

Biología Molecular en el Diagnóstico de Enfermedades Infecciosas

*Bq. Ivonne Vergara P.
Laboratorio Biología Molecular
Clínica Las Condes*

Clasificación molecular de las enfermedades humanas

Exógenas: intoxicaciones, infecciones, parasitosis, debidas a priones, nutricionales, etc.

Genéticas
(en general)

según tipo de célula

{
Germinales
Somáticas (cáncer)

según
tipo de
alteración

{
Génicas

{
Mutaciones puntuales:

**Enfermedades
monogénicas**

{
En regiones estructurales del gen

{
En regiones reguladoras del gen:
alteración de la expresión

{
Mutación mediana

{
Cromosómicas o citogenéticas

{
Numéricas (mutaciones genómicas)

{
Estructurales (cromosomopatías)

según tipo de cromosoma

{
Nucleares

{
Autosómicas

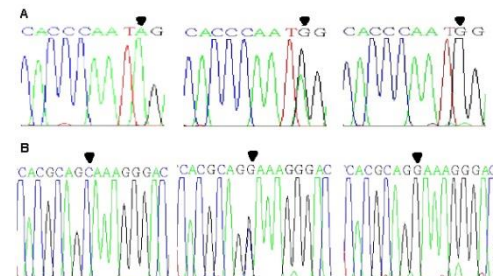
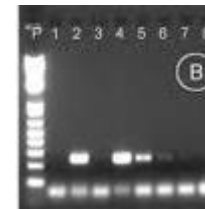
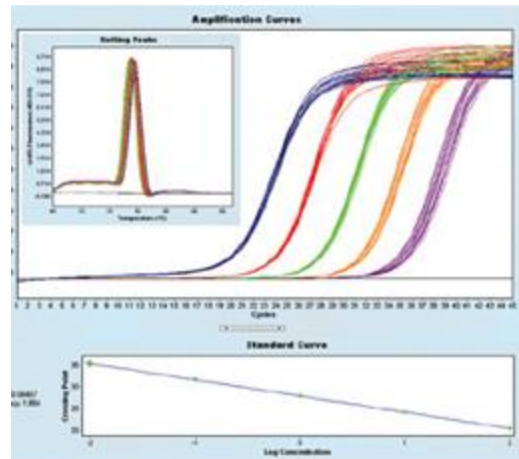
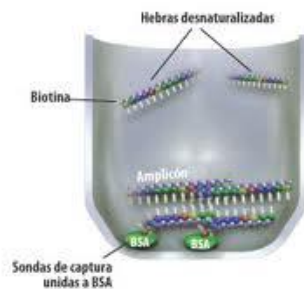
{
Ligadas al sexo

{
Mitocondriales

Mixtas o multifactoriales: en parte exógenas y en parte genéticas

Existen diversas técnicas de Biología Molecular para diagnóstico

- Southern, Northern y Slot Blots
- FISH
- Genómica
- Captura de Híbridos
- PCR y sus variantes (RT-PCR, PCR tiempo real, PCR-RFLP, PCR Nested, PCR Multiplex)
- NASBA
- Secuenciación



Diagnóstico clínico

- Detección temprana de patógenos Bacterianos, protozoarios u hongos.
- Detección /Cuantificación / Genotipificación de patógenos Virales (carga viral, carga pro-viral).
- Monitoreo, elección y evaluación de terapia (enfermedad residual - recaída).
- Detección de cepas resistentes a antibióticos.
- Detección de mutaciones puntuales.
- Detección de marcadores tumorales.
- Polimorfismo genético.
- Filiación.
- Medicina Forense.

Aplicación en enfermedades de origen infeccioso

- Detectar el genoma de los agentes patógenos a través de secuencias que difieren de las secuencias del Genoma Humano (epidemiología de brotes de infección y patógenos emergentes).
- Permite detectar cantidades mínimas del patógeno en muestras biológicas.
- Diagnóstico de infecciones debidas a microorganismos de lento crecimiento.
- Detección de agentes infecciosos que no pueden ser cultivados (virus).
- Rápida identificación de resistencias a antibióticos.
- Identificación de genes de virulencia o de resistencia a drogas.
- Genotipificación de cepas o subespecies.

TABLA 1. Algunos ejemplos de la detección de microorganismos en muestras clínicas por PCR aparecidas en la revista *Journal of Clinical Microbiology* (1989-1990)

Agente infeccioso	Año y mes publicación	Volumen y páginas
<i>Leptospira</i>	1989 octubre	27:2258-62
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1989 noviembre	27:2492-6
<i>Rickettsia rickettsii</i>	1989 diciembre	27:2866-8
Parvovirus	1989 diciembre	27:2647-51
Papillomavirus	1989 diciembre	27:2660-5
VIH	1990 enero	28:16-9
Rotavirus	1990 febrero	28:276-82
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1990 marzo	28:513-8
<i>Borrelia burgdorferi</i>	1990 marzo	28:566-72
Herpesvirus 6 humano	1990 mayo	28:970-4
<i>Chlamydia trachomatis</i>	1990 junio	28:1254-60

PCR: reacción en cadena de la polimerasa; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

Entéricas

SNC

Ginecológicas

Paciente

Inmuno
comprometidos

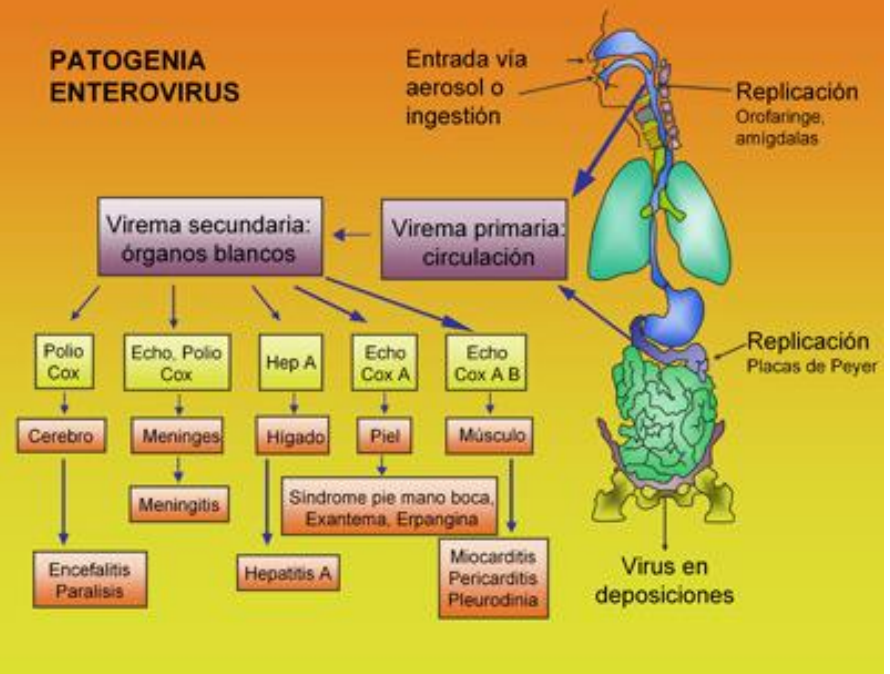
Respiratorias

Meningitis, encefalitis y meningoencefalitis virales

Herpes Simplex Virus 1 (HSV1)
Herpes Simplex Virus 2 (HSV2)
Varicella Zoster Virus (VZV)
Epstein-Barr Virus (EBV)
Cytomegalovirus (CMV)
Human Herpes Virus 6 (HHV6)
Human Herpes Virus 7 (HHV7)
Human Herpes Virus 8 (HHV8)
Enterovirus (Coxsackievirus, Poliovirus y Enterovirus)



Diseminación hematogena



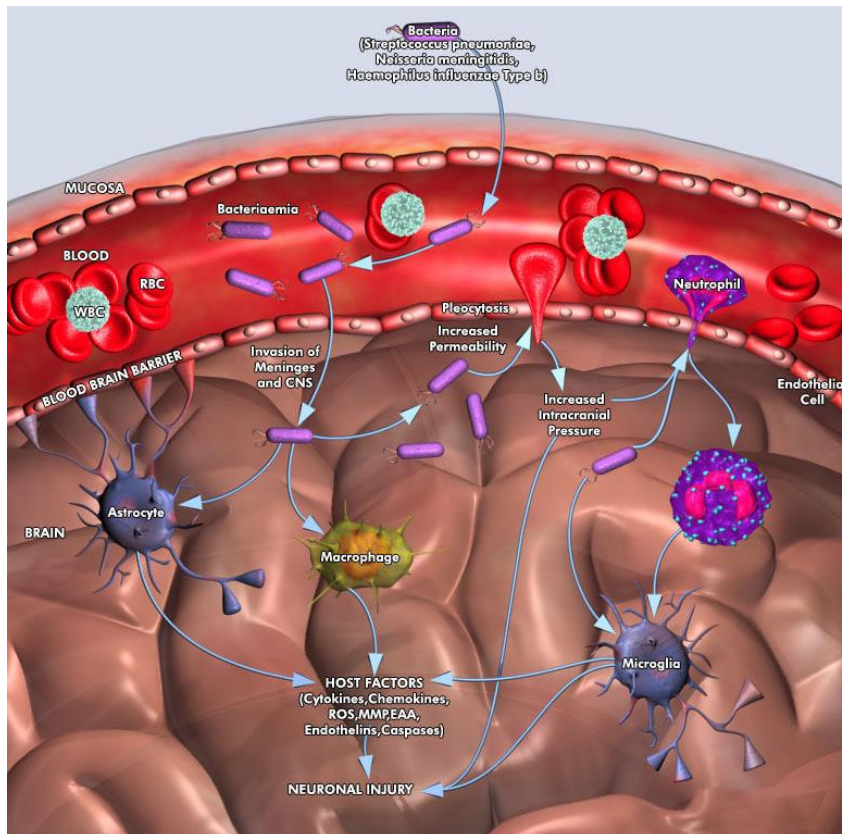
Meningitis bacterianas agudas

Neisseria meningitidis

Streptococcus pneumoniae

Haemophilus influenzae tipo b

Listeria monocitogenes



Meningitis neonatal

Streptococcus agalactiae

Escherichia coli K1

Listeria monocitogenes



Virus herpes
VIH
Carga viral CMV
Carga viral EBV
HTLV I y II

Cryptococcus neoformans
Pneumocystis jiroveci

Oncológicos
VIH positivos
Inmunodeficiencias
hereditarias

Mycobacterium tuberculosis
Mycobacterium Atípicos
Treponema pallidum

Toxoplasma gondii

Detección de Virus Respiratorios

VIRUS
DETECTADOS _

Adenovirus	Bocavirus
Metapneumovirus A	Coronavirus 229E
Metapneumovirus B	Enterovirus
Parainfluenza 1	Influenza A, subtipando: H1N1 Estacional H3N2 Estacional Nueva H1N1
Parainfluenza 2	
Parainfluenza 3	
Parainfluenza 4, subtipando: Parainfluenza 4 A Parainfluenza 4 B	
Rhinovirus	
RSV A	Influenza B
RSV B	Influenza C



Mycobacterium tuberculosis
Pneumocystis jiroveci
Chlamydophila trachomatis
Ureaplasma sp.
Mycoplasma hominis

Bacterias

Mycoplasma pneumoniae
Chlamydophila pneumoniae
Legionella pneumophila
Bordetella pertussis/parapertussis
Streptococcus pneumoniae
Haemophilus influenzae



Chlamydophila trachomatis
Mycoplasma hominis
Ureaplasma sp.
Neisseria gonorrhoeae
Trichomonas vaginalis
 Virus HSV I y II
Treponema pallidum
 Virus Papiloma humano
Streptococcus grupo b

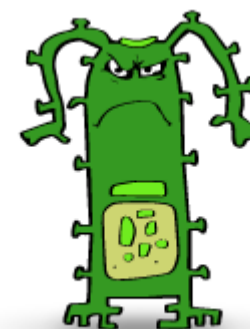
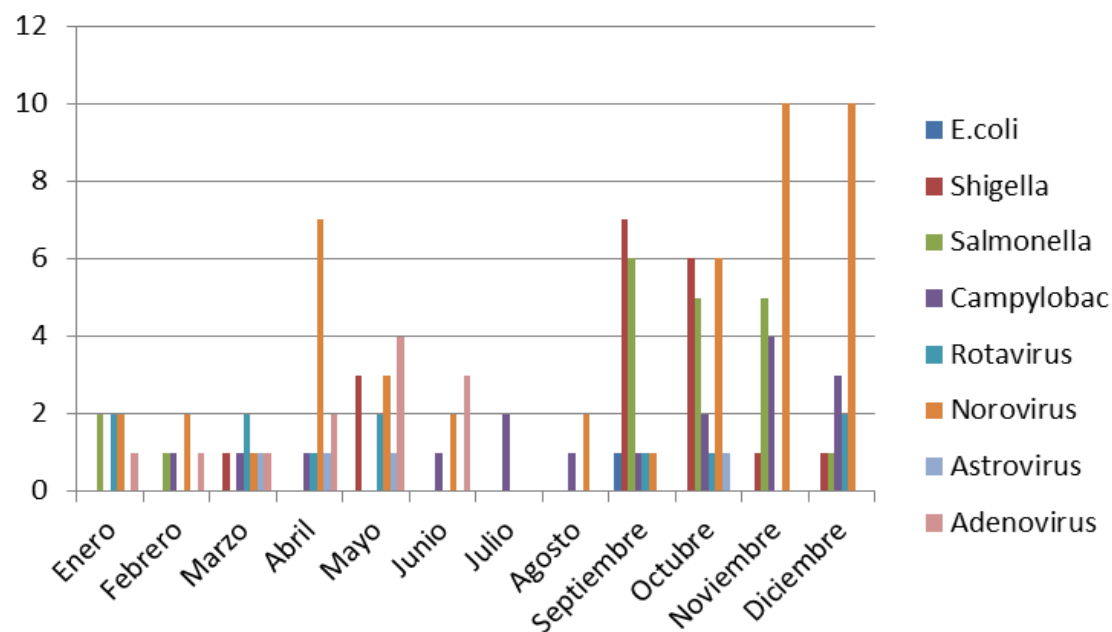
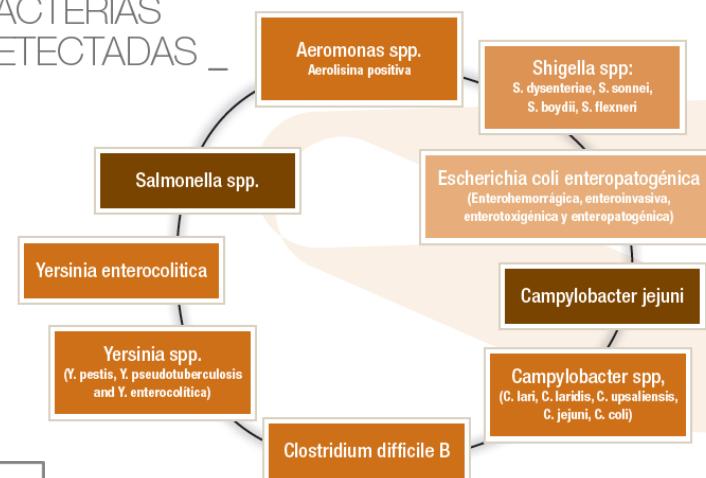
Tabla 1. Síndromes de ITS comunes, sus patologías y sus agentes etiológicos

Síndrome clínico	Patologías asociadas	Principal agente etiológico
Descarga uretral	Uretritis Epididimitis	• <i>Neisseria gonorrhoeae</i> • <i>Chlamydophila trachomatis</i> • <i>Mycoplasma genitalium</i> • <i>Ureaplasma urealyticum</i> • Otros
Descarga vaginal	Cervicitis mucopurulenta Vulvovaginitis Vaginosis bacteriana (VB)	• <i>Neisseria gonorrhoeae</i> • <i>Chlamydophila trachomatis</i> • <i>Candida albicans</i> • <i>Trichomonas vaginalis</i> • Bacterias asociadas a la VB • Otros
Dolor abdominal bajo	Enfermedad pélvica inflamatoria aguda	• <i>Neisseria gonorrhoeae</i> • <i>Chlamydophila trachomatis</i> • Otros
Lesiones ulcerativas genitales	Herpes Sífilis Chancroide Linfogranuloma venéreo	• Virus herpes simplex tipo 1 y 2 (VHS-1, VHS-2) • <i>Treponema pallidum</i> • <i>Haemophilus ducreyi</i> • <i>Chlamydophila trachomatis</i> L1, L2 y L3
Lesiones vegetantes genitales	Condiloma acuminado Condiloma plano sífilítico Molusco contagioso	• Virus papiloma humano (VPH) • <i>Treponema pallidum</i> • Poxvirus

Virus
Adenovirus
Rotavirus
Norovirus
Enterovirus
Astrovirus

Detección de Bacterias causantes de Diarrea Infecciosa

BACTERIAS
DETECTADAS



Detección HCV
Genotipo HCV
Carga viral HCV

Detección HIV
Genotipo HIV
Carga viral HIV

Detección HBV
Carga viral HBV

Carga viral CMV
Carga viral EBV
Carga viral
Parvovirus B 19

Infecciones fúngicas

Sensibilidad, tipo de detección y tiempo de resultado.

- *Pneumocystis jiroveci*
- *Aspergillus spp.*
- *Candida spp* (*C. albicans*; *C. glabrata* y *C. krusei*)

TABLE 1. Results of the diagnostic meta-analyses (hierarchical summary receiver operating characteristic curves)^a

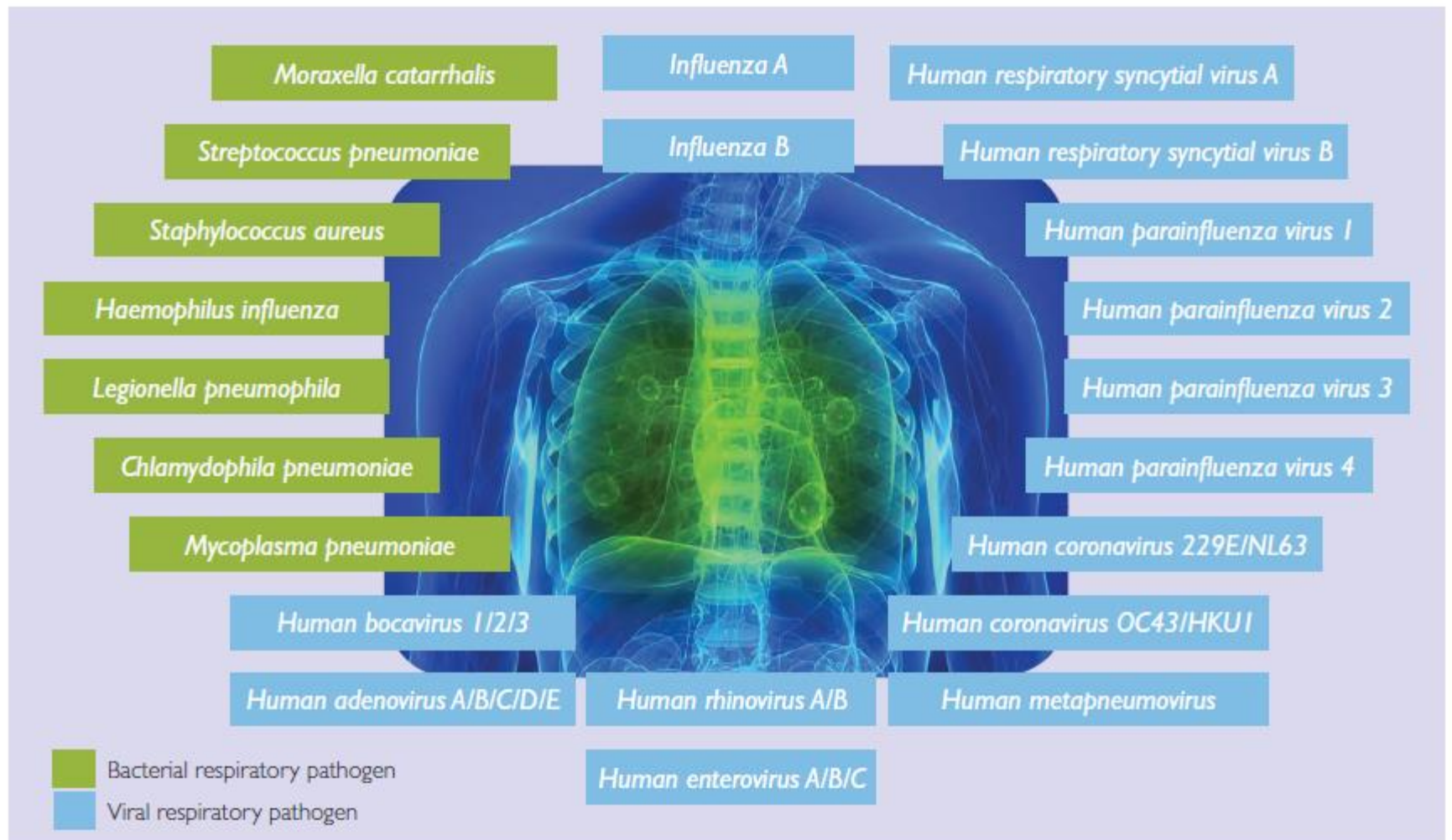
Comparison with TN at-risk patients (no. of studies)	Illustration	Sensitivity	Specificity	DOR	Likelihood ratio	
					Positive	Negative
TP I individuals (with candidemia)						
All ^b (49)	Fig. 1A; Fig. S3 in the supplemental material	0.95 (0.88–0.98)	0.92 (0.88–0.95)	229.1 (85–617.3)	12.3 (7.9–19.3)	0.05 (0.02–0.14)
Yr. $\geq 2000^{b,c}$ (27)	Fig. S4A in the supplemental material	0.93 (0.91–0.97)	0.94 (0.89–0.97)	195.7 (70.9–540.4)	15.4 (9–26.4)	0.08 (0.03–0.21)
Subgroup analysis: whole blood; rRNA or p450 gene target; detection limit, ≤ 10 CFU/ml; SeptiFast excluded (23)	Fig. S5 in the supplemental material	0.98 (0.85–1)	0.90 (0.82–0.85)	394.9 (56.4–2,765.4)	10.2 (5.5–18.9)	0.03 (0.004–0.18)
TP II individuals (with proven/ probable IC)						
All ^b (17)	Fig. 1B	0.93 (0.82–0.98)	0.95 (0.87–0.98)	251.9 (57.4–1,106)	18.2 (7–47.2)	0.07 (0.03–0.2)
Yr. ≥ 2000 (8)	Fig. S4B in the supplemental material	0.87 (0.70–0.95)	0.96 (0.92–0.98)	178.9 (51.1–626.8)	24.3 (11.3–52.4)	0.14 (0.05–0.33)
TP III individuals (with proven/ probable/possible IC)						
All (20)	Fig. 1C	0.73 (0.58–0.83)	0.91 (0.82–0.96)	26.9 (10.5–69.2)	8.1 (4–16.5)	0.3 (0.9–0.48)
Yr. ≥ 2000 (11)	Fig. S4C in the supplemental material	0.71 (0.52–0.85)	0.95 (0.92–0.97)	47.3 (16.9–132.9)	14.4 (8–25.2)	0.3 (0.17–0.55)

^a Values in parentheses are 95% confidence intervals.

^b Model fit using Stata's *gllamm* (generalized linear latent and mixed models) option.

^c Study end year. If the year when the study ended was not reported in the article, we used the publication year minus 2.

Avni T, Leibovici L, Paul M. *J Clin Microbiol.* 2011;49:665–70.



Neisseria gonorrhoea (NG)

Mycoplasma genitalium (MG)

Chlamydia trachomatis (CT)

Ureaplasma urealyticum (UU)

Trichomonas vaginalis (TV)

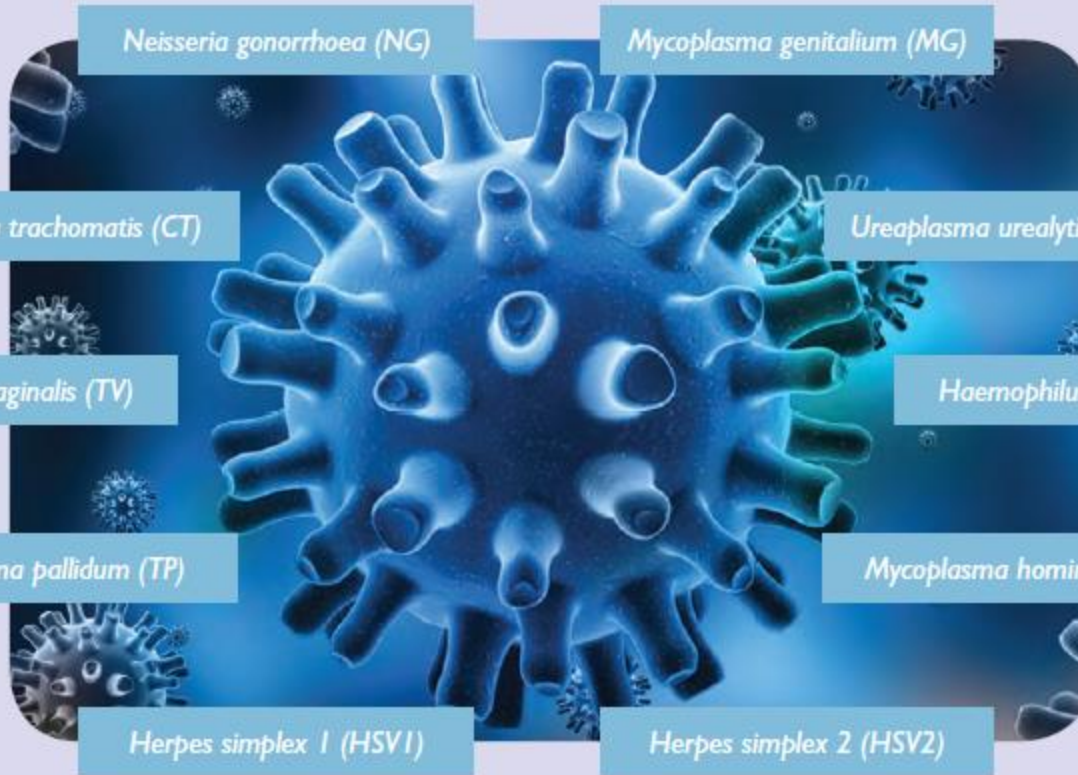
Haemophilus ducreyi (HD)

Treponema pallidum (TP)

Mycoplasma hominis (MH)

Herpes simplex 1 (HSV1)

Herpes simplex 2 (HSV2)



Detección de genes de resistencia a antibióticos

Se debe a la difusión de un único clon o de múltiples clones, si estos llevan un integrón con capacidad de incorporar nuevos genes determinantes de resistencia, o si una especie bacteriana puede intercambiar con otra especie estos determinantes de resistencia antimicrobiana.

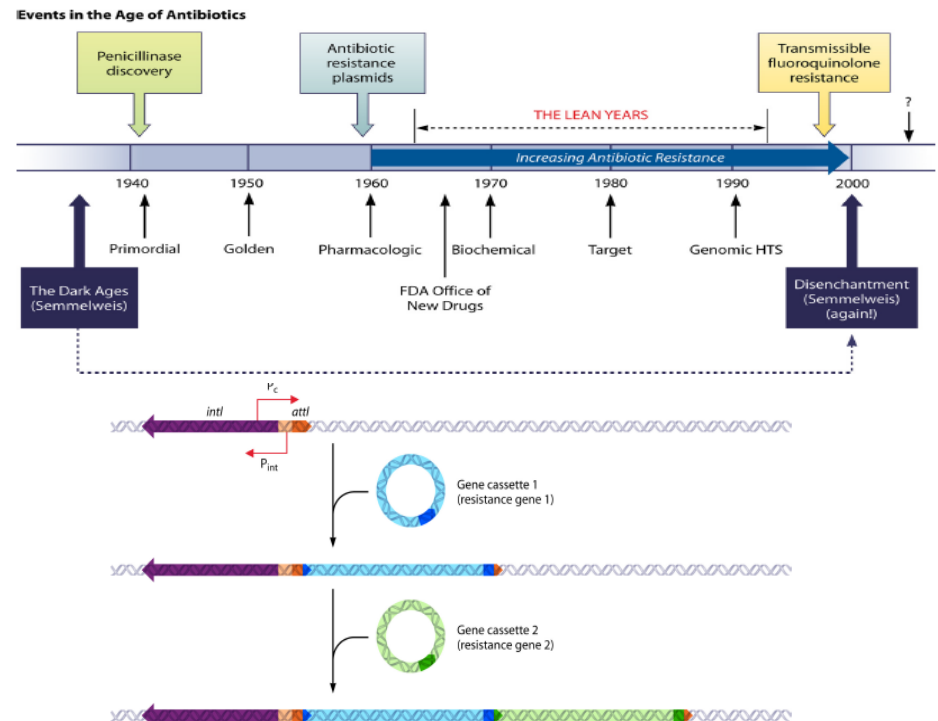


FIG. 5. Integrin structure and gene capture mechanism. This figure indicates the basic elements of integrins, as found in bacterial genomes. The structure consists of an integrase (Int) with the P_{int} and P_C promoters in the 3' end of the gene, with its associated cassette attachment or insertion site (attI). The integrase catalyzes the sequential recombination of circularized gene cassettes into the distal attachment site to create an operon-like arrangement (ant1', ant2', and so on) of r genes transcribed from the strong P_C promoter (132). Three classes of integrins have been identified that differ in their integrase genes.

- *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA).
- *Enterococcus* resistente a Vancomicina (VRE).
- Resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a Rifampicina e Isoniazida.



PCR TIEMPO
REAL

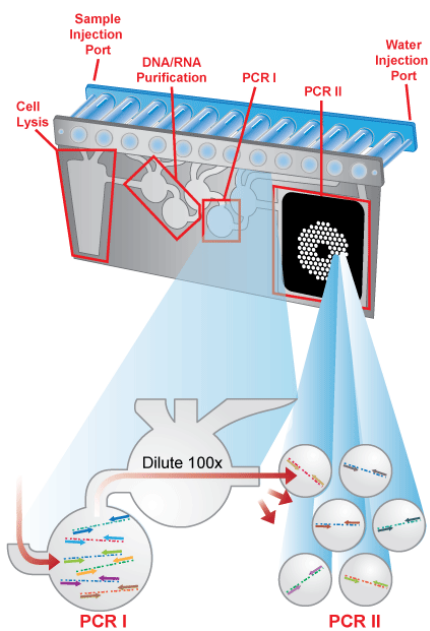


ARRAYS





SISTEMAS INTEGRADOS



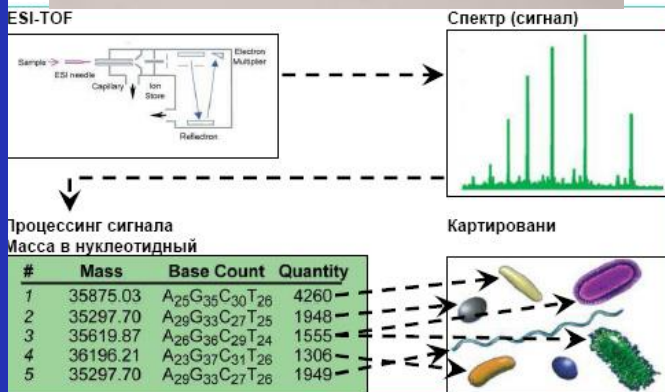
- Reaction Tube
- Extraction Tube
- PCR Tube
- Conical Tube
- Pipette Tips 175µl
- Pipette Tips 1ml
- Waste
- DNA Extraction Solutions

MANEJO MASIVO DE MUESTRAS





EL FUTURO...
LEJANO O CERCANO



El conocimiento de la secuencia genética de los microorganismos con el soporte de la bioinformática y de Internet, así como la introducción de los *microchips* o *microarrays* en grandes aparatos automáticos o en pequeños artilugios portátiles podrá dar a la biología molecular una utilidad para la microbiología clínica difícilmente comparable a otra metodología.

El saber adaptar los procedimientos del futuro (aquí previstos o no) sin perder el factor humano que los modula, traduce y enriquece, será el reto definitivo de nuestra especialidad de Biología Molecular aplicada a la microbiología clínica.



GRACIAS