



Ensayos de Genotipificación de Resistencia a Anti-retrovirales



8 min.



Los ensayos genotípicos de resistencia son comúnmente usados desde hace varios años y están ampliamente evaluados en la bibliografía para detectar a los aislamientos de HIV-1 resistentes. Representan una de las primeras aplicaciones clínicas de la secuenciación de genomas virales en el campo de las enfermedades infecciosas. Numerosos estudios demuestran que la presencia de mutaciones de resistencia es un factor predictivo independiente en la efectividad de un tratamiento antiviral.



Dr. Daniel Pirola
Jefe Área Infectología Molecular
Génesis-MANLAB



E-mail: docencia@genesis-manlab.com.ar



Numerosas drogas antivirales se encuentran aprobadas para el tratamiento de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1) (Tabla 1). Los grupos más antiguos son: inhibidores de la transcriptasa reversa, nucleotídicos/nucleosídicos (NRTI), inhibidores de la proteasa e inhibidores de la transcriptasa reversa no nucleosídicos (NNRTI) e inhibidores de la proteasa (PI). Recientemente, se ha descrito un nuevo grupo de drogas que inhiben a la enzima integrasa. En los últimos 15 años la combinación de tres o más drogas de al menos dos clases de antivirales ha logrado prolongar la supresión de la multiplicación viral y permitir la reconstitución del sistema inmunológico. Adicionalmente a las dificultades del tratamiento caracterizado por los efectos adversos, costo, adherencia, la inhibición incompleta de la multiplicación viral es causa y consecuencia de la aparición de resistencia al tratamiento antiviral. Estas

variantes virales (cuasiespecies) resistentes se generan a lo largo del tratamiento por la elevada tasa de mutación que posee el virus.



Tabla 1: Anti-retrovirales actualmente en uso

1. Inhibidores no-nucleosídicos de la Transcriptasa Reversa (NNRTI)

delavirdine (DLV)
efavirenz (EFV)
etravirine (ETR)
nevirapine (NVP)

2. Inhibidores nucleosídicos de la Transcriptasa Reversa (NRTI)

lamivudine (3TC)
abacavir (ABC)
zidovudine (AZT)
stavudine (D4T)
didanosine (DDI)

emtricitabine (TDF)

3. Inhibidores de la Proteasa (PI)

atazanavir (ATV)
darunavir (DRV)
fosamprenavir (FPV)
indinavir (IDV)
lopinavir (LPV)
nelfinavir (NFV)
saquinavir (SQV)
tipranavir (TPV)

4. Inhibidores de la Integrasa (II)

Raltegravir

Los ensayos genotípicos de resistencia son comúnmente usados desde hace varios años y están ampliamente evaluados en la bibliografía para detectar a los aislamientos de HIV-1 resistentes. Representan una de las primeras aplicaciones clínicas de la secuenciación de genomas virales en el campo de las enfermedades infecciosas. Numerosos estudios demuestran que la presencia de

mutaciones de resistencia es un factor predictivo independiente en la efectividad de un tratamiento antiviral.

La resistencia puede ser transmitida de individuo a individuo. Se conoce que en muchas regiones un porcentaje alto de nuevas infecciones están asociadas a la transmisión de virus resistentes a una o más drogas antivirales.

La estrategia más clásica para investigar la resistencia es la detección fenotípica de la resistencia basada en pruebas biológicas denominadas antivirogramas, en analogía a las pruebas de susceptibilidad a antibióticos que se emplea para las bacterias. Los ensayos fenotípicos incluyen el cultivo del virus en presencia de diluciones del antiviral. Los resultados se expresan habitualmente como IC50 o IC90 (concentración inhibitoria 50 o 90 % respectivamente). Esta metodología es laboriosa y requiere adaptar la cepa del paciente a las condiciones de cultivo in vitro. Con el fin de mejorar este ensayo se han desarrollado

estrategias de clonado parcial de genes virales de la cepa en virus adaptados a cultivo.

Los ensayos para genotificar la resistencia están basados en la secuenciación del genoma del virus en las regiones específicas de los genes de la RT (transcriptasa reversa) (codones 40 a 247) y Pr (Proteasa) (codones 1 a 99) y en identificar las mutaciones frecuentemente observadas en las cepas resistentes, las cuales se describen en la Tabla 2.



Tabla 2: Mutaciones frecuentemente asociadas a resistencia:

En la columna 1 de posición se identifica al aminoácido consenso conjuntamente con la posición del mismo y en la columna 2 se identifica el aminoácido que reemplaza al original para los tres grupos de antivirales más importantes. (Según la OMS, 2009)

BIO-RAD

Dengue

panbio
diagnósticos



Test Rápidos

- Dengue Duo Cassette* (Para diferenciar entre infección primaria y secundaria de Dengue)
- Dengue NS1 Antigen Strip* (Para diagnóstico temprano en fase aguda)

ELISAs

- Dengue Early ELISA* (Para diagnóstico temprano de infección activa de Dengue)
- Dengue IgM Capture ELISA* (Para diagnóstico de infección activa de Dengue)
- Dengue IgG Capture ELISA* (Para diagnóstico de infección secundaria)
- Dengue IgG Indirect ELISA* (Para detección de infección anterior activa)
- Dengue Duo IgM Capture IgG Capture ELISA* (Para diferenciar entre infección primaria y secundaria de Dengue)
- Platelia Dengue NS1 Ag (Para diagnóstico temprano en fase aguda)

*CONSULTAR DISPONIBILIDAD

BIODIAGNOSTICO

Biodiagnostico S.A.

Av. Ing. Huergo 1437 P.B. "I" - C1107APB - Buenos Aires - Argentina - Tel./Fax: (+54 11) 4300-9090 - info@biodiagnostico.com.ar

www.biodiagnostico.com.ar

NRTI

M41	L
K65	R
D67	N, G, E
T69	D, Ins
K70	R, E
L74	V, I
V75	M, T, A, S
F77	L
Y115	F
F116	Y
Q151	M
M184	V, I
L210	W
T215	Y, F, I, S, C, D, V, E
K219	Q, E, N, R

NNRTI

L100	I
K101	E, P
K103	N, S
V106	M, A
V179	F
Y181	C, I, V
Y188	L, H, C
G190	A, S, E
P225	H
M230	L

PI

L23	I
L24	I
D30	N
V32	I
M46	I, L
I47	V, A
G48	V, M
I50	V, L
F53	L, Y
I54	V, L, M, A, T, S
G73	S, T, C, A
L76	V
V82	A, T, F, S, C, M, L
N83	D
I84	V, A, C
85	V
N88	D, S
L90	M

La evolución de la resistencia a antivirales del virus HIV-1 en un individuo depende de la generación de variantes genéticas del virus (cuasiespecies) y en la selección de estas variantes resistentes a drogas durante el tratamiento antiviral. Esta variabilidad genética del virus es resultante

de la incapacidad de la RT de verificar la secuencia sintetizada durante la replicación viral y se magnifica por la elevada velocidad de multiplicación del virus.

Desde el punto de vista virológico la resistencia a antivirales es entonces mediada por mutaciones en las proteínas propias del virus relacionadas con los sitios de acción de las drogas antivirales.

El proceso de identificar mutaciones de resistencia utilizando pruebas genotípicas es complejo y está basado en tres tipos de datos: correlación entre mutaciones y susceptibilidad in vitro frente a antivirales, correlación entre mutaciones y evolución virológica y clínica de los pacientes a partir de los cuales se obtuvieron esas mutaciones y por último, correlación entre mutaciones y la respuesta a nuevos regímenes antivirales administrados luego de un fracaso terapéutico.

La genotipificación de la resistencia está recomendada en numerosas normas internacionales. Las situaciones más relevantes incluyen:

- Falla terapéutica en el primer régimen o respuesta subóptima
- Falla terapéutica múltiple
- Infección en el embarazo cuando no se ha conseguido la supresión de la multiplicación viral
- En caso de infección aguda cuando se sospecha infección a partir de individuos multitratados o con tratamiento y respuesta subóptima
- Niños cuyas madres poseían cargas virales elevadas aún en presencia de tratamiento
- Al inicio del primer tratamiento para conocer la situación basal

Los ensayos genotípicos de resistencia tienen ventajas respecto a los ensayos fenotípicos:

- son ensayos de secuenciación, relativamente simples con sistemas automáticos, rápidos, poco costosos, permiten obtener datos de mutaciones primarias y secundarias y puede ser realizado aún en casos de muestras con baja carga viral (mayor de 1000 copias/mL).
- permiten detectar mutaciones presentes en mezclas fenotípicas en número bajo que son insuficientes para afectar a los ensayos

de sensibilidad a antivirales in vitro.

Como desventaja, podemos mencionar que son una medida indirecta de la susceptibilidad a los anti retrovirales, que solo pueden asociar el efecto cuando la mutación ha sido previamente descrita en la bibliografía, que no permite evaluar el efecto cooperativo de mutaciones nuevas y requiere un análisis experto basado en algoritmos de interpretación.

No todas las mutaciones están asociadas a resistencia o también es posible que no hayan sido descritas hasta el momento como asociadas a una menor sensibilidad por lo que la clasificación final de estas mutaciones es: no asociadas a resistencia, posiblemente asociadas a resistencia y asociadas a resistencia.

En los casos de posible resistencia las mutaciones detectadas se asocian a una menor respuesta virológica solo en algunos pacientes pero no en todos.

Existen numerosos Comités Internacionales de expertos que han elaborado conclusiones de asociaciones mutación-resistencia. Estas normas están basadas en datos de estudios clínicos con seguimiento virológico de sensibilidad in vitro que son aquellos de mayor peso y datos basados en estudios exclusivamente in vitro y datos obtenidos por extrapolación de antivirales similares.

Nos enorgullece una vez más informar que esta práctica se está realizando en Génesis-MANLAB brindando tiempos de respuesta (15 días) acordes a las necesidades de tratamiento del paciente.

