



TECNO DIAGNOSTICA



Diagnóstico Molecular

Dr. Sergio Zúñiga Martínez

III Congreso Nacional del Profesional de Laboratorio Clínico

El Salvador

Febrero 2017

www.tecnodiagnostica.com

DEFINICION

El concepto de “diagnóstico molecular” es un término amplio que incluye técnicas de biología molecular en beneficio de la salud humana, detectando y/o cuantificando secuencias genéticas específicas de ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN) o proteínas.

Inicialmente, el concepto de “Biología Molecular” se aplicó a los trabajos realizados sobre el ADN y se consideraba materia solo académica y de investigación.

Diagnóstico Molecular

Proteómica

Maldi TOF

Genómica

PCR
RT-PCR
q-PCR

FISH

Microarray



VITEK MS™

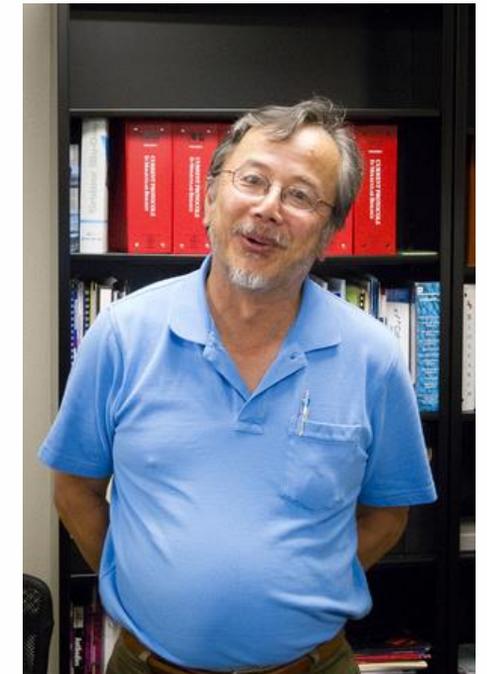
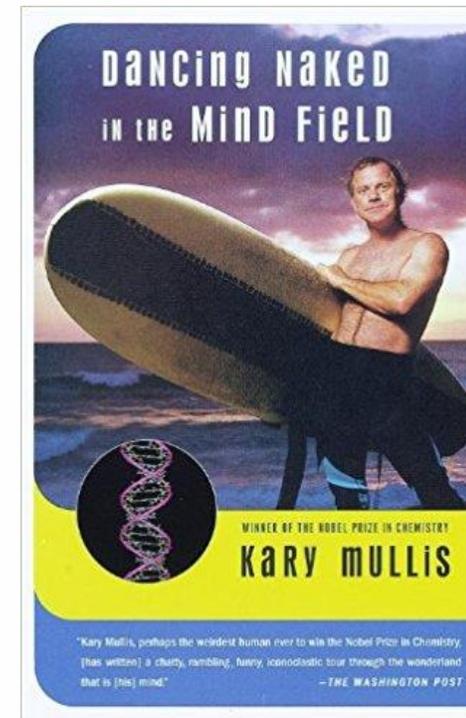
Un poquito de historia

- JF Meishner descubre ADN 1869
- Watson, Crick, Franklin, estructura ADN 1953
- Edwin Southern Southern Blot 1973
- Kari Mullis, perfecciona la PCR 1983
- Higuchi et Al, qPCR 1993

Crick, Watson, and Wilkins were awarded the Nobel Prize for Franklin's work.

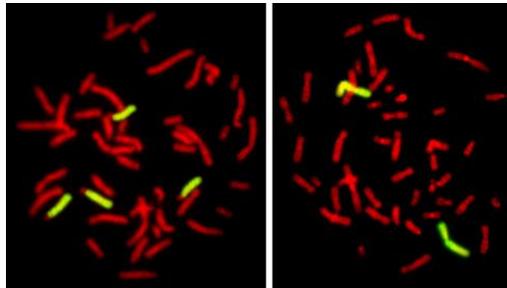


Rosalind Franklin Francis Crick James Watson Maurice Wilkins



Técnicas más comunes para del dx por molecular

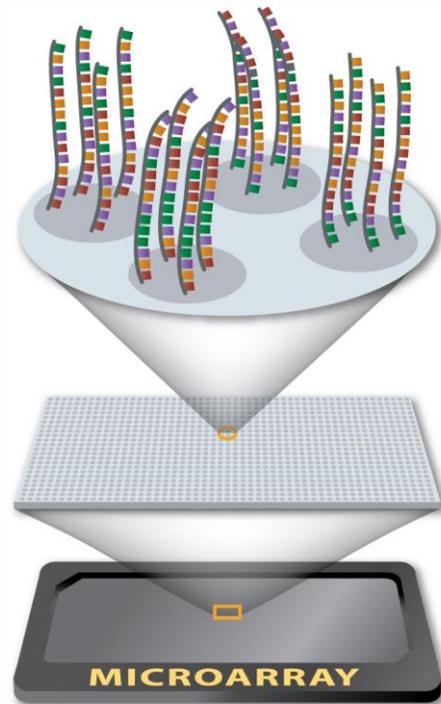
- FISH:
 - Fluorescent In Situ Hybridization
 - De gran utilidad en estudios citogenéticos.
 - Detección de genes anómalos.
 - Detección/diagnóstico de enfermedades congénitas.
 - Detección/diagnóstico de cáncer.



Mucho procedimiento manual
Bajo grado de automatización
Buena sensibilidad y especificidad
Requiere de personal entrenado

Técnicas más comunes para del dx por molecular

- **Microarray:**
 - Técnica que permite la hibridación de un genoma incógnita con sondas fijas en un dispositivo.
 - Se fundamenta en la complementariedad del ADN ADN.



**Enfermedades congénitas.
Mutaciones
Epidemiología
Filogenética**

Técnicas más comunes para del dx por molecular

- **PCR**
- **“PCR is a technique that allows chemists to easily, and inexpensively, replicate as much precise DNA as they need”.**
- **La PCR es un proceso biosintético in vitro que simula los procesos naturales de la replicación de ácidos nucleicos mediante el control de variables básicas como tiempo, temperatura y adición de reactivos.**

Pasos de la PCR



1° Desnaturalización

95° C 1 minuto



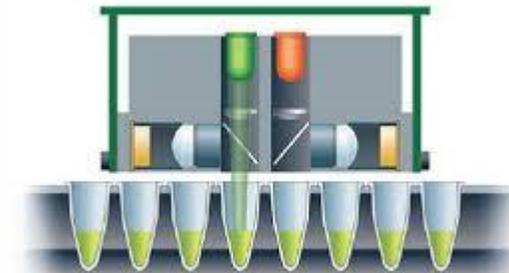
2° Anillamiento

54° C 45 segundos



3° Extensión

72° C 2 minutos

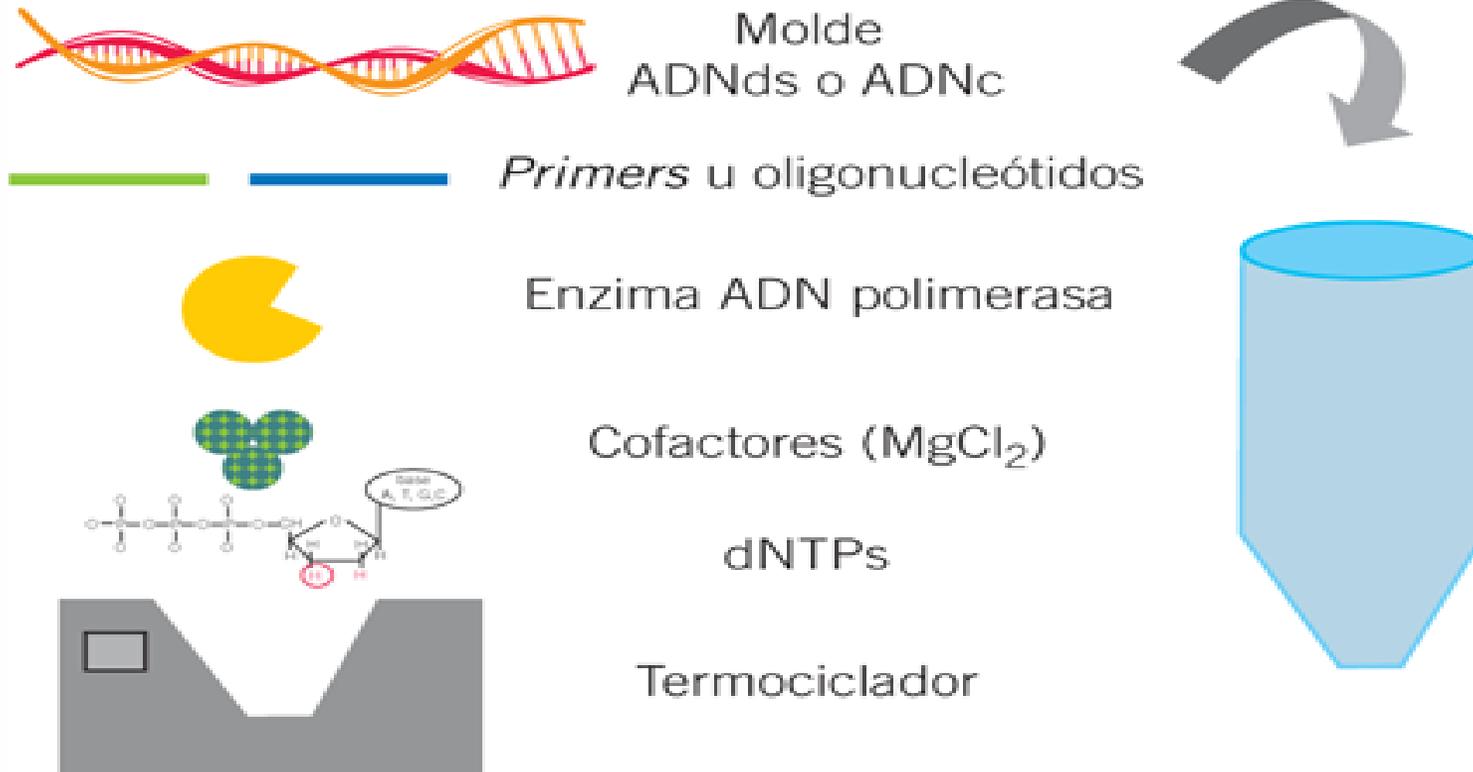


As the CFX96 optics shuttle travels across the plate, light is focused directly into the center of each sample well. Side view of the optics shuttle shows the green LED firing over a well.

Grado de automatización variable
En ocasiones requiere de personal
entrenado
Infraestructura y equipamiento

La reacción

COMPONENTES PARA UNA REACCIÓN DE PCR



Fuente: Adriana María Salazar Montes, Ana Soledad Sandoval Rodríguez, Juan Socorro Armendáriz Borunda: *Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*, www.accessmedicina.com
Derechos © McGraw-Hill Education. Derechos Reservados.

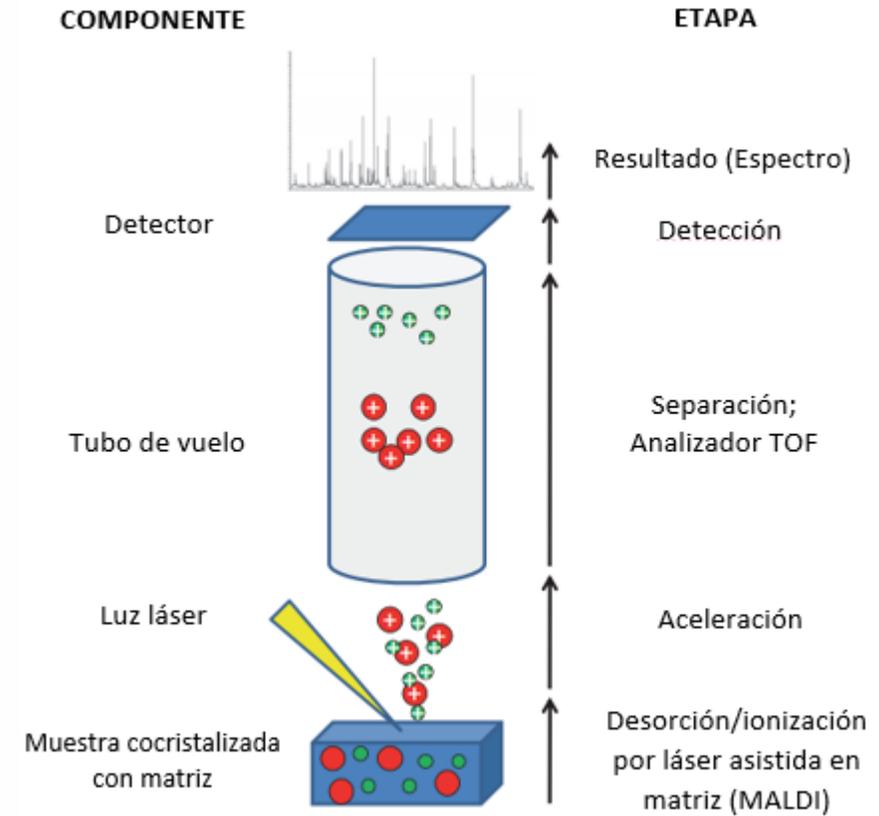
Técnicas más comunes para del dx por molecular

- **Proteómica:**

- Biotipificación de proteínas de microorganismos.
- MALDI-Toff, análisis de riboproteínas



VITEK MS™



**Identificación bacteriana rápida.
Para laboratorios de alto volumen.
Permite la identificación de variados
microorganismos**

Aplicaciones de Biología Molecular

Algunos ejemplos

Cáncer

Los avances en medicina del cáncer se han logrado en gran parte gracias a BM

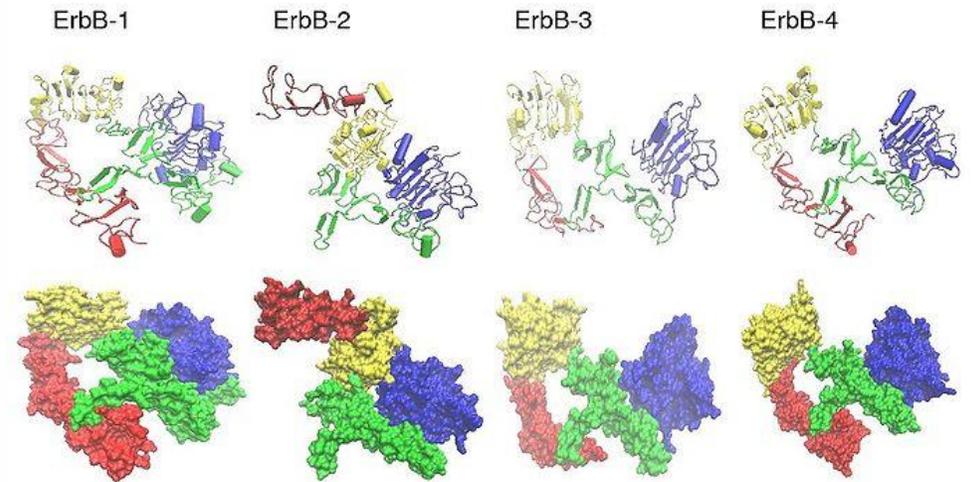
- **Pronóstico:**
 - Mediante detección de mutaciones (PCR/MICRO)
 - Oncogenes (met, ret)
 - Genes de regulación (Rb, p53)
 - Genes care giver (BRCA 1, XP)
- **Diagnóstico:**
 - Cáncer cérvix, genotipificación de HPV detección de genotipos de alto riesgo (PCR/LIPA/CH)

Aplicaciones de Biología Molecular

Algunos ejemplos

Cáncer

- Seguimiento:
 - Transcripción de oncogenes (ARNm) PCR/FISH
 - Producción de proteínas (proteómica)
- Tratamiento:
 - Cáncer de mama, tumores ErbB positivos (FISH/PCR).



Cáncer

- En la actualidad se cuentan con diferentes kit para diferentes aplicaciones con diferente grado de automatización, principalmente:
 - CA de mama
 - CA de cuello de útero
- Muchas de estas tecnologías no están disponibles en la región.
- Varias relacionadas con casas farmacéuticas



Aplicaciones de Biología Molecular PCR



Microbiología

DIGANOSTICO

DETECCIÓN/
IDENTIFICACIÓN

Bacteriología

Micología

Virología

SEGUIMIENTO

Carga viral

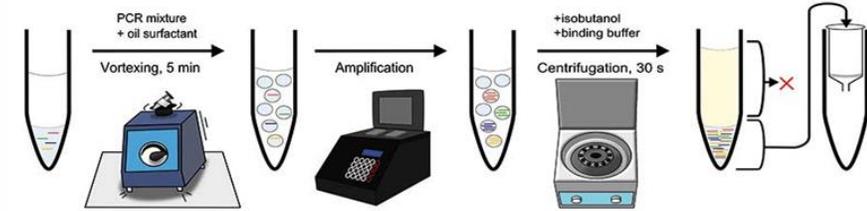
HIV

CMV



Aplicaciones de Biología Molecular PCR

Microbiología



Técnicas directas

Técnicas indirectas

DIGANOSTICO
Consiste en la detección de un gen de un patógeno

A partir de una muestra

A partir de un aislamiento previo

Infecciones respiratorias
Gastrointestinales
SNC

Hemocultivos



Microbiología



SEGUIMIENTO

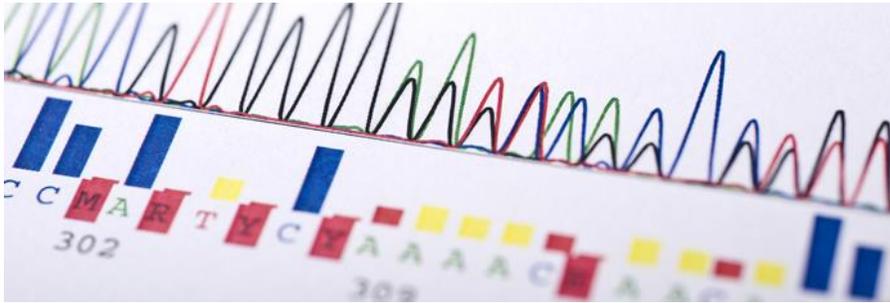
**Carga
viral/secuenciamiento**

HIV

HCV

**CMV
JC/BK**

**Tratamiento
Evolución patología
Implementación de corrección terapéutica
Abordaje clínico
qPCR**



Consideraciones generales

- ***Implementación/elección de la técnica***
 - Establecer necesidades:
 - Tiempo de respuesta.
 - Aumentar capacidad diagnóstica.
 - Manejo efectivo de pacientes.
 - Infraestructura física de los laboratorios:
 - Se cuenta con todo el recurso físico necesario?



Consideraciones generales

La muestra

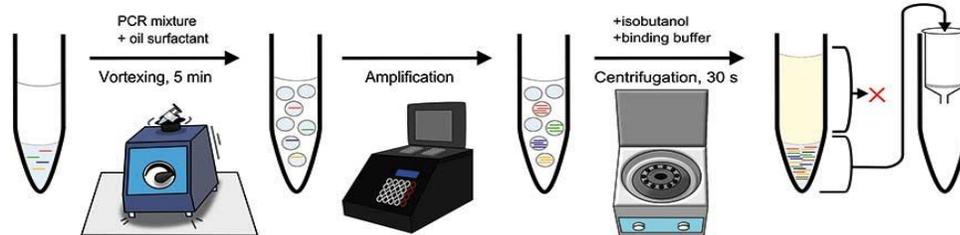
- Sensibilidad deseada del ensayo
- Volumen requerido de muestra para procesar
- Número de pruebas diferentes a realizar sobre la misma muestra procesada
- Estabilidad, conservación
- Tiempo y forma de recolección



Consideraciones generales

Selección de la metodología (s) grado de automatización

- Tiempo de respuesta.
- Disponibilidad de personal.
- Grado de entrenamiento/conocimiento.
- Necesidades del entorno



Consideraciones generales

Interpretación de resultados

• Todos los resultados obtenidos deben ser analizados considerando diferentes variables:

- Calidad de la muestra.
- Cuadro/historia clínica.
- Tiempo de evolución de la patología.
- Coinfección



Comunicación de los resultados

- Debe ser acorde con las técnicas empleadas y los requerimientos de los usuarios

Consideraciones generales

Análisis de costo-beneficio:

- ❖ **Debe ser un análisis integral de todas las aristas.**
- ❖ **Considerar la visión:**
 - ❖ Clínica.
 - ❖ Laboratorio.
 - ❖ Financiera.
 - ❖ Epidemiológica.
 - ❖ Humana.



En resumen

- Las técnicas de molecular son versátiles y permiten obtener resultados adecuados y fidedignos en tiempo récord.
- Permiten aumentar la capacidad y oferta diagnóstica.
- Existe una variedad importante de plataformas que se adecuan a la realidad y necesidad individuales de los laboratorios



Para finalizar

- No olvidemos que las técnicas moleculares se aplican más allá del diagnóstico clínico.
- Son de utilidad en Industria y en Veterinaria.
- Es un campo de constante crecimiento y en un futuro cercano permitirá el diagnóstico de precisión y la medicina personalizada *Next Generation Sequencing*.
- El diagnóstico molecular complementa las metodologías actuales de diagnóstico

BIOTIPIFICACIÓN



ID y PSA



HEMOCULTIVO

Muchas gracias



BIOMARCADORES

DISPONIBILIDAD DE TECNOLOGIA



DX MOLECULAR