

Biología Molecular Aplicada al Diagnóstico Médico
Círculo Médico de Rosario

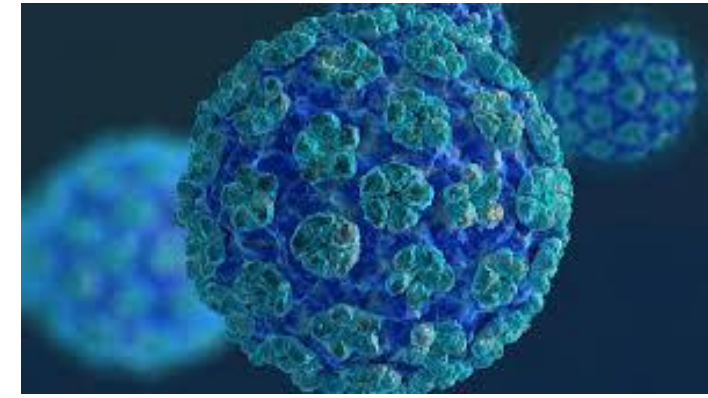
**Aplicaciones de la Biología Molecular en Infectología:
diagnóstico molecular de infección por HPV y de
COVID-19**

Dra. Mariela Sciara
Laboratorio Cibic
Rosario

2020

Diagnóstico molecular de la infección por HPV

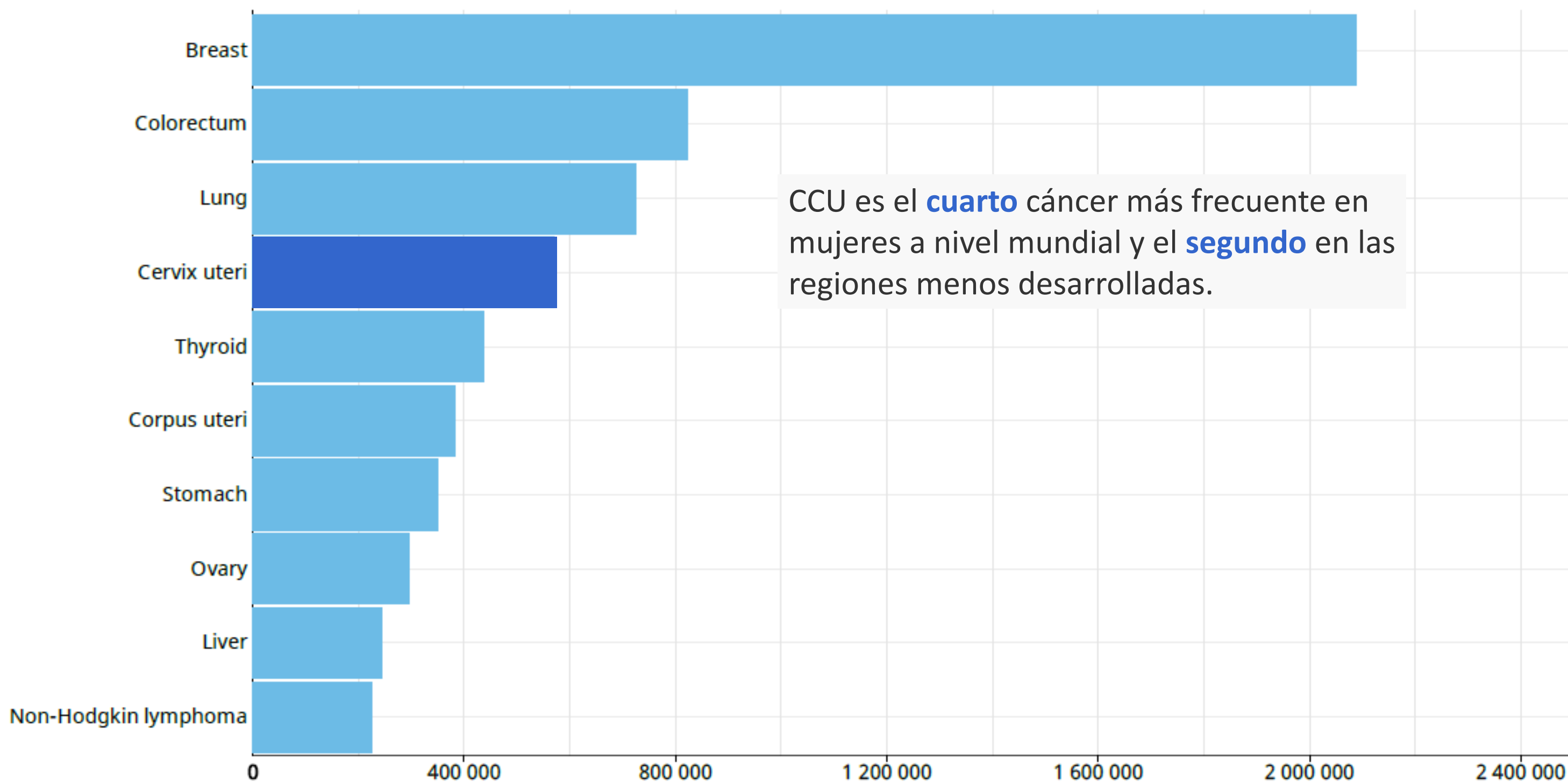
VIRUS PAPILOMA HUMANO (HPV)



- Virus ADN, familia *Papillomaviridae*.
- Replica en el núcleo de células epiteliales (piel y mucosas).
- Transmisión principalmente por contacto sexual en mujeres y hombres. El solo contacto piel con piel es suficiente para producir el contagio
- Más de 100 tipos de HPV, al menos 14 son oncógenicos (alto riesgo).
- Asociado prácticamente al 100% de los casos de Cáncer Cérvico Uterino (CCU)
→ HPV 16 y 18 causantes del 75% de los CCU en Argentina y HPV 6 y 11 der mas del 90% de las verrugas genitales.
- También vinculado con cánceres de vulva, vagina, pene, ano y orofaríngeos.

HPV y CCU

Estimated number of incident cases worldwide, females, all ages



CCU es el **cuarto** cáncer más frecuente en mujeres a nivel mundial y el **segundo** en las regiones menos desarrolladas.

- En 2018, hubo 570 000 nuevos casos. De las 311 000 muertes por CCU, más del 85% de esas muertes se produjeron en países de ingresos bajos y medios.
- El control integral del CCU consiste en la prevención primaria (vacunación contra los HPV), secundaria (detección y tratamiento de las lesiones precancerosas) y terciaria (diagnóstico y tratamiento del CCU invasivo) y los cuidados paliativos
- En países desarrollados la aplicación de programas de prevención primaria y secundaria previene hasta el 80% de los casos de CCU.
- En países en desarrollo existe acceso limitado a las medidas preventivas y tratamiento en las fases avanzadas lo que implica que CCU se detecte en fases más avanzadas y que la tasa de mortalidad sea más alta, respectivamente.



Se cree que entre el 70 y 80% de la población sexualmente activa estará infectada antes de los 50 años de edad.



500.000.
nuevos episodios por año.



Se estima que todos los años se diagnostican 500.000 nuevos episodios de cáncer cervical en el mundo, de los cuales el 80% ocurren en países en desarrollo con una mortalidad cercana al 50%.



4.000
nuevos episodios por año.

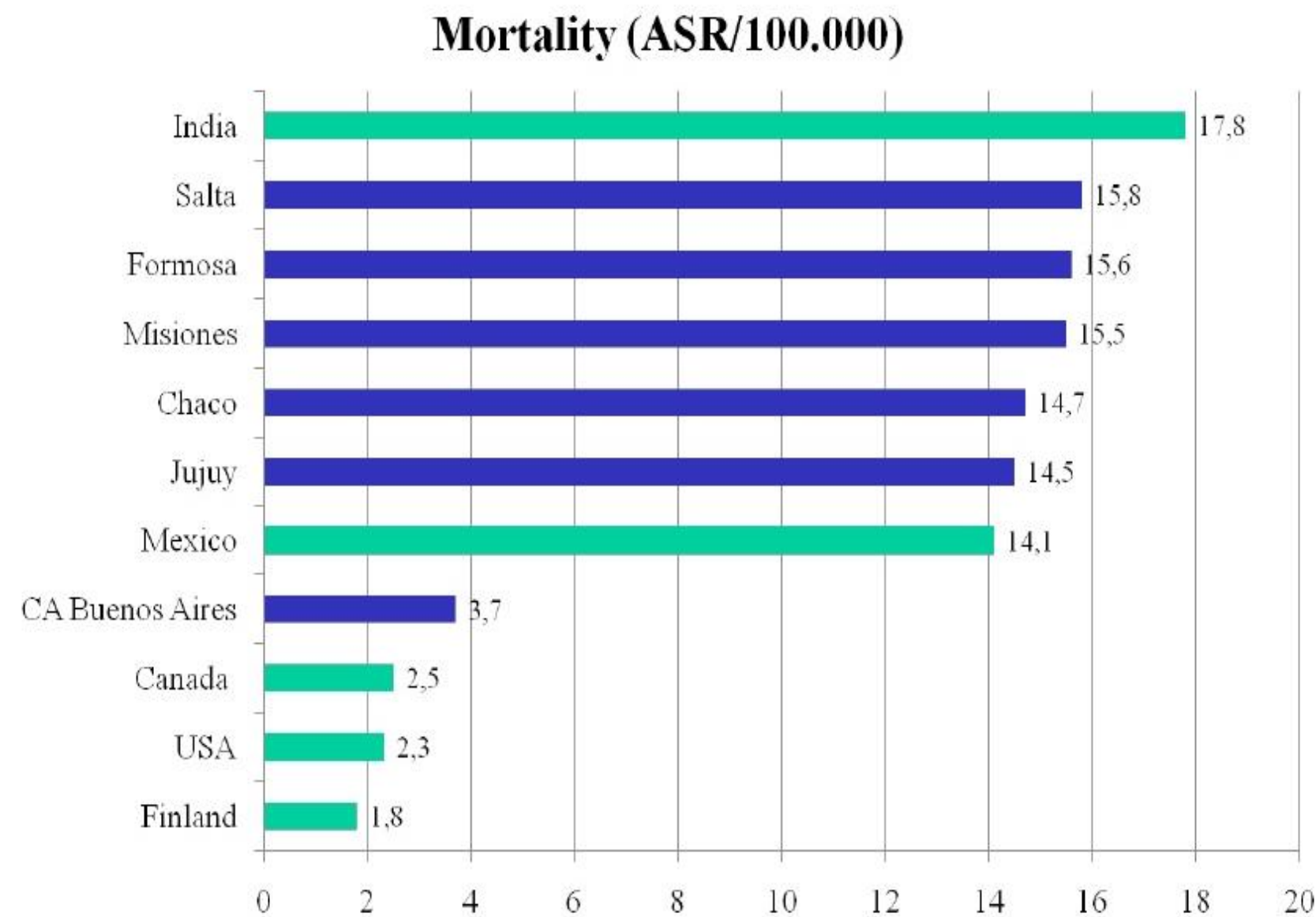
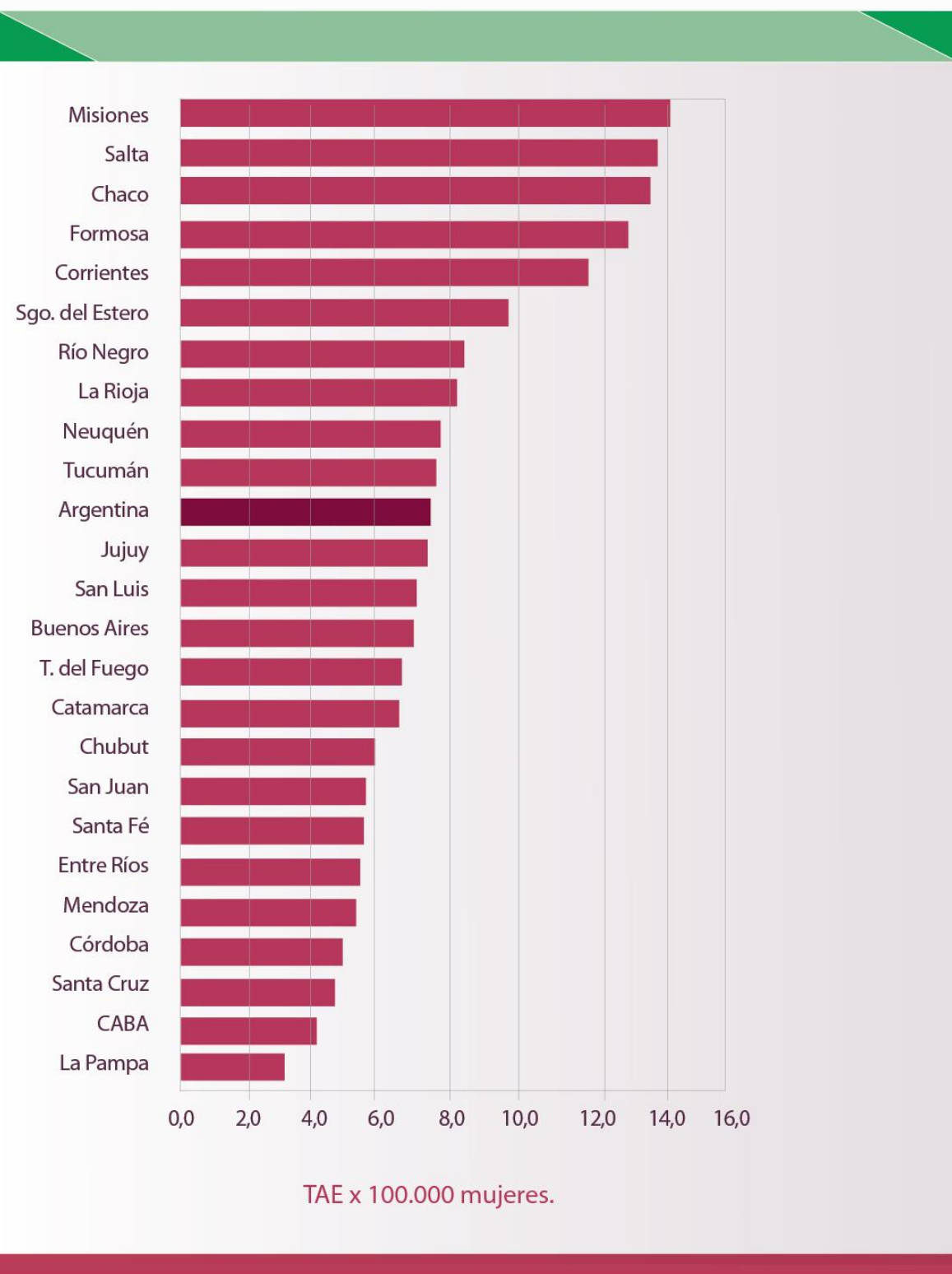
2.000
muertes por año.

De acuerdo a estadísticas del Ministerio de Salud, en Argentina se reportan cerca de 4.000 episodios de neoplasias cervicales invasoras y aproximadamente 2.000 muertes por año.

3ra causa de muerte por enfermedad oncológica en mujeres

Mortalidad por CCU en Argentina

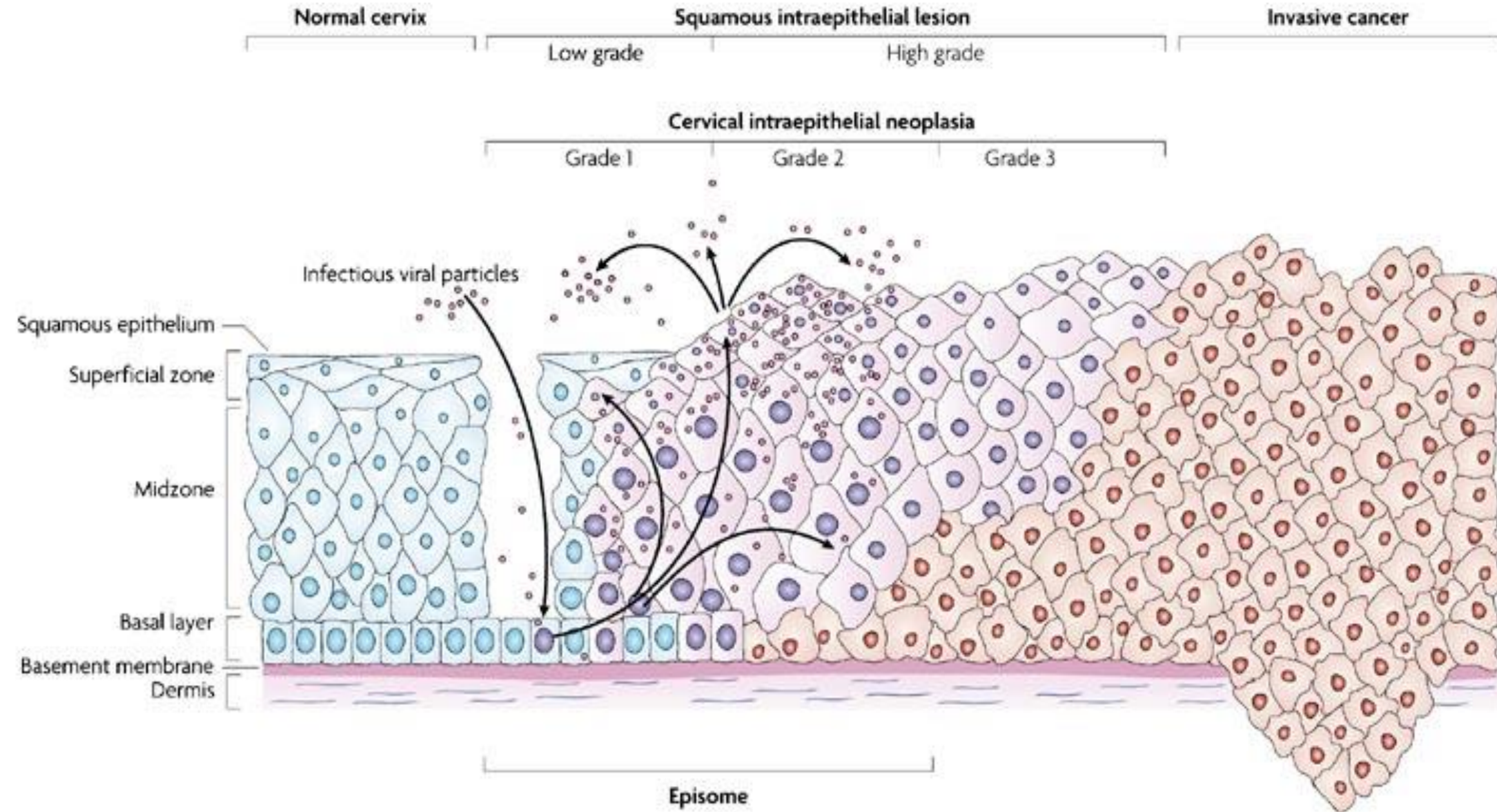
Gráfico 11 : Mortalidad por cáncer cervicouterino en mujeres según jurisdicciones.
Tasas ajustadas por edad por 100.000 habitantes y tasas agrupadas en quintiles de mortalidad. Argentina, 2017



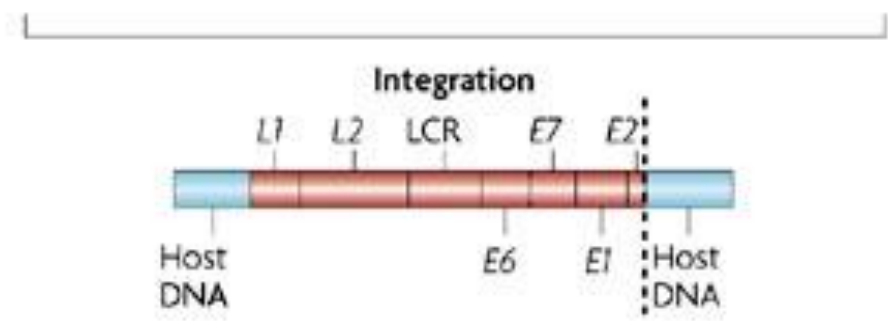
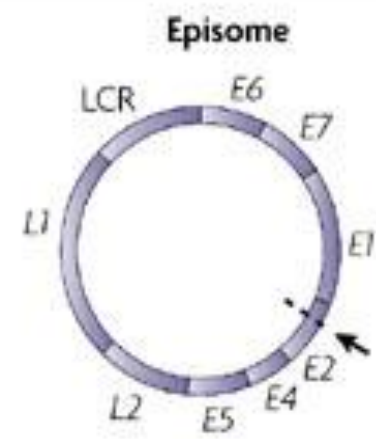
Adapted from Arrosi S. http://www.msal.gov.ar/cancer-cervico-uterino/pdf/pub64_ops.pdf

- Existe una asociación de más del 99% entre el **HPV de alto riesgo y el CCU.**
- El **70-80% de las mujeres sexualmente activas**, pueden adquirir la infección por HPV a lo largo de su vida
- Un bajo porcentaje (**5%**) de las infecciones por HPV causan cáncer cervical
- Primeras etapas del CCU se puede tratar fácilmente (**99,7% de éxito**).
- Transcurren aproximadamente 8 años desde una infección persistente hasta la lesión invasiva → screening .

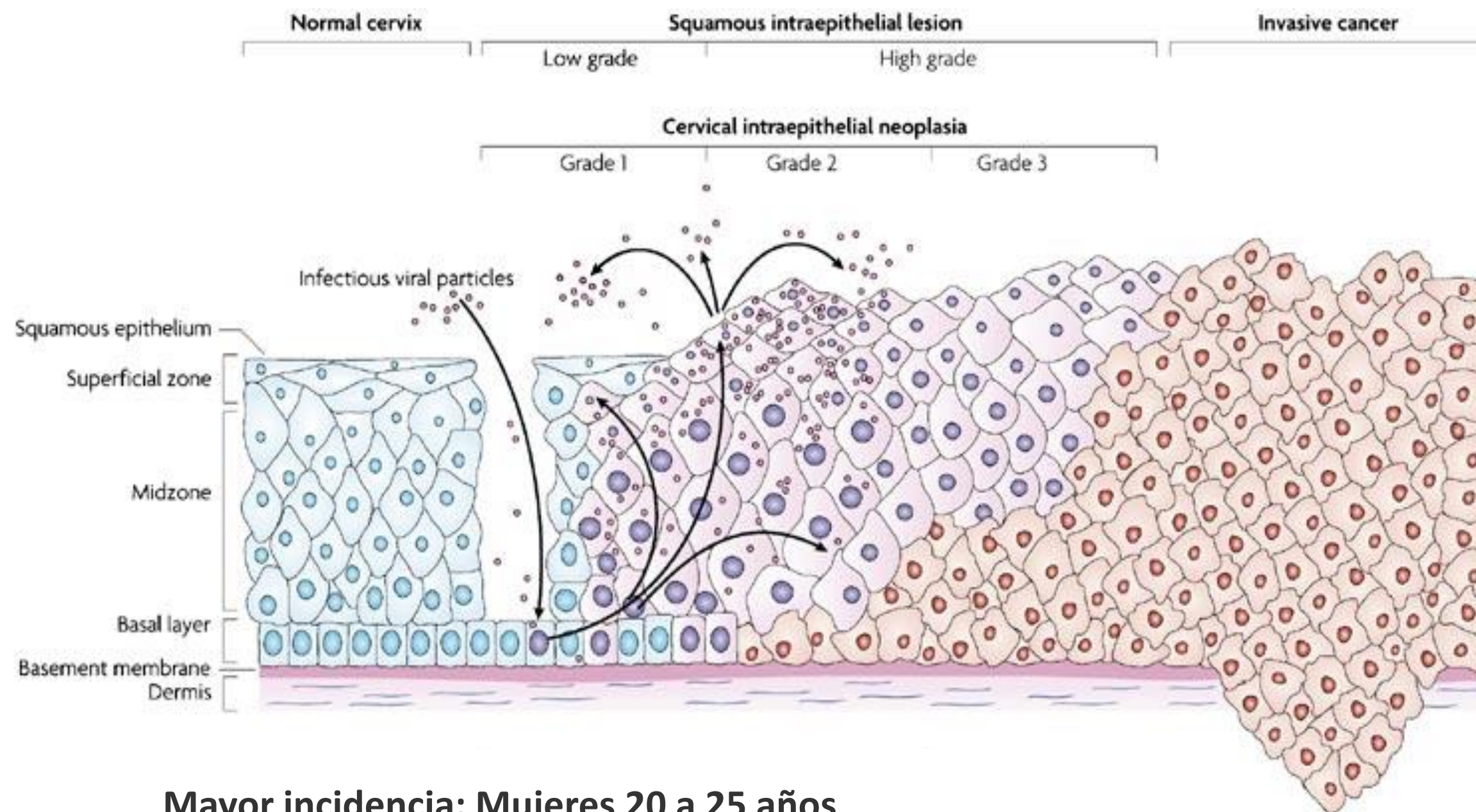
Infección por HPV: progresión al CCU



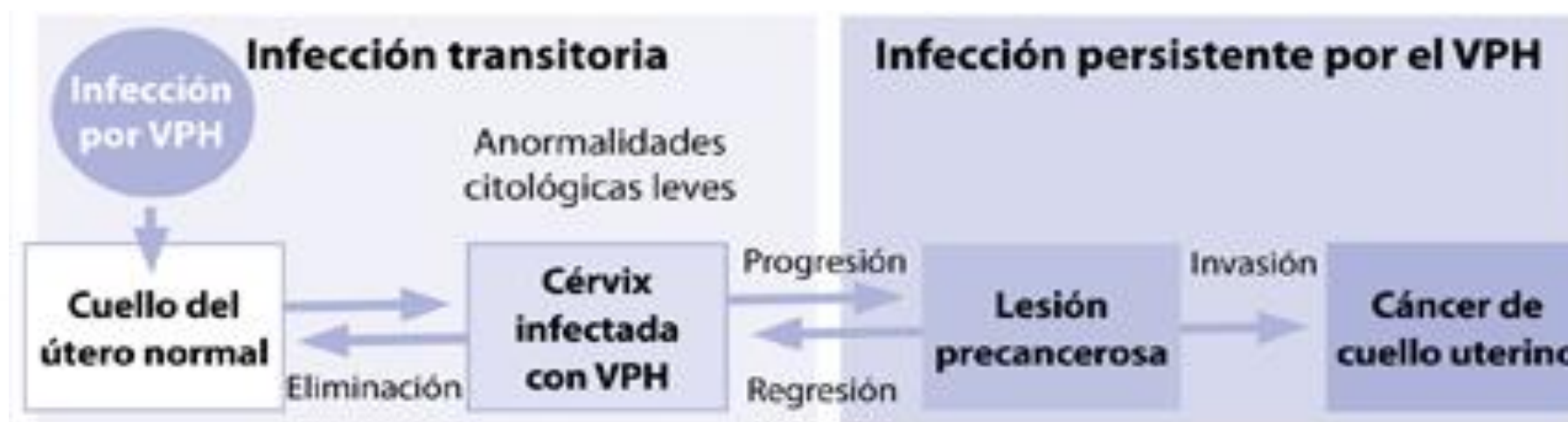
- Nuclei with episomal viral DNA
- Nuclei with integrated viral DNA
- Normal nuclei
- Overexpression of E6 and E7
- Expression of early and late genes



Infección por HPV: progresión al CCU



Mayor incidencia: Mujeres 20 a 25 años



Citología de cuello de útero PAPANICOLAU

Metodología de **screening primario** usada en las últimas décadas en Argentina

Identifica lesiones precursoras de cáncer cervical para prevenir el desarrollo del mismo.

Sensibilidad del 50% → Seguimiento frecuente para lograr buena protección

Alta variabilidad de los resultados del laboratorio

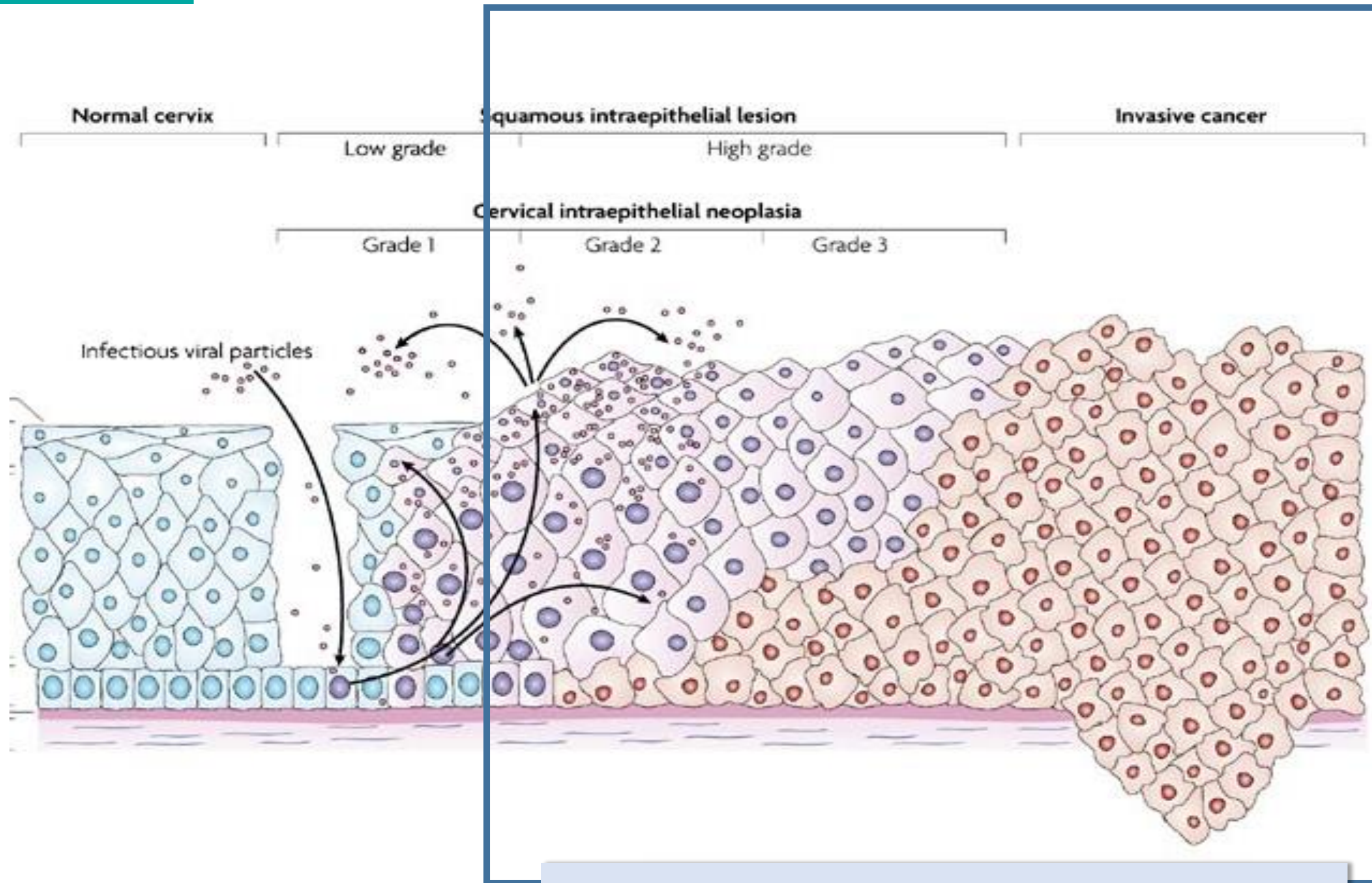
Detecta mujeres con enfermedad cervical, no mujeres en riesgo.

Detección del CCU

Gráfico 10: Tendencias de mortalidad específica por cáncer cervicouterino.
Tasas estandarizadas por edad según población mundial por 100.000 habitantes. Argentina, 1980-2017



Fuente: elaborado por el SIVER-Ca en base a los registros de mortalidad de la DEIS, Ministerio de Salud y Desarrollo Social de la Nación. Instituto Nacional del Cáncer (INC), Argentina 2019.

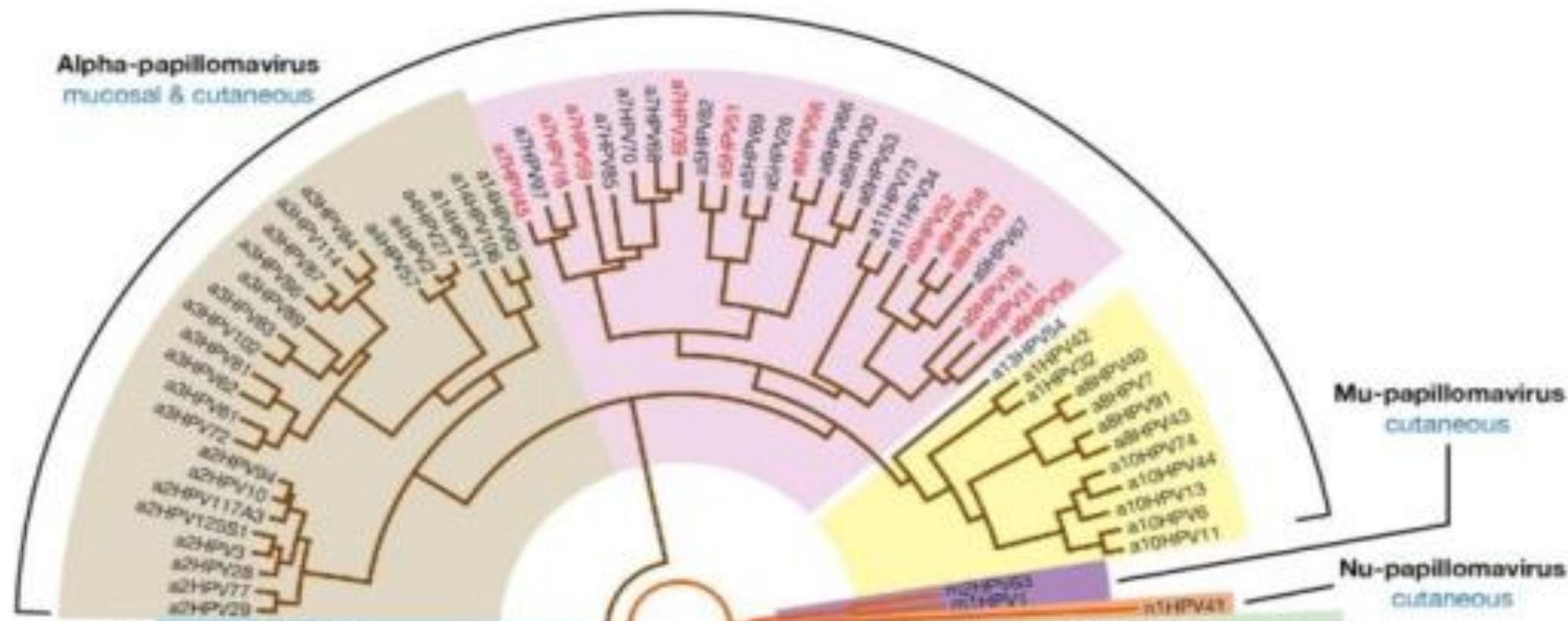


**Citología de cuello de útero
PAPANICOLAU**

Genotipos de HPV

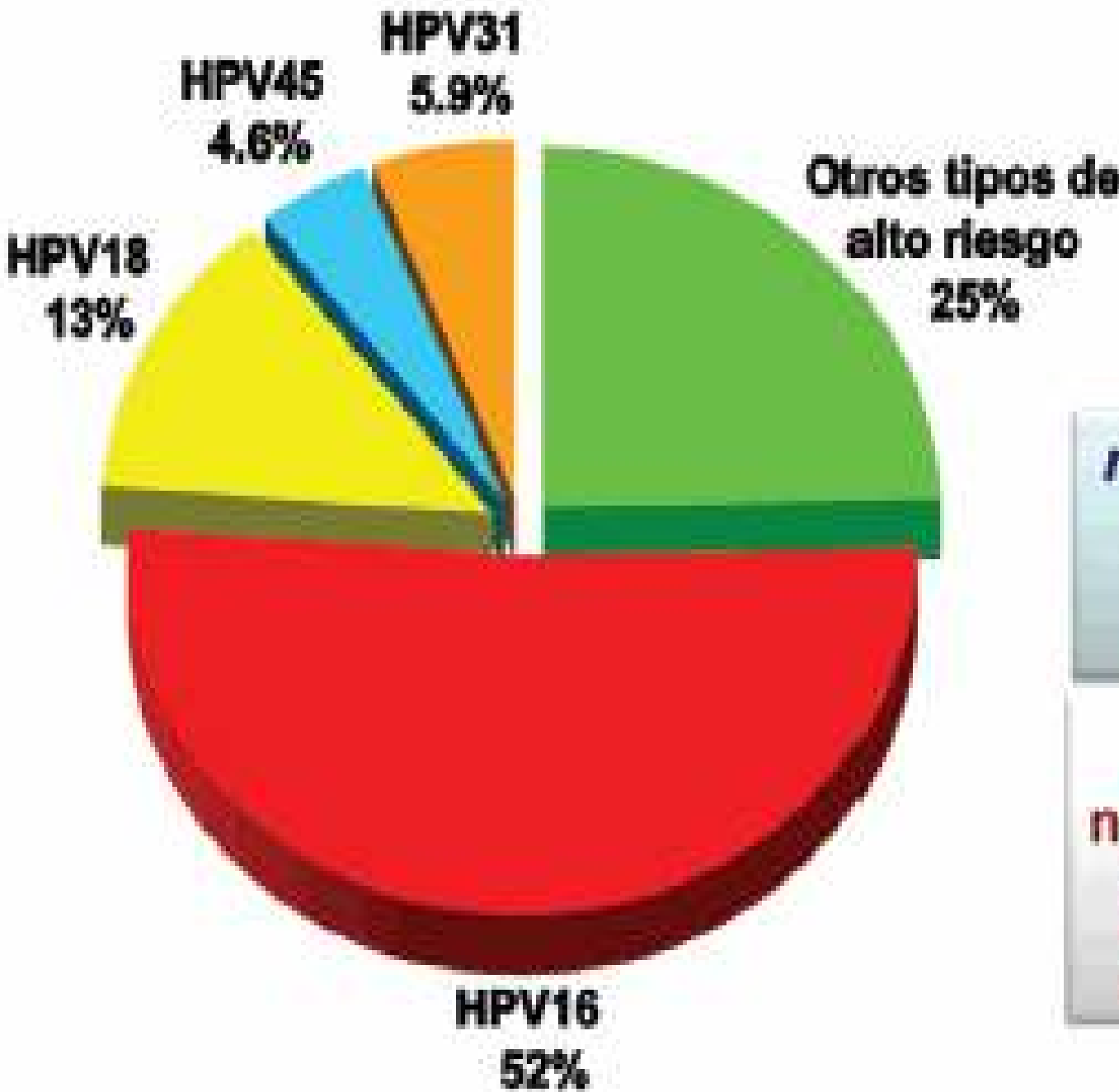
40

afectan tracto
anogenital



- ✓ HPV de **bajo riesgo** oncogénico: asociados con lesiones benignas
- ✓ HPV de **alto riesgo** oncogénico: asociados con cáncer cervical
- ✓ HPV tipo cutáneos: asociados con verrugas

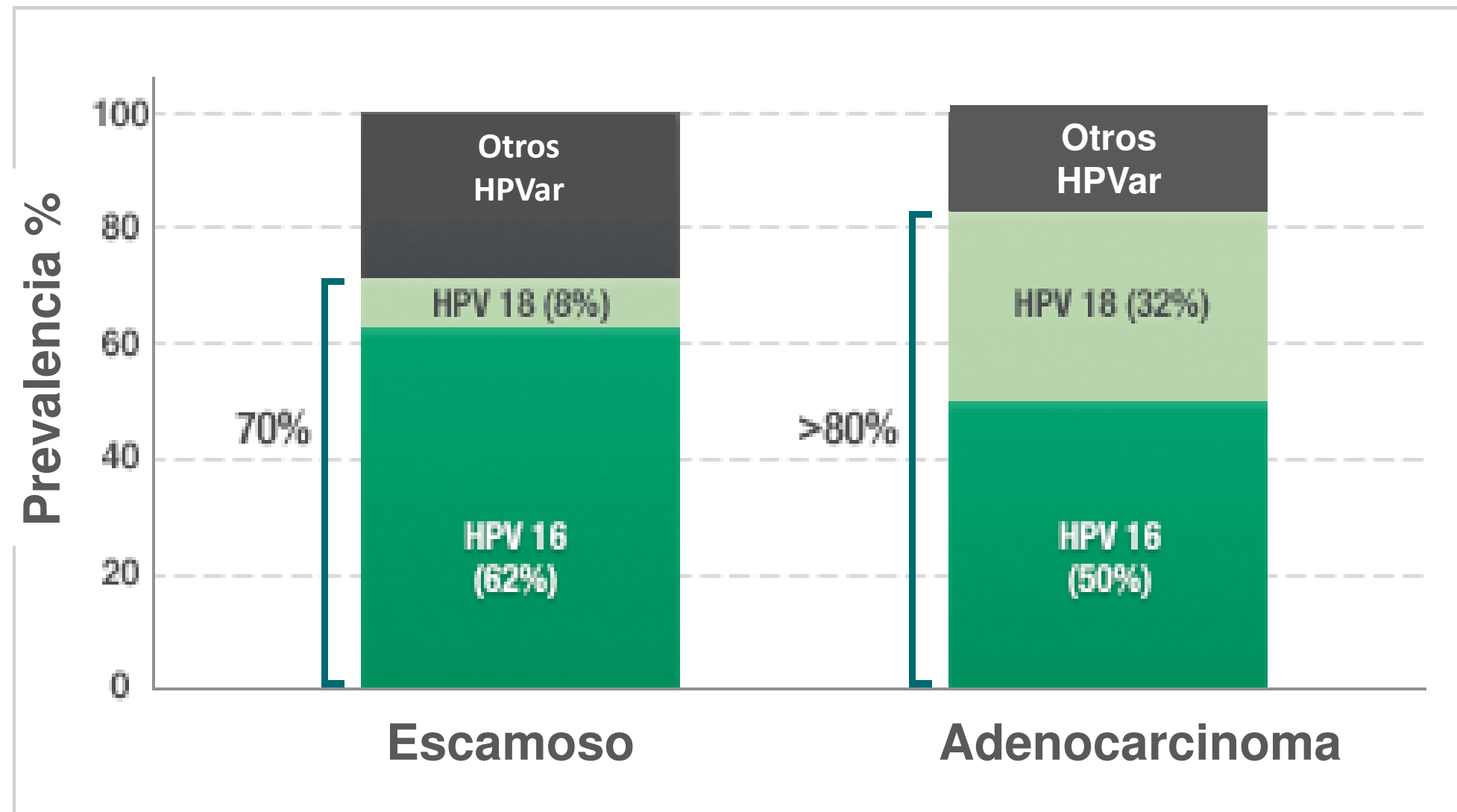
Genotipos de HPV de alto riesgo



n= 5 542 cánceres
61 estudios
16 países

En Argentina:
n=1 013 cánceres
HPV16: 59.5%
HPV18: 17.6%

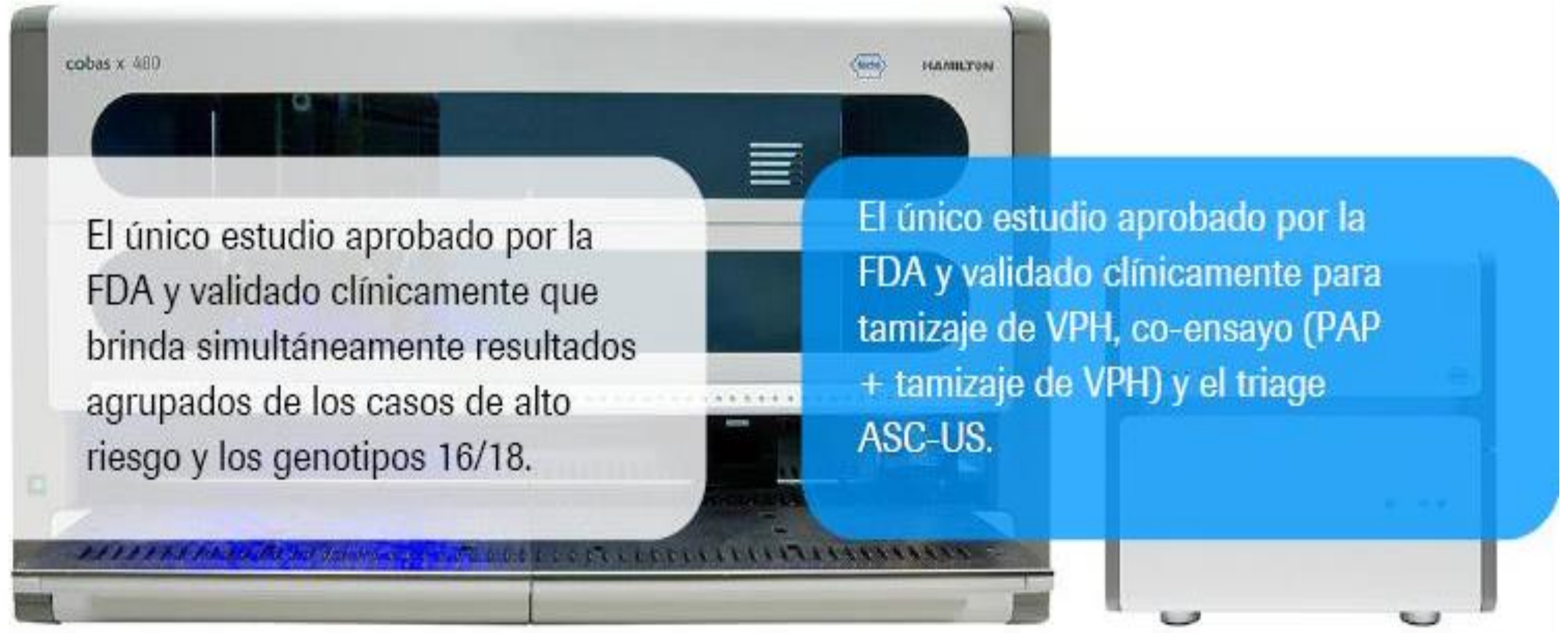
Genotipos de HPV de alto riesgo



✓ HPV de alto riesgo: **16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82.**

presentes en el 95% de los carcinomas de células escamosas.

Test HPV Cobas 4800



El único estudio aprobado por la FDA y validado clínicamente que brinda simultáneamente resultados agrupados de los casos de alto riesgo y los genotipos 16/18.

El único estudio aprobado por la FDA y validado clínicamente para tamizaje de VPH, co-ensayo (PAP + tamizaje de VPH) y el triage ASC-US.

Test HPV Cobas 4800

- ✓ Cepillado cervical
- ✓ Hisopado cervical
- ✓ Semen
- ✓ Hisopado uretral
- ✓ Orina 1er chorro (hombres)



CANAL 1



**Detección de 12
genotipos de HPV**

CANAL 2



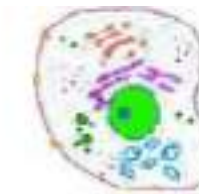
**Detecta
HPV16**

CANAL 3



**Detecta
HPV18**

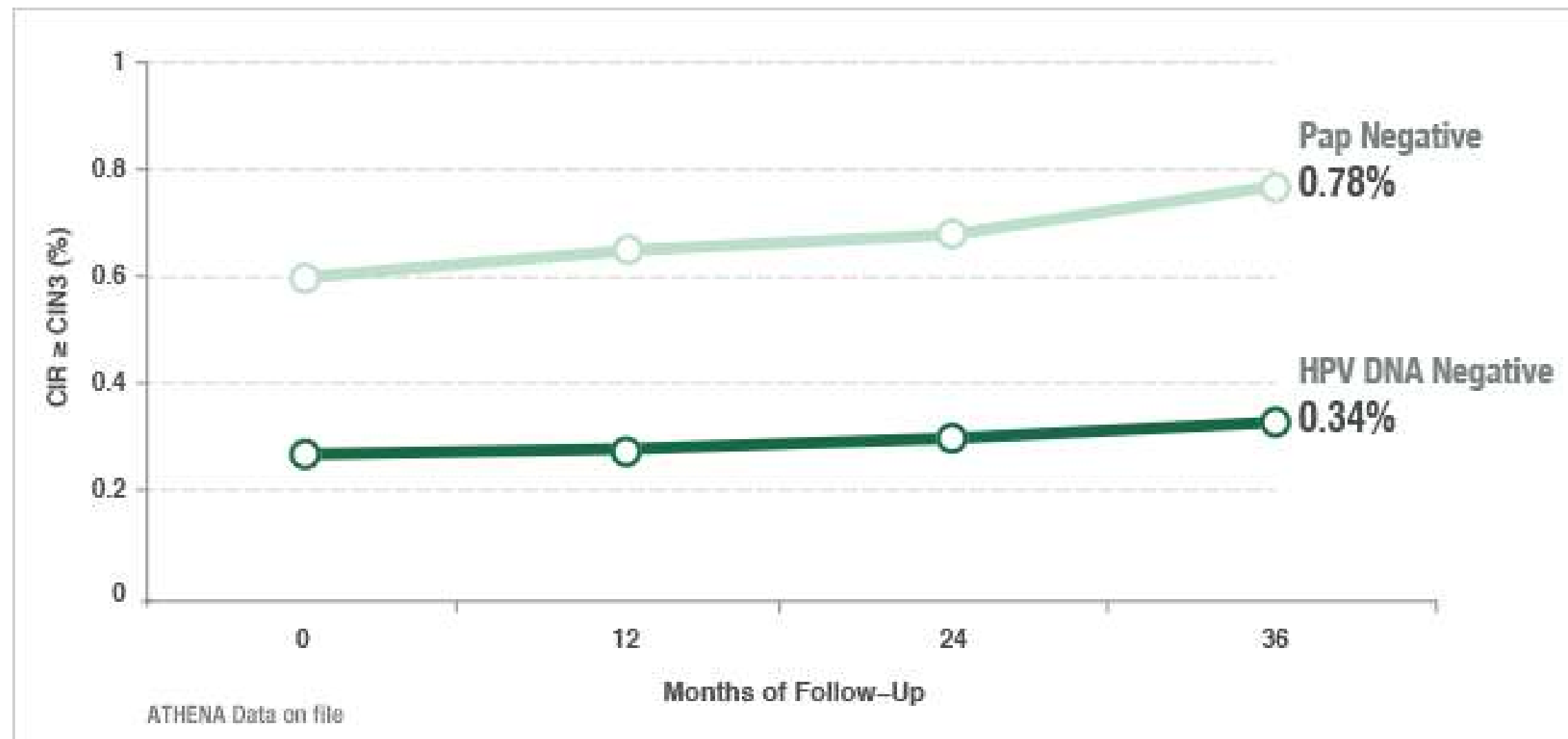
CANAL 4



**Detecta betaglobina
(control interno de
muestra adecuada)**

Incidencia CIN3 en PAP(-) vs HPC (-)

Tasa de incidencia acumulada de 3 años de \geq CIN3 de Papanicolau negativo versus HPV negativo



Estratificación de los pacientes: medicina personalizada

Riesgo de desarrollar CIN3+ en 3 años



1 en 4



1 en 9



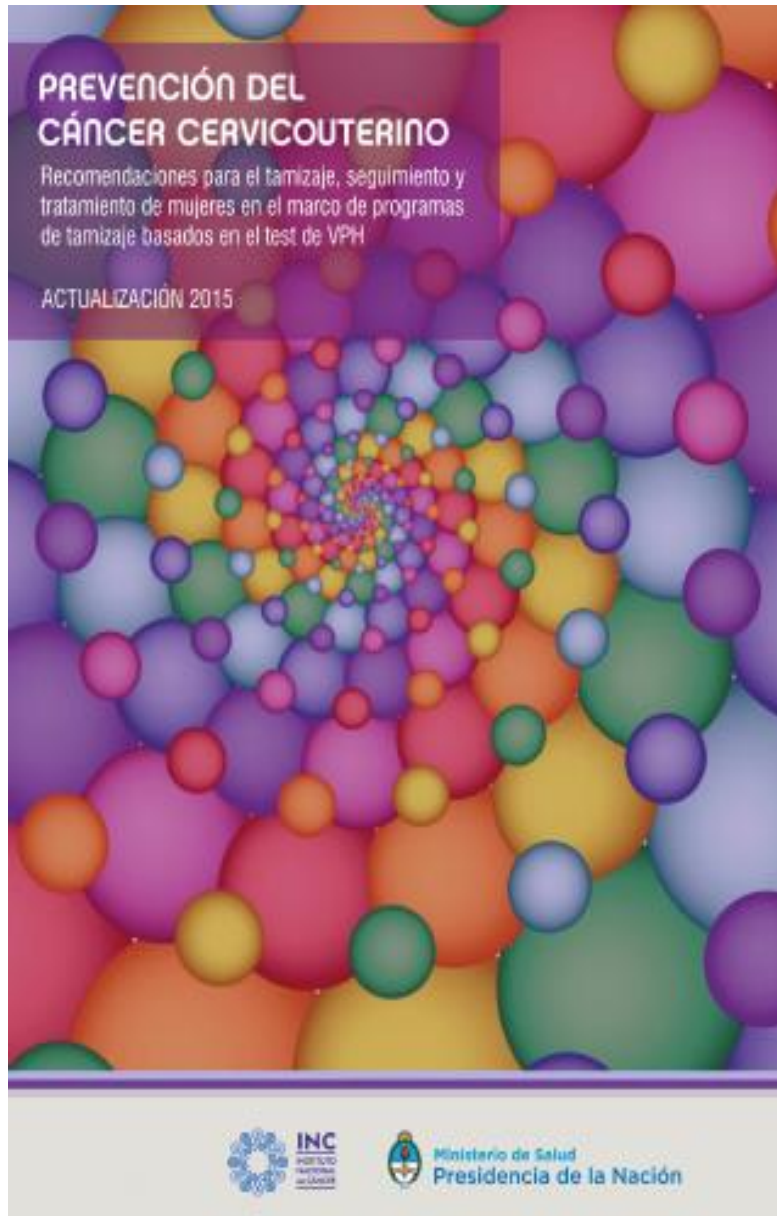
1 en 19

Test HPV para TAMIZAJE

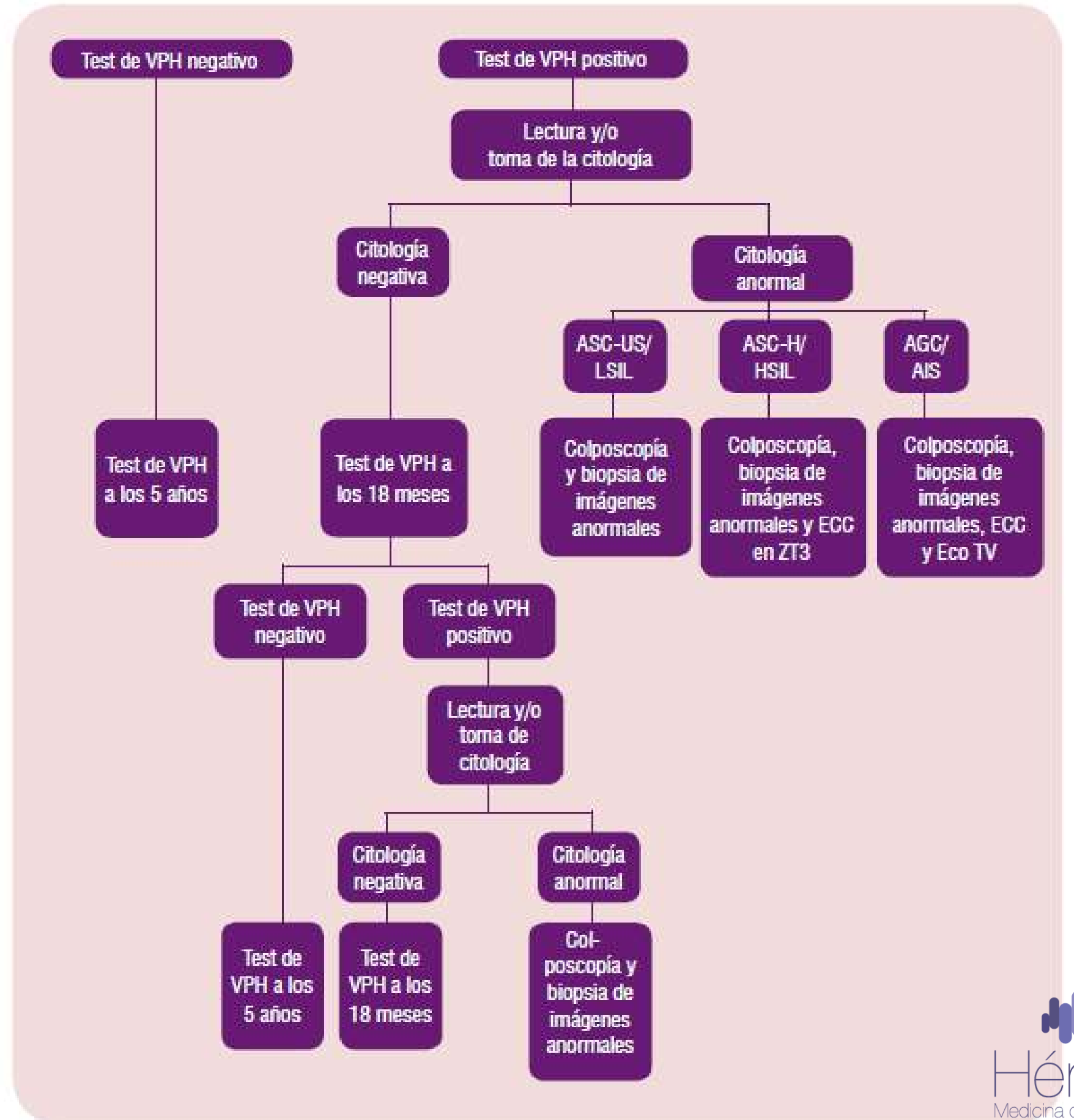
Permite una prevención personalizada y más efectiva del cáncer cervical invasivo.

Permite la detección de lesiones clínicamente relevantes, facilitando el tratamiento pre-cáncer invasivo.

Provee intervalos extendidos de retesteo.



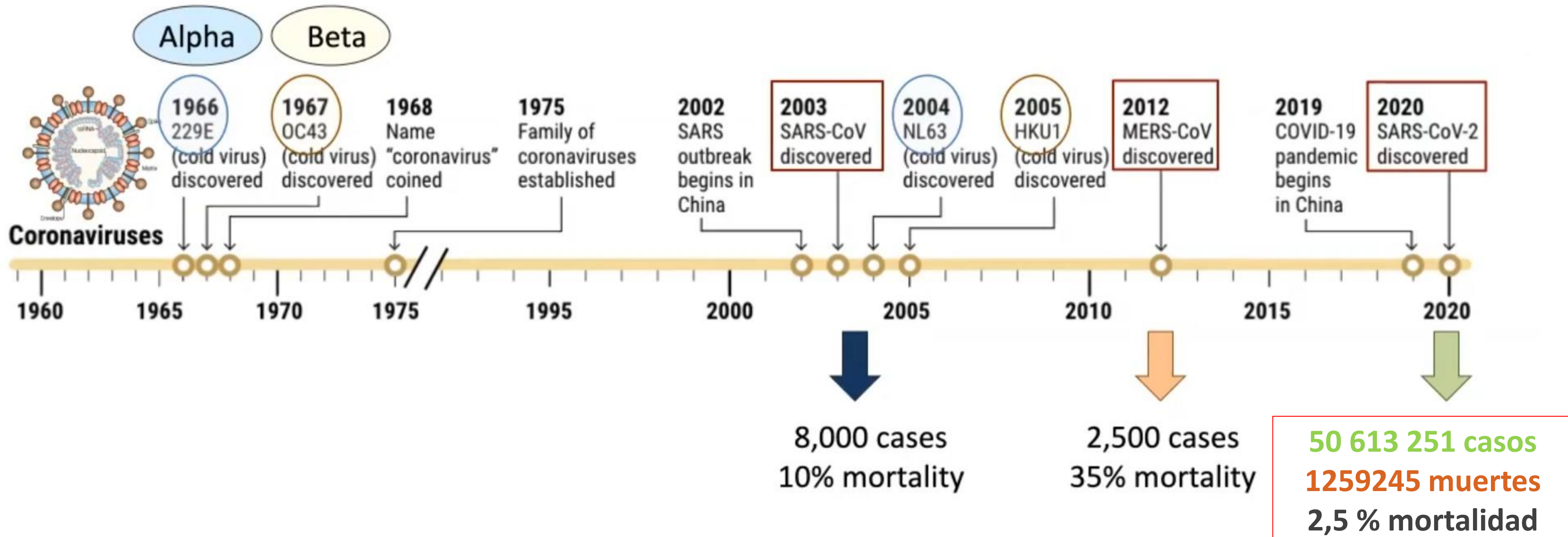
I. TAMIZAJE DE MUJERES DE 30 y MÁS AÑOS Y POSTERIOR SEGUIMIENTO/MANEJO DE LOS CASOS POSITIVOS CON CITOLOGÍA



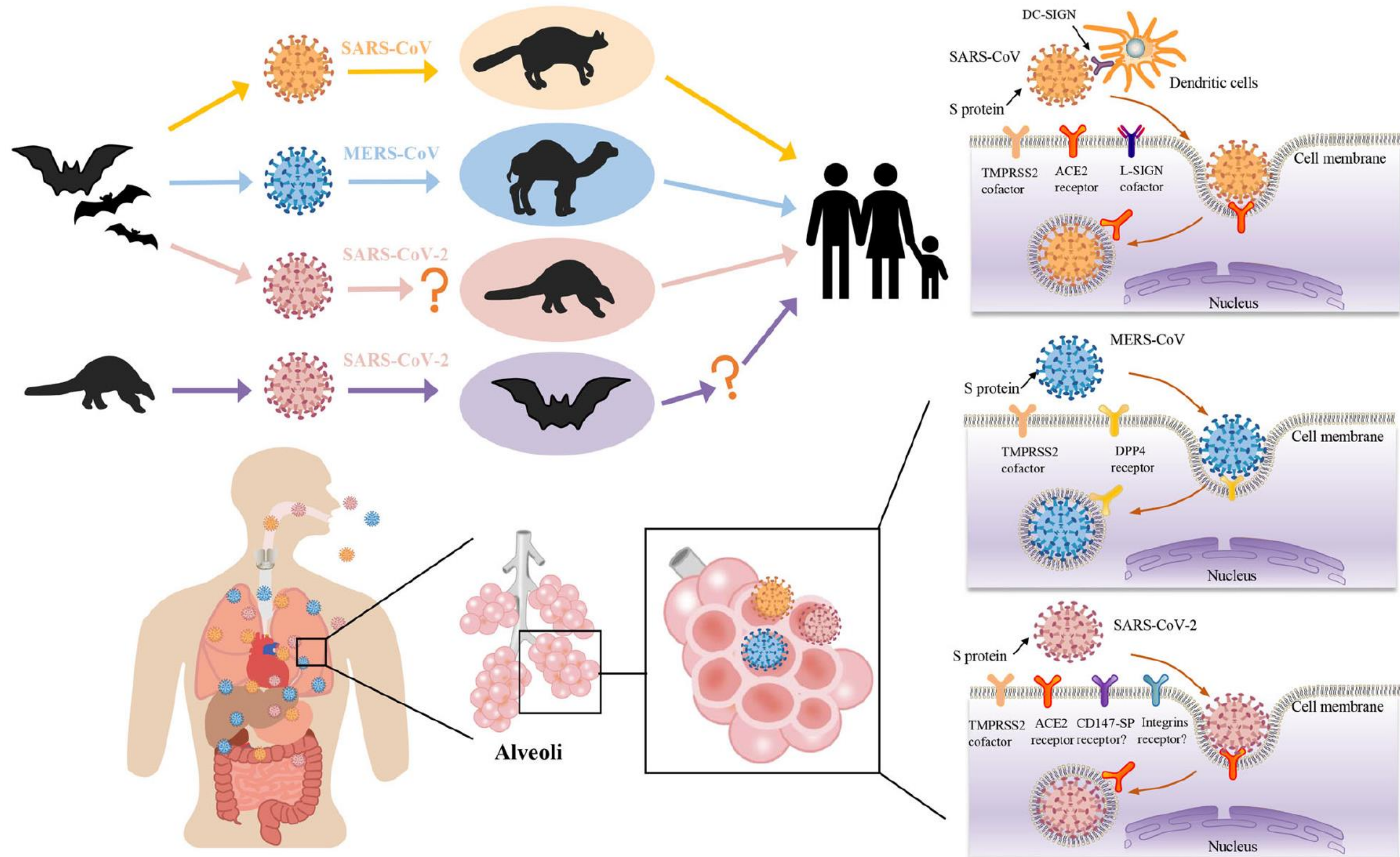
✓ 2011 a 2014 Se duplicó la capacidad de detección de cáncer y lesiones precancerosas

Diagnóstico molecular de COVID-19

Coronavirus humanos

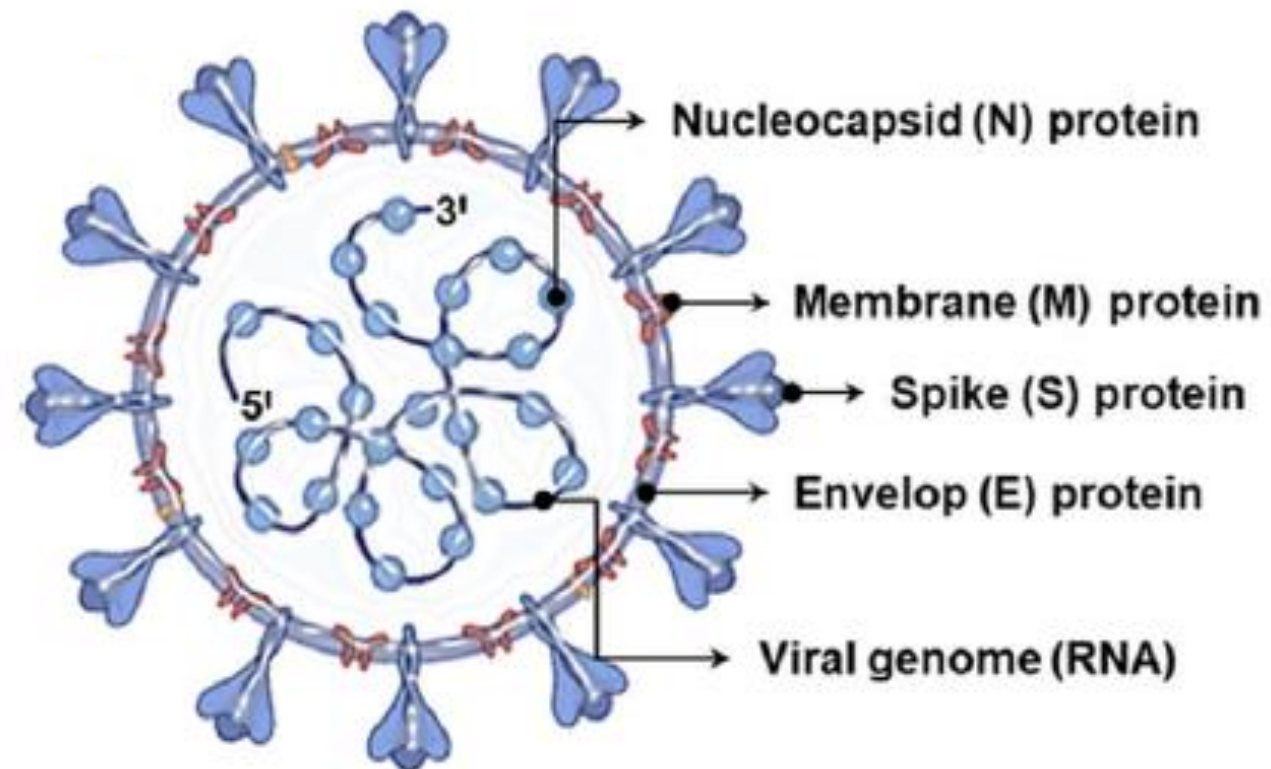


Potenciales hospedadores animales de Coronavirus humanos



Estructura de SARS-CoV2

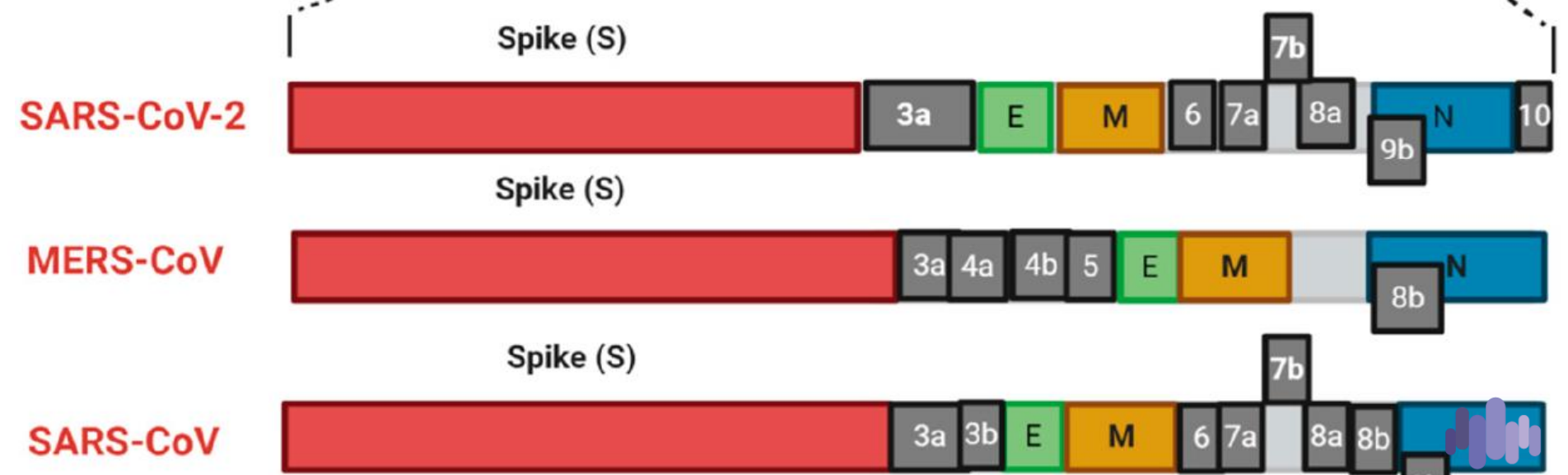
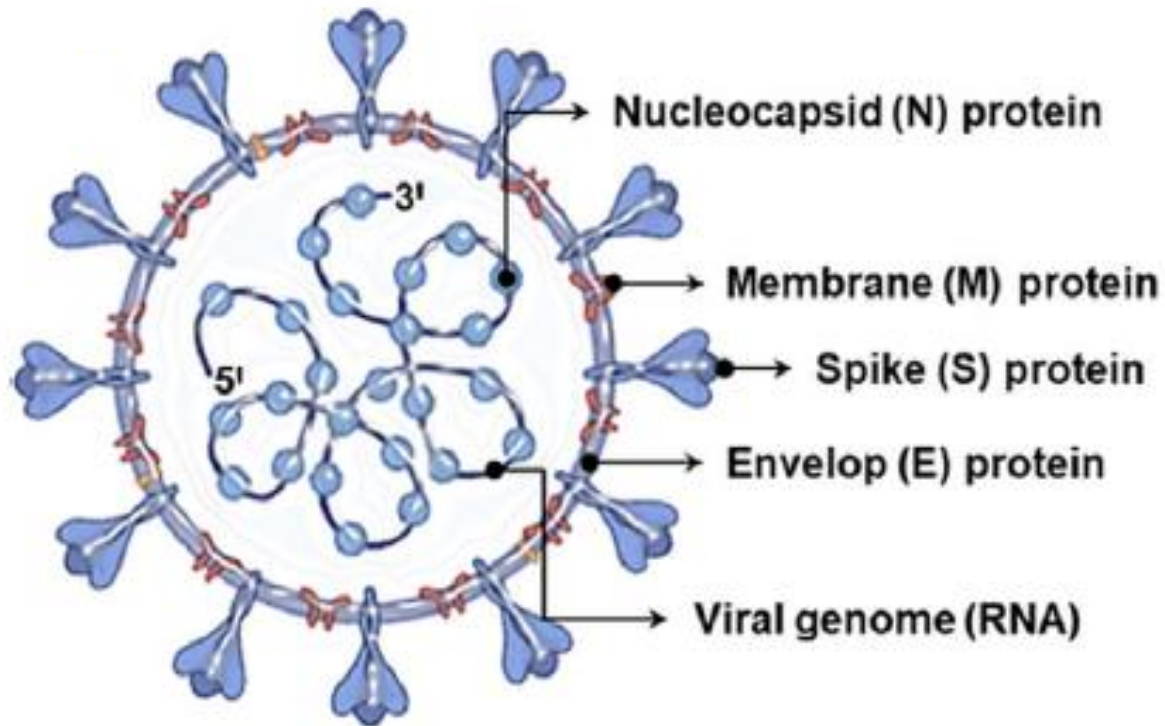
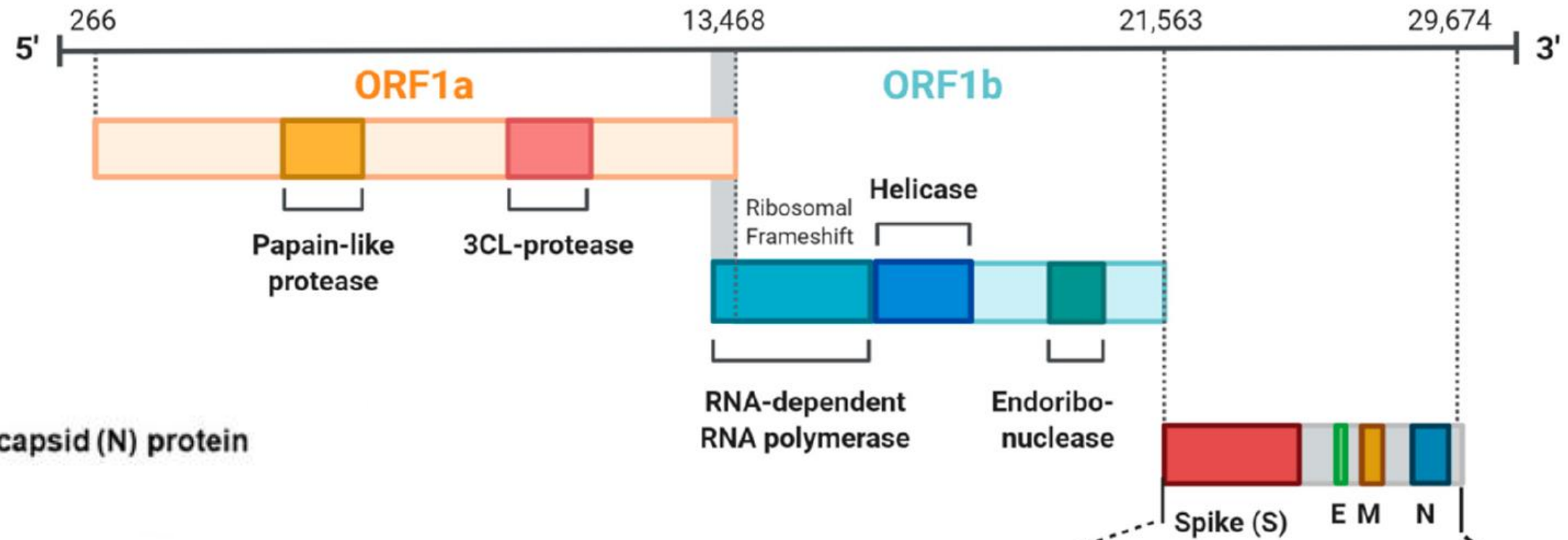
- ✓ Coronavirus SARS CoV-2: Síndrome Agudo Respiratorio Severo CoV.
- ✓ Familia *Coronaviridae*



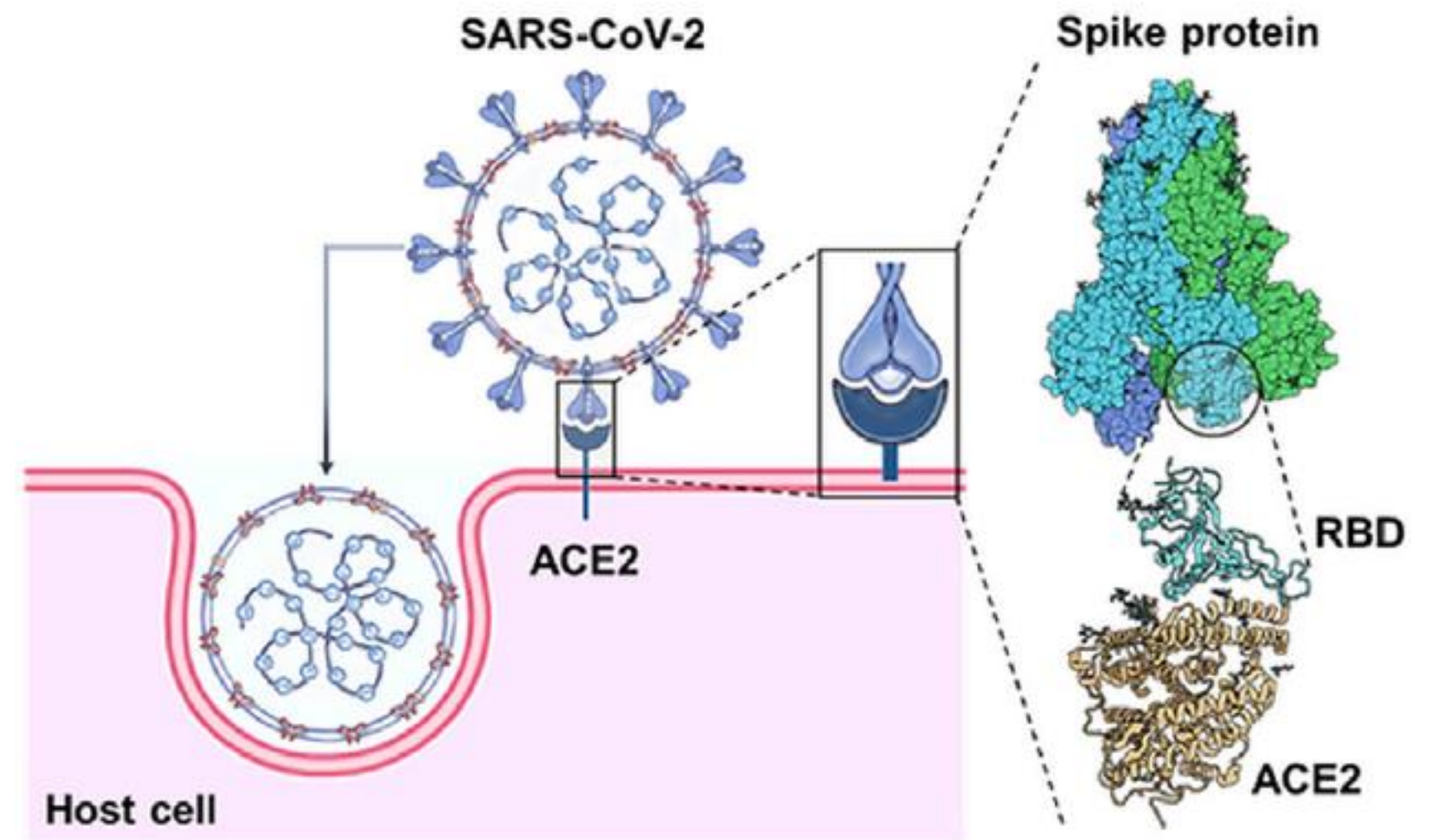
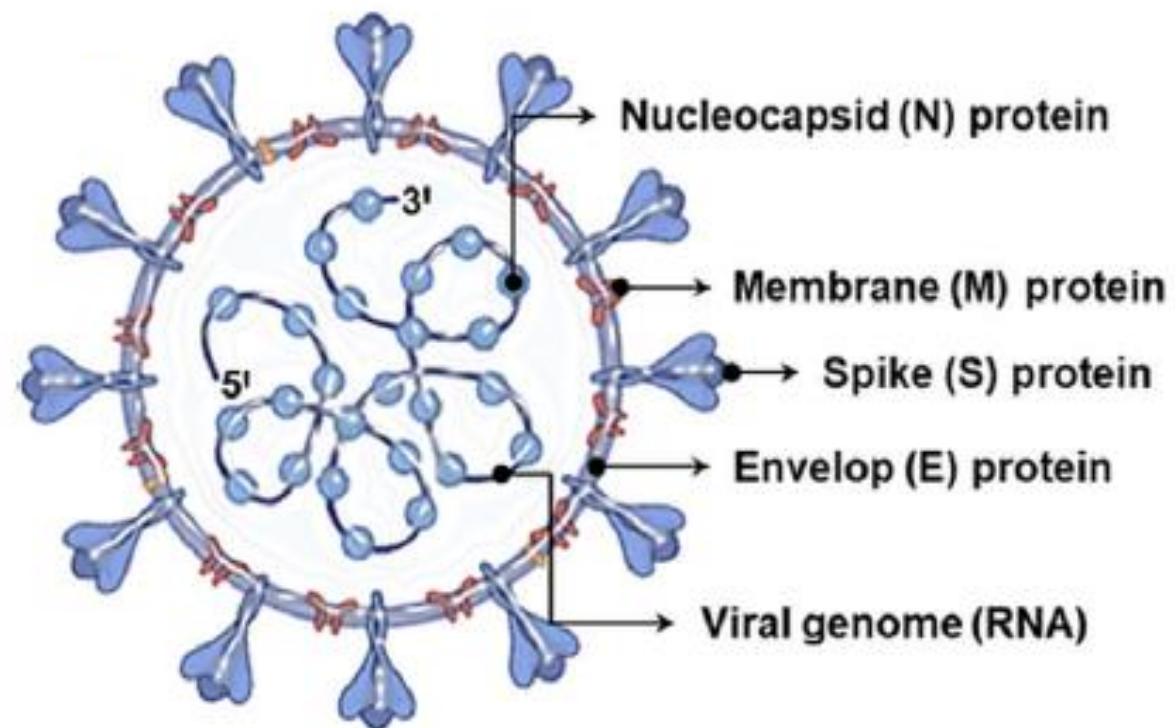
Estructura de SARS-CoV2

PROTEINAS NO ESTRUCTURALES

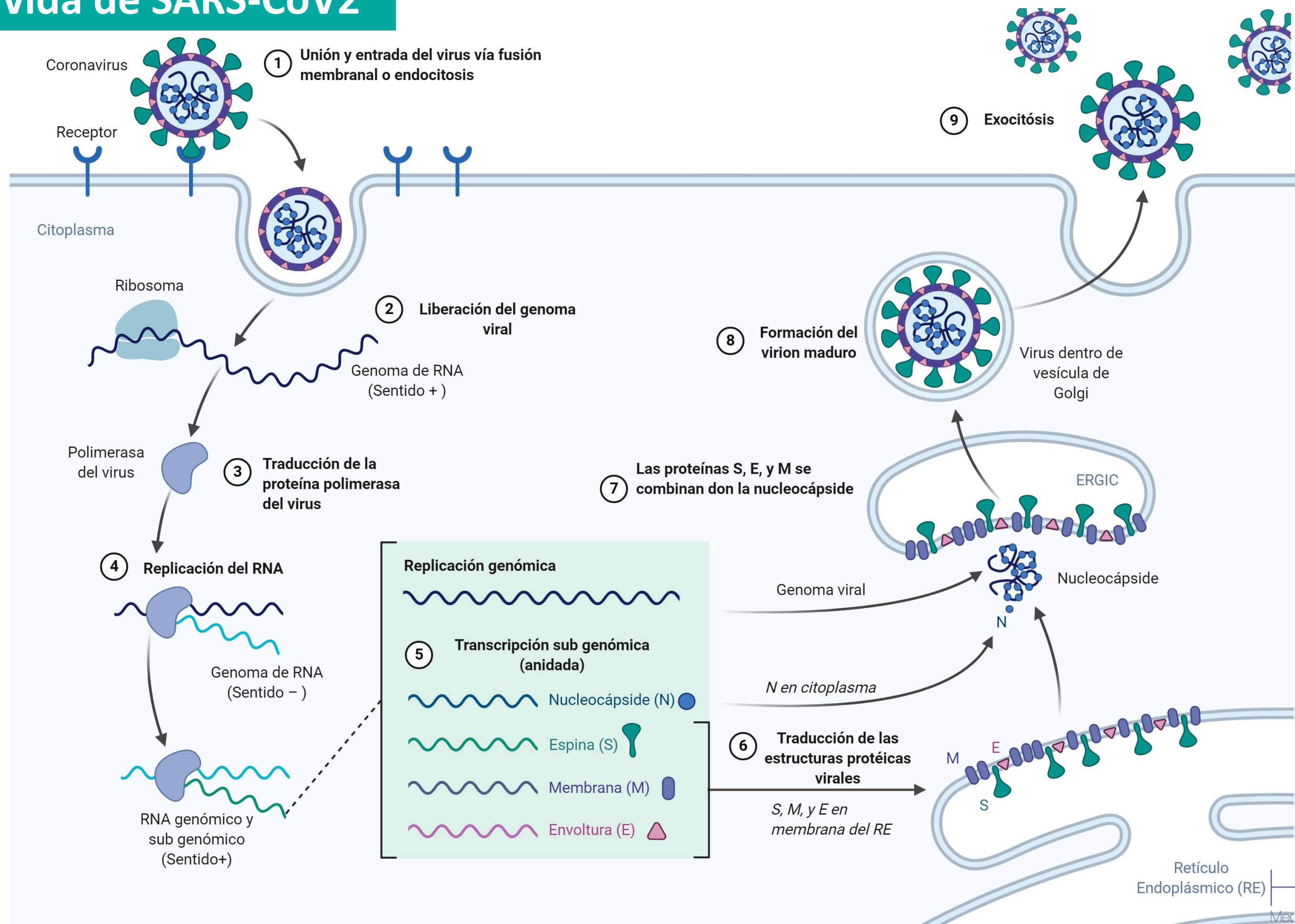
PROTEINAS ESTRUCTURALES



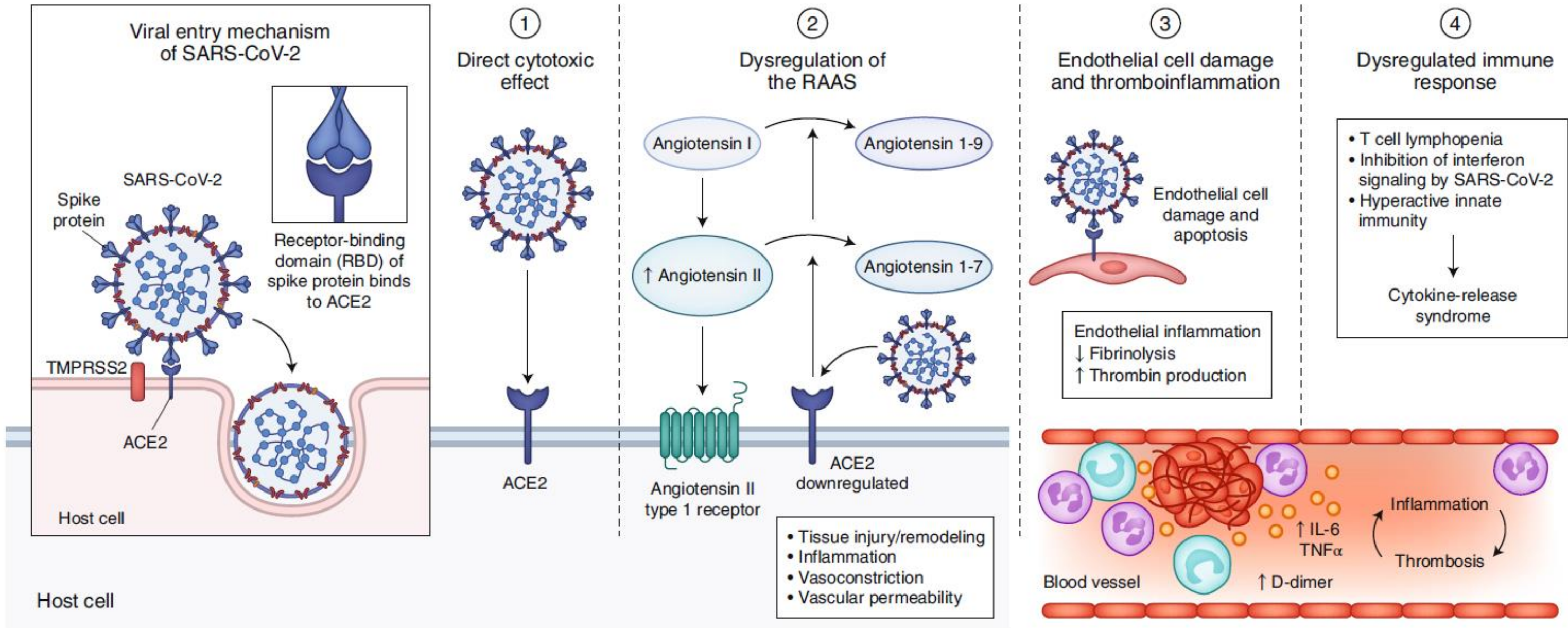
Estructura de SARS-CoV2



Ciclo de vida de SARS-CoV2



Patogénesis de SARS-CoV2



✓ Receptor para SARS CoV-2: proteína ACE2 (Angiotensin Converting Enzyme 2)

Patogénesis de SARS-CoV2

Neurologic

Headaches
Dizziness
Encephalopathy
Guillain-Barré
Ageusia
Myalgia
Anosmia
Stroke



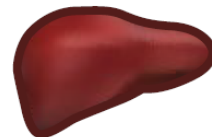
Renal

Acute kidney injury
Proteinuria
Hematuria



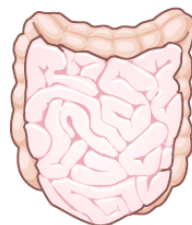
Hepatic

Elevated
aminotransferases
Elevated bilirubin



Gastrointestinal

Diarrhea
Nausea/vomiting
Abdominal pain
Anorexia



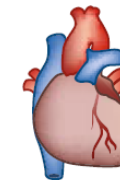
Thromboembolism

Deep vein thrombosis
Pulmonary embolism
Catheter-related thrombosis



Cardiac

Takotsubo cardiomyopathy
Myocardial injury/myocarditis
Cardiac arrhythmias
Cardiogenic shock
Myocardial ischemia
Acute cor pulmonale



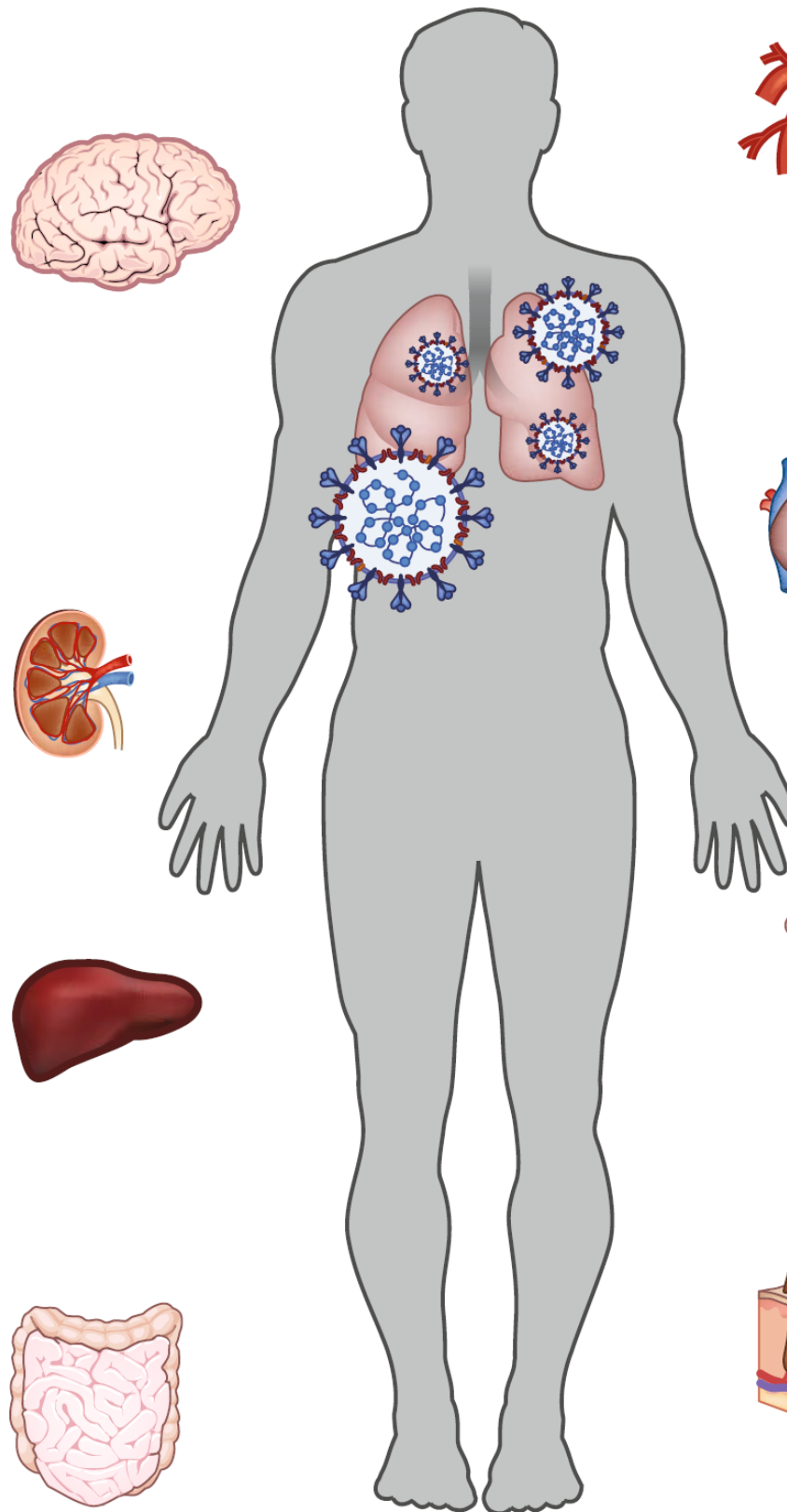
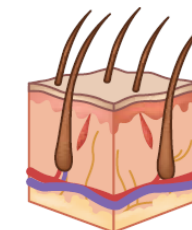
Endocrine

Hyperglycemia
Diabetic ketoacidosis

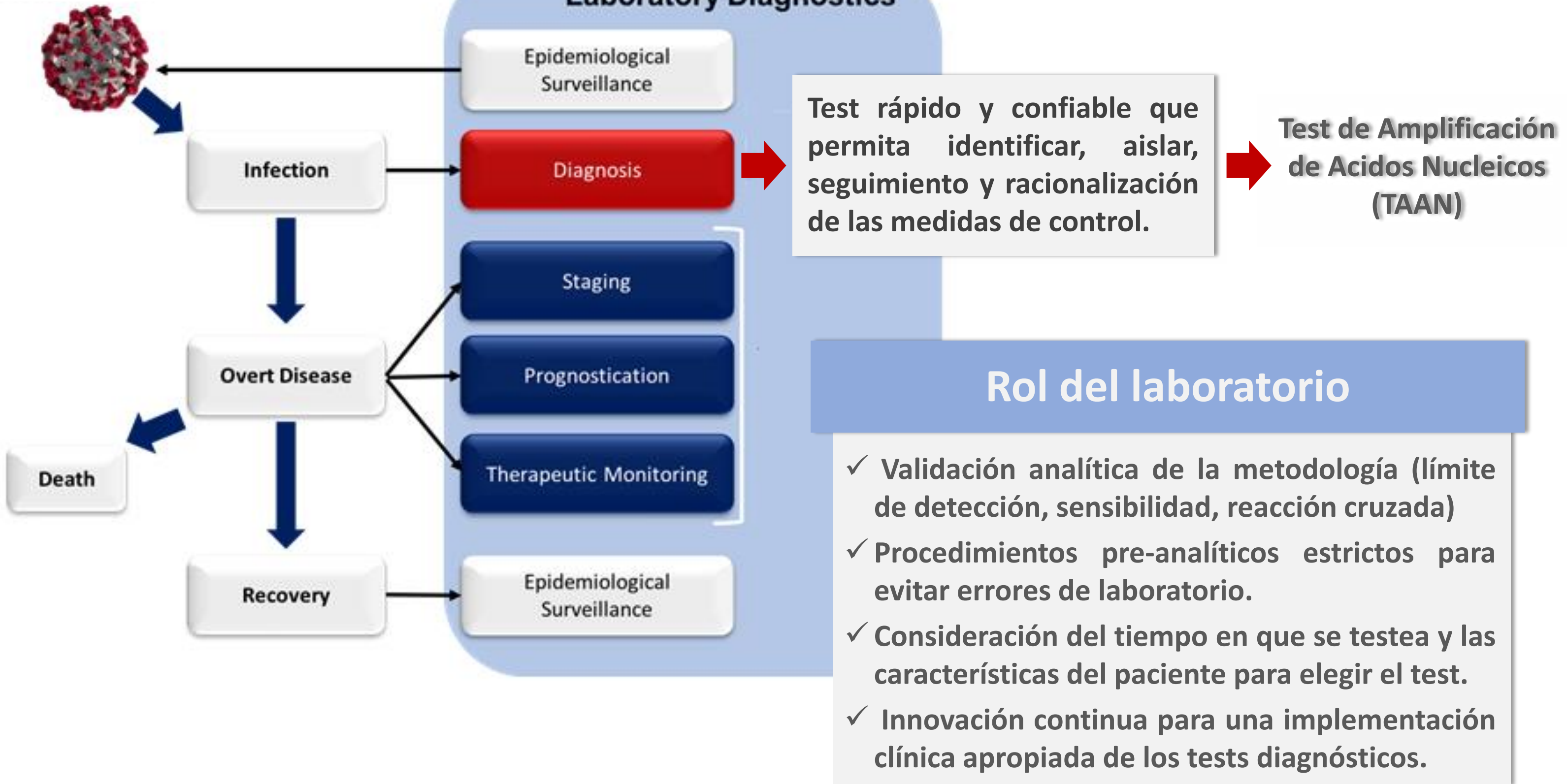


Dermatological

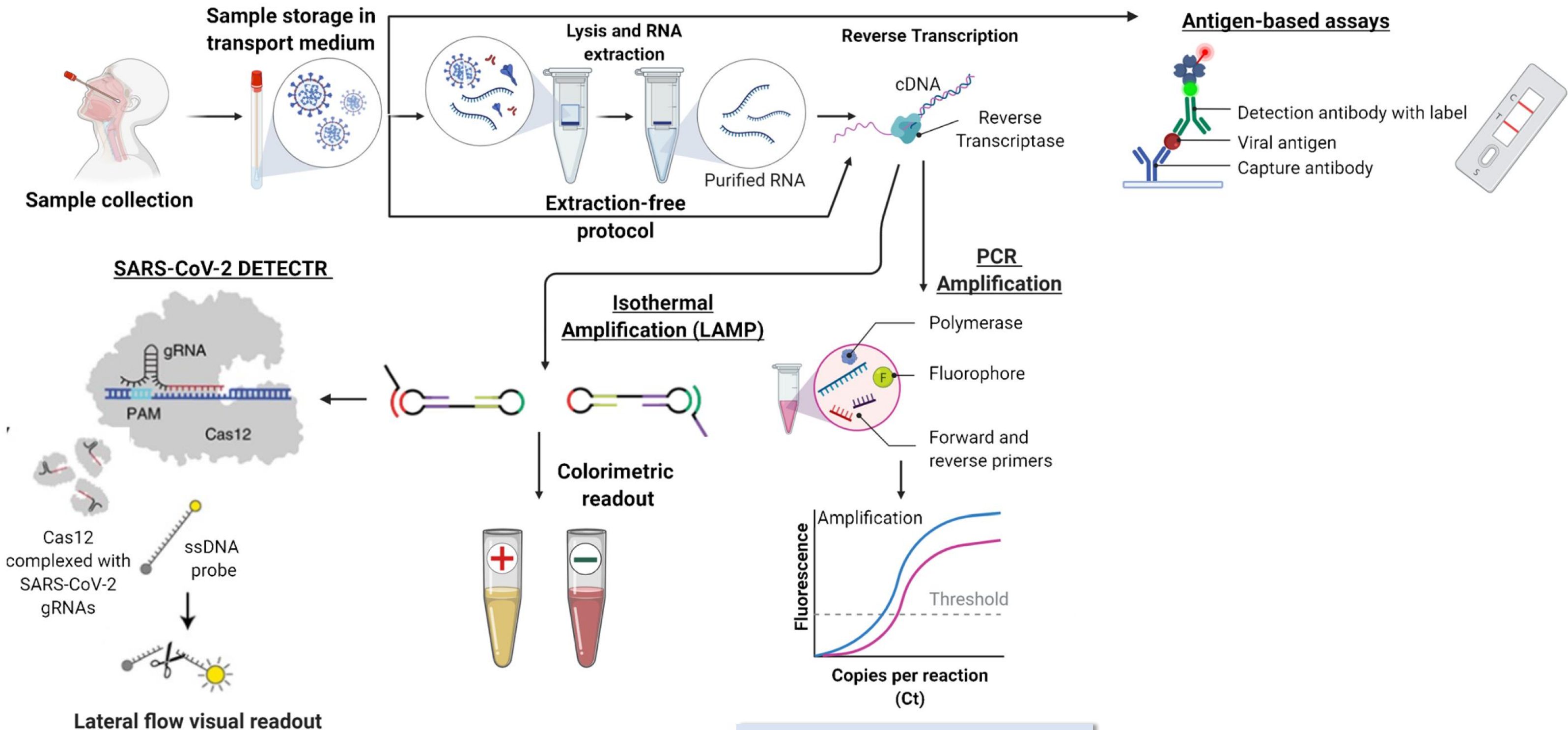
Petechiae
Livedo reticularis
Erythematous rash
Urticaria
Vesicles
Pernio-like lesions



Sars-CoV2

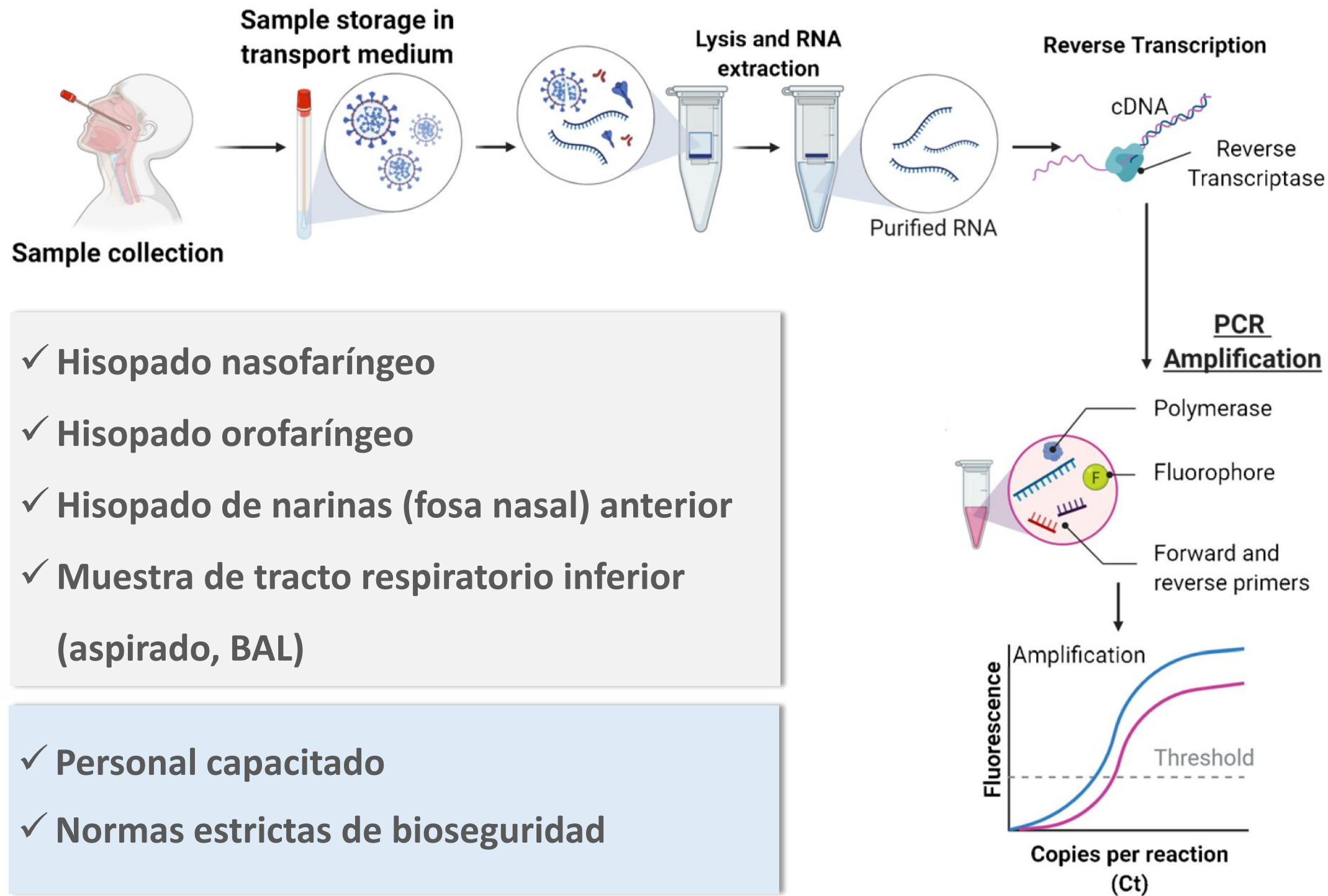


Detección de SARS-CoV2

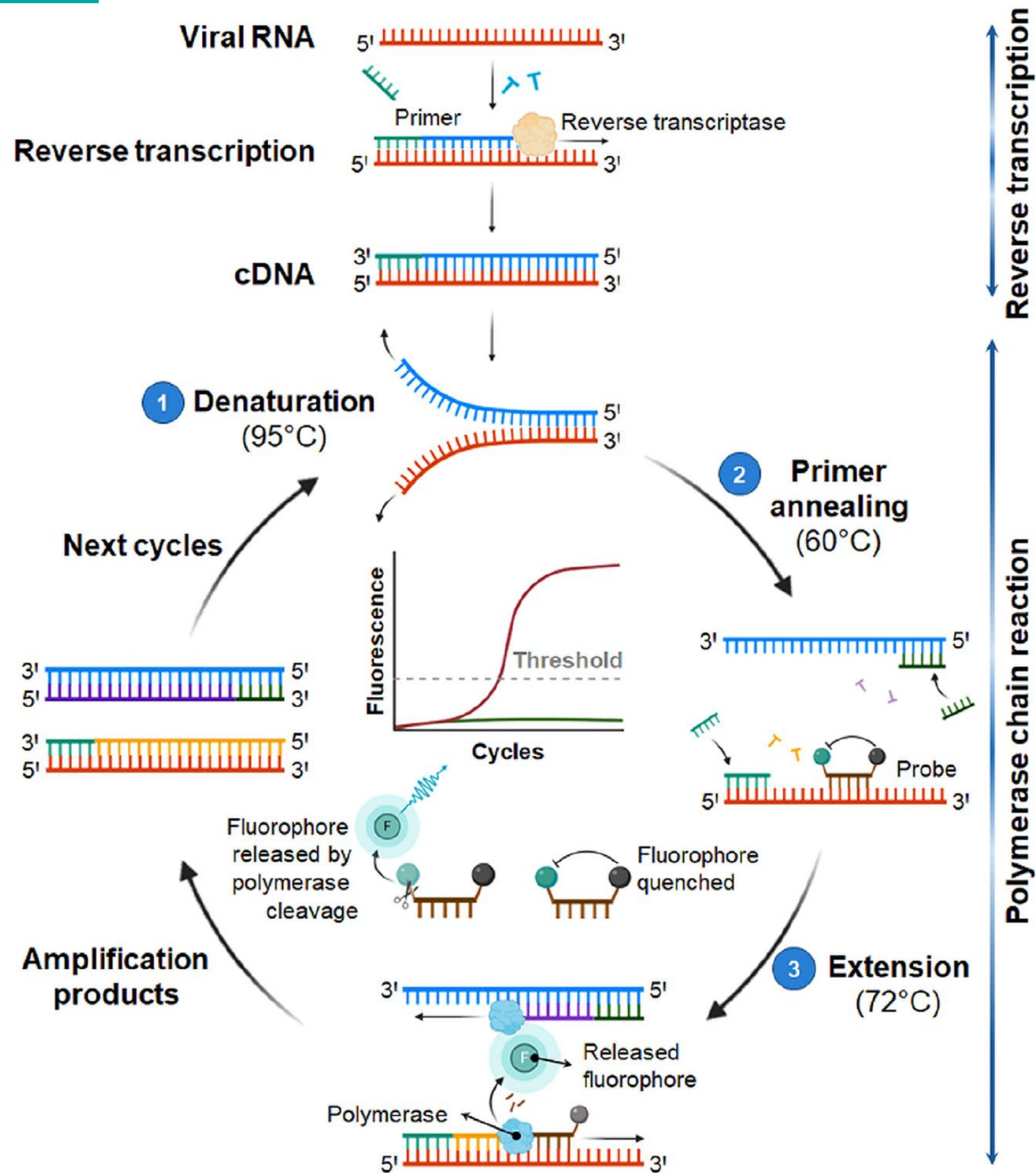


RT-PCR método GOLD STANDARD

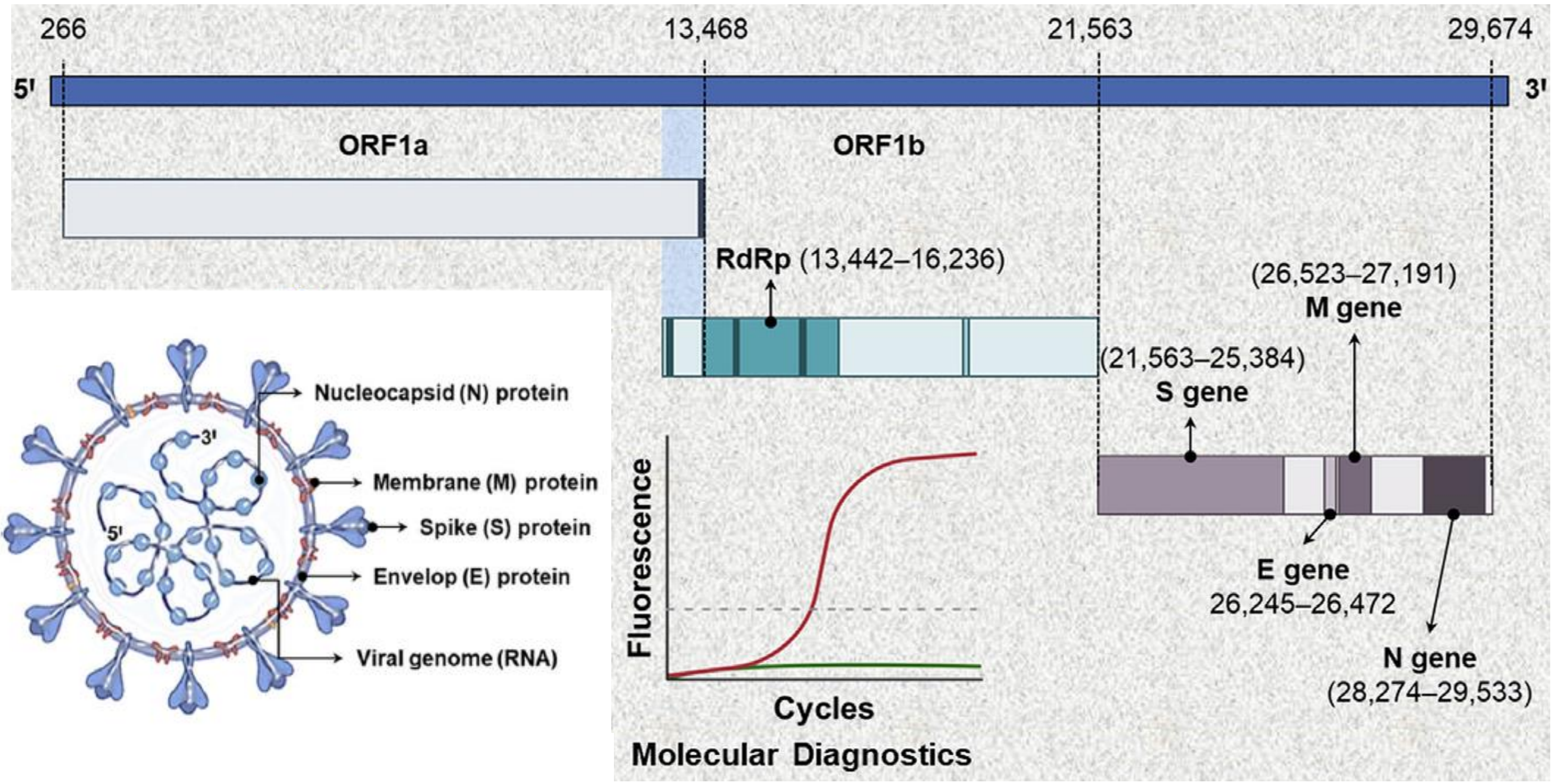
Detección de SARS-CoV2



Técnica de RT-PCR



Genoma de SARS CoV-2



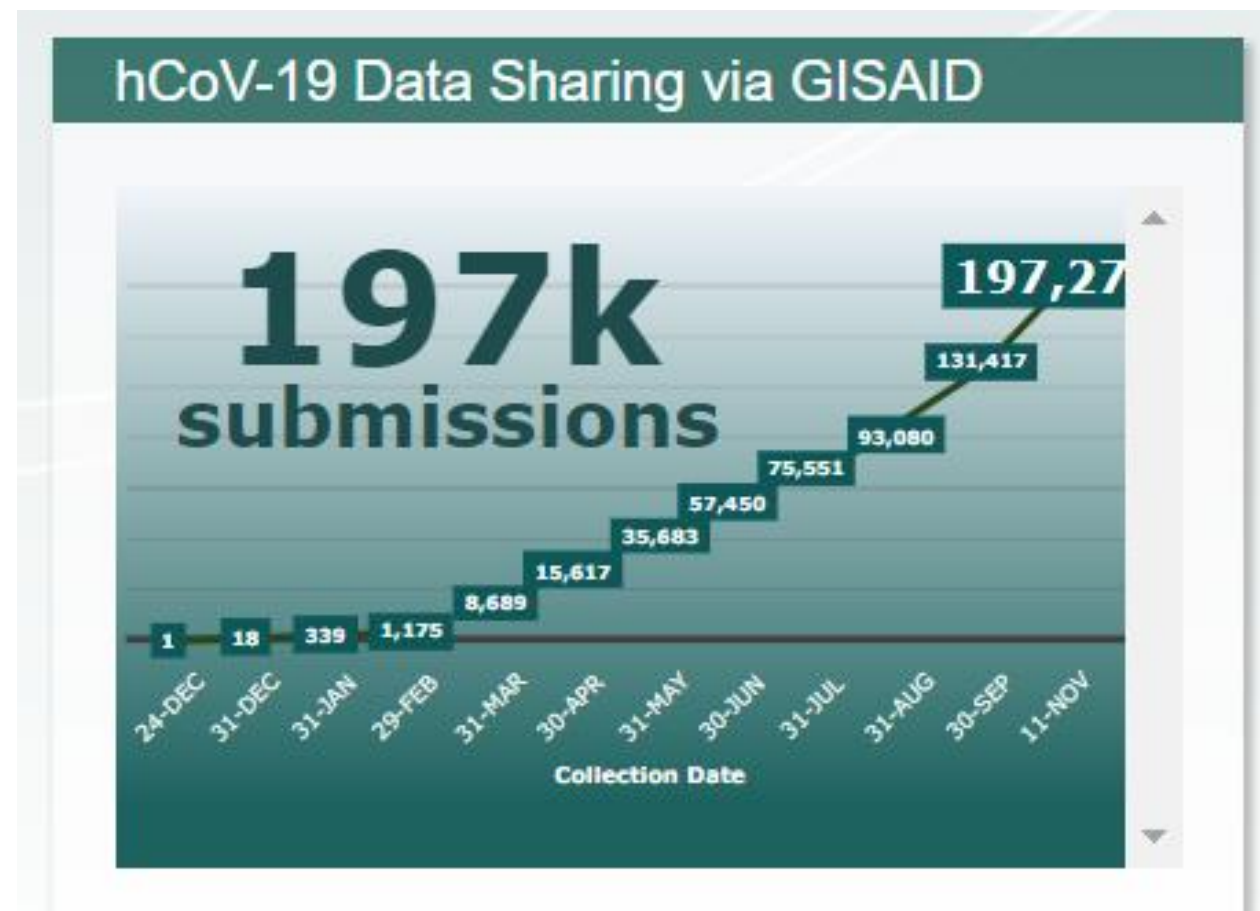
Genoma de SARS CoV-2

- Primer genoma secuenciado a partir de BAL de un paciente infectado (Genbank: MN908947) –enero 2020
- Secuenciación metagenómica del ARN nuevo virus de familia Coronaviridae: 2019-nCoV.
- Por análisis filogenético se vio que tenia 89,1% similitud con los Betacoronavirus subgénero Sarbecovirus SARS-LIKE: SARS CoV-2
- Hallazgos de secuenciación de segunda generación de SARS CoV-2 depositados en GSAID.



Global Initiative on Sharing All Influenza Data

<https://www.gisaid.org/>



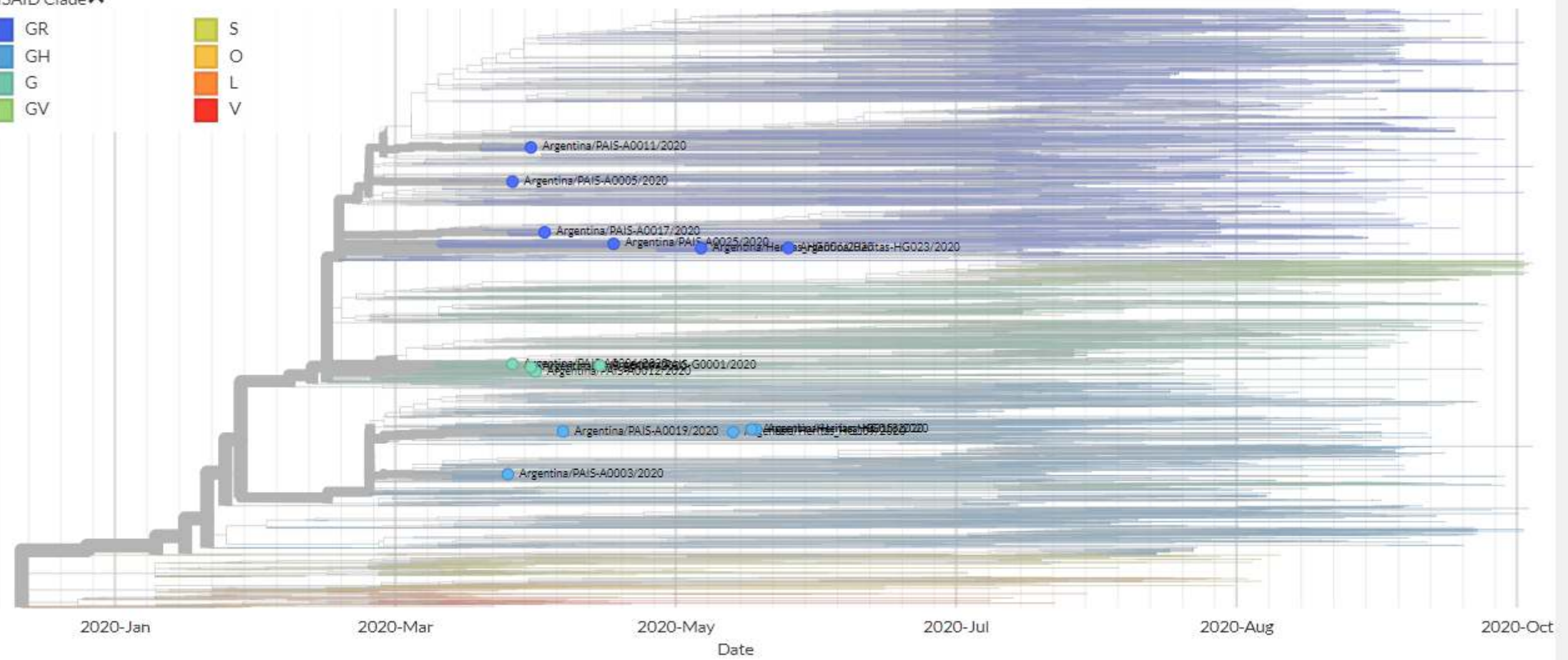
Genomic epidemiology of hCoV-19

Showing 15 of 3351 genomes sampled between Mar 2020 and May 2020. Filtered to Argentina (15).

Phylogeny

GISAID Clade ^

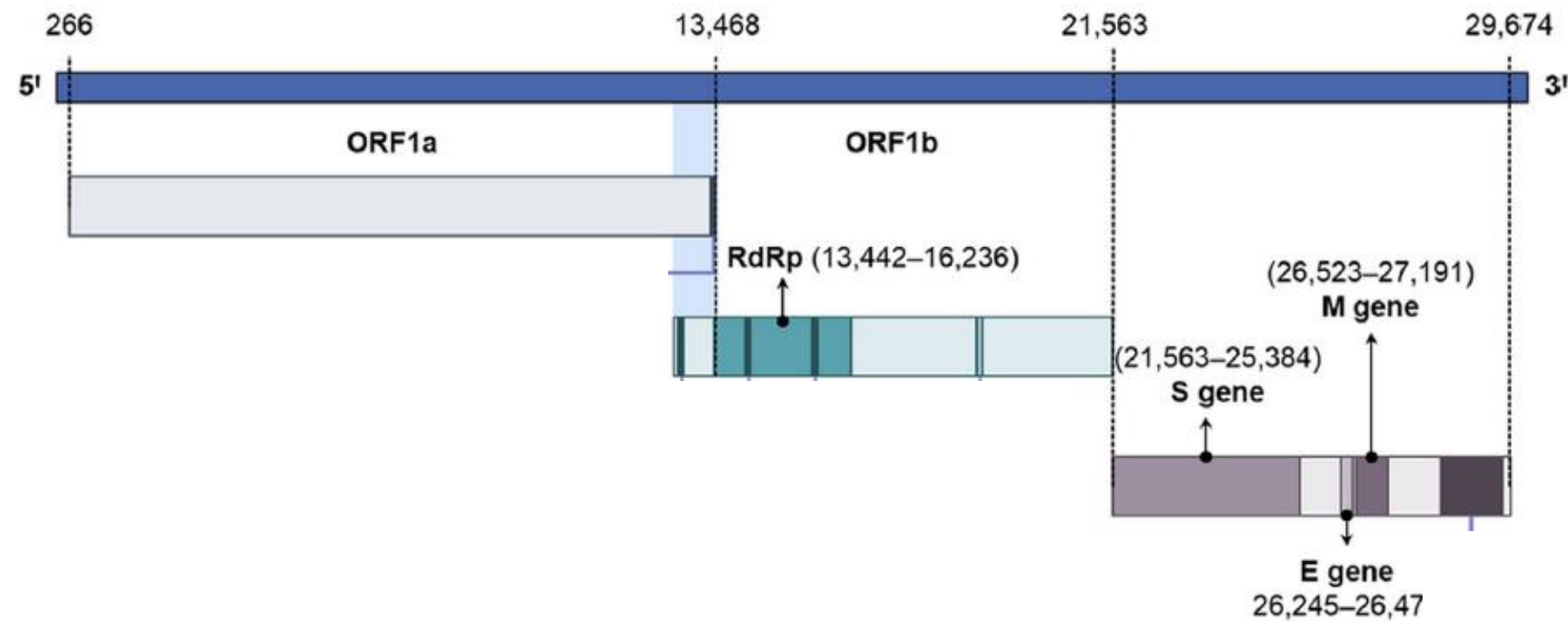
- GR
- GH
- G
- GV
- S
- O
- L
- V



RESET LAYOUT

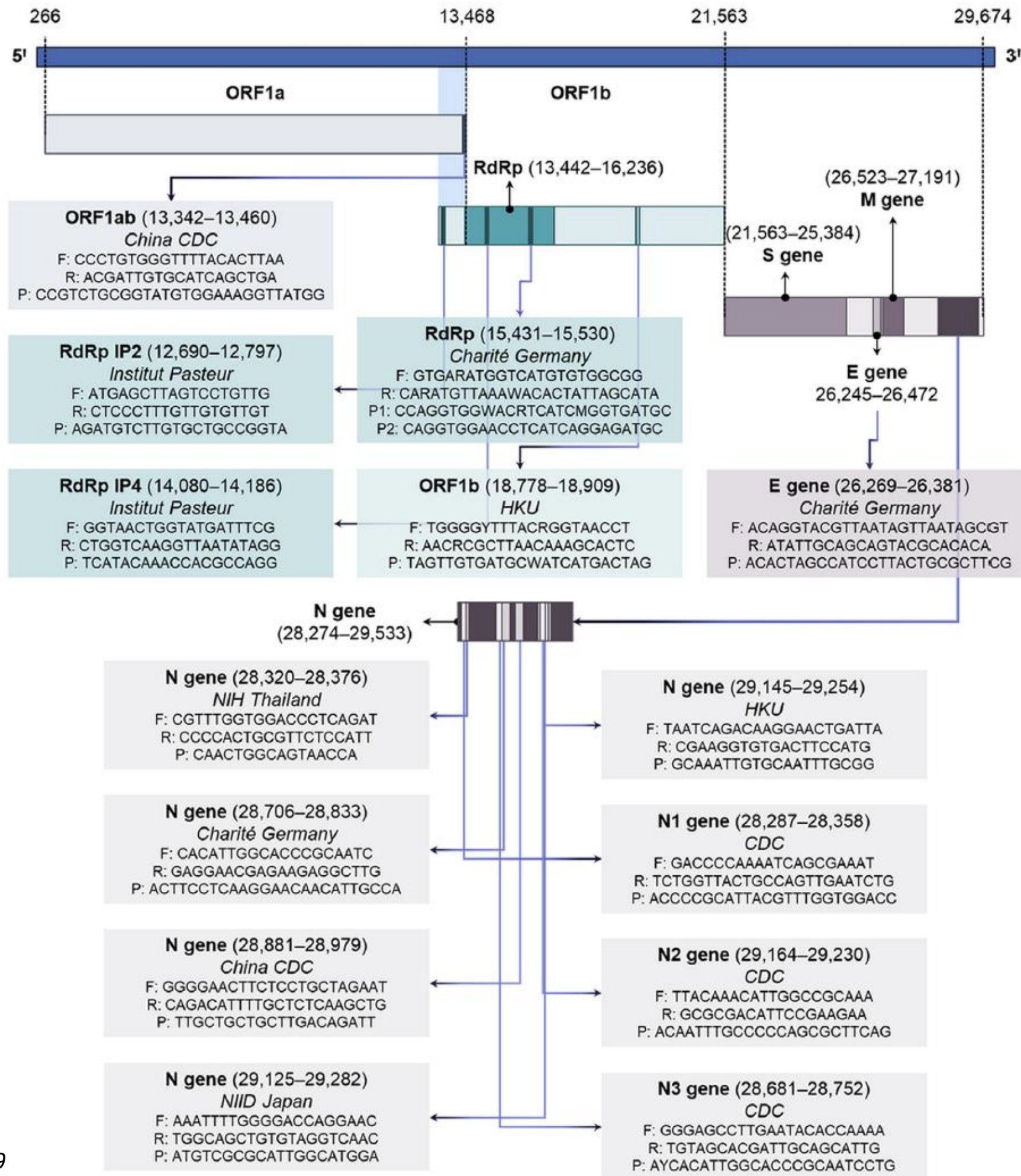
Geography

RESET ZOOM

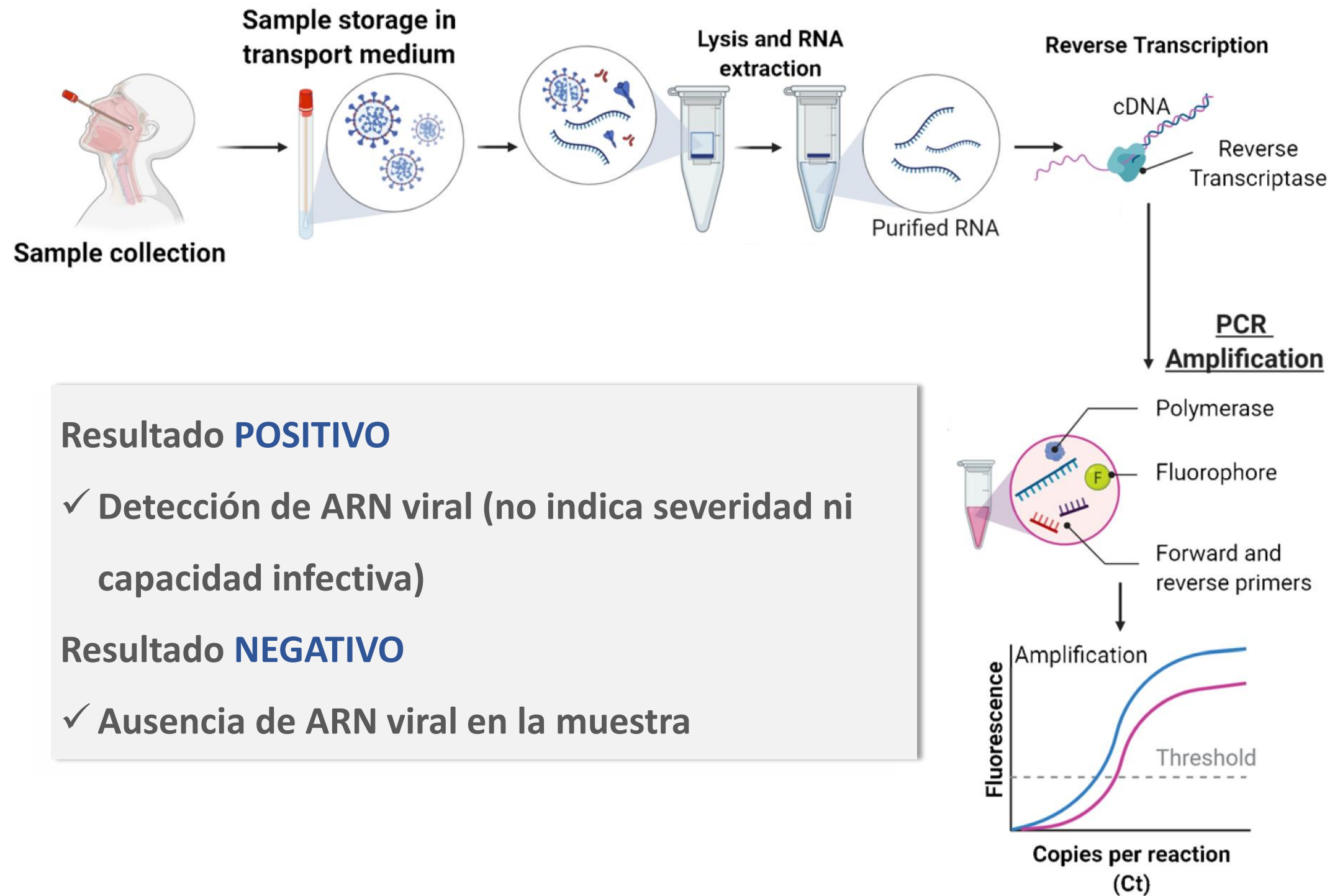


Institute	Gene targets
China CDC, China	ORF1ab and N
Institut Pasteur, Paris, France	Two targets in RdRP
US CDC, USA	Three targets in N gene
National Institute of Infectious Diseases, Japan	Pancorona and multiple targets, Spike protein
Charité, Germany	RdRP, E, N
HKU, Hong Kong SAR	ORF1b-nsp14, N
National Institute of Health, Thailand	N

- ✓ Aprobados para USO DE EMERGENCIA (EUO)
- ✓ Aprobados por ANMAT



Detección de SARS-CoV2



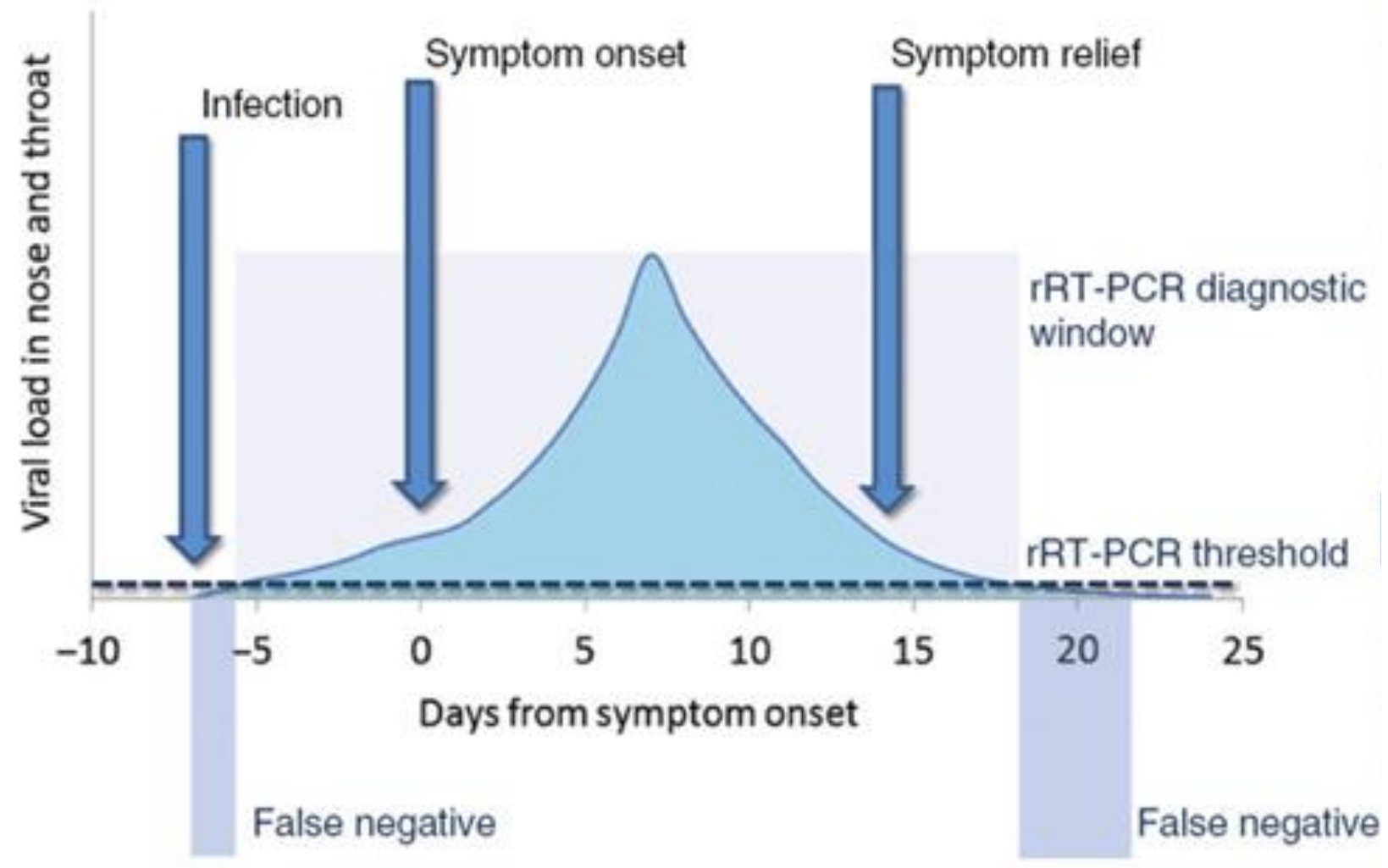
Resultado **POSITIVO**

✓ Detección de ARN viral (no indica severidad ni capacidad infectiva)

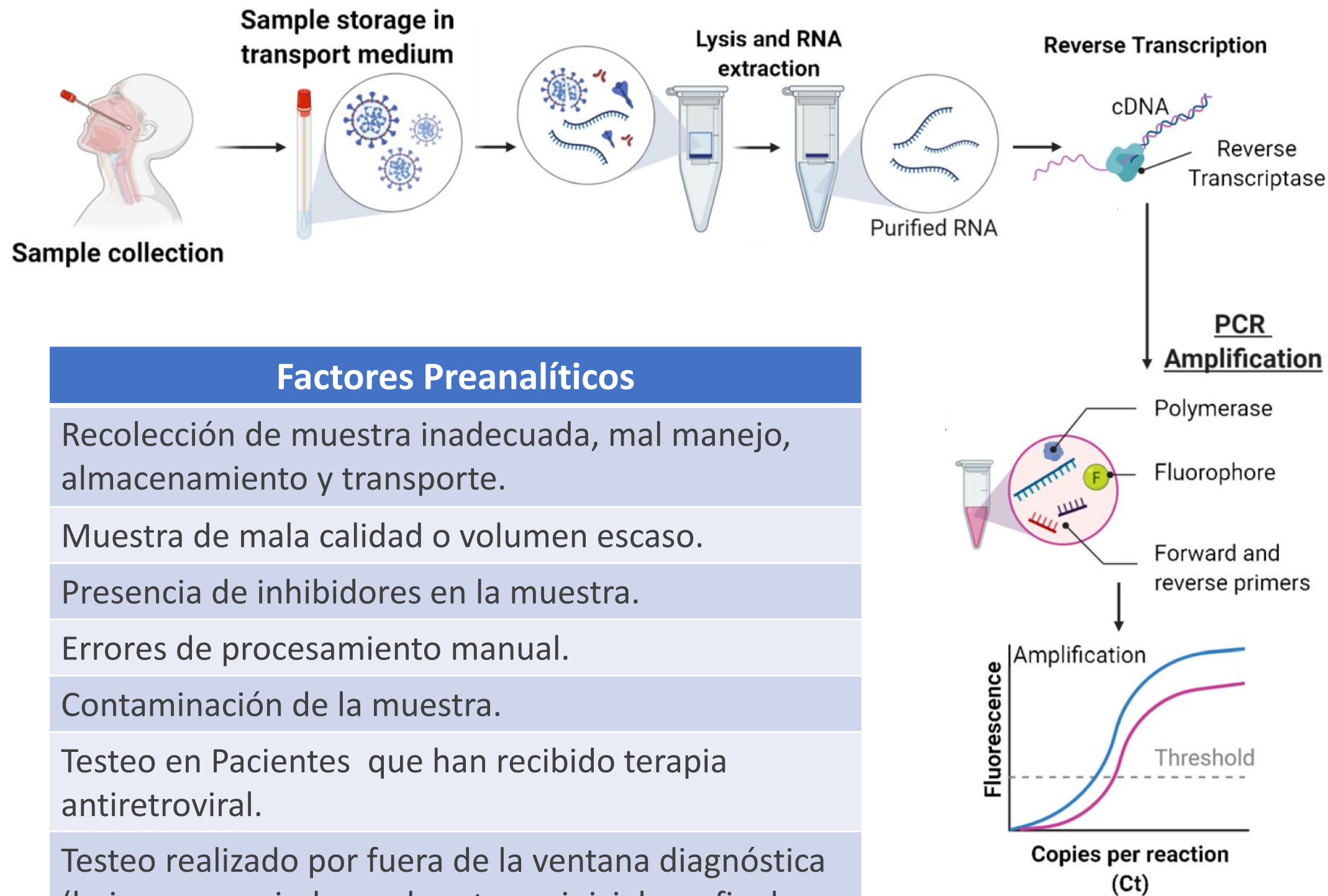
Resultado **NEGATIVO**

✓ Ausencia de ARN viral en la muestra

Evolución de la carga viral de SARS CoV-2



Detección de SARS-CoV2



Factores Preanalíticos

- Recolección de muestra inadecuada, mal manejo, almacenamiento y transporte.
- Muestra de mala calidad o volumen escaso.
- Presencia de inhibidores en la muestra.
- Errores de procesamiento manual.
- Contaminación de la muestra.
- Testeo en Pacientes que han recibido terapia antiretroviral.
- Testeo realizado por fuera de la ventana diagnóstica (bajas cargas virales en las etapas iniciales o finales de la infección).

Factores Analíticos

- Targets virales utilizados para la detección.
- Posibles mutaciones o recombinaciones virales.
- Falta de armonización entre juegos de primers y sonda limitan la comparación entre ensayos.
- Definición del cut-off inespecífica.
- Uso de ensayos no validados adecuadamente.
- Malfuncionamiento de los equipos.
- Amplificación inespecífica.
- Mala interpretación de los resultados.

Casos sospechosos de COVID-19

- Identificación de casos sospechosos de COVID-19
- Evento de notificación obligatoria e inmediata al Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud, SNVS 2.0

DEFINICIÓN DE CASO SOSPECHOSO COVID-19 | 11 de septiembre 2020

Criterio 1

Toda persona que (de cualquier edad) que presente dos o más de los siguientes síntomas

- Fiebre (37.5°C o más)
- Tos
- Odinofagia
- Dificultad respiratoria
- Cefalea
- Mialgias
- Diarrea/vómitos*

Sin otra etiología que explique completamente la presentación clínica
Este criterio incluye toda infección respiratoria aguda grave

O

Pérdida repentina del gusto o del olfato, en ausencia de cualquier otra causa identificada

Criterio 2

Toda persona que:

- Sea trabajador de salud
- Resida o trabaje en instituciones cerradas o de internación prolongada*
- Sea Personal esencial**
- Resida en barrios populares o pueblos originarios***
- Sea contacto estrecho de caso confirmado de COVID-19, que dentro de los 14 días posteriores al contacto:

Presente **1 o más** de estos síntomas: fiebre (37.5°C o más), tos, odinofagia, dificultad respiratoria, pérdida repentina del gusto o del olfato.

Criterio 3

SÍNDROME INFLAMATORIO MULTISISTÉMICO* POST- COVID19 EN PEDIATRÍA:

*Definición adaptada de la OMS

Niños y adolescentes de 0 a 18 años con fiebre mayor a 3 días:

Y dos de los siguientes:

- a) Erupción cutánea o conjuntivitis bilateral no purulenta o signos de inflamación mucocutánea (oral, manos o pies).
- b) Hipotensión o shock.
- c) Características de disfunción miocárdica, pericarditis, valvulitis o anomalías coronarias (incluidos los hallazgos ecográficos o elevación de Troponina / NT-proBNP).
- d) Evidencia de coagulopatía (elevación de PT, PTT, Dímero-D).
- e) Síntomas gastrointestinales agudos (diarrea, vómitos o dolor abdominal).

Y

Marcadores elevados de inflamación, como eritrosedimentación, proteína C reactiva o procalcitonina.

Y

Ninguna otra causa evidente de inflamación (incluida la sepsis bacteriana, síndromes de shock estafilocócicos o estreptocócicos)

DEFINICIÓN DE CASO CONFIRMADO POR LABORATORIO COVID-19 | 29 de septiembre de 2020.

Todo caso sospechoso con resultado DETECTABLE para:

1. SARS-CoV-2 mediante pruebas de RT-PCR.
2. SARS-CoV-2 mediante pruebas de reacción amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP).
3. Antígenos de SARS-CoV-2 mediante pruebas no moleculares (en casos sospechosos con síntomas leves/moderados, sólo durante los primeros 7 días desde el inicio de síntomas*).

* El resultado no reactivo en las pruebas de detección de antígeno no permite descartar la enfermedad por SARS-CoV-2

Casos sospechosos de COVID-19

DEFINICIÓN DE CASO CONFIRMADO POR CRITERIOS CLINICO/EPIDEMIOLOGICOS COVID-19 | 11 de septiembre de 2020

Importante: Todos los casos confirmados por criterios clínico-epidemiológicos, deben ser evaluados clínicamente para identificar signos de alarma y/o diagnósticos diferenciales, durante toda su evolución

Criterio 1

Toda persona que:

En los últimos 14 días

•Haya sido contacto estrecho con un caso confirmado

Ó

Forme parte de un conglomerado de casos, con al menos un caso confirmado por laboratorio, sin otro diagnóstico definido,

Y

que presente **dos o más de los siguientes síntomas:** fiebre, tos, odinofagia, dificultad para respirar, vómitos/diarrea/cefalea/mialgias.

Criterio 2

Toda persona que en ausencia de cualquier otra causa identificada comience con:

•Pérdida repentina del gusto o del olfato

Criterio 3

Toda persona fallecida que:

•No tenga diagnóstico etiológico definido

•Haya tenido cuadro clínico compatible con COVID-19 (conocido por el médico certificante o referido por terceros)

•Independientemente del estado de salud previo

Y

•Que haya sido contacto estrecho de un caso confirmado o haya estado vinculada epidemiológicamente a un conglomerado de casos o a áreas de transmisión comunitaria sostenida.

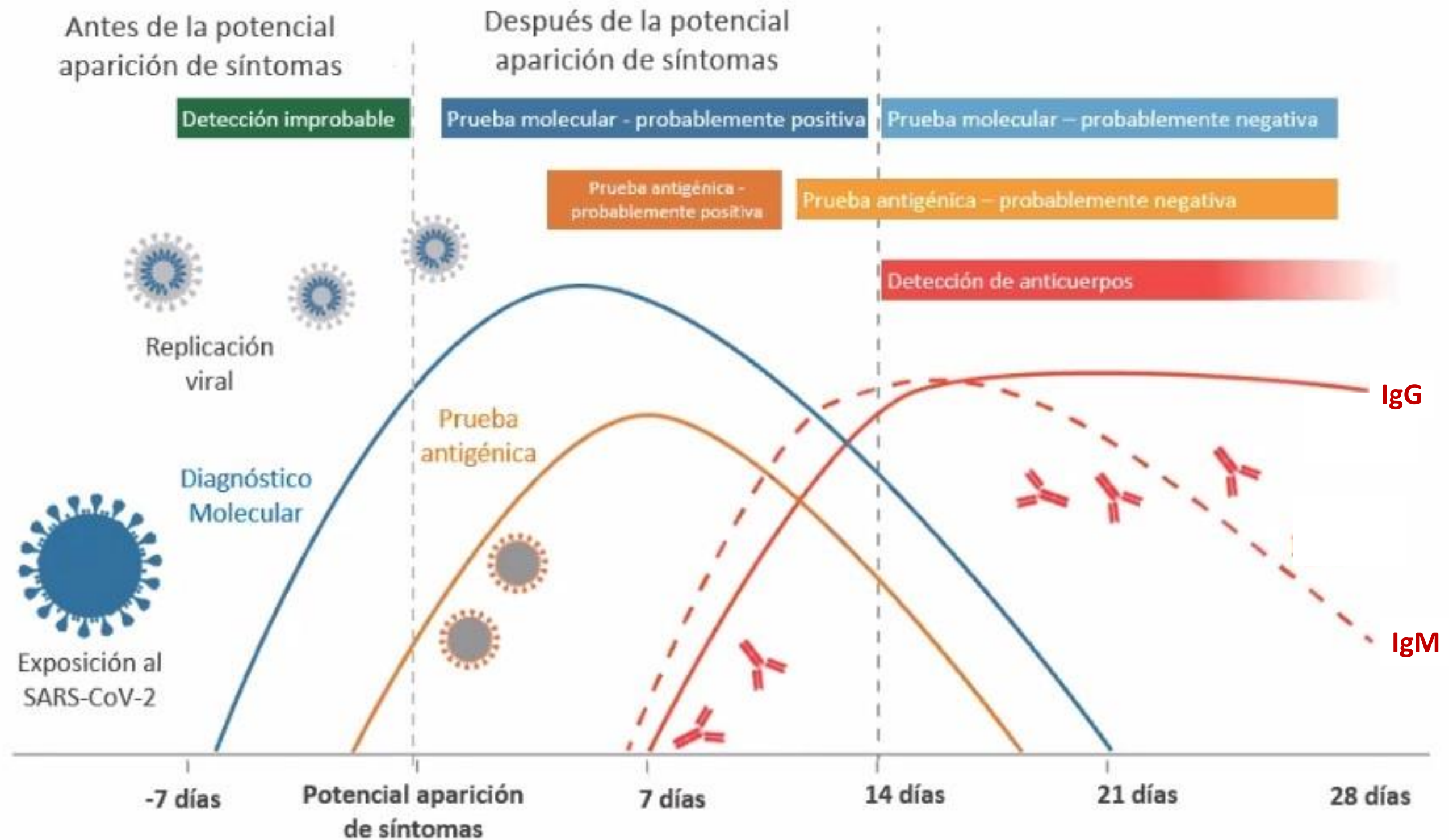
EN TODOS LOS CASOS COMPRENDIDOS EN ESTE PUNTO SE PROCURARÁ EL DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO POR LABORATORIO

Diagnóstico de COVID-19

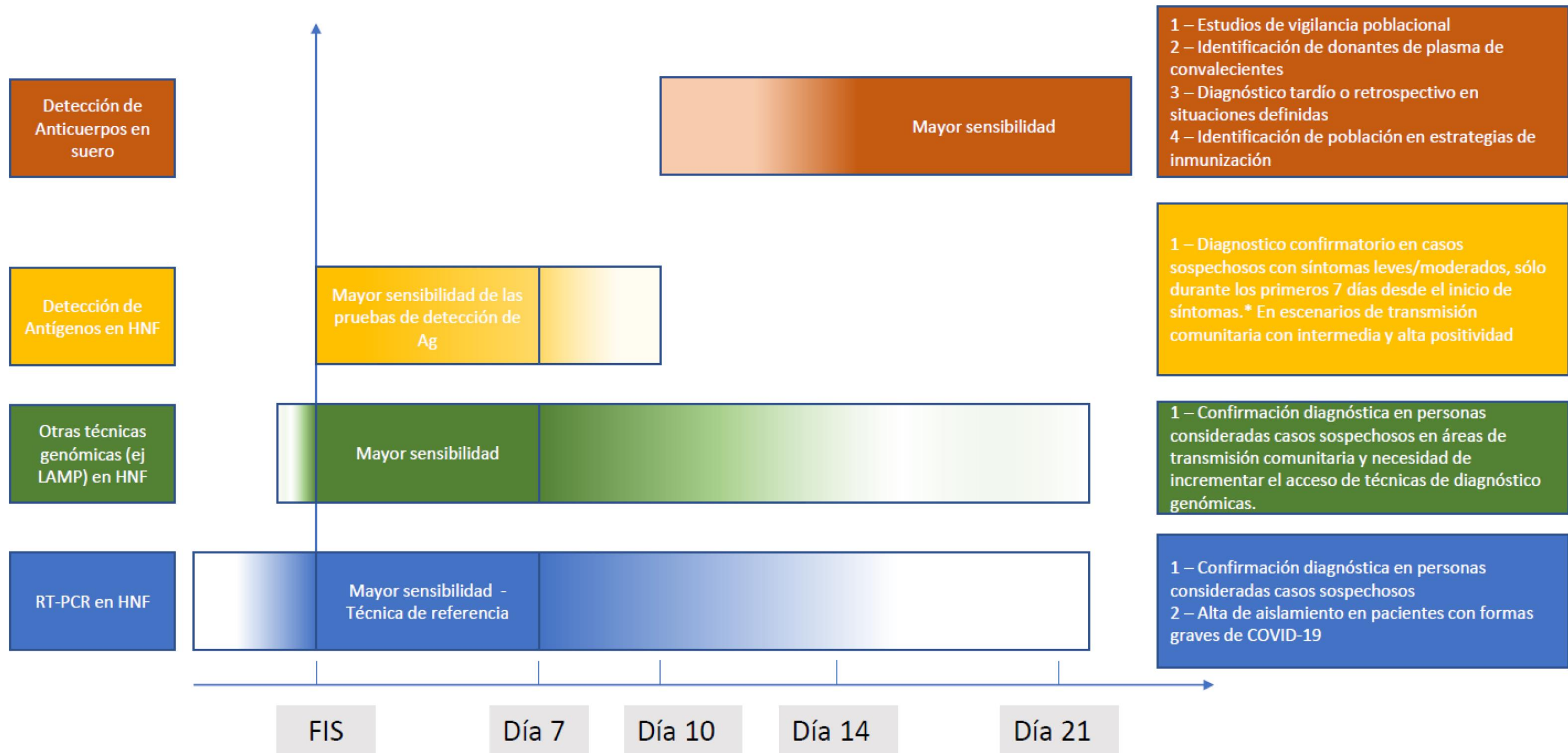
	RT-PCR	Prueba de Ag	Prueba de Ac
Detecta	ARN viral	Antígenos virales	Anticuerpos IgM, IgG a-SARS CoV2
Muestra	Muestras respiratorias (hisopado nasofaríngeo orofaríngeo, esputo, BAL)	Hisopado nasofaríngeo/orofaríngeo	Suero
Indica	Presencia de ARN en la muestra, no indica si es infeccioso.	Presencia de proteína de superficie en la muestra.	Anticuerpos contra el virus presentes en la sangre (infección pasada)
Usos	Diagnóstico de infección. Detección de personas que contagian.	Diagnóstico rápido de infección. Detección de personas que contagian.	Vigilancia Epidemiológica (respuesta inmunológica al virus-infección pasada)

Diagnóstico de COVID-19

La probabilidad de un resultado positivo varía con cada prueba dependiendo del tiempo de evolución de la infección.



Diagnóstico de COVID-19



Linea de tiempo de COVID-19

Infección



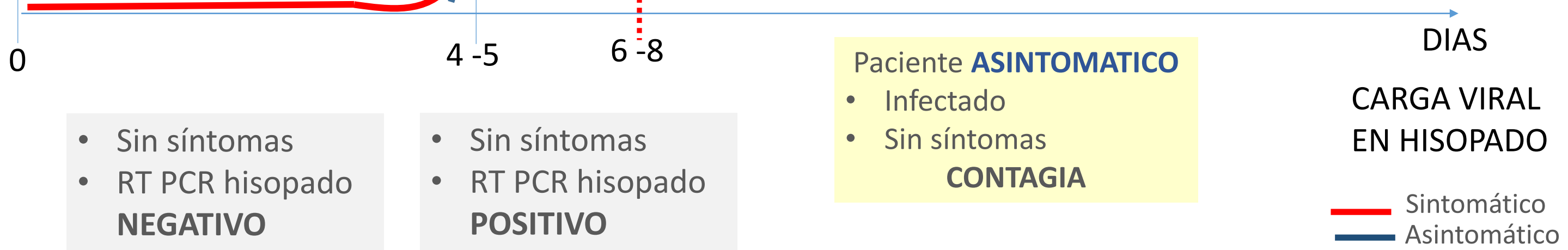
Período de incubación
No contagia

Período pre-sintomático
CONTAGIA

Paciente **SINTOMÁTICO**

- Infectado
- Con síntomas

CONTAGIA



• Sin síntomas
• RT PCR hisopado
NEGATIVO

• Sin síntomas
• RT PCR hisopado
POSITIVO

Paciente **ASINTOMÁTICO**

- Infectado
- Sin síntomas

CONTAGIA

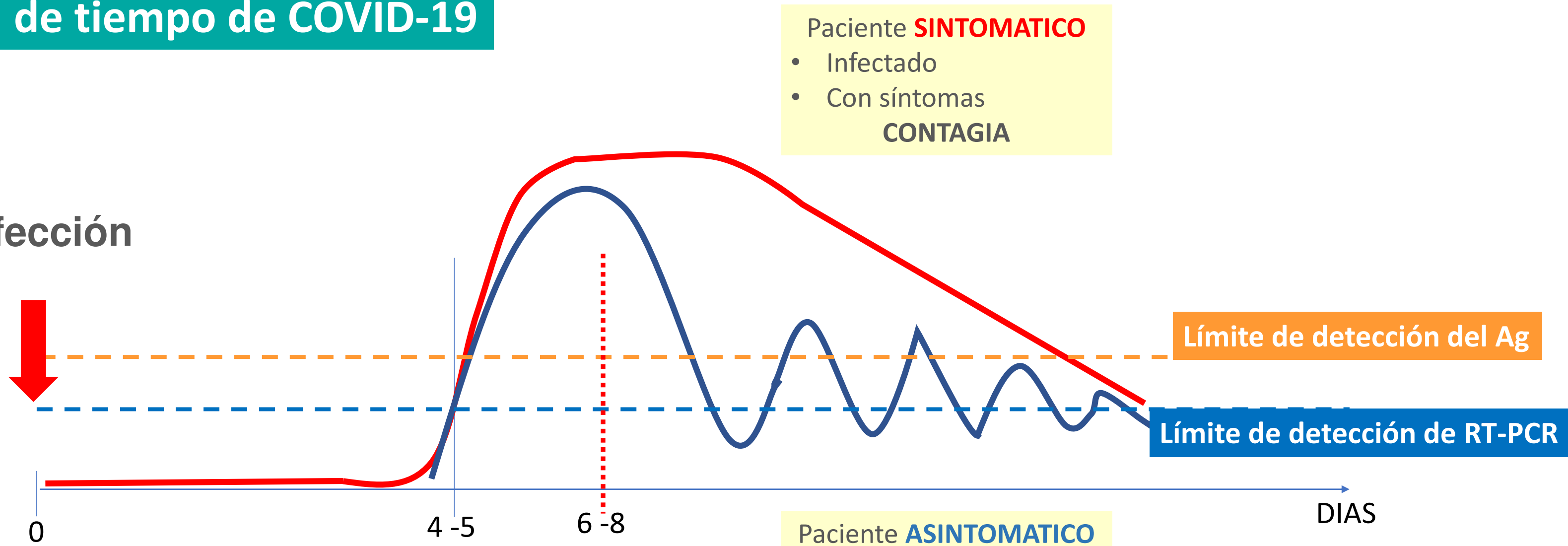
FALSO NEGATIVO POR
TESTEO TEMPRANO

RESULTADOS ALTERNANTES + / -
EN TESTEOS TARDIOS EN ASINTOMÁTICOS



Linea de tiempo de COVID-19

Infección



Paciente **SINTOMÁTICO**
• Infectado
• Con síntomas
CONTAGIA

• Sin síntomas
• RT PCR hisopado
NEGATIVO

• Sin síntomas
• RT PCR hisopado
POSITIVO

Paciente **ASINTOMÁTICO**
• Infectado
• Sin síntomas
CONTAGIA

FALSO NEGATIVO POR
TESTEO TEMPRANO

RESULTADOS ALTERNANTES + / -
EN TESTEOS TARDIOS EN ASINTOMÁTICOS

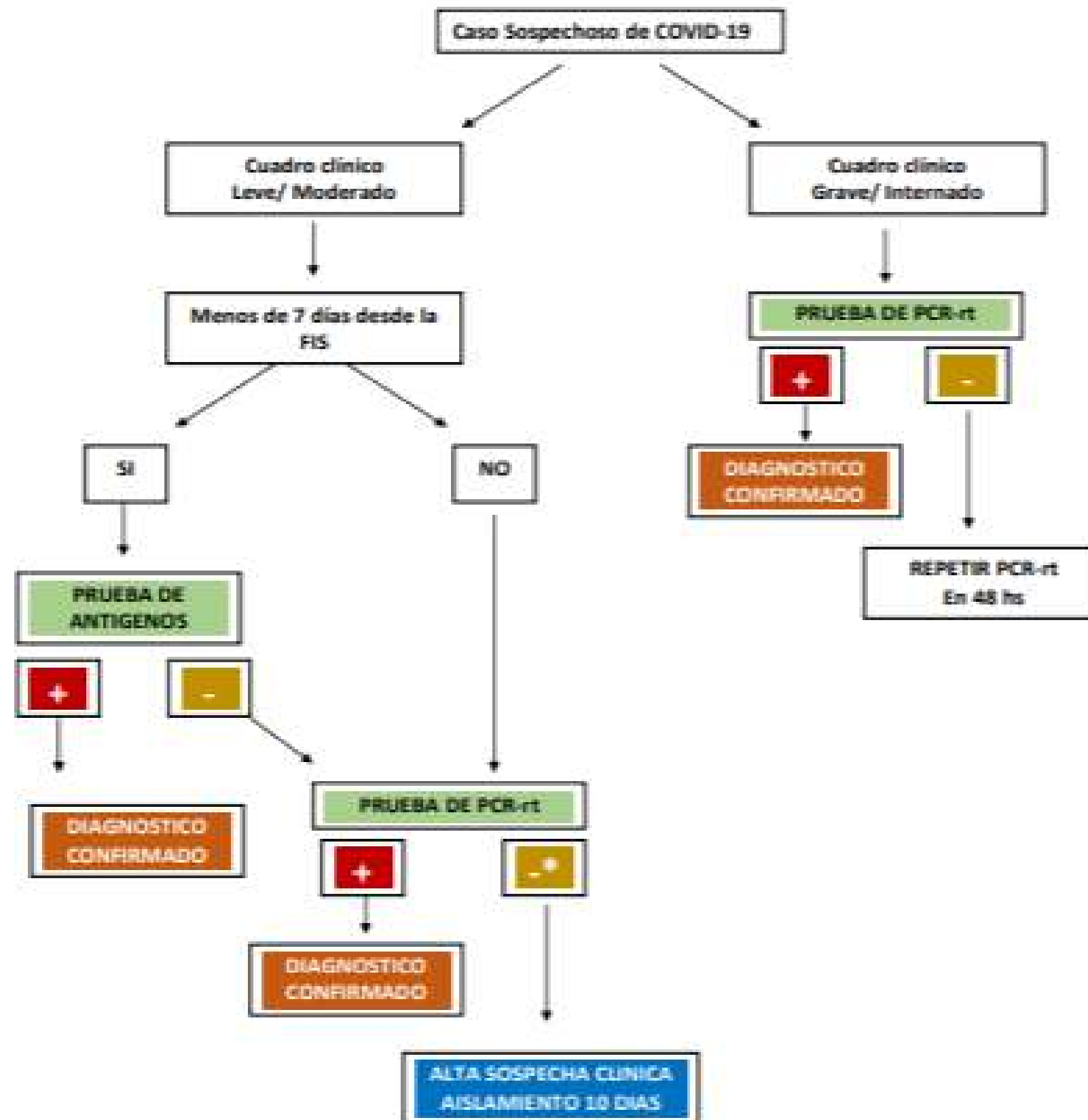
RT- PCR Negativa POSITIVA Negativa

Escenarios posibles

RT-PCR	Ag	IgM	IgG	Interpretación
+	+/-	-	-	Fase presintomática Infección temprana
+	+	+/-	-/+	Fase inicial (1 -7 días post-síntomas)
+	+/-	+	+/-	2° Fase (8-14 días post-síntomas)
+/-	-	+	++	3° Fase > 15 días post-síntomas
-	-	+/-	++	Infección pasada (inmunizado)

Algoritmo diagnóstico Minist. Salud de Santa Fe

ALGORITMO DIAGNOSTICO POR CRITERIO DE LABORATORIO.



Muchas gracias!