

**Curso**

# **Biología molecular aplicada al diagnóstico médico**

**2021**



# CURSO BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA AL DIAGNOSTICO MEDICO

## **Diagnóstico molecular de VIH, hepatitis virales**

9 de noviembre de 2021

Lic. Javier Sfalcin

Especialista Biología Molecular

Laboratorio CIBIC





VIH  
HEPATITIS C  
HEPATITIS B  
HEPATITIS E

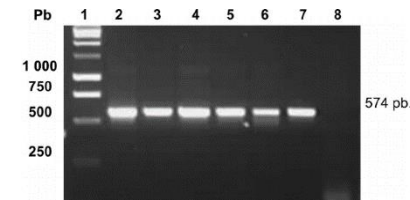
## DIAGNOSTICO MOLECULAR

MARCADORES MOLECULARES DE EVOLUCION

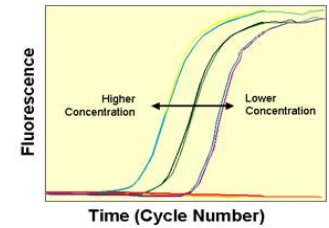
MONITOREO DE LA EVOLUCION DE LA INFECCION

FACTORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA A TRATAMIENTO

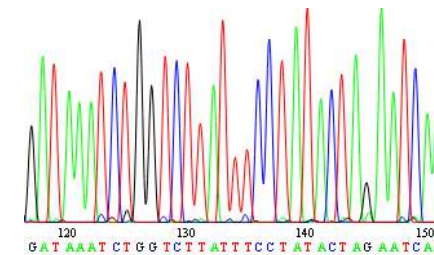
MONITOREO DEL TRATAMIENTO



PCR PUNTO FINAL



PCR EN TIEMPO REAL

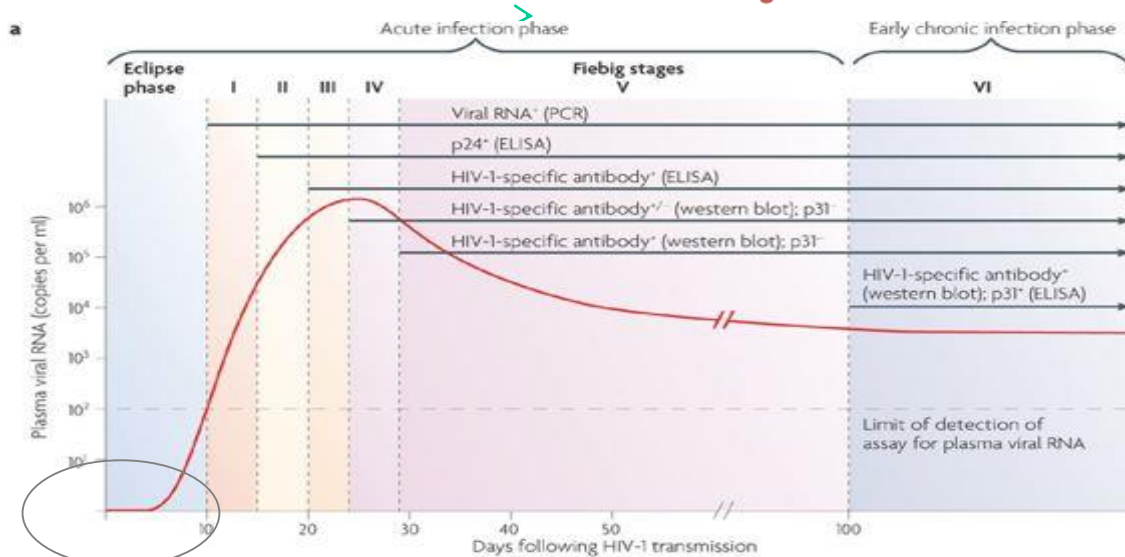
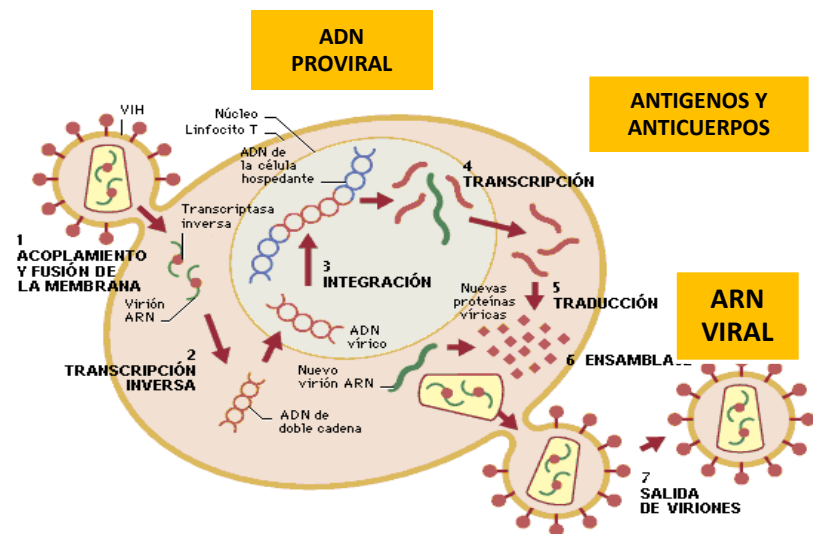


SECUENCIACION POBLACIONAL (SANGER)

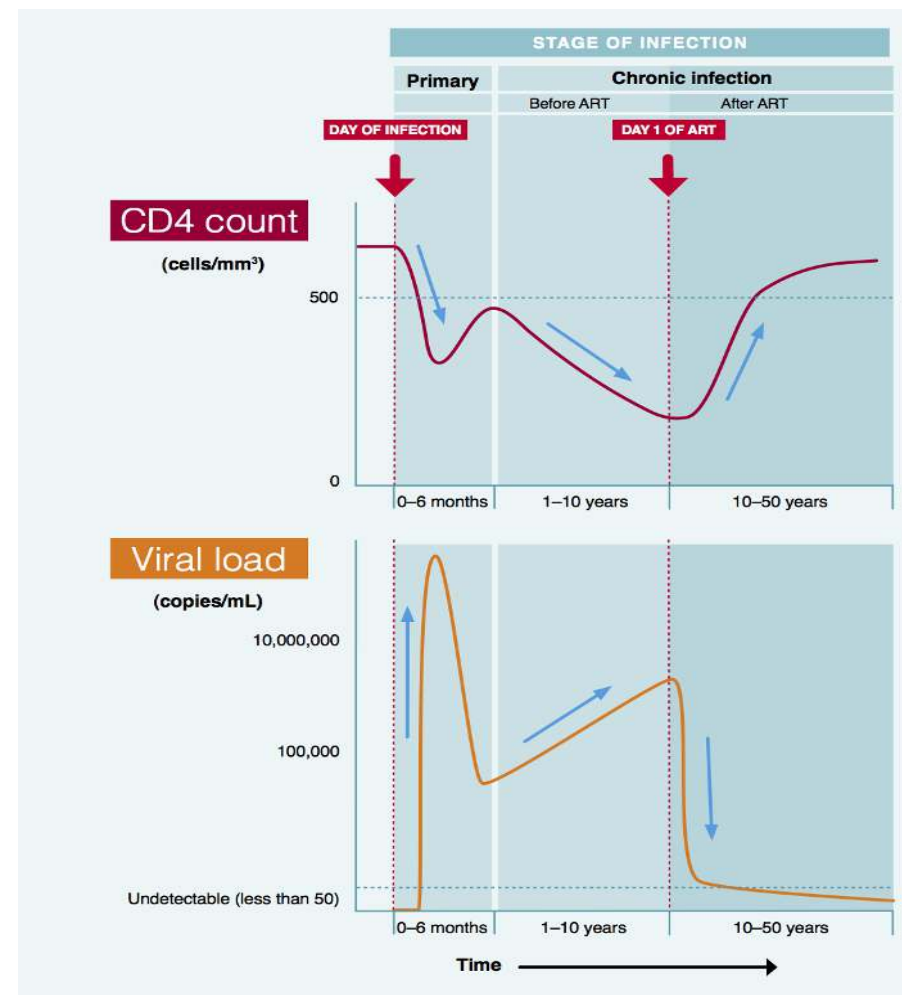


SECUENCIACION DE NUEVA GENERACION (NGS)

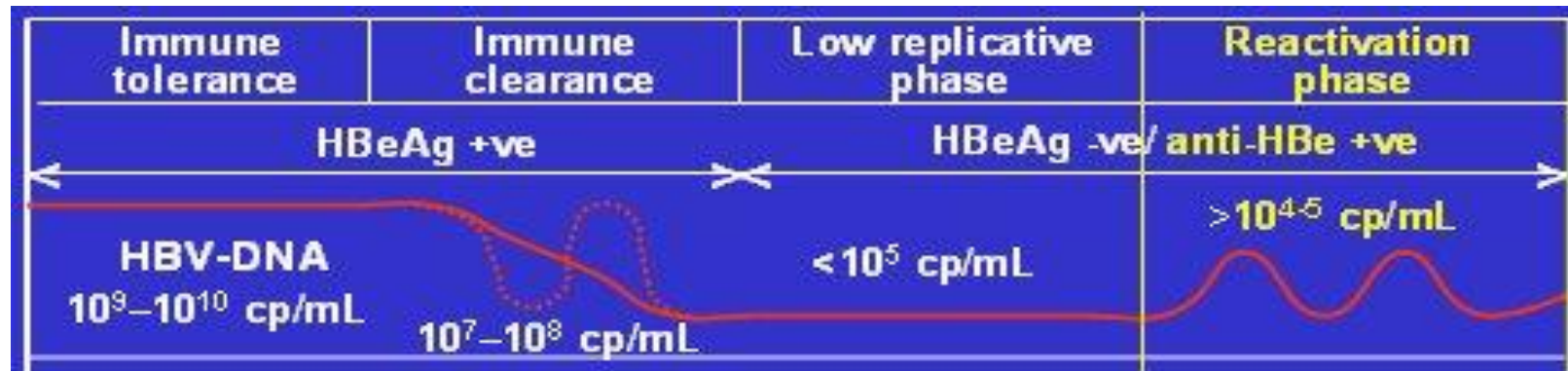
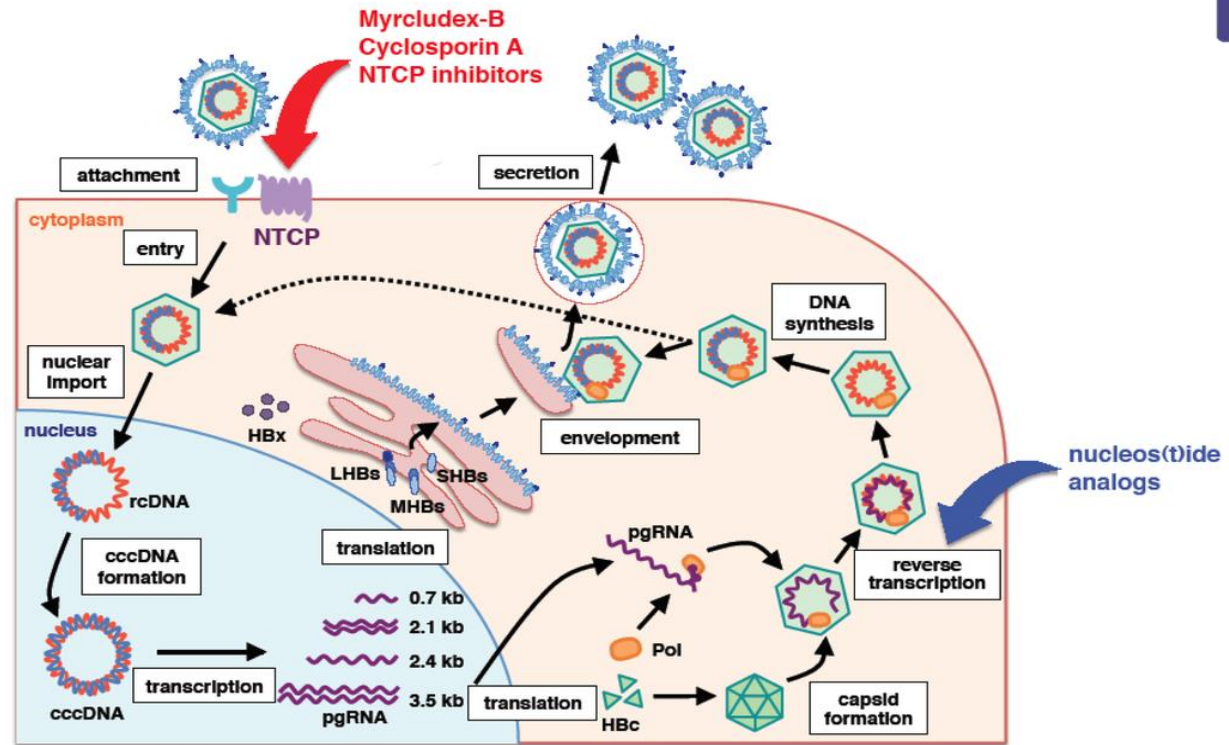
# VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA -VIH



TAN EN BANCO DE SANGRE

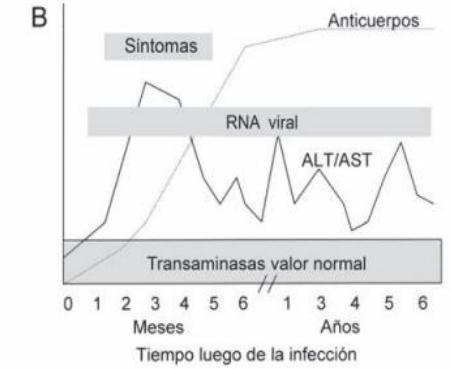
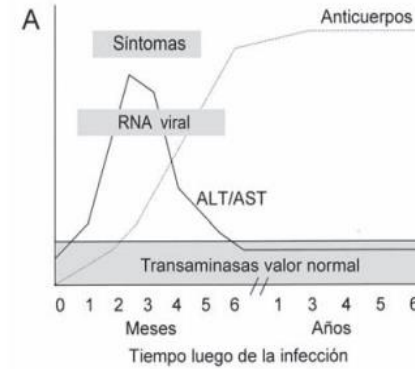
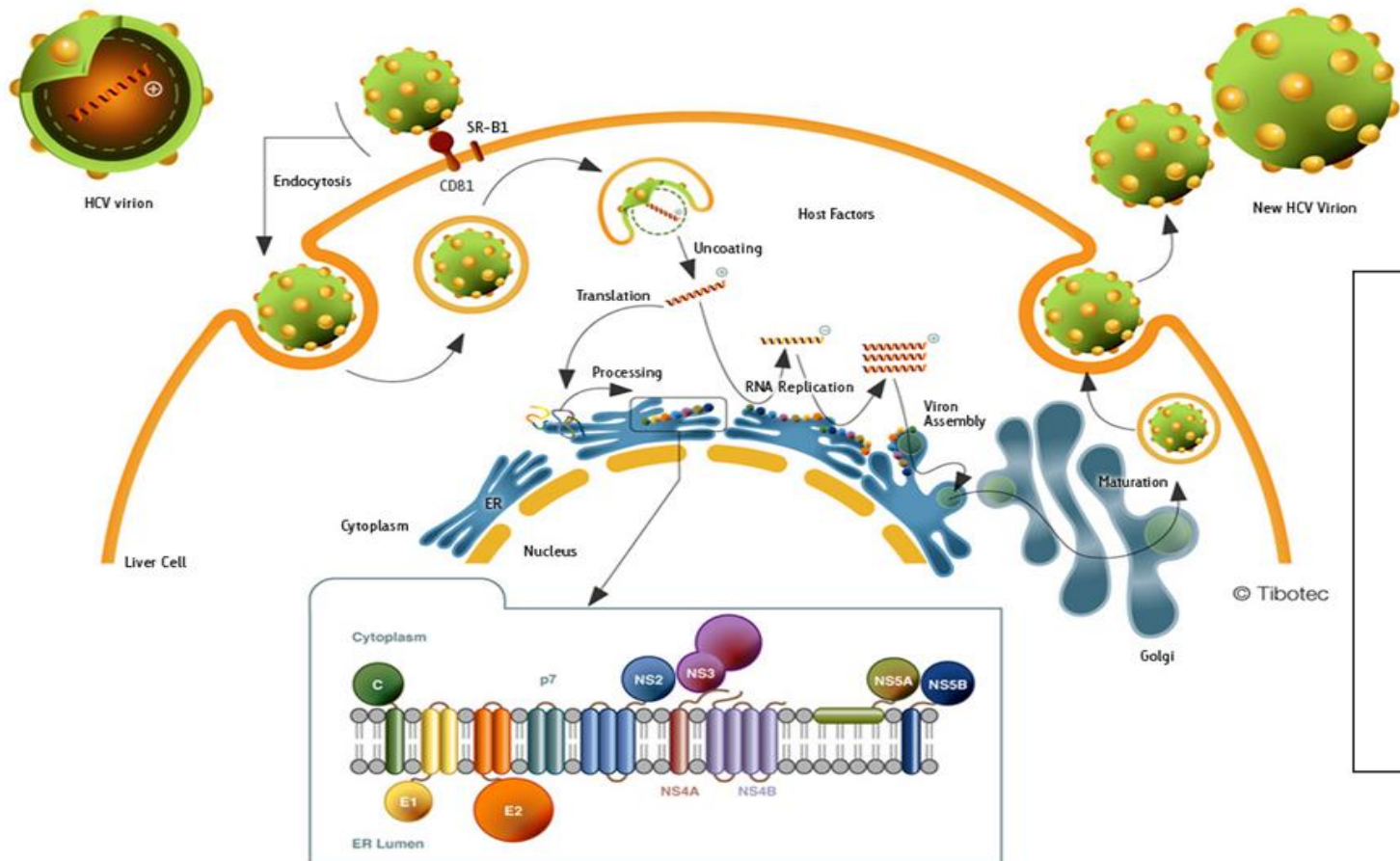


# VIRUS DE LA HEPATITIS B - HBV



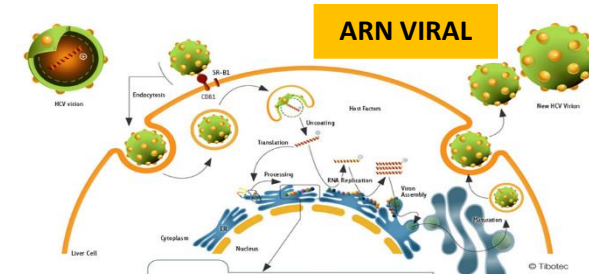
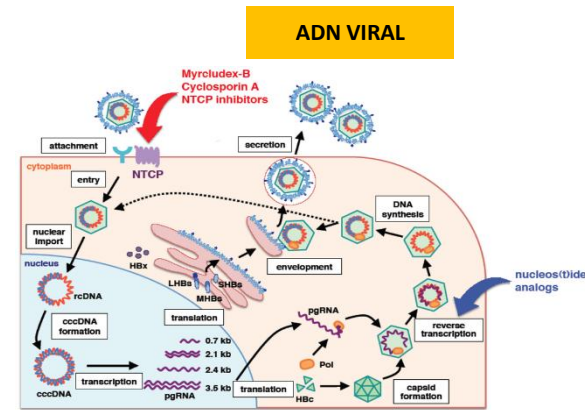
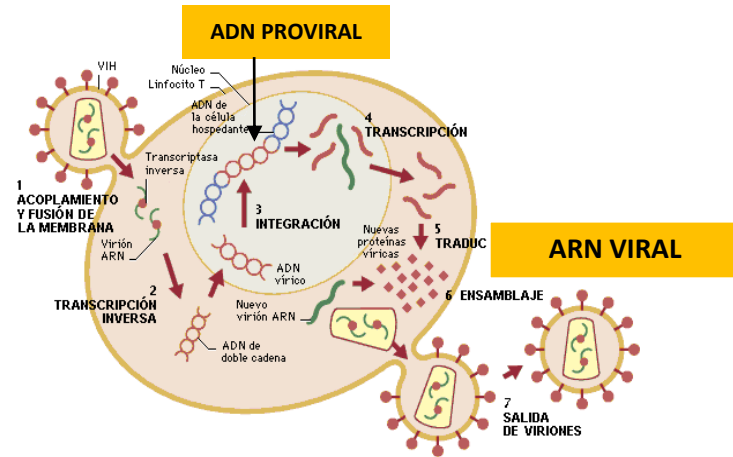


# VIRUS DE LA HEPATITIS C - HCV



A: comportamiento de los pacientes que presentan eliminación espontánea del virus de la hepatitis C.  
 B: comportamiento de los pacientes que desarrollan infección crónica

# DIAGNOSTICO Y MONITOREO DE LA INFECCION



	HIV		HBV	HCV
TARGET MOLECULAR	ADN PROVIRAL	ARN VIRAL	ADN VIRAL	ARN VIRAL
TIPO DE MUESTRA	SANGRE	PLASMA	PLASMA	PLASMA
TIPO DE TEST	PCR PUNTO FINAL O TIEMPO REAL	PCR EN TIEMPO REAL CUANTITATIVA	PCR EN TIEMPO REAL CUANTITATIVA	PCR EN TIEMPO REAL CUANTITATIVA
RESULTADOS POSIBLES	CUALITATIVO	CUANTITATIVO	CUANTITATIVO	CUANTITATIVO
APLICACION	DIAGNOSTICO	DIAGNOSTICO, MONITOREO DE TRATAMIENTO	DIAGNOSTICO, MONITOREO DE EVOLUCION DE INFECCION, MONITOREO DE TRATAMIENTO	DIAGNOSTICO, MONITOREO DE TRATAMIENTO

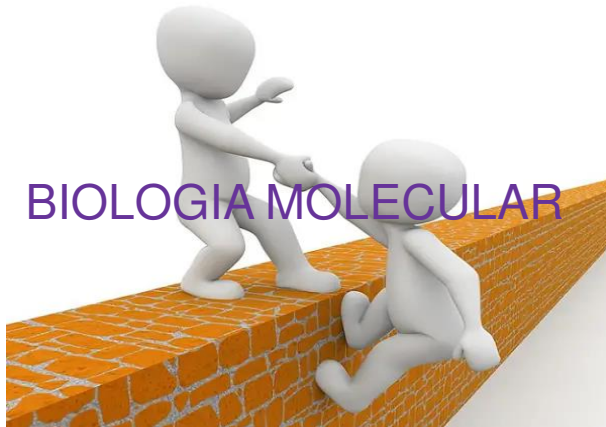
<https://www.argentina.gob.ar/salud/epidemiologia/algoritmos>

## TRATAMIENTO

- DROGAS CON ELEVADA EFICACIA Y POTENCIA
- ESCASOS EFECTOS ADVERSOS
- REQUIERE EXCELENTE ADHERENCIA
- USO DE DROGAS COSTO EFECTIVAS
- DISPONIBILIDAD



BIOLOGIA MOLECULAR



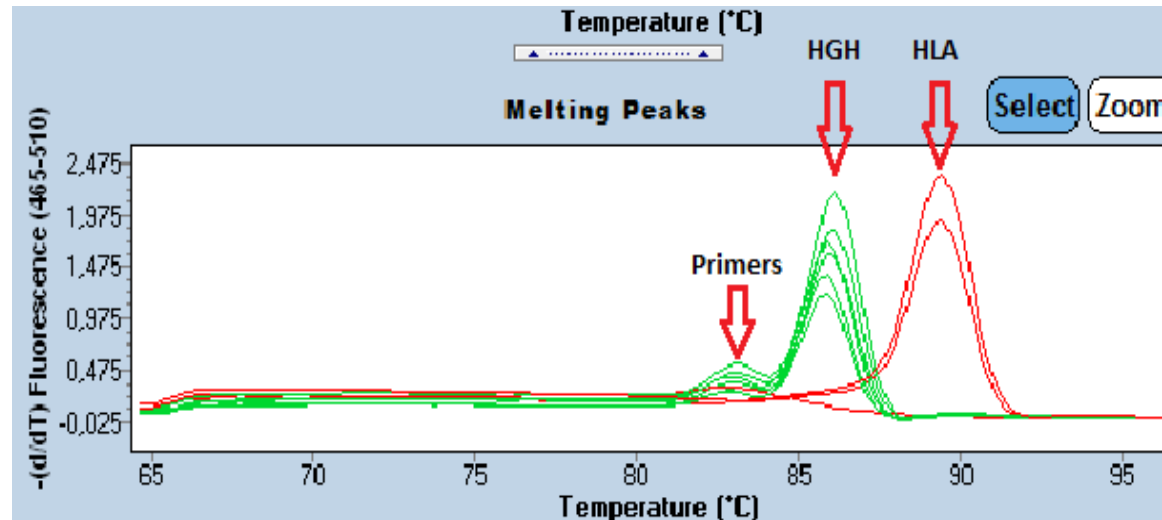
- **AUMENTAR LA EFICACIA:** test de resistencia viral basal, test de tropismo viral.
- **DISMINUCION DE EFECTOS ADVEROS:** Evaluación de factores pronóstico tanto del huésped, como del hospedador.
- **MEJORA DE LA ADHERENCIA:** Controles periódicos de carga viral.



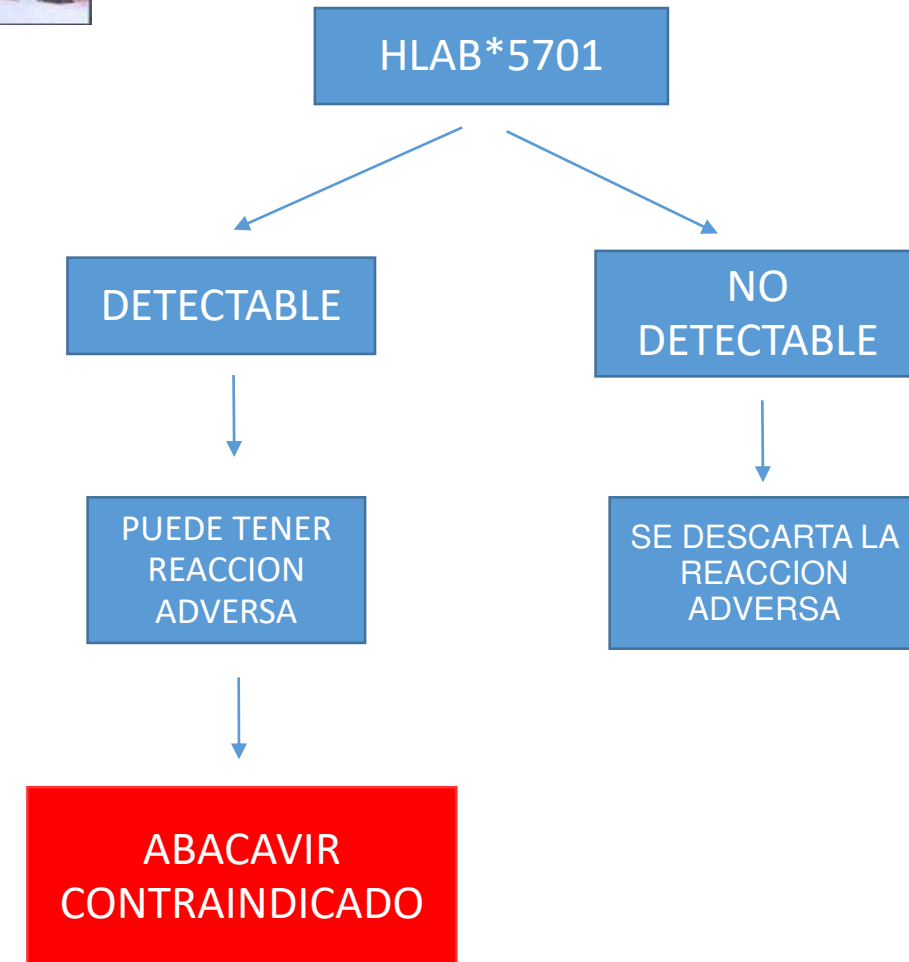
## HIPERSENSIBILIDAD AL ABACAVIR



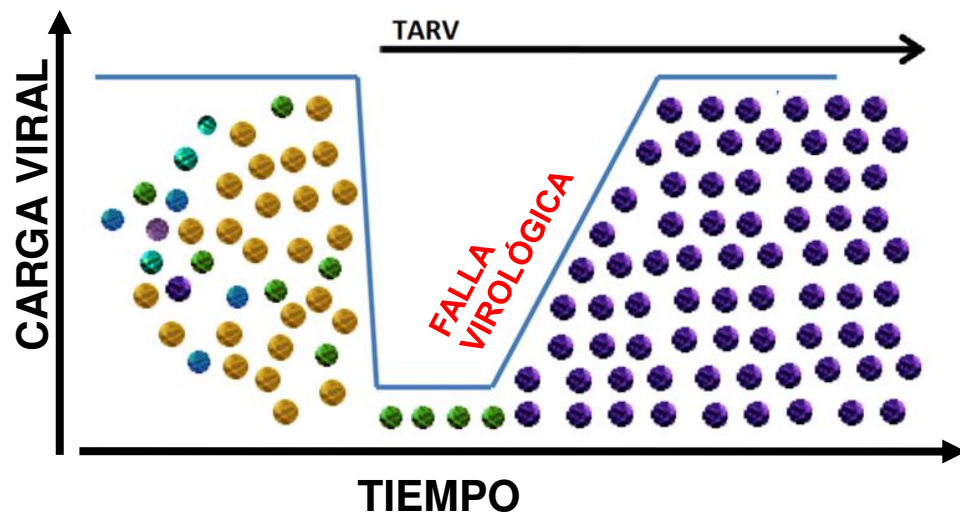
- ABACAVIR: Análogo nucleósido usado en TARV (HIV)
- HIPERSENSIBILIDAD: rush, fiebre, plurito, que pone en riesgo la viral del paciente
- INCIDENCIA: 9% de los pacientes que inician TARV con Abacavir



doi: 10.1371/currents.RRN1203



# RESISTENCIA VIRAL



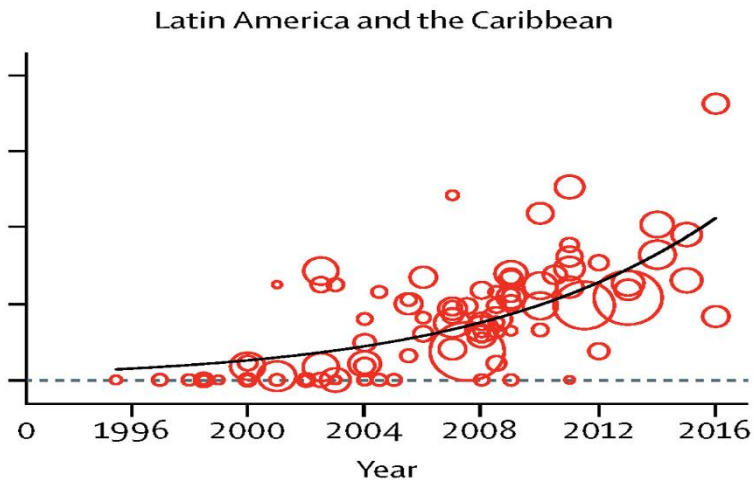
Nonnucleoside Analogue Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs)<sup>1,11</sup>

Drug	106	188	190	225	227	230	234
Doravirine <sup>12</sup>	A I M T	C L H	E	H C L R			I
Efavirenz	I P S	L K K V V	100 101 103 106 108	C I	Y G	188 190	P M 225 230 H L
Etravirine <sup>13</sup>	I G H P	V A L K V	90 98 100 101 106	A G K Q	E V Y	138 179 181	M L 230
Nevirapine	I P S	L K K V V	100 101 103 106 108	C I	Y G	181 188 190	M L 230
Rilpivirine <sup>14</sup>	I E P	L K	100 101	A G K	E V Y	138 179 181	M L 227 230 H C I L

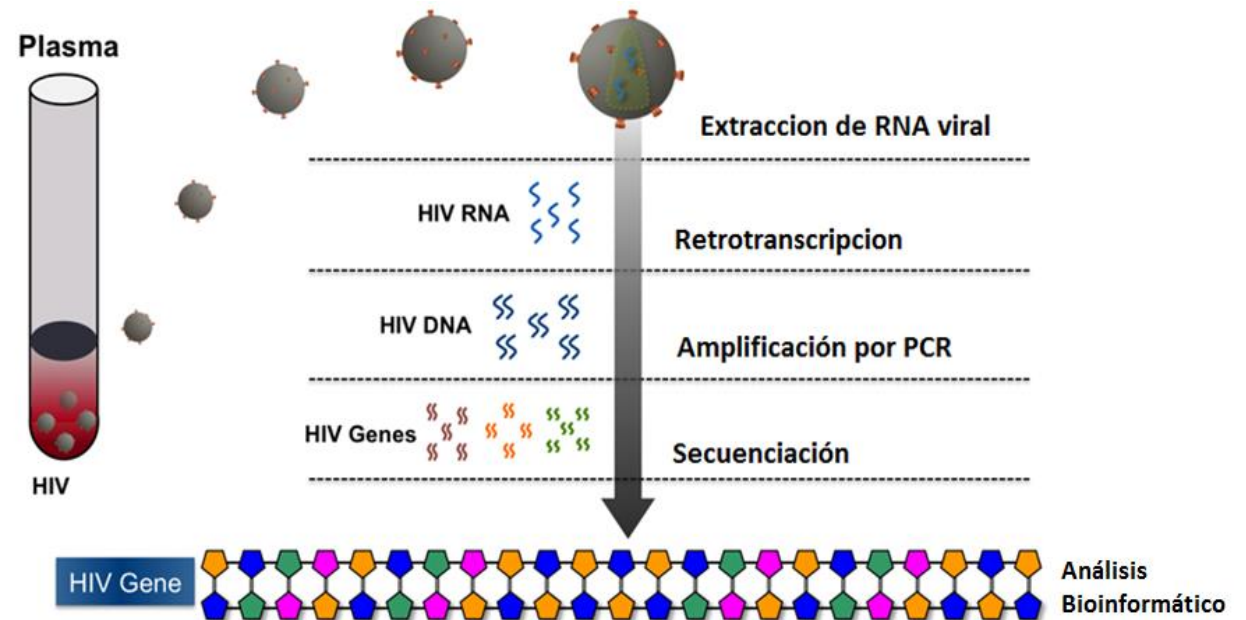
## CAUSAS:

- Mutaciones previas
- Acumulación mutaciones adquiridas por falta de adherencia

# TEST DE RESISTENCIA BASAL



Studies: 83  
 Patients: 16 008  
 p value for association: <0.0001



Nonnucleoside Analogue Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs)<sup>1,11</sup>

Drug	Position	Amino Acid	Position	Amino Acid	Position	Amino Acid	Position	Amino Acid
Doravirine <sup>12</sup>	106	V	188	Y	190	G	225	P
		A		C		E	227	F
		I		L		H	230	M
		M		H		L	234	L
Efavirenz	100	L	181	Y	188	Y	190	P
	101	K		C		G		M
	103	K		L		S		H
	106	V		I		A		L

# TEST DE 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

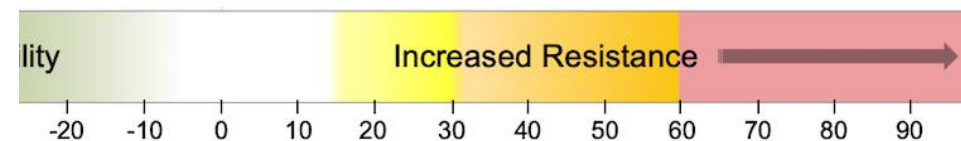
**abacavir (ABC)** Intermediate Resistance  
**zidovudine (AZT)** Susceptible  
**emtricitabine (FTC)** High-Level Resistance  
**lamivudine (3TC)** High-Level Resistance  
**tenofovir (TDF)** Low-Level Resistance

### 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



**Mutation Scoring: Level of Drug Resistance**

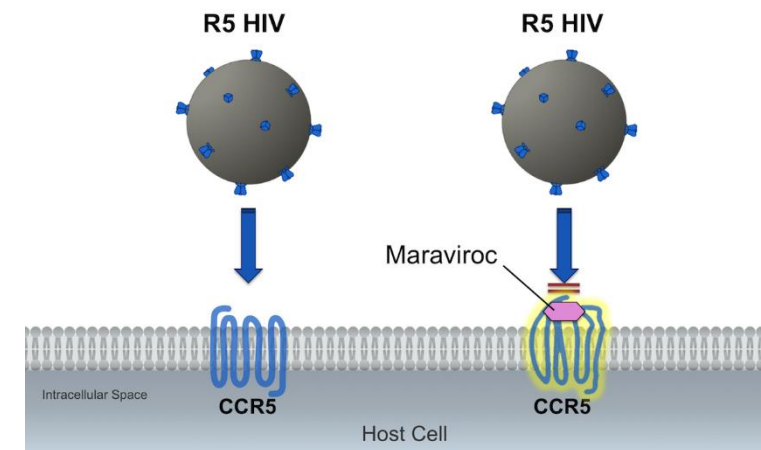
## TROPISMO / GENOTROPISMO

**R5:** UTILIZA EL RECEPTOR CCR5

**Inhibidores de entrada actúan sólo sobre virus R5 trópicos**

**X4:** UTILIZA EL RECEPTOR CXCR4

**MIXTOS/DUAL:** UTILIZA AMBOS RECEPTORES



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

Tipo de muestra:

GENOTROPISMO: plasma (carga viral >1000cop/ml)

TROPISMO EN ADN PROVIRAL: sangre entera (CD4+>200)





## MARCADORES MOLECULARES

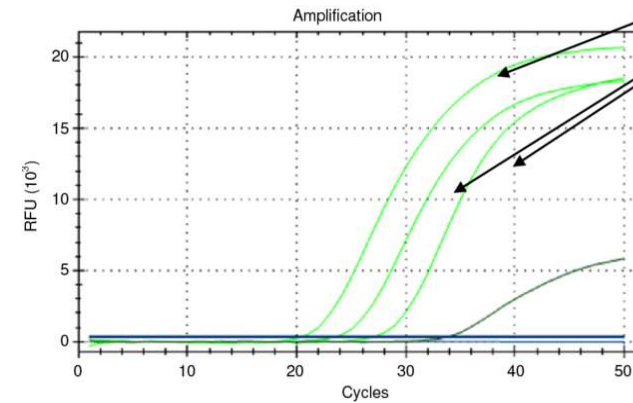
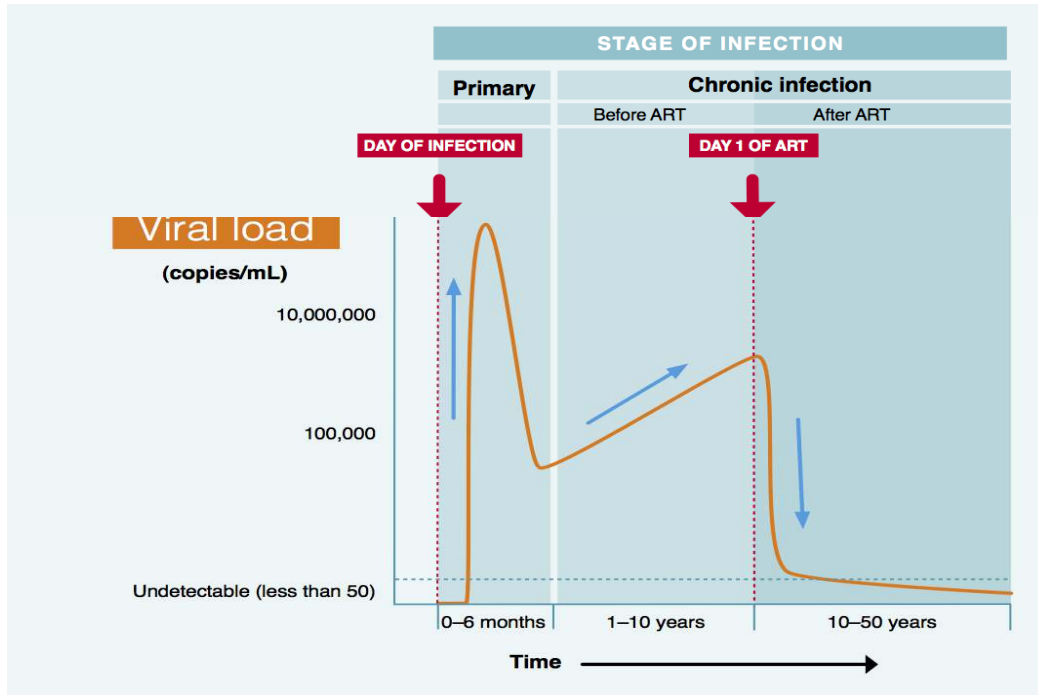
PRE TRATAMIENTO

HIPERSENSIBILIDAD AL  
ABACAVIR

TEST DE RESISTENCIA BASAL

TROPISMO / GENOTROPISMO

# MONITOREO DEL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL EN VIH



## MONITOREO CON CARGA VIRAL CADA 6 MESES\*

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

**1- RESPUESTA AL TRATAMIENTO**

**2- CONTROL DE ADHERENCIA Y SUPRESION VIRAL**

**3- DETECCION DE FALLA VIROLÓGICA**

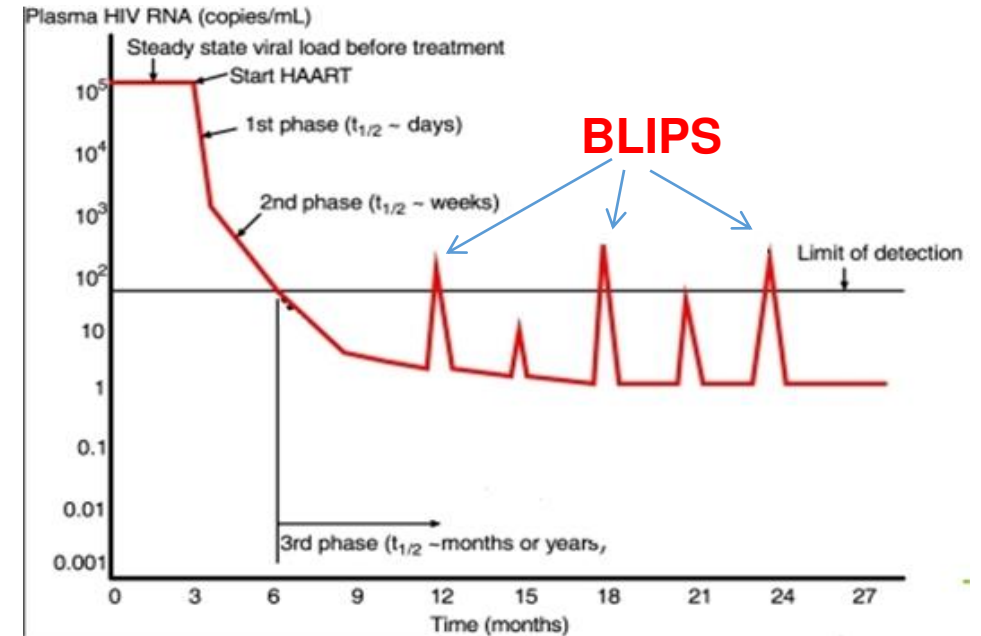
## BLIP EN HIV



DEFINICIÓN: Aumento de CV transitoria apenas por encima del límite de detección /cuantificación, que vuelve a |no detectable en un 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**



## MARCADORES MOLECULARES

PRE TRATAMIENTO

HIPERSENSIBILIDAD AL  
ABACAVIR

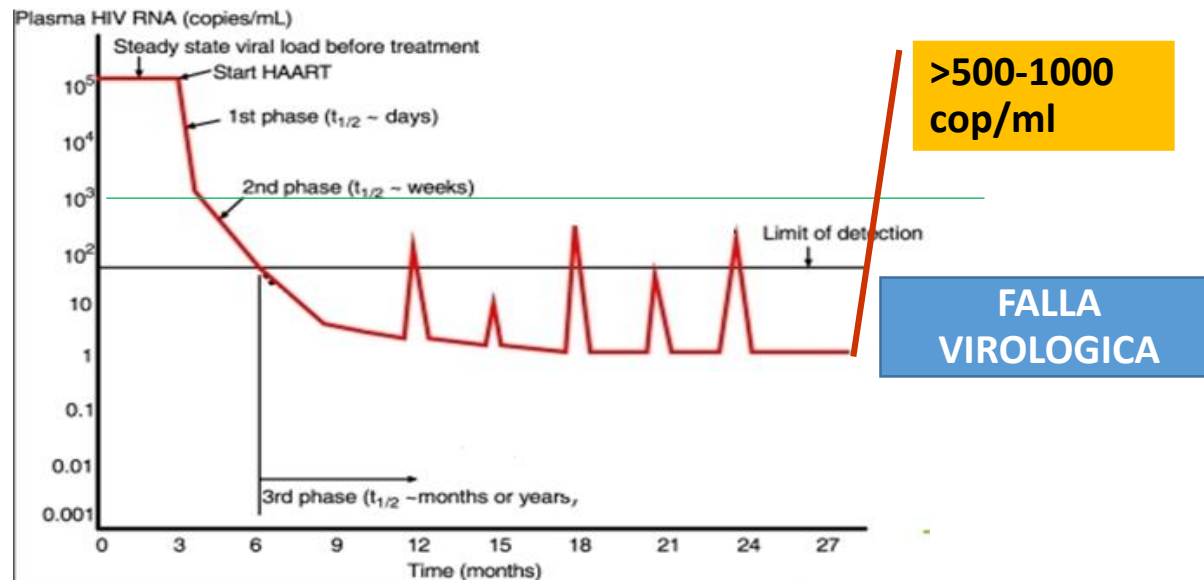
TEST DE RESISTENCIA BASAL

TROPISMO / GENOTROPISMO

MONITOREO DEL TRATAMIENTO  
ANTIRRETROVIRAL EN VIH

CARGA VIRAL

# FALLA VIROLOGICA



➤ Carga viral detectable >1000 cop/ml

➤ Dos CV consecutivas mayores a 500 cop/ml

➤ No se logra supresión virológica (CV=ND)

MODIFICAR TARV

EMPIRICA/GUIDELINES

TEST DE RESISTENCIA



# TEST DE RESISTENCIA

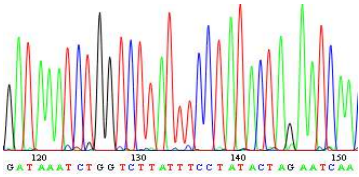


<b>Estatus del paciente</b>	<b>IAS-USA</b>	<b>DHHS</b>	<b>EUROPA</b>
PRIMARIA/AGUDA	RECOMENDADO	RECOMENDADO	RECOMENDADO
PROFILAXIS POS EXPOSICION	-	-	RECOMENDADO
CRONICO, TRATAMIENTO NAIVE	CONSIDERAR	RECOMENDADO	FUERTEMENTE RECOMENDADO
FALLA	RECOMENDADO	RECOMENDADO	RECOMENDADO
EMBARAZADAS	RECOMENDADO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

# TEST DE RESISTENCIA - NGS



>20%



**SECUENCIACION POBLACIONAL:  
SOLO DETECTA VARIANTES  
MAYORITARIAS**

<20%



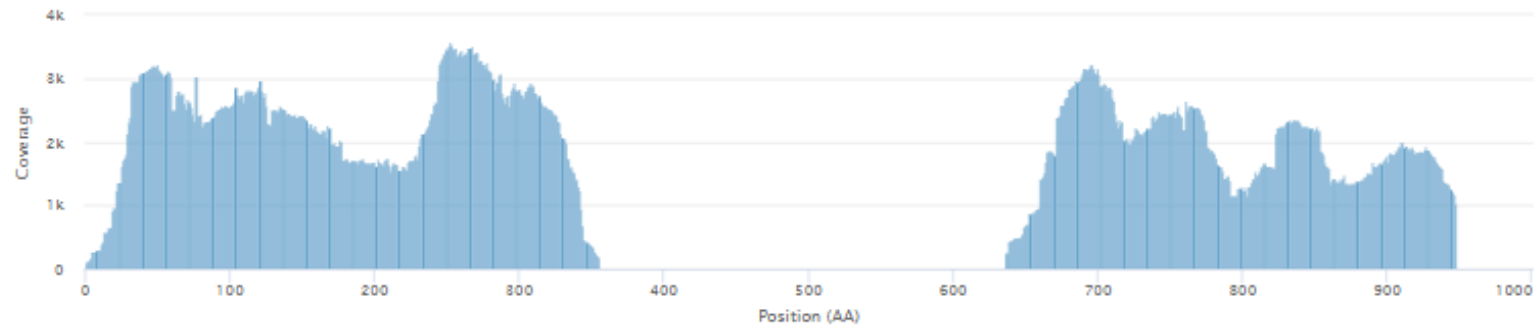
**NGS: DETECTA  
VARIANTES  
MINORITARIAS**

## Mutations

Search:  Showing 1 to 6 of 6 entries | Show  entries

Gene	Classification	Surveillance	Wildtype	Position	Mutation	Frequency	Coverage
IN	Major	Yes	N	155	H	99.18%	1585
IN	Other	No	V	151	I	99.59%	1479
IN	Accessory	No	G	163	K	14.27%	1591
RT	NRTI	Yes	K	70	E	1.17%	2219
RT	NRTI	Yes	M	184	V	99.58%	2826
RT	NRTI	No	K	70	N	1.49%	2219

## Coverage



Published in final edited form as:  
*JAMA*. 2011 April 6; 305(13): 1327–1335. doi:10.1001/jama.2011.375.

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



## MARCADORES MOLECULARES

PRE TRATAMIENTO

HIPERSENSIBILIDAD AL  
ABACAVIR

TEST DE RESISTENCIA BASAL

TROPISMO / GENOTROPISMO

MONITOREO DEL TRATAMIENTO  
ANTIRRETROVIRAL EN VIH

CARGA VIRAL

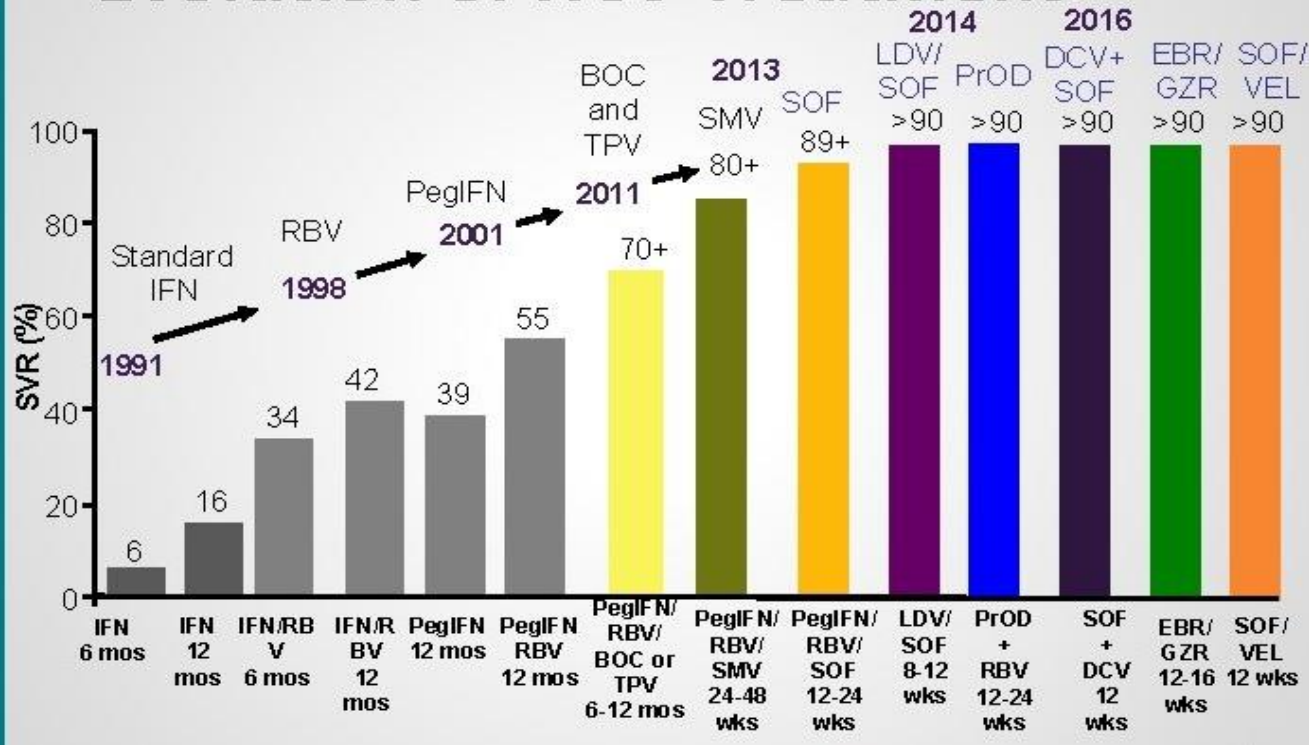
FALLA DEL TRATAMIENTO

TEST DE RESISTENCIA

# ANTIVIRALES DE ACCION DIRECTA (AAD) - HCV



## Evolution of HCV Treatment



## SIN EMBARGO...

SOLO 20% DE LOS PACIENTES INFECTADOS CON HCV SE ENCUENTRA DIAGNOSTICADO

TODOS LOS INDIVIDUOS DEBERIAN TESTEARSE POR LO MENOS UNA VEZ EN LA VIDA

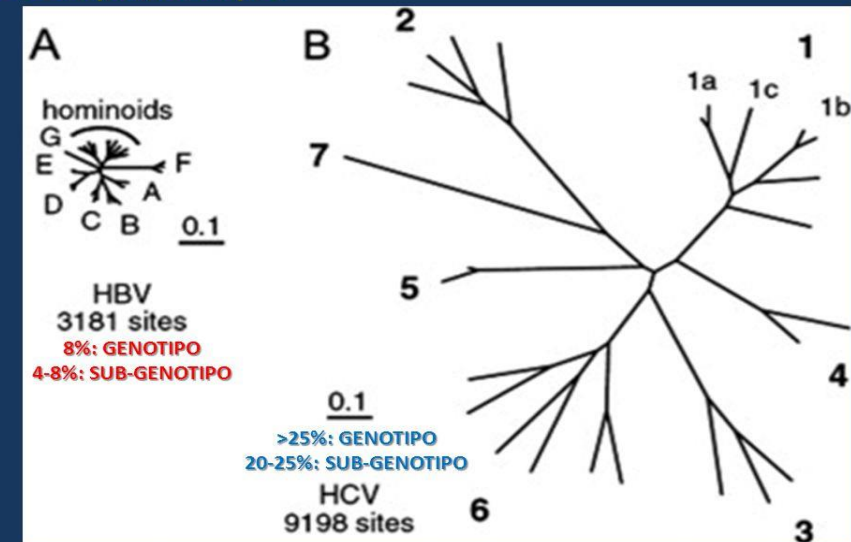
PARA ERRADICAR EL VIRUS CON TTO, NECESITAMOS IDENTIFICAR A LOS PACIENTES CON HCV

# GENOTIPO - HCV



- Existen 7 genotipos y múltiples subtipos de HCV
- Están relacionados con la evolución de la enfermedad y la respuesta al tratamiento
- Algunos tratamientos dependen del genotipo (duración, dosis, %eficacia)

## 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

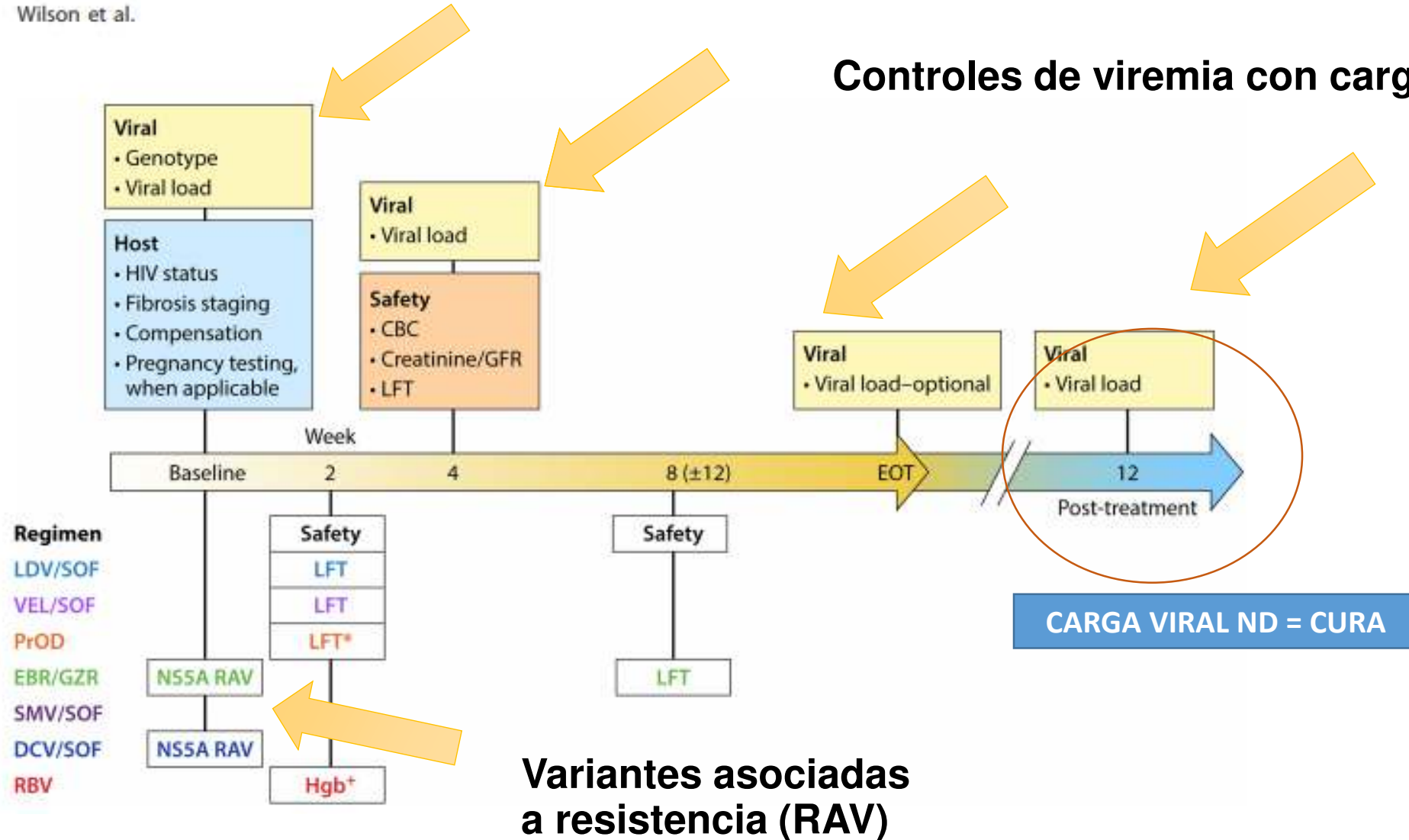
**GOLD ESTÁNDAR:** Secuenciación de regiones altamente conservadas aunque diferentes entre genotipos y subtipos (5'UTR-NS5B-CORE)



# MONITOREO DEL TRATAMIENTO - HCV



Wilson et al.



## TRATAMIENTO - HBV



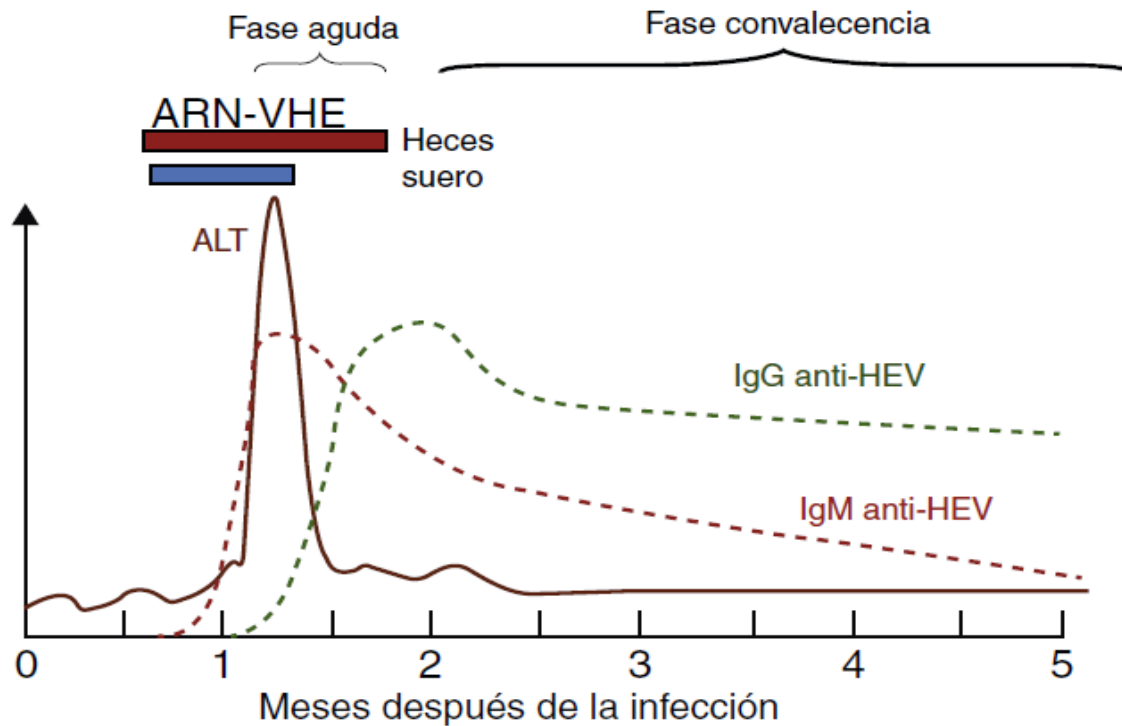
### - INTERFERON: TRATAMIENTO FINITO

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  
POR **RESISTENCIA**

# VIRUS HEPATITIS E



➤ 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

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

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



**¡Muchas gracias!**

[jsfalcin@cibic.com.ar](mailto:jsfalcin@cibic.com.ar)



[www.heritas.com.ar](http://www.heritas.com.ar)



[info@heritas.com.ar](mailto:info@heritas.com.ar)



[Héritas](#)



[HeritasArg](#)