

JORNADAS NACIONALES DEL CENTENARIO DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE PEDIATRÍA *Infectología Pediátrica*

Diagnóstico molecular de las enfermedades infecciosas:
¿qué hay de nuevo?

Miguel Angel De Cristófano



Reflexiones sobre el diagnóstico por amplificación génica.

Magia, mito o realidad para el siglo XXI





Estallido celular E. coli
Aprox. 20.000x



Epoca de Grandes contrastes.



China 1,330,044,605

India 1,147,995,898



Burj Dubai.
820 m de altura



«He aquí que todos forman un solo pueblo y todos hablan una misma lengua, siendo este el principio de sus empresas. Nada les impedirá que lleven a cabo todo lo que se propongan. Pues bien, descendamos y allí mismo confundamos su lenguaje de modo que no se entiendan los unos con los otros» (Génesis.)



La Torre de Babel, pintura al óleo sobre lienzo de Pieter Brueghel el Viejo. (sXVI)



AGCCCTCCAGGACAGGCTGCATCAGAAGAGGGCCATCAA...
GGGCTCAGGATTCCAGGGTGGCTGGACCCCAGGCCCCA...
TGAAGCATGTGGGGGTGAGCCCAGGGGGCCCCAAGGCAG...
CTGTCTCCCAGATCACTGTCCTTCTGCCATGGCCCTGT...
GCCCTCTGGGGACCTGACCCAGCCGCAGCCTTTGTGAA...
CTCTCTACCTAGTGTGCGGGGAACGAGGCTTCTTCTAC...
GCAGGGTGAGCCAACCTGCCCAATTGCTGCCCCTGGCCGC...
CCAGCATGGGCAGAAAGGAGGGCAGGAGGCTGCCACCCAG...
TTCTCTTGGTCACGTCCTAAAAGTGACCAGCTCCCTGT...
TTGGCTTCGGCAGCCCCGAGATACATCAGAGGGTGGGC...
TGCCCCGCAGCCCATTTCTCCACCCTCATTGATGACC...
GGGTGACCTGGGGTACAGGGTGCCCCACGCTGCCTGC...
GGGCGTGGCTGCCTGCCTGAGTGGGCCAGACCCCTGTC...
ATGGGGAAGATGCTGGGGACAGGCCCTGGGGAGAAGTA...
GCTGCCCCGGGGCGGGGGGAAGGAGGTGGGACATGTGGG...
GTGACCCTCCCTCTAACCTGGGTCCAGCCCGGCTGGAG...
AGGCGGGCACTGTGTCTCCCTGACTGTGTCCTCCTGTG...
TCTGCGCGGCACGTCCTGGCAGTGGGGCAGGTGGAGCT...
CCTTGGCCCTGGAGGGGTCCCTGCAGAAGCGTGGCATT...
CTACCAGCTGGAGAATACTGCAACTAGACGCAGCCCG...
GAGAGAGATGGAATAAAGCCCTTGAACCAGC





Temas de salud

Datos y estadísticas

Centro de prensa

Publicaciones

Países

Programas

ODI Cada año mueren 8 millones de niños menores de 5 años. Casi el 90% de estas defunciones se deben a solo 6 trastornos, a saber: problemas neonatales, neumonía, diarrea, paludismo, sarampión y VIH/SIDA

Meta 4

Cada :

90% d

proble

VIH/SI

en des

niños

mortal

16.7 muertes/min!!!

La cor

interve

alimentación del lactante y del niño pequeño; vacunas; prevención y tratamiento de casos de diarrea, neumonía y septicemia; lucha contra el paludismo; y prevención y atención del VIH/SIDA. En países con tasas de mortalidad elevadas, estas intervenciones podrían reducir el número de defunciones a menos de la mitad.

Epoca de Grandes presiones.



La Biología Molecular convive a diario con nosotros. Ha pasado del "oscurantismo" a la "moda".

Las revistas científicas, las de divulgación, los diarios, nos inundan de trabajos, comentarios, de expectativas, de sueños y hasta de temores



LA VERDAD...
NO ME IMAGINABA
QUE CON EL TEMA DEL
GENOMA HUMANO Y
LA CLONACION
AVANZARAN TAN
RAPIDO...

¿ LES PUEDO TOMAR EL PEDIDO ?
¿ YA DEPOSITARON EL ADN ?

SÍ, EEEH... ESTÁBAMOS VIENDO
LOS MENÚ MCDABY... ¿ QUÉ TE PARECE,
BICHI? ¿ NENA O NENE ?

LES PUEDO
OFRECER EL COMBO 2 ... SALE MUECITA,
MOROCHA, OJOS VERDES, ESTATURA 1,75 ...
GENÉTICAMENTE LIMPIA, FAT FREE, COEFICIENTE
INTELLECTUAL ALTO, INCLINACIÓN POR LAS CIENCIAS
ECONÓMICAS ... CARACTER MANEJABLE ...

Mc
Babu
Sale en filas

ME GUSTA,
PERO CON OJOS MARRONES
QUE ME HACE JUEGO
CON LAS CORTINAS

¿ SE PUEDE
AGRANDAR EL
MENÚ ?

POR 50 CENTAVOS
MÁS SE LLEVAN UN
MELLIZO...

LA
CARITA FELIZ
SALE CON
PAPILLA MEDIANA
Y MAMATERA
GRANDE

PELO

- Castaño
- Rubio
- Morocha
- Peirrujo
- Albino

PROFESION

- Médico/a
- Abogado/a
- Ingeniero/a
- Arquitecto/a
- Economista
- Científico/a
- Artista



EL
EMPLEADO
CLONADO
DEL MES



COMBO 1
MEDICO
BUEN ALENTO

COMBO 2
SIN
ENFERMEDADES

COMBO 3
FUTBOLISTA
CON ABUELO
ITALIANO



01.07.2008 | Clarín.com | Sociedad



Logran desarrollar células resistentes al virus del sida

00:00

Por: LONDRES. EFE

Un equipo de científicos consiguió hacer que las células T, un tipo de leucocitos, sean resistentes al virus del sida. Lo lograron gracias a la modificación de un gen, según una investigación que publica en su última edición la revista científica británica Nature Biotechnology. Investigadores de la Universidad de Pensilvania, Estados Unidos explican en este artículo cómo

Imprimir

Gracias a la genética, un bebé nacerá libre de un tipo de cáncer de mama

00:00

No tendrá los genes que habían afectado a varios miembros de la familia del padre. Tenía un 50% de probabilidades de desarrollar un tumor hereditario.

Por: Georgina [Elustondo](#)



U.S. National Library of Medicine
National Institutes of Health

DNA diagnosis	293.962	(1950)
PCR diagnosis	100.467	(1970)
PCR real time	42.854	(1990)
PCR multiplex	7.268	(1990)
Microarray diagnosis	14.831	(2000)
PCR, diag CMV	1.200	(1988)



**Bibliografía
Científica**



**Imagen
profesional**



**MO emergentes, reemergentes y...
nuevos huéspedes para los MO de
siempre
(Presiones enfermos y familiares)**

**La aplicación de nuevas y refinadas técnicas,
son consideradas como esenciales para una
moderna concepción del diagnóstico**

¿Cuál es el costo beneficio y la consolidación de estas técnicas para los fines clínicos = toma de decisiones?



Epoca de Grandes ilusiones (creencias y mitos).





7



El paciente suplica por curación.... (Mágica?)

El mé

El lab

“Ciencia y caridad”



“Doctor Gachet”.
Vincet Van Gogh

“Pasteur en su laboratorio”.
Albert Edelfelt, 1885.





“Antiguamente, cuando la religión era fuerte y la ciencia débil, la gente tomaba la magia por medicina; ahora, cuando la ciencia es fuerte y la religión débil, se toma la medicina por magia”.

Thomas Szasz

*Médico nacido en Budapest, Hungría en 1920.
Profesor emérito de la Univ. Siracusa en Nueva York*



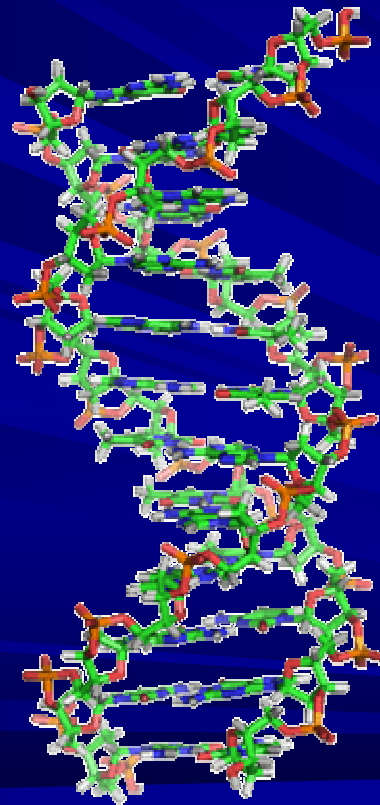
La “biología molecular” vino a instalarse presentándose como la gran magia del s XXI.

Llega como esperanza salvadora de incontables problemas que hasta el momento no tenían solución.

Problemas que abarcan prácticamente todos los aspectos de la vida del hombre desde la alimentación, la ecología y hasta el diagnóstico y la cura de enfermedades que han sido y siguen siendo flagelos mundiales.



Watson y Crick marcan el inicio de la llamada **Biología Molecular** con la presentación del modelo estructural del ADN. (1953).



Reacción en cadena de la polimerasa - PCR

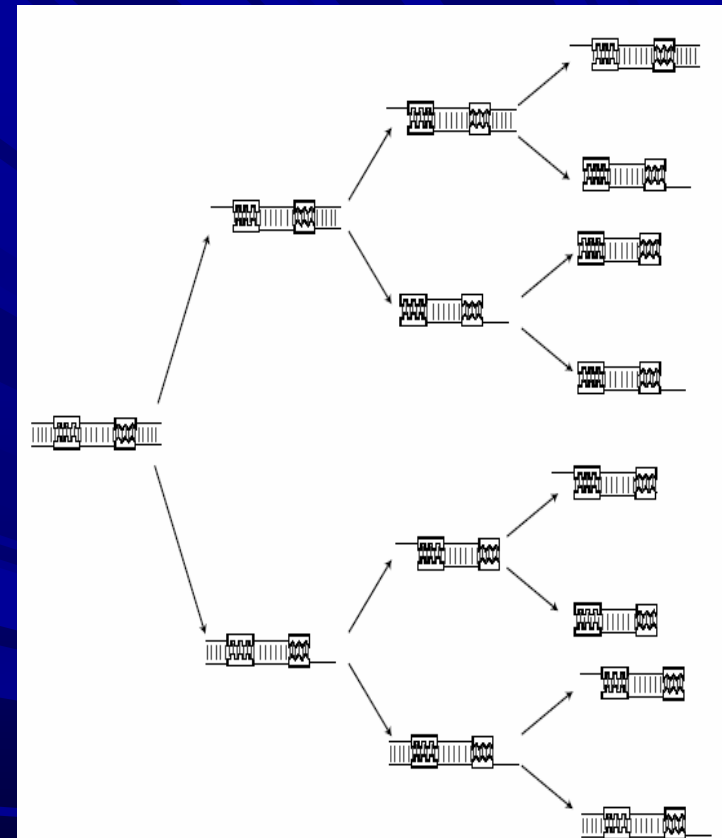
Durante las tres últimas décadas han surgido una serie de procedimientos de laboratorio que facilitan el análisis del ADN.

La PCR probablemente es la que ha tenido el mayor impacto en el avance reciente de la biología molecular



Reacción de la Polimerasa en cadena (PCR)

- **Problemas:** Los instrumentos modernos no pueden detectar fácilmente simples moléculas de DNA y como prerequisite se debe **amplificar** para análisis posteriores
- **Solución:** PCR duplica en forma exponencial el número de fragmentos de DNA en cada ciclo



1.000M copias
en 30 ciclos.



1... 2... 4... 8...

Amplificación
convencional

Amplificación
real time

MUESTRA

Extracción

Ac.
Nucleicos

Amplificación

PCR
Primers
(para la selección de la secuencia blanco).

PCR
Primers + Sondas
(marcadas para el reconocimiento)

DETECCION
(Sondas, electroforesis)



“Rapid-Cycle Real-Time PCR”

(PCR de ciclos rápidos en tiempo real)

Este revolucionario avance tecnológico que pudo cambiar potencialmente la manera en que nosotros podemos **detectar, identificar y cuantificar** los microorganismos patógenos en el laboratorio, extendiendo enormemente el rango de aplicaciones.

... características tan puntuales de los M.O. como los factores de virulencia, resistencia a los antimicrobianos, producción de toxinas, diferenciación de cepa vacunales de patógenos, etc.



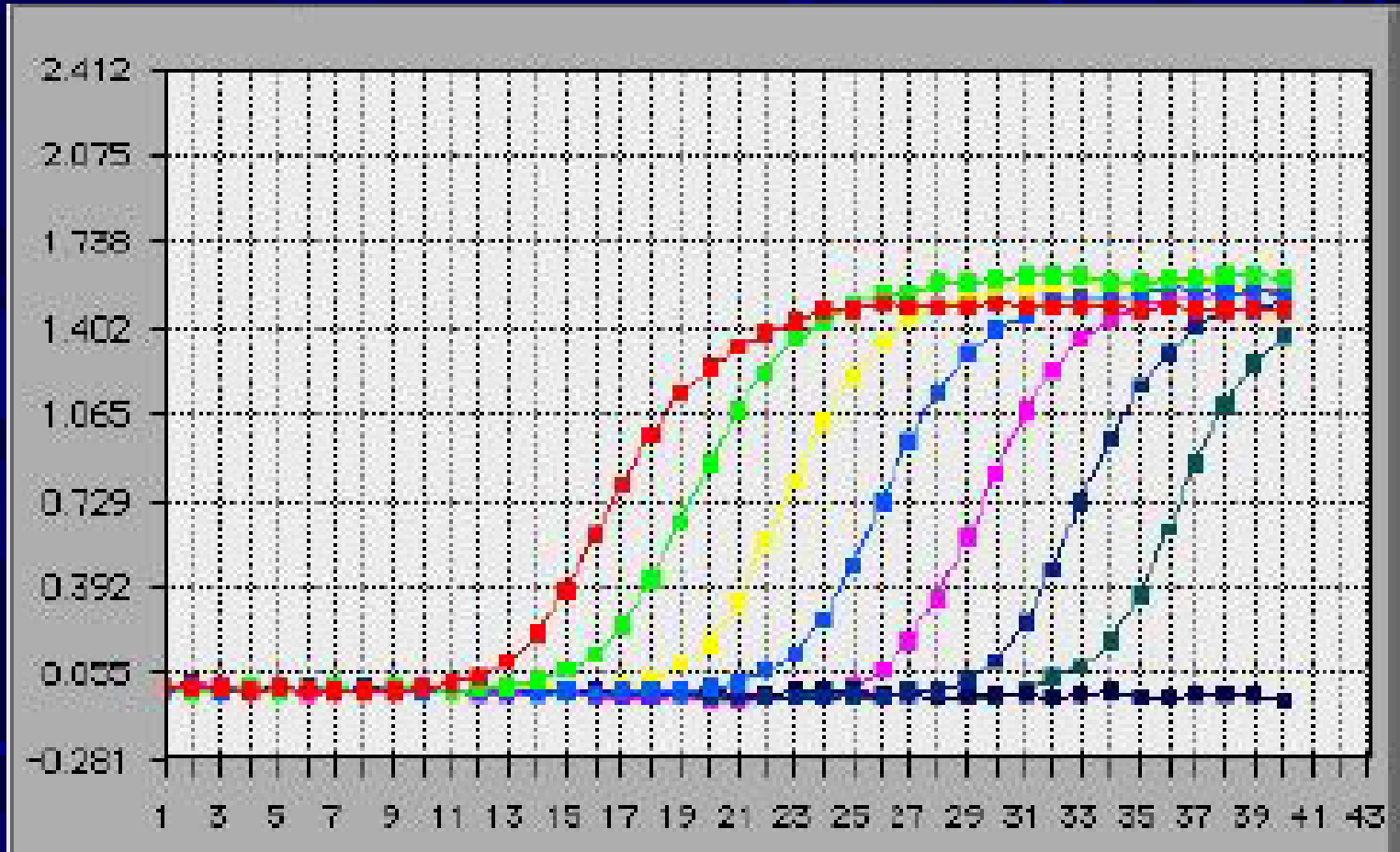


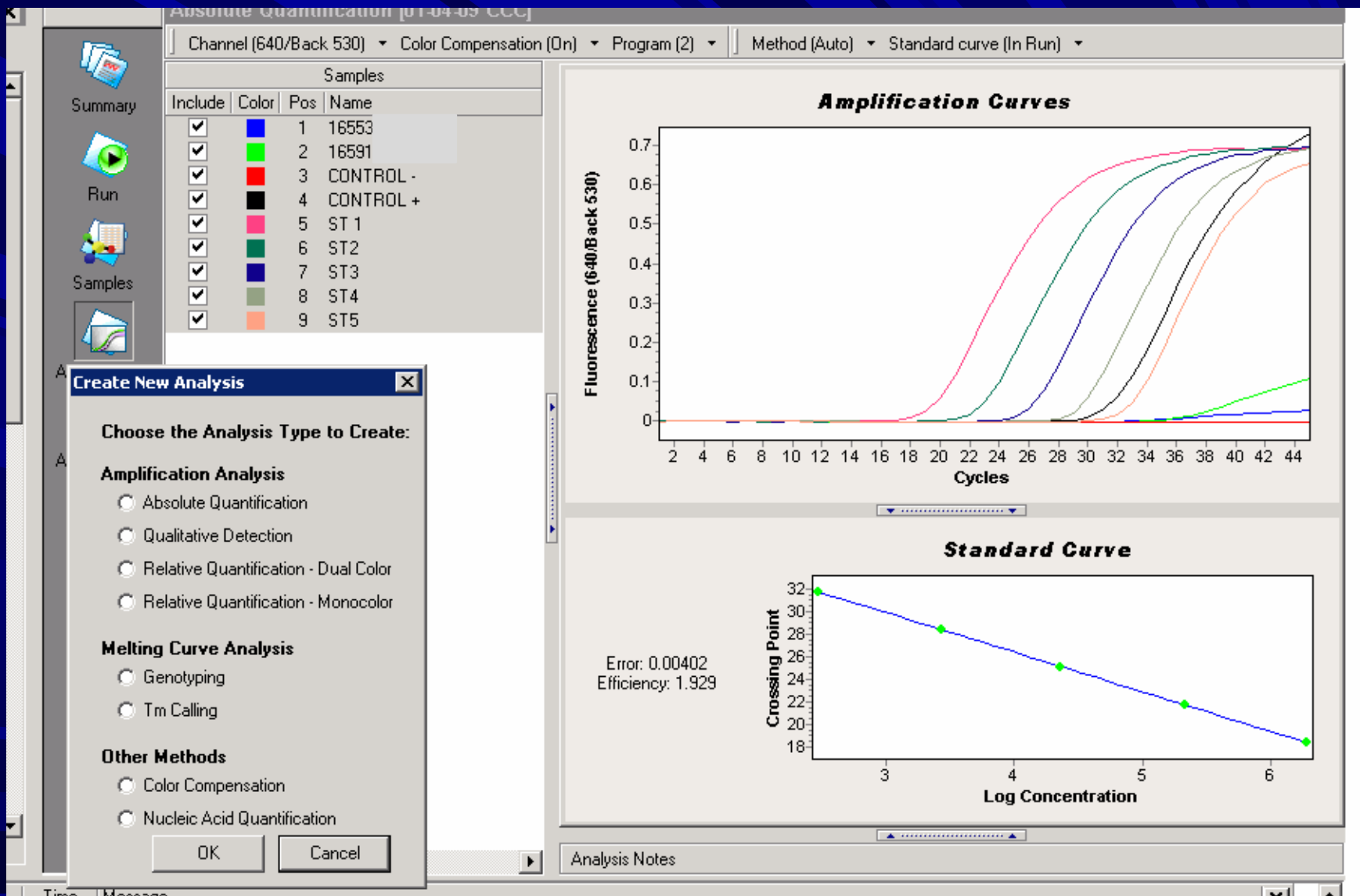
PCR en tiempo real es una reacción cinética

Donde la cantidad de fluorescencia
producida en la reacción es proporcional a
la cantidad de AND sintetizado.

Los procesos de amplificación y detección
se producen de manera simultánea dentro
del mismo vial cerrado (proceso que evita la
contaminación)







Aplicaciones de PCR en tiempo real en Diagnóstico

Microbiología

- a) Diagnóstico e identificación de patógenos
- b) Medición de cargas virales y bacterianas
- c) Identificación de resistencia a los antimicrobianos (aparición de cepas mutantes)
- d) Genotipificación

Oncología/Oncohematología

Genética Humana



Detection of Respiratory Viruses by Molecular Methods

James B. Mahony*

*Regional Virology Laboratory, St. Joseph's Healthcare Hamilton, and Department of Pathology and Molecular Medicine,
McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada*

CONTRIBUCIÓN DE LAS PRUEBAS MOLECULARES

Las pruebas moleculares han mejorado mucho la capacidad del laboratorio para el diagnóstico de las infecciones virales agudas del tracto respiratorio



Sin excepción, NAAT han demostrado ser más sensibles que las pruebas habituales.

Este aumento de la sensibilidad significa que los pacientes infectados se los diagnostica con más precisión y en forma más eficiente, especialmente en momentos en que, la infección cursa con bajos niveles de liberación viral.

(Las pruebas no moleculares fallan en estos casos)



Beneficios:

- El paciente recibe rápidamente el tratamiento adecuado, sea en término de usos de antivirales, aislamiento epidemiológico (dispersión nosocomial), NO USO de antibióticos, etc.
- Evita estudios complementarios.
- La información exacta posibilita, a las autoridades de salud, la toma de medidas sanitarias adecuadas.



El empleo de la multiplex NAAT (nucleic acid amplification test) ha incrementado el diagnóstico de los virus involucrados en las afecciones respiratorias en un 30 a 50%.

(Beer, K. D., J. L. Beebe, and H. F. Maguire. 2007. 107th Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. American Society for Microbiology, Washington, DC. /

Mahony, J., S. Chong, F. Merante, K. Luinstra, T. Sinha, A. Petrich, C. Lisle, S. Yaghoughian, and R. Janeczko. 2007. J. Clin. Microbiol. 45: 2965–2970.)



Sin lugar a dudas la efectividad de estos nuevos ensayos basados en tecnologías de amplificación de ácidos nucleicos proveen al clínico una importante y confiable información para la toma de decisiones en el manejo del paciente.



GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System

Genetic eXpression Profiler

**PLATAFORMA CON MULTIPLES
APLICACIONES**

**MICROBIOLOGIA (Detección de virus,
hongos, bacterias, aplicaciones especiales),
ENFERMEDADES HEREDITARIAS ,
ONCOLOGICAS, etc .**



GenomeLab™ GeXP - Genetic Analysis System

¿Qué es?

Es una plataforma **multiplex** que combina dos tecnologías,, **PCR** y **Electroforesis Capilar**, que sea realiza en **corto tiempo**, con **alta precisión** y sin **necesidad de enriquecer** la muestra.



GenomeLab™ GeXP - Genetic Analysis System



Resumen de Características y Beneficios

- **Multiplex: 2-40 genes en cada reacción**
- Ideal para validación por paneles normalmente de 5 -30 genes.
- Mínima cantidad de ARN – 5 ng a 50 ng total RNA por reacción



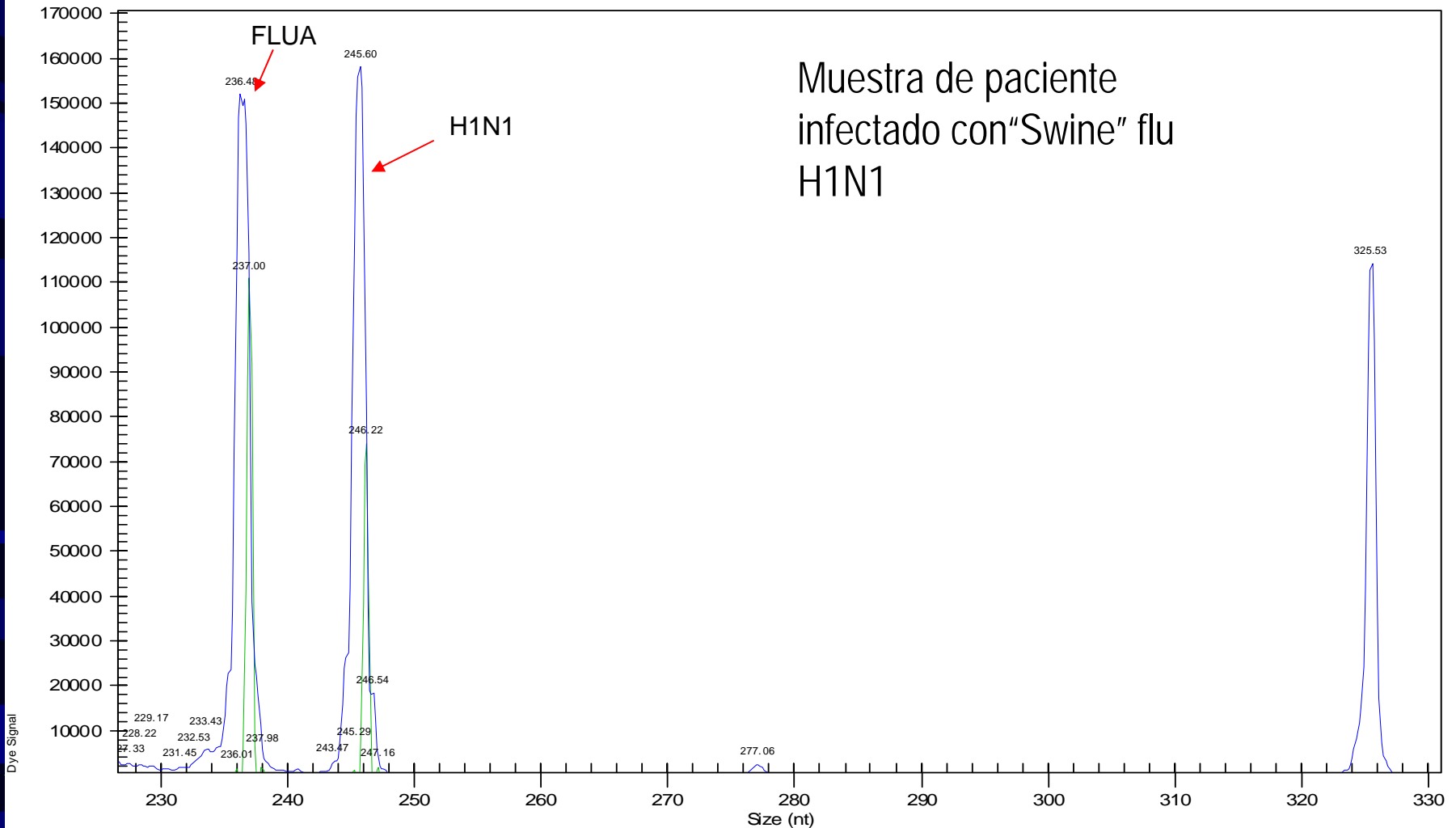
Panel de Virus Respiratorios Influenza A

- Influenza A
- H1N1
- HuH1N1
- A (H1N1) Swine Flu
- Human RNase P



Influenza A Viral Electroferograma

PKU H.F03_0906031502



BCI Respiratory Virus Panel

Target	Desinged size	Target Gene
HMPV	111	Human Metapneumovirus F gene
Human Rnase P_DNA	125	Homo sapiens ribonuclease P/MRP 30kDa subunit
InfA H2N2	129	Influenza A virus (H2N2) segment 4 hemagglutinin (HA) gene
Influenza A	134	Influenza A virus segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1)
HAdV	140	Human Adenovirus Hexon gene
HPIV-1	149	Human parainfluenza virus 1 haemagglutinin—neuraminidase (HN) gene
Influenza C	152	Influenza C virus M gene for M1 protein and CM2 protein
HRV	160	Human Rhinovirus 5' UTR
InfA N1_TS	167	Influenza A virus (H1N1) segment 6 neuroamidase (NA) gene
InfA N1_TR	170	
HCoV-NL63/229E	180	
Influenza B	204	Influenza B virus segment 7 matrix protein
HPIV-3	207	Human parainfluenza virus 3 haemagglutinin—neuraminidase (HN) gene
InfA H5N1	215	Influenza A virus (H5N1) segment 4 hemagglutinin (HA) gene
HPIV-2	223	Human parainfluenza virus 2 haemagglutinin—neuraminidase (HN) gene
SW H1N1	236	Influenza A virus (Mexico (H1N1)) segment 4 hemagglutinin (HA) gene
SARS-CoV	240	Severe acute respiratory syndrome coronavirus matrix (M) gene
HRSV	243	Human Respiratory syncytial virus Fusion (F) gene
Seasonal H1N1	250	Influenza A virus (Seasonal (H1N1)) segment 4 hemagglutinin (HA) gene
InfA H1N1 (Gen)	257	Influenza A virus (H1N1) segment 4 hemagglutinin (HA) gene
InfA H3N2	274	Influenza A virus (H3N2) segment 4 hemagglutinin (HA) gene
HPIV-4	277	Human parainfluenza virus 4 P gene
HCoV-HKU1/OC43	287	Human Coronavirus HKU1/OC43 gene 1b (RNA dependent RNA polymerase)
Human B2M_RNA	307	Homo sapiens beta-2-microglobulin mRNA



Molecular Methods for Diagnosis of Viral Encephalitis

Roberta L. DeBiasi^{1,2,3*} and Kenneth L. Tyler^{2,3,4}

Department of Pediatrics, Division of Infectious Diseases,¹ Department of Neurology,² and Department of Medicine, Microbiology and Immunology,⁴ University of Colorado Health Sciences Center, and Denver Veterans Administration Medical Center,³ Denver, Colorado

INTRODUCTION	904
DISTINGUISHING ENCEPHALITIS FROM ENCEPHALOPATHY AND POSTINFECTIOUS ENCEPHALITIS	904
Encephalitis versus Encephalopathy	904
Encephalitis versus Postinfectious Encephalomyelitis	904
GENERAL PRINCIPLES OF MOLECULAR DIAGNOSTIC METHODS AS APPLIED TO THE DIAGNOSIS OF CNS INFECTION	905
CSF PCR	905
General comments	905

Las técnicas de amplificación génica han revolucionado el campo del diagnóstico de las infecciones del SNC.



Alrededor de 100 virus conocidos producen encefalitis aguda en el ser humano..

Prácticamente todas las infecciones agudas del SNC producen algún grado de inflamación de las meninges y del parénquima

Los hallazgos clínicos y de laboratorio básicos son muy similares, independientemente del agente etiológico



Estudio físico – químico.

El LCR es anormal en más del 90% de los casos:

Pleocitosis linfocítica

Proteínas elevadas

Glucosa normal

Excepciones:

Ciertas patologías del CMV (Radiculomielitis) y WNV (meningoencefalitis) se presentan con predominio de polimorfonucleares (pistas diagnósticas)



Pero ¿Cuál es el agente etiológico?

Diagnóstico fundamental, ...sobre todo en aquellos casos en el que el tratamiento inmediato define la posibilidad de impedir la evolución hacia una situación irreversible (Ej HSV)

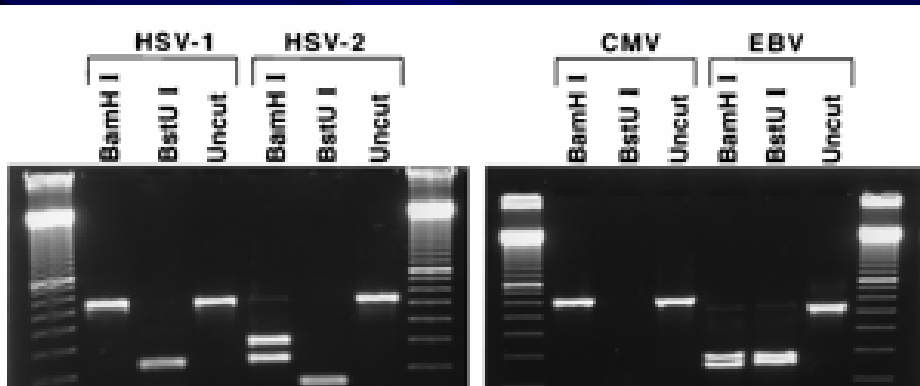


El costo beneficio de estas técnicas es indiscutible en las afecciones del SNC, donde su aplicación sobre muestras de LCR ha resuelto una seria problemática diagnóstica.



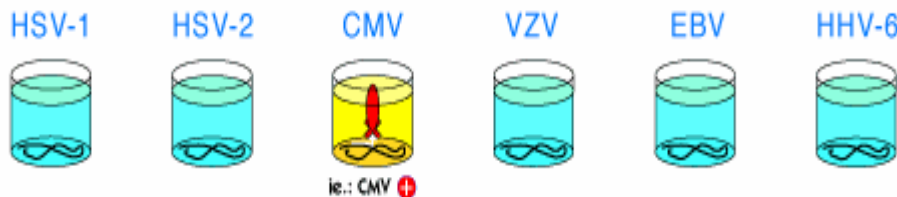
Detección e identificación de herpesvirus humanos

Amplificación (PCR) + Digestión con enzimas de restricción + electroforesis en gel de agarosa al 1.5%



PRINCIPLE

DENATURATION → COATING → HYBRIDIZATION → DETECTION → REVELATION



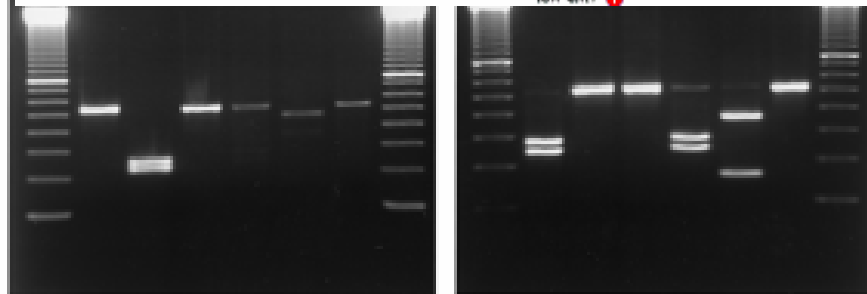
...ad de la PCR:

...0 copias

...EBV, VZV = 10-

S

...1-10 copias



D

E

Johnson y col; J Clin Microbiol 38:3274-9 (2000)



¿Cómo en esta era del diagnóstico molecular se puede determinar la relación causal entre la presencia del genoma de un agente infeccioso y ENFERMEDAD?

Hay casos perfectamente definidos como:

H1N1, SARS (Síndrome agudo respiratorio severo)

Pero... ¿Qué pasa cuando el agente es totalmente nuevo o por lo menos desconocido?





The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

ORIGINAL ARTICLE

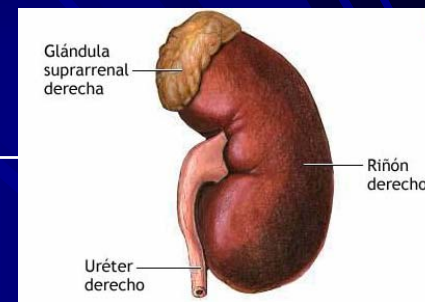
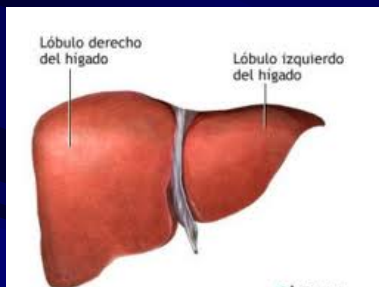
A New Arenavirus in a Cluster of Fatal Transplant-Associated Diseases

Gustavo Palacios, Ph.D., Julian Druce, Ph.D., Lei Du, Ph.D., Thomas Tran, Ph.D., Chris Birch, Ph.D., Thomas Briese, Ph.D., Sean Conlan, Ph.D., Phenix-Lan Quan, Ph.D., Jeffrey Hui, B.Sc., John Marshall, Ph.D., Jan Fredrik Simons, Ph.D., Michael Egholm, Ph.D., Christopher D. Paddock, M.D., M.P.H.T.M., Wun-Ju Shieh, M.D., Ph.D., M.P.H., Cynthia S. Goldsmith, M.G.S., Sherif R. Zaki, M.D., Ph.D., Mike Catton, M.D., and W. Ian Lipkin, M.D.

N Engl J Med 2008; 358:991-998 | March 6, 2008

Three patients who received visceral-organ transplants from a single donor on the same day died of a febrile illness 4 to 6 weeks after transplantation. Culture, polymerase-chain-reaction (PCR) and serologic assays, and oligonucleotide microarray analysis for a wide range of infectious agents were not informative.





SECUENCIAS TOTALES

SECUENCIAS HUMANAS

SECUENCIAS RESIDUALES

¿?



*High-throughput sequencing yielded 103,632 sequences, of which 14 represented an Old World arenavirus. Additional sequence analysis showed that this **new arenavirus** was related to lymphocytic choriomeningitis viruses.*

Specific PCR assays based on a unique sequence confirmed the presence of the virus in the kidneys, liver, blood, and cerebrospinal fluid of the recipients.

Immunohistochemical analysis revealed arenavirus antigen in the liver and kidney transplants in the recipients.

IgM and IgG antiviral antibodies were detected in the serum of the donor. Seroconversion was evident in serum specimens obtained from one recipient at two time points.



The Era of Molecular and Other Non-Culture-Based Methods in Diagnosis of Sepsis

Nicasio Mancini,* Silvia Carletti, Nadia Ghidoli, Paola Cichero, Roberto Burioni, and Massimo Clementi

Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Università "Vita-Salute" San Raffaele, Diagnostica e Ricerca San Raffaele, Milano, Italia



CONCLUDING REMARKS

El número de personas que fallecen de sepsis prácticamente se ha duplicado durante los últimos 20 años , “nuevos huéspedes” tienen elevado riesgo de desarrollar sepsis.

En este contexto, un diagnóstico microbiológico rápido es especialmente importante para el correcto manejo de los pacientes.

(Por ej para el ajuste fino de la terapia empírica)



Detección rápida y sensible de un amplio panel de patógenos bacterianos y fúngicos,
incluso directamente en muestras de sangre.

Sin embargo, estas técnicas todavía no pueden considerarse como sustitutos de los métodos del cultivo clásico,



¿Problemas?

La mayoría de los métodos no proveen información sobre la sensibilidad a los antimicrobinos. (una identificación temprana podría orientar una terapia empírica pero necesitaría después el ajuste fino)

Las técnicas que trabajan directamente desde la sangre del paciente se enfrentan con la problemática de definir si los ácidos nucleicos circulantes que pueden identificarse se pueden relacionar directamente con el diagnóstico de sepsis. (DNAhemia)



Conclusiones:

Sin duda el empleo de técnicas moleculares para el estudio de sepsis abre una nueva era en el laboratorio de diagnóstico microbiológico.

Sin embargo ese potencial de mejora requiere una mayor validación clínica y un crítico estudio de costo-beneficio.



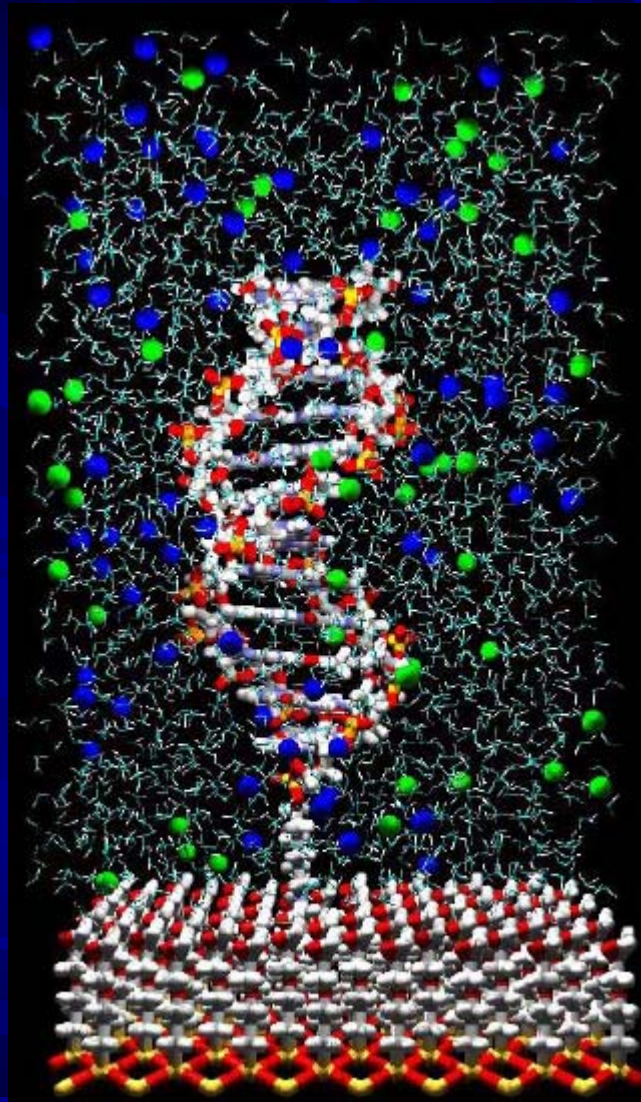
Tecnología basada en genómica y proteómica. (Microarrays)

Nanotecnología

Microchips

Oligonucleótidos sintetizados “in situ” sobre una matriz usando tecnologías de fotolitografía o síntesis química de ácidos nucleicos.





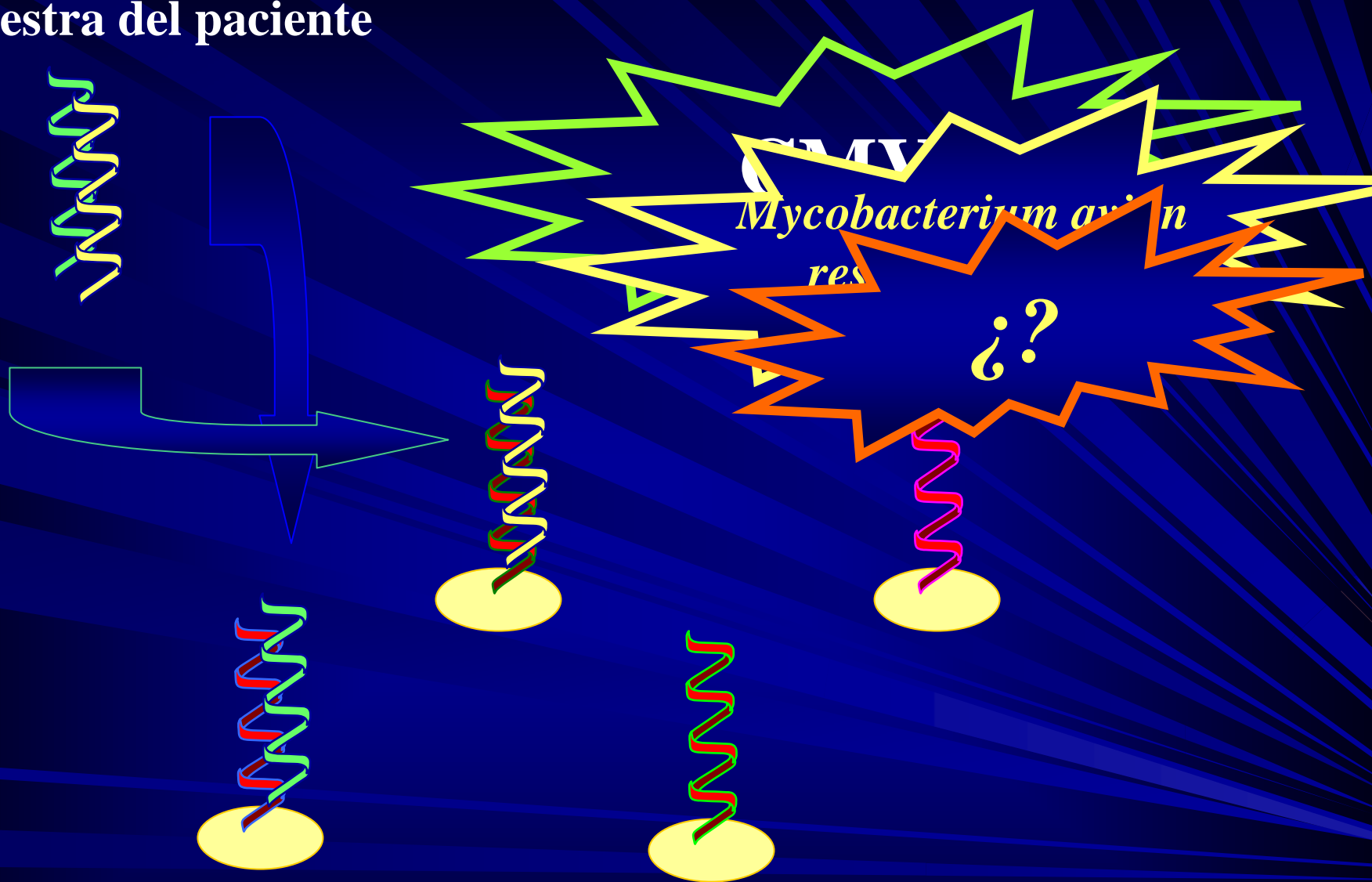
Algunas tendencias en desarrollo pretenden eliminar el paso de extracción y amplificación de la muestra e integrar todas las operaciones en un solo dispositivo.

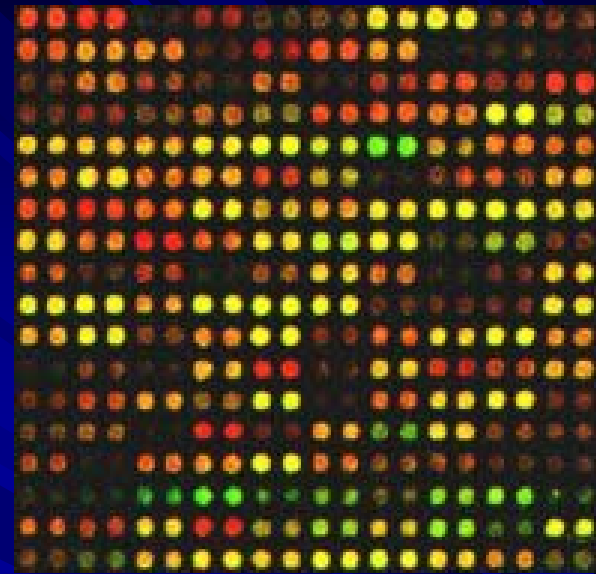
LOAC (Lab_on_a_Chip)





Muestra del paciente





Aplicaciones de los microarrays / biochips

- Monitoreo de expresión génica
- Diagnóstico molecular y prognosis de enfermedades
- Detección directa de agentes infecciosos
- Farmacogenómica (farmacocinética y biodisponibilidad)

MEDICINA PERSONALIZADA



EDITORIAL

December 27, 2007

Hoffman E.P.

N Engl J Med 2007; 357:2719 - 2722

Skippin Toward Personalized Molecular Medicine

La “MEDICINA PERSONALIZADA” está a la vuelta de la esquina...





Tricorder
Dr. McCoy

Viaje a las
estrellas





The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

ORIGINAL ARTICLE

Local Dystrophin Restoration with Antisense Oligonucleotide PRO051

Judith C. van Deutekom, Ph.D., Anneke A. Janson, B.S., Ieke B. Ginjaar, Ph.D., Wendy S. Frankhuizen, B.S., Annemieke Aartsma-Rus, Ph.D., Mattie Bremmer-Bout, B.S., Johan T. den Dunnen, Ph.D., Klaas Koop, M.D., Anneke J. van der Kooij, M.D., Ph.D., Nathalie M. Goemans, M.D., Ph.D., Sijf J. de Kimpe, Ph.D., Peter F. Ekhart, M.Sc., Edna H. Venneker, M.D., Gerard J. Platenburg, M.Sc., Jan J. Verschuuren, M.D., Ph.D., and Gert-Jan B. van Ommen, Ph.D.

N Engl J Med 2007; 357:2677-2686 | December 27, 2007

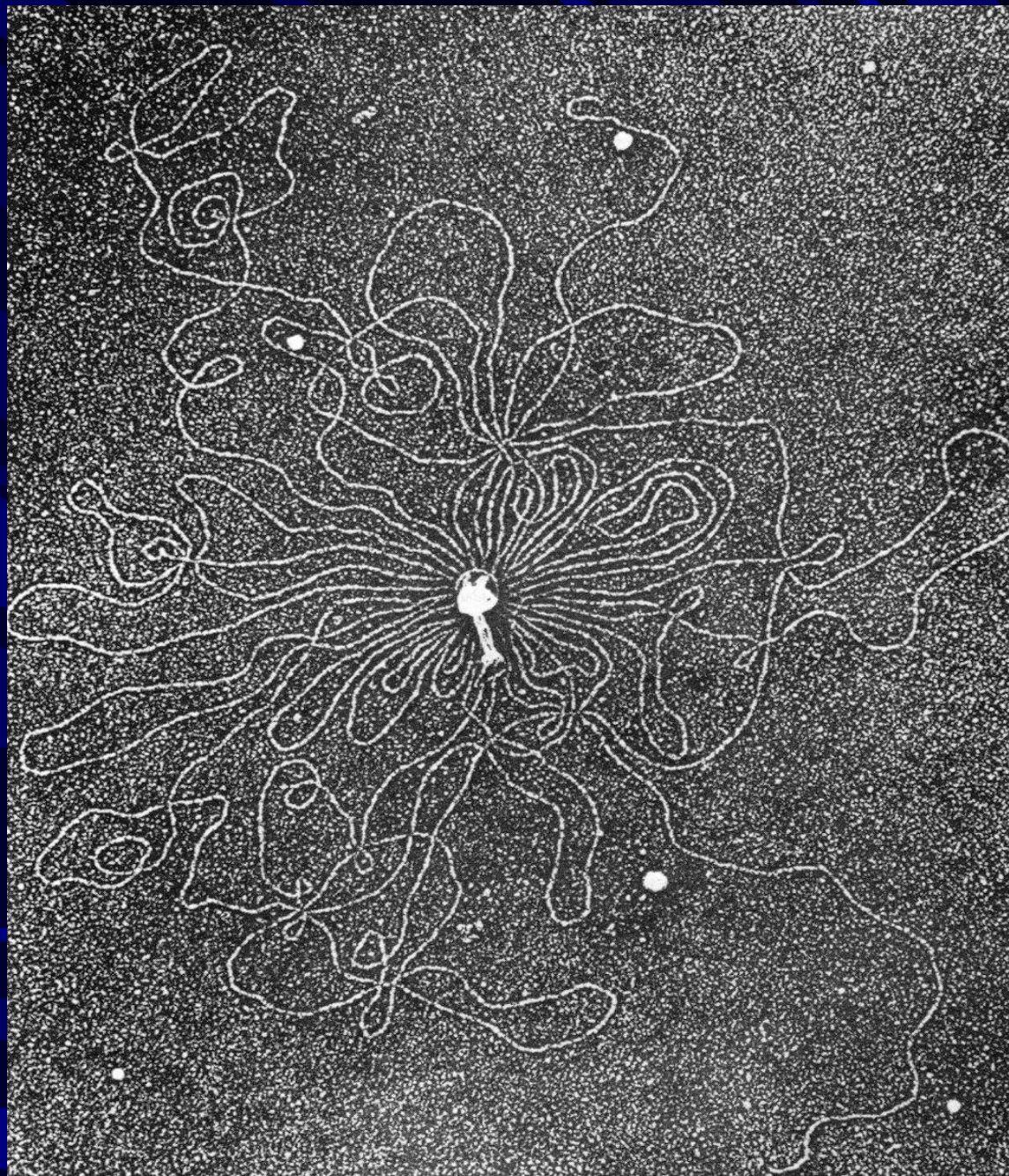
Distrofia muscular de Duchenne

Deutekom y sus colaboradores diseñaron un oligonucleótido antisense que, en principio, podría permitir específicamente a la maquinaria celular a “saltar” la lectura del exón mutado bloqueando su inclusión durante el “splicing” y logrando la restauración de la producción distrofina en los músculos donde se inyectó el producto (PRO051)



Enfasador bosónico





**Molécula de ADN del
bacteriófago T2.
100.000x**



Mitos o creencias:

- Rapidez
- Interpretación.
- Comparación de datos
- Costos.



Mitos o creencias:

- **Rapidez**
- Interpretación.
- Comparación de datos
- Costos.



Table 1. Instrumentation currently available for real-time PCR

Instrument name	Manufacturer	Automated extraction	Thermal cycling format	Turnaround ^b	Data observation	Reaction capacity
GeneAmp [®] 5700 and Prism [®] 7700	Applied Biosystems	Yes	Conventional ^c	~2 hours	Endpoint	96/run
iCycler iQ [™]	BioRad	No	Conventional ^c	~2 hours	Each PCR cycle	96-384/run
LightCycler [™]	Roche	Yes (MAGNA Pure LC)	Ambient air cooling	~20 min-1 hour	Each PCR cycle	32/run
SmartCycler [®]	Cepheid	No	Ceramic heating plate	~40 min-1 hour	Each PCR cycle	16-96/run with random access
MX4000 [™]	Stratagene	No	Conventional ^c	~90 minutes	Each PCR cycle	96/run
Rotor Gene	Corbett Research	No	Ambient air cooling	~50 minutes	Each PCR cycle	32/run

^aTheoretically, TaqMan[®], FRET, or Molecular Beacons fluorophore probes could be used with each system. For the MX4000[™], Stratagene recommends Molecular Beacons, probes, and for the GeneAmp[®] 5700 and Prism[®] 7700, Applied Biosystems recommends TaqMan[®] probes.

^bRefers to analytical turnaround time; does not include specimen preparation, i.e., lysis of organisms and isolation and purification of nucleic acid.

^c"Conventional" refers to heating block thermal cycler.

^dFRET, fluorescence resonance energy transfer.

TABLE 8. Comparison of LightCycler assays to culture-based assays for selected pathogens^a

Organism (reference)	Sensitivity increase for LightCycler (%)	Analytical turnaround time	
		LightCycler ^b (min)	Culture-based assay (days)
Group A streptococci (13)	7	30	1–2
<i>Legionella</i> spp. (5) (BAL ^c)	0 ^d	45	2–14
<i>Bordetella pertussis</i> (6)	219	50	3–7
Vancomycin-resistant enterococci (fecal surveillance samples) (451)	120 ^e	45	2–3
Varicella-zoster virus (skin) (117)	91	45	2–5
Herpes simplex virus (skin, genital) (115)	23	45	1–5
Cytomegalovirus (urine)	88 ^e	45	≤1

COLAPSO

RAPIDEZ implica mayor cantidad de personal especializado, disponibilidad de equipamiento costoso, mayor gasto de reactivos.....

COSTOS.

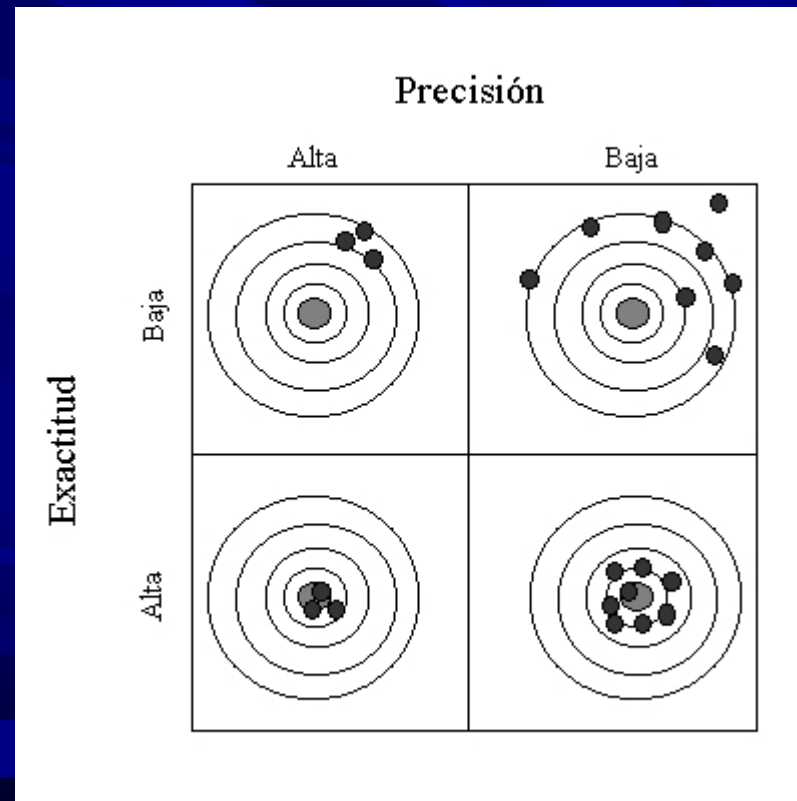


Mitos o creencias:

- Rapidez
- **Interpretación.**
- Comparación de datos
- Costos.



Cuando las técnicas son de alta sensibilidad y especificidad se requiere un **programa de aseguramiento de la calidad** cuyo objetivo es lograr la máxima capacidad de producir resultados exactos y precisos



programa de aseguramiento de la calidad
Por cada corrida de muestras (sea 1 o batch completo) se requiere:

Control positivo
Control negativo
Blanco

Control de extracción
Control de inhibición



Mitos o creencias:

- Rapidez
- Interpretación.
- **Comparación de datos**
- Costos.



**¿Son comparables los resultados
de un laboratorio a otro?**



TABLE 4. Verification guidelines

Verification	FDA cleared	Modified-FDA, ASR, laboratory developed
Accuracy	20 positive samples, 50 negative samples	50 positive samples, 100 negative samples
Precision, qualitative	1 control/day for 20 days or duplicate controls for 10 days	Same as FDA-approved assay
Precision, quantitative	20 data points at 2 to 3 concentrations. Within run, within day, day-to-day	Same as FDA-approved assay
Analytical sensitivity		Analyze 15–20 low or no concentration specimens
Analytical specificity		Evaluate all interfering compounds (i.e., same chemical or genetic structure, same source)
Reportable range, quantitative	3–5 concentrations measured in triplicate	3–5 concentrations measured in triplicate
Normal values	Minimum of 20 per category, 100 recommended	Minimum of 20 per category, 100 recommended

^a C.V., coefficient of variation.

ASR: analyte specific reagents





Advancing Excellence

Accredited
Laboratory



The College of American Pathologists

certifies that the laboratory named below

***Hospital Italiano
Laboratorio Central
Buenos Aires, CF, Argentina
Jose M. Oyhamburu, BioChem***

LAP Number: 5061101

AU-ID: 1190774

*has met all applicable standards for accreditation and
is hereby fully accredited by the College of American Pathologists'
Laboratory Accreditation Program. Reinspection should occur prior
to October 15, 2012 to maintain accreditation.*

Accreditation does not automatically survive a change in director, ownership,
or location and assumes that all interim requirements are met.

Frank R Rudy

Chair, Commission on Laboratory Accreditation

Stephen H Baum MD FCAP

President, College of American Pathologists



Mitos o creencias:

- Rapidez
- Interpretación.
- Comparación de datos
- **Costos.**



El costo de las técnicas moleculares es mayor que el de las técnicas convencionales.

... pero esta diferencia debe evaluarse contra el desenlace de la patología del paciente (*outcome*) del paciente (en términos de menor morbilidad/mortalidad), en el ahorro de hotelería debido al TAT de los resultados y a la alta sensibilidad/especificidad diagnóstica; en la reducción de estudios auxiliares; en el ahorro en la sobreprescripción de medicación.

En síntesis, el ahorro está fuera del laboratorio.



TABLE 7. Reimbursement

Technique	Organism	Medicare reimbursement (U.S. dollars)	2005 Mayo Clinic list price (U.S. dollars)
Amplified probe	CMV	27-49	228
	EBV	27-49	228
	HSV	27-49	228
	VZV	27-49	228
	Enterovirus	27-49	228
	JC and BK virus	27-49	228
	Group A streptococci	27-49	NA ^a
	<i>Bordetella pertussis/Bordetella parapertussis</i>	55-98	271
	<i>Borrelia burgdorferi</i>	27-49	320
	VRE	27-49	271
	<i>Tropheryma whipplei</i>	27-49	321
	<i>Ehrlichia</i> spp.	27-49	222
Quantification	CMV	39-59	307
	EBV	27-59	221

^a NA, not available through the Mayo Clinic reference laboratory.

Debemos asumir que el trabajo en equipo y la comunicación exigen ocupar un lugar preponderante en el laboratorio diagnóstico actual (futuro) para lograr que los resultados sean significativos y racionales.



“Nuestros pacientes no necesitan magia. Nuestros pacientes necesitan de parte del médico **conocimiento, compromiso y dedicación**, porque la relación entre un médico y su paciente es tan simple y tan profunda como un diálogo entre dos seres humanos”.

Dr. Eduardo San Román



Es necesario conocer y entender profundamente las posibilidades de los últimos avances tecnológicos, bajo la luz de la experiencia profesional y del sentido común.





LO IMPORTANTE



No hay técnicas ni reactivos infalibles (mágicos)

Todo gira alrededor del criterio y la capacidad profesional con la que se las utiliza e interpreta sus resultados





**MUCHAS GRACIAS
POR SU ATENCION**

miguel.decrstofano@hospitalitaliano.org.ar



Hospital Italiano - Laboratorio Central

Grupo Bioquímico S.A.

