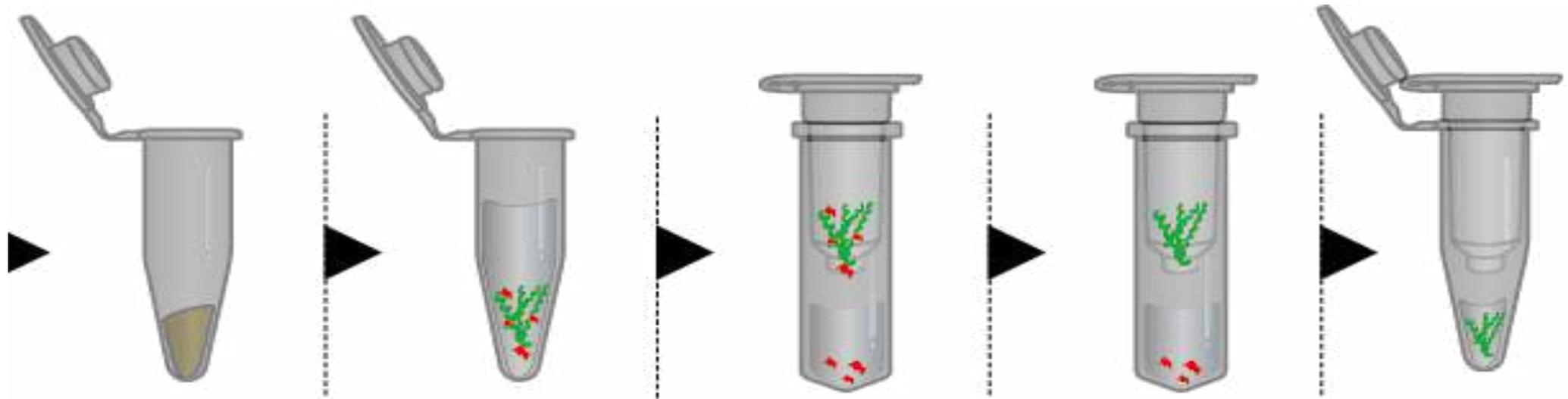
Los pasos necesarios para una correcta extracción y purificación mediante un procedimiento químico son:

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)

Extracción automatizada de Ácidos nucleicos:

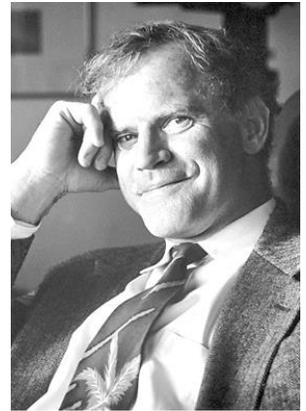
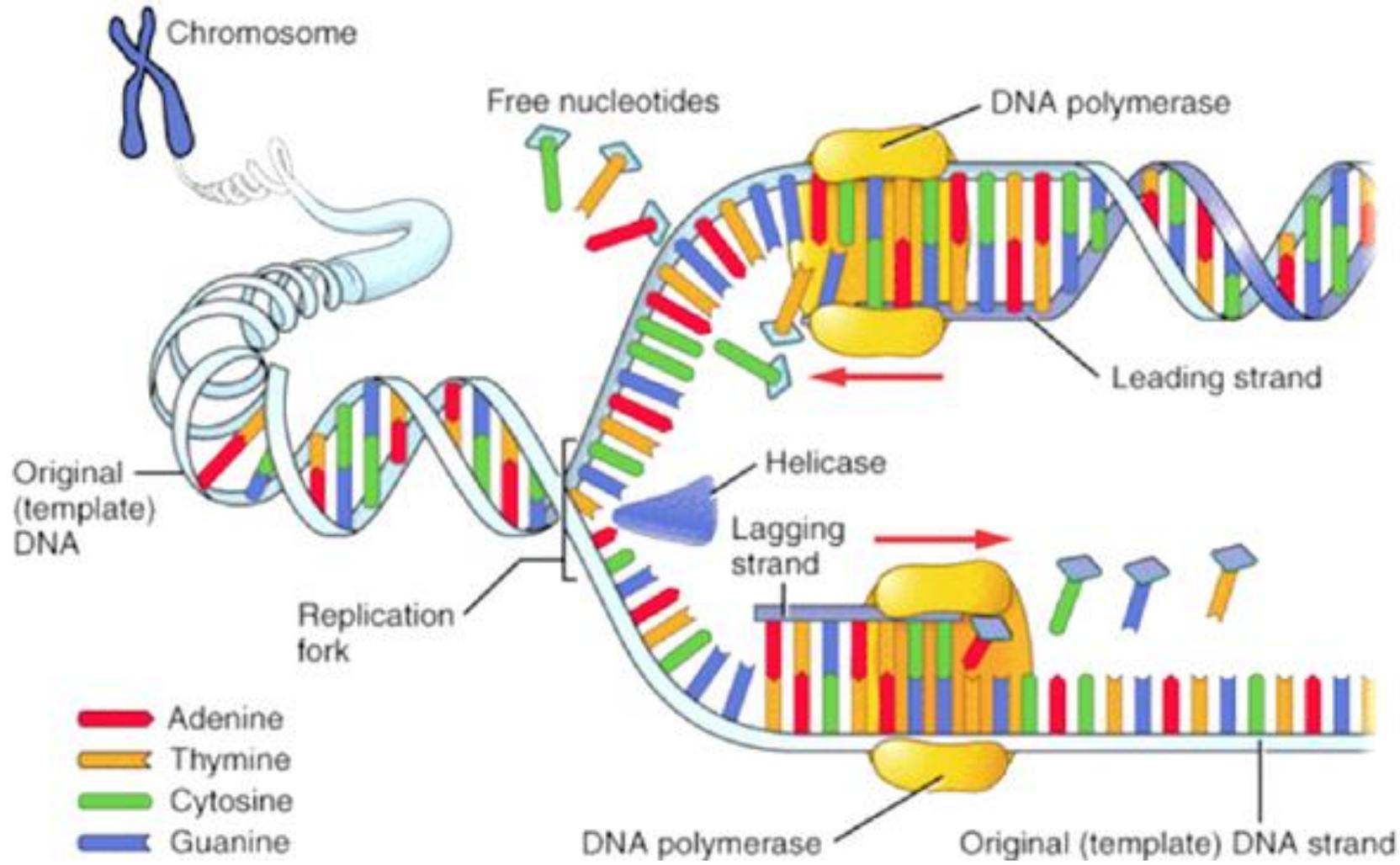
sistema de extracción basado en el uso de partículas magnéticas que permite el aislamiento rápido y automatizado de ácidos nucleicos.

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)

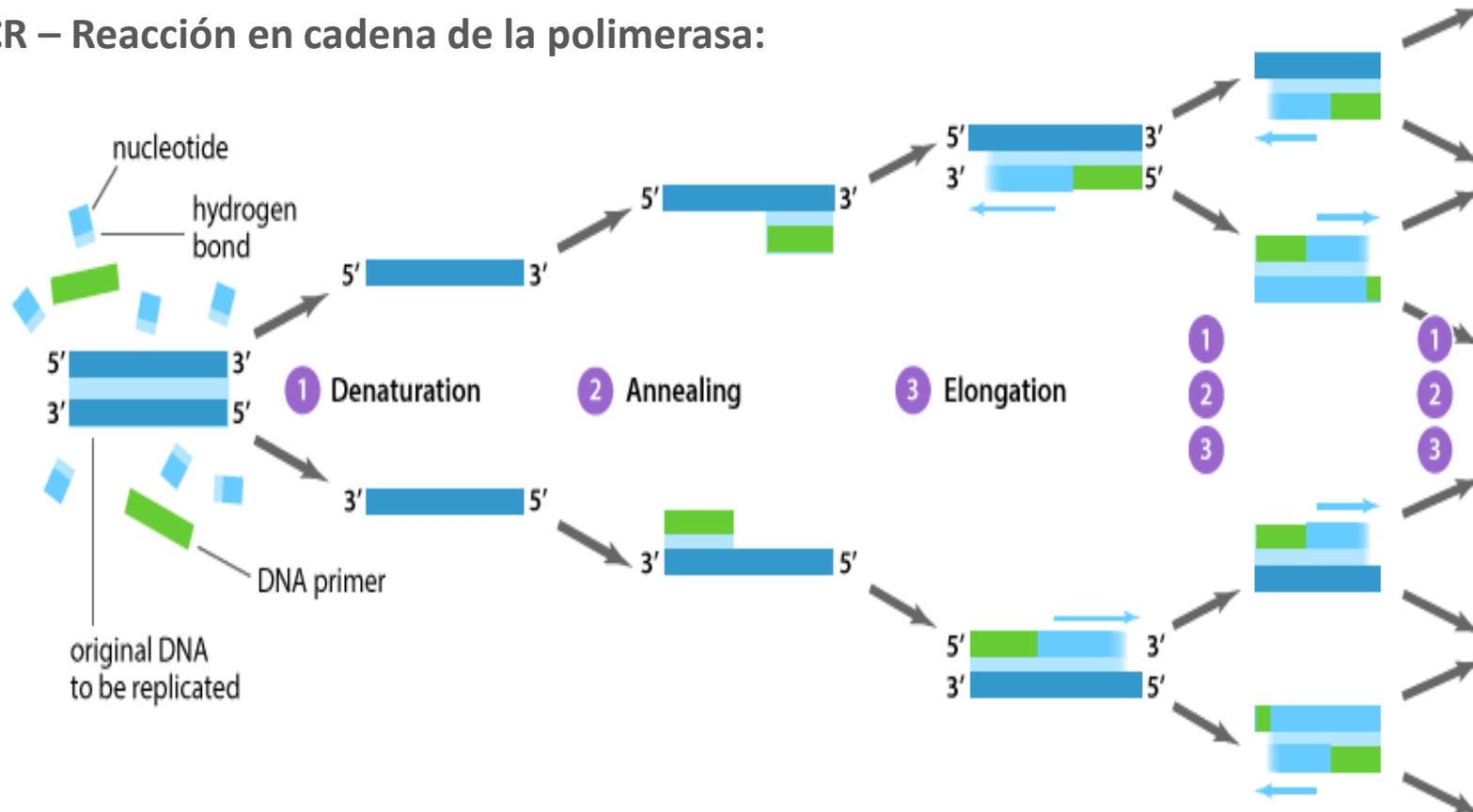


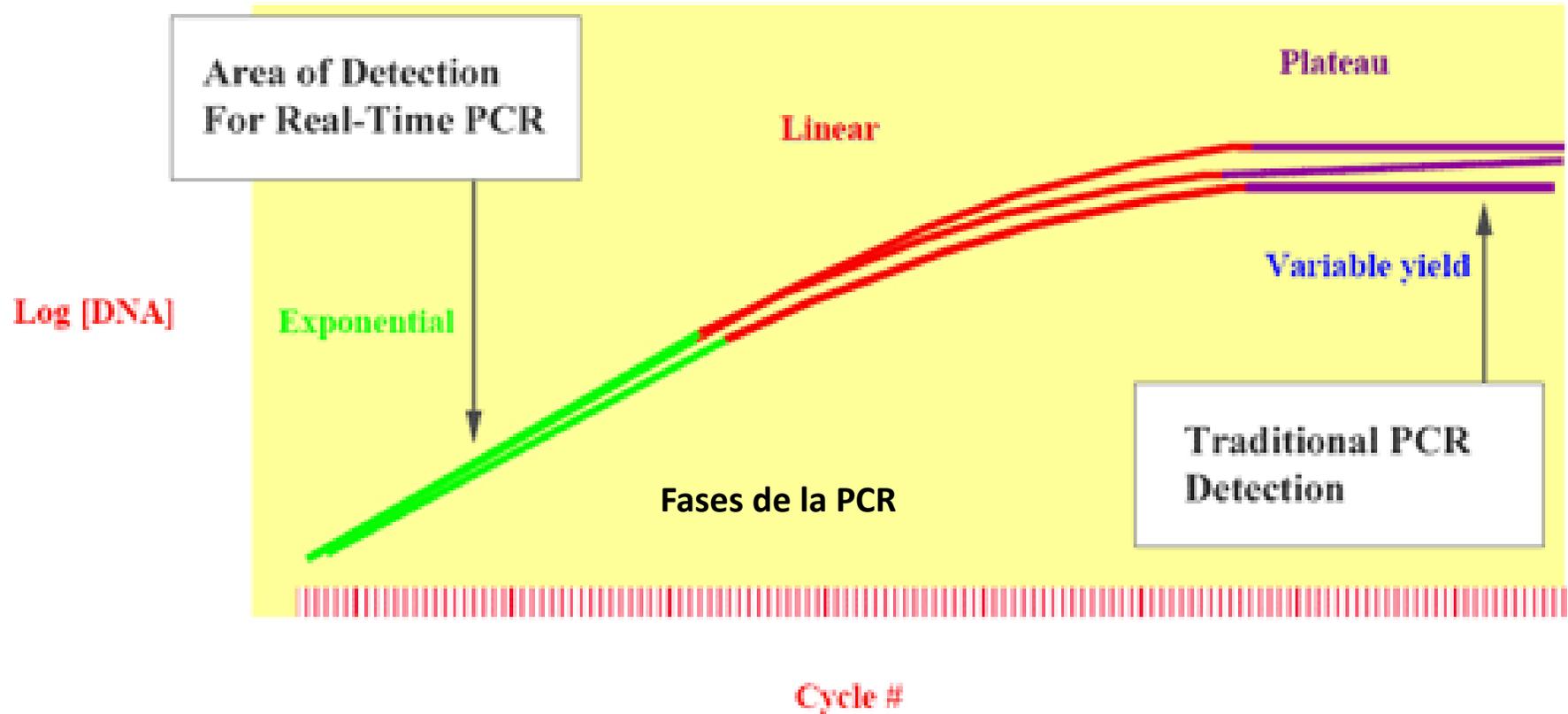
PCR – Reacción en cadena de la polimerasa:



Kary Mullis

PCR – Reacción en cadena de la polimerasa:





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

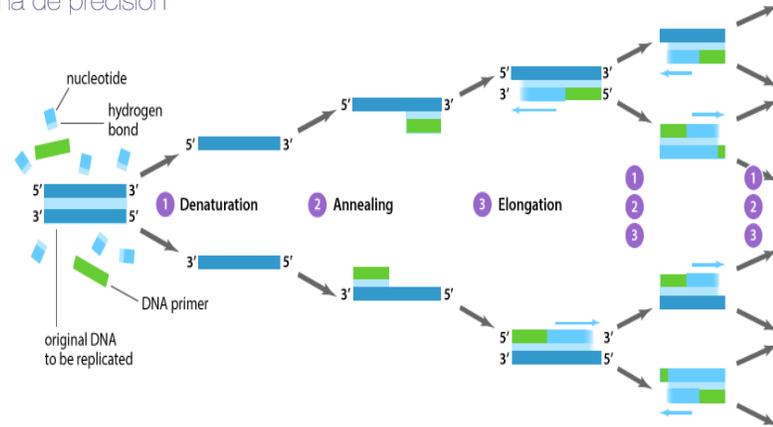
PCR – Reacción en cadena de la polimerasa:



35 – 60 Ciclos



PCR – Reacción en cadena de la polimerasa:

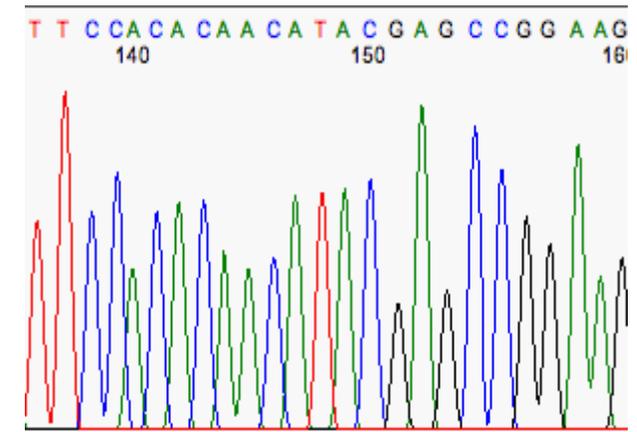
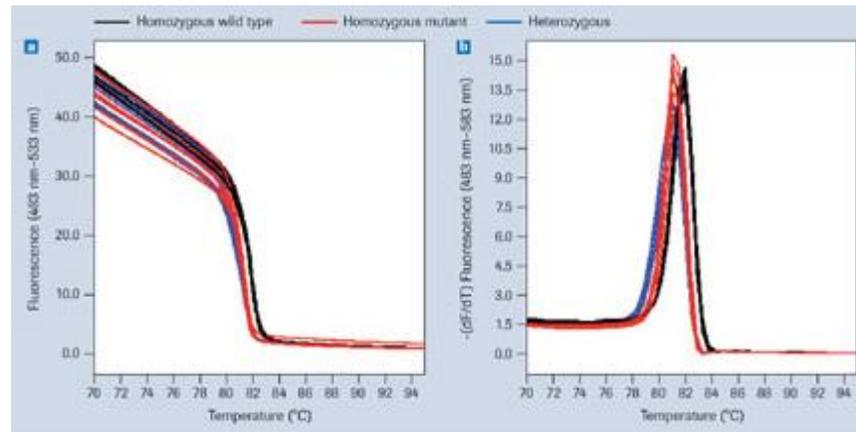
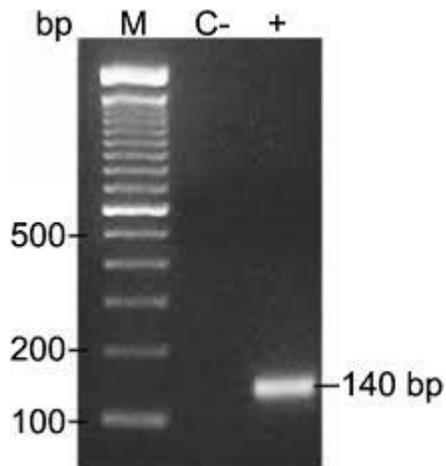


Amplicon = producto de la amplificación por Métodos Moleculares de un fragmento de ADN o ARN.

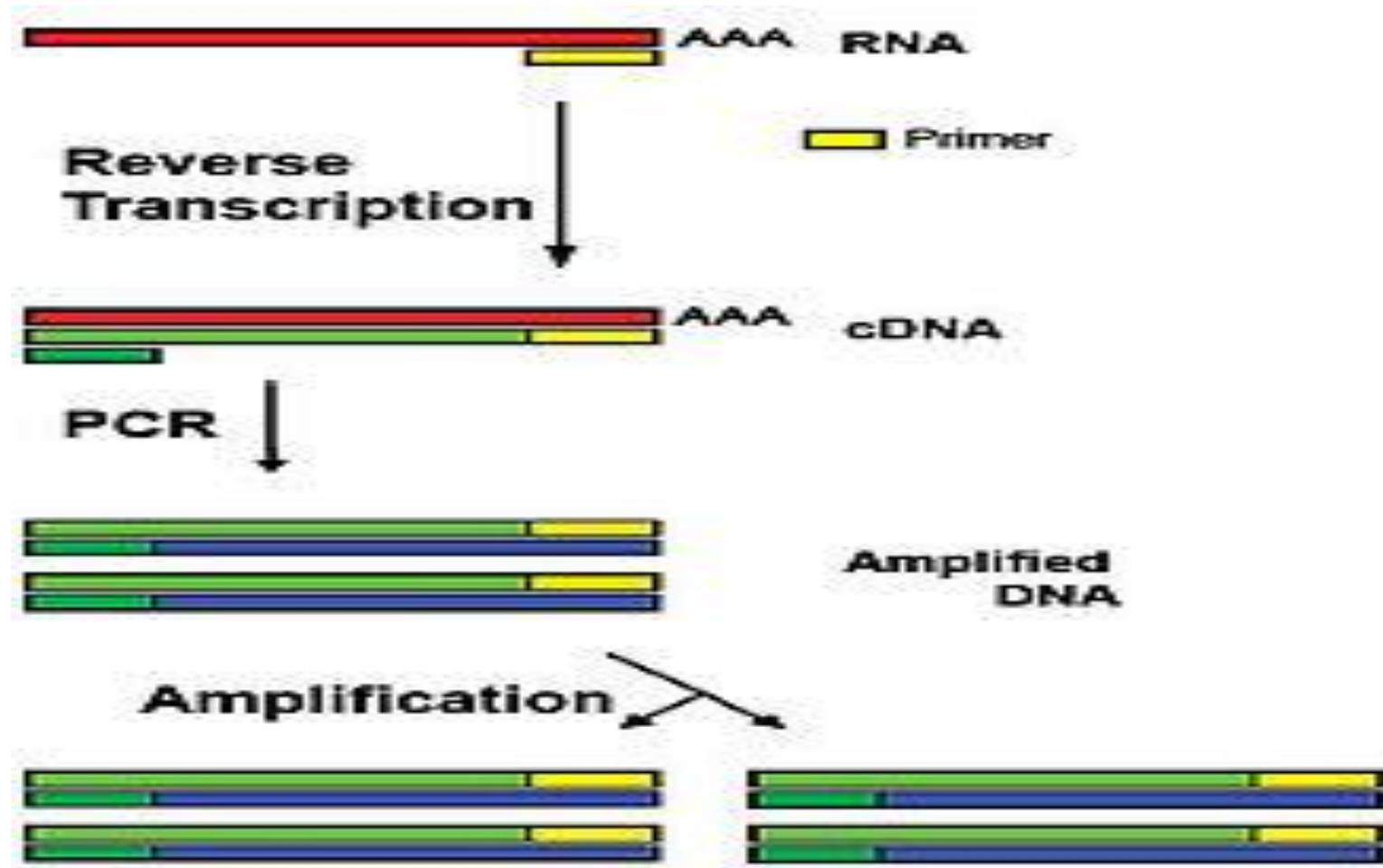
TAMAÑO:

TEMPERATURA DE MELTING:

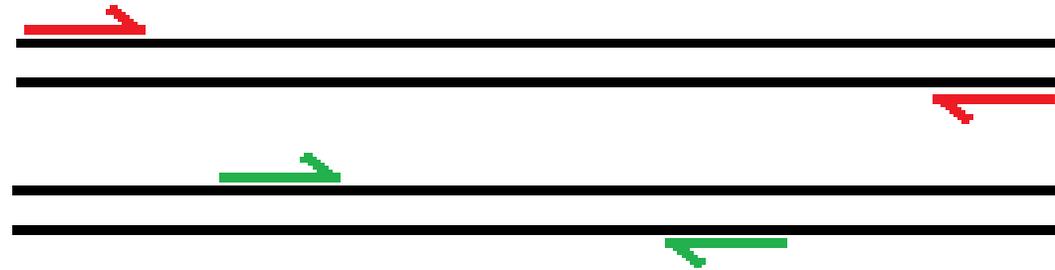
SECUENCIA:



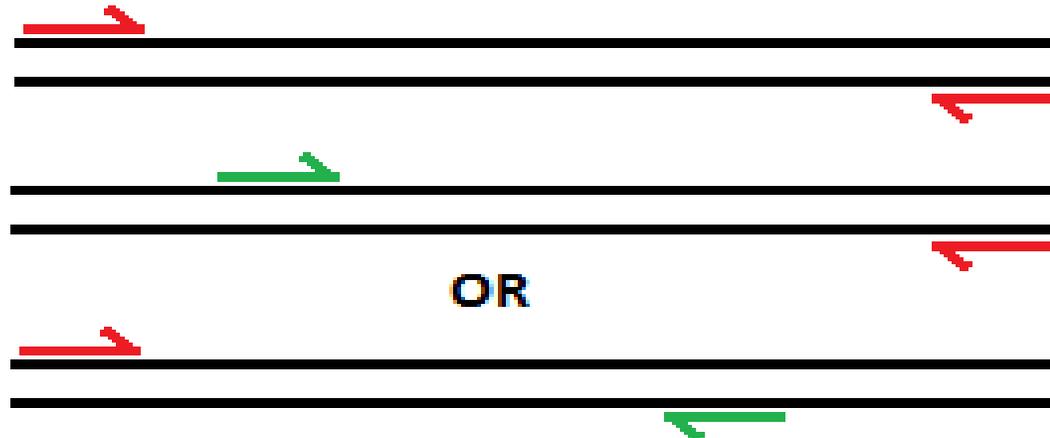
RT - PCR – Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa:



Nested PCR – Reacción en cadena de la polimerasa:



Nested PCR

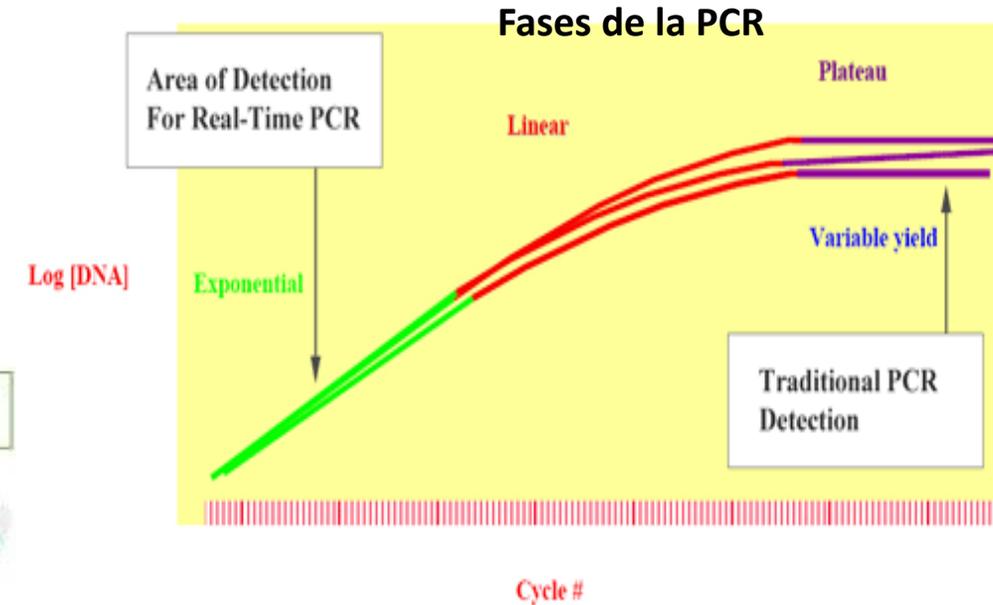
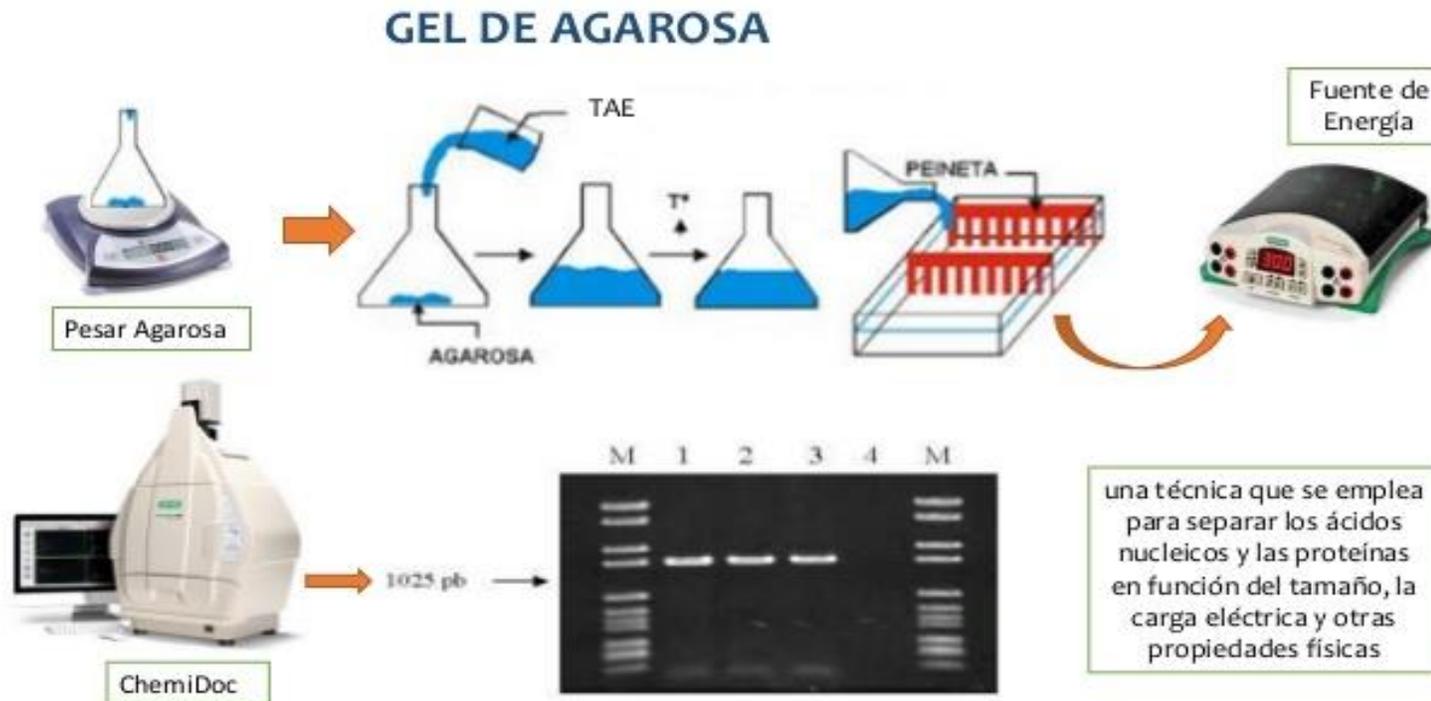


Semi-Nested PCR

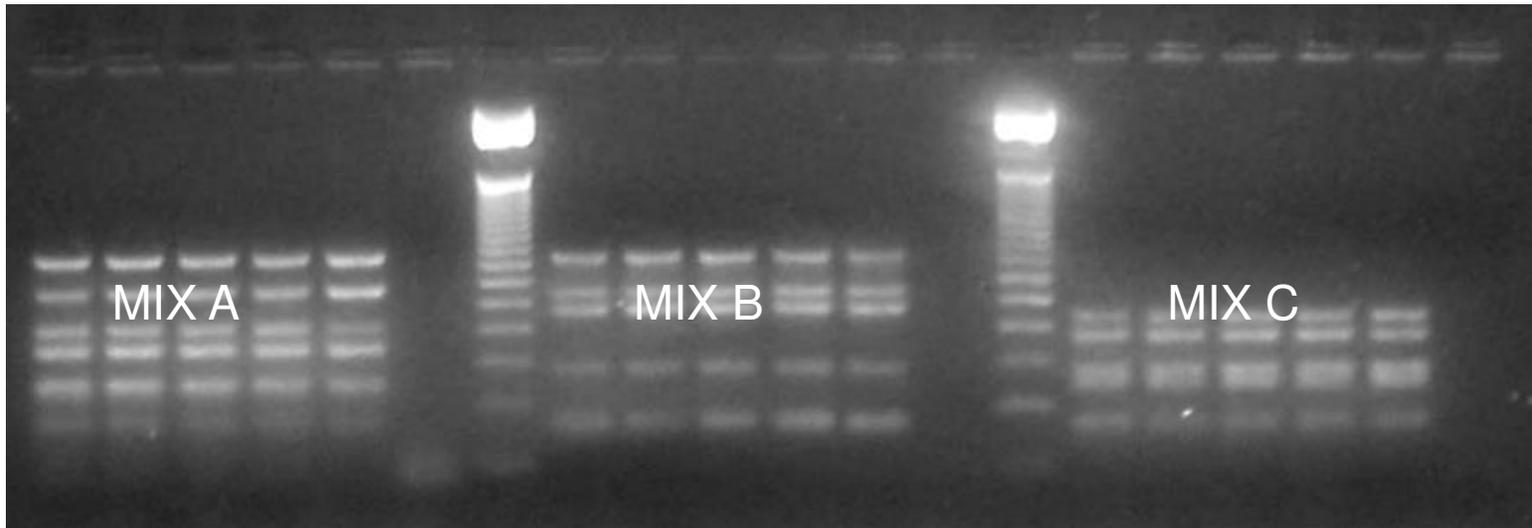
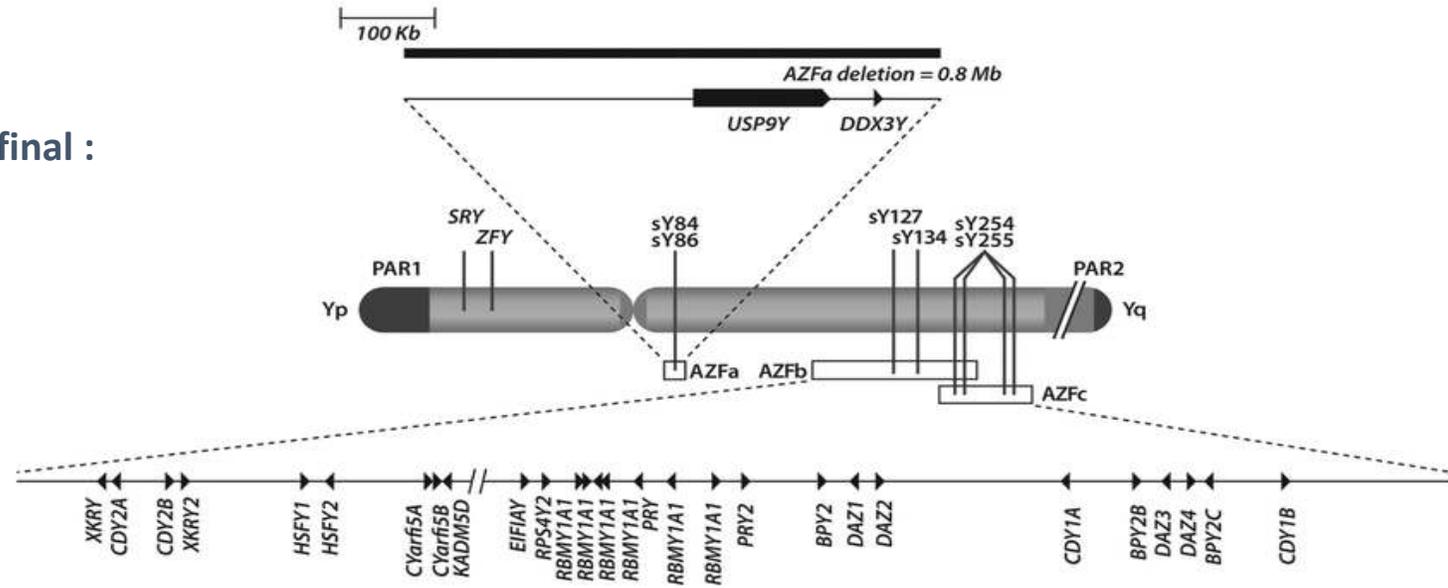
OR

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

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

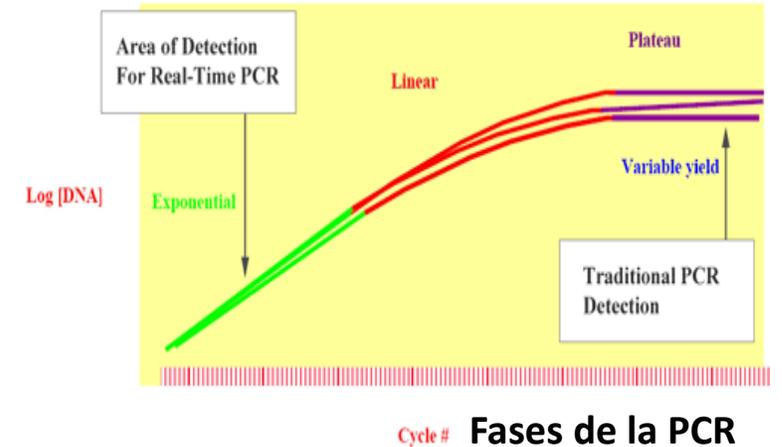
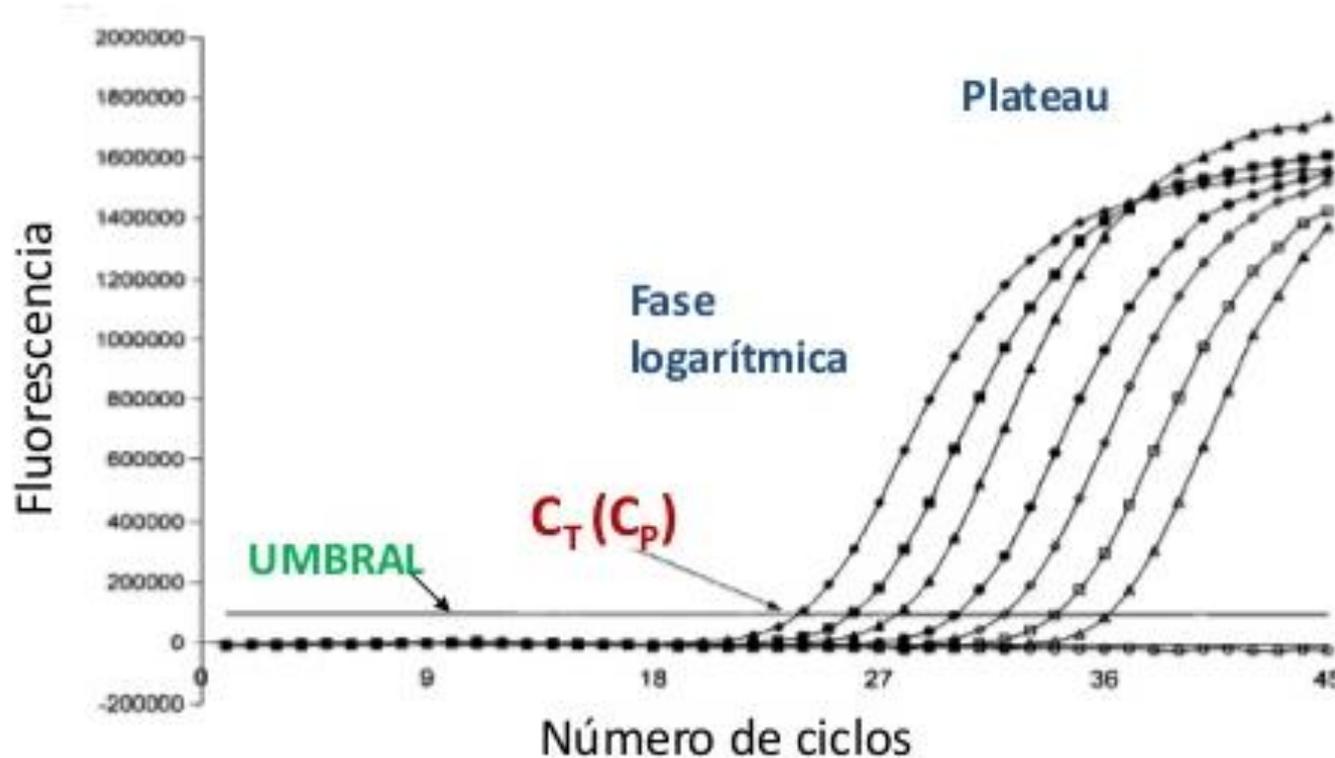


PCR Multiplex punto final :



1 2 3 4 P N M 1 2 3 4 P N M 1 2 3 4 P N

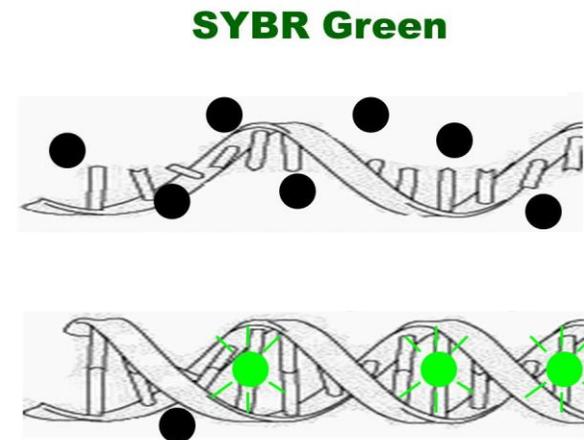
La real time PCR es cinética: Los procesos de **amplificación** y **detección** ocurren dentro del mismo vial cerrado.



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**).



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

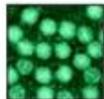
FilmArray® Meningitis/Encephalitis Panel

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



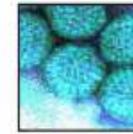
Bacteria

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/st*
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



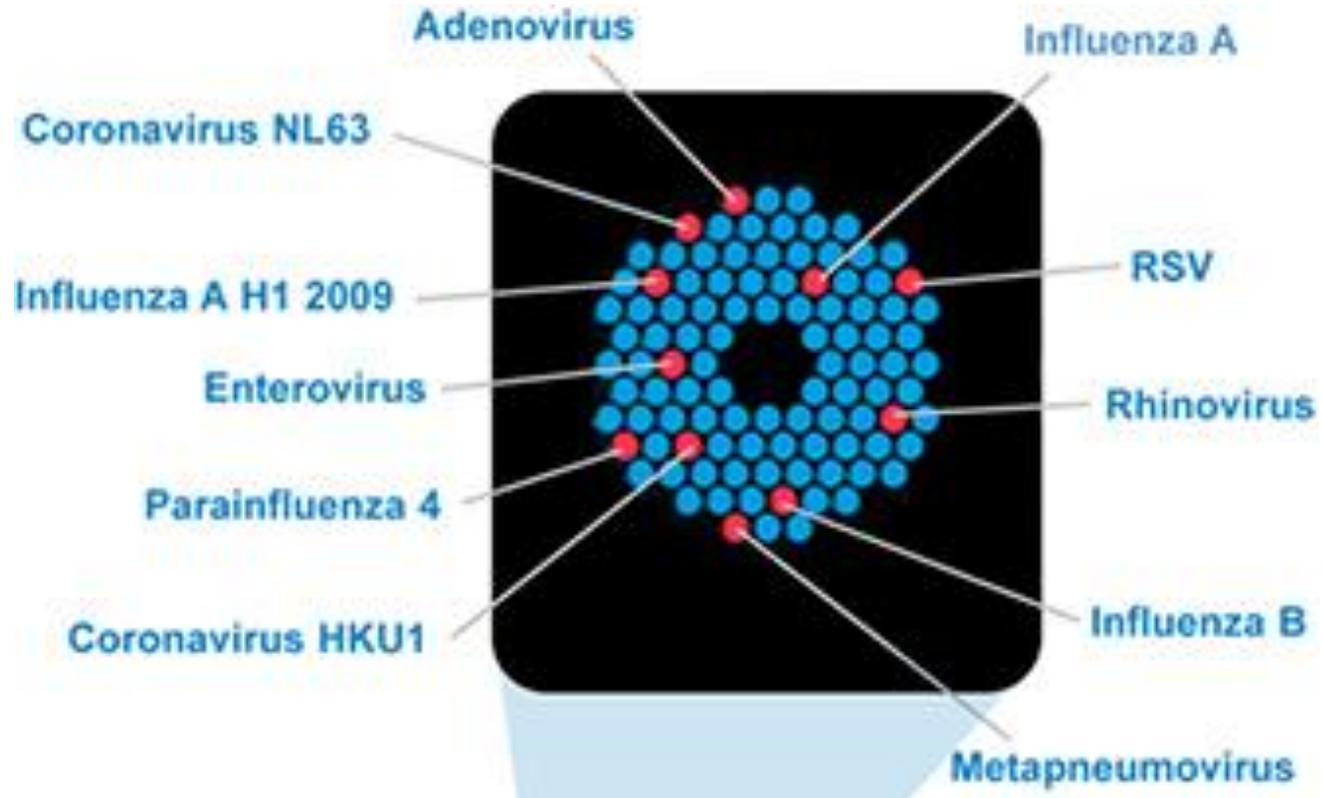
Viruses

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

FilmArray® GI Panel		BIO FIRE	
		www.BioFireDx.com	
Run Summary			
Sample ID:	4973948	Run Date:	09 Apr 2018 10:51 AM
Detected:	Enteroaggregative <i>E. coli</i> (EAEC) <i>Shigella</i> /Enteroinvasive <i>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 <i>E. coli</i>/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/st</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</i> /Enteroinvasive <i>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		



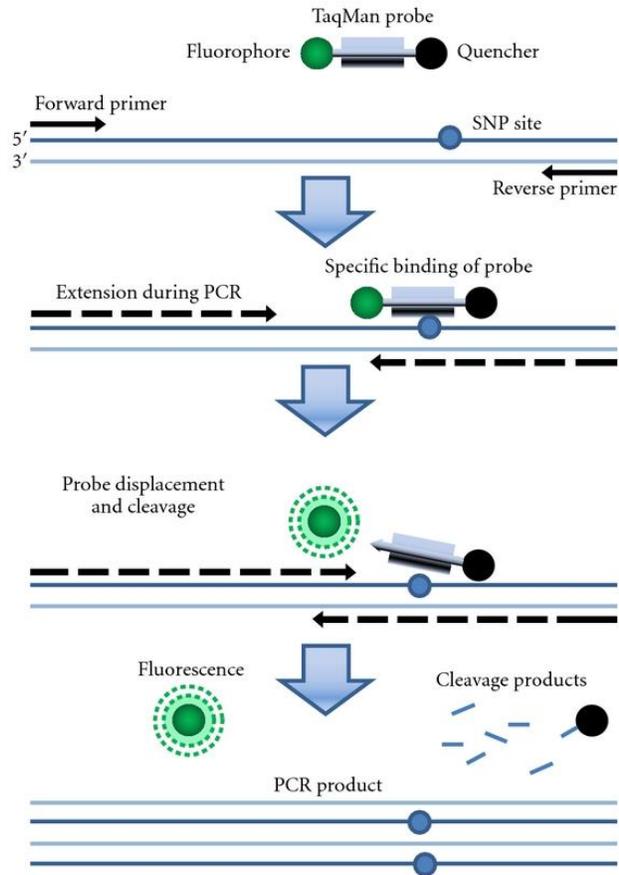
PCR Multiplex Real Time No Especifico :



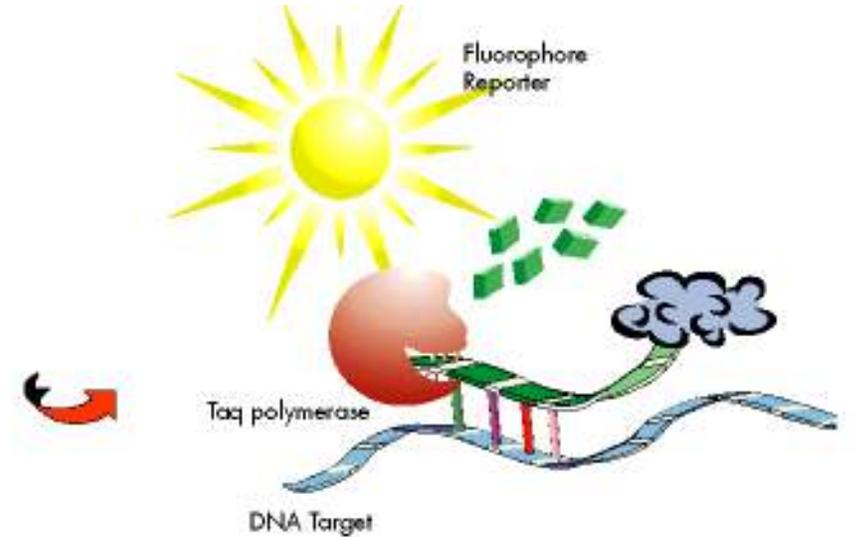
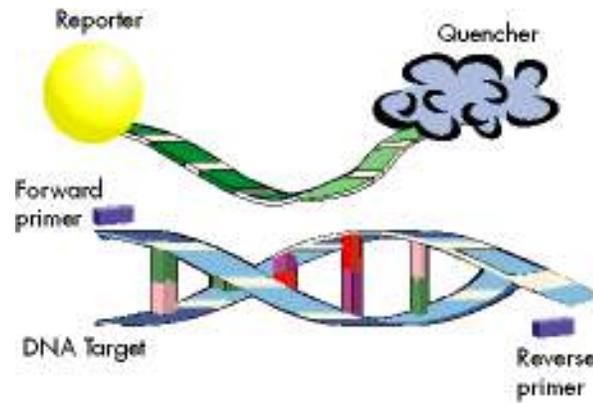
Real time PCR:

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

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

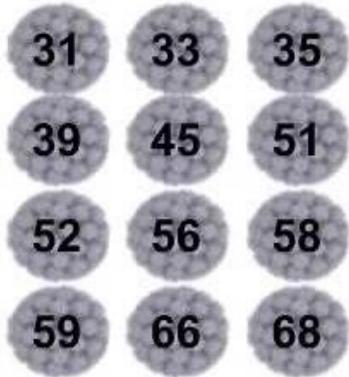


Taqman™ probe



PCR Multiplex Real Time Especifico :

Channel 1



12 hrHPV genotypes
as a pooled result

Channel 2



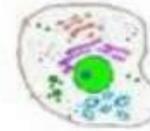
Individually
detects HPV16

Channel 3

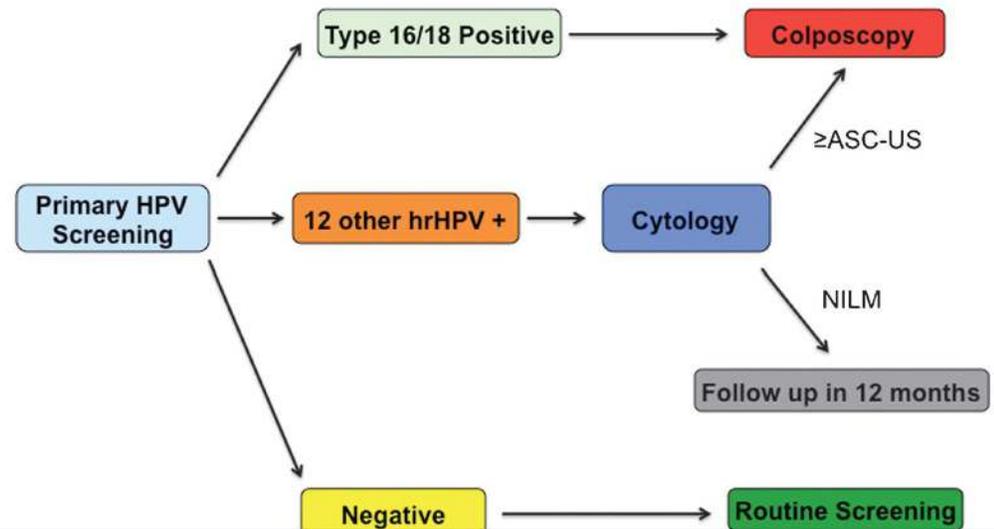
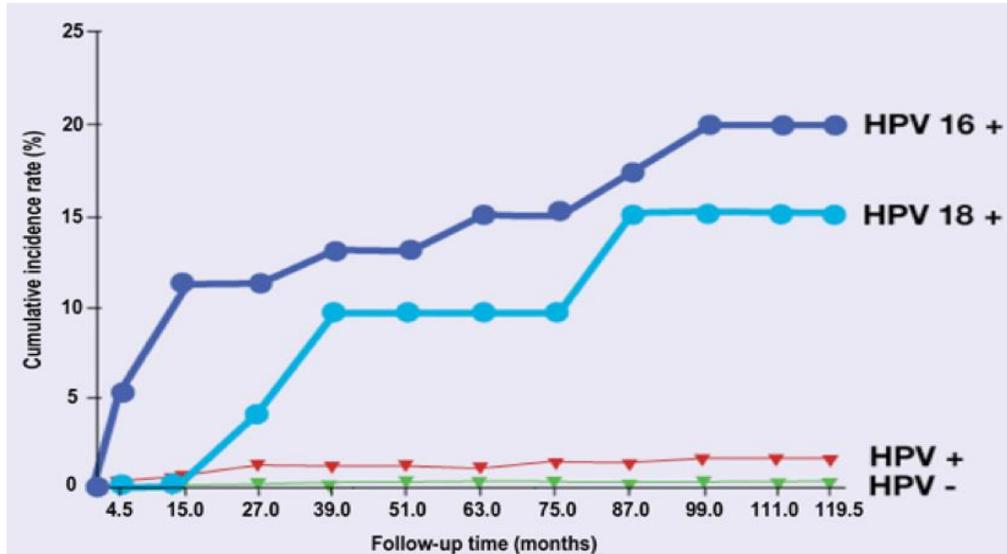


Individually
detects HPV18

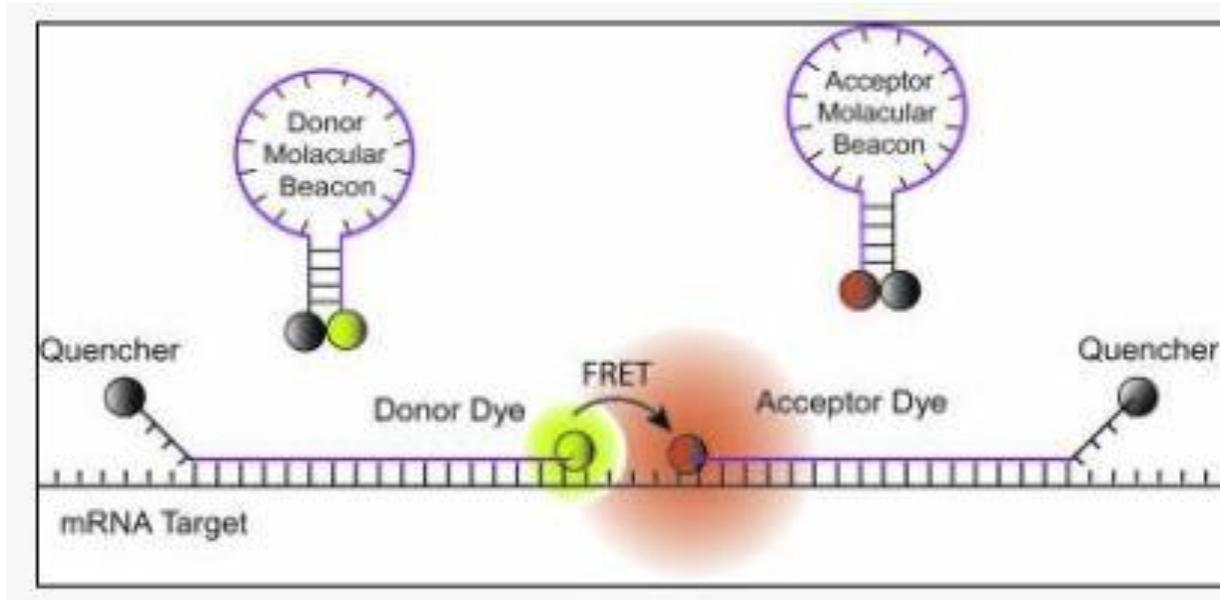
Channel 4



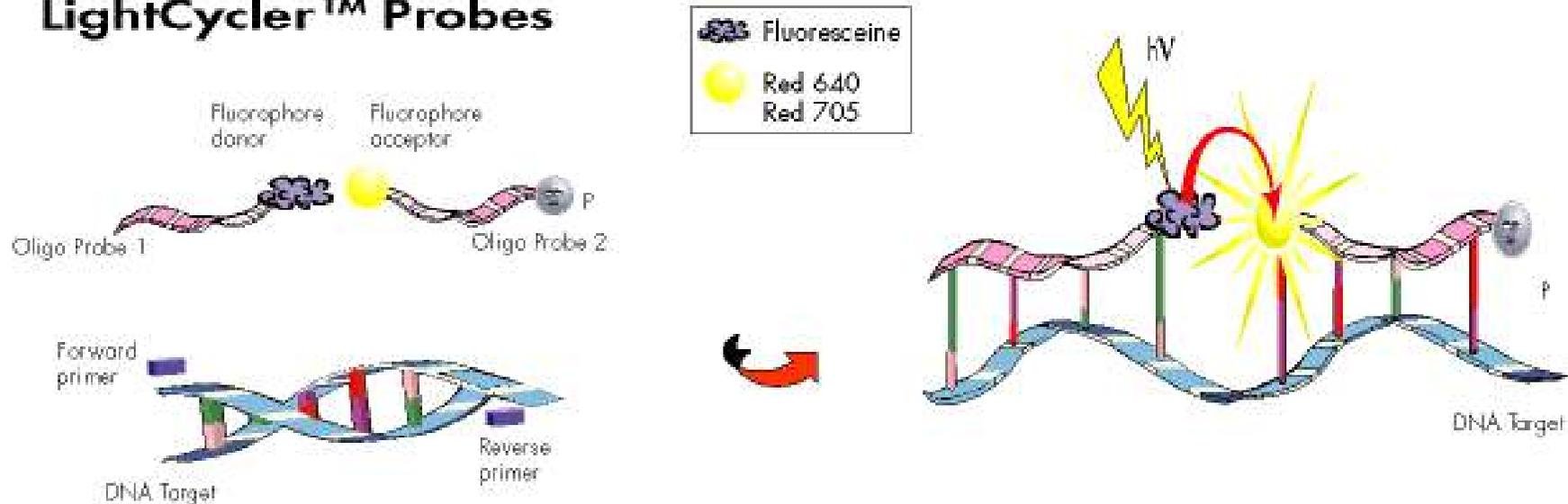
Internal cellular
control (β -globin)



Real time PCR: métodos específicos - Probes

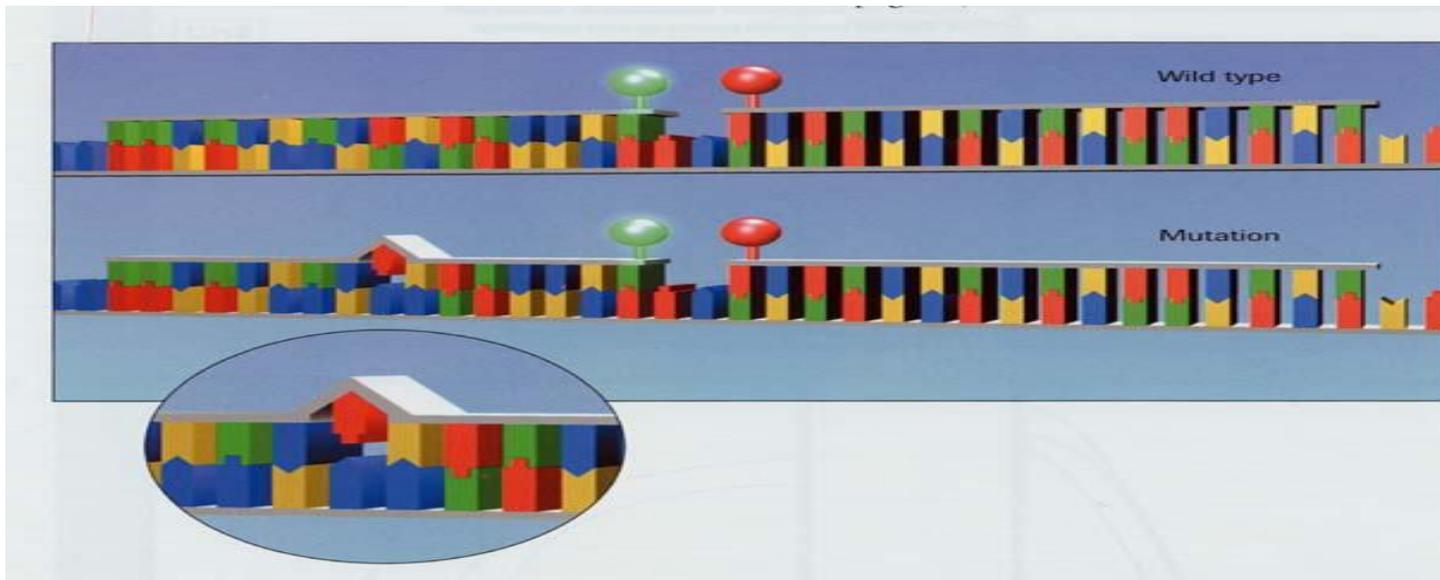
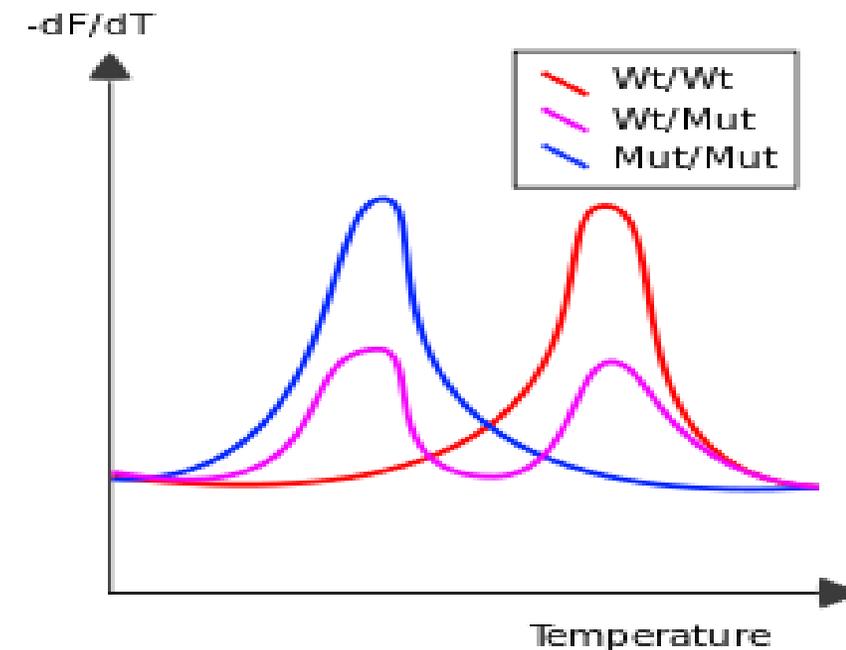
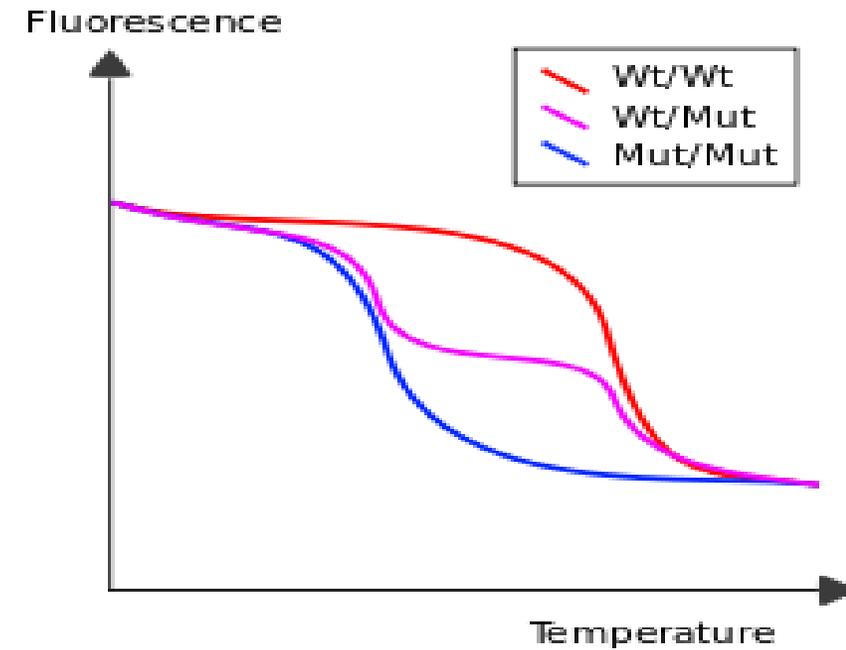


LightCycler™ Probes



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



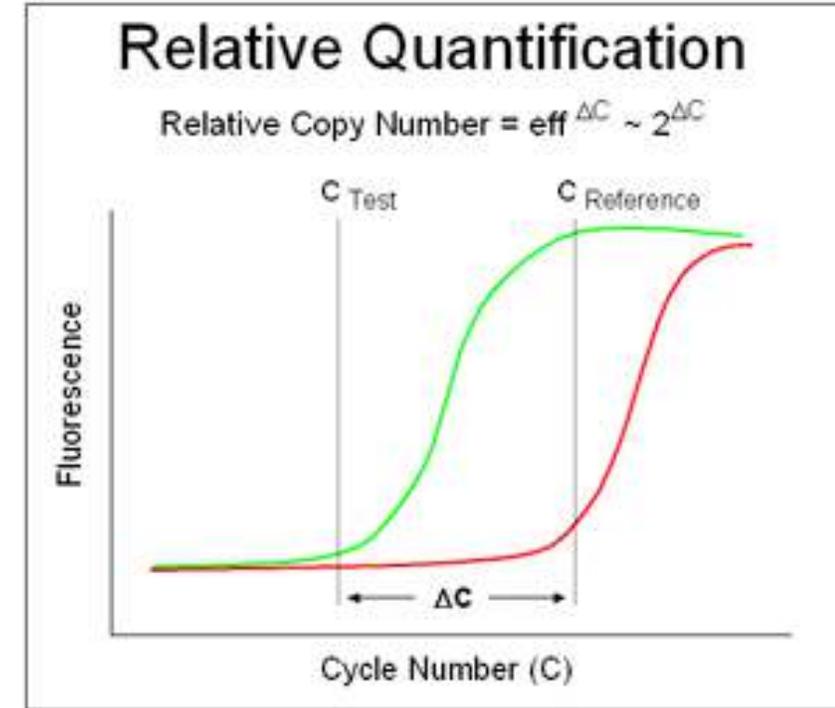
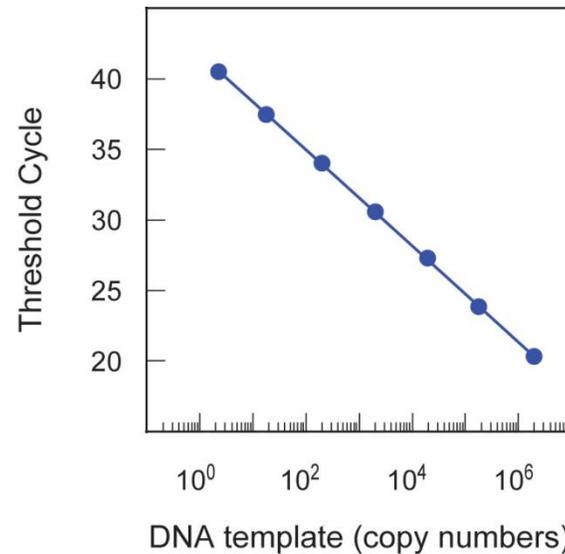
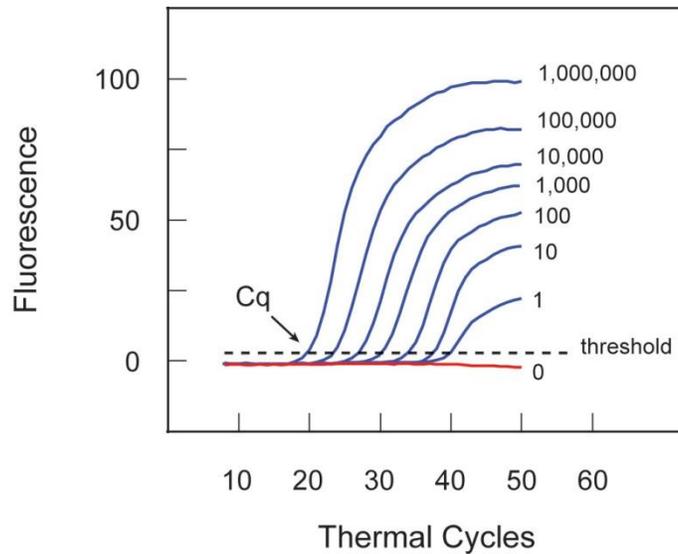
¿Como se **cuantifica** en la PCR Tiempo Real?

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

Cuantificación Absoluta

VS

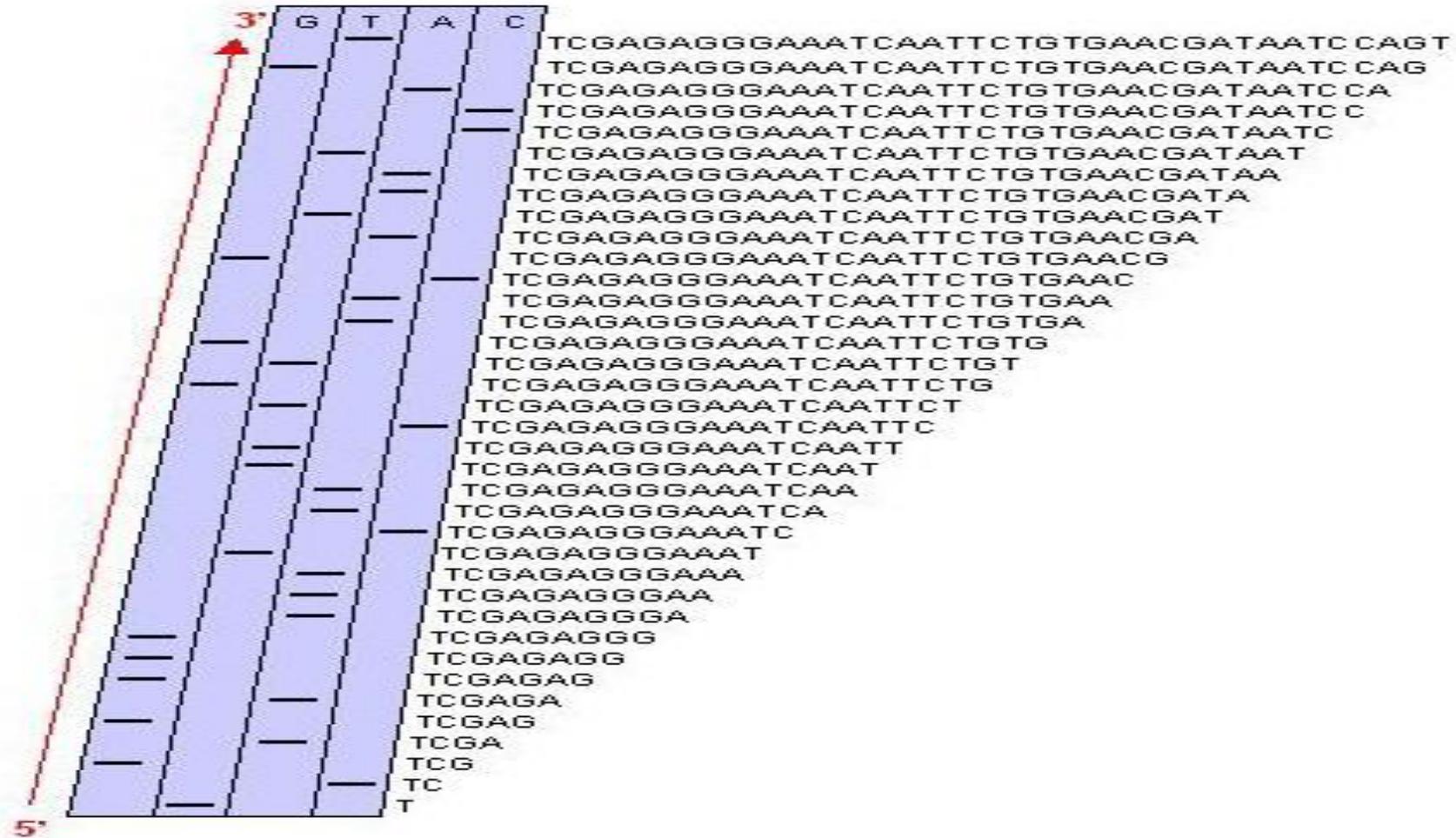
Cuantificación Relativa



Secuenciación por método enzimático:

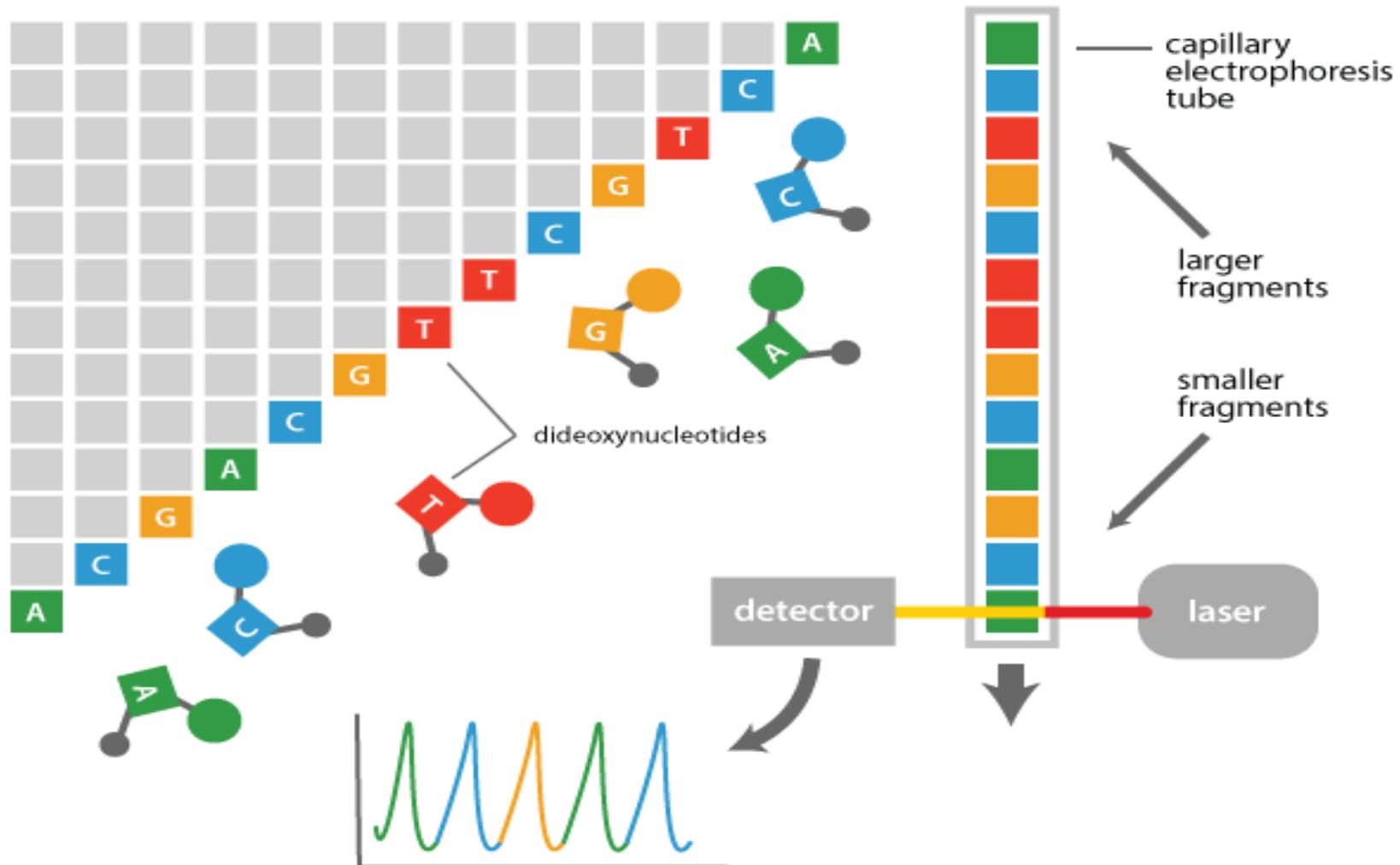
El método de **Sanger (1977)** se basa en el uso de la ADN polimerasa para sintetizar cadenas de ADN con una terminación específica.

Autorradiografía resultante

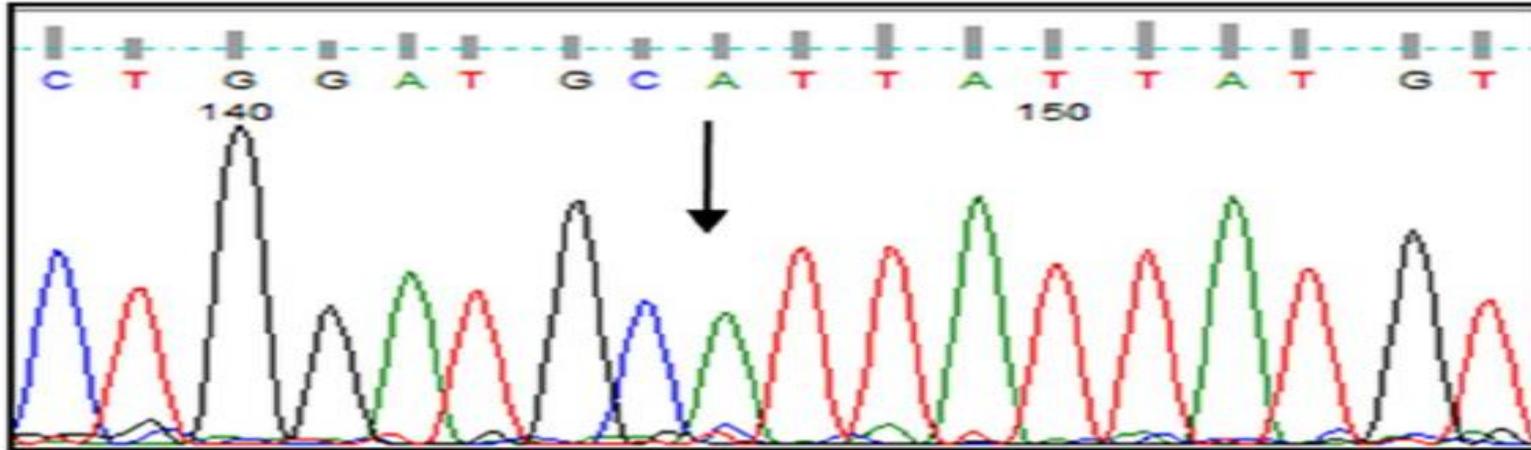


Secuenciación por método enzimático automatizado:

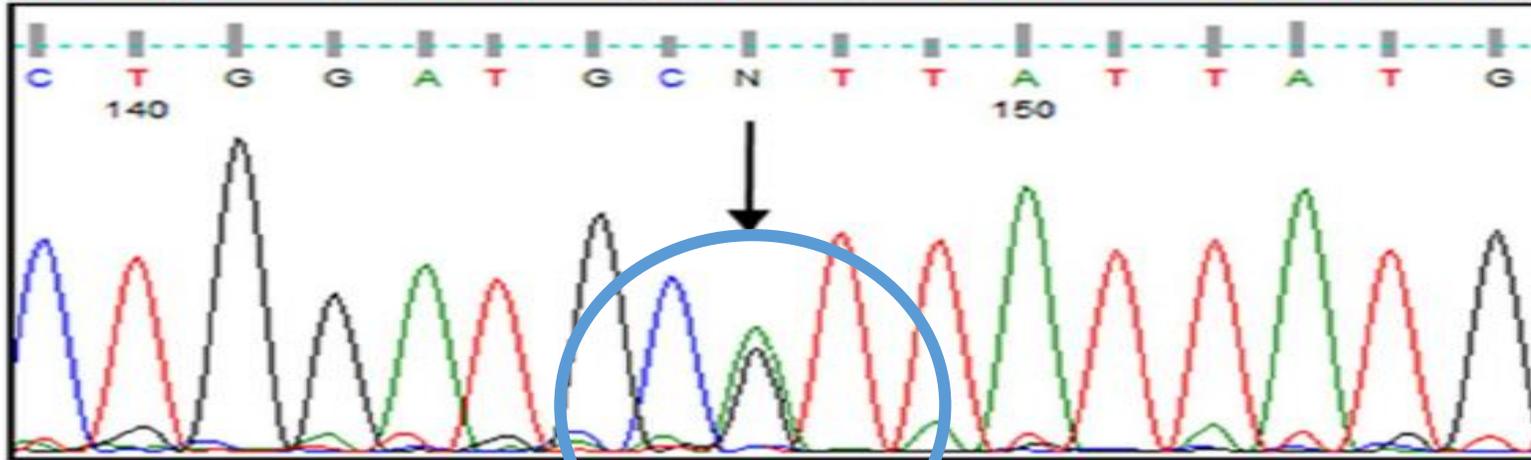
Secuenciación en electroforesis capilar: En la actualidad la reacción de secuenciación se basa en una modificación de la PCR con dideoxinucleótidos marcados con fluoróforos y se resuelve mediante una electroforesis capilar.

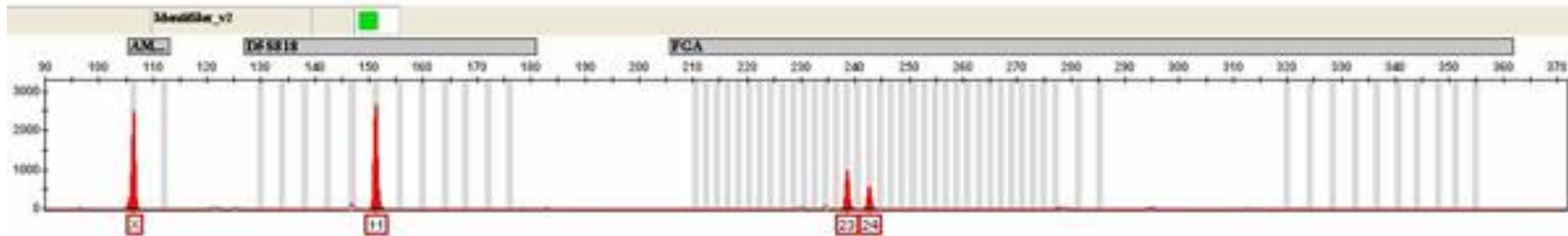
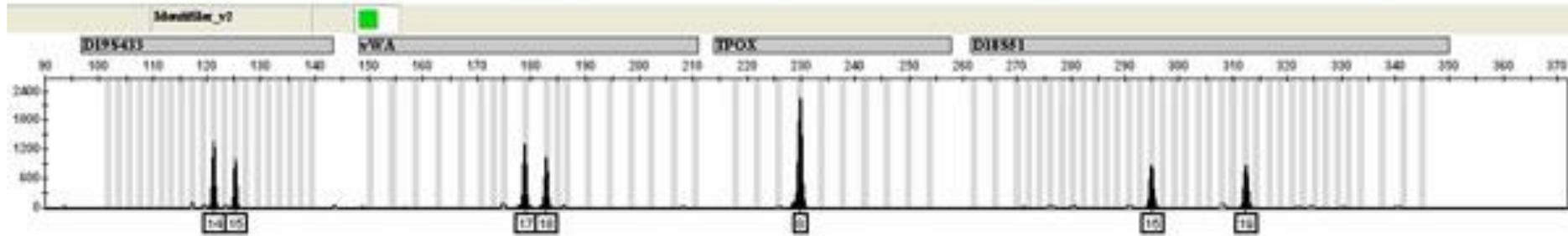
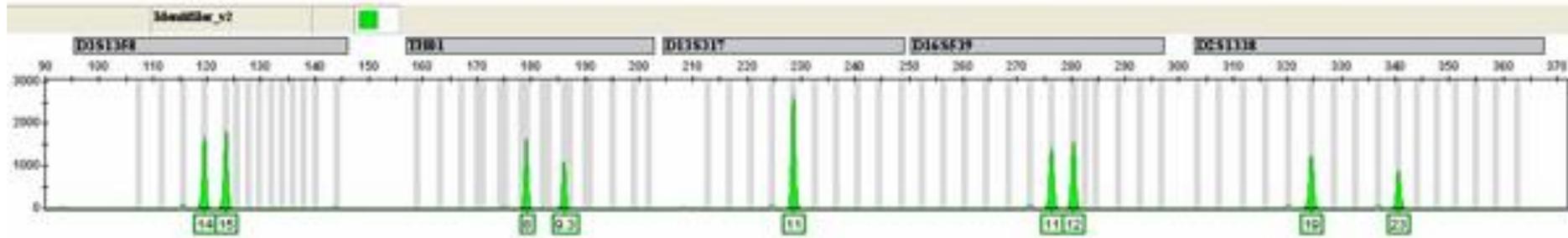
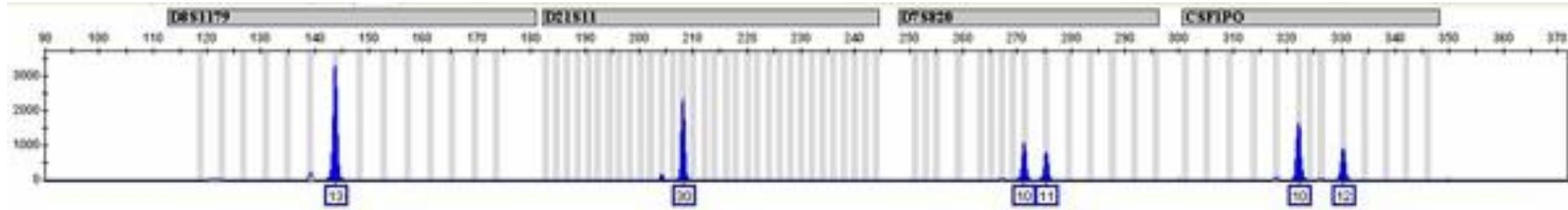


A

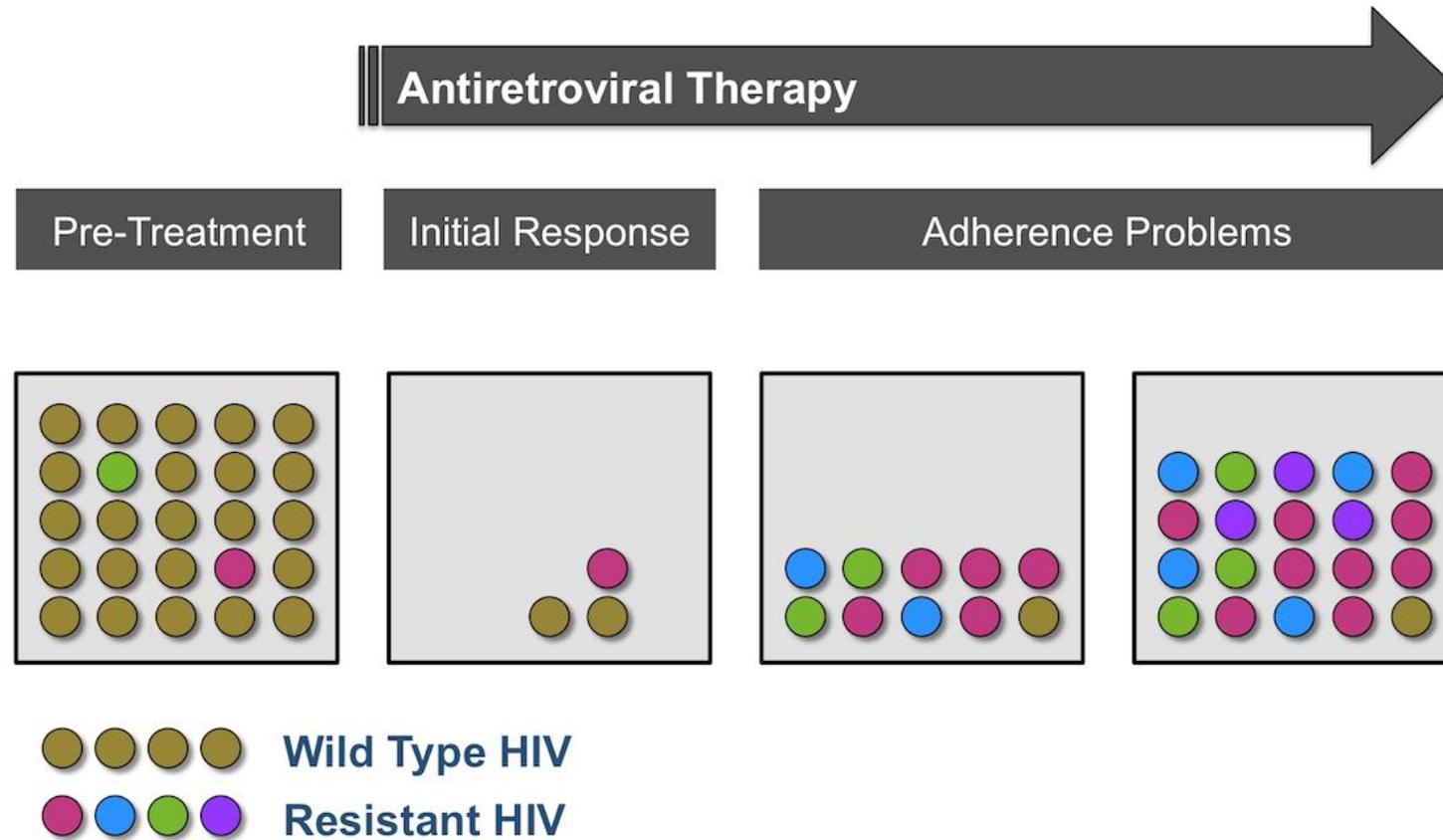


B





Secuenciación:

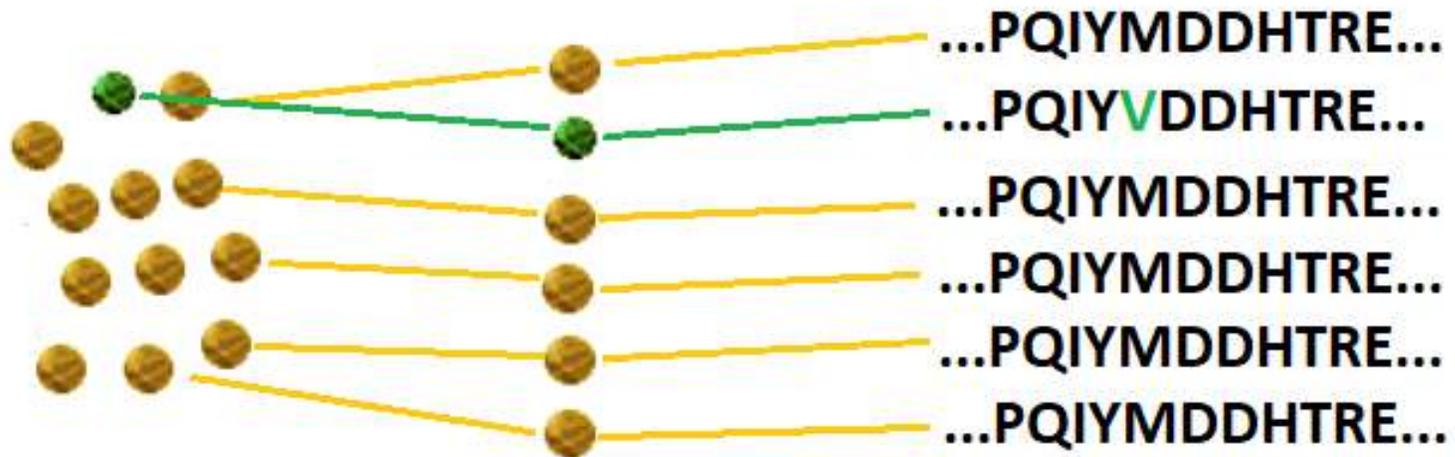


Secuenciación NGS (Next Generation Sequencing):

SECUENCIACION POBLACIONAL



SECUENCIACION NGS



Secuenciación NGS:

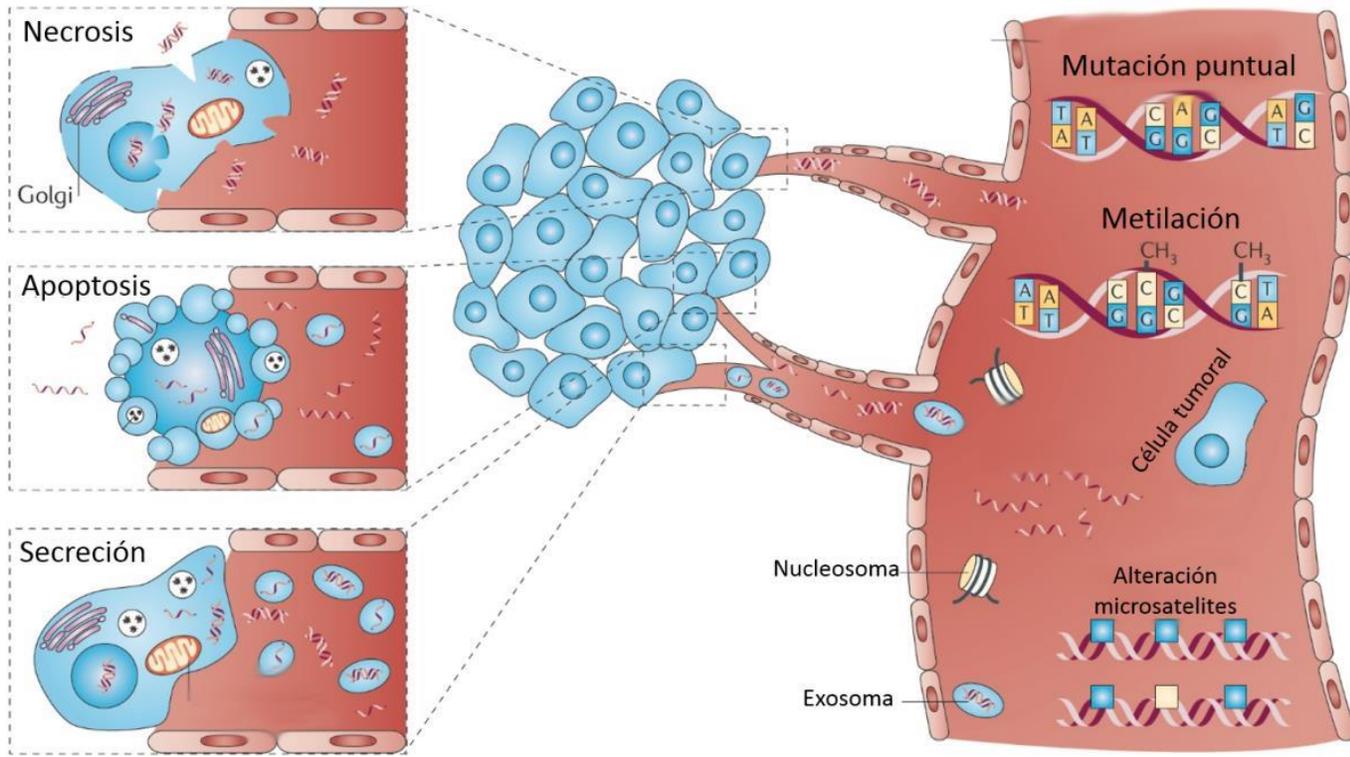
Drug	20%	10%	5%	1%
NRTI				
lamivudine (3TC)	M184V			
abacavir (ABC)	M184V			
zidovudine (AZT)	M184V			
stavudine (D4T)	M184V			
didanosine (DDI)	M184V			
emtricitabine (FTC)	M184V			
tenofovir (TDF)	M184V			
NNRTI				
efavirenz (EFV)		K103N		
etravirine (ETR)				
nevirapine (NVP)		K103N		
rilpivirine (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

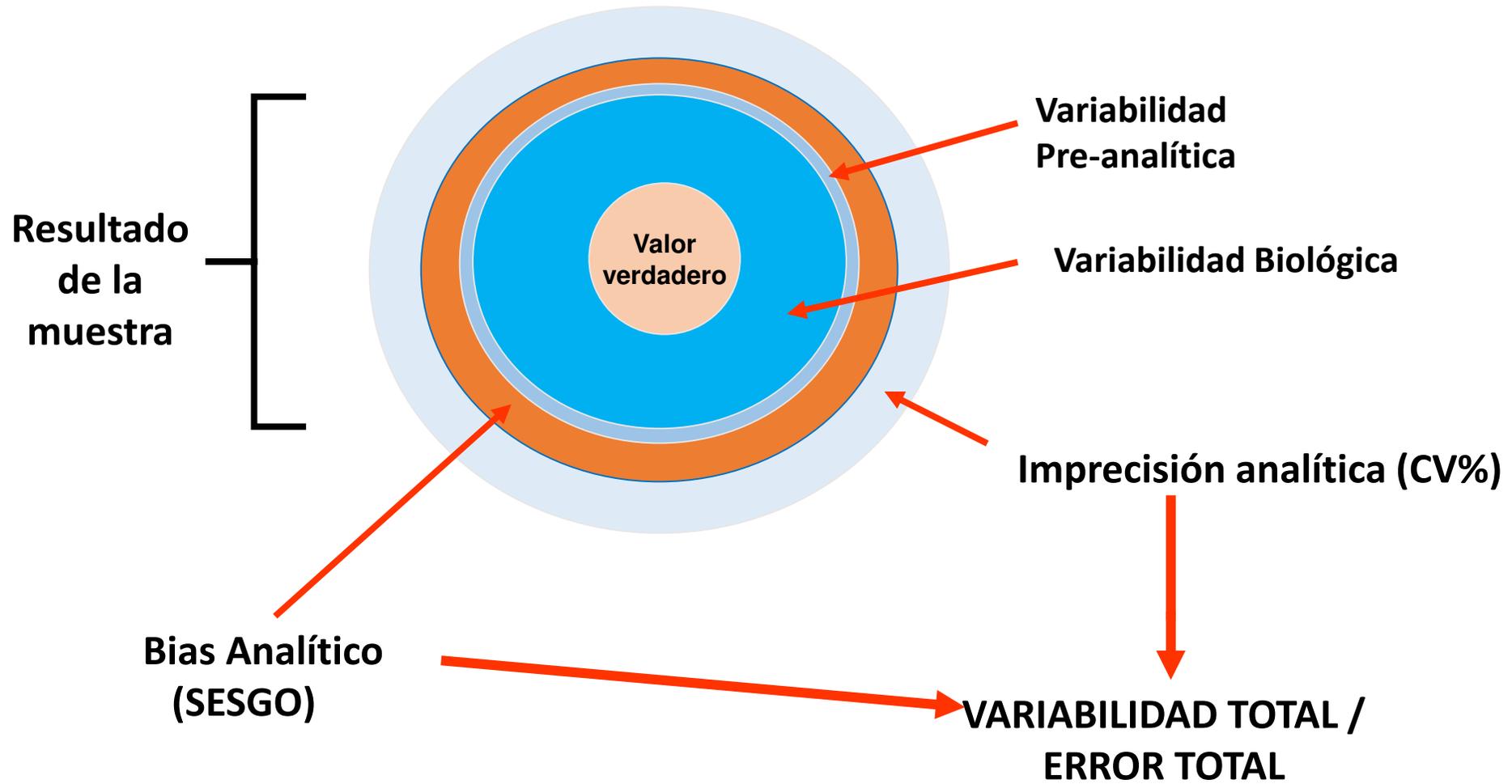
Cómo es la biopsia líquida • Con un análisis de sangre se buscan células cancerosas. Es menos invasiva y más rápida.



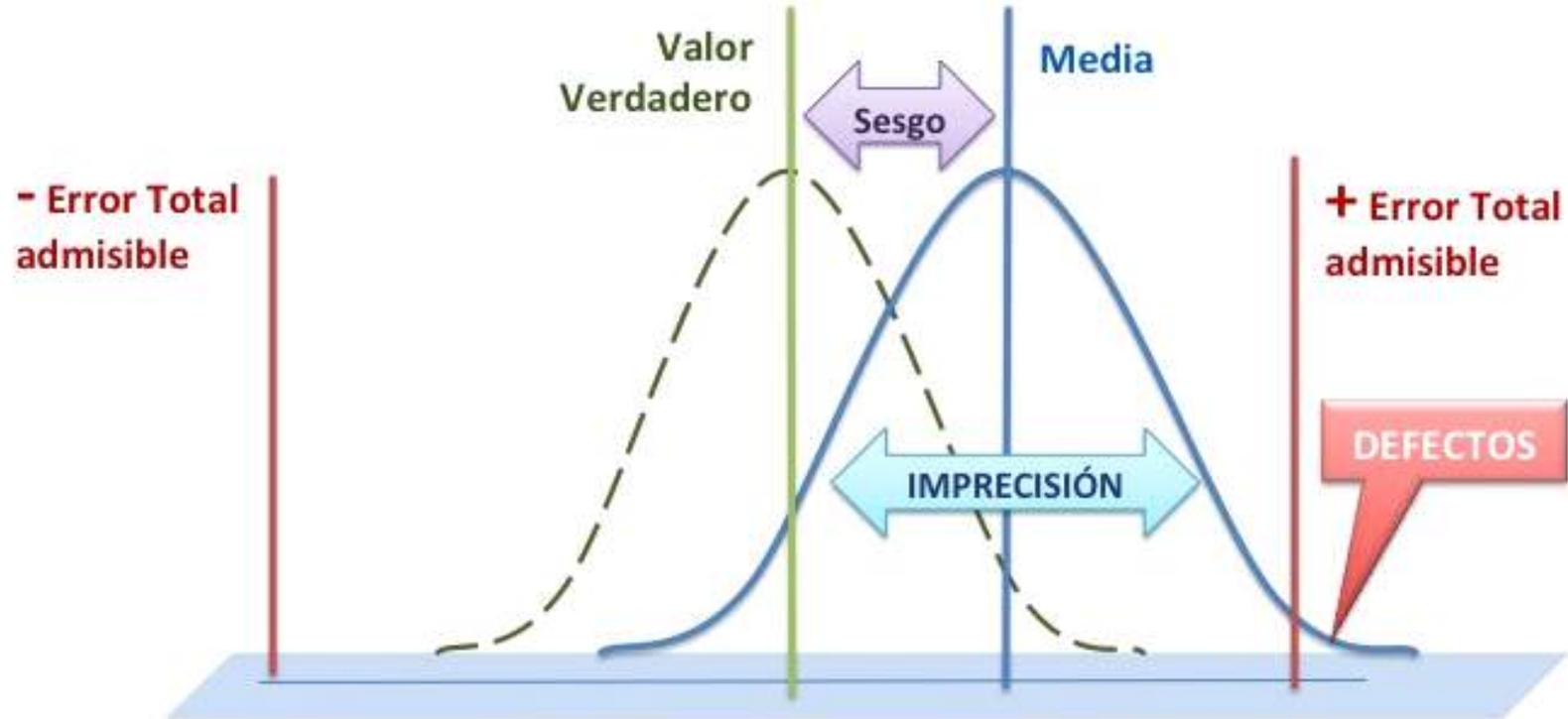
CLASIM



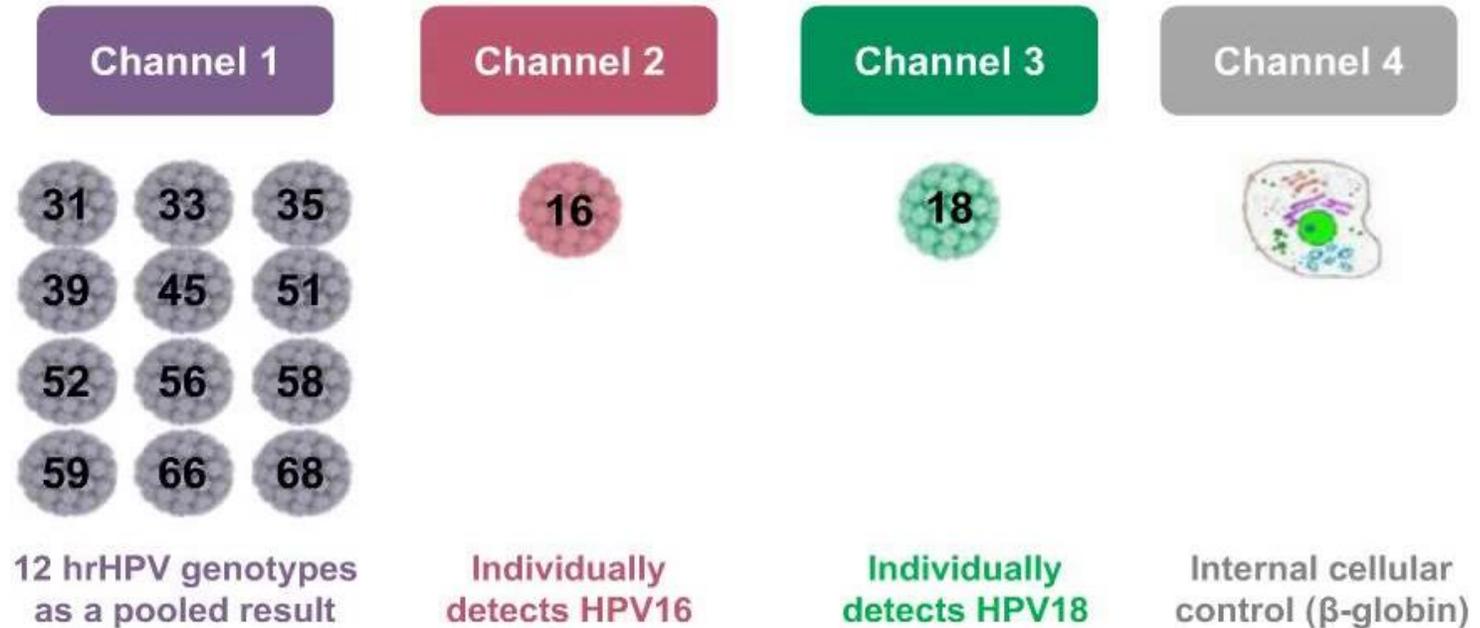
¿Para **informar - liberar** un
resultado debemos conocer
algo más?



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



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 médico 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 diagnóstico. Además de útil contar con los tests realizados sobre la misma muestra (ej: serología, citogenética, etc.).

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

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

La validación clínica es el paso más importante en la generación de resultados, ya que engloba los aspectos pre-analíticos y analíticos, establecer criterios y el uso de tests reflejos para la misma es indispensable para conseguir buenas prácticas 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!

ezubillaga@cibic.com.ar



www.heritas.com.ar



info@heritas.com.ar



[Héritas](#)



[HeritasArg](#)