



**INNOGENETICS**  
BIOTECHNOLOGY FOR HEALTHCARE



# Tipaje molecular del virus HBV

**INNO-LiPA: herramientas estandarizadas para la detección del virus de la hepatitis B**

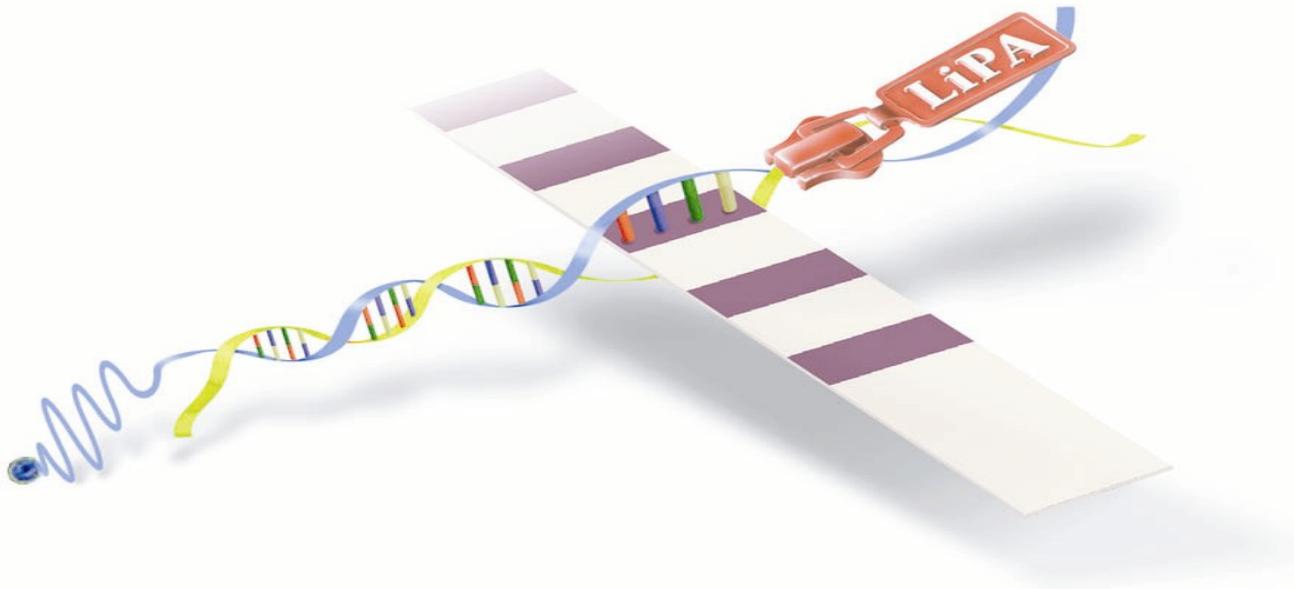
# Índice



- Tecnología LiPA
- Genotipado
  - INNO-LiPA HBV genotyping
  - Procedimiento de ensayo
  - Recomendaciones genotipado
- Resistencias
  - INNO-LiPA HBV DRv2 y v3
  - Procedimiento de ensayo
  - Recomendaciones detección resistencias
- Precore
  - INNO-LiPA HBV PreCore
  - Procedimiento de ensayo



## Descripción de la tecnología



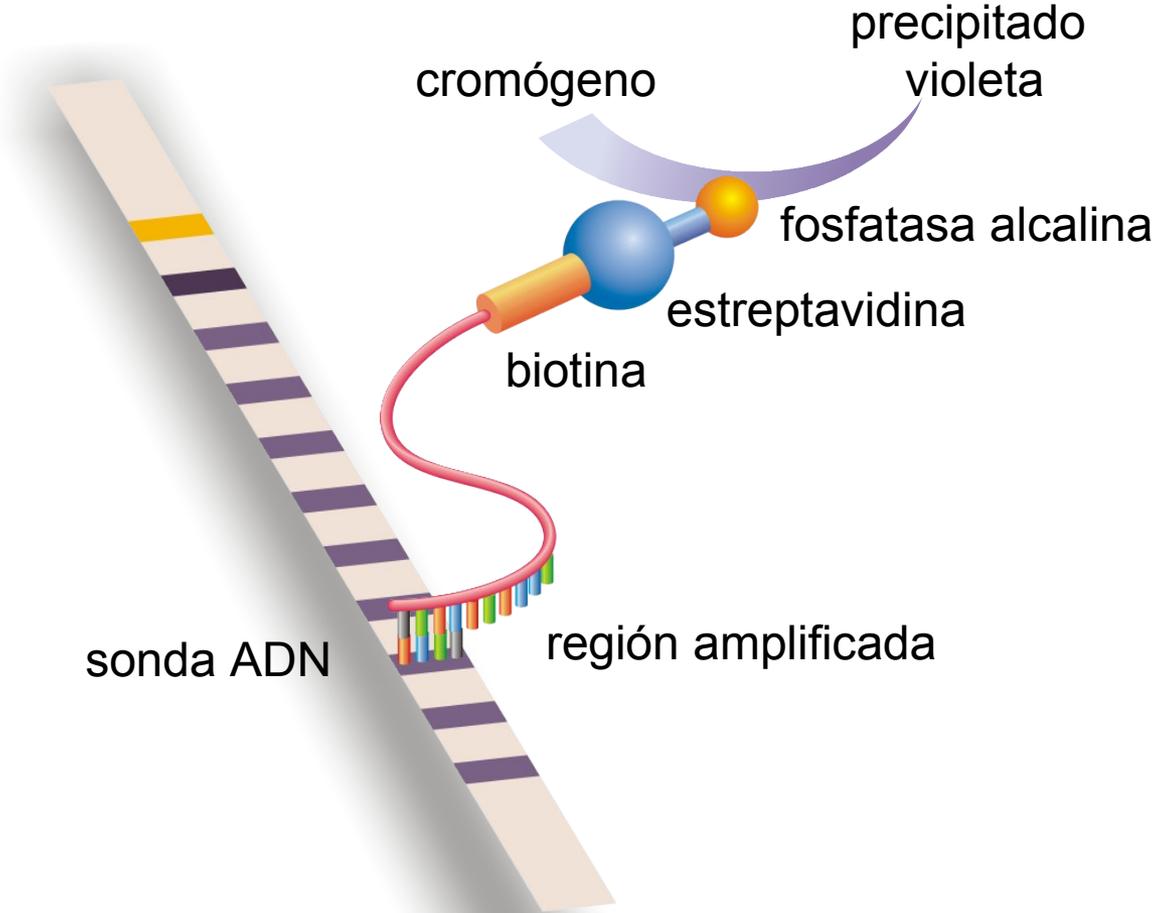
## Ensayo de hibridación reversa en tira de nitrocelulosa

# Qué es el LiPA?

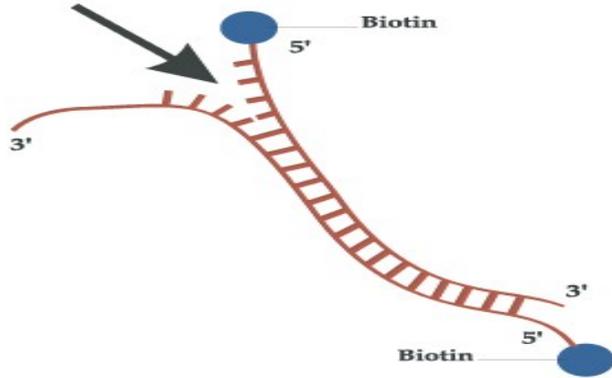


- LiPA es un ensayo de sondas en una tira de nitrocelulosa (**L**ine **P**robe **A**ssay)
- Es un ensayo de hibridación reversa utilizando sondas de oligonucleótidos con una secuencia específica (SSOP reversa)
- Permite un ensayo multiparamétrico

# Tecnología INNO-LiPA



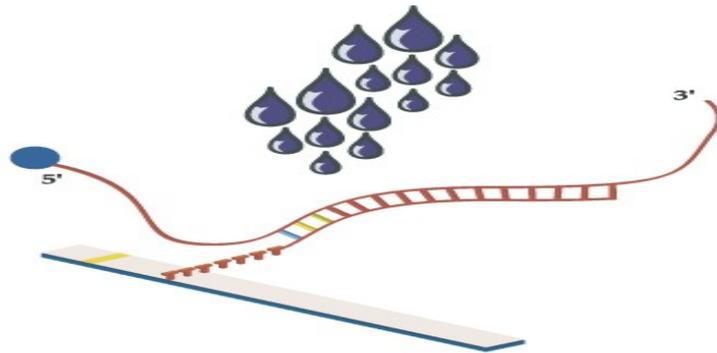
# Denaturation



5 min

Denaturation of amplified biotinylated DNA

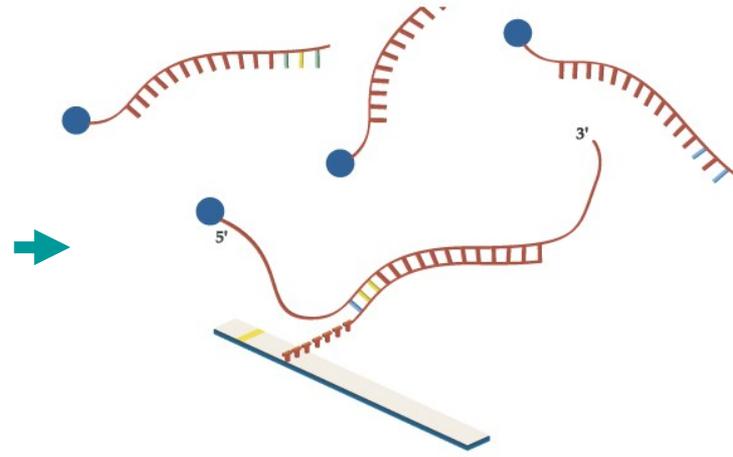
# Stringent wash



30 min

Remove a specific hybridized and unbound DNA

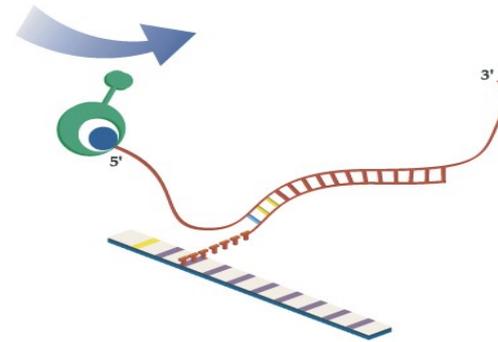
# Hybridization



60 min

Hybridization with specific oligonucleotide probes immobilized as parallel lines on membrane-based strips

# Color development



60 min

Incubation with conjugate and substrate resulting in purple brown precipitate



# Pasos de los equipos INNO-LiPA HBV



## 1.Extracción ADN: equipos de extracción validados y recomendados por INNEX:

QIAamp<sup>®</sup> DNA blood mini kit (Qiagen, Alemania)

High Pure PCR Template Preparation kit (Roche Diagnostics)

## 2.Amplificación regiones diana:

**INNO-LiPA HBV Genotyping:** Dominios B y C de la polimerasa del HBV (342 pb)

**INNO-LiPA HBV DR v2/v3\*:** Región de la polimerasa de HBV (867 pb)

**INNO-LiPA HBV PreCore\*:** Región precore (326 pb)

## 3.Ensayo LiPA: detección de secuencias específicas

✓ Manual: HS, SW: 49°C +/- 0.5°C

✓ *Auto-LiPA 48:* utilizar el programa HBVV1

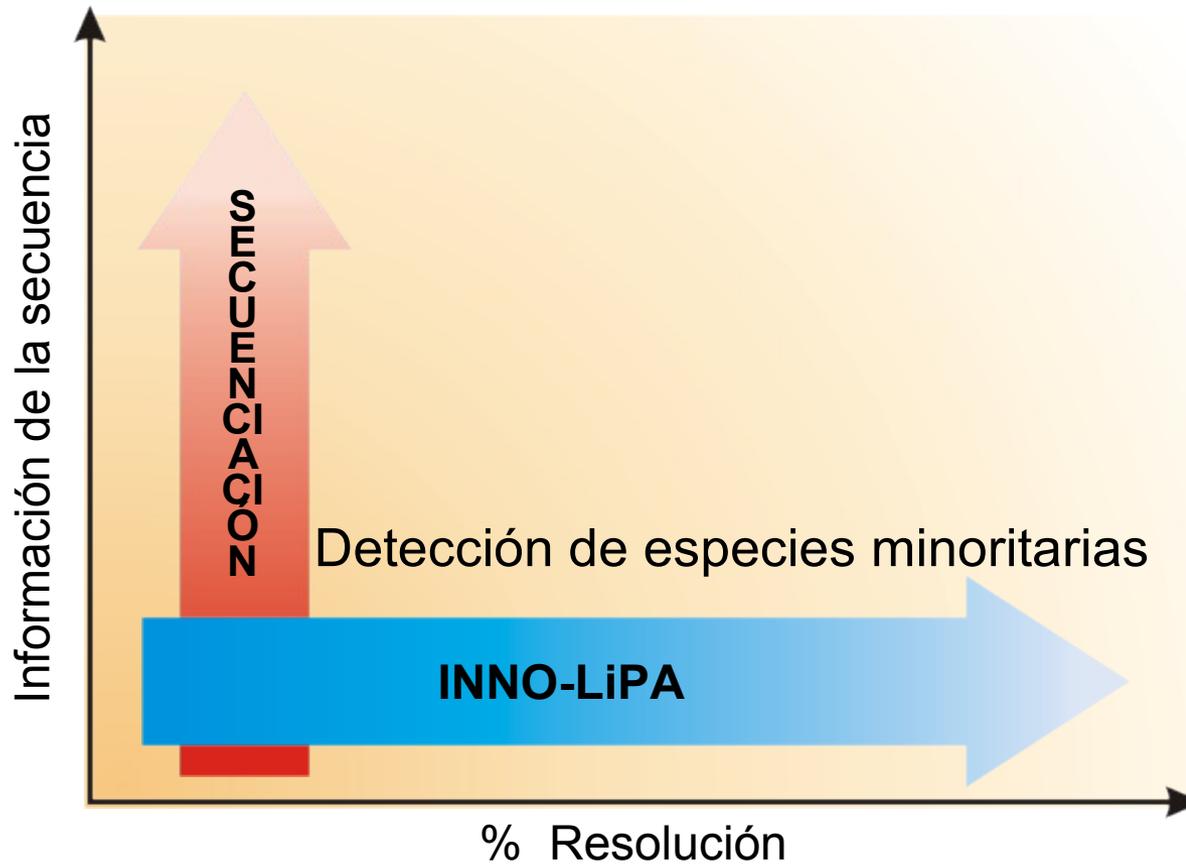
\* Solo para ser usado en investigación. No utilizar en procedimientos de diagnóstico.

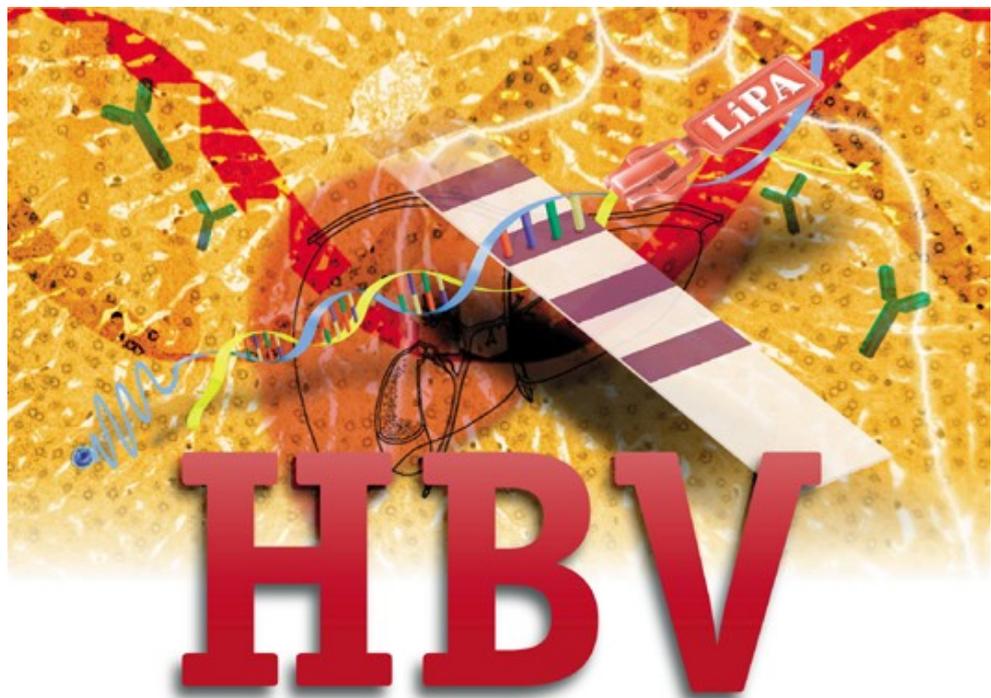


# Compatibilidades LiPAs HBV

- Utilizan la misma tecnología que los otros LiPAs de INNX
- Todos los LiPAs de HBV
  - el amplicón de INNO-LiPA HBV DR v2 puede ser usado para INNO-LiPA HBV Genotyping
  - utilizan el mismo programa en el *Auto-LiPA 48* (HBVV1)
  - utilizan el mismo programa manual
  - tienen los mismos reactivos LiPA

# LiPA en comparación con la secuenciación: sensibilidad





## Genotipado

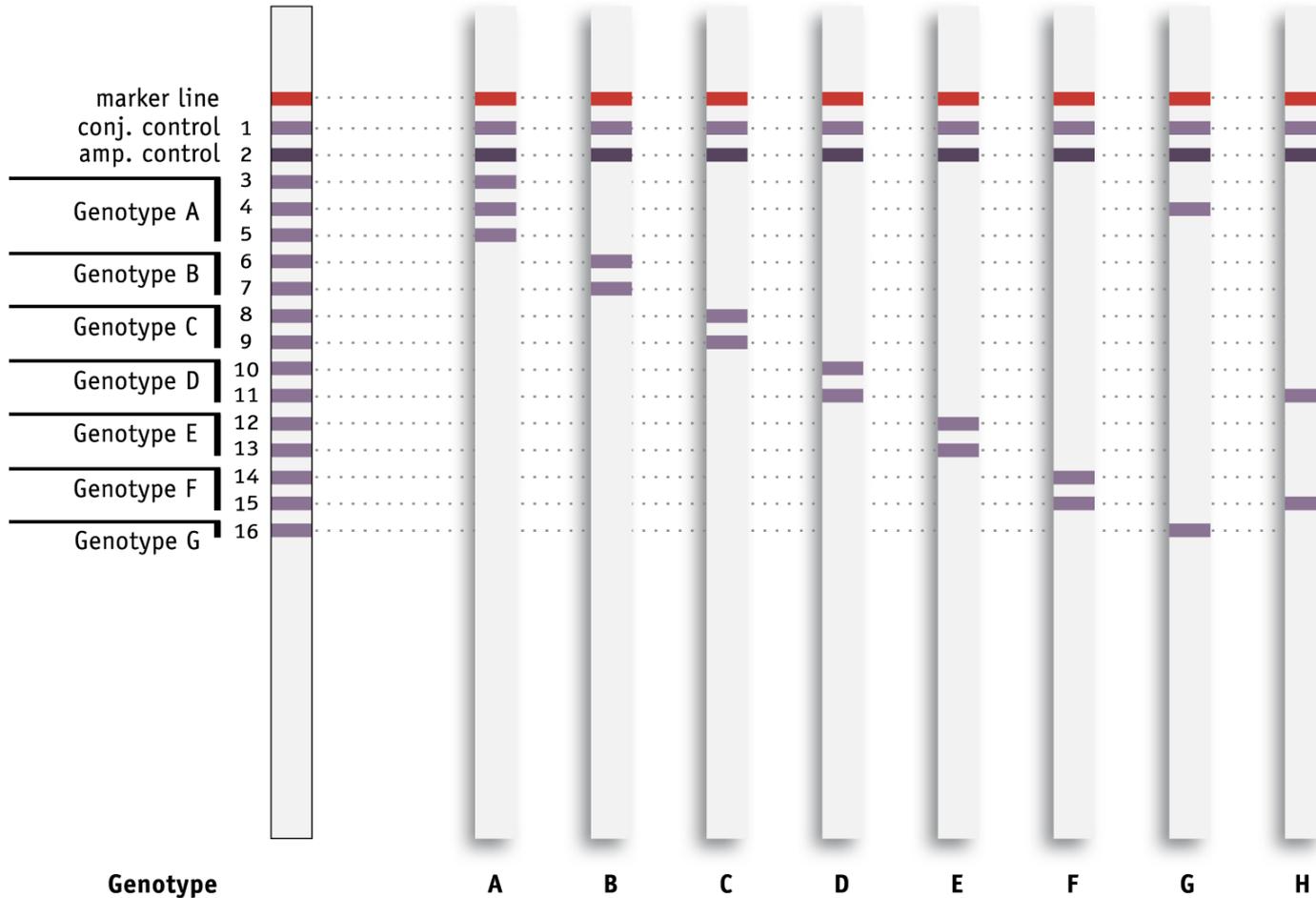
INNO-LiPA HBV Genotyping (20T, CE)



## Descripción del producto

- Incluye 14 sondas específicas de genotipo optimizadas
- Estas sondas cubren secuencias específicas de los dominios B y C del gen de la polimerasa del HBV
- La tira INNO-LiPA está compuesta de estas 14 sondas

# Ejemplos de tiras del equipo INNO-LiPA HBV Genotyping



**El genotipo H viene definido por la reactividad de las sondas 11 y 15.**

# INNO-LiPA HBV Genotyping



- Posicionamiento
  - Identificación acurada de los genotipos A, B, C, D, E, F, G y H del virus de la hepatitis B
  - Especial ventaja en detectar infecciones múltiples en comparación con otras técnicas
  - Permite una selección óptima de los fármacos antes de iniciar la terapia



# INNO-LiPA HBV Genotyping

## Ventajas



- Ventaja en la detección de infecciones múltiples
  - La tecnología LiPA detecta hasta un 16.3% más de infecciones múltiples que la secuenciación directa, confirmado por análisis clonal<sup>1</sup>
    - Implicaciones en la selección del fármaco para la terapia
- Detección de genotipos muy sensible
  - El LiPA es más sensible que la PCR-RFLP (98.8% vs 65.0%)<sup>2</sup>
  - El LiPA es más sensible que la secuenciación<sup>2</sup>

1 Chen BF et al. J Med Virol 2004;74:536-42

2 Lok ASF et al. J Clin Microbiol 2002;40:3729-34

# INNO-LiPA HBV Genotyping

## Características de rendimiento



- Características de rendimiento<sup>1</sup>
  - Evaluaciones internas y externas de la sensibilidad han revelado un 100% de sensibilidad en las 425 muestras amplificadas
  - El LiPA detectó un 4.6% más de coinfecciones en comparación con la secuenciación
  - Límite de detección más bajo: 375 copias/ml ~ 100 UI/ml
- Se dispone de un protocolo de PCR single-round<sup>2</sup> (RUO)
  - El protocolo single-round para genotipar es sensible y reproducible. Demuestra una eficiencia mejorada y es ideal para ser usado en laboratorios que detectan HBV de forma rutinaria

1 Aplicable sólo al equipo con marca CE

2 Qutub MO. J Clin Virol. 2006;37(3):218-21.

# Publicaciones recientes



- INNO-LiPA HBV Genotyping
  - Jardí R, Buti M et al. J Hepatol. 2008;49(5):695-701.
  - Hou J et al. J Med Virol. 2007;79(8):1055-63.
  - Davidson et al. Vox Sang 2005;88:87-92.
  - Halfon P et al. J Viral Hepat 2006;13:329-35.
  - Pena-Lopez MJ et Al. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2005;23:415-8.
  - Yuen MF et al. J Hepatol. 2004;41:119-25.
  - Chen BF et al. J Med Virol. 2004;74:536-42.



# Recomendaciones genotipado HBV

# Recomendaciones genotipado HBV



- “Guidelines” alemanas (Junio 2007)
  - Factores asociados a la respuesta a interferón
    - HBV genotipo A
    - Carga viral baja ( $<2 \times 10^5$  IU/ml)
    - Nivel de ALT aumentado como mínimo el doble
    - Tratamiento pacientes nunca tratados (“naïve”)
  - <http://www.kompetenznetz-hepatitis.de/>
- “Guidelines” canadienses (Junio 2007)
  - Conocer el genotipo puede ayudar a escoger la terapia antiviral adecuada.

## Recomendación 13:

- Los clínicos deberían tener acceso al genotipo de HBV ya que esta información puede ayudar a seleccionar la terapia antiviral y la predicción de respuesta a terapias basadas en interferón (**Clinicians should have access to HBV genotype testing, which may help in the selection of antiviral therapy and prediction of response with IFN-based therapies**)
  - <http://www.hepatology.ca/cm/FileLib/hepB.pdf>

# Recomendaciones genotipado HBV

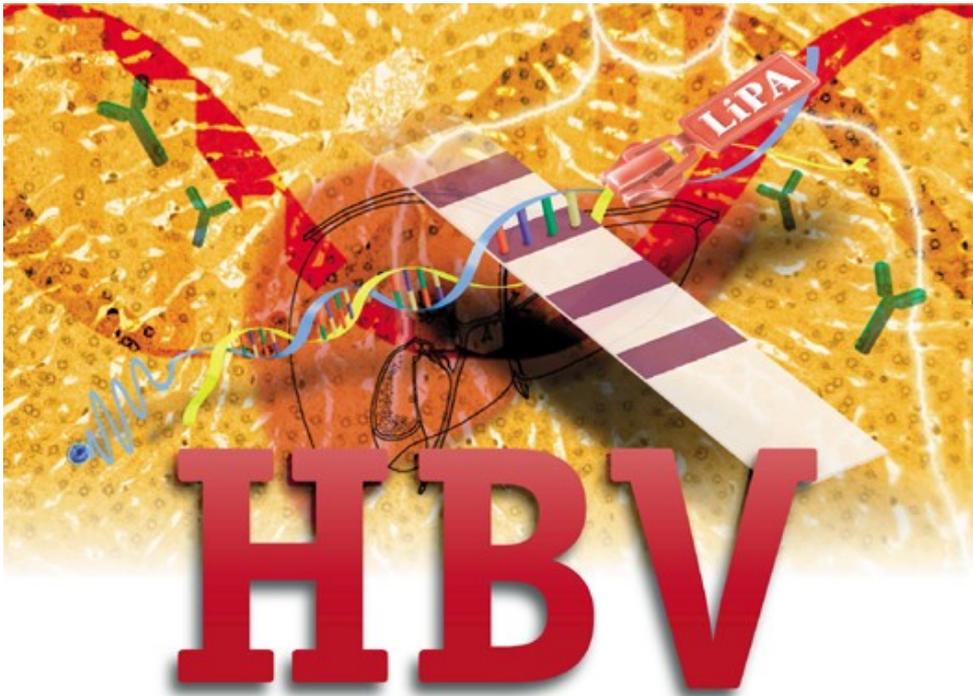


- “Guidelines” europeas EASL (Octubre 2008)\*
  - Se ha observado que los genotipos A y B están asociados a una mejor respuesta a interferón alfa que los genotipos C y D

## Recomendación B1

- B: La calidad de la evidencia es moderada
  - Investigaciones futuras pueden tener un impacto en el conocimiento actual y pueden cambiar esta recomendación
- 1: Fuerte recomendación

\*EASL guidelines: Management of chronic hepatitis B. J Hepatol. 2009;50(2):243.

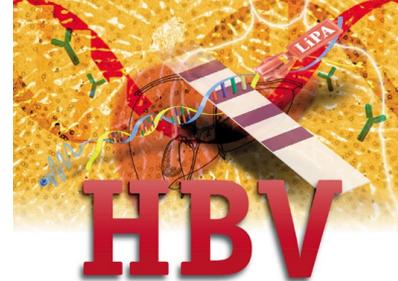


## **Detección de resistencias**

INNO-LiPA HBV DR v2 (20T, CE)

INNO-LiPA HBV DR v3 (20T, RUO)

# Resistencias HBV



INNO-LiPA HBV DR v2 / v3\*

Detección de mutaciones que confieren resistencia a lamivudina, adefovir dipivoxil, entecavir, emtricitabina, tenofovir y telbuvudina.

Minimizar el fallo del tratamiento, maximizar la supresión del HBV: seleccionar LiPA

\* Solo para ser usado en investigación. No utilizar en procedimientos de diagnóstico.

# Posicionamiento



- Detección temprana y simultánea del virus salvaje de hepatitis B y de las mutaciones asociadas a resistencias
- Permite iniciar rápidamente la terapia adecuada para todos los tratamientos aprobados



**Whom are you  
going to bet on?**

# Descripción del producto



- DR v2
  - Un total de 60 sondas han sido optimizadas para las mutaciones clave en los codones 80, 173, 180, 181, 204 y 236
- DR v3\*
  - Un total de 110 sondas han sido optimizadas para las mutaciones clave en los codones 184, 194, 202, 233 y 250
- Estas sondas cubren el virus salvaje y los mutantes conocidos para todos los genotipos conocidos, incluyendo polimorfismos silenciosos
- La tira DR v2 está compuesta por 32 bandas de sondas (60 sondas)
- La tira DR v3 está compuesta por 22 bandas de sondas (110 sondas)
  - La tira V3\* se suministra con el equipo INNO-LiPA HBV DR v2

\* Solo para ser usado en investigación. No utilizar en procedimientos de diagnóstico.

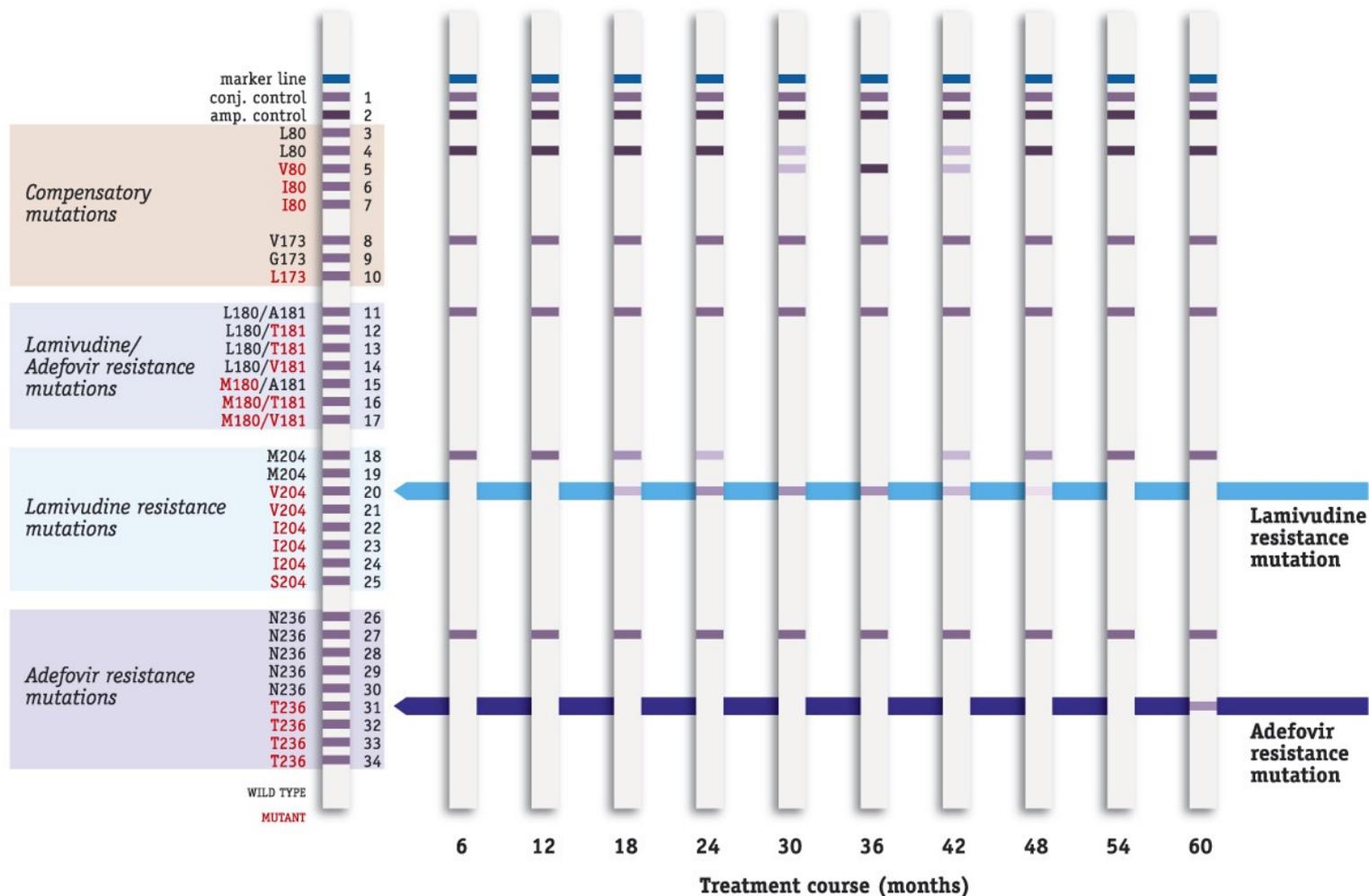
# Mutaciones asociadas a resistencias y INNO-LiPA HBV DR



Principales fármacos antivirales aprobados o en ensayos clínicos avanzados	Mutaciones asociadas a resistencias	Incluídas en el equipo INNO-LiPA HBV DR v2	Incluídas en el equipo INNO-LiPA HBV DR v3
lamivudina	L180M, M204V/I/S	Si	No
adefovir dipivoxil	A181V/T, N236T	Si	No
Predisposición adefovir dipivoxil	I233V	No	Si
tenofovir	A194T	No	Si
entecavir	T184S/C/G/A/I/L/F/M, S202G/C/I, M250V/I/L	No	Si
telbivudina	M204I	Si	No
emtricitabina	M204V/I	Si	No

# INNO-LiPA HBV DR v2 / v3\*

## Monitorización del paciente



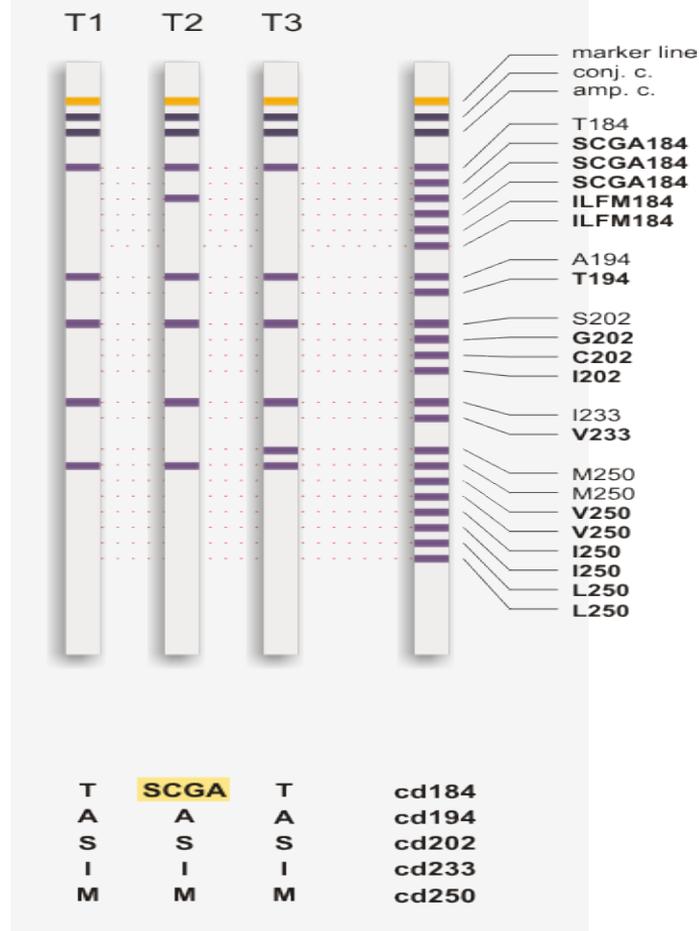
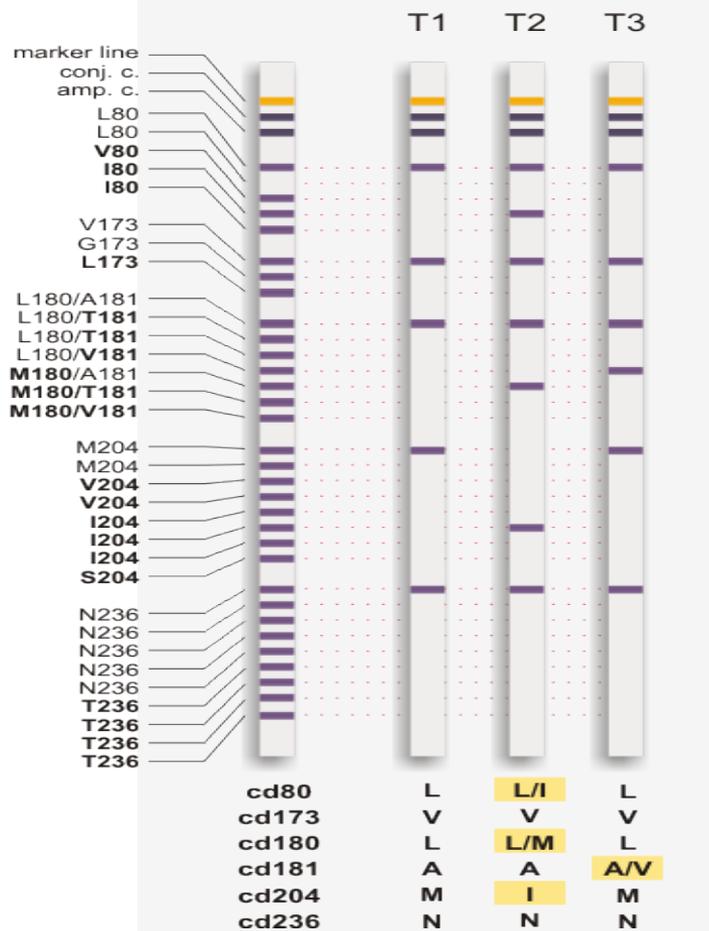
\*RUO

# Ejemplos de muestras de pacientes analizadas con los equipos INNO-LiPA HBV DR v2 and v3



Tira INNO-LiPA HBV DR v2

Tira INNO-LiPA HBV DR v3



# INNO-LiPA HBV DRv2/v3

## Ventajas



- Ventaja en la detección de mutaciones
  - La tecnología LiPA detecta las mutaciones de resistencia a fármacos entre **2 y 6 meses antes que la secuenciación directa**, confirmado con muestras de seguimiento<sup>1</sup>
    - Permite una detección precoz de la aparición de resistencias y en consecuencia un comienzo más rápido de la terapia alternativa<sup>1</sup>
- Alta sensibilidad en la detección de mutaciones
  - La hibridación reversa permite la detección antes que la secuenciación,
  - y antes que haya un rebrote en la carga viral y en las ALT<sup>2</sup>
  - La posibilidad de detectar una determinada mutación en un determinado momento es **2.8 veces superior** con LiPA que con la secuenciación (hazard ratio 2.8, 95% C.I. [1.79;4.41]; p<0.0001)<sup>3</sup>
- Detecta todas las mutaciones clínicamente relevantes para lamivudina, adefovir, entecavir y telbuvudina

1Hussain M et al. J Clin Microbiol 2006:1094-97. 2 Lok ASF et al. J Clin Microbiol 2002;40:3729-34. 3 Libbrecht et al J Clin Microbiol 2007, 45:3935-41

# INNO-LiPA HBV DR v2

## Características de rendimiento



- Características de rendimiento
  - Evaluaciones internas y externas de la sensibilidad han revelado un 100% de sensibilidad en las 136 muestras amplificadas
  - El LiPA proporcionó un 20.8% más de información en comparación con la secuenciación a nivel de codón, verificado por análisis clonal
  - Limite de detección más bajo: 990 copias/ml ~ 200 UI/ml

# Publicaciones recientes



- INNO-LiPA HBV DR v2 / v3
  - Jardí R, Buti M et al. J Clin Microbiol. 2009;47:485-8.
  - Degertekin B et al. J Hepatol. 2009;50:42-8.
  - Libbrecht et al. 2007;45:3935-41.
  - Hussain M et al. J Clin Microbiol. 2006;44:1094-7.
  - Osiowy C et al. J Clin Microbiol. 2006;44:1994-7.
  - Alvarado-Esquivel C et al. J Antimicrob Chemother. 2006;57:221-3.
  - Sertoz RY et al. J Chemother. 2005;17:514-20.



# Recomendaciones detección resistencias HBV

# Recomendaciones para la detección de resistencias HBV



- “Guidelines” alemanas (Junio 2007)
  - Las resistencias a fármacos deberían ser detectadas lo más pronto posible para permitir un ajuste rápido de la terapia
  - <http://www.kompetenznetz-hepatitis.de/>
- “Guidelines” canadienses (Junio 2007)
  - Conocer las mutaciones es esencial para determinar el tratamiento más apropiado **Recomendación 25:**
    - Los clínicos tienen que tener acceso al ensayo genético de virus mutantes. Esto va a ser usado para diferenciar entre no adherencia y aparición de un virus resistente. El rebrote viral debería ser confirmado por ensayos de resistencias antes de usar un nuevo fármaco. **(Clinicians must have access to genetic testing for mutant virus. This is used to differentiate between non-adherence and emergence of resistance virus. Viral breakthrough should be assessed by resistance testing before any new agents are used)**
  - <http://www.hepatology.ca/cm/FileLib/hepB.pdf>

# Guidelines europeas EASL\*



- Las resistencias deberían ser identificadas lo más pronto posible antes del rebrote clínico (incremento ALT) a través de la monitorización del DNA del virus, y a ser posible la identificación del patrón de mutaciones debería ser usado para adaptar las estrategias terapéuticas. **(Resistance should be identified as early as possible before clinical breakthrough (increased ALT) by means of HBV DNA monitoring, and if possible identification of the pattern of resistance mutations should be used to adapt therapeutic strategies)**
- Además, estudios clínicos y virológicos han demostrado el beneficio de una adaptación precoz del tratamiento, tan pronto como los niveles de carga viral se incrementan [52,63]
- Recomendación A1
  - A: la calidad de la evidencia es alta
    - Muy poco probable que investigaciones futuras cambien el punto de vista respecto a esta recomendación y a sus efectos
  - 1: fuerte recomendación

\*EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B. J Hepatol. 2009;50(2):243.



**PreCore**

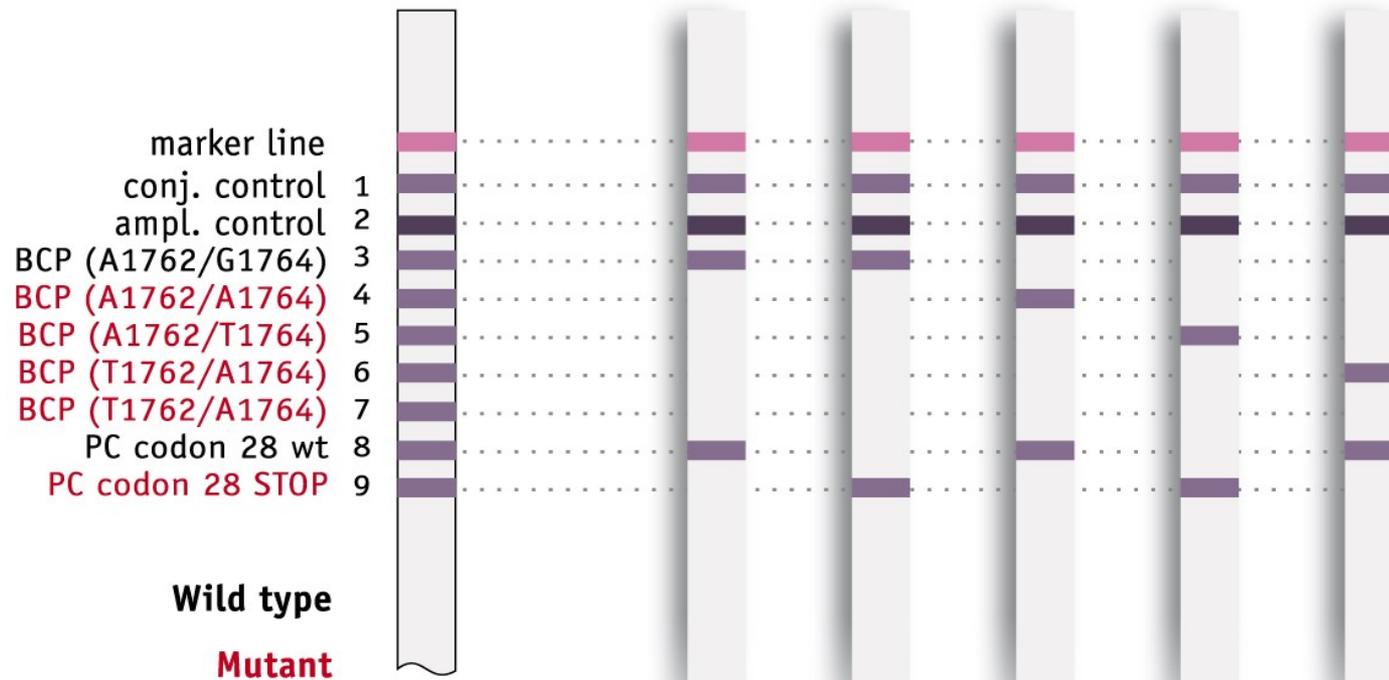
**INNO-LiPA HBV PreCore (20T, RUO)**

# Mutantes en la región PreCore del HBV



- Mutaciones en el promotor PreCore
  - Las más importantes son A1762T y G1764A/T
  - Disminuyen la expresión de HBeAg
- Mutaciones PreCore
  - La mutación más importante se presenta en el codón 28, cuando se transforma en un codón de parada
  - no hay expresión HBeAg

# Ejemplos de tiras INNO-LiPA HBV PreCore



# Mutaciones en la región Precore



- Existe un alto porcentaje de poblaciones mixtas (virus salvaje/virus mutado)
  - Pacientes positivos para HBeAg pueden tener poblaciones mixtas salvajes y mutantes
  - No serán detectadas por secuenciación, mientras si que lo son con el LiPA



**Gracias por su atención !**