

Introducció de la seqüenciació massiva per fer el test de resistències als antiretrovirals del VIH-1 amb el seqüenciador GS Junior

El VIH-1 virus de la immunodeficiència humana tipus 1 com tots els virus d'ARN es replica molt ràpidament i en la seva replicació es produeixen còpies errònies donant lloc a mutacions que permet al virus sobreviure als organismes que parasiten.

El tractament amb fàrmacs antiretrovirals s'ha dirigit a la reducció de la càrrega viral plasmàtica del VIH-1 per sota dels nivells de detecció, no obstant això, i malgrat que en la actualitat es disposa de fàrmacs altament eficaços, un nombre significatiu de pacients en tractament antiretroviral de gran activitat (TARGA) poden presenciar fracàs terapèutic evidenciat per la càrrega viral detectable en plasma (fracàs virològic), falla immunològica (disminució o augment no satisfactori de recompte de cèl·lules CD4+) i/o fracàs clínic produint-se una progressió de la infecció pel VIH definida per l'aparició de malalties oportunistes.

Existeixen diferents factors que permeten explicar l'existència d'aquest fracàs, per exemple la falta d'adherència al tractament, la baixa absorció d'alguna de les drogues (farmacocinètica variable: forma en què el medicament s'absorbeix, es distribueix, es descompon i s'elimina del cos) i la resistència a fàrmacs antiretrovirals que continua sent un dels factors de fracàs terapèutic d'importància fonamental en el maneig clínic del pacient infectat per VIH.

En general, s'ha de sospitar la presència de resistència farmacològica quan els nivells de càrrega viral comencen a augmentar (0,5 log), o si es fan detectables en mesuraments repetits quan prèviament eren indetectables.

La seqüenciació és el mètode genotípic de referència per a comprovar la presència de mutacions associades a la resistència a fàrmacs antirretrovirals.

Els assajos de seqüenciació comercials més utilitzats són TRUGENE™ HIV-1 Genotyping Test de Siemens i ViroSeq™ HIV genotyping system de Abbott Diagnostics.

Tots dos mètodes deriven del mètode de Sanger segons el qual la polimerització de l'ADN comença per un encebador (petit oligonucleòtid) complementari d'una part del fragment d'ADN que es vol seqüenciar, els productes de les reaccions de seqüenciació es sotmeten a una electroforesi i les bandes que s'obtenen (cada una representa una de les bases A,G C i T)

Catlab Informa

són llegides pel seqüenciador, la seqüència obtinguda es compara amb la seqüència de referència del virus salvatge mitjançant algorismes informàtics com el de la Universitat d' Stanford (<http://hivdb.stanford.edu/>) o el de la Societat internacional de la SIDA (<http://www.iasusa.org/>).

Al servei de Biologia molecular de Catlab hem utilitzat els dos assajos comercials, actualment i des de febrer del 2011 fem servir TRUGENETM HIV-1 Genotyping Test, del qual estem molt satisfets, però que malauradament deixarem d'utilitzar aviat ja que Siemens ha deixat de produir aquests reactius.

Així doncs, partir de febrer del 2016 (mitjans/ finals) el servei de Biologia molecular de Catlab substituirà TRUGENETM HIV-1 Genotyping Test per una nova tecnologia, la seqüenciació massiva, per fer el test de resistència als antiretrovirals.

Encara que aquesta nova tecnologia suposi un repte pel departament, creiem que val la pena l'esforç ja que ens aportarà una sèrie de avantatges respecte a la tècnica utilitzada actualment.

Fins ara, amb els mètodes de resistències convencionals només es podien determinar resistències en la proteasa (Pro) i la transcriptasa reversa (RT), la detecció de resistències en la integrasa (INT) s'havia de fer per separat amb un altre kit suposant un cost addicional.

Amb la seqüenciació massiva es determinen les resistències de les tres regions de manera integrada i en un sol test.

Una altre avantatja de la seqüenciació massiva es que es determina automàticament el subtipat del virus del VIH-1 una informació molt apreciada pels internistes ja que encara que el subtipat predominant sigui el subtipat B, la prevalença d'infeccions per VIH-1 no B s'ha incrementat al nostre país degut a l'augment de la immigració provinent d'àrees endèmiques.

Per últim i no per això menys important es que la seqüenciació massiva permet la detecció de mutacions de quasiespècies víriques que representen el 1% de la població vírica, mentre que cap dels mètodes genotípics convencionals assegura la detecció de totes les variants o quasiespècies víriques que infecten a un pacient, sols detecten una variant si representa més del 20 % del total de la població vírica.

El llindar de detecció de l'1% representa una millora en la caracterització de la població vírica promovent la identificació de mutacions de resistència addicionals i permetent així millorar les eines de diagnòstic genotípic.

Catlab Informa

A part de tot l'exposat anteriorment, aquesta nova tecnologia ens obre les portes per poder realitzar en un futur altres proves genètiques associades a diferents malalties amb aquesta nova eina.



GS Junior

Bibliografia

Jeffrey A. Johnson et al. Sensitive Testing Demonstrates a High Prevalence of Transmitted Drug Resistance among Conventionally Genotyped Wildtype HIV-1 Infections. 16th Intl HIV Drug Resistance Workshop, June 12-16, 2007, Barbados

Evelyn Stelzl et al. Human immunodeficiency virus type 1 drug resistance testing: Evaluation of a new ultra-deep sequencing-based protocol and comparison with the TRUGENE HIV-1 Genotyping Kit. *Journal of virological methods*. August 2011.

Erali, M., Page, S., Reimer, L.G., Hillyard, D.R., 2001. Human immunodeficiency virus type 1 drug resistance testing: a comparison of three sequence-based methods. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2157–2165.

Monica Heger. Study Finds Roche's NGS-Based HIV Assay comparable to TruGene; Company Expects 2014 CEIVD. January 30, 2013

Sofiane Mohamed, Guillaume Penaranda, Dimitri Gonzalez, Claire Camus, Hacène Khiri, Ronan Boulme, Chalom Sayada, Patrick Philibert, Daniel Olive and Philippe Halfon, Comparison of ultra-deep versus Sanger sequencing detection of minority mutations on the HIV-1 drug resistance interpretations after virological failure. *AIDS* 2014, 28:1315 –1324.

Àngels Ramos

Biologia Molecular

CATLAB

Tel. 93.748.56.00 - ext. 35020

aramos@catlab.cat

www.catlab.cat