

APLICACIONES DEL LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR

Javier Sfalcin

Líder de Biología Molecular

CIBIC - Rosario - Argentina



Biología Molecular: es una disciplina que se enfoca principalmente en el estudio de las macromoléculas (ADN, ARN, enzimas, etc) y las funciones de éstas dentro del ser vivo a nivel molecular.

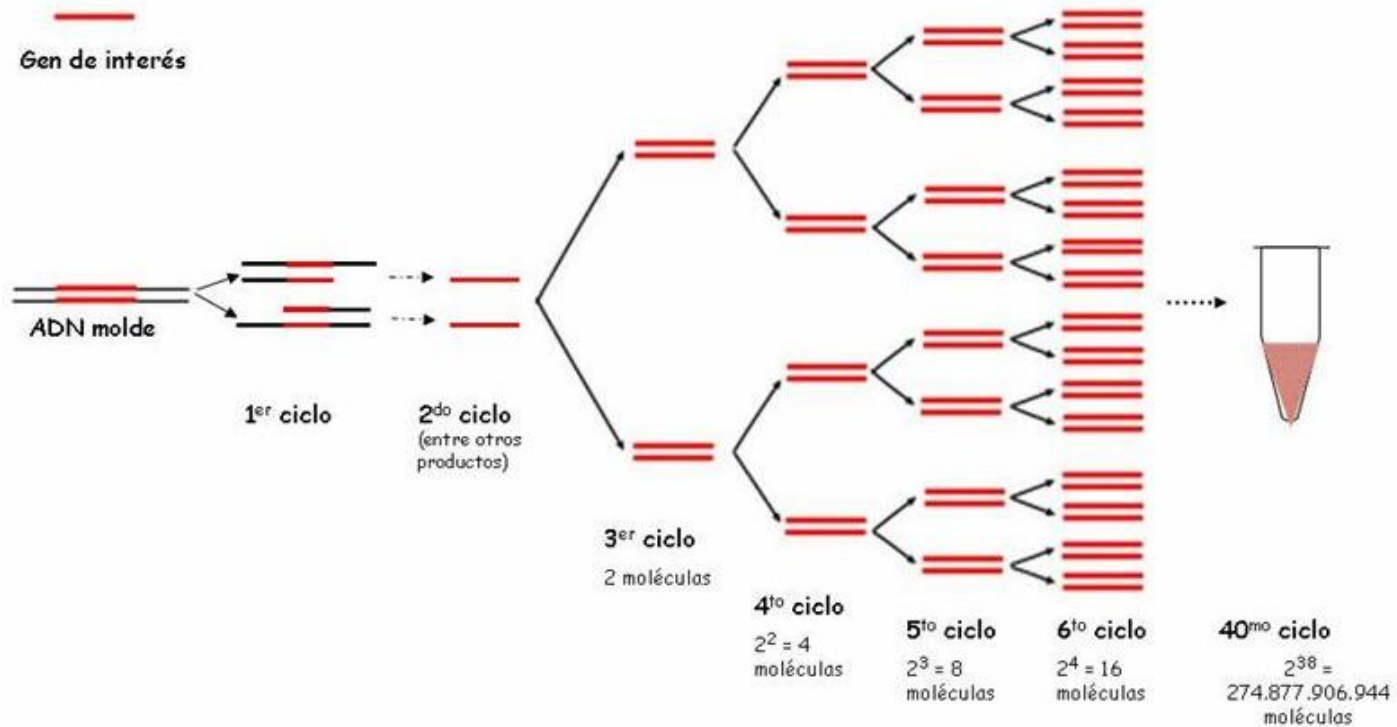
Una de las aplicaciones más importante de la Biología Molecular es el diagnóstico clínico de enfermedades en el hombre a partir de muestras biológicas.





LA VEDETTE DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR ES LA PCR: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Amplificación exponencial de la PCR





EL PRODUCTO DE PCR SE DETECTA DE DIFERENTES MANERAS SEGÚN LA UTILIDAD QUE SE LE QUIERE DAR

- PCRs CUALITATIVAS (ESTÁ O NO ESTÁ)
- PCRS CUANTITATIVAS (VALOR DENTRO DE UN RANGO)
- TECNICAS DE SECUENCIACION (DONDE SE LEE BASE POR BASE LA SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS)

Como ayuda el Laboratorio de Biología Molecular?



Diagnóstico de enfermedades infecciosas

Monitoreo de la evolución de una infección viral

Seguimiento del tratamiento

Factores predictivos de respuesta a tratamiento

HIV

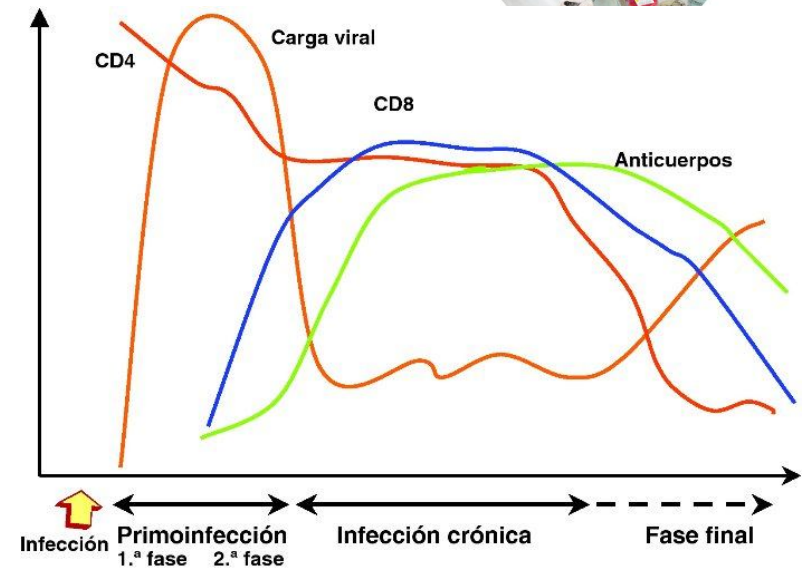
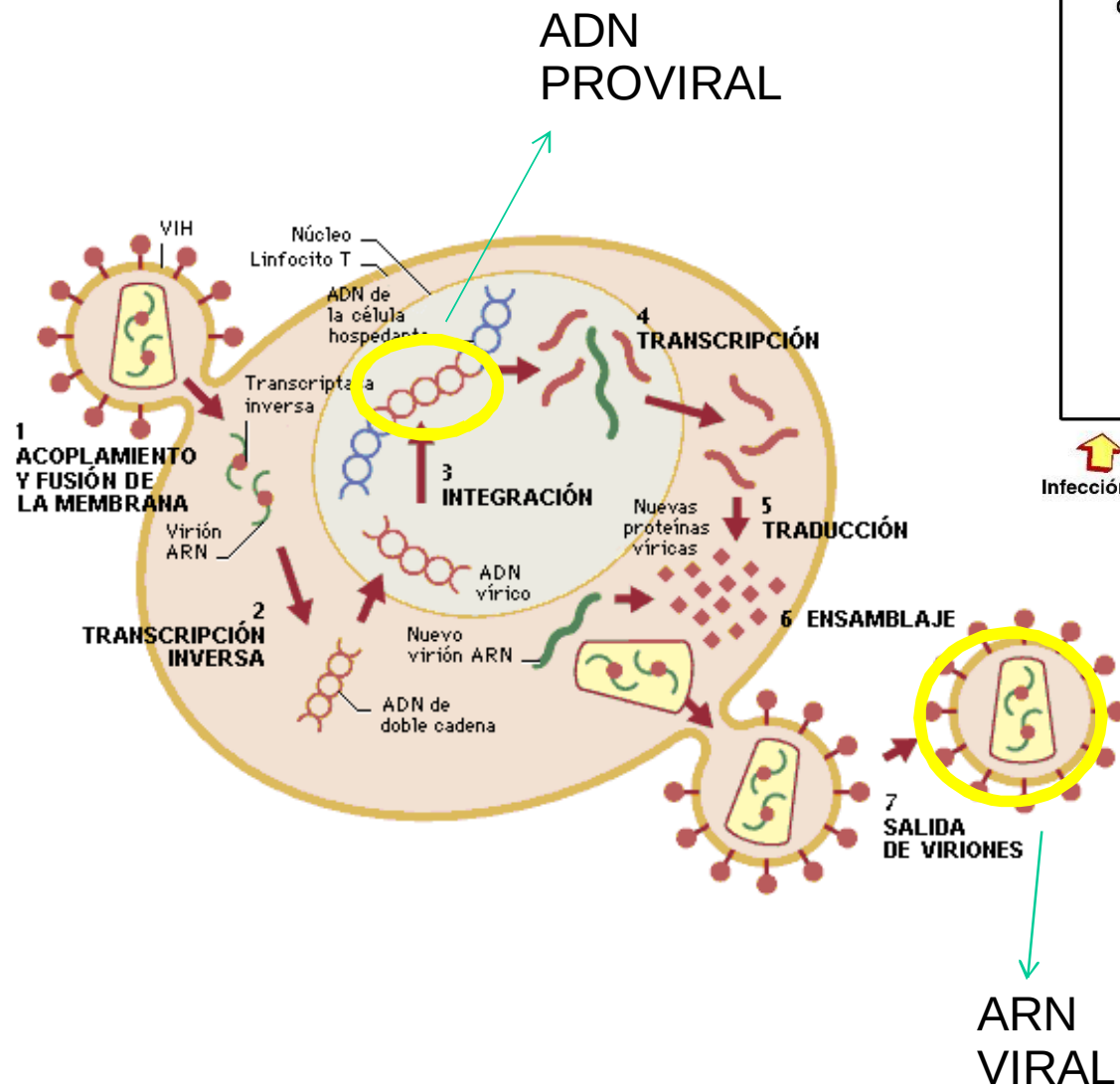
HEPATITIS
VIRALES

EPSTEIN

BARR VIRUS

CITOMEGALOVIRUS

HIV



HIV DIAGNÓSTICO ADN PROVIRAL/ARN VIRAL



DETECCIÓN DE ADN PROVIRAL:

ES ADN INTEGRADO EN EL GENOMA HUMANO.

SE BUSCA EN SANGRE ENTERA

TEST CUALITATIVO

TÉCNICAS CASERAS (BAJO COSTO)

MENOR SENSIBILIDAD: 30% DE FALSOS NEGATIVOS EN RECIÉN NACIDOS

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ARN VIRAL (CARGA VIRAL):

ES EL GENOMA DEL VIRUS

SE BUSCA EN PLASMA

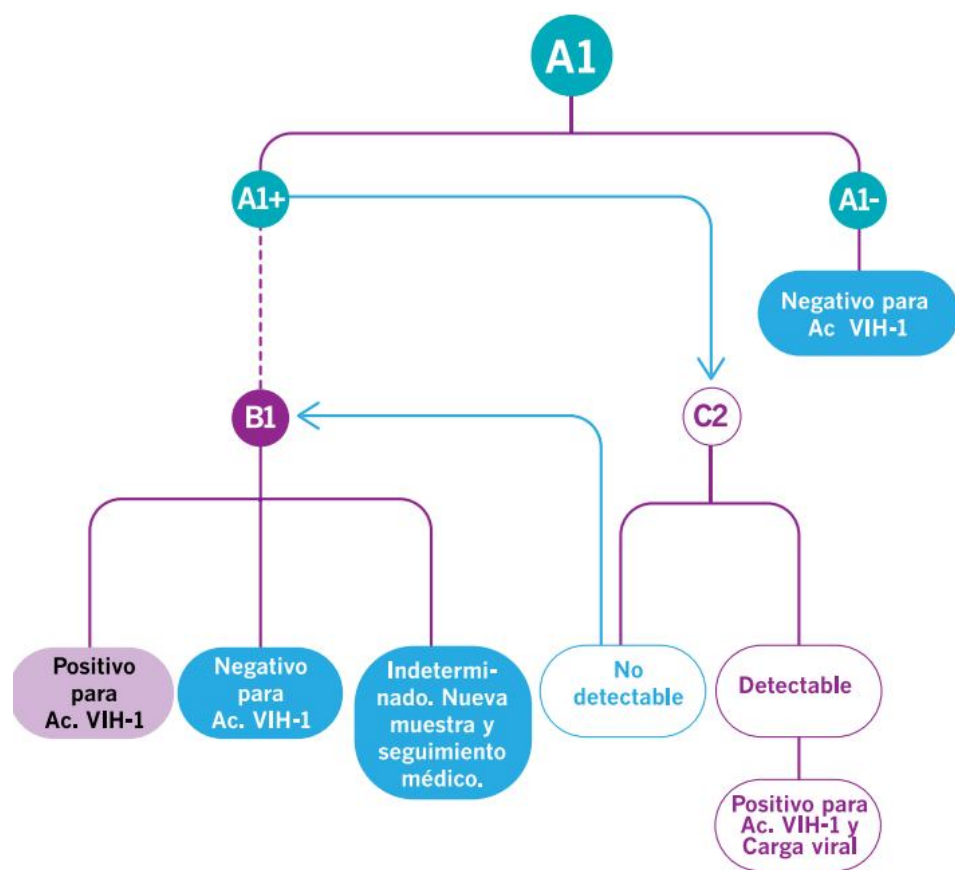
TEST CUANTITATIVOS CON ALTA ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD

TÉCNICAS COMERCIALES CON LIMITES DE CUANTIFICACIÓN MUY BAJOS: FALSOS POSITIVOS

MAS COSTOSA

COBAS AMPLIPREP/COBAS TAQMAN: LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN 20 COPIAS/ML

CUANDO NECESITAMOS UTILIZAR LA BIOLOGÍA MOLECULAR?



A1: ELISA DE 4TA
GENERACIÓN

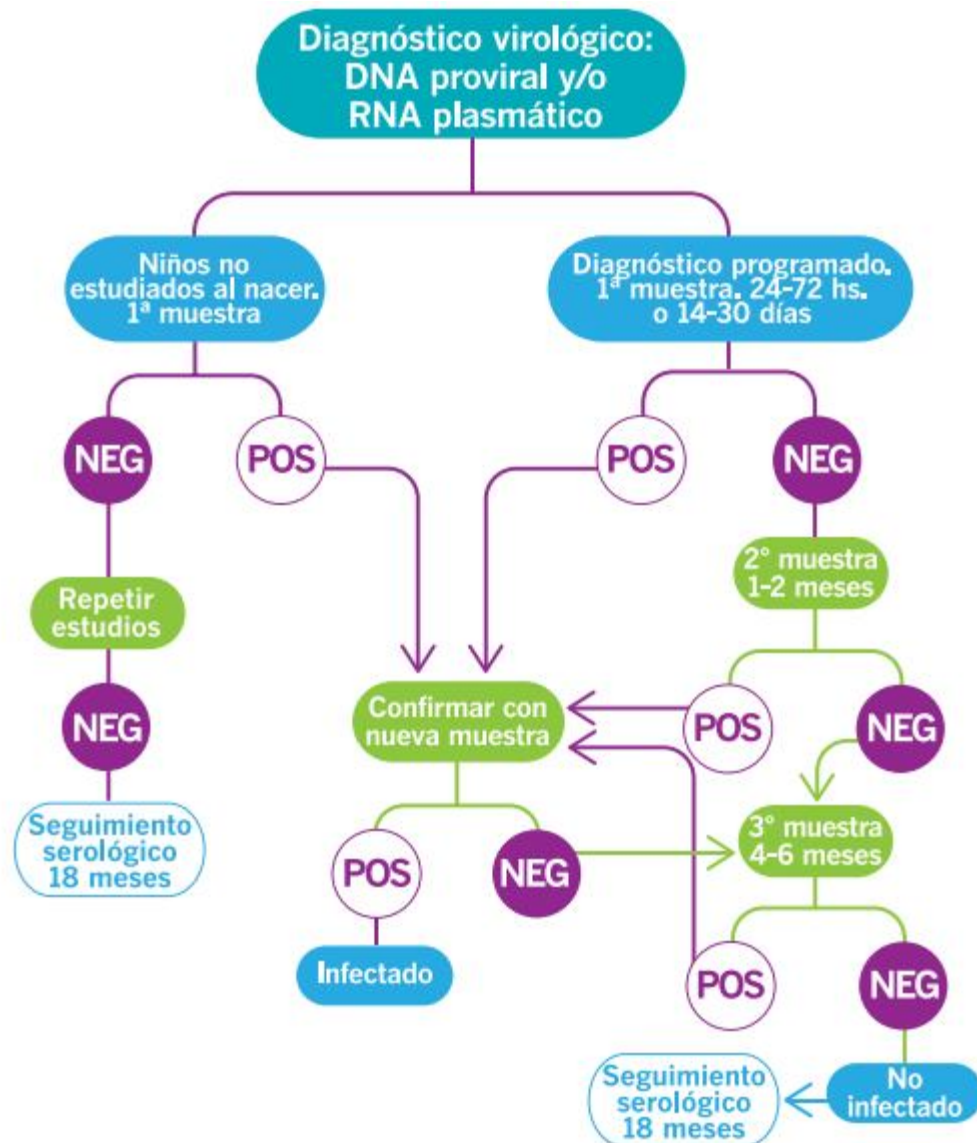
B1: WESTERN BLOT

C2: CARGA VIRAL

VENTAJA: EN LA SEGUNDA VISITA
(PRIMERA: ELISA +) TIENEN
CONFIRMACIÓN DE INFECCIÓN
JUNTO A UNA EVALUACIÓN DEL
PACIENTE. EN ALGUNOS CASOS
EL PEDIDO DE CV ES JUNTO A
CD4 Y CD8

http://www.msal.gov.ar/sida/images/stories/5-comunicacion/pdf/2013-11_algoritmos-diagnosticos-vih.pdf

HIV EN PEDIÁTRICOS (<18 MESES) (MADRES O PADRES VIH POSITIVAS)



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).

DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO!
EL ANTI-HIV NO SE UTILIZA
EL RECIÉN NACIDO PUEDE SER ANTI-HIV + Y NO TENER INFECCIÓN POR EL VIRUS YA QUE HEREDA LOS ANTICUERPOS DE LA MADRE

CARGA VIRAL DE HIV: ES EL RECOMENDADO POR EL MINISTERIO PARA LA EVALUACIÓN DE UN RECIÉN NACIDO DENTRO DE LAS 48 HS.

HIV DIAGNÓSTICO CONSIDERACIONES

HIV PROVIRAL: FALSOS NEGATIVOS EN RECIÉN NACIDOS

CARGA VIRAL: LIMITE DE DETECCION MUY BAJOS, ABRIR LOS OJOS
ANTE CARGAS VIRALES DE MENOS DE 1000 COP/MI

ANTI-HIV NO SE DEBE UTILIZAR EN PEDIATRICOS





TRATAMIENTO (TARV): TERAPIA ANTIRRETROVIRAL

OBJETIVO: SUPRESIÓN DE LA CARGA VIRAL
RECUPERACIÓN DEL SISTEMA INMUNE
PREVENCIÓN DE NUEVAS INFECCIONES
FRENADO DE LA EVOLUCIÓN DE LA INFECCIÓN



**AUMENTO DE
LA VIDA MEDIA
DE LOS
PACIENTES!!**

METODOLOGÍA PARA EL MONITOREO: CARGA VIRAL

La carga viral se debe medir cada 6 meses, eventualmente cada 3 meses (si se descubre un blip o probable falla virológica)

BLIP EN HIV



UN PACIENTE CON CARGA VIRAL NO DETECTABLE QUE
EXPERIMENTA POR:

- FALTA DE ADHERENCIA
- ALTERACIONES DEL SISTEMA INMUNE
- OTRAS CAUSAS DESCONOCIDAS

CARGA VIRAL ENTRE ND Y 500 COP/MI

Se mide la carga viral cada 3 meses
para descartar una falla virológica

HIV RESISTENCIA

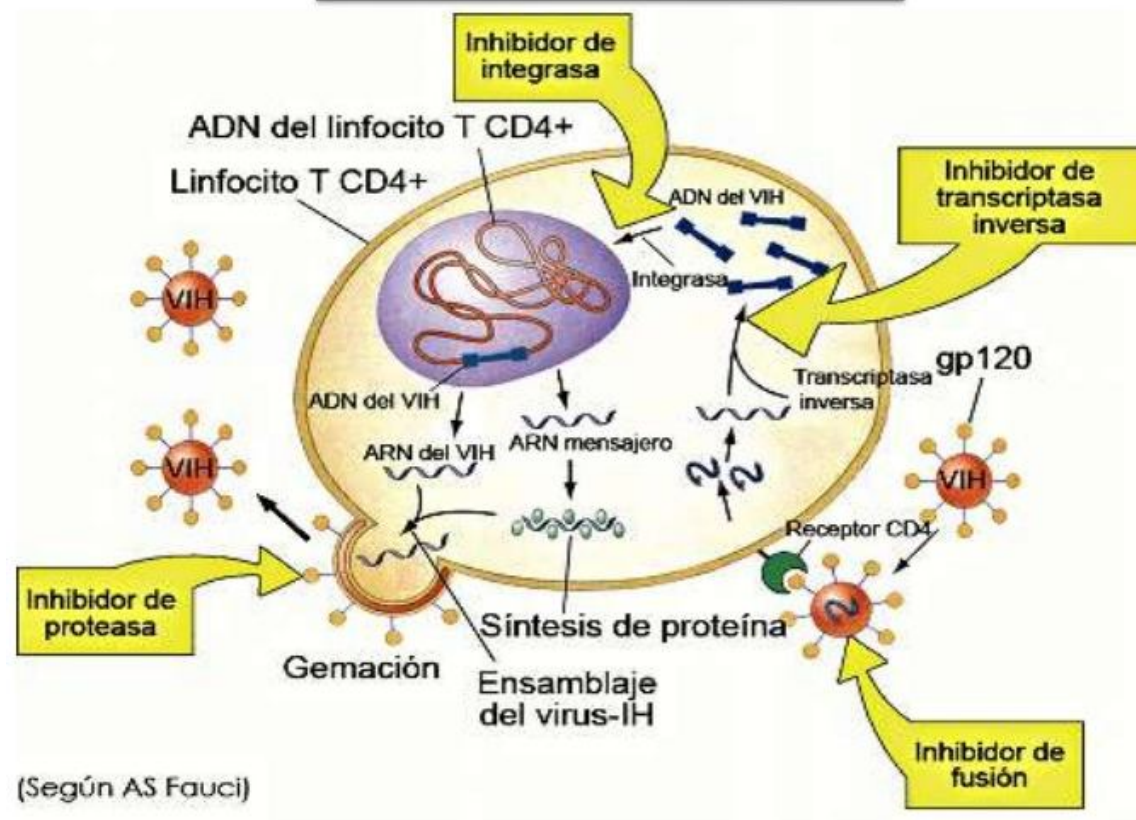


MECANISMO DE ACCIÓN

TARV: SE UTILIZAN
COMBINACIONES DE DROGAS
ANTIRRETROVIRALES

MOLECULAS QUE ACTÚAN FRENANDO
LA REPLICACIÓN Y LIBERACION DEL
VIRUS: INHIBIDORES DE LA PROTEASA,
INTEGRASA, RETROTRANSCRIPTASA

MOLECULAS QUE INHIBEN LA
ENTRADA DEL VIRUS A LA CELULA
TARGET



PACIENTE QUE NO
LOGRA LA
SUPRESION
VIROLÓGICA

FALLA
VIROLÓGICA

SOLICITUD DE
TEST DE
RESISTENCIA

HIV RESISTENCIA



GENOTIPO VIRTUAL: AMPLIFICACION, SECUENCIACIÓN Y ANALISIS BIOINFORMÁTICO

NRTI Resistance Mutations: M184V
NNRTI Resistance Mutations: K103NS, G190AG
Other Mutations: R211KR, F214L, A272P, E297R, I329V, R356KR, G359S, K366R, A400I, T403S

Nucleoside RTI		Non-Nucleoside RTI	
lamivudine (3TC)	High-level resistance	efavirenz (EFV)	High-level resistance
abacavir (ABC)	Low-level resistance	etravirine (ETR)	Potential low-level resistance
zidovudine (AZT)	Susceptible	nevirapine (NVP)	High-level resistance
stavudine (D4T)	Susceptible	rilpivirine (RPV)	Potential low-level resistance
didanosine (DDI)	Potential low-level resistance		
emtricitabine (FTC)	High-level resistance		
tenofovir (TDF)	Susceptible		

Mutation Scoring

PR	ATV/r	DRV/r	FPV/r	IDV/r	LPV/r	NFV	SQV/r	TPV/r
Total:	0	0	0	0	0	0	0	0

RT	3TC	ABC	AZT	D4T	DDI	FTC	TDF	EFV	ETR	NVP	RPV
M184V	60	15	-10	-10	10	60	-10	-	-	-	-
K103NS	-	-	-	-	-	-	-	60	0	60	0
G190AG	-	-	-	-	-	-	-	45	10	60	10
Total:	60	15	-10	-10	10	60	-10	105	10	120	10

HIV RESISTENCIA



GENOTIPO VIRTUAL

TIPO DE MUESTRA: PLASMA CON EDTA

SENSIBILIDAD: MAYOR A 1000 COP/MI

SE DEBE SOLICITAR SIN INTERRUMPIR EL TARV

**UTILIDAD: EVALUACIÓN DE FALLA
VIROLÓGICA O RESISTENCIA
PRIMARIA**

HIV TROPISMO

TROPISMO: ESTA DEFINIDO
POR EL TIPO DE RECEPTOR
QUE UTILIZA EL VIRUS PARA
INGRESAR A LA CELULA DEL
HUESPED

VIRUS R5: UTILIZA EL RECEPTOR
CCR5

VIRUS X4: UTILIZA EL RECEPTOR
CXCR4

VIRUS MIXTOS/DUAL: UTILIZA
AMBOS



HIV TROPISMO



MARAVIROC : DROGAS QUE BLOQUEAN LOS RECEPTORES POR LOS QUE EL VIRUS ENTRA. DROGAS DE ALTA POTENCIA. **SOLO FUNCIONA EN VIRUS R5**

LABORATORIO: TROPISMO PROVIRAL O GENOTROPISMO

ESTUDIO QUE DEFINE QUE TROPISMO TIENE EL VIRUS DEL PACIENTE

METODOLOGÍA: AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LA REGION V3. CON POSTERIOR ANALISIS BIOINFORMÁTICO

Tipo de muestra: PLASMA (carga viral $>1000\text{cop/ml}$) O SANGRE ENTERA (NO DETECTABLES)

HIV TROPISMO



geno2pheno®



Coreceptor usage prediction from genotype (version 2.5)

I. General information

Patient:	Study Id:
Birth date:	Viral load:
Sample received:	Sample collected:
Sample IDs: (Headerless_pasted_FAS TA_sequence)	Predicted V3-subtype: B
Sample type:	Report date:
Physician:	Reported by:

II. Additional clinical parameters used for the predictions:

No clinical parameters given

III. Aligned V3 region

	TGT	ACA	AGA	CCC	AGC	AGC	AGT	ACA	—	AGA	AGA	AGT	ATA	CAT	ATA	GGA	CCA	GAG	AGA	GCA	TTT	TAT	ACA	ACA	GGA	GAA	ATA	ATA	GGA	GAT	ATA	AGA	CMA	GCA	GAT	TGT
Consensus B:	C	T	R	P	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	
Query:	C	T	R	P	N	N	I	T	R	K	R	I	H	I	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	G	S	I	I	G	N	I	R	Q	A	H	C	
	TGT	ACA	AGA	CCC	AGC	AGC	AGT	ATT	ACA	AGA	AGA	AGT	ATA	CAT	ATA	GGA	CCA	GAG	AGA	GCA	TTT	TAT	ACA	ACA	GGA	AGC	ATA	ATA	GGA	AGT	ATA	AGA	CMA	GCA	GAT	TGT

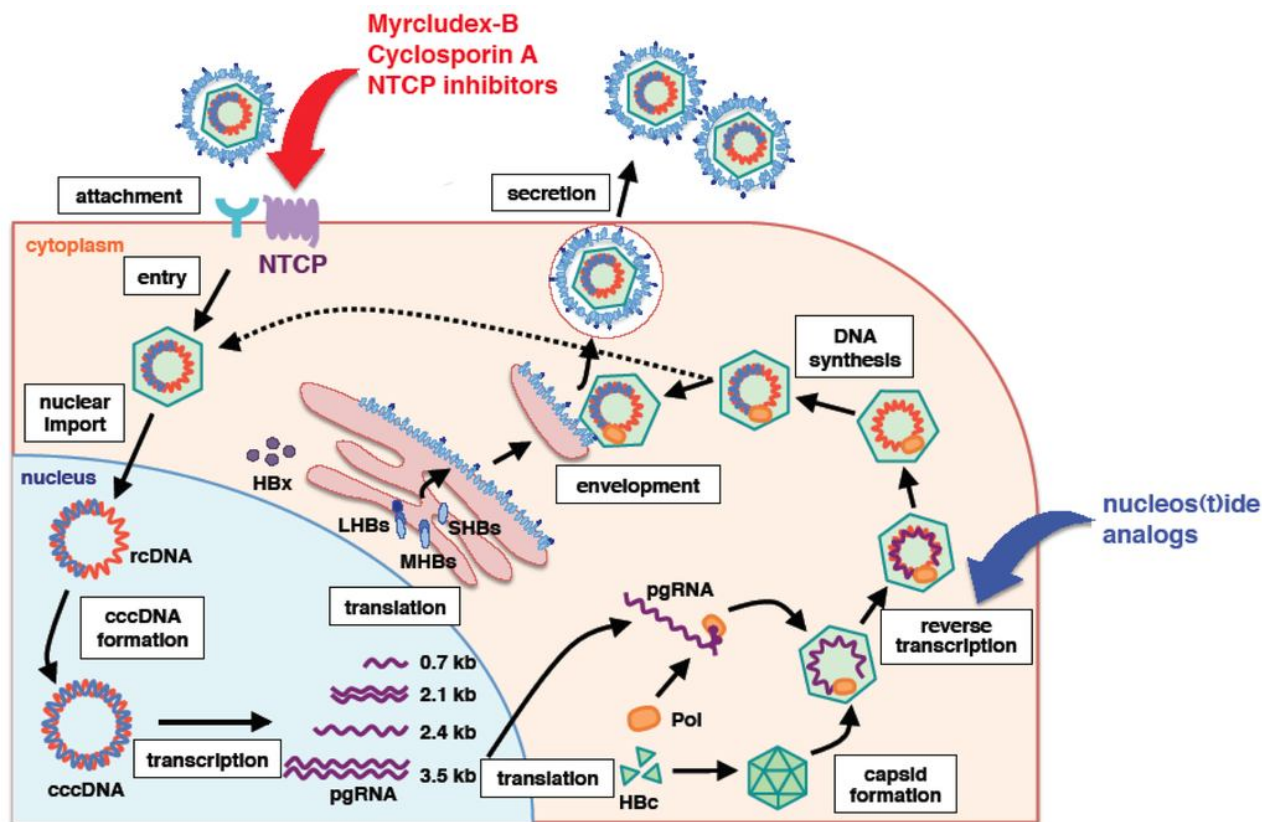
IV. Coreceptor prediction

Model	Prediction	FPR	Remarks
Clonal	CCR5-antagonists like Maraviroc (Celsentry/Selzentry) are not likely to be effective.	0.7%	The 11/25 rule would predict this sequence as an X4-virus.

The significance level was set to: "Optimized cutoffs based on analysis of clinical data from MOTIVATE"

VIRUS DE LA HEPATITIS B

CICLO DE VIDA



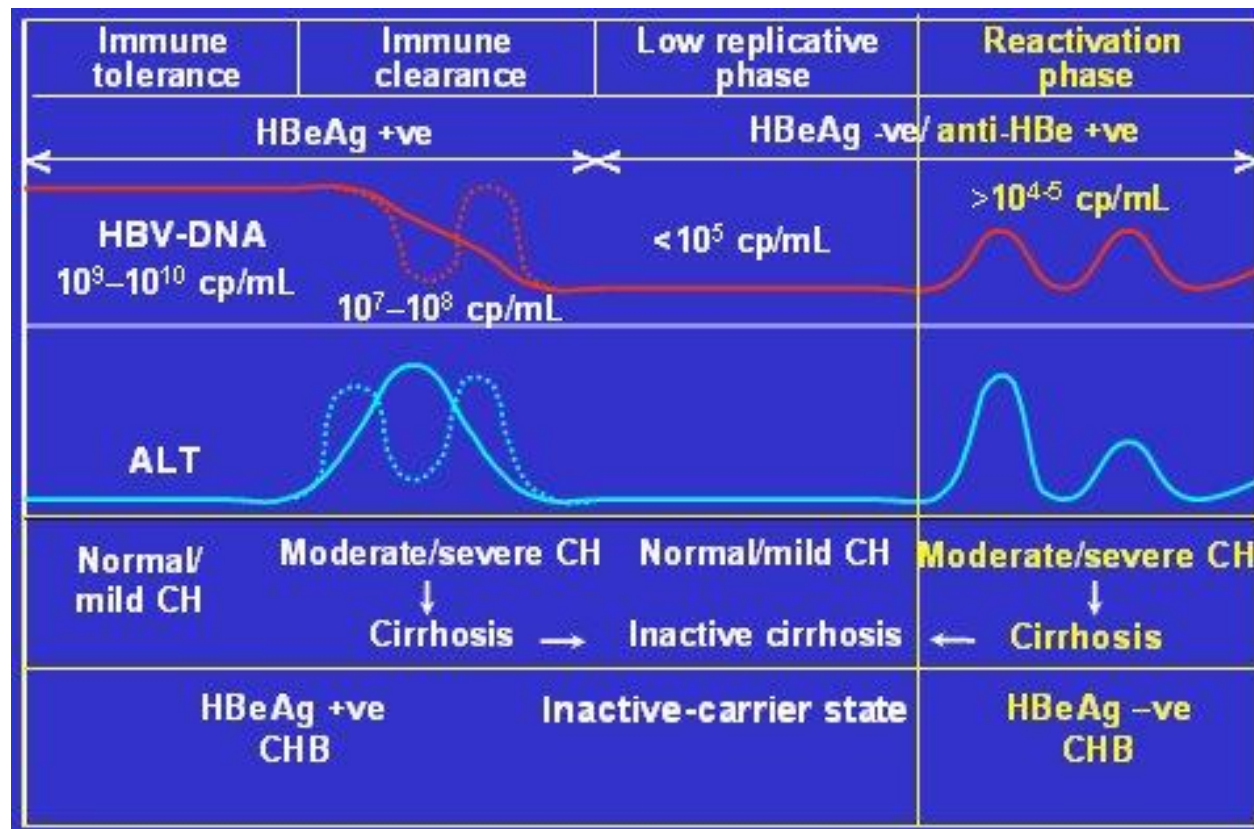
IMPORTANTE:

- NO SE INTEGRA AL GENOMA HUMANO
- CCC DNA
- FASE AGUDA
- PUEDE DESENCADENAR UNA INFECCION CRONICA (<5 % DE LOS CASOS)

VIRUS DE LA HEPATITIS B



ETAPAS DE LA INFECCION CRÓNICA



VIRUS DE LA HEPATITIS B



EL DIAGNOSTICO SE REALIZA CON SEROLOGIA

LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR: USO DE LA CARGA VIRAL

PARA CONFIRMAR ALGUNOS DIAGNOSTICOS ESPECIALES:

EJ: ANTI CORE NR, ANTIGENO DE SUPERFICIE RE. INFECCIONES AGUDAS AUN ASINTOMATICAS (PAREJAS DE HBV+ RECIENTEMENTE INFECTADAS)

DEFINIR EN QUE FASE DE LA EVOLUCION DE LA ENFERMEDAD CRONICA NOS ENCONTRAMOS

SEGUIIMIENTO DEL TRATAMIENTO

MONITOREO DE REACTIVACION POR INMUNOSUPRESORES



IFN: CURA AL PACIENTE

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

ANTIVIRALES: RARA VEZ EL PACIENTE SE CURA

SE DEBE MONITOREAR LA **CARGA VIRAL** PARA EVALUAR POSIBLES FALLAS VIROLOGICAS

HBV RESISTENCIA



SIMILAR A HIV. CUANDO SE SOSPECHA DE FALLA VIROLOGICA

TIPO DE MUESTRA PLASMA CON EDTA

CARGA VIRAL >1000 UI/MI

NO DISCONTINUAR EL TT

METODOLOGIA: SECUENCIACION CON ANALISIS

BIOINFORMATICO: GENOTIPO VIRTUAL

HBV GENOTIPO



EL GENOTIPO ES PREDICTOR DE RESPUESTA A TRATAMIENTO
CON IFN

EXISTEN 10 GENOTIPOS (A-J)

A RESPONDE MEJOR QUE EL D (ASOCIADOS A TRANSMISION EN
HOMOSEXUALES)

B RESPONDE MEJOR QUE EL C (ASOCIADOS A TRANSMISION
VERTICAL)

METODOLOGÍA: SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

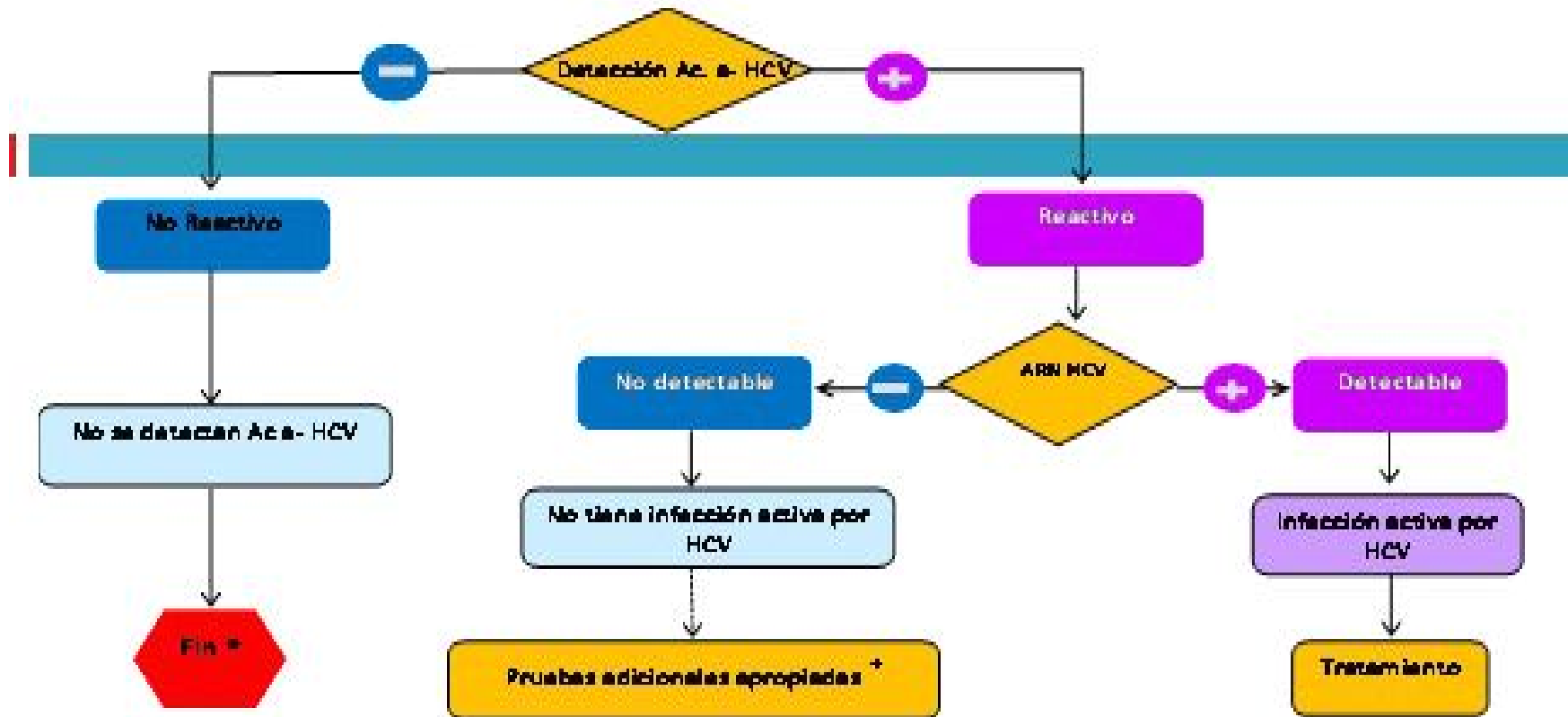


- REPLICACION CITOPLASMATICA
- 15 A 25% DE PACIENTES EVOLUCIONAN A CRONICIDAD
- ENFERMEDAD ASINTOMATICA
- SE CURA, ESPONTANEAMENTE O CON TT

HCV DIAGNOSTICO



ANTI-HCV: DENOTA EL CONTACTO CON EL VIRUS PERO NO CONFIRMA INFECCION RECIENTE
LA INFECCION ACTIVA DEBE CONFIRMARSE CON LA BUSQUEDA DEL ARN VIRAL



RIBA O LIA



DETECCION DE ARN VIRAL

- RECOMENDADO: TECNICA COMERCIAL, CON LIMITE DE DETECCION MENOR A 50 UI/MI
- COBAS Ampliprep/COBAS Taqman: LIMITE DE DETECCION DE 15 UI/MI
- SE ESTAN DISCONTINUANDO LAS TECNICAS DE PCR CUALITATIVAS

CASOS PARTICULARES (SOLO TECNICAS MOLECULARES)

- ARN VIRAL: SOSPECHA DE INFECCION RECIENTE O AGUDA. NO SE DETECTAN ANTICUERPOS
- ARN VIRAL: PACIENTE INMUNOCOMPROMETIDOS O EN DIALISIS

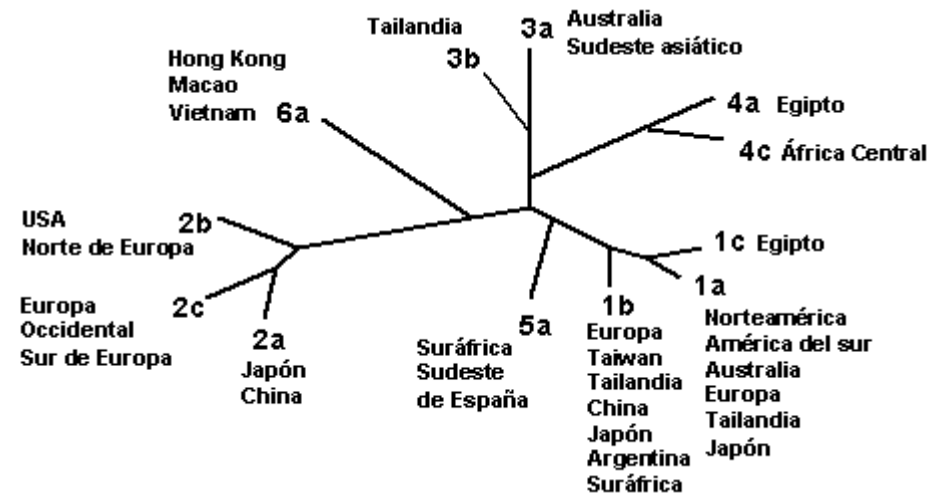
HCV GENOTIPO



EXISTEN 7 TIPOS Y MÚLTIPLES
SUBTIPOS DE HCV

ESTÁN RELACIONADOS CON LA
EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD Y
LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO

LOS TRATAMIENTOS VARIAN SEGÚN EL
GENOTIPO



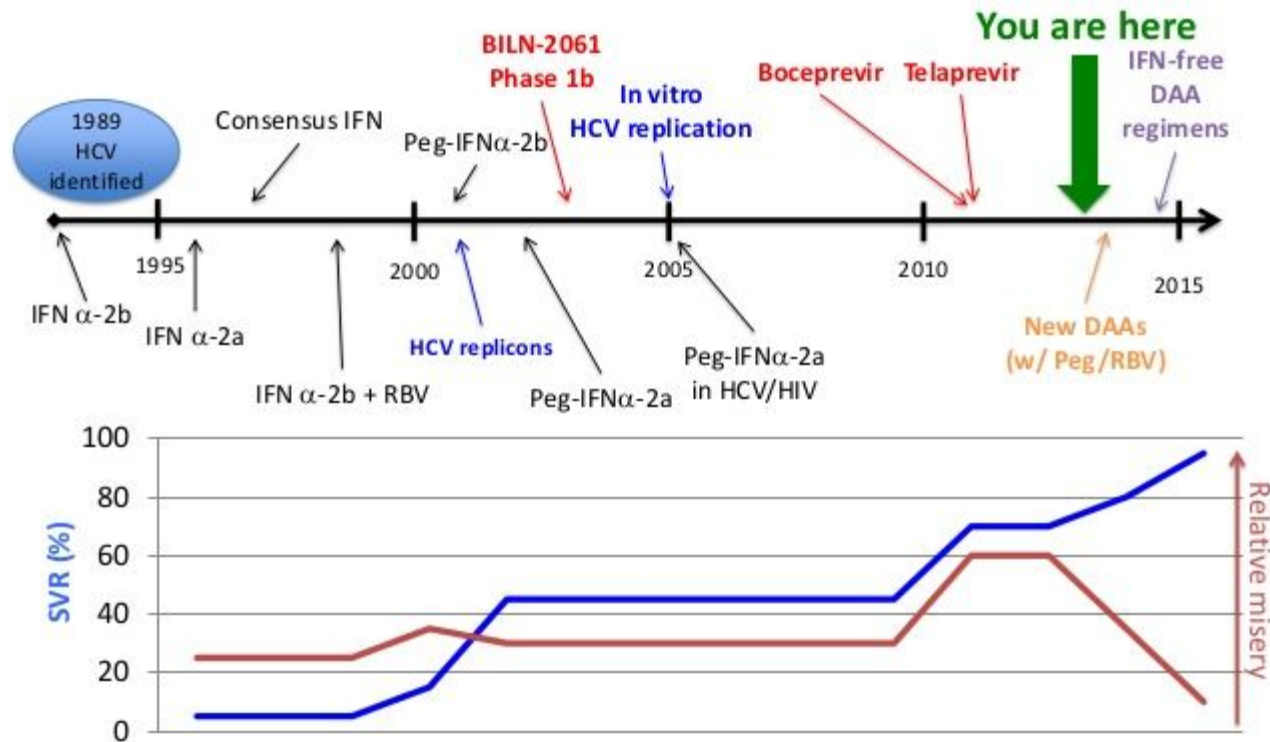
**GOLD ESTÁNDAR: SECUENCIACIÓN DE
REGIONES ALTAMENTE CONSERVADAS AUNQUE
DIFERENTES ENTRE GENOTIPOS**

**(SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO, MÁS COMPARACIÓN CON
BASE DE DATOS INTERNACIONAL)**

HCV MONITOREO TT



HCV Therapeutics Timeline



HCV MONITOREO TT



A MODO DE EJEMPLO:

Terapias de corta duración

Respuestas rápidas

Algunas guiadas por la respuesta

Reglas de discontinuación

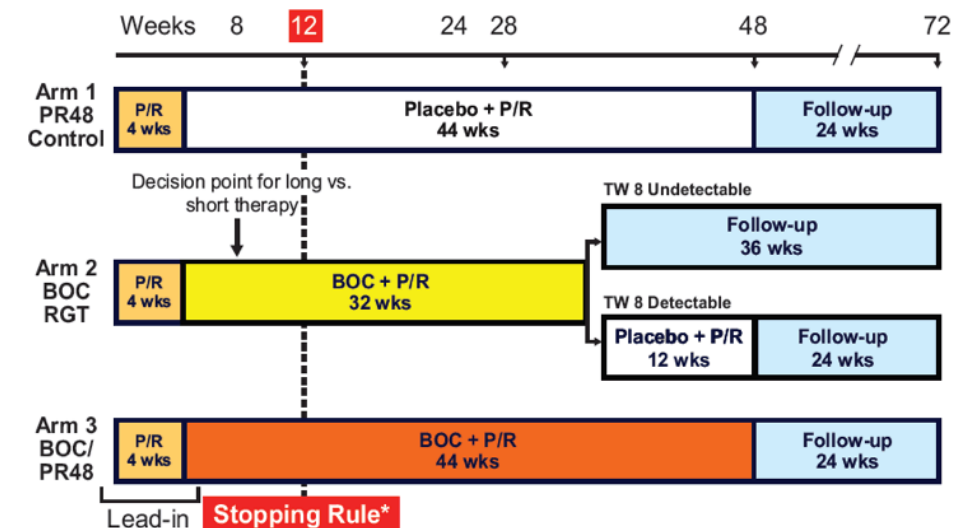
Evaluación de adherencia

Otros

En todos los casos, necesarias técnicas comerciales, Cuantitativas, con bajo limite de detección

Futility Rules for Patients Receiving Telaprevir and Peginterferon plus Ribavirin				
Stopping Criteria*	Regimen and Treatment Duration (weeks)			
	0	4	12	24
Week 4 HCV RNA > 1000 IU	Telaprevir PR STOP			
Week 12 HCV RNA > 1000 IU	Telaprevir PR STOP			
Week 24 Detectable HCV RNA	Telaprevir PR STOP			

RESPOND-2 Previous Treatment Failure Patients Study Design



Muchas gracias!

