

Universidad Del Sureste

Materia: Biología Molecular de la Clínica

Docente: QFB Hugo Nájera Mijangos

**Ensayo de Diagnóstico molecular de HIV, Hepatitis A,
B, C**

Alumno: José Alfredo Sánchez Álvarez

8° Semestre Grupo “Único”

Comitán de Domínguez

4/12/2020

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE HIV

Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)

Es una variante de PCR, es una técnica de laboratorio comúnmente usada en biología molecular para generar una gran cantidad de copias de ADN, proceso llamado "amplificación". En el RT-PCR, sin embargo, una hebra de ARN es retrotranscriptasa en ADN complementario (ADNc) usando una enzima llamada transcriptasa inversa, y el resultado, se amplifica en un PCR tradicional. En la fase aguda de la infección por VIH, la carga viral es la única prueba que tiene utilizad para determinar si los resultados en las pruebas de detección (por ejemplo, Western Blot) son falsos reactivos o el paciente cursa por etapa aguda de la infección.

Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoabsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un substrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro.

Western blot

El Western blot es la técnica más ampliamente utilizada y consiste en que las proteínas constitutivas del virus se separan por electroforesis y, luego, se transfieren a un papel de nitrocelulosa. Estas proteínas fijadas son expuestas al suero del paciente, en el cual los anticuerpos específicos se unen a las proteínas presentes dando un patrón de bandas, cuya interpretación depende del criterio que se adopte en el laboratorio de acuerdo con lo definido por organismos internacionales. El resultado de la prueba de Western blot se informa como negativo cuando hay ausencia total de bandas; como indeterminado, cuando no cumple los criterios definidos y no es negativo, y positivo cuando cumple los criterios, de acuerdo con el que se haya adoptado. El resultado indeterminado puede deberse a un período inicial de seroconversión o a un falso positivo, sobre todo cuando se trata de una sola banda,

usualmente la p24. Este tipo de hallazgo puede estar en relación con otras enfermedades infecciosas.

Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia indirecta se ha utilizado ampliamente como prueba confirmatoria para la infección por el VIH-1 y lo siguen haciendo laboratorios con amplia experiencia con la prueba. Su desempeño es bueno, pero requiere de personal debidamente entrenado para su lectura y de microscopio de fluorescencia. La inmunofluorescencia indirecta detecta anticuerpos totales empleando células linfoides infectadas con VIH-1 y fijadas a una lámina de vidrio. En esta prueba se utiliza una placa con células infectadas con VIH, a las que se les adiciona el suero del paciente, y la presencia de Ac contra VIH se detecta con Ac anti IgG humano marcado con isotiocianato de fluoresceína. Puede realizarse para Ac IgM, caso en el cual detecta la infección más tempranamente.

Análisis de amplificación de ácido nucleicos (NAT)

Los análisis basados en ácidos nucleicos (Nucleic acid-based tests, NAT), también llamados análisis de amplificación de ácidos nucleicos (nucleic acid amplification tests, NAAT) detectan el virus, ya que capturan porciones del ARN del VIH y las amplifican para facilitar su detección. Pueden dar resultados positivos o negativos (cualitativa), o indicar la cantidad exacta de virus presente en la sangre (cuantitativa). Por su elevado costo, no es una prueba rutinaria, sin embargo, debe considerarse su uso en escenarios para identificar infección reciente o aguda por VIH. El análisis NAT se usa más comúnmente para detectar el VIH en recién nacidos, en casos de violencia sexual y en bancos de sangre. Los resultados de las pruebas de ácido nucleico generalmente se consideran precisos en las etapas tempranas de la infección.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE HEPATITIS A, B, C

ARN del VHA

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). 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

Tomando como base su diversidad genética en la región VP1 del genoma viral, el VHA se clasifica en 6 genotipos (i al vi). Solo 3 de ellos, el i, el ii y el 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.

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 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.

Hepatitis B

Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares del VHB son aquellos basados en la detección del ADN viral como la determinación de la carga viral, el genotipo, la caracterización de las diferentes variantes genómicas, y el ADNccc intrahepático.

Carga viral

En este sentido los ensayos de amplificación por PCR o TMA en tiempo real son los que mejor se ajustan hoy en día a estos requerimientos.

ADNccc intrahepático

Éste se acumula en el núcleo celular de los hepatocitos, actuando como molde para la transcripción de los genes virales.

Genotipo viral

Hasta el momento, se han identificado 10 genotipos diferentes (A-J), que presentan un grado de divergencia genómica superior al 8% a nivel de nucleótidos en el genoma viral completo.

Hepatitis C

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.

La mayoría de las técnicas utilizadas se basan en RT-PCR a tiempo real con sondas fluorescentes. Son rápidas y permiten rangos dinámicos amplios. Otro tipo de técnicas moleculares, como el TMA (Transcription Mediated Amplification) o el bDNA (branched DNA), cuentan con un uso cada vez más limitado.

Genotipado del VHC

El método de referencia para el genotipado del VHC es la secuenciación directa de las regiones NS5B, E1 o E2 del genoma viral, mediante métodos comerciales basados en secuenciación de la región 5' no codificante (Trugene 5'NC HCV Genotyping Kit, Siemens), por hibridación inversa del producto amplificado con sondas genotipo-específicas de la misma región fijadas a un soporte de nitrocelulosa o PCR a tiempo real. La mayoría de los métodos disponibles detectan correctamente los 6 genotipos principales, aunque algunos no logran identificar el subtipo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alonso, R. (2014). Diagnóstico de las hepatitis virales. *Elsevier*, 1-47.

Gajón, M. A. (2013). Métodos de detección del Virus de Inmunodeficiencia Humana. *HEUV*, 1-16.

Icazbalceta, L. V. (2018). Guía para la detección del Virus de la Inmunodeficiencia Humana. *CEN*, 1-27.