

APLICACIONES DEL LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR

Módulo 4. Clase 1 **1era parte: VIH y hepatitis virales**

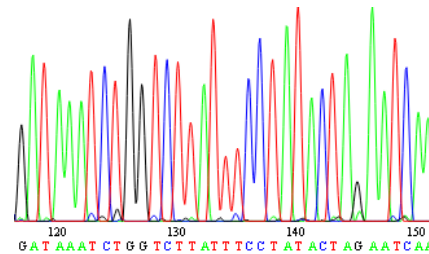
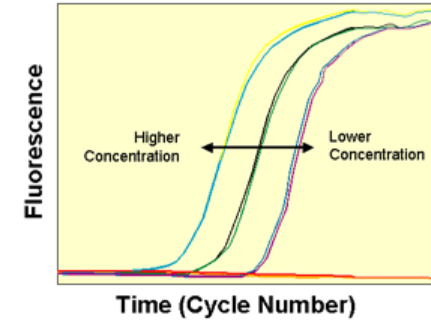
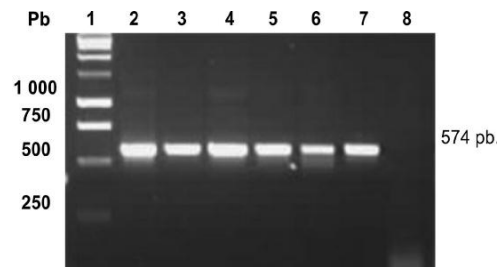
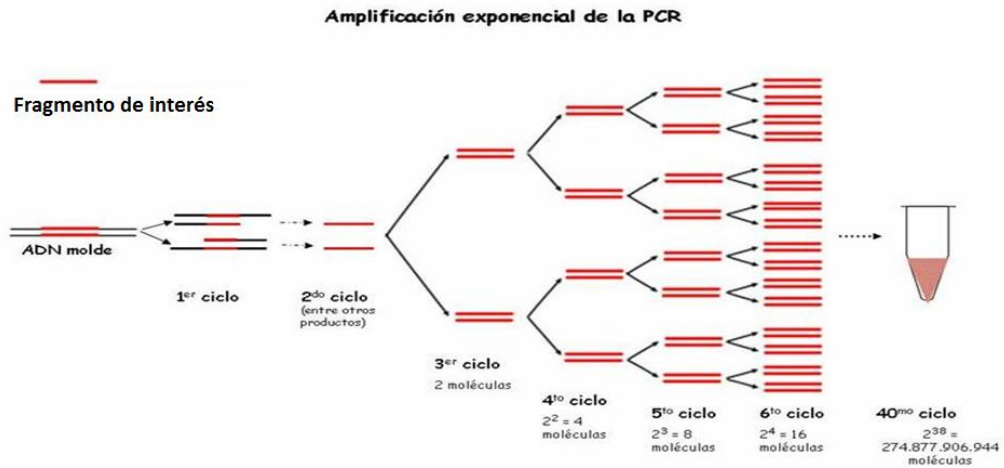
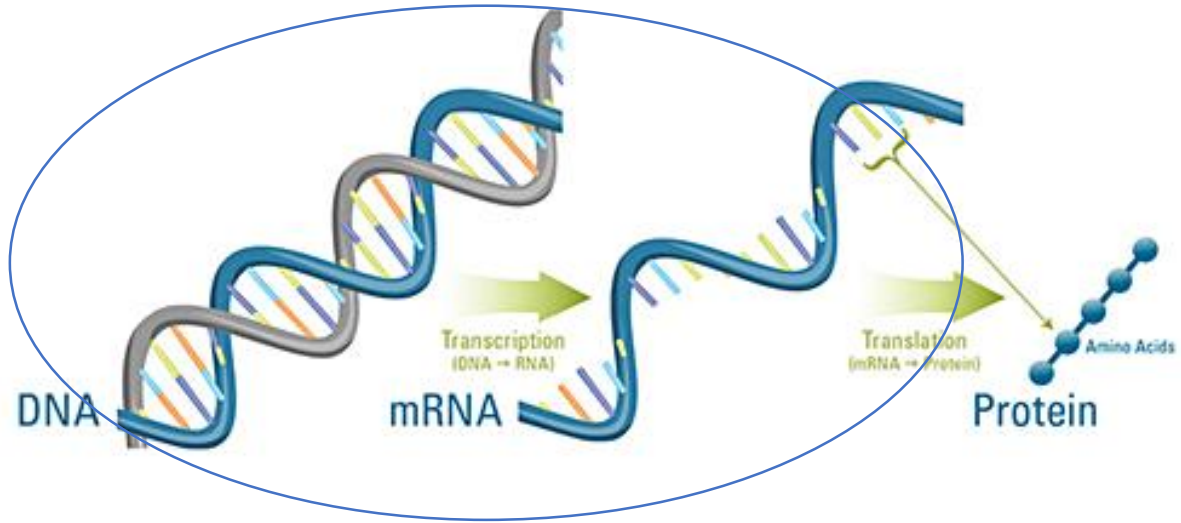
Lic. Javier Sfalcin

Supervisor Biología Molecular

Laboratorio CIBIC

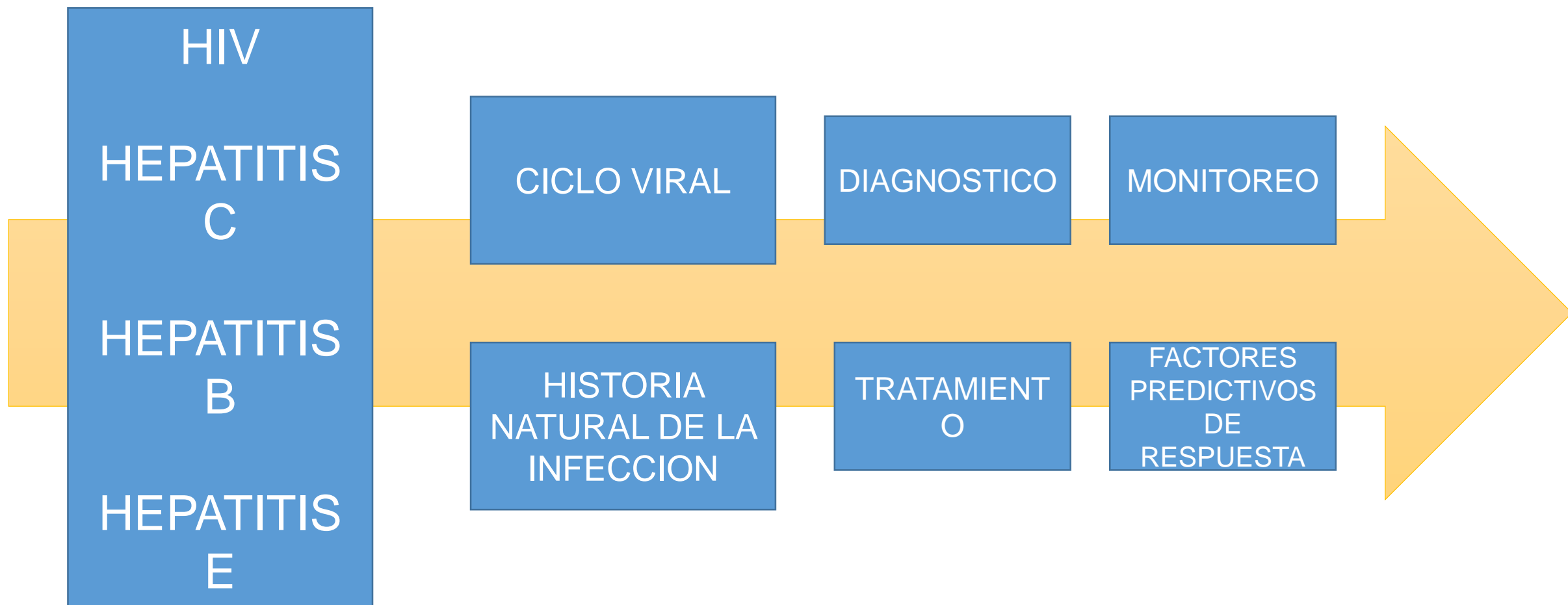
BIOLOGIA MOLECULAR

MACROMOLECULAS

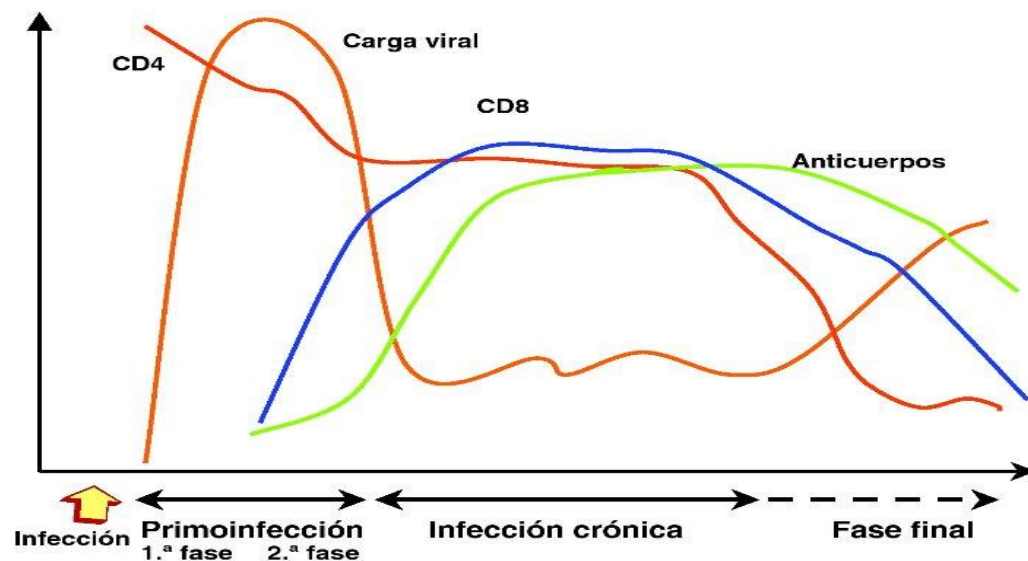
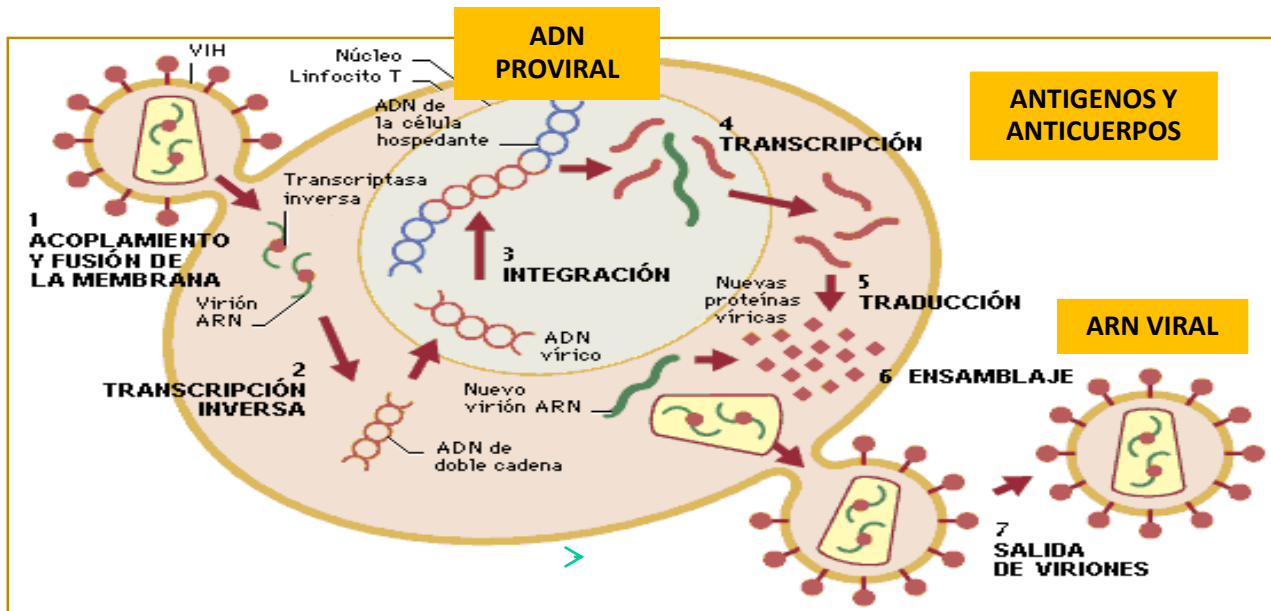


APLICACIONES BIOLOGIA MOLECULAR EN EL ESTUDIO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS

- Diagnóstico
- Monitoreo de la evolución de la infección
- Seguimiento y control del tratamiento
- Evaluación de factores predictivos de evolución de la infección y de respuesta al tratamiento

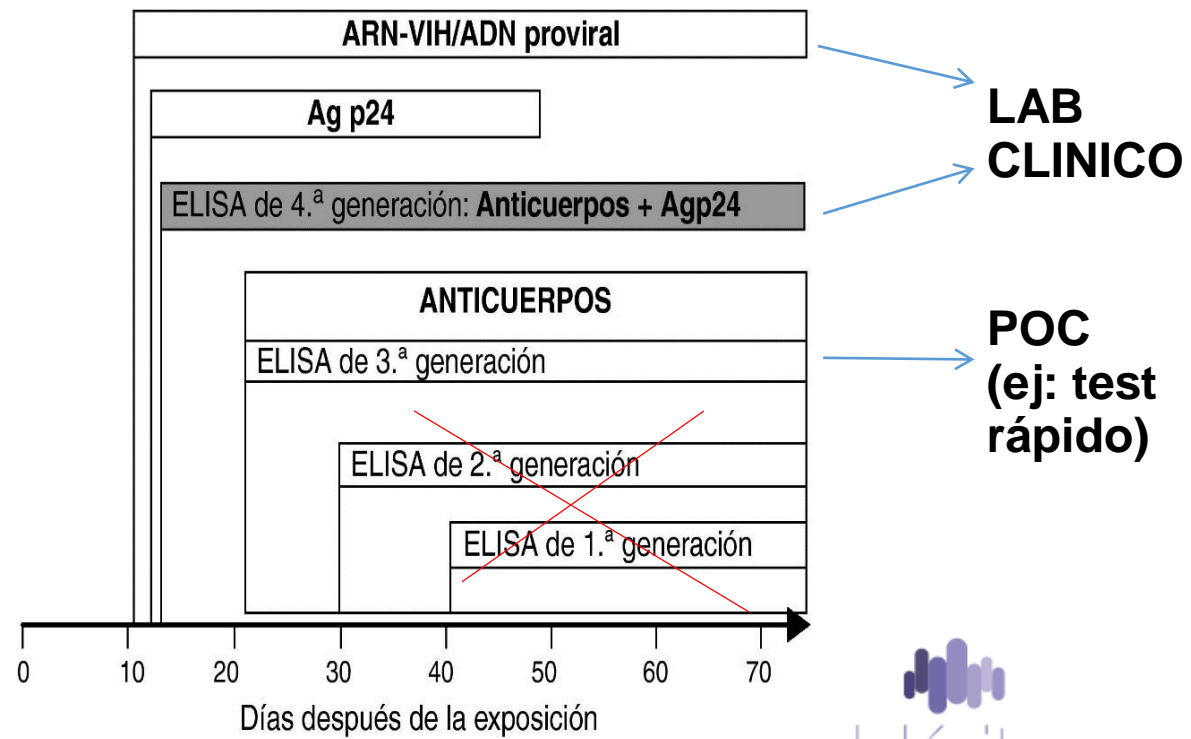


VIH



METODOS MOLECULARES

METODOS SEROLÓGICOS



METODOS MOLECULARES

DETECCIÓN DE ADN PROVIRAL: DIAGNOSTICO

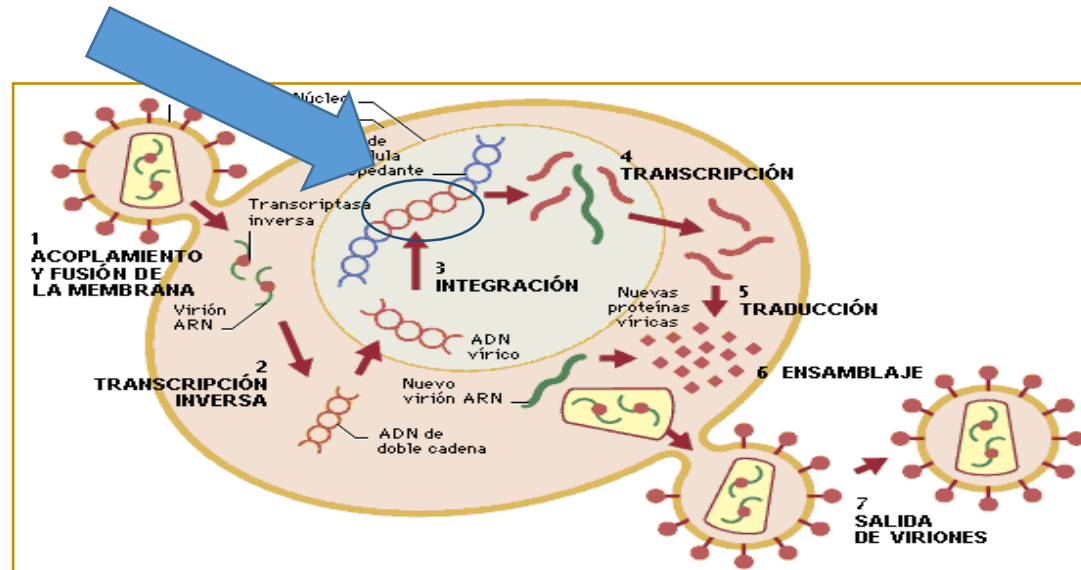
MOLÉCULA A DETECTAR: ADN INTEGRADO EN EL GENOMA HUMANO

TIPO DE MUESTRA: SANGRE ENTERA CON EDTA

TIPO DE TEST: PCR CUALITATIVA (PCR EN TIEMPO REAL, PCR PUNTO FINAL)

RESULTADOS POSIBLES: DETECTABLE O NO DETECTABLE

SENSIBILIDAD: INTERMEDIA (RECIÉN NACIDOS, 30% DE FALSOS NEGATIVOS)



METODOS MOLECULARES

CUANTIFICACION DE ARN VIRAL (Carga Viral): DIAGNOSTICO Y CONTROL DE TARV

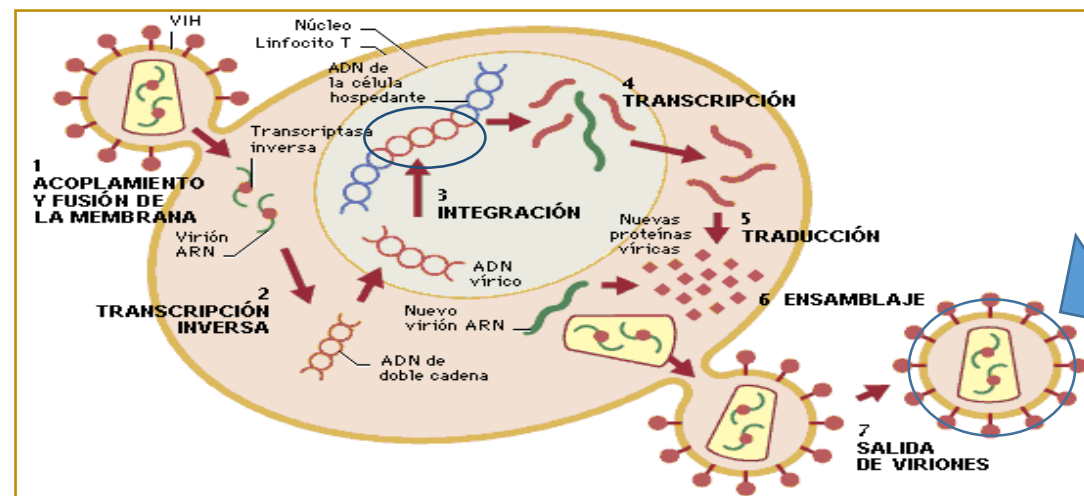
MOLECULA A DETECTAR: ARN VIRAL

TIPO DE MUESTRA: PLASMA CON EDTA

TIPO DE TEST: RT/PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL

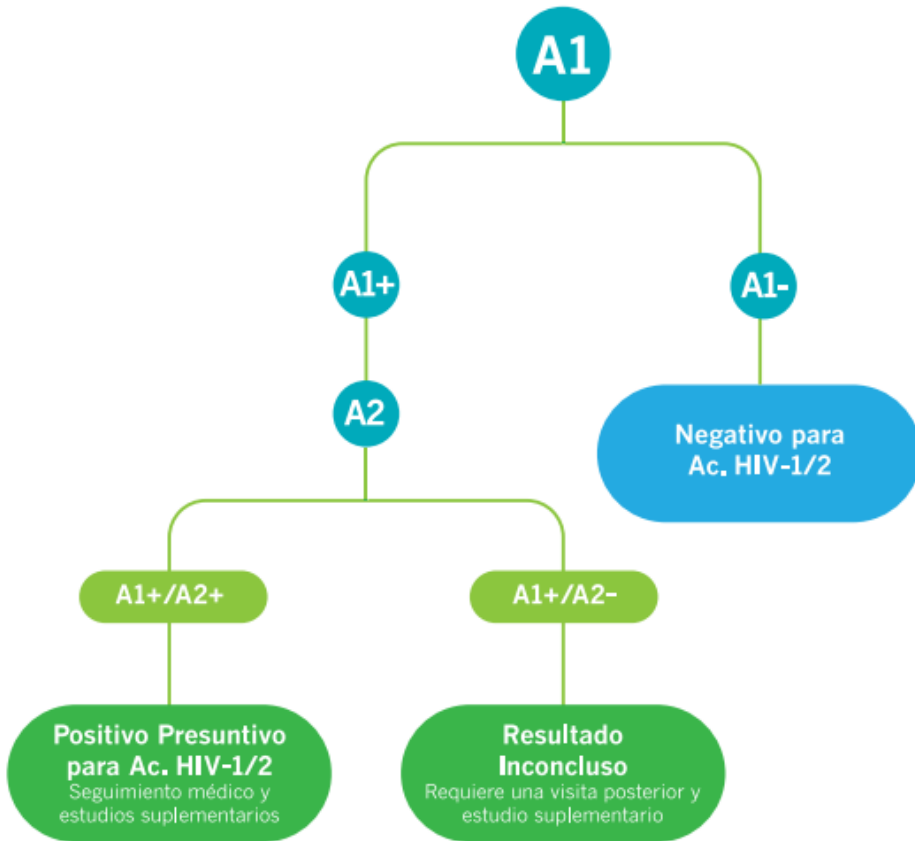
RESULTADOS POSIBLES: 20-10.000.000 cop/mL, 1,3 – 7 logs

SENSIBILIDAD: ALTA



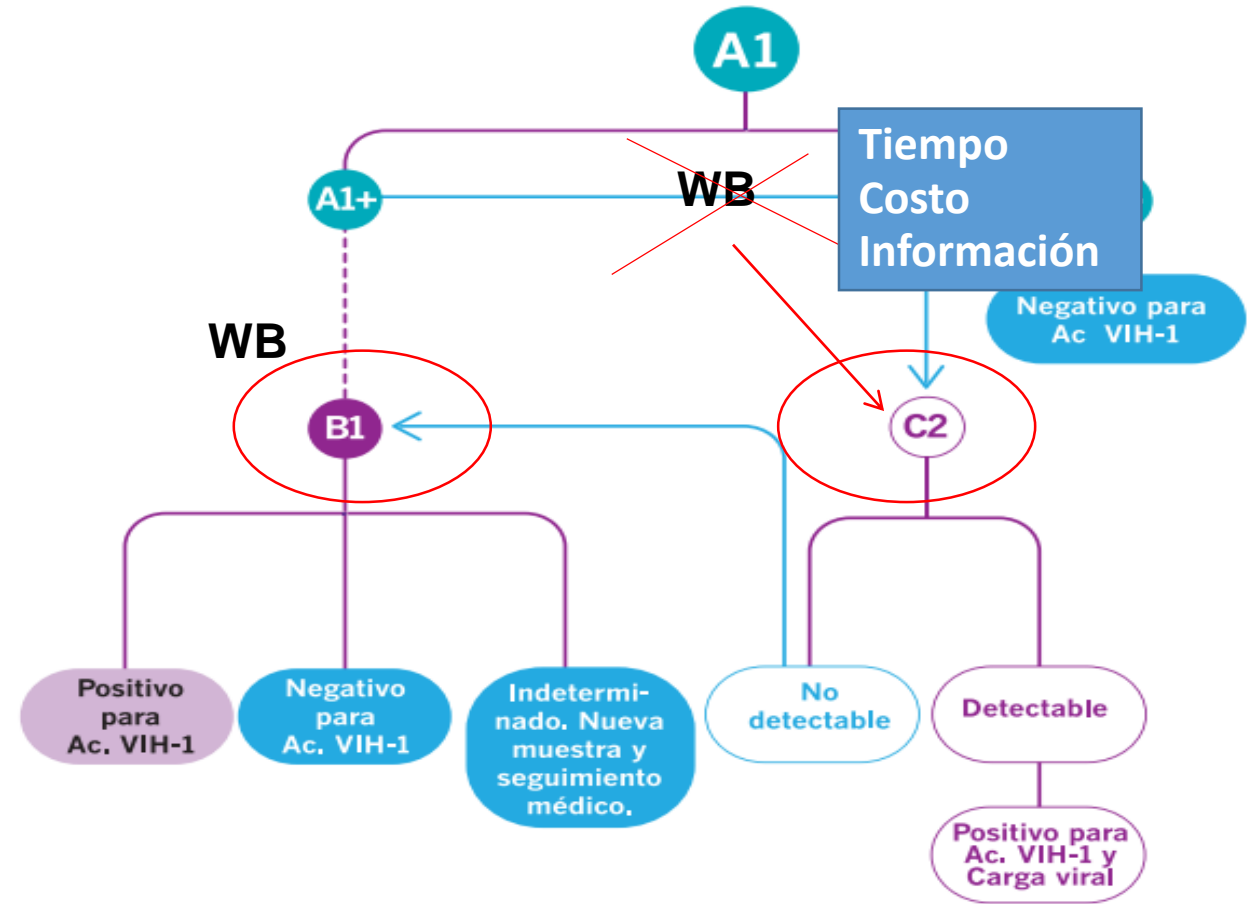
DIAGNOSTICO DE VIH EN ADULTOS

Centros de salud, POC, testeo voluntario



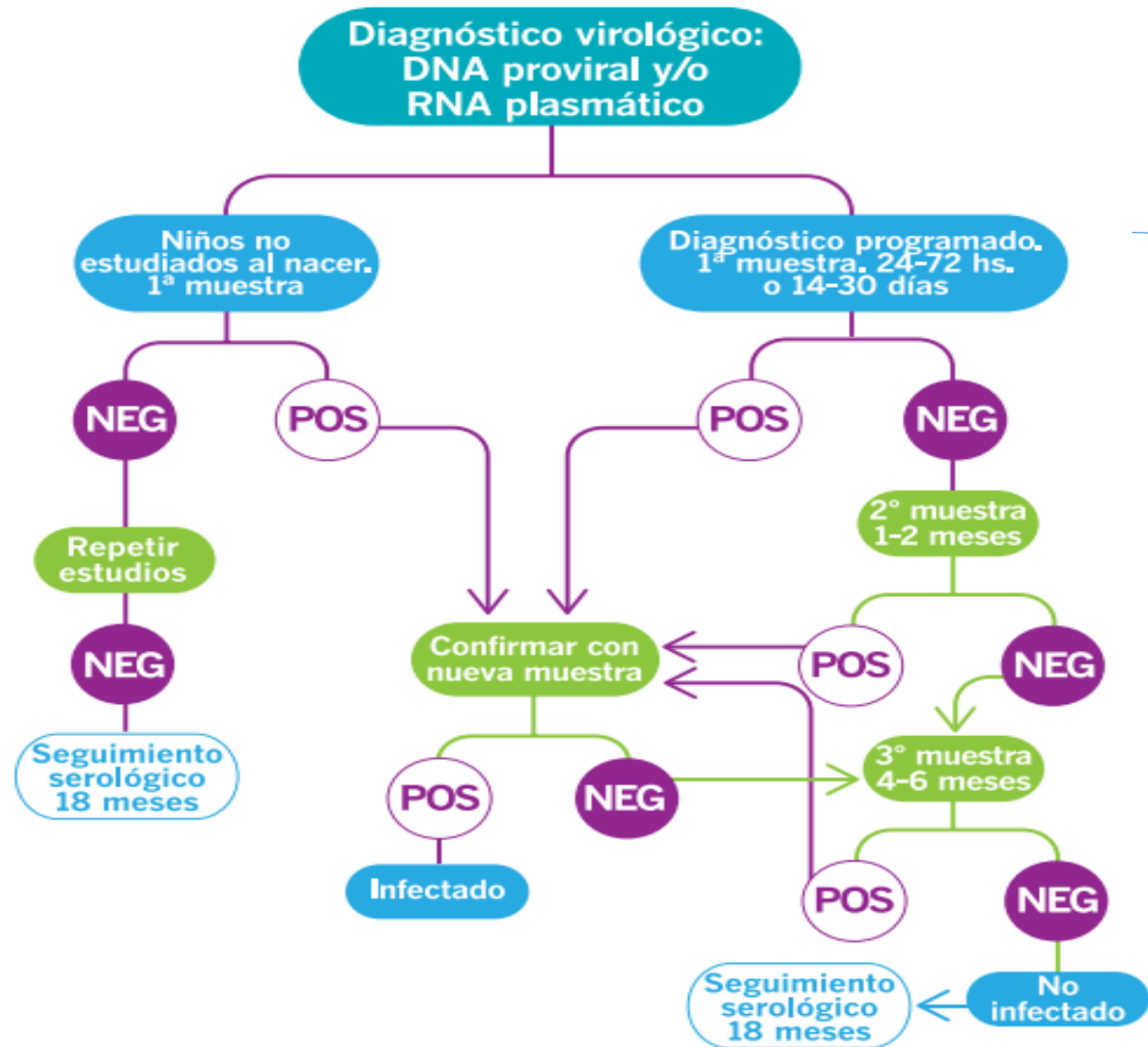
A1: TEST RAPIDO, A2: TEST RAPIDO (otra marca, menor sensibilidad)

Laboratorio Clínico



A1: ELISA DE 4TA GENERACIÓN, B1: WESTERN BLOT, C2: CARGA VIRAL

VIH EN PEDIÁTRICOS (<18 MESES) (MADRES O PADRES VIH POSITIVOS)



DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO

(EL ANTI-HIV NO SE UTILIZA ANTES DE LOS 18 MESES)

CARGA VIRAL

RECOMENDACION PARA LA EVALUACIÓN DE UN RECIÉN NACIDO DENTRO DE LAS 48 HS. (excepción: en tratamiento profiláctico se reemplaza por el ADN proviral)

IMPORTANTE AGOTAR TODAS LAS ETAPAS DEL DIAGNOSTICO

Si la muestra llega antes del mes de vida se sigue el algoritmo de diagnóstico programado, de lo contrario realizar 2 determinaciones virológicas (la segunda de los 4-6 meses de vida).

TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL

TARV: combinación de drogas antirretrovirales

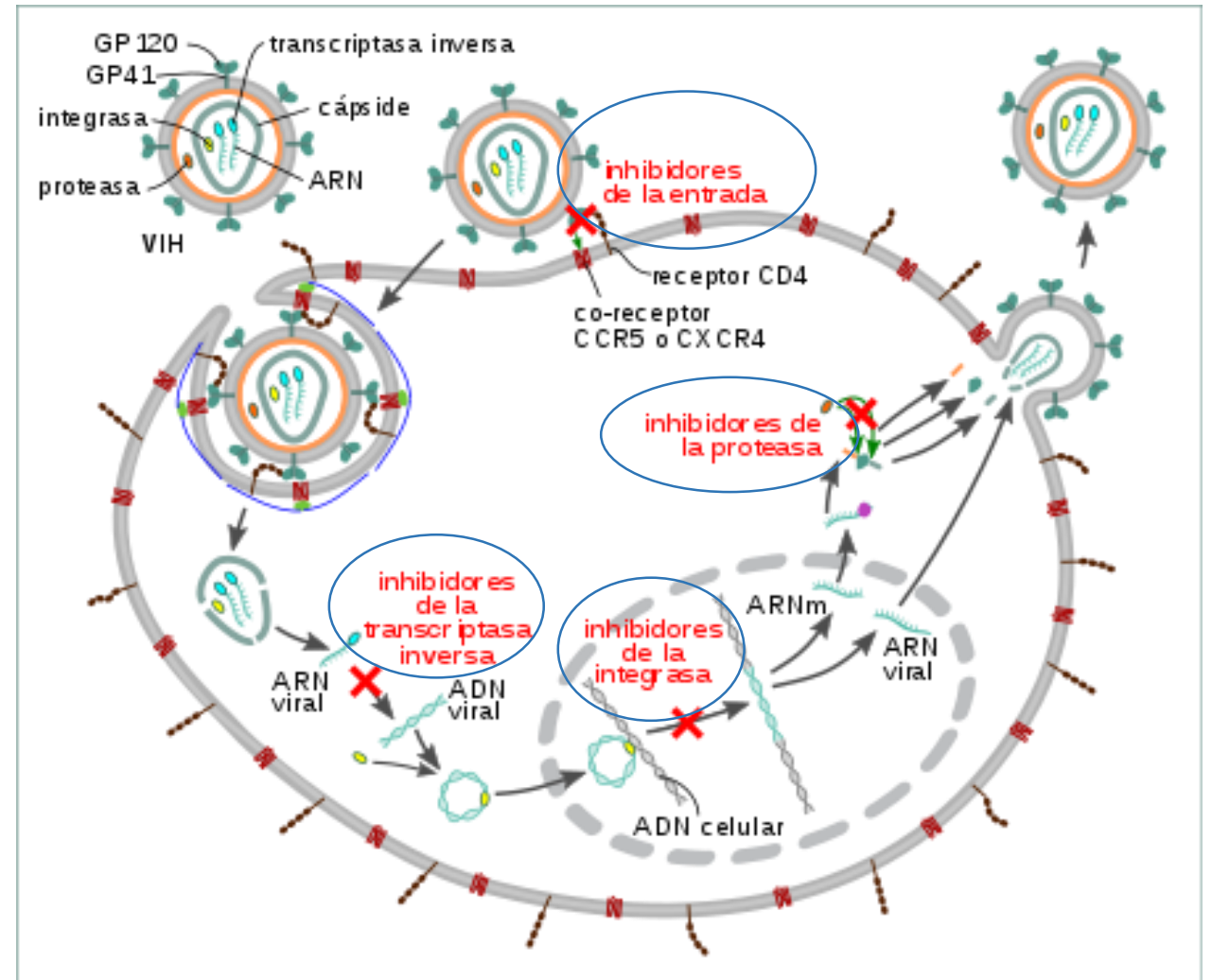
OBJETIVO: SUPRESIÓN DE LA CARGA VIRAL

INHIBIDORES DE LA PROTEASA

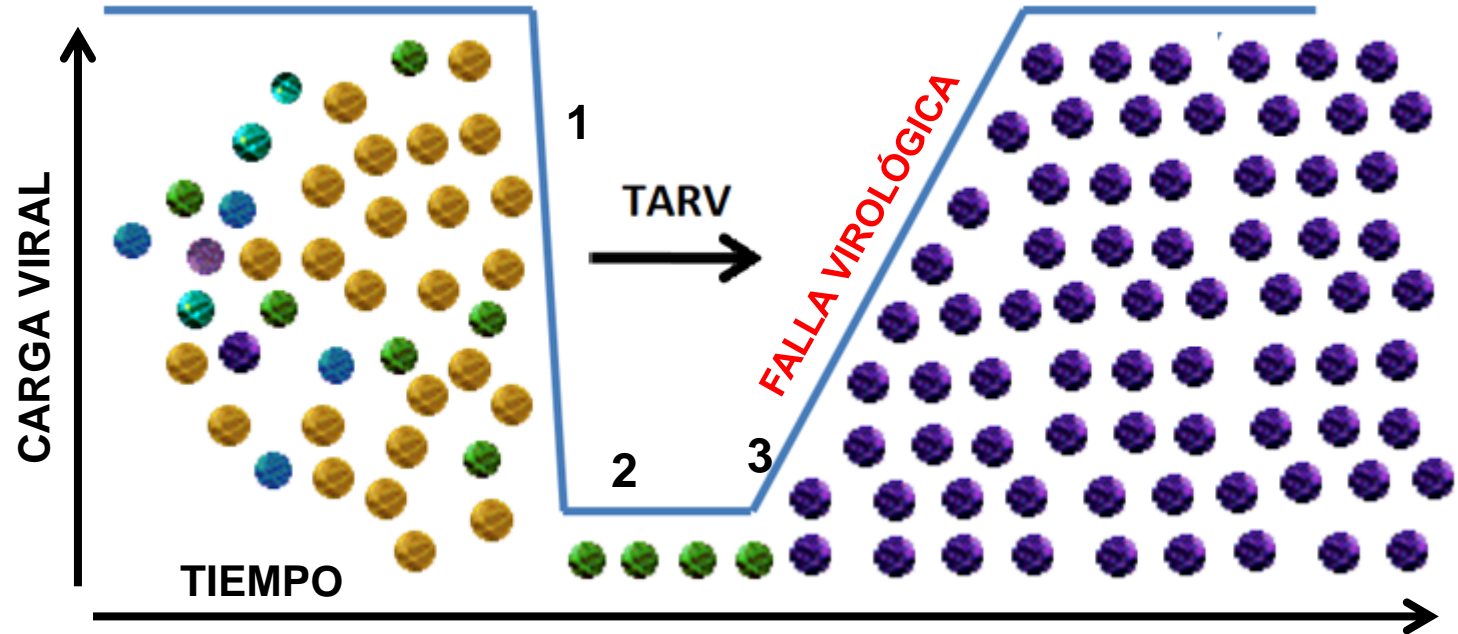
INHIBIDORES DE LA
RETROTRANSCRIPTASA

INHIBIDORES DE LA INTEGRASA

ANTAGONISTAS DE CCR5
(INHIBIDORES DE ENTRADA)



MONITOREO DEL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL



MONITOREO CON CARGA VIRAL CADA 6 MESES*

*eventualmente cada 3 meses
(ante un blip o probable falla
viroológica)

1- RESPUESTA AL TRATAMIENTO

2- CONTROL DE ADHERENCIA Y
SUPRESION VIRAL

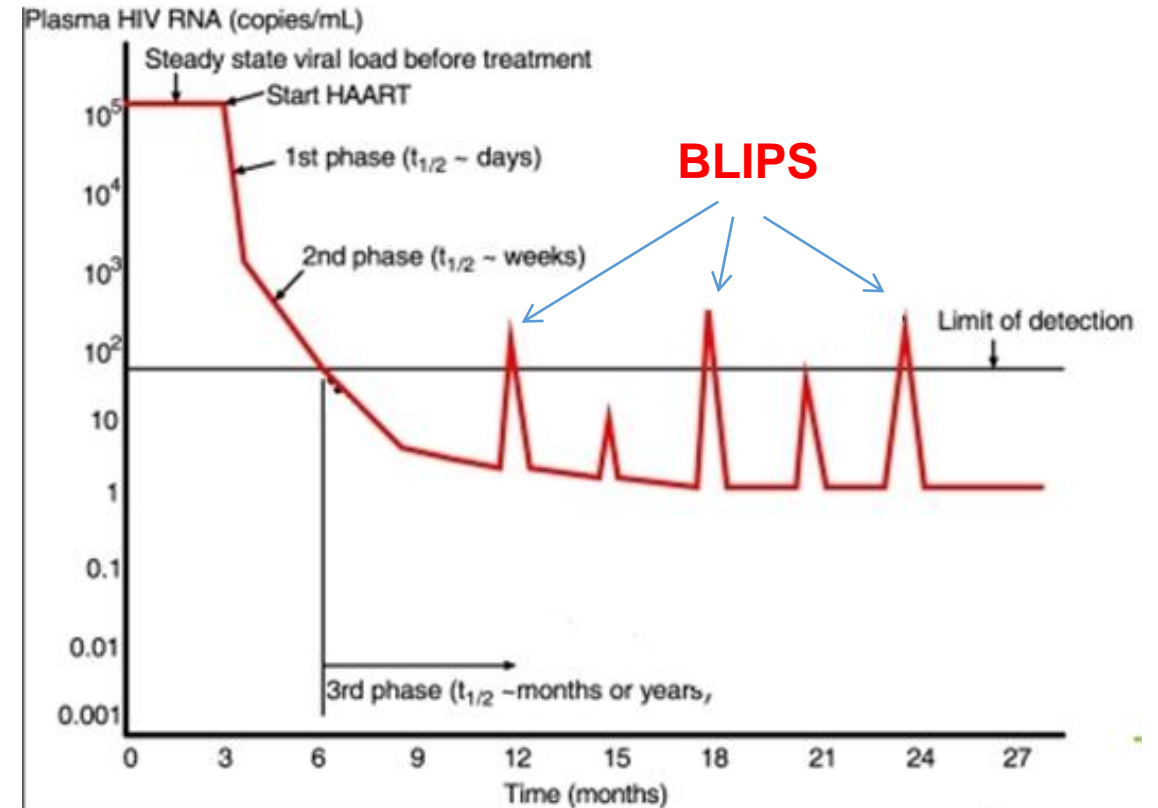
3- DETECCION DE FALLA VIROLÓGICA

BLIP EN HIV

DEFINICIÓN: Aumento de CV transitoria apenas por encima del límite de detección /cuantificación que vuelve a no detectable en corto período de tiempo

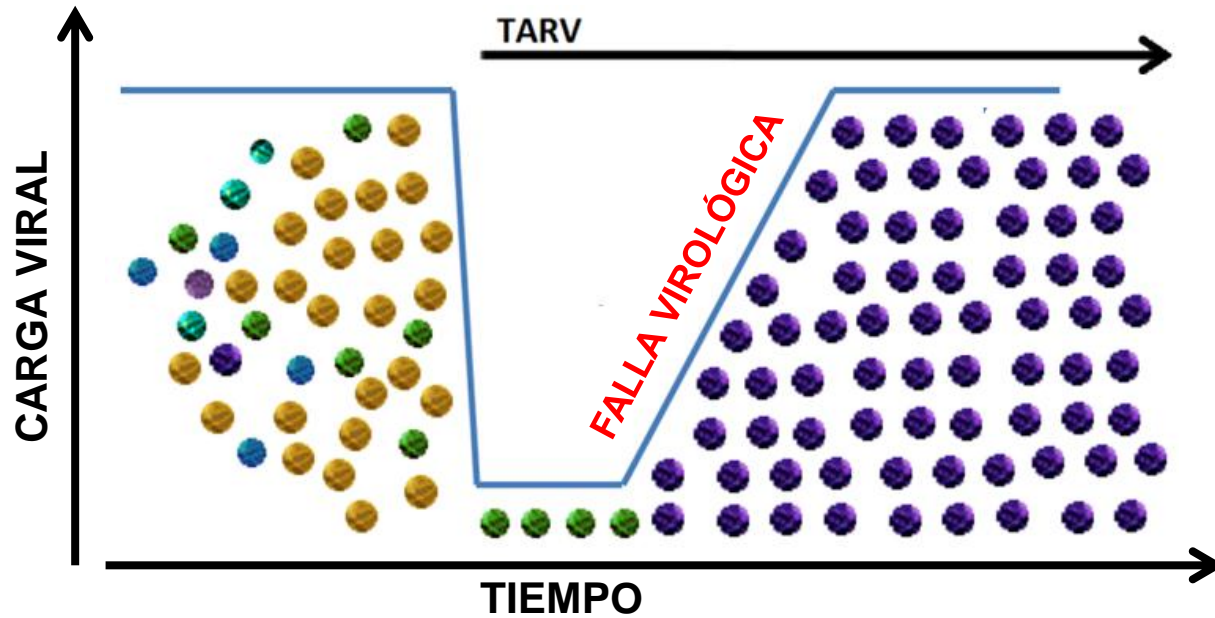
CAUSAS:

- Falta de adherencia
- Alteraciones del sistema inmune
- Otras causas desconocidas

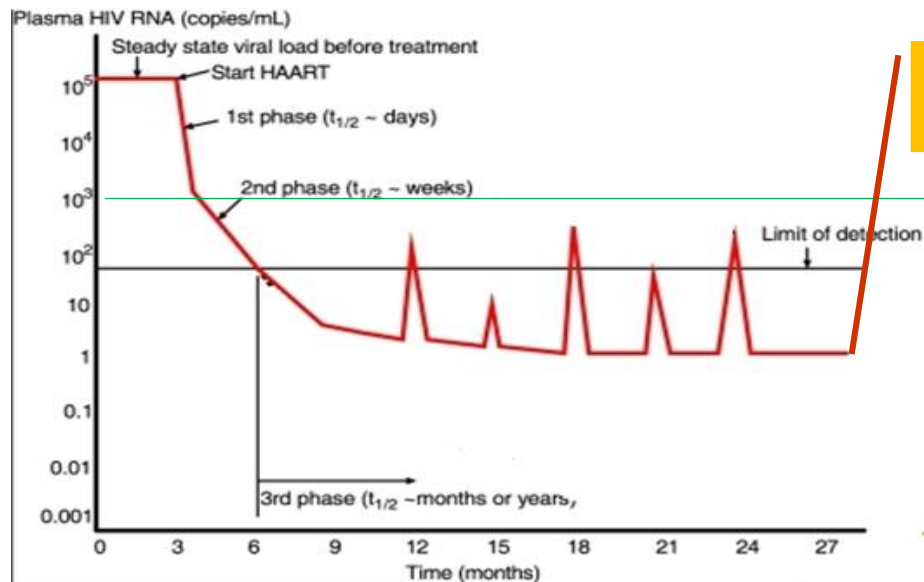


CARGA VIRAL CADA 3 MESES PARA EVALUAR SI ES BLIP O FALLA

FALLA VIROLOGICA EN HIV



- Carga viral detectable >1000 cop/ml
- Dos CV consecutivas mayores a 500 cop/ml
- No se logra supresión virológica (CV=ND)



>500-1000 cop/ml

MODIFICAR TARV

HIV RESISTENCIA

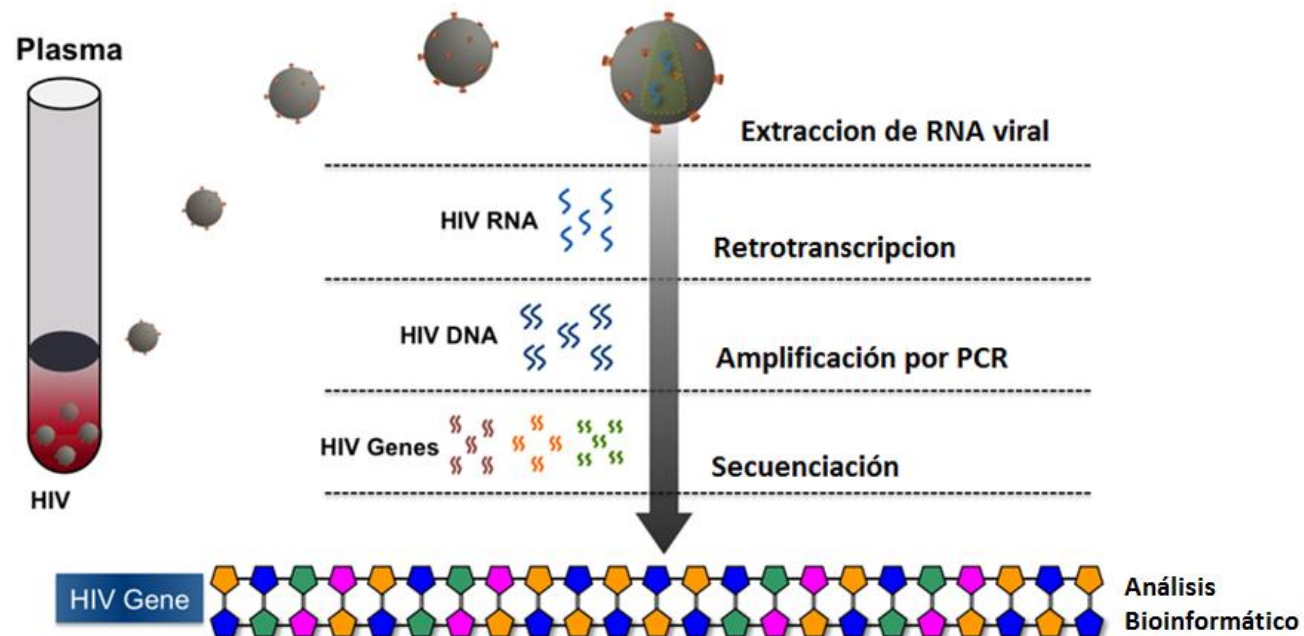
FALLA VIROLOGICA

MUTACIONES ASOCIADAS A RESISTENCIA

DISPONIBILIDAD DE TEST DE RESISTENCIA

SI

NO



TIPO DE MUESTRA: PLASMA CON EDTA

SENSIBILIDAD: 20% (SANGER) / 1% (NGS)

**EMPIRICAMENTE: SEGÚN
GUIAS DE RECOMENDACIONES**

HIV RESISTENCIA

Mutation Scoring: RT

Drug Resistance Interpretation: RT

NRTI Resistance Mutations: **D67G, K70E, M184V**
 NNRTI Resistance Mutations: **E138A**
 Other Mutations: E6D, V35T, T39L, V60I, I142V, I202IV, R211K

Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors

abacavir (ABC) Intermediate Resistance
zidovudine (AZT) Susceptible
emtricitabine (FTC) High-Level Resistance
lamivudine (3TC) High-Level Resistance
tenofovir (TDF) Low-Level Resistance

Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors

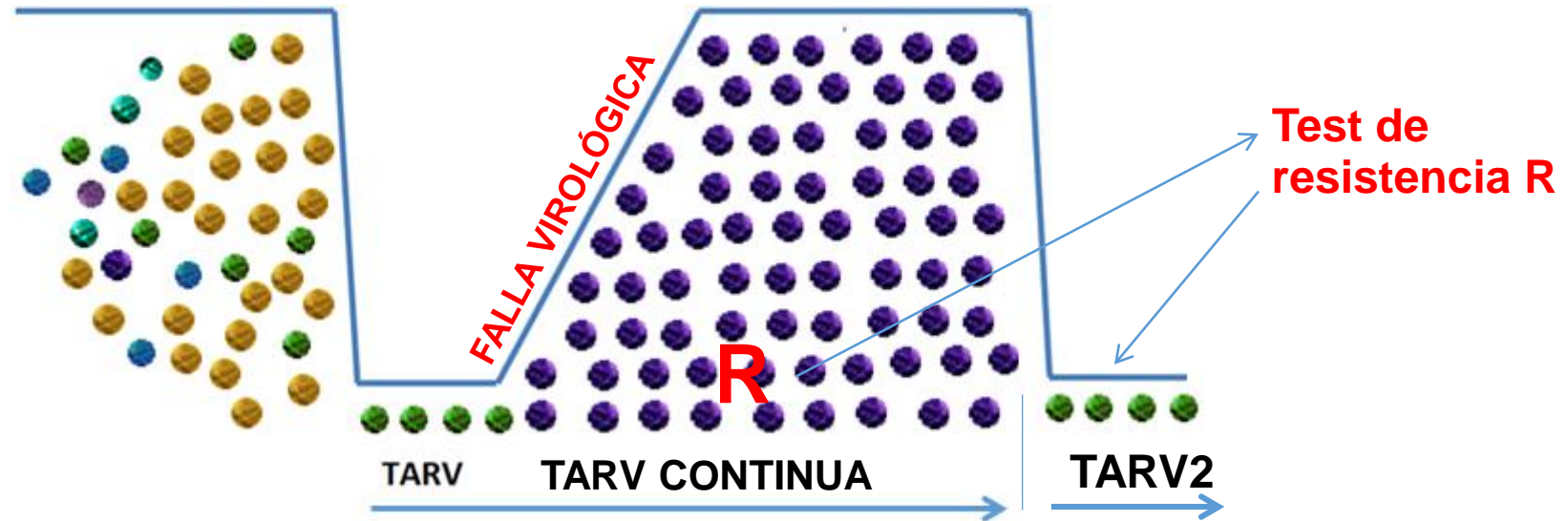
efavirenz (EFV) Susceptible
etravirine (ETR) Potential Low-Level Resistance
nevirapine (NVP) Susceptible
rilpivirine (RPV) Low-Level Resistance

AZT	FTC	3TC	TDF
10	0	0	5
-10	10	10	15
-10	60	60	-10
0	0	0	10
-10	70	70	20

ETR	NVP	RPV
10	0	15
10	0	15

<https://hivdb.stanford.edu/>

CÓMO SOLICITAR EL TEST DE RESISTENCIA EN LA FALLA VIROLÓGICA???



INMEDIATAMENTE SOSPECHADA LA FALLA
SIN DISCONTINUAR TARV

HIV RESISTENCIA

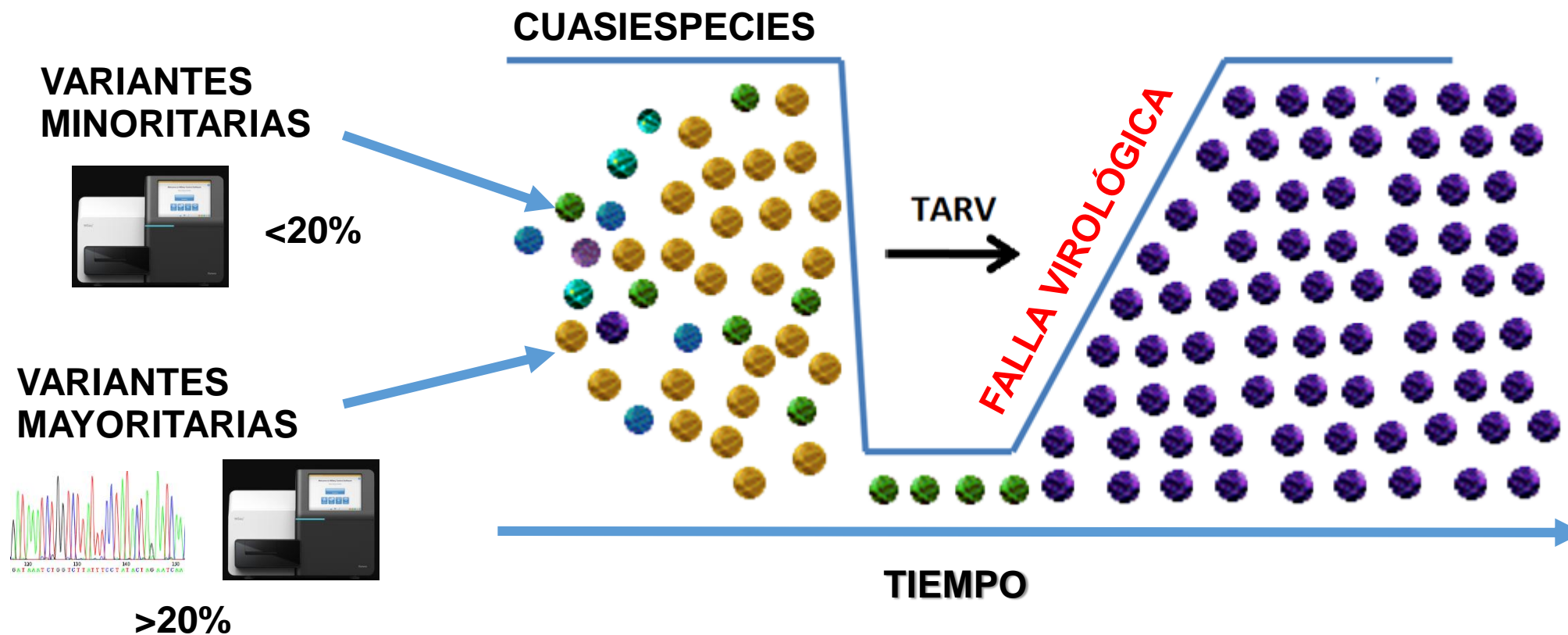
Estatus del paciente	IAS-USA	DHHS	EUROPA
PRIMARIA/AGUDA	RECOMENDADO	RECOMENDADO	RECOMENDADO
PROFILAXIS POS EXPOSICION	-	-	RECOMENDADO
CRONICO, TRATAMIENTO NAIVE	CONSIDERAR	RECOMENDADO	FUERTEMENTE RECOMENDADO
FALLA	RECOMENDADO	RECOMENDADO	RECOMENDADO
EMBARAZADAS	RECOMENDADO	RECOMENDADO	RECOMENDADO
PEDIATRICO	-	-	RECOMENDADO

HIV RESISTENCIA

Estatus del paciente	IAS-USA	DHHS	EUROPA
PRIMARIA/AGUDA	RECOMENDADO	RECOMENDADO	RECOMENDADO
PROFILAXIS POST-EXPOSICION	RECOMENDADO	RECOMENDADO	RECOMENDADO
CRONICO, TRATAMIENTO	RECOMENDADO	RECOMENDADO	RECOMENDADO
FALLA	RECOMENDADO	RECOMENDADO	RECOMENDADO
EMBARAZADAS	RECOMENDADO	RECOMENDADO	RECOMENDADO
PEDIATRICO	-	-	RECOMENDADO

**LA RESISTENCIA
ES UTIL
EN TODOS LOS ESCENARIOS**

HIV RESISTENCIA POR NGS



**VARIANTES MINORITARIAS: NO PUEDEN SER DETECTADAS
POR MÉTODOS CONVENCIONALES**

HIV RESISTENCIA POR NGS

Published in final edited form as:

JAMA. 2011 April 6; 305(13): 1327–1335. doi:10.1001/jama.2011.375.

CUAS

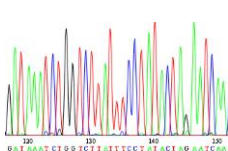
Minority HIV-1 Drug Resistance Mutations and the Risk of NNRTI-based Antiretroviral Treatment Failure: A Systematic Review and Pooled Analysis

VARIANTES MINORITARIAS

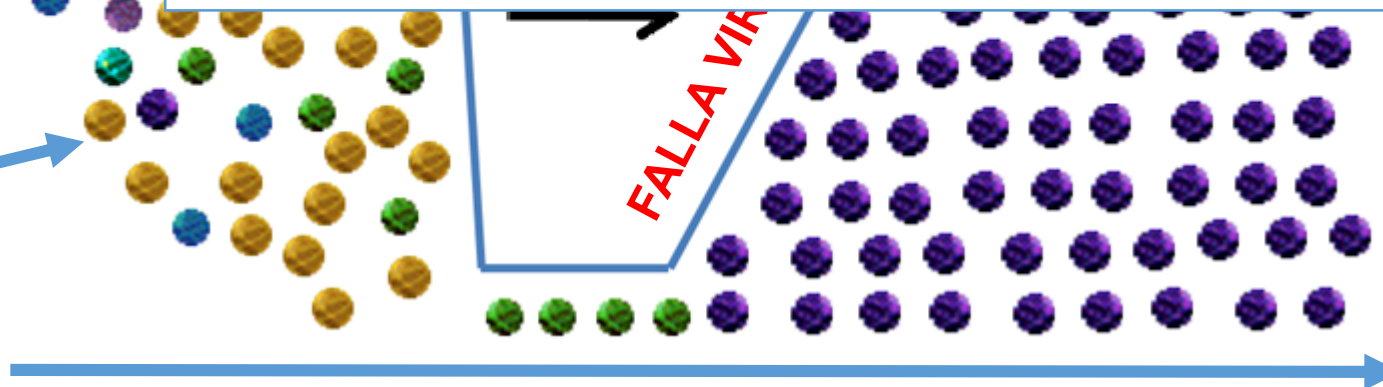


<20%

VARIANTES MAYORITARIAS



>20%



TIEMPO

**VARIANTES MINORITARIAS: NO PUEDEN SER DETECTADAS
POR MÉTODOS CONVENCIONALES**

INHIBIDORES DE ENTRADA

R5: UTILIZA EL RECEPTOR CCR5

Actúan sólo sobre virus R5 trópicos



X4: UTILIZA EL RECEPTOR CXCR4



MIXTOS/DUAL: UTILIZA AMBOS RECEPTORES



TEST MOLECULAR DE TROPISMO O GENOTROPISMO

Metodología: amplificación y secuenciación de la región v3. Con posterior análisis bioinformático

Tipo de muestra: plasma (carga viral >1000cop/ml) o sangre entera (CD4+>200)

HIV TROPISMO

virus
R5
trópico

El virus del paciente emplea el co-receptor CCR5.

El empleo de drogas antagonistas de CCR5 es aconsejable.

```
TGT ACA AGA CCC AAC AAC AAT ACA AGA AAA AGT ATA CAT ATA GGA CCA GGG AGA GCA TTT TAT ACA ACA GGA GAA ATA ATA GGA GAT ATA AGA CAA GCA CAT TGT
C T R P N N N T R K S I H I G P G R A F Y T T G E I I G D I R Q A H C
C T R P N S D G N N T R K S I H I G P G Q A F F A T G D I I G N D I R Q A H C
TGT ACA AGA CCC RRC AAC AAT ACA AGG AAA AGT ATA CAT ATA GGG CCA GGG CAG GCA TTT TTT GCA ACA GGA GAC ATA ATA GGA RAY ATA AGA CAA GCA YAT TGT
```

Resultados basados en un valor de False Positive Rate (FPR) de 98⁽¹⁾

FPR < 2

Antagonistas de CCR5 NO EFECTIVOS.

2 < FPR < 5.75

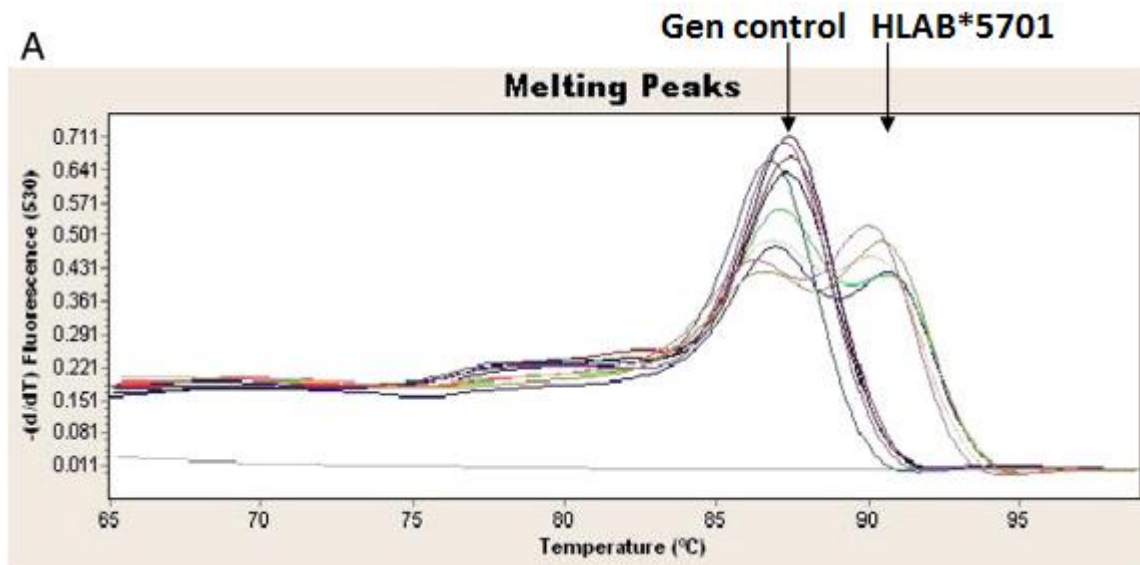
Antagonistas de CCR5 pueden ser útiles en pacientes pre-tratados con sólo un número limitado de drogas potencialmente activas disponibles. El empleo de antagonistas de CCR5 no es aconsejable como droga de reemplazo en pacientes con valores indetectables de carga viral.

FPR > 5.75

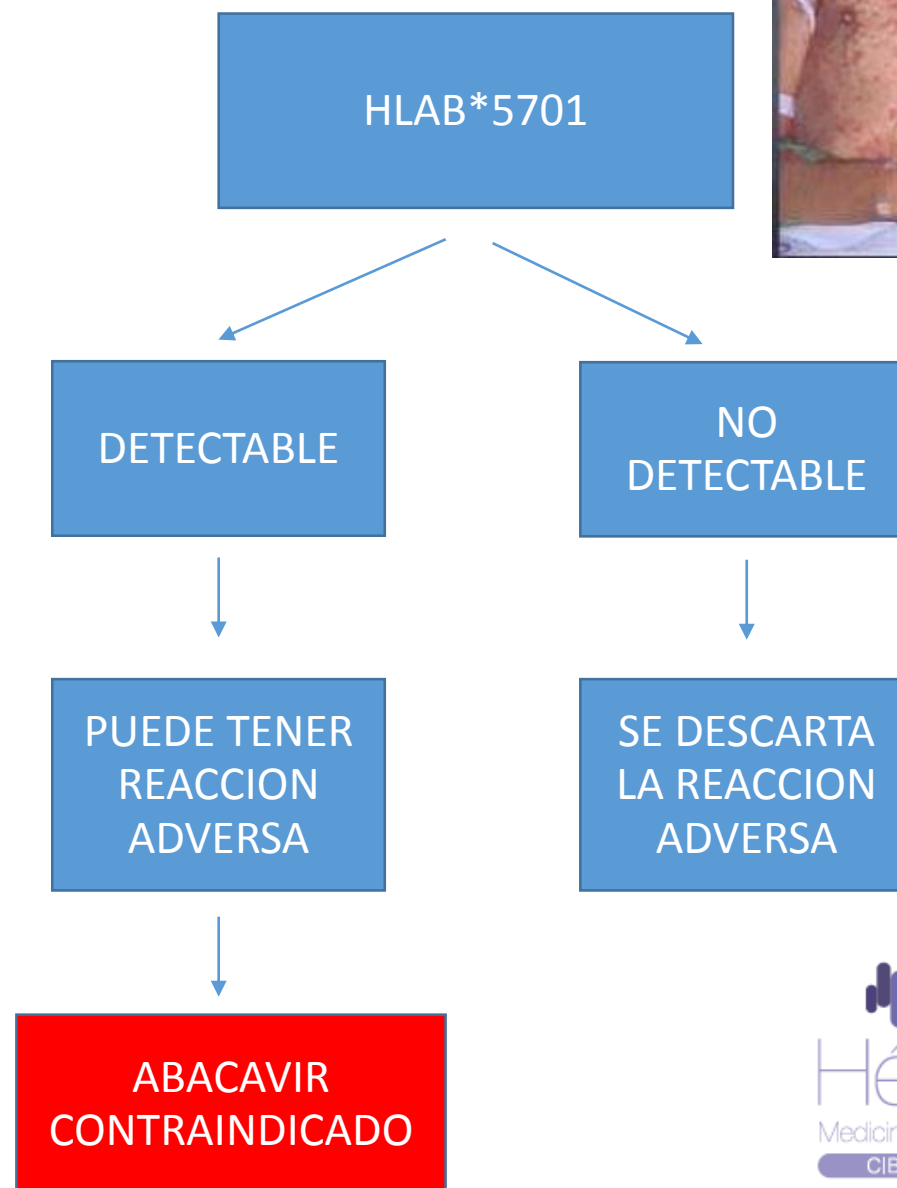
Antagonistas de CCR5 EFECTIVOS.

HIPERSENSIBILIDAD AL ABACAVIR (HLAB*5701)

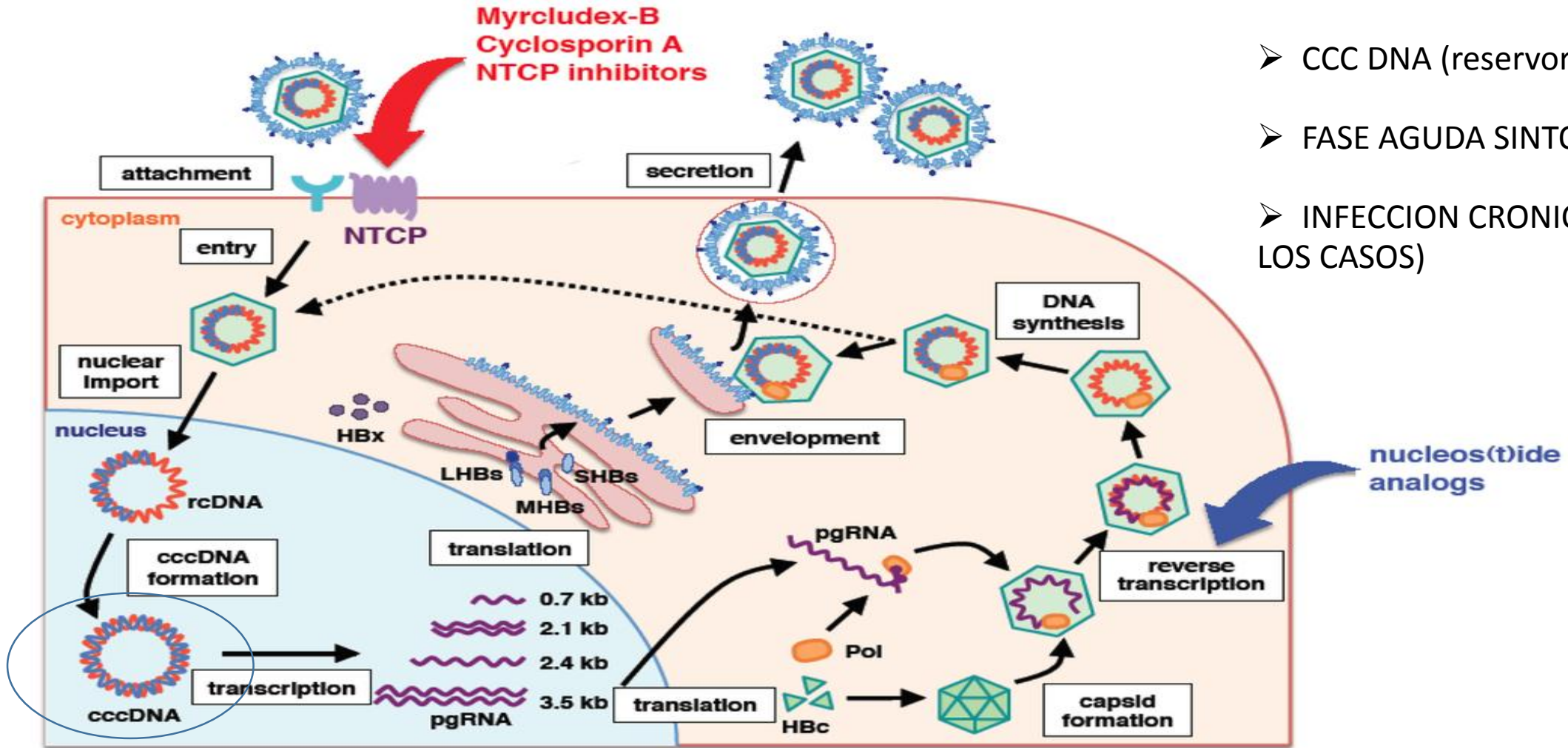
- ABACAVIR: ANALOGO NUCLEOSIDO USADO EN TARV
- HIPERSENSIBILIDAD: RUSH, FIEBRE, PLURITO, QUE PONE EN RIESGO LA VIDA DEL PACIENTE
- INCIDENCIA: 9% DE LOS PACIENTES QUE INICIAN TARV CON ABACAVIR



TIPO DE MUESTRA: SANGRE CON EDTA



VIRUS DE LA HEPATITIS B



- NO SE INTEGRA AL GENOMA HUMANO
- CCC DNA (reservorio)
- FASE AGUDA SINTOMÁTICA
- INFECCIÓN CRÓNICA (<5 % DE LOS CASOS)

DIAGNOSTICO HBV

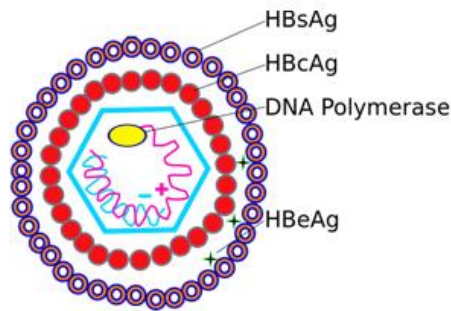
DIAGNOSTICO SEROLÓGICO

HBsAg

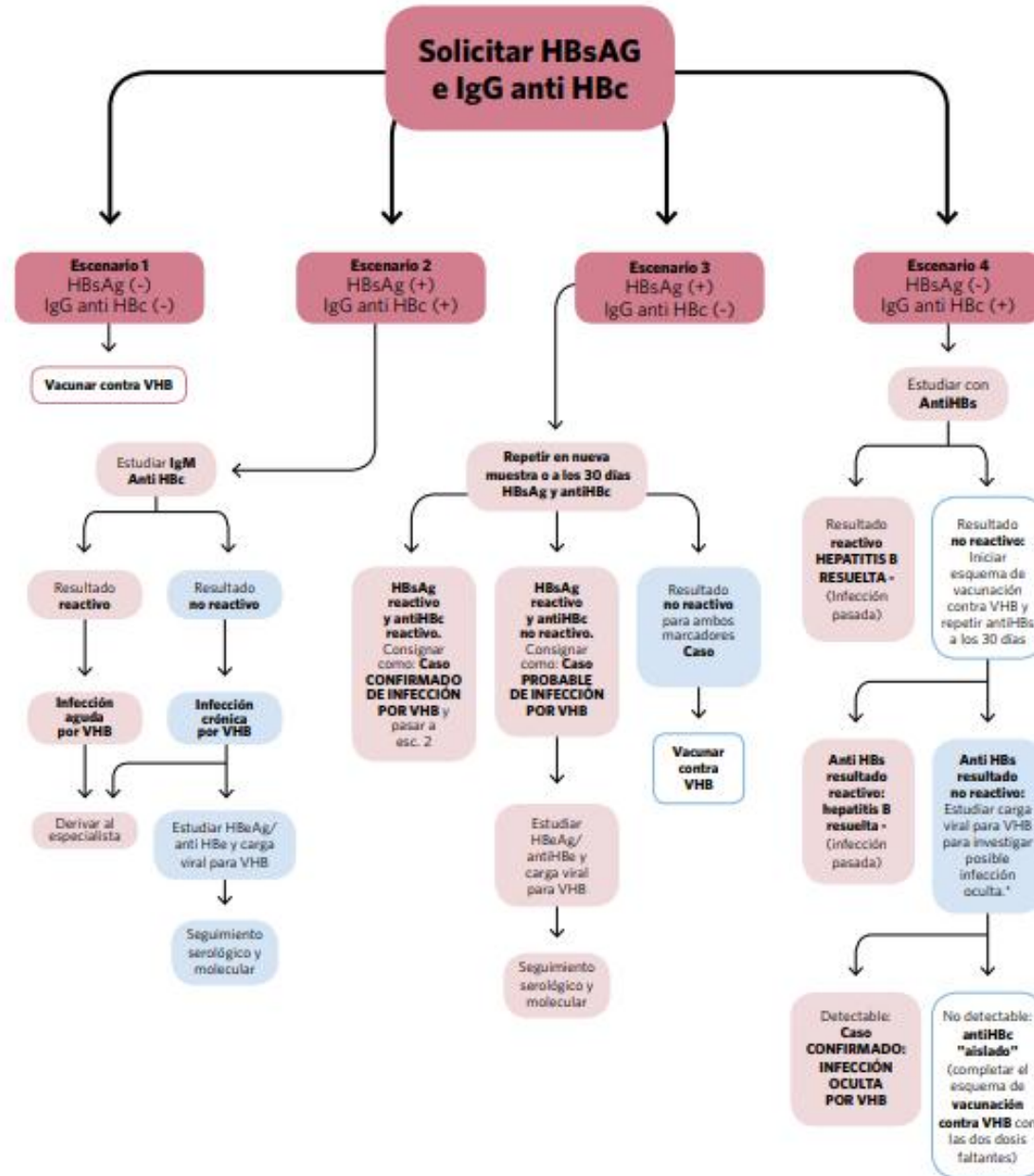
Antígeno de superficie

IgG anti HBc

Anticuerpo IgG anti Core

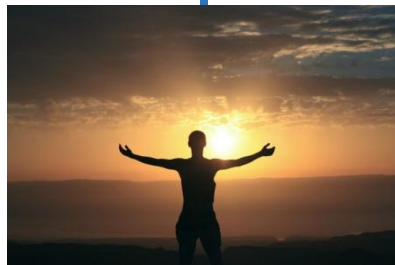


Nombre	Interpretación
Ag Superficie	Infección por VHB
Ag Core	Tejido hepático
Ag e	↑ Replicación e infectividad
Ag e +	Inf. Cr. Activa
Ag e -	Inf. Cr. Inactiva
Anti-HBc IgM	Infección aguda (↑ replicación en crónico)
Anti-HBs	Recuperación e inmunidad



VIRUS DE LA HEPATITIS B

HISTORIA NATURAL DE LA INFECCION POR VIRUS B



VIRUS DE LA HEPATITIS B

CARGA VIRAL (PCR en tiempo real cuantitativa, tipo de muestra: plasma)

- Definir en que fase de la evolución de la enfermedad crónica nos encontramos.
- Confirmación de diagnósticos especiales.

ANTI CORE NR (IgM, IgG)/ ANTIGENO DE SUPERFICIE RE. Infecciones agudas aún asintomáticas, parejas serodiscordantes o recientemente infectadas/poblaciones de riesgo.

- Monitoreo del tratamiento
- Monitoreo de reactivación por inmunosupresores

HBV TRATAMIENTO

IFN: TRATAMIENTO FINITO

SE DEBE MONITOREAR LA **CARGA VIRAL** PARA EVALUAR LA RESPUESTA AL TTO

ANTIVIRALES: TRATAMIENTO DE POR VIDA

SE DEBE MONITOREAR LA **CARGA VIRAL** PARA EVALUAR POSIBLES FALLAS VIROLOGICAS (RESISTENCIA, FALTA DE ADHERENCIA)

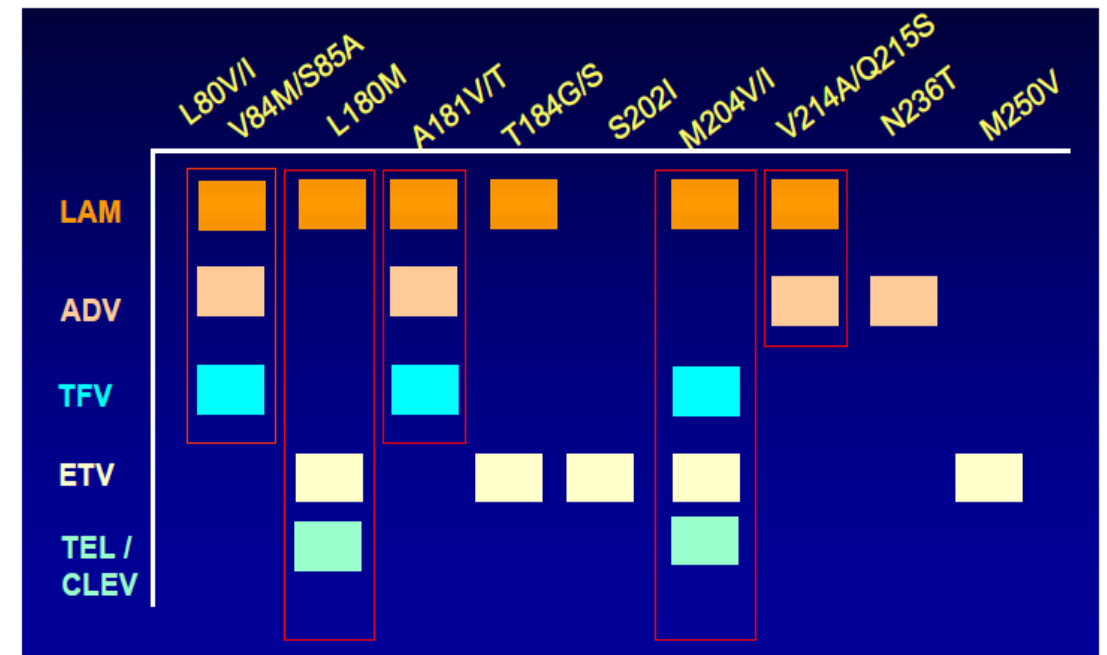
HBV TRATAMIENTO

TEST DE RESISTENCIA

CUÁNDO?: sospecha de falla virológica

TIPO DE MUESTRA: plasma con EDTA
(carga viral >1000 UI/ml)

METODOLOGIA: secuenciación con análisis bioinformático



NO SE DEBE DISCONTINUAR EL TTO

HBV GENOTIPO

EXISTEN 10 GENOTIPOS (A-J)

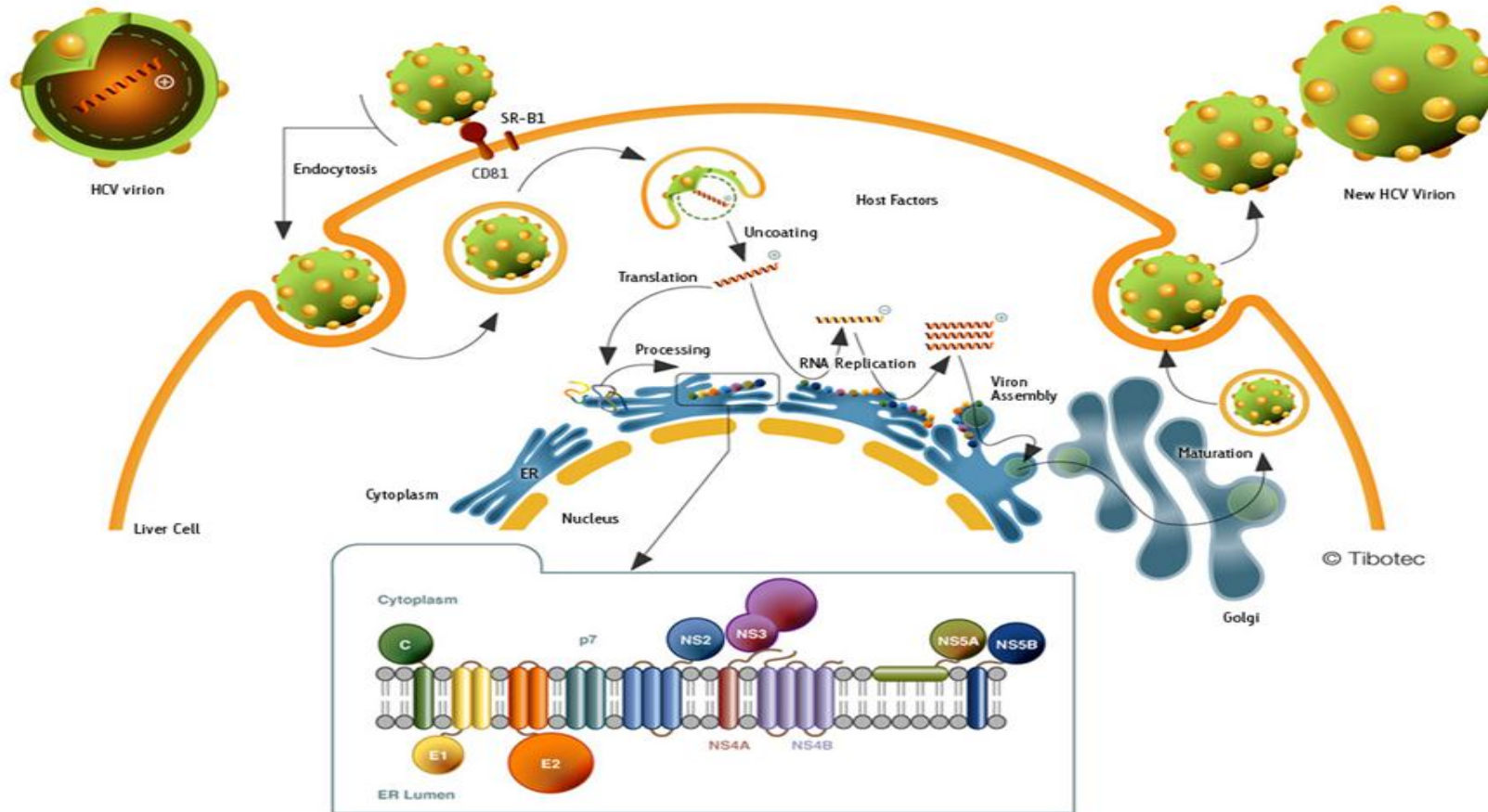
EL **GENOTIPO** ES PREDICTOR DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON **IFN**

“**A**” responde mejor que el “**D**” (asociados a transmisión en HSH)

“**B**” responde mejor que el “**C**” (asociados a transmisión vertical)

METODOLOGÍA: SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

VIRUS DE HEPATITIS C



➤ Replicación citoplasmática

➤ Se cura,
Espontáneamente o con tto

➤ 75-85% de pacientes
evolucionan a cronicidad

➤ Enfermedad asintomática

➤ **Principal causa de trasplante
de hígado y en conjunto con la
Hepatitis B, superan en causa
de muertes a HIV**

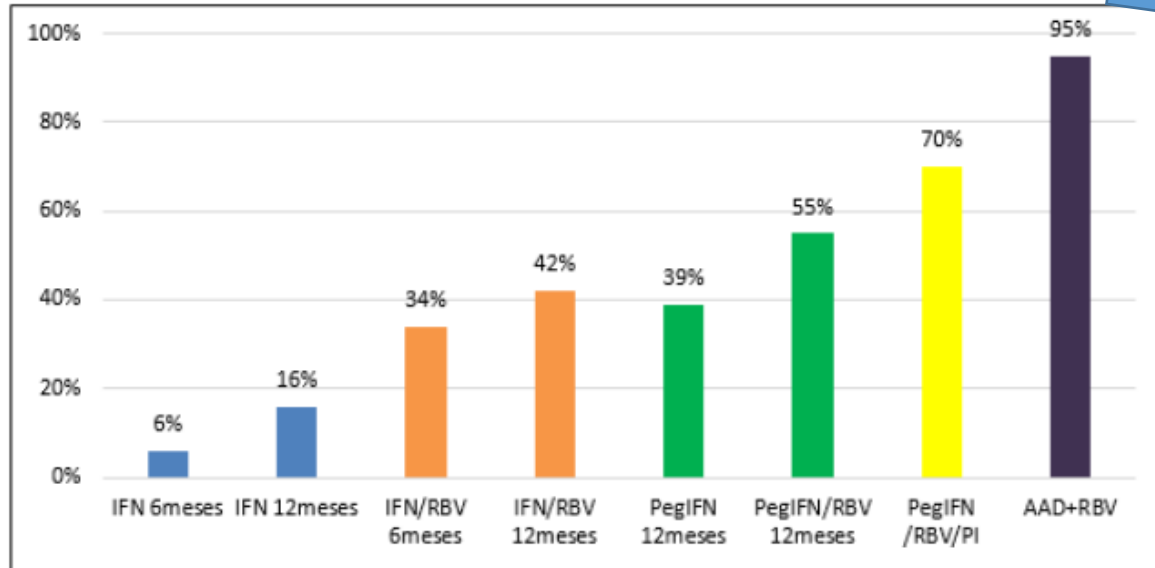
NO SE INTEGRA EN EL GENOMA VIRAL

NO TIENE RESERVORIO



SE CURA

VIRUS DE HEPATITIS C



IFN Estándar 1991–1995 | RBV 1998 | PEG-IFN 2001–2002 | IP 2011 | AAD 2014

EVOLUCIÓN DEL TRATAMIENTO DE LA HEPATITIS C CRÓNICA

2013

Brand name: OLYSIO
Generic name: simeprevir
Genotype: 1
Company: Janssen

Brand name: DAKLINZA
Generic name: daclatasvir
Genotype: 1 or 3
Company: Bristol-Myers Squibb

Brand name: SOVALDI
Generic name: sofosbuvir
Genotype: 1, 2, 3 or 4
Company: Gilead Sciences

2016

Brand name: ZEPATIER
Generic name: elbasvir/grazoprevir
Genotype: 1 or 4
Company: Merck

2014

Brand name: HARVONI
Generic name: ledipasvir/sofosbuvir
Genotype: 1, 4, 5 or 6
Company: Gilead Sciences

Brand name: EPCLUSA
Generic name: sofosbuvir/velpatasvir
Genotype: 1, 2, 3, 4, 5 or 6
Company: Gilead Sciences

Brand name: VIEKIRA PAK
Generic name: dasabuvir/ombitasvir/paritaprevir/ritonavir
Genotype: 1
Company: AbbVie

2017

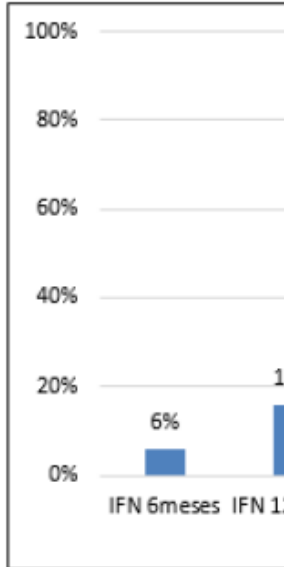
Brand name: VOSEVI
Generic name: sofosbuvir/velpatasvir/voxilaprevir
Genotype: 1, 2, 3, 4, 5 or 6
Company: Gilead Sciences

2015

Brand name: TECHNIVIE
Generic name: ombitasvir/paritaprevir/ritonavir
Genotype: 4
Company: AbbVie

Brand name: MAVYRET
Generic name: glecaprevir/pibrentasvir
Genotype: 1, 2, 3, 4, 5 or 6
Company: AbbVie

VIRUS DE HEPATITIS C



IFN Estándar
1991-1995

EVOLUCION DEL TRATAMIENTO DE LA HEPATITIS C CRONICA

- EN 2015 SOLO EL 20% DE LOS PACIENTES INFECTADOS CON VHC ESTABA DIAGNOSTICADO
- TODOS LOS INDIVIDUOS DEBERIAN TESTEARSE POR LO MENOS UNA VEZ EN LA VIDA
- PARA ERRADICAR EL VIRUS CON TTO NECESITAMOS IDENTIFICAR A LOS PACIENTES CON HCV

2013

Brand name: OLYSIO
Generic name: simeprevir
Genotype: 1
Company: Janssen

Brand name: DAKLINZA
Generic name: daclatasvir
Genotype: 1 or 3
Company: Bristol-Myers Squibb

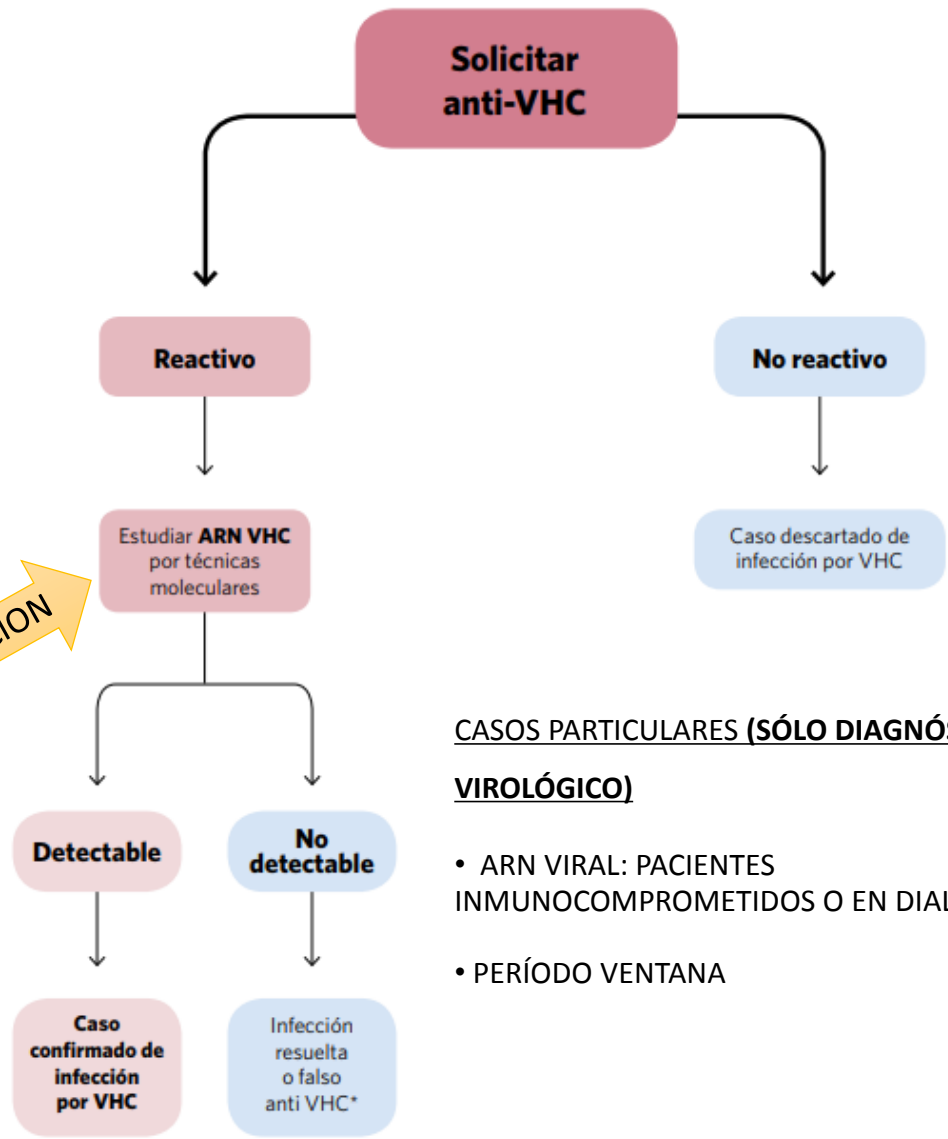
ZEPATIER
: elbasvir/grazoprevir
1 or 4
Merck

EPCLUSA
: sofosbuvir/velpatasvir
1, 2, 3, 4, 5 or 6
Gilead Sciences

VOSEVI
: sofosbuvir/velpatasvir/
voxilaprevir
1, 2, 3, 4, 5 or 6
Gilead Sciences

MAVYRET
: glecaprevir/pibrentasvir
1, 2, 3, 4, 5 or 6
AbbVie

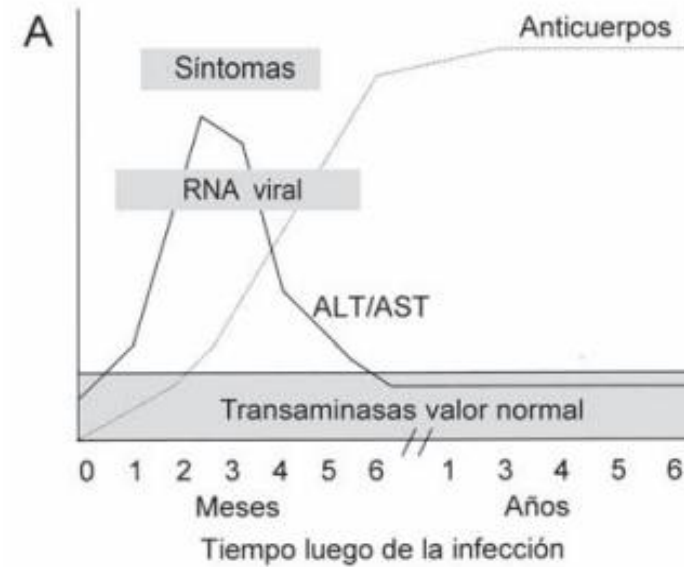
HCV DIAGNOSTICO



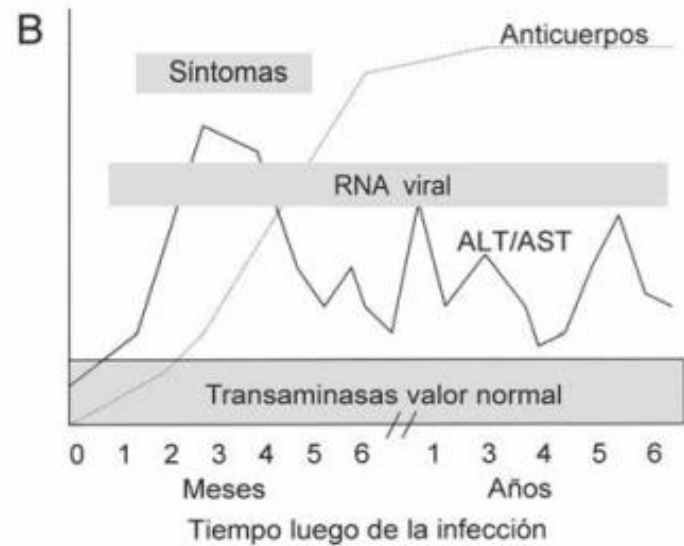
CONFIRMACION

CASOS PARTICULARES (SÓLO DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO)

- ARN VIRAL: PACIENTES INMUNOCOMPROMETIDOS O EN DIALISIS
- PERÍODO VENTANA



INFECCION RESUELTA



INFECCION CRONICA

HCV DIAGNOSTICO

Solicitar anti-VHC

ARN-VHC:

• **RECOMENDADO:** PCR EN TIEMPO REAL CUANTITATIVA COMERCIAL, CON LIMITE DE DETECCION MENOR A 50 UI/MI (15 UI/MI (COBAS 4800), 12 UI/MI (ABBOTT))

CONFIRMACION

Detectable

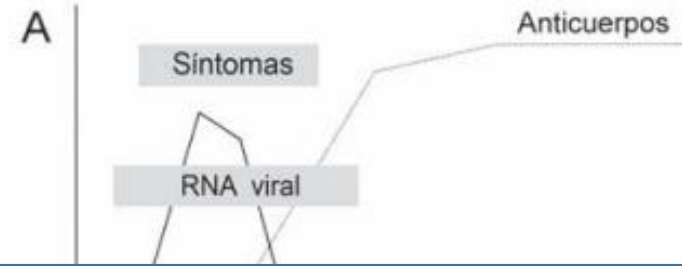
Caso confirmado de infección por VHC

No detectable

Infección resuelta o falso anti VHC*

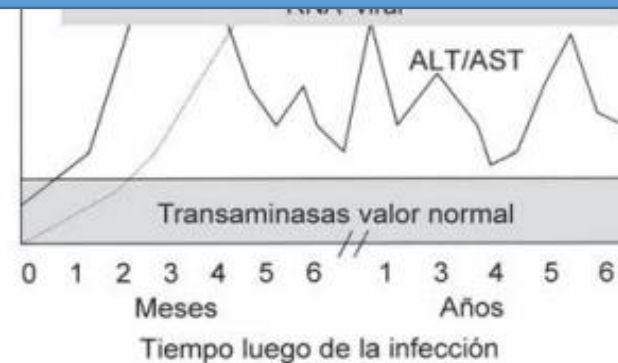
VIROLOGICO

- ARN VIRAL: PACIENTES INMUNOCOMPROMETIDOS O EN DIALISIS
- PERÍODO VENTANA



INFECCION RESUELTA

INFECCION CRONICA

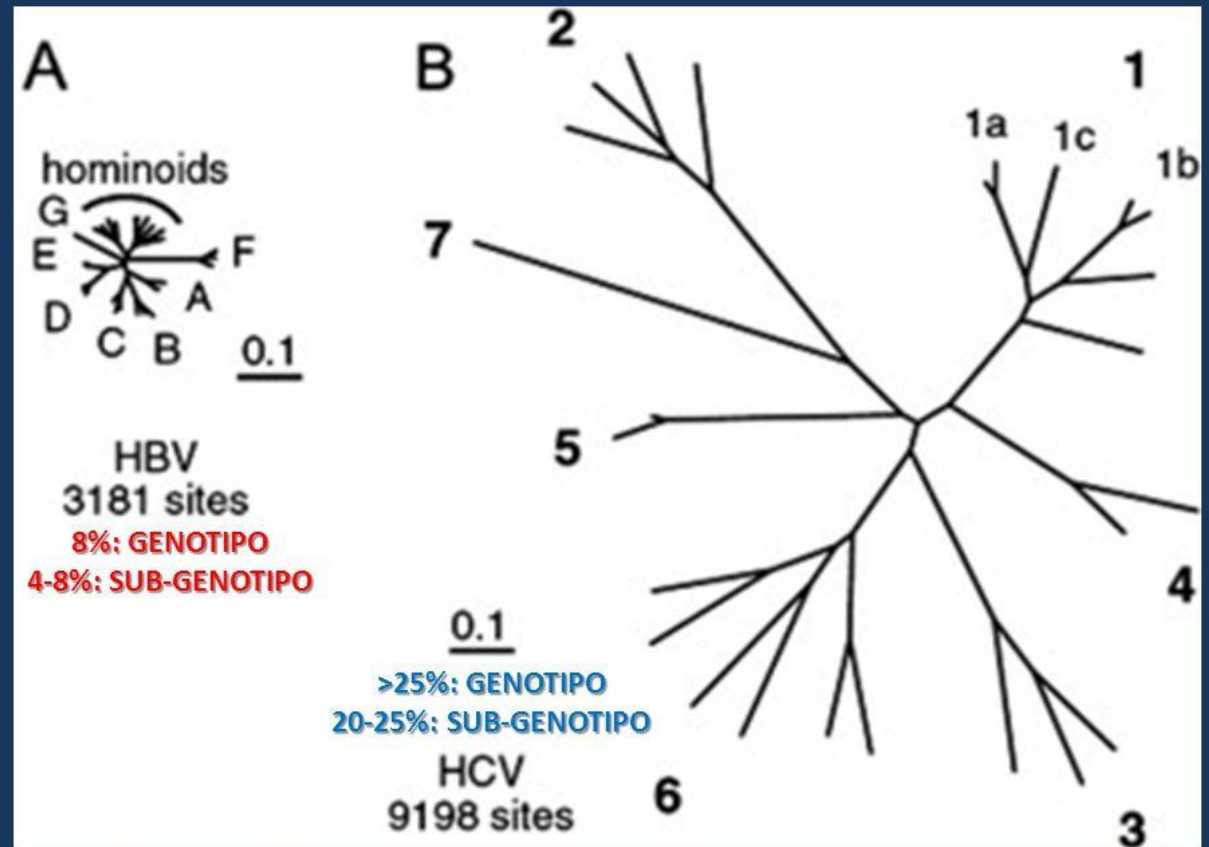


HCV GENOTIPO

- Existen 7 tipos y múltiples subtipos de HCV
- Están relacionados con la evolución de la enfermedad y la respuesta al tratamiento
- Los tratamientos varían según el genotipo

GOLD ESTÁNDAR: Secuenciación de regiones altamente conservadas aunque diferentes entre genotipos y subtipos (5'UTR-NS5B-CORE)

Genotipos, subtipos



Ray SC, Thomas DL. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases, 2010

HCV TRATAMIENTO

2013

Brand name: OLYSIO
Generic name: simeprevir
Genotype: 1
Company: Janssen

Brand name: SOVALDI
Generic name: sofosbuvir
Genotype: 1, 2, 3 or 4
Company: Gilead Sciences

2014

Brand name: HARVONI
Generic name: ledipasvir/sofosbuvir
Genotype: 1, 4, 5 or 6
Company: Gilead Sciences

Brand name: VIEKIRA PAK
Generic name: dasabuvir/ombitasvir/
 paritaprevir/ritonavir
Genotype: 1
Company: AbbVie

2015

Brand name: TECHNIVIE
Generic name: ombitasvir/paritaprevir/
 ritonavir
Genotype: 4
Company: AbbVie

Brand name: DAKLINZA
Generic name: daclatasvir
Genotype: 1 or 3
Company: Bristol-Myers Squibb

2016

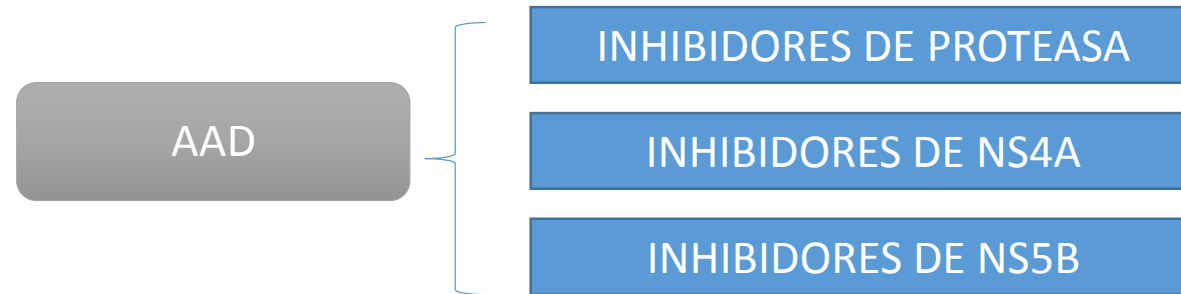
Brand name: ZEPATIER
Generic name: elbasvir/grazoprevir
Genotype: 1 or 4
Company: Merck

Brand name: EPCLUSA
Generic name: sofosbuvir/velpatasvir
Genotype: 1, 2, 3, 4, 5 or 6
Company: Gilead Sciences

2017

Brand name: VOSEVI
Generic name: sofosbuvir/velpatasvir/
 voxilaprevir
Genotype: 1, 2, 3, 4, 5 or 6
Company: Gilead Sciences

Brand name: MAVYRET
Generic name: glecaprevir/pibrentasvir
Genotype: 1, 2, 3, 4, 5 or 6
Company: AbbVie



HCV TRATAMIENTO

2013

Brand name: OLYSIO
Generic name: simeprevir
Genotype: 1
Company: Janssen

Brand name: SOVALDI
Generic name: sofosbuvir
Genotype: 1, 2, 3 or 4
Company: Gilead Sciences

2014

Brand name: HARVONI
Generic name: ledipasvir/sofosbuvir
Genotype: 1, 4, 5 or 6
Company: Gilead Sciences

Brand name: VIEKIRA PAK
Generic name: dasabuvir/ombitasvir/
 paritaprevir/ritonavir
Genotype: 1
Company: AbbVie

2015

Brand name: TECHNIVIE
Generic name: ombitasvir/paritaprevir/
 ritonavir
Genotype: 4
Company: AbbVie

Brand name: DAKLINZA
Generic name: daclatasvir
Genotype: 1 or 3
Company: Bristol-Myers Squibb

2016

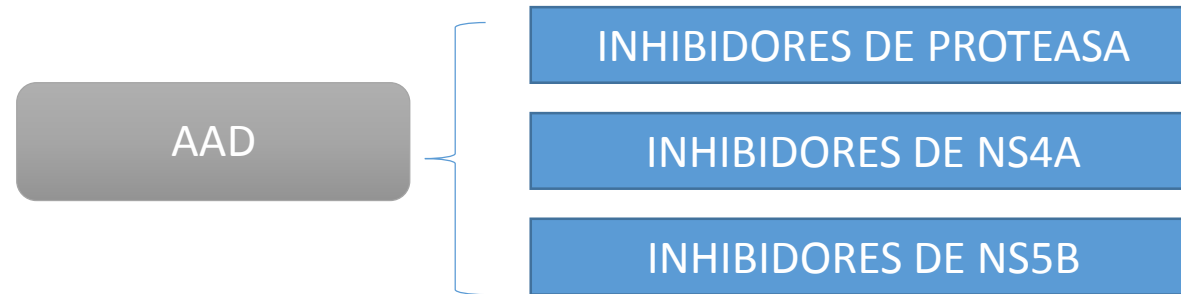
Brand name: ZEPATIER
Generic name: elbasvir/grazoprevir
Genotype: 1 or 4
Company: Merck

Brand name: EPCLUSA
Generic name: sofosbuvir/velpatasvir
Genotype: 1, 2, 3, 4, 5 or 6
Company: Gilead Sciences

2017

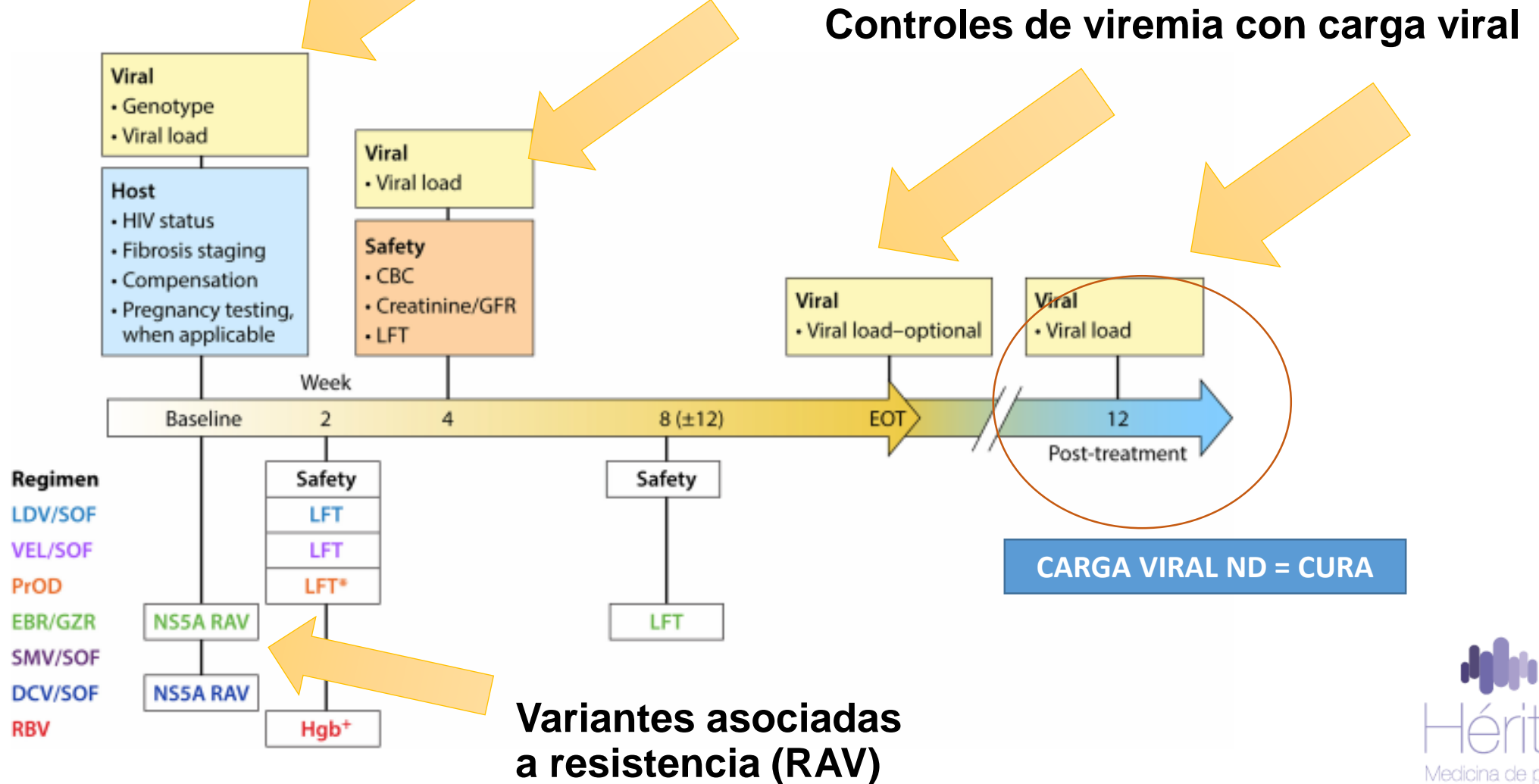
Brand name: VOSEVI
Generic name: sofosbuvir/velpatasvir/
 voxilaprevir
Genotype: 1, 2, 3, 4, 5 or 6
Company: Gilead Sciences

Brand name: MAVYRET
Generic name: glecaprevir/pibrentasvir
Genotype: 1, 2, 3, 4, 5 or 6
Company: AbbVie



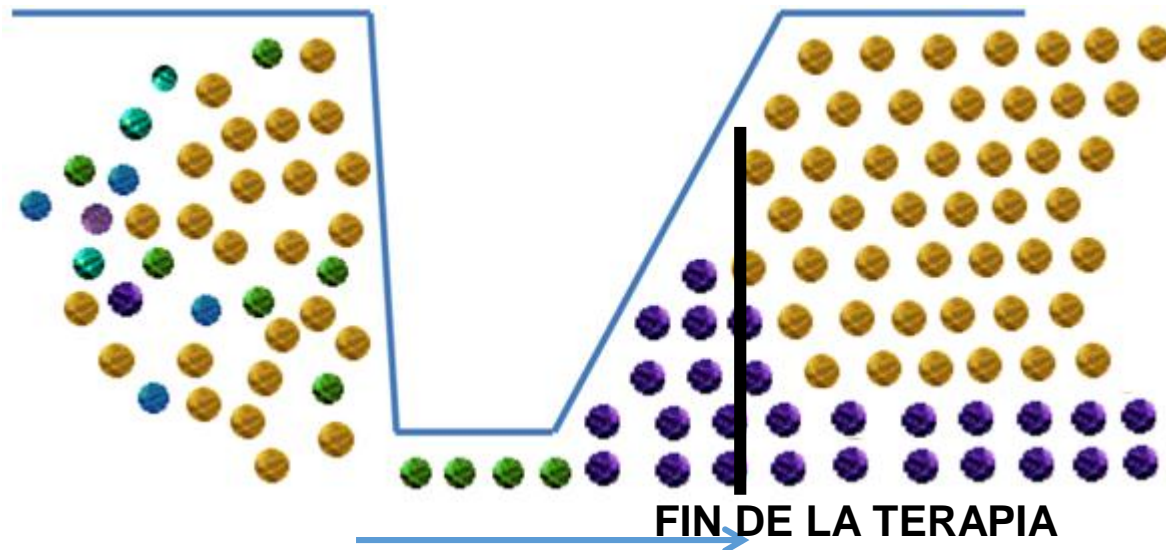
HCV MONITOREO DEL TRATAMIENTO

Wilson et al.



VARIANTES ASOCIADAS A RESISTENCIA (RAVs)

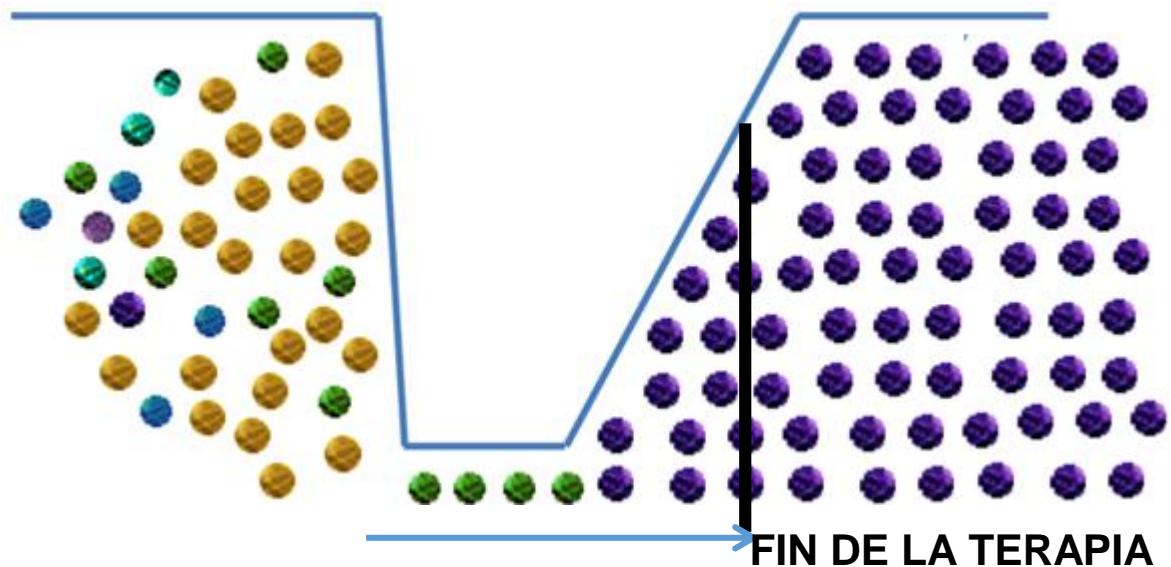
ANTI NS3
ANTI NS5B



WT

**NS3r, NS5Br
(BAJA CAPACIDAD
REPLICATIVA)**

ANTI NS5A



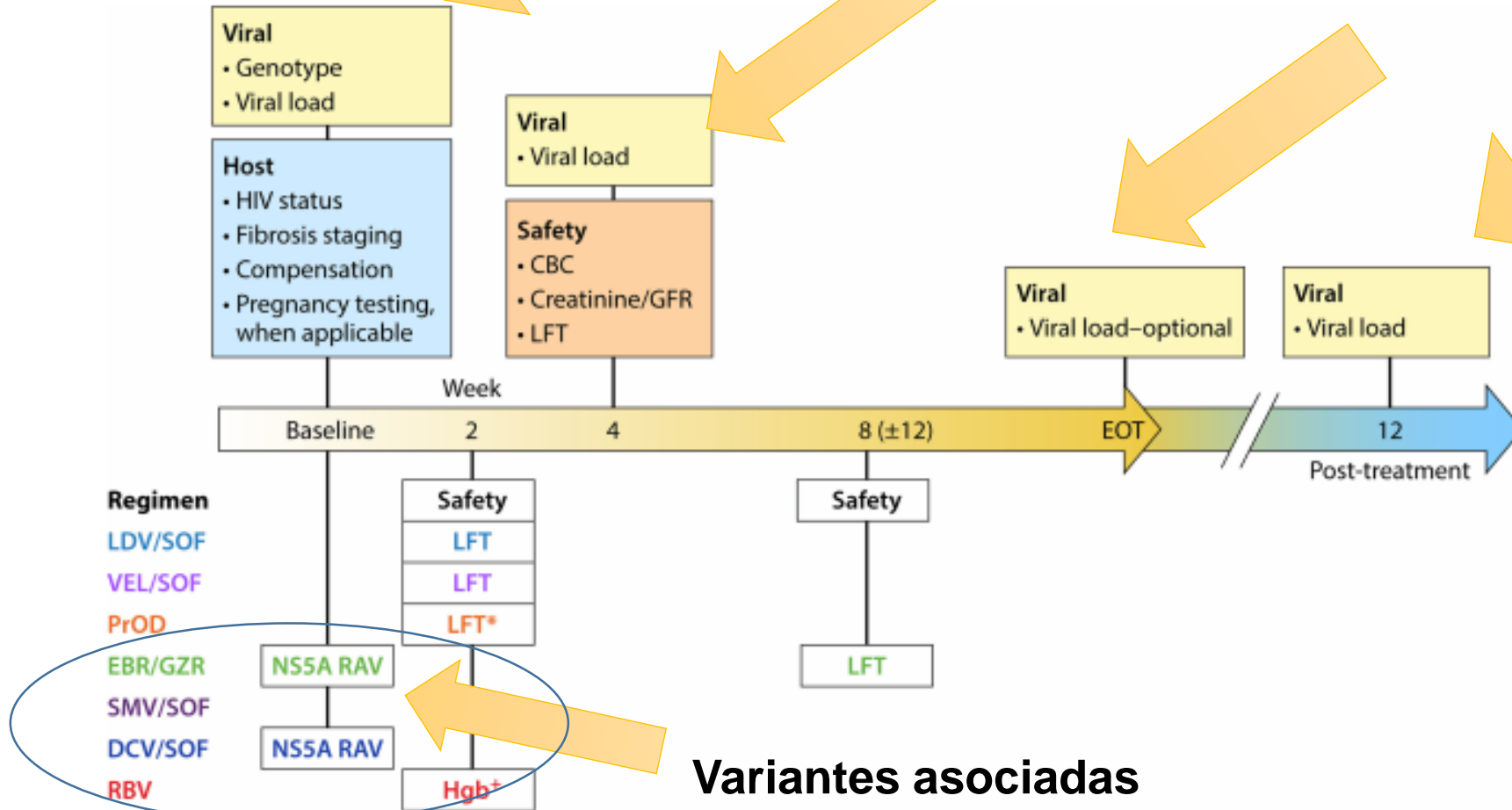
**NS5Ar
(BAJA CAPACIDAD
REPLICATIVA SIMILAR A
WT)**

LA RESISTENCIA A
anti NS5A
CONDICIONA
FUTUROS
TRATAMIENTO

HCV MONITOREO DEL TRATAMIENTO

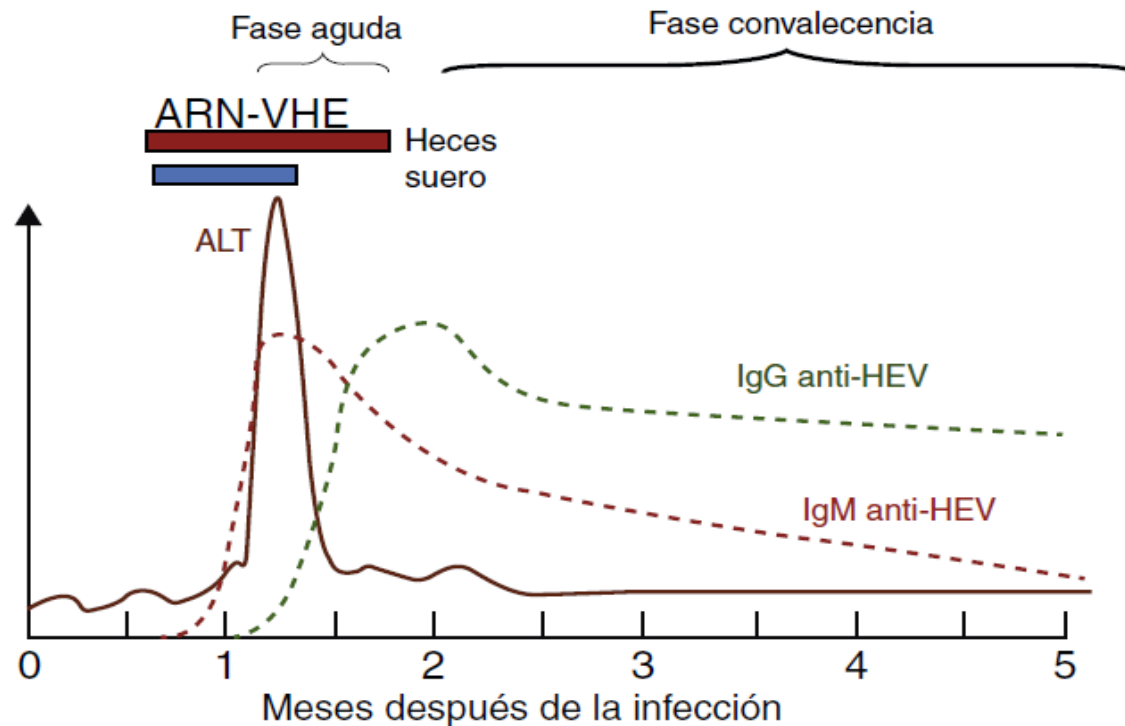
Wilson et al.

Controles de viremia con carga viral



Variantes asociadas a resistencia (RAV)

VIRUS DE LA HEPATITIS E



IgM anti-VHE: se detecta en más del 90% de los pacientes dentro de las dos semanas de exposición

ARN-VHC: por PCR durante la fase aguda. Permite caracterización del genotipo y monitoreo de la evolución.
(plasma: 2 semanas, heces: 4 semanas)

➤ Se contagia por vía entérica (agua contaminada) o carne animal contaminada (Zoonosis), moluscos, transfusiones, trasplante de órganos sólidos

➤ Hepatitis aguda autolimitada similar a la Hepatitis A (erradicada por vacunación en nuestro medio)

➤ Peligrosa en mujeres embarazada, niños menores de 2 años e individuos con enfermedad hepática preexistente

➤ Infección crónica en inmunosuprimidos