



**Biomédicos
de Mérida**

LABORATORIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS

Biología molecular aplicada en el diagnóstico del laboratorio pediátrico

*Diagnóstico oportuno y veraz

M. en C. Roger López Díaz
Laboratorio de Biología Molecular

27 de Octubre del 2011

El laboratorio clínico en las enfermedades pediátricas

El arte del diagnóstico



“Una buena historia clínica es el pilar insustituible del diagnóstico médico, aunque en muchos casos la clínica no proporciona la certeza suficiente, y es en este momento donde las pruebas de laboratorio, gabinete o microbiológicas, pasan a ser armas de apoyo en el diagnóstico clínico, si se indican e interpretan de forma racional (medicina basada en evidencias)”.



Causas de enfermedad en Yucatán

Datos hasta el 19 de marzo del 2011 (semana epidemiológica 11)

No	Diagnóstico	Grupos etario			
		< 1 año	1 a 4 años	5 a 9 años	10 a 14 años
1	Infecciones respiratorias agudas	13 001	31 120	19 737	10 884
2	Infecciones intestinales por otros microorganismo	1 441	4 532	2 356	1 368
3	Infección de vías urinarias	67	485	546	471
4	Úlceras, gastritis y duodenitis	0	0	0	216
5	Asma y estado asmático	176	1 057	705	389
6	Amebiasis intestinal	110	670	419	253
7	Intoxicación aguda por alcohol	0	0	0	6
8	Gingivitis y enfermedades periodontales	0	59	153	125
9	Hipertensión arterial	0	0	0	0
10	Otitis media aguda	41	310	395	237
11	Otras helmintiasis	26	436	391	237
12	Varicela	74	362	435	276
13	Conjuntivitis	101	346	209	126
14	Diabetes mellitus no insulino dependiente (Tipo II)	0	1	1	0
15	Candidiasis urogenital	0	2	8	11
16	Accidentes de transporte en vehículos con motor	7	21	45	41
17	Vaginitis aguda	0	4	5	12
18	Ascariasis	16	224	268	169
19	Otras infecciones intestinales debidas a protozoarios	31	216	181	94
20	Heridas de la cabeza	2	64	74	63

Contenido

- 1 Enfermedades de transmisión vertical
- 2 Bacteremia y sepsis neonatal
- 3 Enfermedades respiratorias pediátricas
- 4 Enfermedades del sistema digestivo
- 5 Diagnóstico oportuno por el laboratorio
- 6 Avances en el diagnóstico de laboratorio
- 7 La calidad en el laboratorio clínico

Enfermedades de transmisión vertical

Generalidades

- ❖ Son un problema de salud pública a nivel mundial.
- ❖ Los Microorganismos (M.O.) involucrados son numerosos.
- ❖ Se deben considerar los mecanismos patogénicos, momento en que la transmisión de la infección supone mayor riesgo para el feto o neonato y las posibilidades de evitarlas o de tratamiento disponibles.
- ❖ La fuente de infección fetal es la viremia, bacteremia o parasitemia que se producen en la mujer embarazada durante una primoinfección o una infección crónica.

Vías de transmisión de las infecciones verticales

1

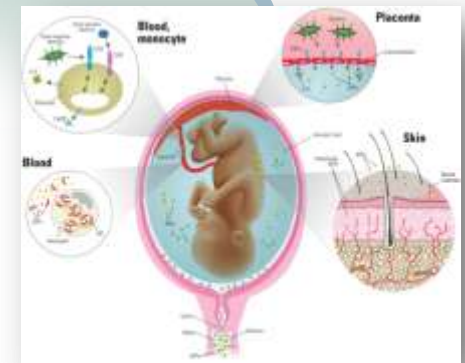
Durante el embarazo, la transmisión de estas infecciones puede ocurrir principalmente por vía transplacentaria y mucho menos frecuente por vía ascendente, dado lugar en el niño a infecciones congénitas.

2

- Durante el parto, la transmisión puede ocurrir a través del contacto con secreciones infectadas en el canal de parto, dando origen a infecciones perinatales.

3

- Después del parto, a través de la lactancia materna o contacto con las secreciones maternas dando origen a infecciones post-natales.



Principales agentes causales de infección vertical

M.O.	Transmisión	Infección en gestante asociada al riesgo de transmisión	Patología en el neonato	Riesgo de transmisión	
				Semana de gestación	Infección fetal %
Rubéola	Transplacentaria	Primoinfección	Rubéola congénita	3-12 13-16 >16	85 % 35 % Mínimo
Toxoplasma gondii	Transplacentaria	Primoinfección	Toxoplasmosis congénita	< 6 6-12 13-24 25-36 >37	1% 14% 29% > 60% 90%
Treponema pallidum	Transplacentaria Intraparto	Primaria o secundaria	Sífilis congénita Sífilis	Muy eficaz después de la cuarta semana	75%
		Latente temprana Latente tardía			40% 10%
VHB	Intraparto	HBsAg (+) Mayor riesgo HBe-Ag (+)	Hepatitis neonatal	Parto	20% si Anti-HBe(+) 90% si HBeAg (+)
VIH	Transplacentaria Intraparto	Viremia (más riesgo si es elevada)	SIDA pediátrico VIH		25% sin tratamiento <5% con tratamiento
VHC	Intraparto	Viremia elevada Mayor riesgo si VIH +	Hepatitis C		< 5-10% VIH (-) 20-30% VIH (+)

Principales agentes causales de infección vertical

M.O.	Transmisión	Infección en gestante asociada al riesgo de transmisión	Patología en el neonato	Riesgo de transmisión	
				Semana de gestación	Infección fetal %
Citomegalovirus	Transplacentaria	Primoinfección Reactivación o reinfeksi3n	CMV congénita ^a	12 24 >24	25-35% 35-45% 45-75%
	Intraparto Postparto	Reactivación o reinfeksi3n	CMV perinatal ^b	Parto y lactancia	20-50%
Herpes simple 1 y 2	Transplacentaria Intraparto	Primoinfección Reactivación Reinfeksi3n	Herpes neonatal	Pr3xima al parto	40-50% 1-3% 1-3%
Virus varicela z3ster	Transplacentaria Intraparto	Primoinfecci3n	Varicela congénita Varicela perinatal	< 28 28-36 >36	5-12 % 25 % 50 %
Parvovirus B19	Transplacentaria	Primoinfecci3n	P3rdida fetal Hydrops foetalis	< 4 5-16 > 16	0 % 15 % 25-70 %

^a Los cuadros graves se asocian con la primoinfecci3n materna durante los tres primeros meses de gestaci3n.

^b La infecci3n perinatal no se asocia con consecuencias graves para el reci3n nacido, al menos a corto y medio plazo.

Bacteremia y sepsis neonatal

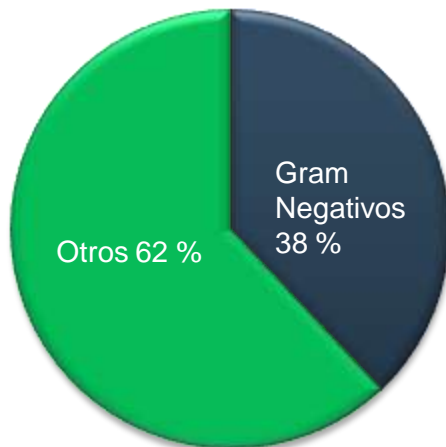
Generalidades

- Las infecciones bacterianas del recién nacido tienden a la diseminación, resultando en sepsis y meningitis, cuadros clínicos graves que requieren una oportuna sospecha, pesquisa y tratamiento precoz, para evitar la morbilidad y mortalidad potencial que tienen.
- Según la forma de adquisición, se denominan connatales (adquiridas por transmisión materna) y nosocomiales (adquiridas por contagio intrahospitalario de gérmenes en el ambiente o superficies de utensilios y muebles).
- Algunos factores de riesgo son: rotura prematura de membranas e infección materna periparto, colonización vaginal con streptococcus tipo B, trabajo de parto prematuro y otros factores, como infección urinaria de la madre, parto prolongado e instrumentación del parto.

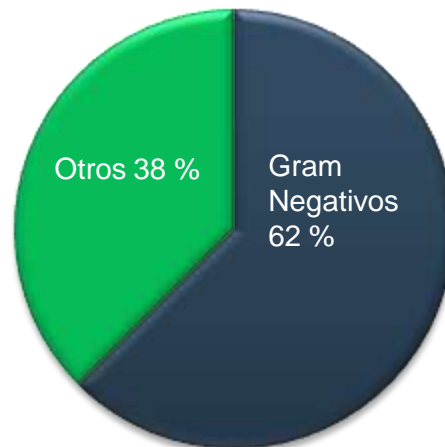
Agentes causales de sepsis

- Los agentes predominantes son las bacterias, aunque algunos virus como el herpes simple y el enterovirus han sido asociados con sepsis neonatal fulminante con una alta mortalidad.

Shock séptico



Mortalidad por sepsis



Gram negativos

Las infecciones por Gram positivos son debidos primordialmente a estreptococos del grupo B y estafilococos coagulasa negativos.

Los hongos (principalmente *Candida albicans*) pueden dirigir a sepsis neonatal fulminante, afectando predominantemente a infantes con bajo peso al nacer.

Microorganismos comúnmente implicados en la sepsis neonatal

Tipo de sepsis	Frecuentes	Menos frecuentes
Sepsis vertical	S. agalactie (EGB): 30.9% Escherichia coli: 26.8%	Listeria monocytogenes Enterococcus, Klebsiella Haemophilus influenzae, Virus (enterovirus, VHS-1)
Sepsis extrahospitalaria	EGB, E. coli, L. monocytogenes (igual que vertical) Comunitarios: S. pneumoniae y H. influenzae	
Sepsis nosocomial	Staphylococcus coagulasa negativo (SCN): 58% Bacilos gramnegativos (E. coli, Klebsiella). 29% Candida: 12%	S. aureus Enterococcus Pseudomonas Anaerobios (bacteroides)

Enfermedades respiratorias pediátricas

Generalidades

- Las infecciones respiratorias agudas son la causa mas frecuente de consulta entre las enfermedades pediátricas y son debido fundamentalmente a microorganismos virales y bacterianos.
- Algunos de los factores predisponentes a la aparición de estas enfermedades son: la variación climática, la humedad, desnutrición, contaminación ambiental, uso inadecuado de antibióticos, factores intrínsecos del huésped, sexo y edad, así como por falta de alimentación materna.
- Los virus comúnmente asociados a IRA en niños son el Virus respiratorio sincitial, adenovirus, Virus de la influenza A y B, así como virus parainfluenza.
- Las bacterias asociadas a IRA comprenden a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, entre otros.

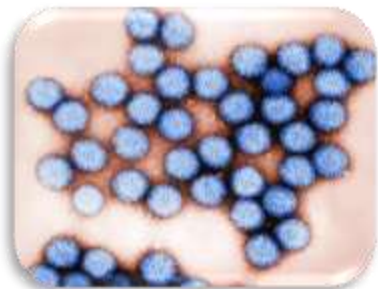
Enfermedades del sistema digestivo

Generalidades

- La presentación de diarrea en los niños puede estar acompañada de otros síntomas, como náusea, vómito, dolor estomacal, dolor de cabeza y fiebre.
- La presentación aguda puede ser señal de diferentes entidades, los casos leves pueden ser provocados por alergias o comidas, aunque puede de igual forma ser debido a una intolerancia a la lactosa.
- Los casos más serios de diarrea pueden ser causados por los virus (tal como rotavirus), bacterias (como Salmonella, E. coli o Campilobacter), parásitos (como Giardia lamblia).



Patógenos causantes de enfermedades digestivas



El Rotavirus es a nivel mundial la mayor causa de muertes infantiles. La diarrea producida varía de leve a grave y dura generalmente de 3 a 9 días.

La vía de transmisión es fecal-oral, los niños pueden difundir el virus aún antes de mostrar síntomas, usualmente por medio de objetos contaminados o las manos.



Escherichia Coli O157:H7 es transmitida a través de la comida contaminada, produce una poderosa toxina y puede causar una grave enfermedad.

La infección de este microorganismo trae consecuencias como la diarrea con sangre y en ocasiones, fallo renal. La enfermedad tiene una duración de 5 a 10 días generalmente.



Los niños pequeños, ancianos y personas con sistema inmune débil, son las más propensas a la infección por Salmonella.

Suele transmitirse por comida contaminada con excremento animal. Los síntomas empiezan de 12 a 72 horas de la infección y dura de 4 a 7 días.

En casos severos la Salmonella pasa al flujo sanguíneo.

Patógenos causantes de enfermedades digestivas



La infección por shigela produce diarrea, fiebre y calambres estomacales, en niños y ancianos puede requerir hospitalización. Se transmite de persona a persona, al tocar las heces fecales de un enfermo y después llevarse las manos a la boca, a través de los alimentos o agua contaminados.



Campylobacter afecta a infantes y adultos jóvenes, produce diarreas, calambres, dolor estomacal y fiebre de 2 a 5 días. La enfermedad dura una semana aproximadamente. Se transmite por consumir carne de ave mal cocida y puede pasar a otros alimentos cuando se almacenan juntos.

Diagnóstico oportuno por el laboratorio

Recomendaciones

- La realización de un diagnóstico adecuado por el laboratorio, conlleva una apropiada recogida de muestra. Es imprescindible mantener las condiciones de asepsia idóneas.
- Es importante que el clínico tenga conocimiento de las técnicas de recolección y transporte de muestras, para que el análisis por el laboratorio sea de la máxima efectividad.
- Las muestras han de estar bien identificadas, con la fecha y datos del paciente; es recomendable incluir algunos datos clínicos que puedan ayudar a poder correlacionar los distintos estudios de laboratorio y así darle un mejor servicio a sus pacientes.
- En caso de duda, es preferible contactar con el laboratorio antes de enviar alguna muestra en malas condiciones. Esto puede ser de crucial importancia en los pacientes graves o con muestras de difícil recogida, como la de médula ósea.

Consideraciones clínicas

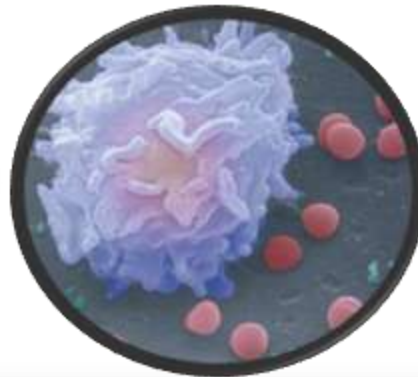
- El primer paso de un diagnóstico exitoso comienza con la obtención de la muestra clínica adecuada. La muestra debe ser representativa del proceso infeccioso que se pretende diagnosticar, y ha de tenerse siempre en cuenta que, en determinadas infecciones, algunas muestras, no relacionadas directamente con la focalidad clínica, pueden tener un buen rendimiento microbiológico. El síndrome clínico y los posibles agentes etiológicos implicados condicionan, además del tipo de muestra a enviar, el procedimiento de obtención y su transporte al laboratorio.

Decidiendo la prueba adecuada

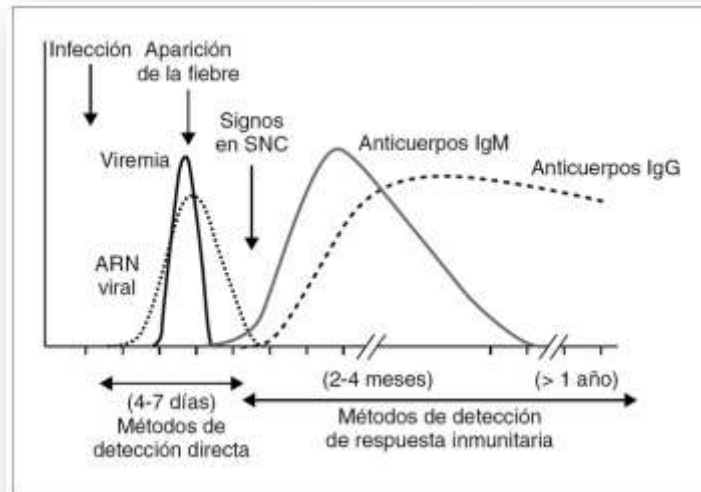
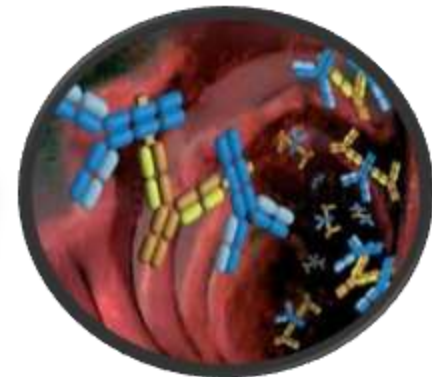
¿DNA, antígeno o anticuerpo?



VS



VS



Avances en el diagnóstico de laboratorio

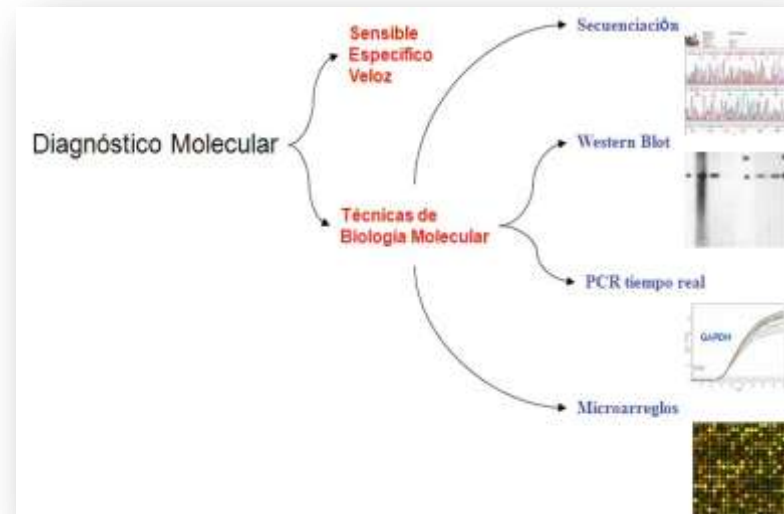
Nuestra actualidad

- Los avances dinámicos en el área de la genética, inmunología y proteómica entre otras disciplinas, así como la necesidad de los profesionales médicos de obtener resultados con máxima sensibilidad y especificidad para el manejo de patologías complejas, han difundido rápidamente el uso de técnicas moleculares y serológicas, capaces de ayudar en el diagnóstico clínico con gran precisión y veracidad, en tiempos sorprendentemente cortos, en relación con las técnicas convencionales.



Diagnóstico molecular de las enfermedades infecciosas

- Las técnicas moleculares aplicadas al diagnóstico ofrecen mayor sensibilidad, especificidad y rapidez con requerimientos mínimos de muestra, en comparación con las pruebas convencionales. Esto permite el inicio temprano del mejor esquema terapéutico, disminuyendo de esta manera la probabilidad de complicaciones.
- Las técnicas moleculares aplicadas al diagnóstico de enfermedades infecciosas en ocasiones superan las limitaciones que imponen los organismos para su aislamiento.

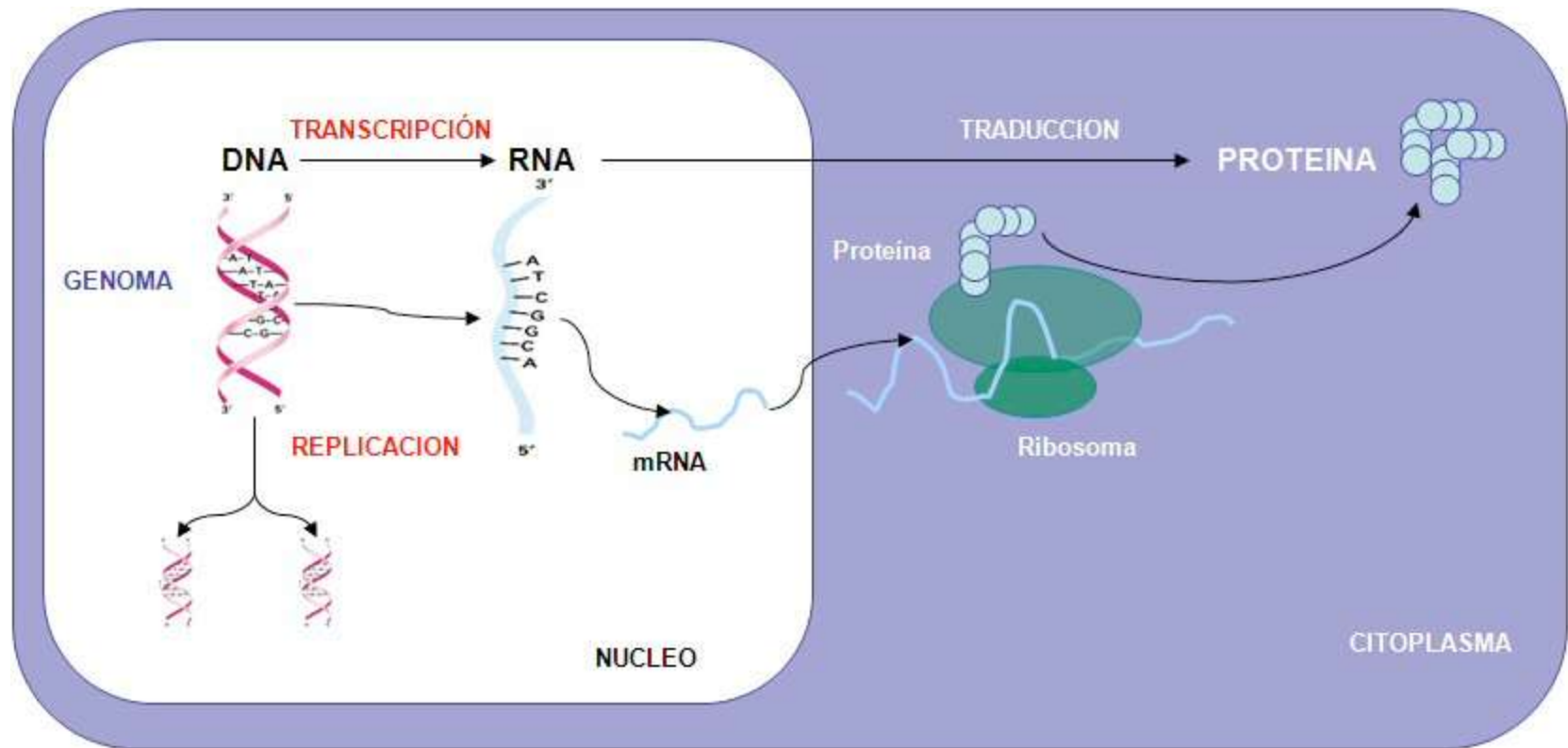


Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)



www.dnalc.org

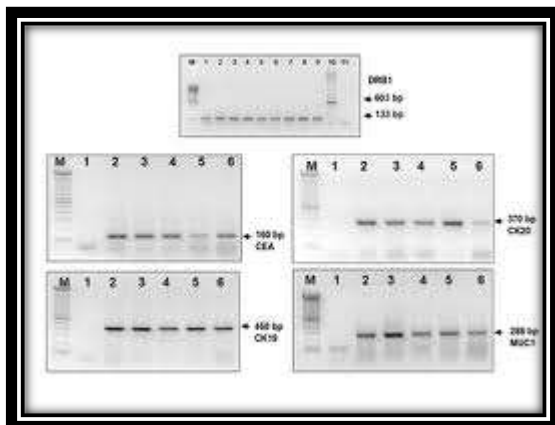
Dogma central de la biología molecular



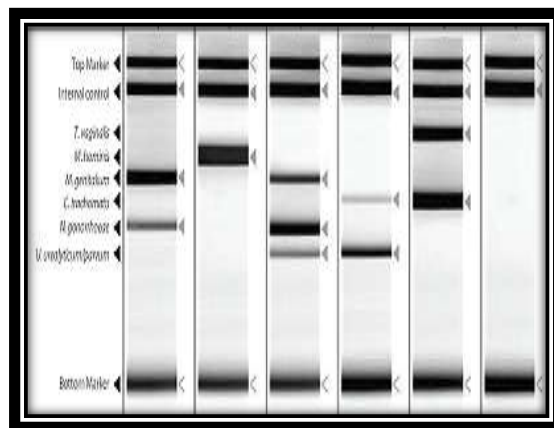
Variantes de la PCR y sus ventajas

- La PCR es una técnica de la biología molecular, prácticamente indispensable en cualquier tipo de procedimientos médicos y biológicos y tiene múltiples ocupaciones.
- Dentro del diagnóstico de enfermedades infecciosas se cuenta con variantes de la misma técnica:

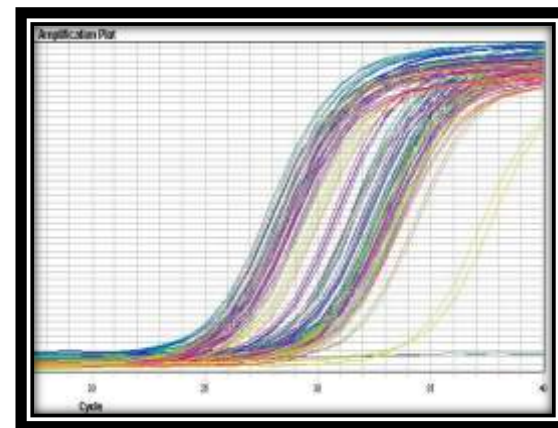
PCR convencional



PCR multiplex



PCR tiempo real



Pruebas disponibles para fines diagnósticos

PCR convencional

Leptospira

Rickettsia

Ehrlichia

Chlamydia trachomatis

Mycobacterium tuberculosis



PCR en tiempo real

Carga viral de hepatitis C

Carga viral de VIH

Carga viral de virus de Epstein barr



Pruebas disponibles para fines diagnósticos

PCR multiplex

Panel de ETS

- Trichomonas vaginalis
- Mycoplasma hominis
- Mycoplasma genitalium
- Chlamydia trachomatis
- Neisseria gonorrhoeae
- Ureaplasma urealyticum/parvum

Panel de HPV

- HPV 16
- HPV 18
- High-risk HPV
- Low-risk HPV

Panel de Bacterias respiratorias

- Streptococcus pneumoniae*
- Haemophilus influenzae*
- Chlamydophila pneumoniae*
- Legionella pneumophila*
- Bordetella pertussis*
- Mycoplasma pneumoniae*

Panel de virus respiratorios

- Adenovirus
- Coronavirus 229E/NL63
- Parainfluenza virus 1
- Parainfluenza virus 2
- Parainfluenza virus 3
- Influenza A virus
- Influenza B virus
- Respiratory syncytial virus A
- Respiratory syncytial virus B
- Rhinovirus A
- Coronavirus OC43

Panel de PCR para sepsis

Sepsis ID 1 : Fungi

Candida albicans *Candida glabrata*
Candida tropicalis *Candida krusei*
Candida parapsilosis *Aspergillus fumigatus*

Sepsis ID 2 : Gram (+) bacteria 1

Enterococcus faecium/faecalis
Staphylococcus spp. (22) 1*
Staphylococcus aureus
Staphylococcus epidermidis
Staphylococcus haemolyticus

Sepsis ID 3 : Gram (+) bacteria 2

Streptococcus agalactiae
Streptococcus pneumoniae
Streptococcus pyogenes
Streptococcus mitis
Streptococcus spp. (24) 2*

Sepsis ID 4 : Gram (-) bacteria 1

Enterobacter aerogenes *Enterobacter cloacae*
Serratia marcescens *Klebsiella oxytoca*
Klebsiella pneumoniae

Sepsis ID 5 : Gram (-) bacteria 2

Pseudomonas aeruginosa
Escherichia coli
Proteus mirabilis
Stenotrophomonas maltophilia
Acinetobacter baumannii

1*. Screening among 22 different species in the genus *Staphylococcus* including *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. pasteuri*, *S. warneri*, *S. cohnii* subsp. *urealyticum*, *S. hominis* subsp. *hominis*, *S. caprae*, *S. xylosus*, *S. equorum*, *S. simulans*, *S. arlettae*, *S. kloosii*, *S. gallinarum*, *S. auricularis*, *S. chromogenes*, *S. delphini*, *S. intermedius*, *S. hominis* subsp. *novobiosepticus*, *S. lugdunensis*, *S. capitis* subsp. *ureolyticus*, *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*.

2*. Screening among 24 different species in the genus *Streptococcus* including *S. pneumoniae*, *S. agalactiae*, *S. pyogenes*, *S. mitis*, *S. anginosus*, *S. gordonii*, *S. intermedius*, *S. oralis*, *S. parasanguinis*, *S. sanguinis*, *S. vestibularis*, *S. alactolyticus*, *S. criceti*, *S. downei*, *S. ferus*, *S. gallinaceus*, *S. hyointestinalis*, *S. lutetiensis*, *S. macacae*, *S. parauberis*, *S. suis*, *S. constellatus* subsp. *constellatus*, *S. cristatus*, *S. mutans*.

Ventajas y desventajas de las pruebas de BM

PCR

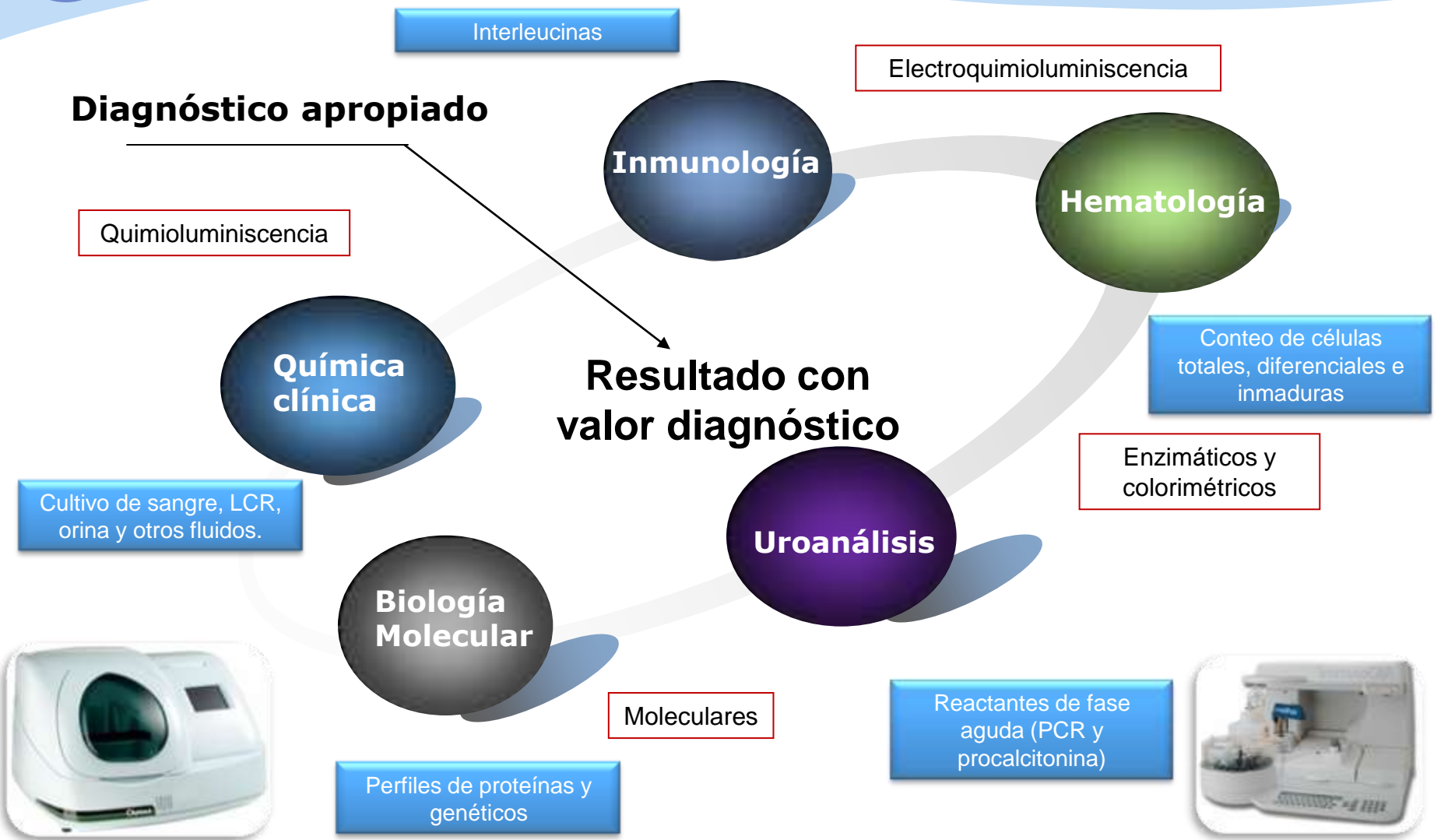
Ventajas

- Sensible
- Específica
- Rápida
- Independiente del tratamiento
- Práctica
- Eficiente
- Competitiva

Desventajas

- Capacitación
- Equipos especiales
- Reactivos validados externamente
- Conocimientos técnicos
- Cuidados en el manejo
- Sistemas con bajo umbral de contaminación

Avance integral del laboratorio clínico



Diagnóstico apropiado

Interleucinas

Electroquimioluminiscencia

Inmunología

Hematología

Quimioluminiscencia

Resultado con valor diagnóstico

Conteo de células totales, diferenciales e inmaduras

Química clínica

Enzimáticos y colorimétricos

Cultivo de sangre, LCR, orina y otros fluidos.

Uroanálisis

Biología Molecular

Reactantes de fase aguda (PCR y procalcitonina)

Moleculares

Perfiles de proteínas y genéticos





**Biomédicos
de Mérida**

LABORATORIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS

Gracias por su atención!

La calidad nunca es un accidente; siempre es el resultado de un esfuerzo de la inteligencia...