



FACULTAD DE INGENIERÍA UNAM
DIVISIÓN DE EDUCACIÓN CONTINUA

CURSOS INSTITUCIONALES

CONTROL DE CALIDAD EN QUIMICA CLINICA



Del 24 al 28 de Septiembre de 2007

DIPOSITIVAS

CI - 034

Instructor: M. en C. Saúl Flores Medina

SERVICIOS DE SALUD PUBLICA DEL DISTRITO FEDERAL

SEPTIEMBRE DE 2007



INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA
Laboratorio de Biología Molecular

Diagnóstico Microbiológico de *Helicobacter pylori*

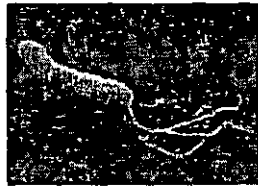
M. en C. IVARI MORALES MÉNDEZ

Manual Bergey de Bacteriología Sistemática

DOMINIO: *Bacteria*
 PHYLUM BXII: *Proteobacteria*
 CLASE V: "Epsilonproteobacterias"
 ORDEN I: "Campylobacteriales"
 FAMILIA II: "Helicobacteriaceae"
 GENERO I: *Helicobacter*
 ESPECIE: *pylori*

Antecedentes

- ↓ Descubierta en 1982 por Robin Warren y Barry Marshall.
- ↓ Coloniza la capa mucosa gástrica.
- ↓ *Campylobacter pyloridis*

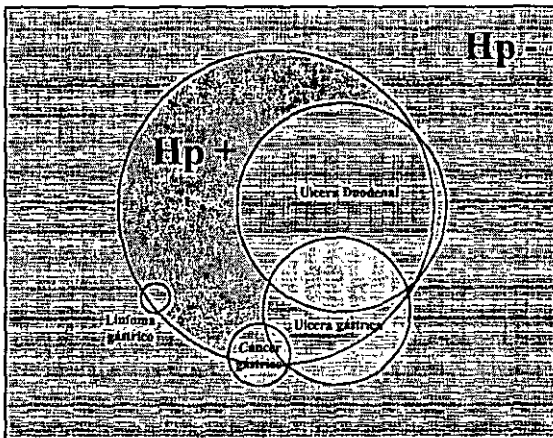


Clinica

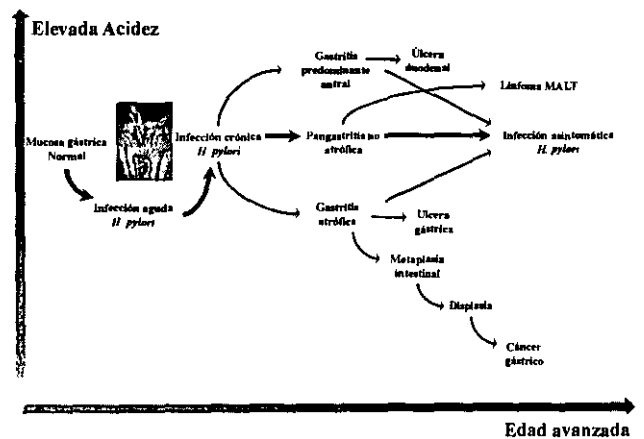
- ↓ Gastritis crónica
- ↓ Úlceras
- ↓ Dispepsia no ulcerosa o funcional
- ↓ Linfoma MALT
- ↓ Adenocarcinoma gástrico
- ↓ Cáncer gástrico



Clinica

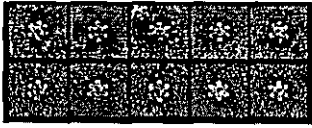


Clinica



N Eng J Med, Vol. 347, No. 15

Vac A



pH Neutro



Medio ácido

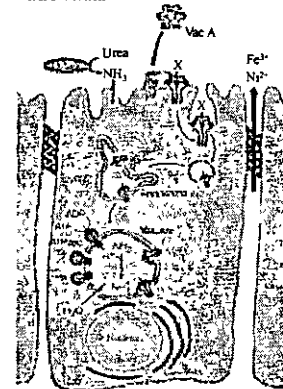
Oligomerización de VacA

- En condiciones nativas existe como un gran oligomero
- Es disociado en monómeros por acción del ácido



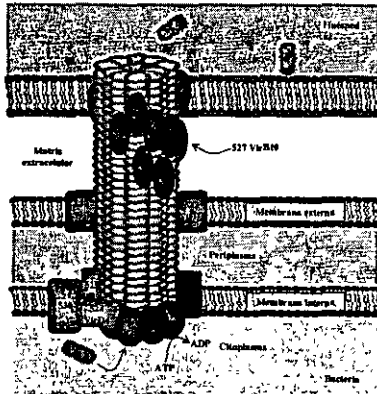
Vac A

Modelo de interacción VacA-célula



Cag A

SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO IV *Helicobacter pylori*

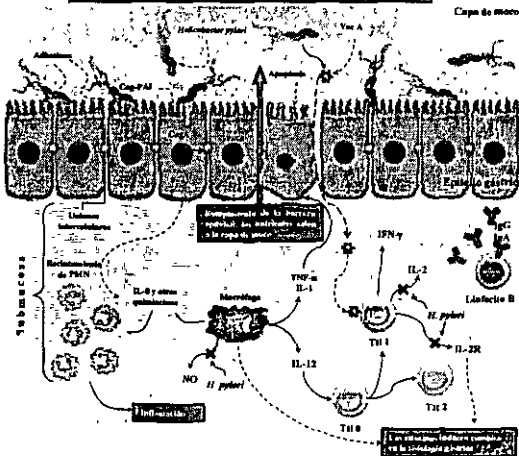


Clasificación

Fenotípicamente se han clasificado en 3 tipos:

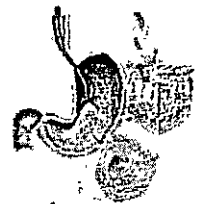
- ✦ Cepas tipo I (Vac A⁺ / Cag A⁺)
- ✦ Cepas tipo II (Vac A⁻ / Cag A⁻)
- ✦ Cepas Triple positivas (Vac A⁺ / Cag A⁺ / Bab A⁺)

Mecanismo de Patogenicidad



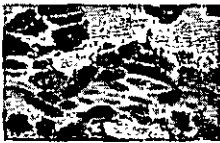
Diagnóstico

- Establecer criterio para la selección de pacientes
 - Cuadro clínico
 - Edad
 - Adulto
 - Pediátrico
 - Disponibilidad (costo, equipo, etc)
 - Tratamiento (persistencia)
- Método a emplear
 - Directo (Invasivo)
 - Indirecto (No Invasivo)



Diagnóstico

Métodos directos



Histología



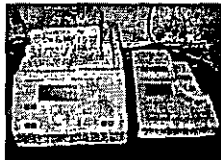
Cultivo



Ureasa rápida

PCR

- *vacA*
- *cagA*
- *glmM*

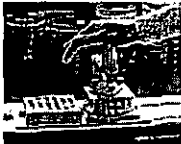


Diagnóstico

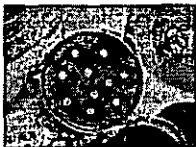
TÉCNICA	MÉTODO	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
HISTOLOGÍA	DIRECTO	93-98%	95-98%
CULTIVO	DIRECTO	77-95%	100%
PRUEBA DE LA BREASA RÁPIDA	DIRECTO	89-98%	93-98%
PCR	DIRECTO	95-100%	95-100%
PRUEBA DEL ALIENTO	INDIRECTO	90-96%	88-98%
SEROLOGÍA	INDIRECTO	86-94%	78-95%

Pruebas de Sensibilidad

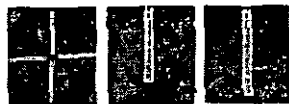
Replicador de Steers



Unidiscos



Tiras E (E-test)



Tratamiento

- ↘ Antisecretores
 - ↘ Antagonistas de los receptores H_2
 - ↘ Inhibidores de la bomba de protones
- ↘ Protección local
 - ↘ Sales de bismuto
 - ↘ Bismuto coloidal
 - ↘ Sucralfato
- ↘ Antimicrobianos
 - ↘ Amoxicilina
 - ↘ Claritromicina
 - ↘ Metronidazol
 - ↘ Tetraciclina

Tratamiento

- ↘ Monoterapia
 - ↘ Un solo antimicrobiano
- ↘ Terapia doble
 - ↘ Un antimicrobiano
 - ↘ Un antiácido
- ↘ Terapia triple
 - ↘ Dos antimicrobianos
 - ↘ Un antiácido
- ↘ Terapia cuádruple
 - ↘ Dos o tres antimicrobianos
 - ↘ Uno o dos antiácidos

Terapias

Tratamiento

Antisecretores

Antagonistas de los receptores H_2

- ↘ Bloquean de forma específica y competitiva los receptores H_2 de la histamina en la mucosa gástrica, inhibiendo la secreción gástrica y reduciendo la secreción de pepsina.

Ventajas

- ↘ Disminución de la secreción gástrica y de la acidez.
- ↘ Costo.

Desventajas

- ↘ Tolerancia cuando se uso más de 7 días.

Dosis

- ↘ 150 mg/12 hrs. o 300 mg/24 hrs.

Tratamiento

Tetraciclina

- ✦ Es también muy activa y existen pocos problemas de resistencia.
- ✦ No puede usarse en niños ni en mujeres embarazadas.
- ✦ Actualmente se incluye con menos frecuencia en los regimenes terapéuticos recomendados para el tratamiento de la infección por *H. pylori*.

Tratamiento

Terapias triples recomendadas por el Consenso Europeo

Tratamiento	Días	Fármaco (dosis)
Inhibidor de la bomba de protones + Antibiótico + Derivado imidazólico	7	Omeprazol (20mg/12h) + Clarithromicina (250mg/12h) + Metronidazol (400mg/12h)
Cuando se sospecha resistencia a claritromicina	7	Omeprazol (20mg/12h) + Amoxicilina (500mg/8h) + Metronidazol (400mg/8h)
Inhibidor de la bomba de protones + 2 Antibióticos + Cuando se sospecha resistencia a metronidazol	7	Omeprazol (20mg/12h) + Amoxicilina (1g/12h) + Clarithromicina (500mg/12h)

Tratamiento

Otras terapias triples

Tratamiento	Días	Fármaco (dosis)
Compuesto de bismuto + Antibiótico + Derivado imidazólico	14	Ranitidato de bismuto (400mg/12h) + Tetraciclina (500mg/6h) + Metronidazol (400mg/8h)
2 Antibióticos + Antagonista de los receptores de H ₂	10-14	Amoxicilina (750mg/8h) + Clarithromicina (500mg/8h) + Antagonista /12h o una sola dosis por la noche
Compuesto de bismuto + Antagonista de los receptores de H ₂ + 2 Antibióticos	14	Ranitidato de bismuto (400mg/12h) + Antagonista /12h o una sola dosis por la noche + Clarithromicina (250mg/6h ó 500mg/8h) o amoxicilina (500mg/6h)

Tratamiento

Terapias cuádruples indicadas cuando fallan las terapias triples

Tratamiento	Días	Fármaco (dosis)
Compuesto de bismuto + Antibiótico + Derivado imidazólico + Inhibidor de la bomba de protones	7-14	Ranitidato de bismuto (400mg/12h) + Tetraciclina (500mg/6h) + Metronidazol (250mg/6h ó 500mg/12h) + Omeprazol (20mg/12h)
Compuesto de bismuto + Antibiótico + Derivado imidazólico + Antagonista de los receptores de H ₂	14	Ranitidato de bismuto (400mg/12h) + Tetraciclina (500mg/6h) + Metronidazol (500mg/8-12h) + Antagonista /12h o una sola dosis por la noche
Compuesto de bismuto + 2 Antibiótico + Antagonista de los receptores de H ₂	7-14	Ranitidato de bismuto (400mg/12h) + Tetraciclina o amoxicilina (500mg/6h) + Clarithromicina (500mg/8h) + Antagonista /12h o una sola dosis por la noche


Tratamiento

Factores que dificultan la acción de los antibióticos:

- ✦ pH
- ✦ Moco gástrico
- ✦ Forma de actuar del antibiótico
- ✦ El estado fisiológico de la bacteria
- ✦ La diferencia de las pruebas *in vitro* e *in vivo*
- ✦ El glucocálix puede actuar como barrera.

GRACIAS

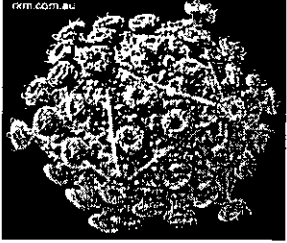
VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANO
PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO



INPer

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA
 HONRO ESPINOSA DE LOS REYES

DEPARTAMENTO DE INFECTOLOGÍA E INMUNOLOGÍA PERINATAL
 LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



BIOL. LINA AVIGAIL GIL ACEVEDO

INTRODUCCION

- PROBLEMA DE SALUD PUBLICA
- AFECTA A MAS DE 39.5 MILLONES DE PERSONAS EN EL MUNDO (OMS)
- EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA = SIDA

ANTECEDENTES

- 1981 SE DETECTARON CASOS SORPRENDENTES DE INFECCION POR *Pneumocystis jirovecii*, (HONGO CARACTERIZADO POR INFECTAR A PERSONAS INMUNOSUPRIMIDAS)
- CASOS SEMEJANTES EN VARONES HOMOSEXUALES Y APARECIAN A SU VEZ INFECCIONES ASOCIADAS POR CITOMEGALOVIRUS Y CANDIDIASIS
- DESPUES APARECIERON NUEVOS CASOS EN PERSONAS HETEROSEXUALES, USUARIOS DE DROGAS E INCLUSO SUS HIJOS.

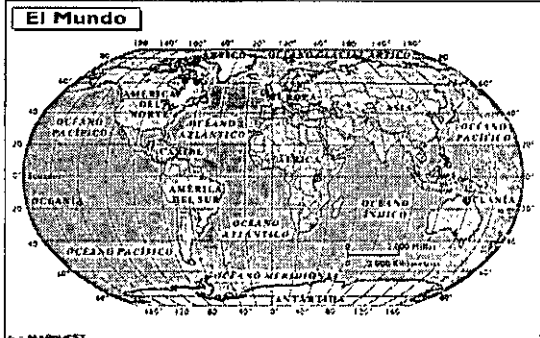
ANTECEDENTES

- CAUSA DEBIA SER UN AGENTE INFECCIOSO QUE SE TRANSMITIA DE FORMA SEMEJANTE AL VIRUS DE LA HEPATITIS B .
- DISTINTOS GRUPOS EMPEZARON A INVESTIGAR SOBRE LAS DIFERENTES INMUNODEFICIENCIAS, TALVEZ UN RETOVIRUS SEMEJANTE AL QUE CAUSA UNA INMUNODEFICIENCIA EN LOS GATOS O EL HTLV, PRODUCTOR DE UN TIPO DE LEUCEMIA
- 1983 EN EL INST. PASTEUR DEDICADOS AL ESTUDIO DE LOS RETOVIRUS L. MONTAGNIER ENCONTRO UN CANDIDATO QUE LO DENOMINO LAV

ANTECEDENTES

- 1984 R. GALLO – HTLV RETOVIRUS (VIRUS LINFOTROPICO T HUMANO TIPO III).
- DESPUES L MONTAGNIER Vs R. GALLO
- 1984- VIRUS ADQUIRIO LA DENOMINACIÓN
“VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA”

DISTRIBUCIÓN GEOGRAFICA VIH



El Mundo

MAPQUEST

EPIDEMIOLOGIA

- A FINALES DEL 2006 HABIA 39.5 MILLONES DE PERSONAS INFECTADAS VIH (OMS)
- No. DE DEFUNCIÓNES FUE DE 2.9 MILLONES
- NUEVOS CASOS 11 MIL PERSONAS POR DIA
- 1995 TERCERA CAUSA DE MUERTE EN MUJERES Y HOMBRES JÓVENES
- EN EEUU ERA LA PRIMERA CAUSA DE MUERTE

EPIDEMIOLOGIA EN MEXICO

- DESDE 1993 A LA FECHA - 182 MIL PERSONAS INFECTADAS POR EL VIH
 - OCUPANDO EL PRIMER LUGAR MEXICO, D.F. Y EL CUARTO LUGAR JALISCO.
- MAYOR PARTE DE AFECTADOS ENTRE 15-44 AÑOS

GRUPOS DE RIESGO

- HOMOSEXUALES
- TRABAJADORES SEXUALES
- GRUPOS EN CONTACTO CON DROGAS, TATUAJES.
- TRABAJADORES DE LA SALUD

MECANISMOS TRANSMISIÓN

- SEXUAL (acto sexual sin protección)
- PARENTERAL (sangre)
- VERTICAL (madre-hijo)

TRANSMISION SEXUAL

- HOMOSEXUAL 28.5 %
- HETEROSEXUAL 50.9 %
- TRABAJADORES SEXUALES 3.2 %
- BISEXUALES 17.4 %

TRANSMISIÓN SANGUINEA

- UDI 98.8 %
- HEMOFILICOS 0.4 %
- TRANSFUNDIDOS 0.7 %
- ACCIDENTES LABORALES 0.1 %

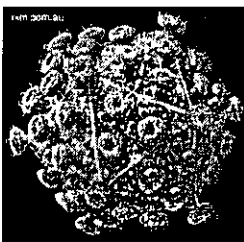
LIQUIDOS CORPORALES TRANSM. VIH

- SANGRE
- SEMEN
- SECRECIONES VAGINALES
- LECHE MATERNA
- LIQ. RODEA AL CEREBRO, ARTICULACIONES, Y EL QUE RODEA AL BEBE.

SIGNOS Y SINTOMAS

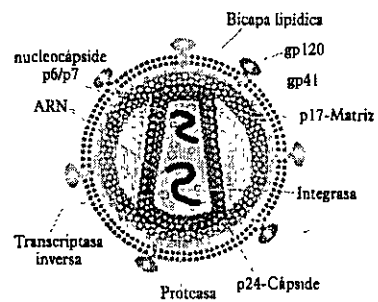
- DIARREA
- PÉRDIDA DE PESO
- FIEBRE
- NÓDULOS LINFÁTICOS INFLAMADOS
- TOS Y DIFICULTAD PARA RESPIRAR

BIOLOGIA DE VIH

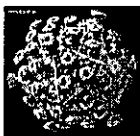


FAMILIA : RETROVIRUS
SUBFAM: LENTIVIRUS
DOS SEROTIPOS. VIH 1 - VIH 2
FORMA: ESFERICO
TAMAÑO: APROX 120 nm DIAMETRO
CARACTERISTICAS PRINCIPALES
-RAPIDA EVOLUCION
-VARIABILIDAD GENETICA (9 SUBTIPOS Y FORMAS RECOMBINANTES)

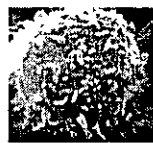
BIOLOGIA DEL VIH



BIOLOGIA DEL VIH

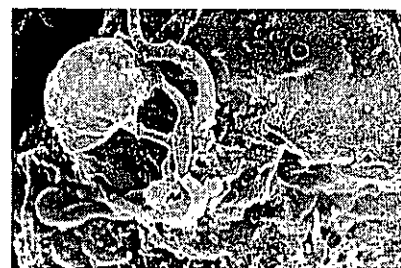


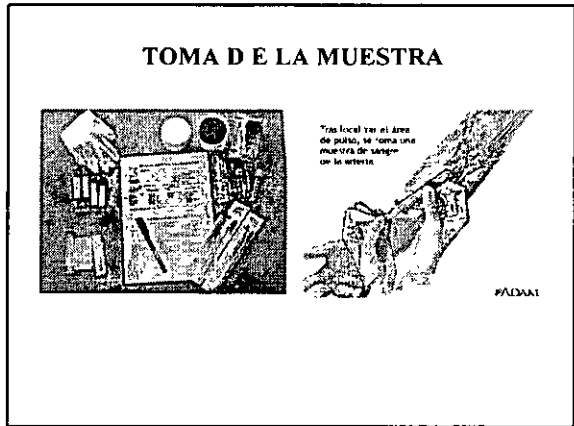
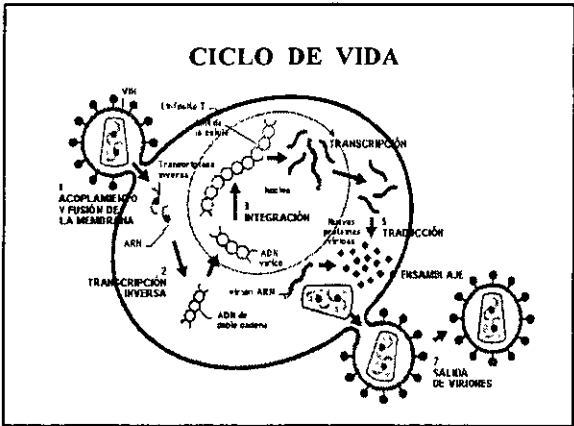
EL VIH INFECTA A LA MAYORIA DE LA CELULAS DEL SISTEMA INMUNOLOGICO



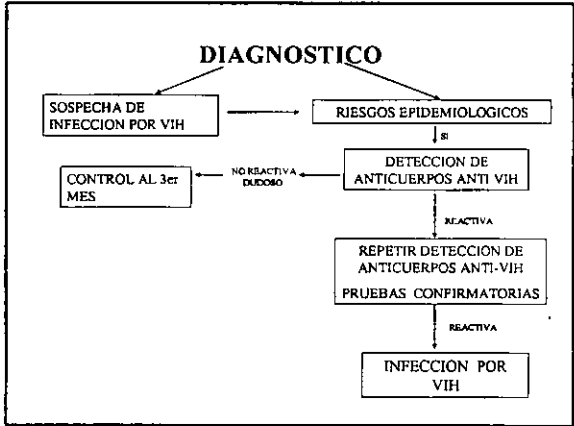
LINFOCITOS T4 AVISAN AL SIST INMUNE QUE HAY AGENTE EXTRAÑO

VIRIONES DEL VIH 1 ENSAMBLANDOSE A UN LINFOCITO





PRUEBAS DIAGNOSTICAS VIH



- ### DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO
- ELISA (INMUNOENSAYO)
 - WESTERN BLOT (PRUEBA CONFIRMATORIA)
 - DIAGNOSTICO MOLECULAR
 - PCR
 - (RT-PCR CARGA VIRAL)
 - PCR TIEMPO REAL

- ### DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO
- TIPOS DE ELISA:
- Indirecto(++)
 - Competitivo(+)
 - Tipo sandwich (+++)
 - Captura(+++)

DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO

ELISA

En ellas el antígeno puede proceder del lisado viral de un cultivo.

Proteínas recombinantes o péptidos sintéticos de 10-50 aminoácidos específicos del VIH (se clasifican como EIA de 2ª. y de 3ª. generación).

DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO

ELISA POR QUIMIOLUMINISCENCIA: todo en un equipo automatizado

Muestra (suero o plasma) → ACs suero → reconocen epitopes del núcleo y contra glicoproteínas de la envoltura
Tubo

Reaccion de dos fases

1) Unión Ag-Ac (incubación de 37°C x 30') se hace un lavado
2) Se agregan Ag VIH recombinantes marcados con Peroxidasa de rabano (Conjugado) se fijará al Ac. Específicamente VIH 1 y 2

se vuelve a lavar quitar exceso de

conjugado
RESULTADOS libre

Este se obtiene por una reacción lumínica, añadiendo un reactivo derivado del lumino! y un agente de transferencia de e-. La peroxidasa va a oxidar al derivado del Lumino! produciendo Luz.

DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO

ELISA QUIMIOLUMINISCENCIA

RESULTADOS

Se va a medir un unidades de luminiscencia

Valores de corte

Mayor o igual a 1.0 reactivo +

Menor a 0.9 no reactivo -

Mayor o igual 0.9 y menor a 1.0 indica una muestra dudosa o en zona gris

RESULTADOS + 0 DUDOSOS

↓
VOLVER A PROCESARLOS POR DUPLICADO
SI VUELVE A DAR LOS MISMOS VALORES

↓
HACER PRUEBA CONFIRMATORIA

DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO

ELISA QUIMIOLUMINISCENCIA

LIMITACIONES DE LA PRUEBA puede darte falso + o -

-Estadios tempranos de la infección puede no detectar los Ac

- No utilizar muestra de plasma extraídos con EDTA (puede interferir con en la reacción)

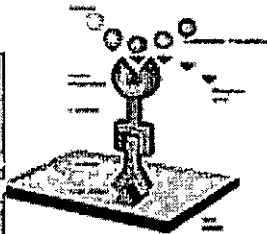
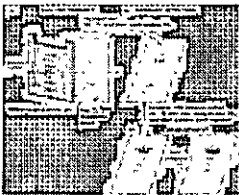
-No utilizar muestras turbias

-Puede dar falsos + o - en muestras de personas que trabajan con animales o que han recibido tratamientos derivados de sueros de animales

DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO

Pruebas de confirmación: Tienen como objeto verificar (confirmar) que los resultados obtenidos con las pruebas de escrutinio sean correctas.

• Western blot



PAUTAS DE LECTURA DEL WESTERN BLOT

- Identificación de bandas específicas virales de reactividad
- Valoración de la reactividad de cada banda
- Anotación individualizada de los resultados en cada muestra
- Aplicación del criterio de positividad
- Emisión del resultado e informe

CRITERIOS DE POSITIVIDAD WESTERN BLOT

Criterio	Reactividad frente a:
OMS	Dos glucoproteínas cualquiera de: gp160, gp120, gp41
Cruz Roja Americana	Una proteína de cada gen estructural (<i>env</i> , <i>pol</i> y <i>gag</i>)
FDA ^a	p24 + p32 + (gp41 o gp120 o gp160)
CRSS ^a	p24 + (gp41 o gp120 o gp160) o p32 + (gp41 o gp120 o gp160)
CDC/ASTPHLD ^a	p24 + (gp41 o gp120 o gp160) o gp41 + (gp120 o gp160)

DIAGNÓSTICO MOLECULAR VIH

DIAGNOSTICO MOLECULAR

PCR

(RT-PCR CARGA VIRAL)

PCR TIEMPO REAL

DIAGNÓSTICO MOLECULAR

PCR

- Técnica "in vitro" que imita el proceso natural de replicación
- RT-PCR: Obtención de DNA a partir de RNA, para el caso de virus
- Consta de tres pasos básicos que se repiten un determinado número de veces formando un ciclo
- Los pasos básicos son,
 - Desnaturalización
 - Alineación
 - Extensión
- El proceso se realiza en un termociclador, equipo automatizado que controla y alterna las temperaturas durante los tiempos programados para un determinado número de ciclos (30-40).

DIAGNÓSTICO MOLECULAR

PCR en el Laboratorio Clínico



DIAGNÓSTICO MOLECULAR

COBAS AMPLICOR

Ensayos Cuantitativos

- HIV-1
- HCV
- HBV
- CMV

Ensayos Cualitativos

- HCV
- *C. trachomatis*
- *N. gonorrhoeae*
- *M. tuberculosis*



DIAGNÓSTICO MOLECULAR

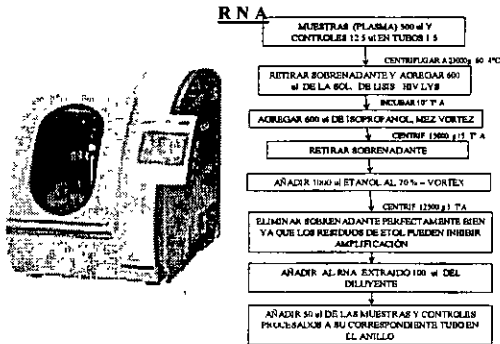
COBAS AMPLICOR CARGA VIRAL



ESPECIFICACIONES:

- Dos termocicladores .
- Dos estaciones de detección (48 muestras).
- Unidad de pipeteo para muestras y reactivos automatizada y estandarizada
- Estación de incubación a 37°C +/-1°C.
- Estación de lavado
- Fotómetro integrado para lecturas colorimétricas a 660nm.
- Tres gradillas con capacidad para 18 cassetes de reactivos.
- Tres espacios para gradillas de D-cups desechables.
- 41cm x 86cm x 57cm y 75 kgs.

EXTRACCIÓN DE LOS AC. NUCLEICOS



DIAGNÓSTICO MOLECULAR

COBAS AMPLICOR CARGA VIRAL



- DETERMINAR LOS ANILLO NECESARIOS A UTILIZAR

- PREPARAR MEZCLA MAESTRA (Buffer, dNTP'S, Mg⁺⁺, Oligos, DNA, Enzima Taq polimerasa, agua)

- MEZCLAR POR INVERSIÓN

- AÑADIR 50 µl DE LA MEZCLA MAESTRA A LOS 50 µl DE LAS MUESTRA PROBLEMA Y CONTROLES

Resultados en numero de copias: se pueden trabajar tipos de corridas estándar (400 - 750 000 c/ml) y ultrasensibles 50/100000 c/ml
Tiempo para llevar a cabo la amplificación 4 hrs Después de la extracción

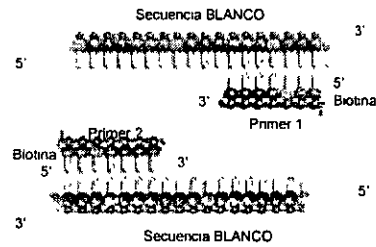
DIAGNÓSTICO MOLECULAR VIH

Ciclo de PCR - Paso 1: Desnaturalización por calor



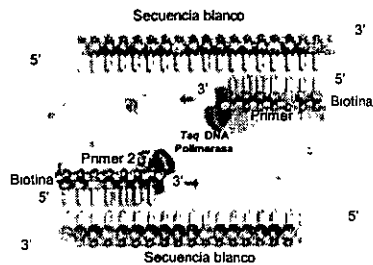
DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Ciclo de PCR - Paso 2: Los primers biotinilados se unen a las secuencias blanco (templado)



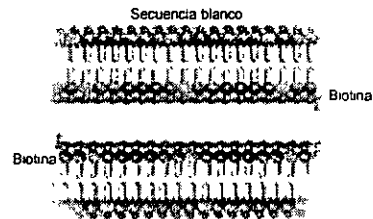
DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Ciclo de PCR - Paso 3: la Taq DNA polimerasa cataliza la extensión de los primers a medida que se incorporan los nucleótidos



DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Fin del Primer Ciclo de PCR - Resulta en Dos copias de la Secuencia blanco



DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Amplificación

	No. de Ciclos	No. de Copias
Ciclo 1 = 2 Amplificones	1	2
Ciclo 2 = 4 Amplificones	2	4
Ciclo 3 = 8 Amplificones	3	8
Ciclo 4 = 16 Amplificones	4	16
Ciclo 5 = 32 Amplificones	5	32
Ciclo 6 = 64 Amplificones	6	64
Ciclo 7 = 128 Amplificones	20	1,048,576
	30	1,073,741,824

DIAGNÓSTICO MOLECULAR LightCycler 2.0



- PCR tiempo real.
- 32 muestras de 20 o 100 µl que se miden en 5".
- 35 ciclos en 30'.
- 6 canales de detección. Con diferentes filtros
- Salto de temperatura de 0.1-20°C/s.
- Lectura/capilar/ciclo.

- DETERMINAR LOS CAPILARES NECESARIOS A UTILIZAR

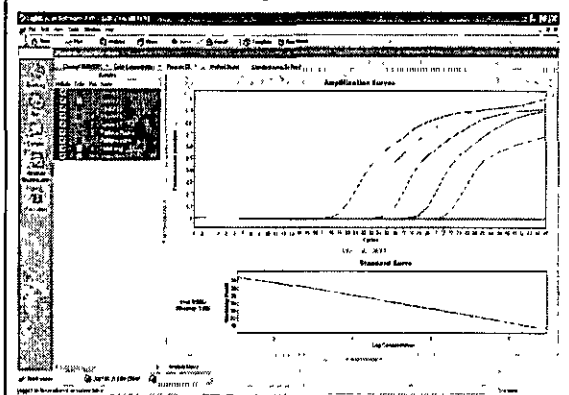
-PREPARAR MEZCLA MAESTRA (Buffer, dNTP'S, Mg++, Oligos, DNA, Enzima Taq polimerasa, agua fluoroforo)

-AÑADIR 10 µl DE LA MEZCLA MAESTRA A LOS 10µl DE LA MUESTRA PROBLEMA Y CONTROLES + .

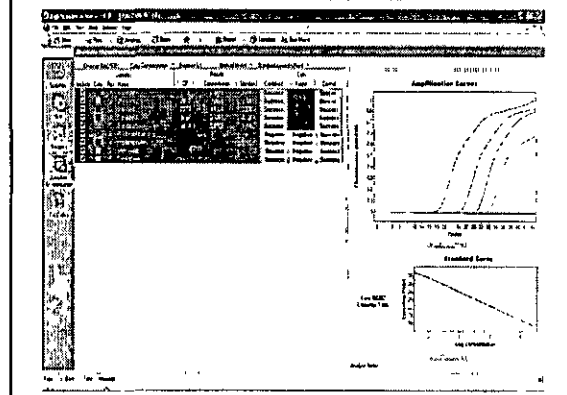
- PONER EN LOS CAPILARES. BAJAR DE UN SOLO GOLPE

-METERLOS EN LOS CAPILARES AL TERMOCICLADOR UNA VEZ YA PROGRAMADA LA CORRIDA EN EL SOFTWARE

Resultado Cuantificación EBV



Resultado Cuantificación EBV



TRATAMIENTO

- INHIBIDORES DE PROTEASA ADULTOS EN PRIMER ESQUEMA DE TERAPIA ANTIRETROVIRAL:

- 1) EFAVIRENZ
- 2) ATAZANAVIR/RITONAVIR O LOPINAVIR/RITONAVIR
- 3) FOSAMPRENAVIR/RITONAVIR O LOPINAVIR/RITONAVIR

SE DAN TRES OPCIONES DE TRATAMIENTO DEPENDIENDO A TU CUANTA DE T4 - ALGUNOS MEDICAMENTOS CAUSAN HEPATOTOXICIDAD

TRATAMIENTO

- INHIBIDORES DE PROTEASA ADULTOS EN SEGUNDO ESQUEMA DE TERAPIA ANTIRETROVIRAL:

- 1) ATAZANAVIR/RITONAVIR O SAQUINAVIR/RITONAVIR
- 2) FOSAMPRENAVIR/RITONAVIR O LOPINAVIR/RITONAVIR

