

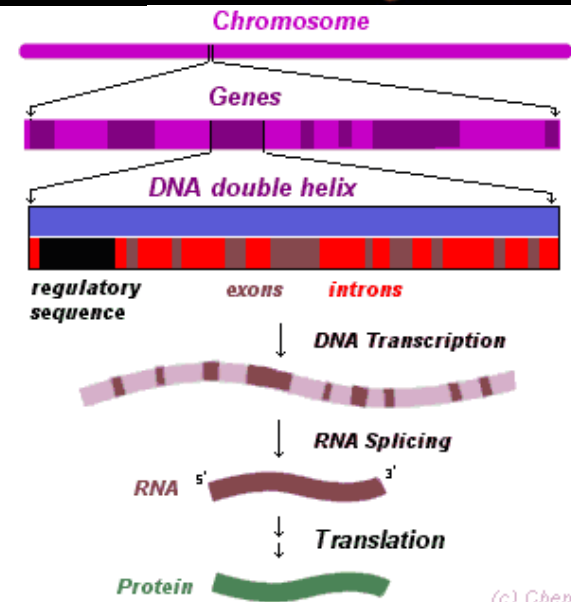
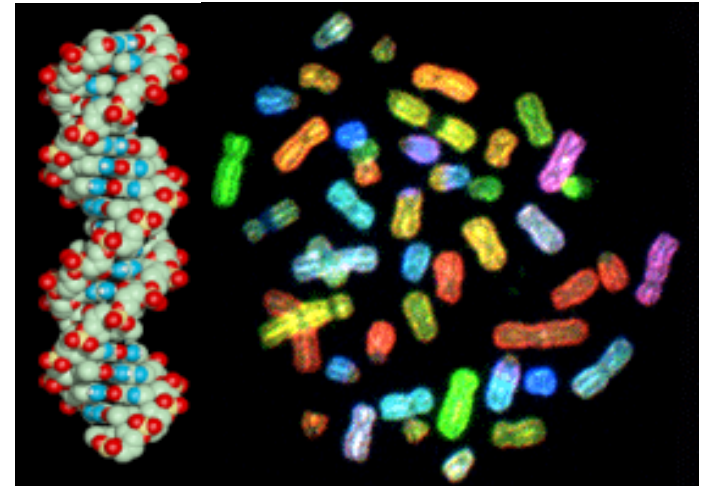
Aplicaciones de la Biología Molecular en la Salud

Ácidos nucleicos

Dr. Javier Quinteiro (USC)

Ácidos nucleicos

- ADN
 - Genoma
 - Información más detallada acerca de un organismo
 - Accesible a través de secuenciación
- ARNm
 - Transcriptoma
 - Accesible a través del análisis de expresión génica
- Correlación genotipo /fenotipo



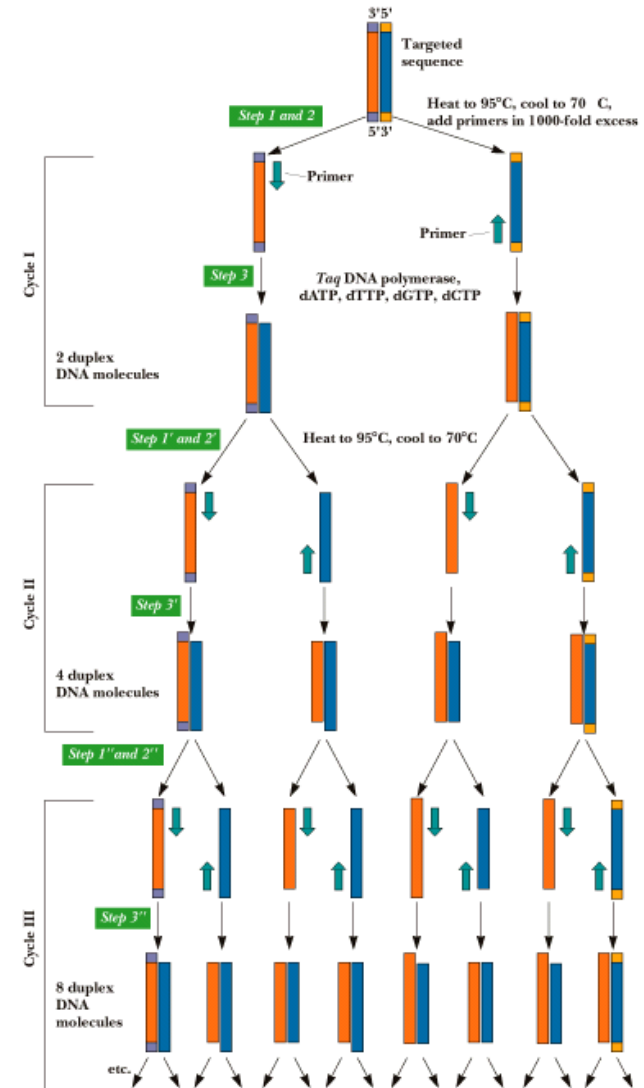
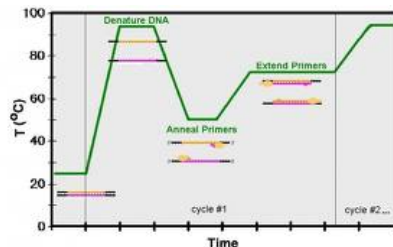
PCR (Polymerase Chain Reaction)

Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., and Erlich, H. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-54

- Objetivo: obtener múltiples copias de una región específica del DNA a partir de algunas (1) moléculas molde.
- Componentes:
 - DNA Molde
 - Desoxirribonucleótidos (dNTPs)
 - Cebadores
 - Oligonucleótidos (15-30) complementarios
 - Tampón (Mg_2Cl) y agua
 - DNA Polimerasa (*Taq* DNA polimerasa)
 - Aislada de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*
- Proceso
 - Ciclo: desnaturalización/hibridación/extensión

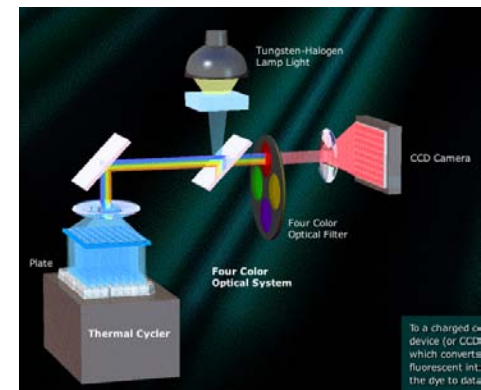
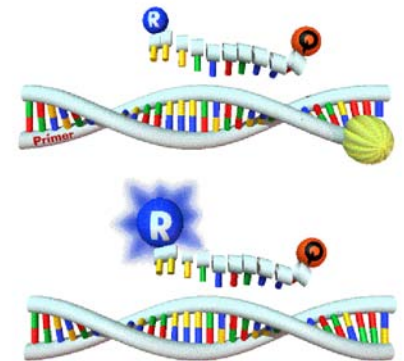
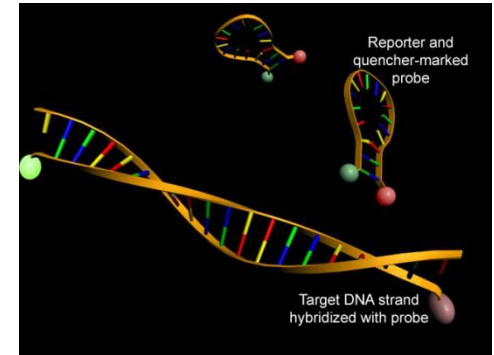
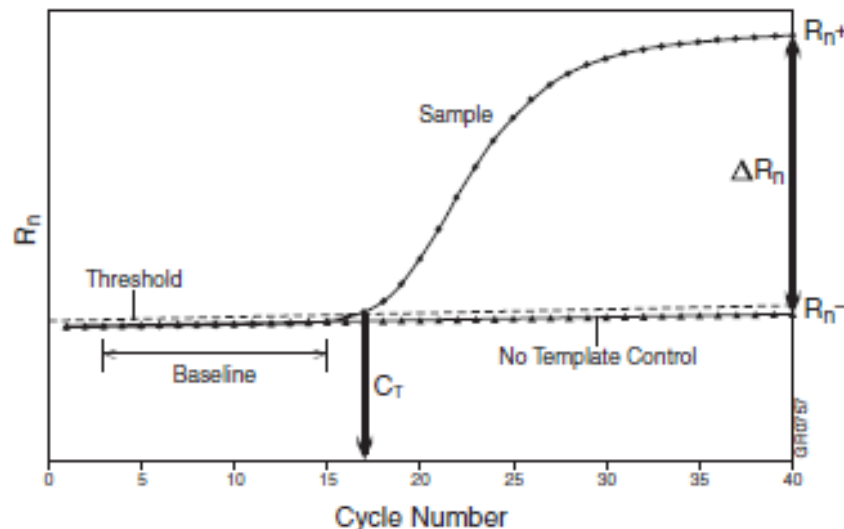


Kary Mullis
Nobel 1993:
"for his invention of the polymerase chain reaction (PCR) method"



PCR a tiempo real (qPCR)

- Se basa en la detección/cuantificación de fluorescencia asociada a la generación de productos de PCR
- Diversas metodologías (TaqMan, Molecular Beacons...), SYBRGreen
- Permite novedosas y más precisas aproximaciones a la cuantificación de DNA y RNA por PCR.
 - Cuantificación relativa/absoluta
- Aplicaciones en la detección/cuantificación de SNPs, alelos, mRNAs, DNAs...

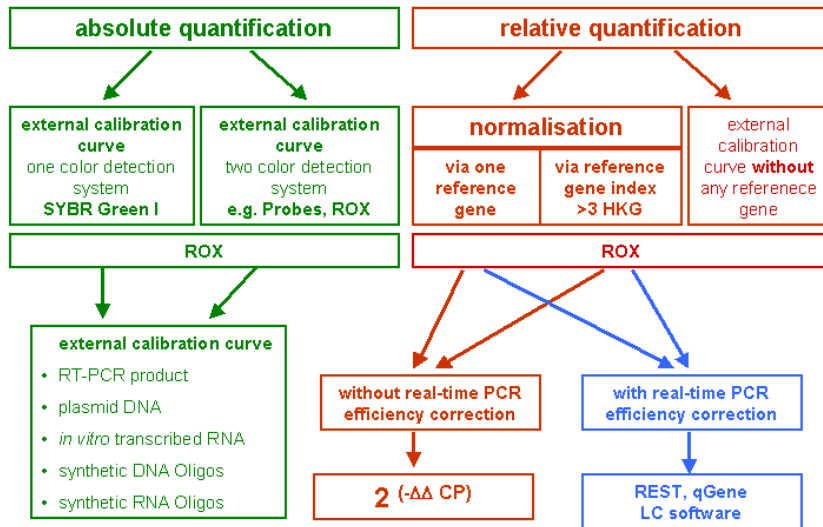


Estimaciones cuantitativas en qPCR

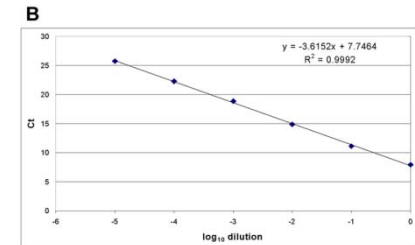
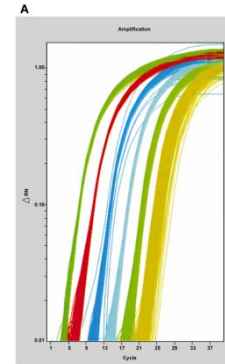
- Usando recta estándar

Quantification Strategies in real time qRT-PCR

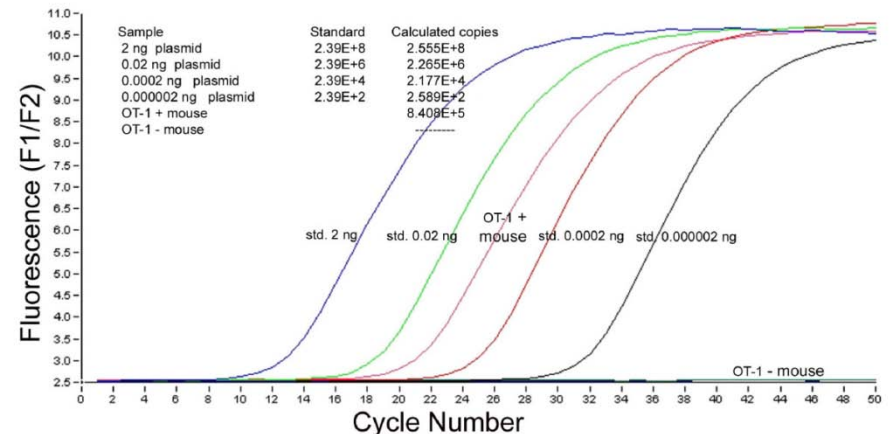
M.W. Pfaffl, *BioSpektrum* 2004 (Sonderausgabe PCR)



Datos de fluorescencia durante PCR



Curva estándar

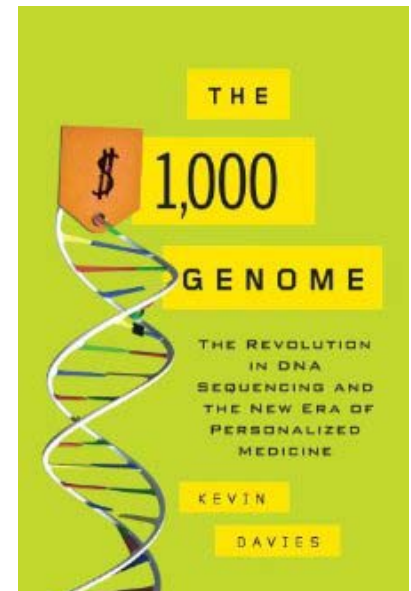


Quantitative Real-time PCR Data. Quantitative real-time PCR data for the OT-1 transgene using pCR TOPO2.-OT-1 plasmid standards and genomic DNA from OT-1 positive and OT-1 negative mice. 8.408×10^5 copies of the OT-1 transgene were detected in 300 ng of genomic DNA from the OT-1 positive mouse while no signal was generated from the OT-1 negative mouse.

Wright *et al. BMC Immunology* 2005 6:20 doi:10.1186/1471-2172-6-20

Secuenciación

- Elucidación de la secuencia nucleotídica (bases) de un fragmento de ADN, gen, genoma
- Secuenciación clásica
 - Sanger
- “Secuenciación de nueva generación”
 - 454 pirosecuenciación
 - SOLiD
 - Ion semiconductor (Ion Torrent)
 - Illumina (Solexa)
 - + Desarrollo bioinformático



Análisis de Datos

- Desarrollo Bioinformático

- Datos de secuenciación

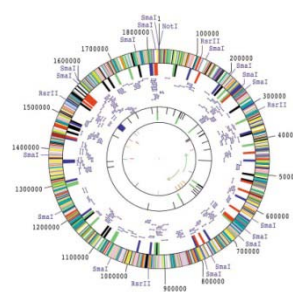
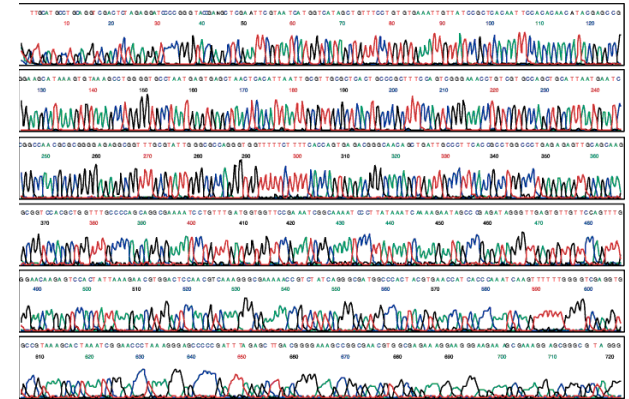
- Ensamblado
- Anotación génica

- qPCR

- Algoritmos de cuantificación
- Cálculo de eficiencia

- Microarrays

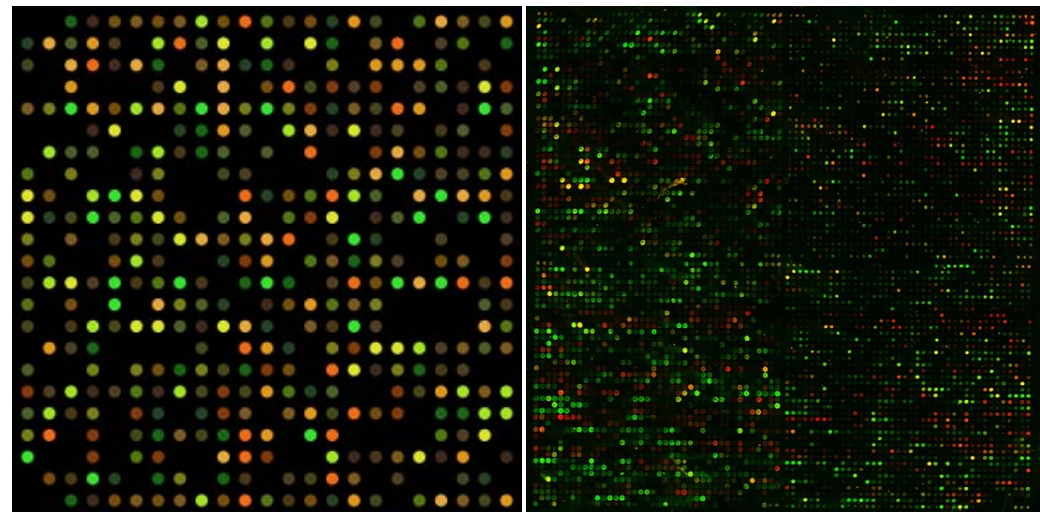
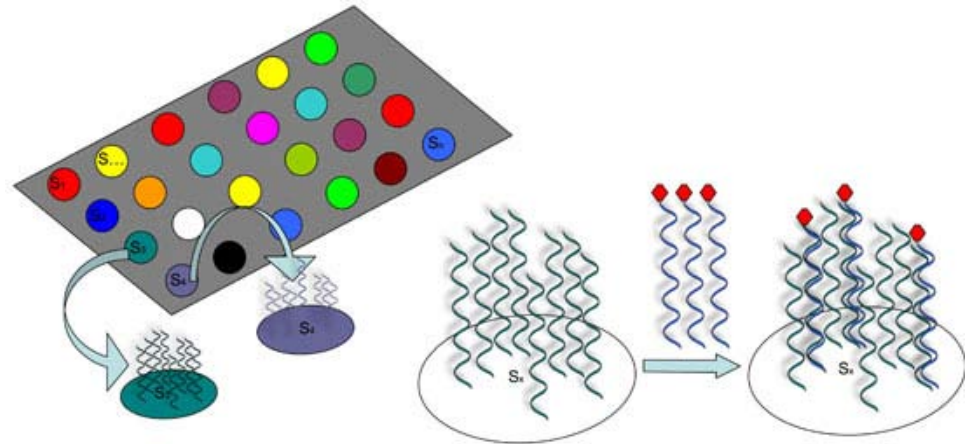
- Evaluación de señales

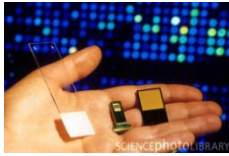


Microarrays ADN



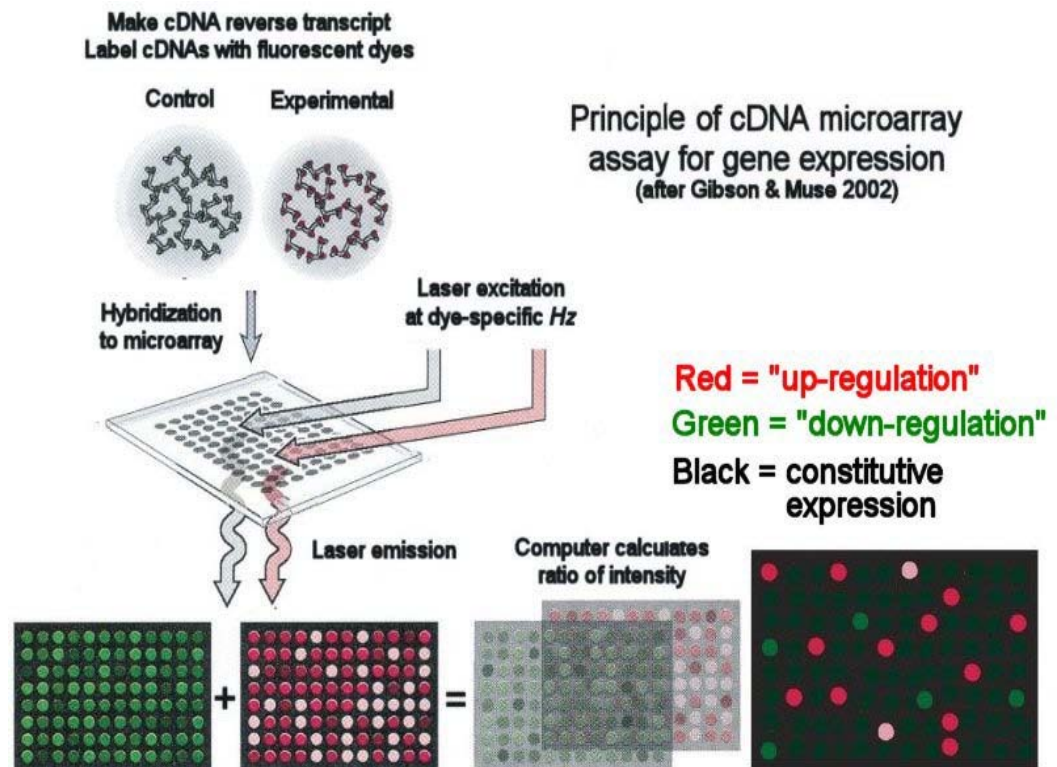
- Colección de moléculas de ADN inmovilizadas sobre diferentes soportes en posiciones definidas
- Proceso:
 - Diseño microarray (disponibilidad comercial)
 - Sondas
 - Inmovilización / Soporte
 - Plataformas comerciales
 - p.ej. Genechip (Affymetrix)
 - Hibridación
 - Detección de señal.
 - Amplificación





Microarrays ADN

- Herramienta de análisis de alto rendimiento
 - Genotipado / resecuenciación
 - Análisis de expresión génica
 - Definición de biomarcadores
 - Diagnóstico genético
 - Detección de patógenos



Aplicaciones en Microbiología



Go Molecular. The Answer Is in the DNA

- Microbiología molecular
 - Diagnóstico de infecciones microbianas.
Evolución carga viral
 - Detección de microorganismos en muestras ambientales
 - Detección de microorganismos en alimentos
 - Identificación taxonómica de microorganismos
 - Rapidez, sensibilidad, especificidad, bajo riesgo de contaminación, comodidad, alto numero de muestras procesadas.



Applied Biosystems
Pathogen Detection
System

Primary
Enrichment

16-24 hrs

DNA
Sample Prep

1-2.5 hrs

Analysis

40 mins

Total Time:
18-27 hrs

Immunoassays

Primary
Enrichment

18-24 hrs

Secondary
Enrichment

18-24 hrs

Analysis

10 mins-2 hrs

Total Time:
1.5-2 days

Traditional Culture

Primary
Enrichment

1 day

Secondary
Enrichment

1-2 days

Selective
Isolation

1-2 days

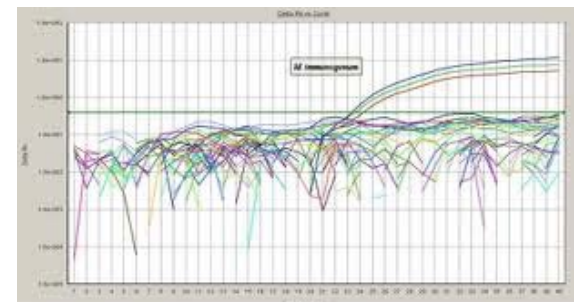
Confirmation

1-2 days

Total Time:
3-7 days

Metodología

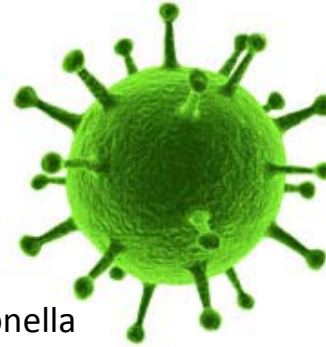
- Sistema de detección de patógeno
 - Selección del ADN objetivo
 - Diseño de cebadores y sondas. Controles.
 - Optimización del ensayo
 - Verificación / validación
- Ensayo de detección
 - Preparación de la muestra
 - Eliminación de inhibidores de PCR
 - Incremento de la concentración del organismo objetivo
 - Eliminación de la heterogeneidad de la muestra
 - Enriquecimiento
 - Acceso al nivel de detección por PCR (10⁻³ ufc)
 - Células viables/no viables
 - Aislamiento de ADN
 - Kits ad hoc para las diversas muestras/automatización
 - Colony PCR
 - Análisis por PCR/real-time PCR
 - RT-PCR



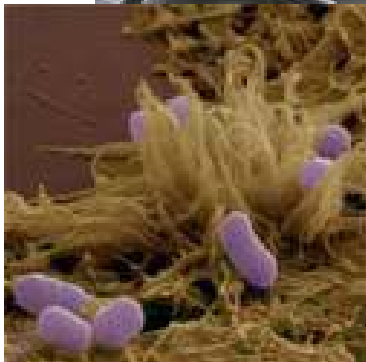
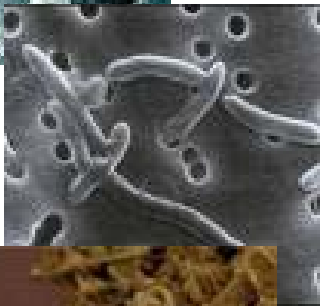
Microbiología molecular

LightCycler

- Especies objetivo



- | | |
|-----------------------|---------------------|
| Alicyclobacillus | HIV |
| Bacillus | Legionella |
| Campylobacter | Listeria |
| Candida | MMR viruses |
| Chlamydia | Molds [Moulds] |
| Clostridium difficile | Mycobacterium |
| CMV | Neisseria |
| Cronobacter sakazakii | Pseudomonas |
| Cryptosporidium | Respiratory Viruses |
| E. coli | Salmonella |
| E. coli O157 | Shigella |
| Enterobacteriaceae | Staphylococcus |
| E. sakazakii | Staph. aureus |
| Enterococci | Staph. [MRSA] |
| Enteric Viruses | Streptococci |
| Helicobacter | Yeasts |
| Hepatitis | Vibrios in Food |



Parámetros	Aplicación
Virología	
HIV - Carga Viral	Cuantificación directa del RNA del virus de la inmunodeficiencia humana - 1 para evaluación del pronóstico o de la respuesta viral a la terapia antirretroviral.
HCV - Carga Viral	Cuantificación del RNA del virus de la hepatitis C por amplificación de ácidos nucleicos para detección de fluctuaciones de la carga viral en pacientes con infección crónica por HCV, sometidos a tratamiento.
HBV - Carga Viral	Cuantificación de los niveles de DNA del virus de la hepatitis B para evaluación de la eficacia de la terapia antiviral, utilizada en el tratamiento de enfermos con HBV.
HCV - Detección	Detección del RNA del virus de la hepatitis C por amplificación de ácidos nucleicos, que ofrece un parámetro de viremia activa, siendo posible detectar la viremia antes de la soroconversión inmunológica.
CMV - Carga Viral	Determinación de la carga viral del Citomegalovirus, para el acompañamiento de pacientes de alto riesgo y monitoreo de la respuesta al tratamiento.
HPV - Detección	Detección del Virus del Papiloma Humano con genotipo de alto riesgo en células de cuello del útero recogidas en medios líquidos.
HPV Genotipificación	Detección y genotipificación del Virus del Papiloma Humano en sus 33 genotipos más relevantes.
Tamizaje de bolsas de sangre	
TaqScreen MPX	Test multiplex cualitativo para la detección de RNA del HIV-1 Grupo M, HIV-1 Grupo O, HIV-2, HCV y DNA del HBV en muestras de plasma de donantes.
Microbiología	
Detección de Chlamydia trachomatis	Detección cualitativa del ADN de Chlamydia trachomatis en muestras endocervicales o en orina.
Detección de Neisseria gonorrhoea	Detección cualitativa del ADN de Neisseria gonorrhoeae en muestras urogenitales.
Detección de Mycobacterium tuberculosis	Detección cualitativa del ADN del complejo de la Mycobacteria tuberculosis (MTB), en muestras respiratorias humanas para diagnóstico de tuberculosis.
Septifast	Detección e identificación de ADN de 25 especies de hongos y bacterias, causantes de aproximadamente 90% de todas las infecciones del torrente sanguíneo, para ayudar en el diagnóstico rápido de la sepsis.

Detección/cuantificación de virus gripe Aviar H5N1 por qPCR

Kit Contents

- Hemagglutinin H5 primer/probe mix (150 reactions **BROWN**)
FAM labeled, BHQ quenched
- Neuramidase NI primer/probe mix (150 reactions **BROWN**)
FAM labeled, BHQ quenched
- Hemagglutinin H5 positive control template (for Standard curve **RED**)
- Neuramidase NI positive control template (for Standard curve **RED**)
- Internal extraction control/H5 and NI/ACTB RT primer mix (150 reactions **GREEN**)
- RNase/DNase free water

Real-Time PCR Instrument

RNA extraction kit

This kit is designed to work well with all processes that yield high quality RNA with minimal PCR inhibitors.

Precision OneStep™ qRT-PCR MasterMix kit

Contains complete one step qRT-PCR MasterMix plus Standard MasterMix for no template control

Optional - Reverse Transcription kit and Mastermix

Although a one step RT-PCR protocol is recommended, this kit is designed to work well with a two step protocol. We recommend the use of PrimerDesign™ Reverse Transcription kits and the use of PrimerDesign 2x Precision™ MasterMix for the two step protocol.

Pipettors and Tips

Vortex and centrifuge

Thin walled 1.5 ml PCR reaction tubes



PrimerDesign™ Ltd

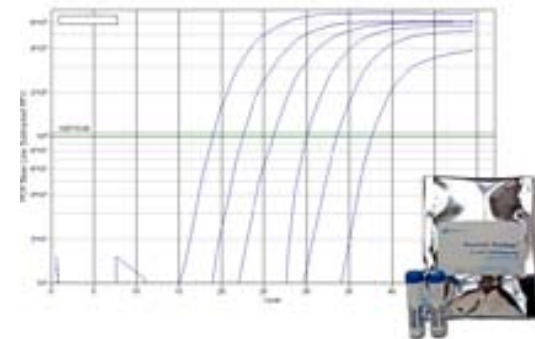
Quantification of
Influenza A virus subtype H5N1 (avian
influenza)

Hemagglutinin H5
&
Neuramidase NI

For general laboratory and research use only

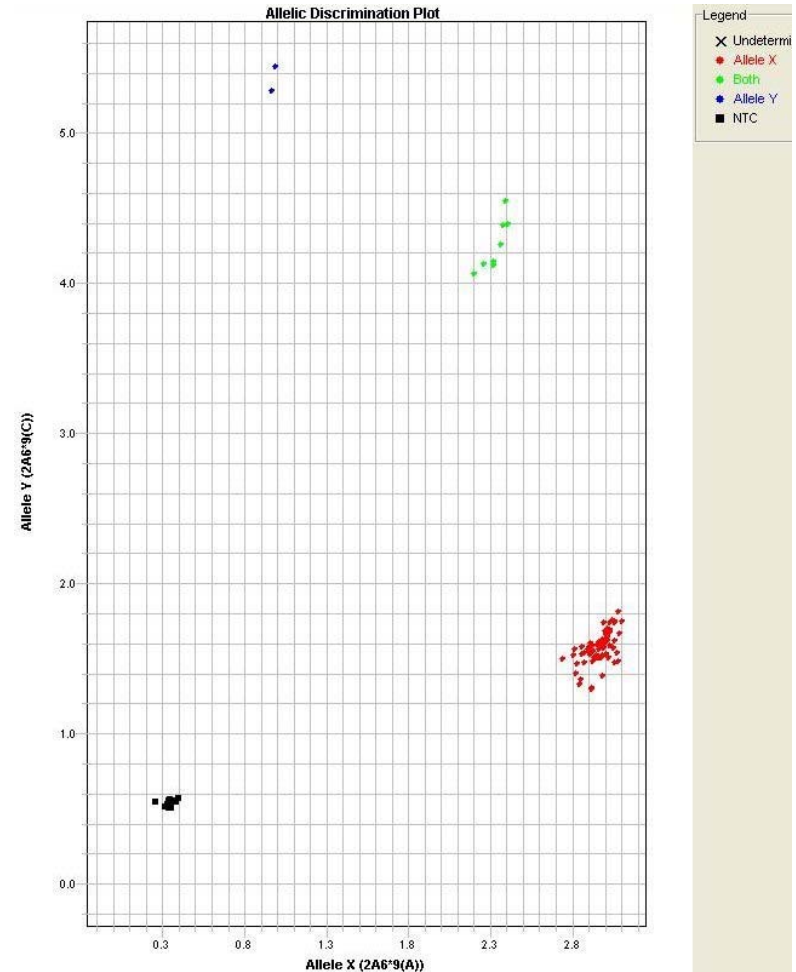
Standard kit
150 tests

150 tests per kit



Farmacogenética/Farmacogenómica

- Real-time PCR
 - TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assay
 - Tecnología TaqMan
 - DME genes
 - Detección de polimorfismos
 - Selección de más de 200 genes



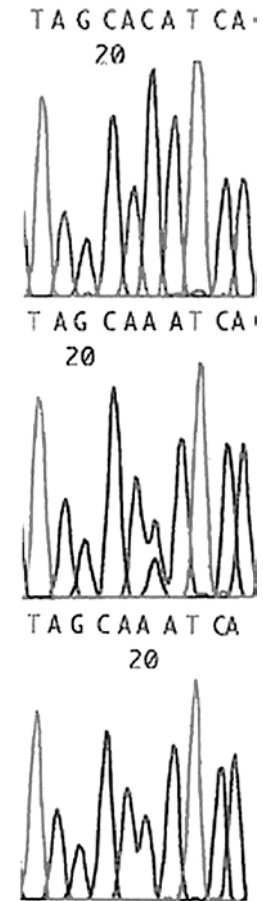
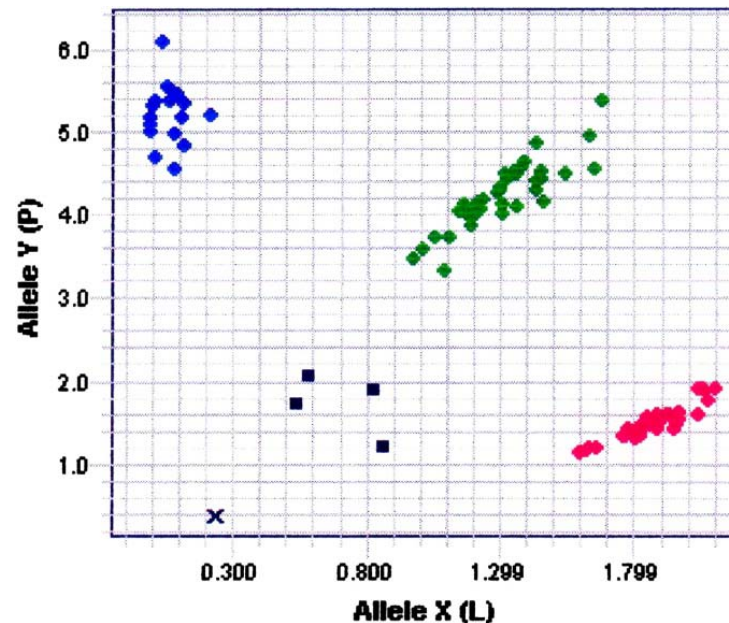
Farmacogenética/Farmacogenómica

- Microarray: AmpliChip CYP450 Test
 - Detección de variantes en los genes CYP2D6 and CYP2C19
 - Implicados en el metabolismo del 25% de los medicamento prescritos
 - Estrategia terapeutica y dosis de tratamiento



Oncología molecular

- Estudio de la relación de entre polimorfismos y riesgos de patologías.



DNA sequencing of BRCA2 N372H polymorphism.
Wenham R M et al. Clin Cancer Res 2003;9:4396-4403

CML (Leucemia mieloide crónica)

- La CML se caracteriza por presentar la Ph translocación en el 90-95% de los casos (gen bcr-abl quimérico)
- Cuantificación de células específicas Ph+.
- Monitoring de pacientes bajo trasplante de células troncales
 - Cuantificación de transcritos
 - Decisiones en el tratamiento

