



UNIVERSIDAD DEL SURESTE



MEDICINA HUMANA

BIOLOGIA MOLECULAR.

QFB: Hugo Nájera Mijangos.

DIANOTICO MOLECULAR DE HIV, HEPATITIS A,B,C



PRESENTA:

LÓPEZ HERNANDEZ SANDIBEL

OCTAVO SEMESTRE, GRUPO UNICO.

Comitán de Domínguez Chiapas a 02 de diciembre del 2020

HEPATITIS.A

El diagnóstico de la hepatitis A se fundamenta en la detección de anticuerpos específicos de clase IgM e IgG frente a antígenos virales (proteínas de la cápside) del VHA en muestras de suero o plasma del paciente, Estos anticuerpos constituyen los principales marcadores serológicos de la infección y establecen el diagnóstico virológico de la misma..

IgM anti-VHA: En general el diagnóstico de la infección aguda por el VHA se establece por la presencia de anticuerpos específicos frente al virus de tipo IgM (IgM anti-VHA), que son los primeros en aparecer y se detectan durante un periodo de tiempo prolongado (de 3 a 6 meses); además su presencia coincide con la fase sintomática, cuando ésta se manifiesta. Virtualmente, Por lo que respecta a los anticuerpos específicos de clase IgG (IgG anti-VHA), aparecen posteriormente, durante la fase de convalecencia, coinciden durante un tiempo con los de clase IgM y persisten indefinidamente confiriendo inmunidad permanente que protege de la enfermedad. Estos anticuerpos no distinguen entre infección actual o pasada y además, también aparecen después de la inmunización pudiendo cuantificarse, por lo que su finalidad se circunscribe a estudios epidemiológicos de prevalencia o de investigación inmunitaria. Los sistemas más utilizados son equivalentes a los empleados para la detección de la IgM

La tecnología utilizada para la amplificación y detección del ARN-VHA se fundamenta en la reacción de transcripción inversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en cualquiera de sus variantes (a tiempo final o a tiempo real). En la actualidad ya se encuentran comercializados ensayos de amplificación a tiempo real para detectar el ARN del VHA (por ejemplo, RealStar HAV RT-PCR kit 1.0, Altona Diagnostics) con excelente sensibilidad y especificidad en diferentes tipos de muestras. Estos métodos también

han sido aplicados a la detección del virus en alimentos y muestras ambientales. Recientemente también se han desarrollado ensayos de PCR a tiempo real múltiples para la detección cualitativa y cuantitativa del ARN del VHA simultánea a ácidos nucleicos de otros virus hepatotropos en muestras de suero, con finalidad diagnóstica. Estos sistemas de diagnóstico sindrómico presentan además una gran sensibilidad durante el periodo de ventana.

Genotipo viral:

En base a su diversidad genética en la región VP1 del genoma viral, el VHA se clasifica en seis genotipos (I a VI). Sólo tres de ellos el I, II y III y sus correspondientes subtipos A y B, son capaces de infectar al hombre. La caracterización molecular, en laboratorios de investigación, de las secuencias amplificadas por RT-PCR del ARN genómico mediante secuenciación y posterior análisis filogenético permite determinar los diferentes genotipos virales, que son de gran utilidad en los estudios de epidemiología molecular para caracterizar los brotes epidémicos.

2.3.3. Técnicas rápidas y otras

Existen pruebas rápidas para detectar anticuerpos específicos de clase IgM frente al VHA en muestras de suero o plasma, basadas en la inmunoadherencia por inmunocromatografía de flujo lateral. La detección de antígenos de VHA en heces puede tener cierto interés diagnóstico. En este sentido, existe algún sistema comercializado en formato de inmunocromatografía que aporta resultados en pocos minutos (por ejemplo, CerTest HAV, CerTest Biotech ES). La detección directa por inmunomicroscopía electrónica de los viriones en las heces de los pacientes es otra posibilidad poco práctica y reservada a laboratorios de investigación para determinar directamente la presencia viral. Del mismo modo la detección directa del antígeno viral en diferentes muestras clínicas por radioinmunoensayo o enzimoimmunoensayo tiene poca aplicación y se reserva a los mismos escenarios.

HEPATITIS B

En el laboratorio se deben considerar dos grupos de pruebas: A) los marcadores serológicos clásicos y B) las pruebas moleculares para la detección del ácido nucleico (NAT). En la última década las mejoras realizadas en los marcadores serológicos han supuesto la posibilidad de cuantificar el antígeno de superficie (HbsAg), el aumento de las sensibilidades y especificidades de las técnicas y su automatización. En el campo de las pruebas moleculares utilizadas para la detección y cuantificación del ADN viral los avances han sido aun mayores y han permitido su realización estandarizada en muchos laboratorios donde hace pocos años esto era impensable. Este nuevo entorno en el laboratorio es un punto fundamental en la monitorización de los tratamientos y ha hecho posible un mejor diagnóstico, un mayor conocimiento de la biología del virus y, por tanto, de la patogenia de la enfermedad. Podría decirse de un modo simplista que el anti-HBc IgM marca momentos recientes de la infección o reactivaciones, el anti-HBc IgG es marcador de contacto con el virus, el HBsAg es el marcador de la actividad de la enfermedad y de infectividad y se aclara con la elevación de su anticuerpo específico, el anti-HBs; este último anticuerpo es el único que confiere inmunidad frente al virus y puede surgir por la infección o por la vacunación; el HBeAg sería marcador de alta actividad replicativa viral, y se aclararía por elevación de su anticuerpo específico, el anti-HBe, o dejaría de detectarse por la aparición de variantes del virus con mutaciones en la región precore/core. Los marcadores que se pueden observar en cada momento en el suero del paciente son consecuencia de la actividad replicativa viral en el hepatocito y de sus consecuencias inmunológicas. La interpretación correcta de estos marcadores en conjunto, de la presencia en el suero del virión, de alguna de sus proteínas, de los anticuerpos a los que dieron lugar o del ADN viral, permite establecer una correlación muy precisa de la historia natural de la enfermedad. En todos los casos la secuencia de aparición de los marcadores es la siguiente: ADN-VHB, HBsAg, anti-HBc (IgM e IgG), HBeAg, anti-HBe y anti-HBs. Los relacionados con la replicación viral son: ADN-HBV y HBeAg y de forma indirecta anti-HBc IgM. El marcador de curación es

el anti-HBs y los marcadores anti-HBc IgG y anti-HBe conviene interpretarlos dentro del contexto del paciente. Otros marcadores como la determinación en biopsia hepática del ADNccc en hepatocito y en suero de los antígenos pre-S 1 y 2 y sus correspondientes anticuerpos pueden ser de utilidad para establecer un pronóstico pero no existen pruebas comerciales estandarizadas ni experiencia de uso que justifiquen su empleo. Es importante recordar que la enfermedad no es la presencia de marcadores en el suero sino la del virus en el hepatocito infectado.

Antígeno de superficie: HBsAg El HBsAg, antígeno de superficie o antígeno Australia, expresión de la ORF S del gen S, se sintetiza en el citoplasma del hepatocito por la traducción de varios ARNm de 2,1 a 2,4 Kb. Es una partícula formada por más de 100 copias de moléculas proteicas con una compleja estructura tridimensional. Este antígeno se encuentra en el citoplasma unido a las membranas del retículo endoplasmático desde donde, libre y en gran cantidad, se excreta al torrente sanguíneo con formas de agregados esféricos o filamentosos según sea la cantidad de proteína preS1 o preS2 que contengan. Estas formas excretadas de antígeno, aunque son marcadoras de infectividad, no son infecciosas al carecer de ADN y pueden superar en número hasta 10^6 a las del propio virión. Otra pequeña parte de proteína de superficie, con proporciones reguladas de fracciones preS1 y preS2, entra a formar parte de la estructura del virión (partícula de Dane) al ensamblarse con la nucleocápside antes o en el momento de la salida del hepatocito. En las fases agudas, la viremia también es muy alta pudiéndose alcanzar concentraciones de 10^6 a 10^9 viriones/mL. La concentración de este antígeno en la sangre puede oscilar entre 50 y 300 mg/mL aunque en algunos casos el HBsAg puede alcanzar concentraciones de hasta 1 mg/ml

Anticuerpos anti-HBs El HBsAg provoca la aparición de anticuerpos neutralizantes contra sus epítomos conformacionales. Los anticuerpos están dirigidos frente a varios lugares antigénicos del HBsAg y todos ellos se denominan genéricamente anti-HBs. Algunos anticuerpos son únicos para determinadas cepas del virus, pero en todos los pacientes y personas vacunadas, el anticuerpo predominante es el anti-HBs/a dirigido frente al determinante común

“a”. No hay diferencia en la virulencia de las diferentes cepas de VHB pero cada una induce anticuerpos para su propio antígeno de subtipo. Estos anticuerpos también se detectan, con diferente sensibilidad, mediante las pruebas serológicas comerciales. Los anticuerpos subtipo específicos, probablemente solo producen protección contra la cepa a la que van dirigidas. El anti-HBs es el último marcador en aparecer. Su seroconversión sucede poco después de la desaparición del HBsAg, a los 2 o tres meses de la infección en los cursos agudos autolimitados. La presencia de este marcador indica inmunidad de larga duración frente a la reinfección. En los vacunados es el único marcador de VHB presente y se considera que un individuo está protegido si la concentración de este anticuerpo supera las 10-20 mUI/mL. En los individuos vacun

HEPATITIS C

Detección de anticuerpos anti-HCV Existen diferentes formatos de ensayo para la detección de anticuerpos anti-HCV en suero o plasma. Los más utilizados son los enzimoimmunoensayos (EIA) o su variante inmunoensayos quimioluminiscentes (CLIA) que aportan ventajas en cuanto a automatización, simplicidad de uso y productividad. Los ensayos de tercera generación detectan anticuerpos a antígenos recombinantes del core, NS3, NS4 y NS5. Son sistemas de alta especificidad y muy alta sensibilidad y su periodo ventana está en torno a las 6 o 7 semanas. Algunos ensayos de segunda generación todavía se comercializan. Difieren de los de tercera generación en sensibilidades y especificidades más limitadas y en su periodo ventana que puede llegar a las 10 semanas. Existen tests rápidos basados en técnicas de inmunoadherencia por inmunofiltración o inmunocromatografía, para detectar anticuerpos anti-HCV con buenas sensibilidades y especificidades. Estos sistemas pueden ser utilizados con diferentes muestras como suero, plasma, sangre o incluso saliva y ofrecen resultados en menos de 30 minutos. Otro formato disponible son los inmunoblots con antígenos recombinantes (RIBA y LIA). Estos sistemas permiten detectar anticuerpos del paciente frente a diferentes antígenos de forma independiente. Los resultados se evidencian sobre una tira de celulosa o nylon sobre la que se han depositado antígenos recombinantes. Son ensayos con excelente especificidad

po, o que suelen ser utilizados como confirmatorios y son útiles para descartar reacciones falsamente positivas de los tests de screening.

Carga Viral del VHC La detección del ARN-VHC en plasma implica infección activa y por lo tanto capacidad infectiva. Sin embargo, un resultado negativo (o indetectable) no excluye totalmente la infección, ya que el virus puede encontrarse en los hepatocitos o en los linfocitos. Su determinación es útil en diversas circunstancias, así proporciona evidencias de infección aguda cuando los anticuerpos anti-VHC aun no son detectables, sirve para verificar el diagnóstico de infección vertical, confirma una hepatitis crónica C, confirma la infección en pacientes con una alteración de la inmunidad humoral y que no expresan el anti-VHC en plasma (inmunodeprimidos por trasplante, diálisis o tratamiento citostático), así como es muy importante en la monitorización de la respuesta al tratamiento antiviral.

DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR EL VIH

El diagnóstico definitivo de la infección por el VIH sólo puede establecerse por métodos de laboratorio, ya que en ningún caso las manifestaciones clínicas son lo suficientemente específicas. Los métodos directos detectan al propio virus o alguno de sus componentes, como proteínas o ácidos nucleicos, mientras que los indirectos reconocen los anticuerpos específicos producidos por el sistema inmunitario como respuesta a la infección vírica (tabla 1). La detección por métodos directos o indirectos del VIH ha permitido no solo reconocer a las personas infectadas y establecer medidas preventivas adecuadas, sino que además constituye una ayuda esencial en el seguimiento de los pacientes para conocer el pronóstico de la enfermedad y la eficacia del tratamiento utilizado.

Las técnicas inmunoenzimáticas (EIA) son las más empleadas debido a su metodología relativamente simple, alta sensibilidad, nivel de automatización y diseño para realizar un gran número de tests de forma simultánea (2). En principio se basaron en la

utilización de lisados víricos (ensayos de primera generación), y fueron de enorme utilidad para conocer el alcance de la epidemia de SIDA en los primeros años y establecer las primeras medidas preventivas.

La reactividad indeterminada del WB puede ocurrir en determinadas situaciones relacionadas con la infección por el VIH. En casos de seroconversión reciente en las que aún no han aparecido todas las bandas, en recién nacidos de madres seropositivas, estén infectados o no, y en pacientes con enfermedad avanzada y grave deterioro inmunológico. También hay que valorar la posibilidad de presentar una infección por el VIH-2 (algunos tests llevan adherida una banda de antígeno específico del VIH-2) o por un subtipo del VIH-1 distinto al habitual. La hipergammaglobulinemia frecuente en individuos africanos, por estimulación antigénica inespecífica, es causa de patrones indeterminados en WB no relacionados con infección por VIH, así como también es posible la reactividad cruzada en pacientes con enfermedades autoinmunitarias, embarazadas y en algunos donantes de sangre.

Cultivo celular

Aunque es la técnica más específica para el diagnóstico de la infección su utilización suele reservarse para estudios básicos de variabilidad genética, epidemiología molecular, patogénesis vírica o resistencia a fármacos, debido a la complejidad y riesgo que supone su realización

Antigenemia de p24

El antígeno p24 de la cápside del VIH (core), detectado en suero o plasma mediante una reacción de EIA, es un marcador precoz de infección aguda por VIH. A lo largo de la infección su detección es variable debido al incremento de anticuerpos anti-p24 neutralizantes o a la escasa replicación del virus. Las técnicas que rompen los inmunocomplejos formados por el antígeno p24 y su anticuerpo aumentan la sensibilidad

Técnicas de laboratorio para el diagnóstico de la infección por VIH 1. MÉTODOS INDIRECTOS a. Pruebas de screening serológicas I. Técnicas inmunoenzimáticas (EIA) • EIA indirecto con antígeno obtenido de lisado vírico (primera generación) • EIA indirecto o competitivo con antígeno obtenido de proteínas recombinantes y/o péptidos sintéticos (segunda generación) • EIA de tipo sándwich o de inmunocaptura, con antígeno obtenido de proteínas recombinantes y/o péptidos sintéticos y detección conjunta de anticuerpos específicos de clase IgG, IgM e IgA (tercera generación) • Detección combinada de anticuerpos específicos y antígeno de VIH (cuarta generación) II. Otras técnicas • Aglutinación • Dot blot • Inmunocromatografía b. Pruebas confirmatorias I. Western blot II. Inmunofluorescencia indirecta (IFI) III. Radioinmunoprecipitación (RIPA) IV. Inmunoensayo lineal (LIA) 2. MÉTODOS DIRECTOS a. Cultivo vírico b. Detección de antigenemia (antígeno p24) c. Detección molecular de ADN provírico y ARN vírico I. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) II. ADN ramificado (bDNA) III. Amplificación basada en la transcripción o TMA (NASBA)

BIBLIOGRAFIA

1. Manuel Rodríguez Iglesias y Alberto Terrón Pernía, DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR EL VIH, https://www.minsalud.gov.co/salud/Documents/observatorio_vih/documentos/ Acceso_al_diagnostico/1_Diagnostico_en_ITS_VIH_Sida/b.Proceso_diagnostico/pruebas%20dx%20vih.pdf }
2. Emília Cercenado Mansilla, Rafael Cantón Moreno, Diagnóstico microbiológico de las hepatitis víricas, <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc>