



UNIVERSIDAD DEL SURESTE



ESCUELA DE MEDICINA

**ENSAYO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE VIH Y HEPATITIS
A,B,C**

BIOLOGÍA MOLECULAR EN LA CLÍNICA

CATEDRÁTICO: HUGO MIJANGOS NAJERA

ALUMNO: MARIANA CATALINA SAUCEDO DOMINGUEZ

8° SEMESTRE GRUPO "A"

COMITÁN DE DOMÍNGUEZ, CHIAPAS, 01 DE DICIEMBRE DEL 2020

Ensayo de diagnóstico molecular de VIH y hepatitis A, B, C

Diagnóstico molecular de VIH

Para comenzar con el presente trabajo, es importante tener en claro el significado de diagnóstico molecular, definiéndose como; “Proceso que se usa para identificar una enfermedad por medio del estudio de las moléculas, tales como proteínas, ADN y ARN, de un tejido o líquido corporal” (INC, 2016). También es fundamental abordar la importancia y especificaciones clave del VIH, ya que este es un retrovirus perteneciente a la subfamilia de los lentivirus, causante de infecciones persistentes, dando lugar a enfermedades con largos periodos de incubación.

Comparado con otros virus, los lentivirus tienen un genoma de Ácido Ribonucleico (ARN) más extenso, en torno a las 10 Kilobases (Kb). Su propiedad más relevante estriba en la capacidad de codificar genes esenciales que permiten la regulación de su propia expresión en la célula infectada.” infecta las células CD4+ del sistema inmune cuya función es la presentación de antígenos; ingresa a las células utilizando receptores de superficie que participan en la respuesta inmunológica como la molécula CD4 y los componentes de la familia de receptores de quimioquinas (CXCR4, CCR5 y CCR3) y posee una alta frecuencia de mutación que le permite cambiar sus determinantes antigénicos” (Pérez, 2000).

Ahora bien, haciendo hincapié en el diagnóstico molecular del VIH, se recomienda el uso de tres técnicas con distinto principio o base antigénica, siendo obligado que para la confirmación una de ellas sea el Western Blot. El abordaje diagnóstico se inicia con una prueba presuntiva o de tamizaje, tipo ELISA, que luego debe confirmarse con una prueba más específica, tipo Western Blot. En algunos casos, como en el niño menor de 18 meses, es necesario recurrir a pruebas moleculares para establecer el diagnóstico. “El diagnóstico de la infección por el VIH se establece al aislar el virus en cultivo, detectar el antígeno P24, medir la respuesta de anticuerpos o detectar su ácido nucleico” (Ospina, 2006).

Las pruebas para la detección de anticuerpos, se dividen en pruebas de tamizaje o presuntivas, las cuales poseen una alta sensibilidad y buena especificidad, y las pruebas confirmatorias, cuya característica es la alta especificidad, a su vez se clasifican en pruebas de primera generación (lisados virales) y segunda generación (proteínas recombinantes del VIH, péptidos sintéticos), de tercera generación (péptido / proteína recombinantes), de cuarta generación (detección simultánea de anticuerpos y complejos inmunes antígeno p24(anticuerpo).

En el caso de las pruebas serológicas para la detección de antígeno, en la infección temprana existe un corto período en el que hay presencia del antígeno p24 del VIH-1 en ausencia de anticuerpos contra el mismo, este antígeno puede detectarse por técnicas de ELISA. Algunos métodos incorporan un ajuste al pH o tratamiento con calor para separar los complejos p24-anti p24 y, así, mejorar la sensibilidad de la prueba.

Las pruebas confirmatorias para la infección por el VIH, “están orientadas a confirmar la presencia de la infección por el VIH en un paciente con una prueba presuntiva doblemente reactiva, por lo que tienen una alta especificidad, se basan en la detección de anticuerpos contra el virus o sus componentes” (Ospina, 2006). El Western blot, consiste en separar las proteínas constitutivas del virus por electroforesis y se transfieren a un papel de nitrocelulosa, estas son expuestas al suero del paciente, los anticuerpos específicos se unen a las proteínas presentes dando un patrón de bandas, la interpretación depende del criterio del laboratorio.

“Una prueba de Western blot para VIH 1 sugestiva de infección por el VIH 2, debe ser confirmarse por un Western blot específico para VIH 2 o por pruebas que involucren proteínas recombinantes específicas. En algunos casos es necesario hacer PCR para ambos virus” (Ospina, 2016). Otra prueba confirmatoria, es la inmunofluorescencia indirecta, pero para utilizarla se necesita de personal capacitado en su totalidad para su lectura.

Para la detección de niños mejores de 18 meses, se usan las técnicas de detección de ácidos nucleicos. Existen pruebas para detectar el ácido ribonucleico (ARN) del virus, tales como la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa, amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico, ADN amplificado.

Diagnóstico molecular de hepatitis A, B, C

Para hablar del diagnóstico molecular de la hepatitis, en el presente trabajo se abarcan características importantes y generales por separado de la hepatitis A, B y C para fácil comprensión. Comenzando con la hepatitis A, esta causada por un virus ARN de la familia Picornaviridae y género Hepatovirus. Tiene morfología icosaédrica sin envuelta, de unos 28 nm de diámetro y un solo genoma de ARN lineal de polaridad positiva con longitud total de 7,5 kb, que se traduce en una única poliproteína que, por sí sola, puede causar infección. “En el mundo, las infecciones por VHA ascienden aproximadamente a 1,4 millones de casos al año. Se estima que más del 50% de la población mayor de 40 años posee anticuerpos de tipo IgG contra el virus” (Aguilera, Alonzo & Córdoba, 2014).

Para su diagnóstico se utilizan una serie de pruebas, dentro de las que destacan; marcadores serológicos, 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. 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 en un lapso de 3-6 meses, 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.

“Los marcadores moleculares del VHA se basan en la detección del ARN viral y permiten la detección directa del virus o su caracterización a través del genotipo viral” (Aguilera, et al, 2014). 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). 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.

En el caso de la hepatitis B, es un virus perteneciente a la familia hepadnaviridae, cuenta con una nucleocápside de morfología icosaédrica y una envuelta lipídica. La cápside, contiene el genoma que consiste en una molécula circular de ADN circular bicatenario de 3,2 kb, cuya cadena positiva está parcialmente incompleta en su extremo 3'. Los marcadores moleculares que se utilizan son aquellos basados en la detección del ADN viral como la determinación de la carga viral, el genotipo, las caracterizaciones de las diferentes variantes genómicas, y el ADNccc intrahepático.

La carga viral del VHB, es esencial para caracterizar el estado en que se encontraba la infección, así como para evaluar el riesgo de desarrollo de cirrosis y carcinoma hepatocelular (CHC) al existir una relación directa entre este riesgo y el nivel de carga viral en el momento del inicio del seguimiento (ingreso) o bien con el mantenimiento de niveles altos de replicación durante el mismo. El ADNccc intrahepático, se acumula en el núcleo celular de los hepatocitos, actuando como molde para la transcripción de los genes virales. La buena correlación observada en algunos estudios con los niveles de HBsAg sugiere que la determinación cuantitativa de este antígeno, podría ser una alternativa práctica a la determinación del ADNccc en tejido hepático.

Uno de los aspectos esenciales del VHB es su gran variabilidad genética. Esta hipervariabilidad, especialmente en el gen S es la responsable de la diversidad genética que caracteriza al VHB en genotipos y subtipos. Las técnicas de hibridación reversa (LIPA) también han demostrado ser útiles para el genotipado y además pueden identificar de una manera sencilla las infecciones mixtas. Otras alternativas pueden ser la PCR a tiempo real alelo específica, PCR múltiples genotipo específicas, RFLP y ensayos serológicos, siempre que sean validadas frente a la técnica de referencia.

Para terminar, el virus de la hepatitis C, se caracteriza por una alta tasa de mutaciones debido a que la ARN polimerasa dependiente del virus no posee actividad exonucleasa 3'-5' correctora de errores, lo que se traduce en un incremento de la heterogeneidad del virus en cada ciclo de replicación. En el caso del diagnóstico, 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.

Las pruebas moleculares para VHC, se encuentran la carga viral del VHC, su detección 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. La determinación del genotipo es fundamental en la evaluación del paciente, para la predicción del pronóstico y la planificación del tratamiento. El método de referencia para el genotipado del VHC es la secuenciación directa de las regiones NS5B, E1 o E2 del genoma viral, pero se utiliza poco por su laboriosidad.

Para concluir con el presente trabajo, es importante mencionar que en la actualidad existen múltiples pruebas y técnicas para diagnosticar enfermedades y gracias al avance de la tecnología se pueden encontrar de forma temprana medidas diagnósticas – terapéuticas que permitan a los pacientes un alivio rápido y adecuado de la enfermedad.

Es fundamental que como estudiantes de medicina, conozcamos los aspectos básicos y generales de las presentes pruebas, ya que estas constituyen el pilar base para el diagnóstico de múltiples enfermedades, en las cuales el personal de salud debe de formar parte de los avances y no quedarse en el pasado.

Referencias bibliográficas

- Ospina, S. (2006). "Diagnóstico de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana". Scielo; Colombia
- García, F (2010). "Diagnóstico de laboratorio de la infección por el VIH, del tropismo viral y de las resistencias a los antirretrovirales". Hospital universitario San Cecilio; España.
- Pérez, L. (2000). "Biología molecular del virus de la inmunodeficiencia humana y los recientes progresos en el tratamiento del SIDA". Revista chilena de pediatría; Chile.
- Aguilera, A., Alonso, R., Córdoba, J, & Fuentes, A. (2014). "Diagnóstico microbiológico de las hepatitis víricas". Sociedad española de enfermedades infecciosas; España.