

Testes de Genotipagem do HIV: Aplicação na Prática

Simone Tenore

Escola Paulista de Medicina - UNIFESP

CRT DST AID/SP

Declaração de conflitos de interesses

- Membro do Comitê Técnico Assessor para TARV de adultos e adolescentes com infecção pelo HIV
- Membro da Câmara Técnica de SP para autorização de TARV
- Recebi auxílio para aulas e congressos da farmacêutica ViiV

Teste de genotipagem

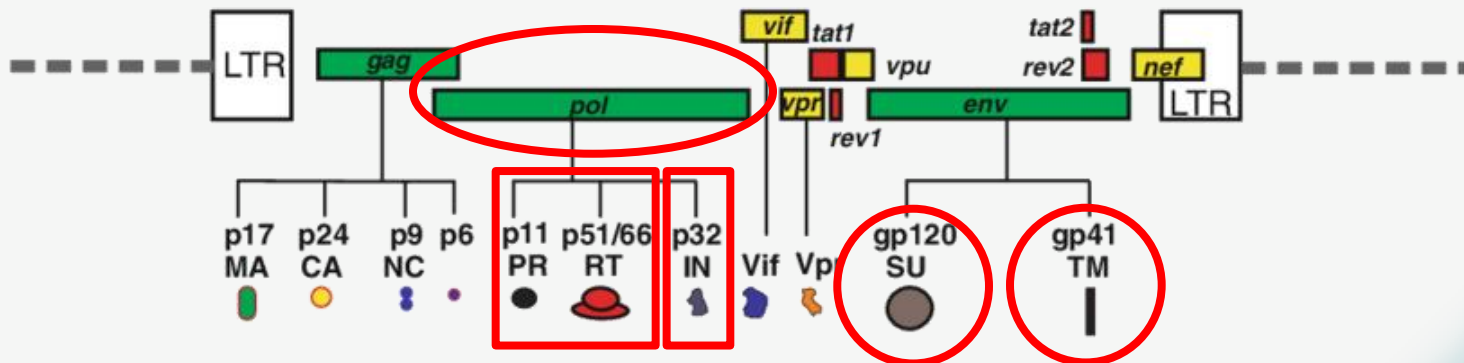
Ferramenta de detecção de resistência aos antirretrovirais

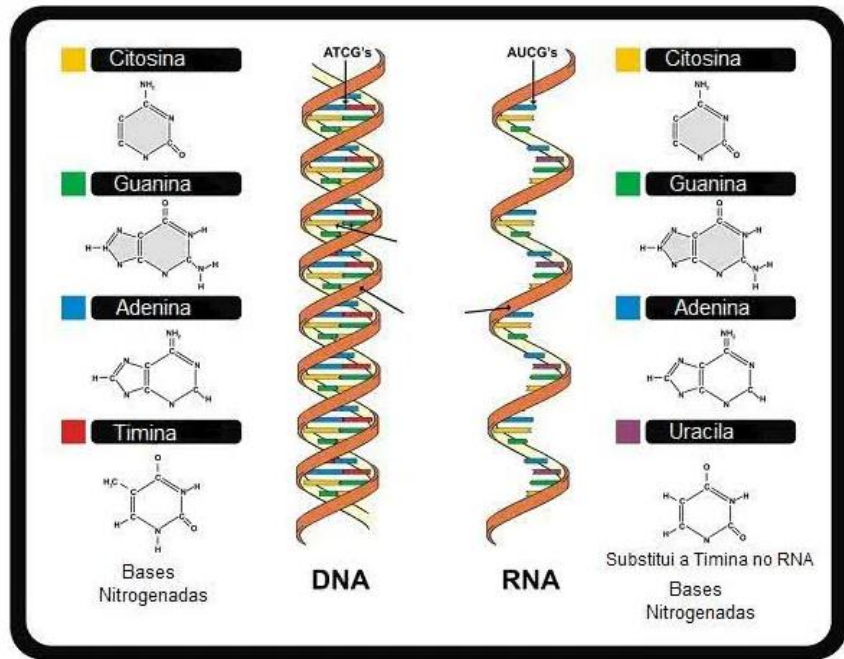
- identificação de linhagem virais circulantes no organismo que apresentam mutações em seu genoma associadas à resistências aos antirretrovirais.

Teste de resistência genotípica

- Sequenciamento de porções de interesse do genoma viral e comparação com cepa de referência (selvagem)
- Detecção de variações que podem ou não se relacionar a resistência aos ARV

HIV-1 provirus





Efeitos de uma mudança no nucleotídeo

Mudança nucleotídeo (mutação)



Mudança na sequência de AA de uma proteína



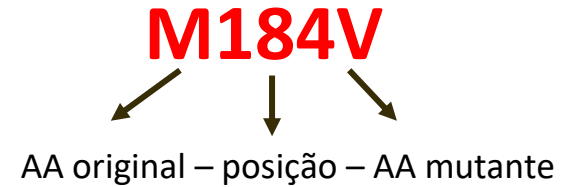
Mudança na estrutura/função de uma proteína (ex PR o RT)



Alteração na habilidade do medicamento em inibir a enzima alvo = resistência

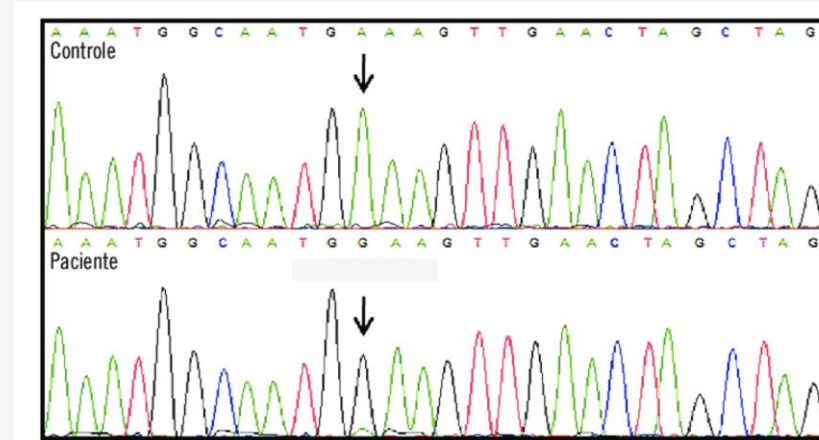
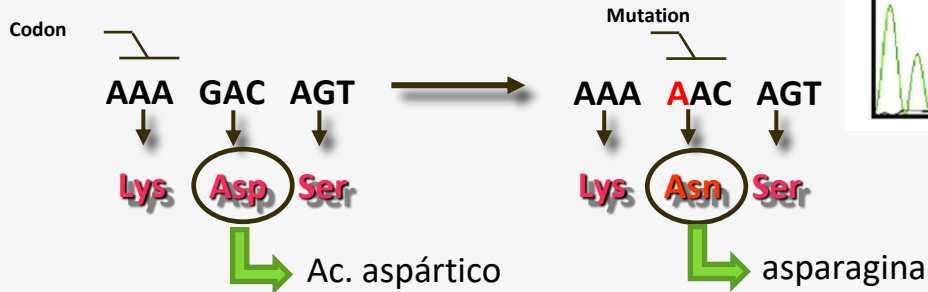
Tabela 19. Aminoácidos e seus códigos de três e uma letras e os diferentes tripletes de nucleotídeos que os codificam

Aminoácido	Código de 3 letras	Código de 1 letra	Nucleotídeos
Alanina	Ala	A	GCT GCC GCA GCG
Arginina	Arg	R	CGT CGC CGA CGG AGA AGG
Asparagina	Asn	N	AAT AAC
Ácido aspártico	Asp	D	GAT GAC
Cisteína	Cys	C	TGT TGC
Ácido glutâmico	Glu	E	GAA GAG
Glutamina	Gln	Q	CAA CAG
Glicina	Gly	G	GGT GGC GGA GGG
Histidina	His	H	TAC CAC
Isoleucina	Ile	I	ATT ATC ATA
Leucina	Leu	L	TTA TTG CTT CTC CTA CTG
Lisina	Lic	K	AAA AAG
Metionina	Met	M	ATG
Fenilalanina	Phe	F	TTT TTC
Prolina	Pro	P	CCT CCC CCA CCG
Serina	Ser	S	TCT TCC TCA TCG AGT AGC
Treonina	Thr	T	ACT ACC ACA ACG
Triptofano	Trp	W	TGG
Tirosina	Tyr	Y	TAT TAC
Valina	Val	V	GTT GTC GTA GTG
Códon de terminação	Stop		TAA TAG TGA



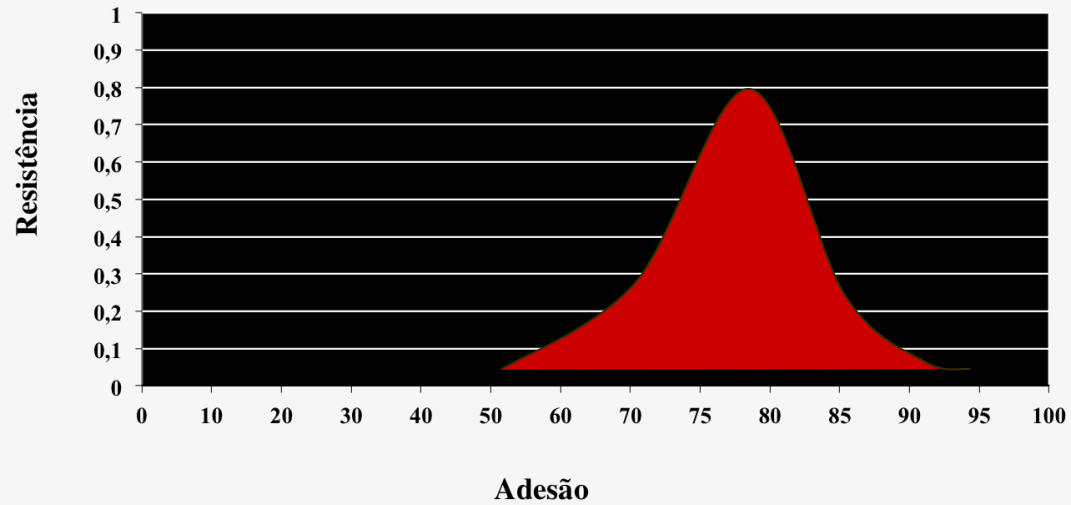
Ensaio de resistência genotípica

- Sequenciamento genômico das regiões da TR, protease (*pol*), integrase, gp41 (T-20) e V3 da gp 120 (MVC)
- Detecta e reporta variações na sequência destes genes conhecidos ou suspeitos de causar resistência a determinados ARV



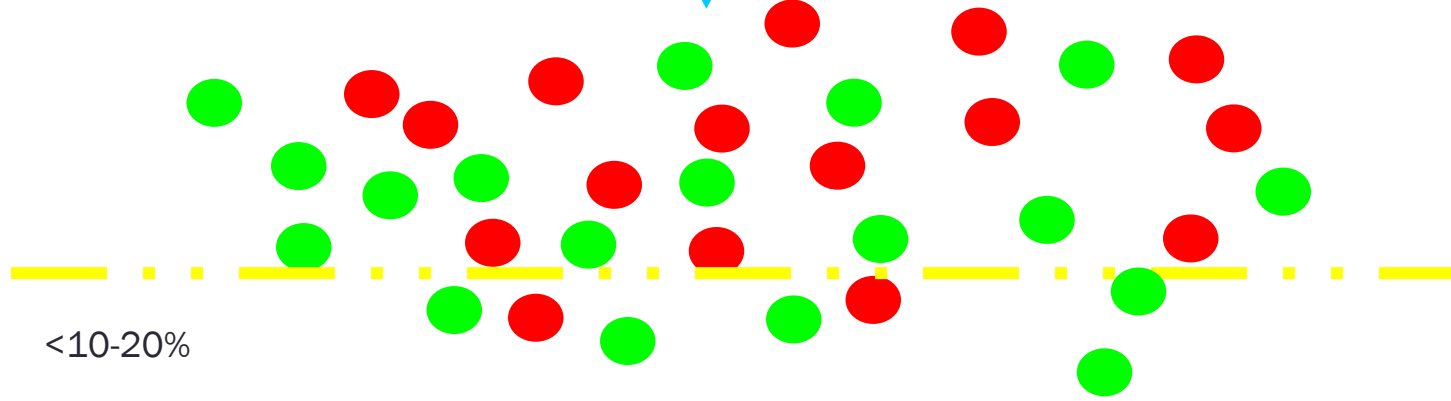
Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. 56.
10.5935/1676-2444.20200011.

Relação entre adesão e resistência



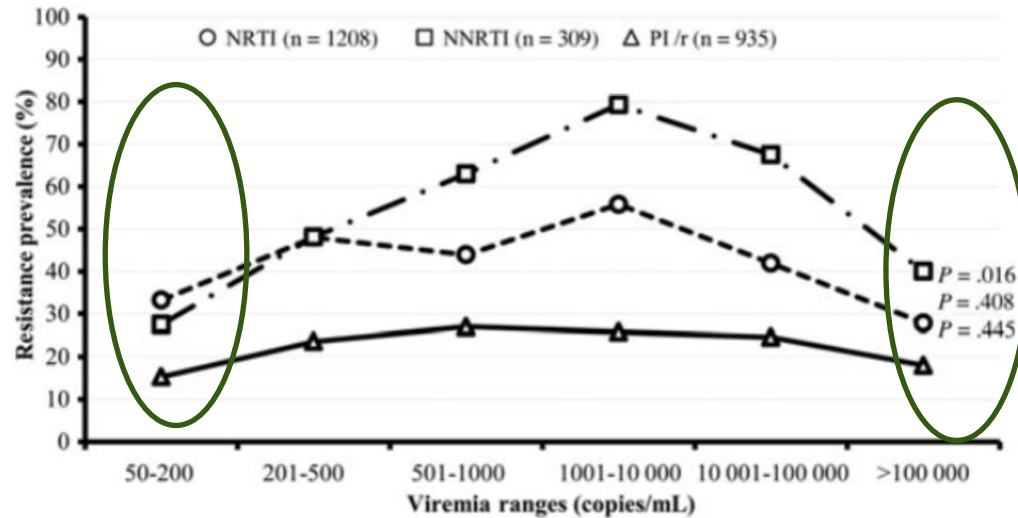
● Vírus resistentes
● Vírus selvagem

Pressão
seletiva
dos
ARV



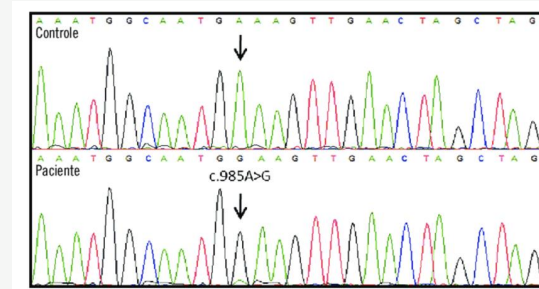
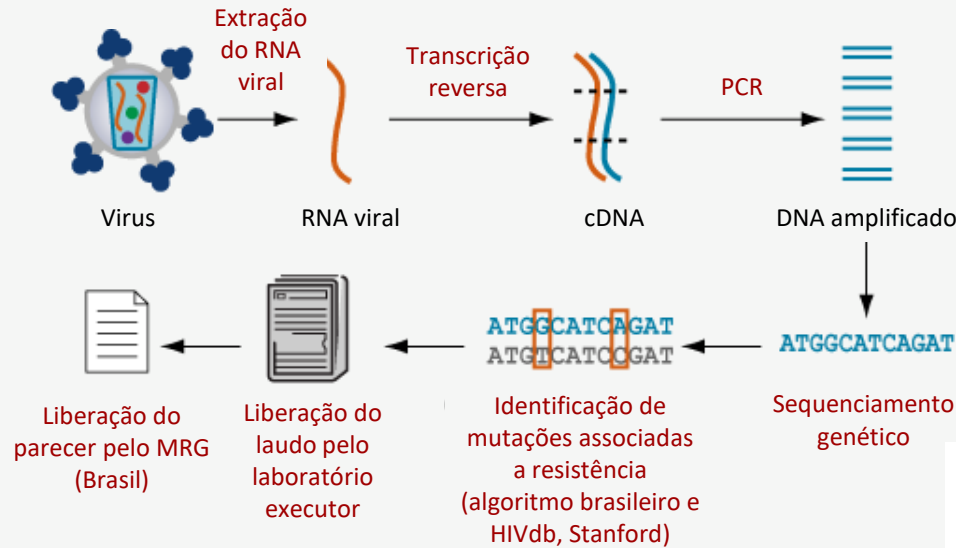
<10-20%

Detecção de mutações de Resistência



NRTI	196	123	82	283	315	209
NNRTI	40	27	27	87	83	45
PI/r	150	106	63	209	240	167

Genotipagem convencional (protease/RT), integrase e gp41



IAS–USA Drug Resistance Mutations Group

Special Contribution

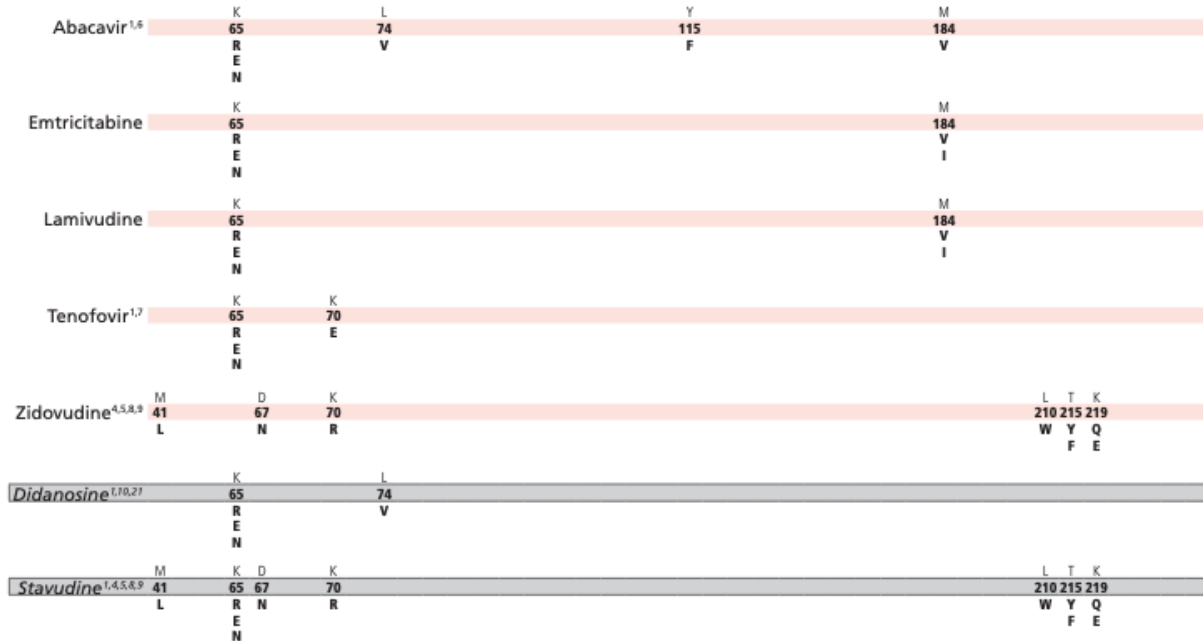
2022 Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1

Annemarie M. Wensing, MD, PhD; Vincent Calvez, MD, PhD; Francesca Ceccherini-Silberstein, PhD; Charlotte Charpentier, PharmD, PhD; Huldrych F. Günthard, MD; Roger Paredes, MD, PhD; Robert W. Shafer, MD; Douglas D. Richman, MD

Volume **30** Issue **4** October/November
2022

www.iasusa.org

Mutations in the Reverse Transcriptase Gene Associated With Resistance to Reverse Transcriptase Inhibitors

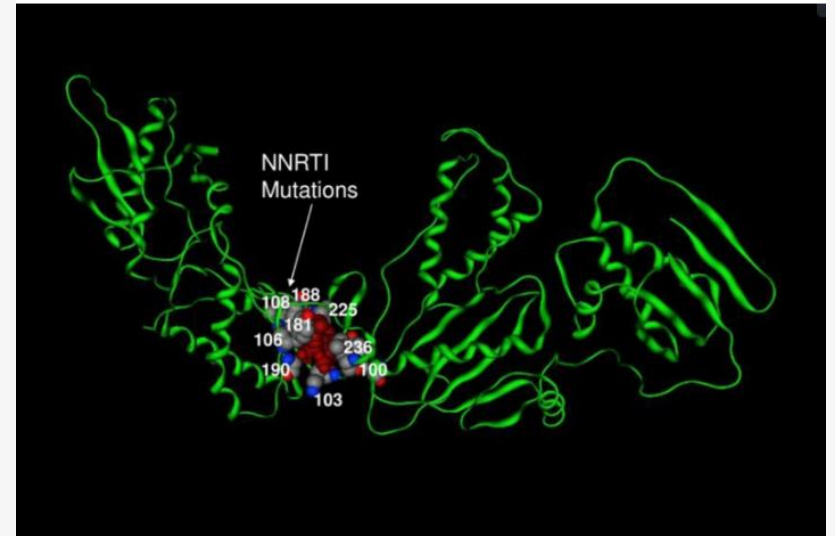
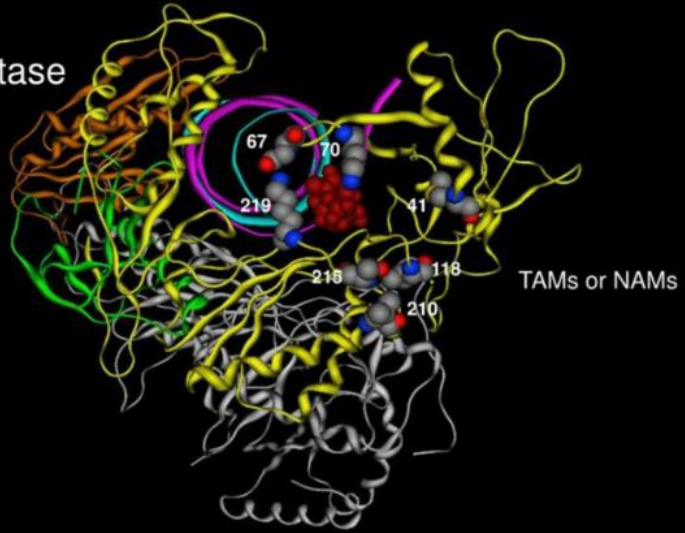


Mutations in the Integrase Gene Associated With Resistance to Integrase Strand Transfer Inhibitors

MUTATIONS IN THE INTEGRASE GENE ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO INTEGRASE STRAND TRANSFER INHIBITORS²⁵

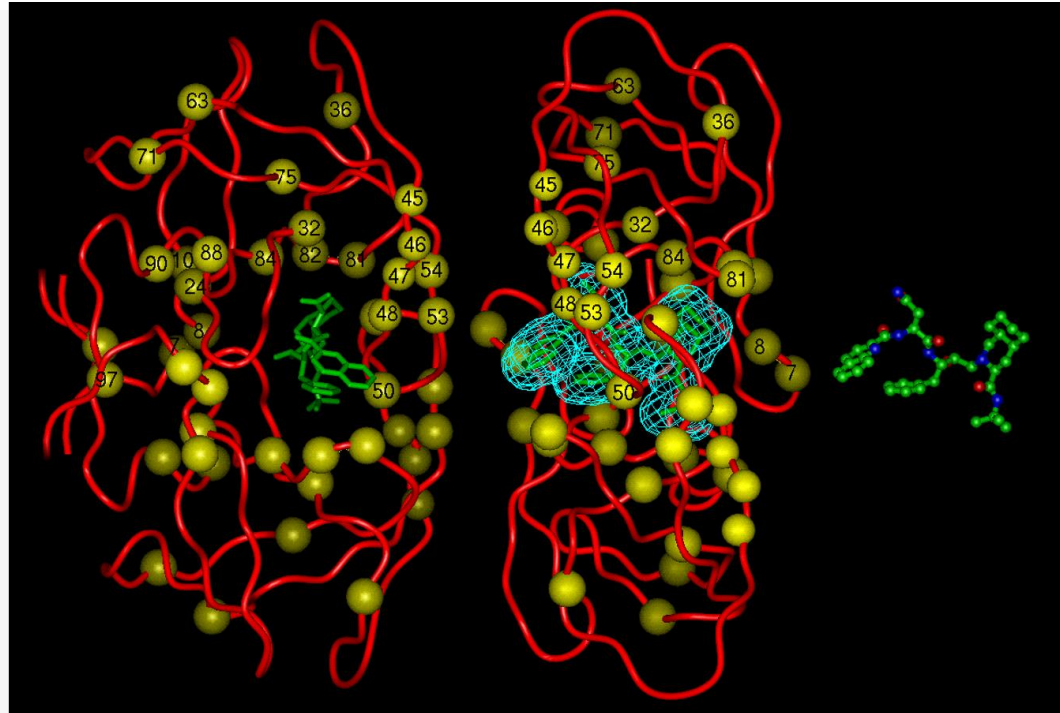
Inhibitor	66	74	92	97	118	121	138	140	143	147	148	153	155	263
Bictegravir ²⁶					G 118 R		E 138 K	G 140 S			Q 148 H			R 263 K
Cabotegravir ²⁷	T 66 K				G 118 R		E 138 A K T	G 140 A C R S			Q 148 H K R	S 153 F Y	N 155 H	R 263 K
Dolutegravir ²⁸					G 118 R	F 121 Y	E 138 A K T	G 140 A S			Q 148 H K R		N 155 H	R 263 K
Elvitegravir ²⁹	T 66 I A K		E 92 Q G	T 97 A		F 121 Y				S 147 G	Q 148 H K R		N 155 H	R 263 K
Raltegravir ³⁰		L 74 M	E 92 Q	T 97 A		F 121 Y	E 138 A K	G 140 A S	Y 143 R H C		Q 148 H K R		N 155 H	R 263 K

Reverse Transcriptase



Atazanavir +/- ritonavir ¹⁸	L 10 F	K 20 T	L 24 I	V 32 I	L 33 F	M 46 I L	G 48 V	I 50 L	F 53 L Y	I 54 L V M T A S	G 73 C S T A	V 82 A	I 84 V	I 85 V	N 88 S	L 90 M
---	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	-------------------	--------------	--------------	-------------------	---------------------------------------	-----------------------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------

Darunavir/ ritonavir ¹⁹	V 11 I	V 32 I	L 33 F	I 47 V	I 50 V	I 54 M L	T 74 P	L 76 V	I 84 V	L 89 V
---------------------------------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	-------------------	--------------	--------------	--------------	--------------

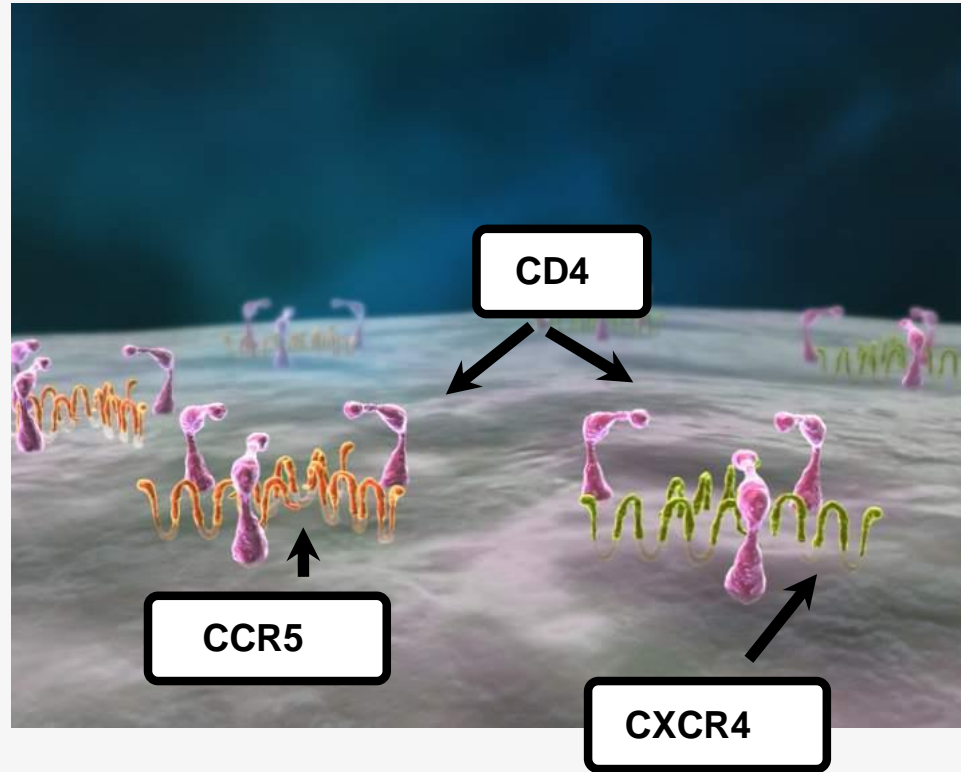


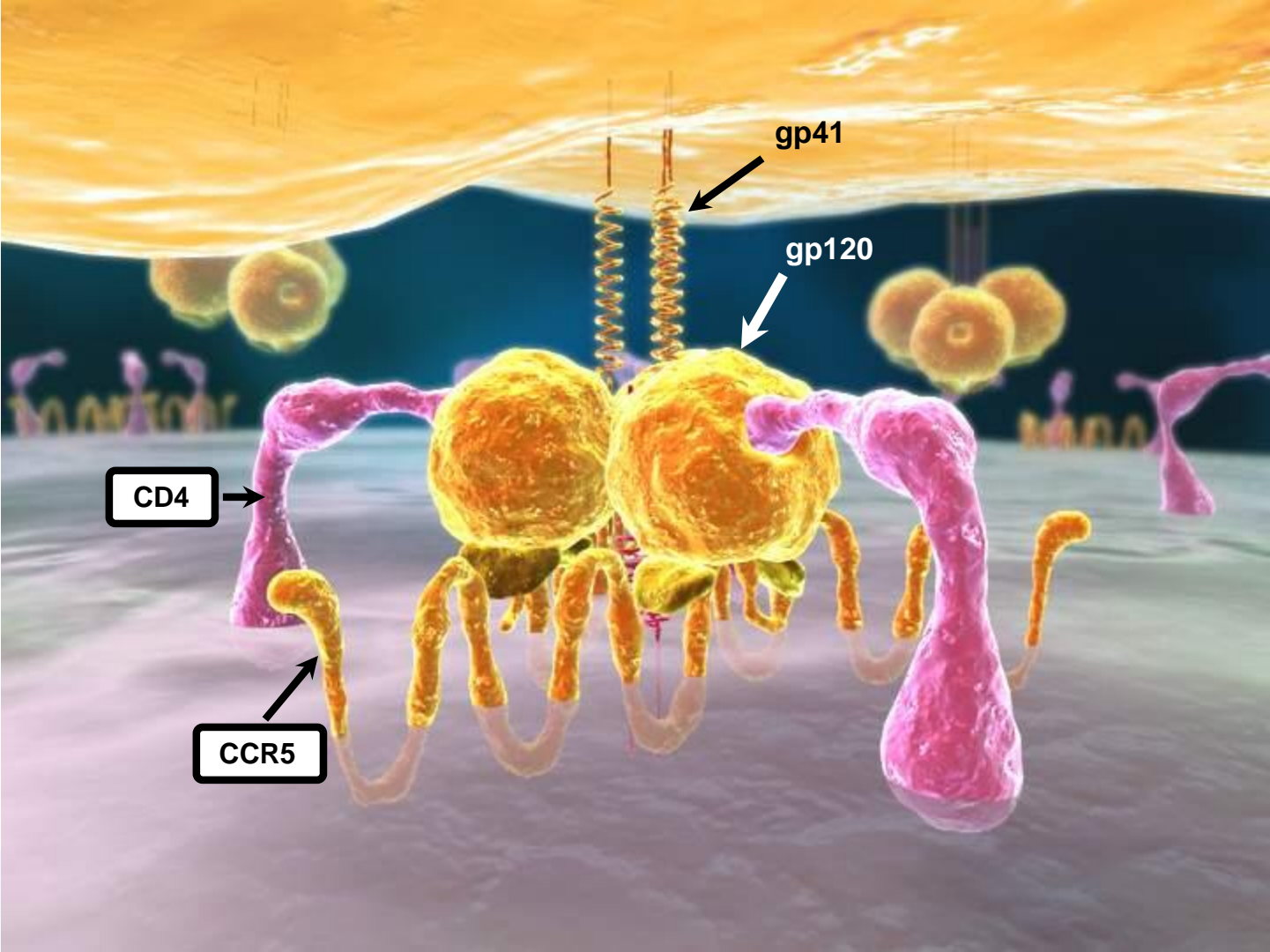


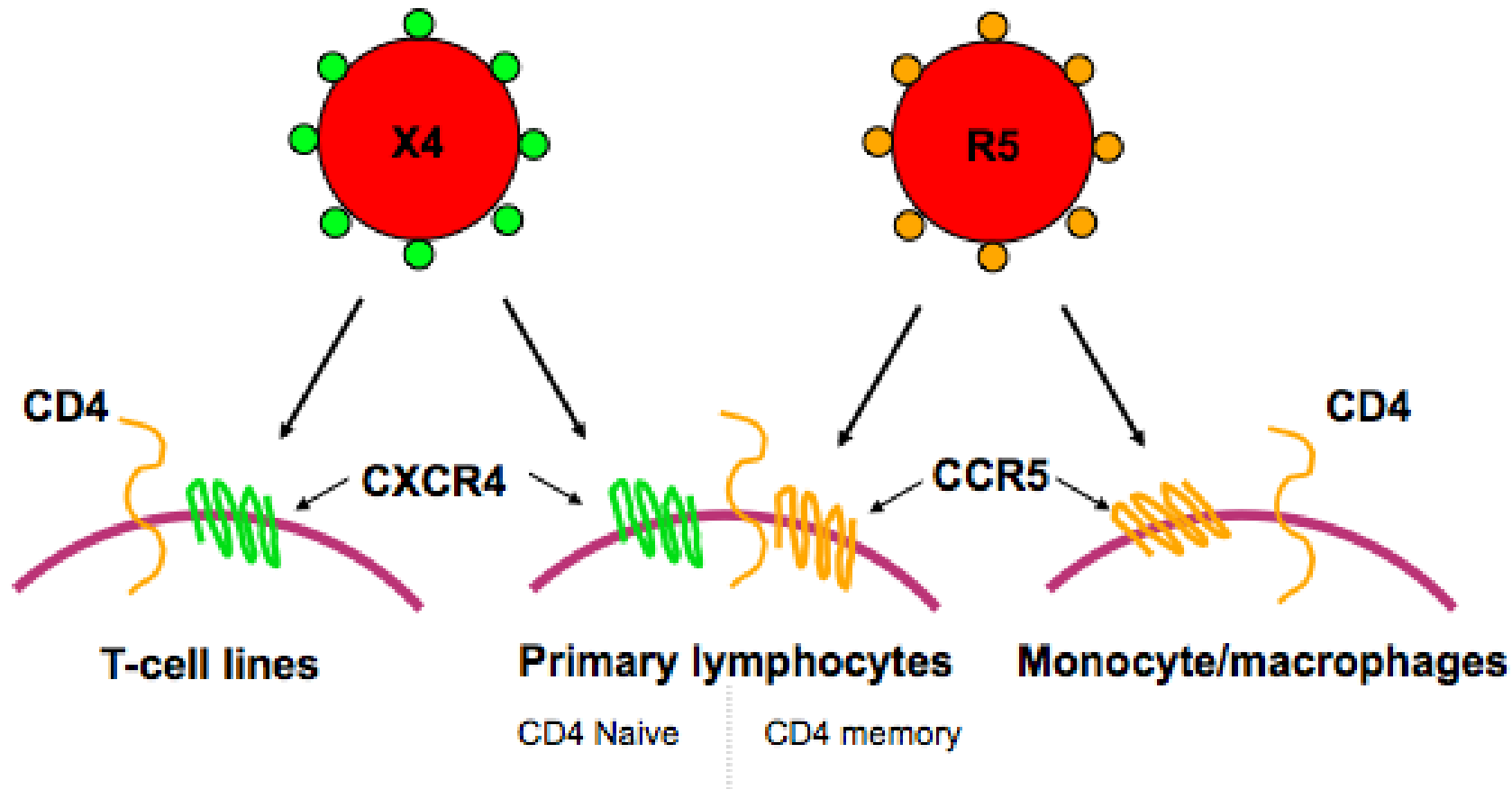
Interpretação dos testes de genotipagem

- O relatório da genotipagem inclui uma interpretação das possíveis implicações clínicas das mutações identificadas
- Contudo:
 - O significado exato de algumas mutações permanece controverso
 - Interações entre mutações/ repercussão clínica
 - Algoritmos de interpretação diferem
 - Populações minoritárias podem não ser detectadas (< que 10-20% da população viral)

Tropismo do HIV (necessário para uso do maraviroque)

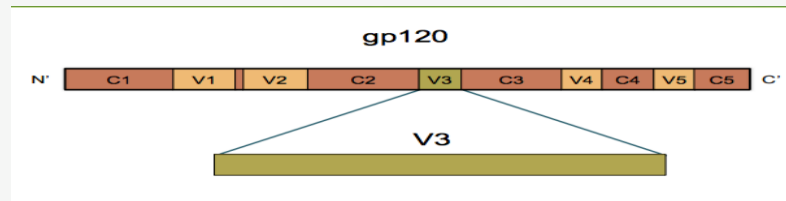
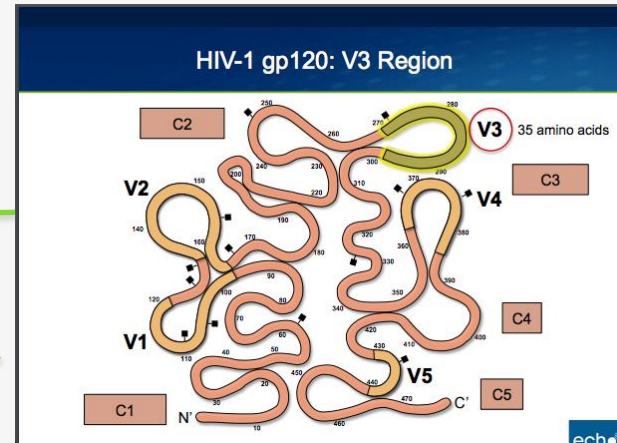
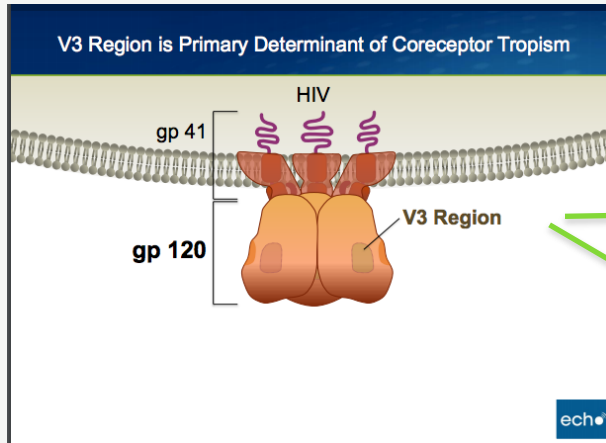






Genotropismo

Predição do tropismo do HIV por meio da análise da composição de aminoácidos da alça V3 de gp120 (glicoproteína do envelope viral).



Genotropismo

CTRPSNTRRGIHIGPGRFYTTGEIIGDIRQAHC → CCR5
CTRPSNQRKRIYIGPGRFYTTGR IIGDIRQAHC → CXCR4



Algoritmos de interpretação

- Penalidades
- Stanford
- Regras
- ANRS

Penalidades - Stanford

HIVDB	
ABC	SIR: I Intrp: Low-Level Resistance Expln: Total score: 25 T215Y (10), D67N (5), K219E (5) D67N + T215Y + K219E (5)
AZT	SIR: R Intrp: High-Level Resistance Expln: Total score: 70 T215Y (40), D67N (15), K219E (10) D67N + T215Y + K219E (5)

Mutation Scoring

RT	3TC	ABC	AZT	D4T	DDI	FTC	TDF	EFV	ETR	NVP	RPV
M41L	5	10	15	15	10	5	10	-	-	-	-
K65R	30	45	-15	45	60	30	60	-	-	-	-
M184V	60	15	-10	-10	10	60	-10	-	-	-	-
T215Y	5	15	45	45	15	5	15	-	-	-	-
T215Y+M41L	-	10	10	10	10	-	10	-	-	-	-
K65R+M184V	-	-	-	10	-	-	10	-	-	-	-
Total:	100	95	45	115	105	100	95	0	0	0	0

0-9: suscetível

10-14: potencial baixo nível de resistência

15-29: baixo nível de resistência

30-59: resistência

>60: alto nível de resistência

Algoritmo Francês - ANRS

ANRS - AC 11: RESISTANCE GROUP

GENOTYPE INTERPRETATION: NUCLEOSIDE AND NUCLEOTIDE REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITORS

	Mutations associated with resistance	Mutations associated with « possible resistance »
ZDV	<ul style="list-style-type: none"> • T215Y/F • At least 3 mutations among: M41L, D67N, K70R, L210W, T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V, K219Q/E [1, 2, 3, 4] • Q151M • Insertion at codon 69 	<ul style="list-style-type: none"> • T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V [1, 2, 3, 4]
3TC/FTC	<ul style="list-style-type: none"> • M184V/I • Insertion at codon 69 	<ul style="list-style-type: none"> • K65R [11, 12, 16] • Q151M
ddI	<ul style="list-style-type: none"> • At least a score of + 2 among: M41L + T69D + 215Y/F + K219Q/E – K70R – M184 V/I [5, 14, 15, 17, 18] • L74V/I [19] • Q151M • Insertion at codon 69 	<ul style="list-style-type: none"> • K65R [11, 12]
d4T	<ul style="list-style-type: none"> • V75A/M/S/T • T215Y/F [6] • At least 3 mutations among: M41L, D67N, K70R, L210W, T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V, K219Q/E [4, 7, 14, 15] • K65R [30, 31, 32] • Q151M • Insertion at codon 69 	<ul style="list-style-type: none"> • T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V [4, 7]
ABC	<ul style="list-style-type: none"> • At least 4 mutations among: M41L, D67N, M184V/I, L210W, T215Y/F [8, 19, 29] • K65R [9, 11, 12] • L74V/I [24, 25, 26, 27, 28, 29] • Y115F • Q151M • Insertion at codon 69 	<ul style="list-style-type: none"> • 3 mutations among: M41L, D67N, M184V/I, L210W, T215Y/F [8, 19, 29]



STANFORD UNIVERSITY

HIV DRUG RESISTANCE DATABASE

A curated public database designed to represent, store, and analyze the divergent forms of data underlying HIV drug resistance.

HOME GENOTYPE-RX GENOTYPE-PHENO GENOTYPE-CLINICAL HIVdb PROGRAM



» Analyze sequence sets for proportions with Surveillance Drug Resistance Mutations (SDRMs)



» Interactive map displaying HIV-1 drug resistance in ARV-naive populations



» XML Suite of Treatment-Change Episodes

Interactive map displaying HIV-1 drug resistance in ARV-naive population

Studies of ARV-naive population by region, year and subtype. » [Interactive map](#)

GENOTYPE-TREATMENT CORRELATIONS

- » Retrieve sequences (and/or mutations) from persons receiving selected HIV drugs
- » Retrieve sequences and treatments from viruses with specific mutations

GENOTYPE-PHENOTYPE CORRELATIONS

- » Retrieve drug susceptibility data for isolates with selected mutations
- » Download genotype-phenotype research datasets

REFERENCES

- » Published drug resistance studies in HIVRT&PrDB
- » Published studies by Stanford database group

SURVEILLANCE MUTATIONS

- » World Health Organization 2009 Mutation List
- » Geographic Information System
- » Surveillance Drug Resistance Mutation (SDRM) Worksheet



Genotype Resistance Interpretation

Interprets user-entered mutations to infer the level of resistance to NRTIs, NNRTIs, PIs. Web Services and Spreadsheets **NEW!** available.

MARVEL

» [Mutation ARV Evidence Listing](#)

HIVseq Program

» [Provides mutation frequencies by subtype and treatment](#)

HIValg Program

» [Compare HIVdb, ANRS, Rega, or create your own algorithm](#)

Reverse Transcriptase

Enter Mutation List:

OR

Use The Pulldown Menus:

40	41	44	62
---	---	---	---
65	67	69	70
---	---	---	---
74	75	77	90
---	---	---	---
98	100	101	103
---	---	---	---
106	108	115	116
---	---	---	---
118	138	151	179
---	---	---	---
181	184	188	190
---	---	---	---
210	215	219	221
---	---	---	---
225	227	230	236
---	---	---	---
238	318	348	
---	---	---	

Protease

Enter Mutation List:

OR

Use The Pulldown Menus:

10	11	13	20
---	---	---	---
23	24	30	32
---	---	---	---
33	35	36	43
---	---	---	---
46	47	48	50
---	---	---	---
53	54	58	63
---	---	---	---
71	73	74	76
---	---	---	---
77	82	83	84
---	---	---	---
85	88	89	90
---	---	---	---
93			

Integrase

Enter Mutation List:

OR

Use The Pulldown Menus:

51	66	74	92
---	---	---	---
95	97	114	121
---	---	---	---
128	138	140	143
---	---	---	---
145	146	147	148
---	---	---	---
151	153	155	157
---	---	---	---
163	230	263	
---	---	---	



Analyse

	HIVDB_9.4	ANRS_33	Rega_10.0
ABC	<p>SIR: I</p> <p>Intrp: Intermediate Resistance</p> <p>Expln: Total score: 35.0 M41L (5.0), M41L + L210W (10.0), M184V (15.0), L210W (5.0)</p>	<p>SIR: R</p> <p>Intrp: Resistance</p> <p>Expln: 184VI (Resistance)</p>	<p>SIR: I</p> <p>Intrp: Intermediate Resistant GSS 0.5</p> <p>Expln: SELECT ATLEAST 1 FROM (65NR, 74IV, 115F, 184IV) AND SELECT ATLEAST 2 AND NOTMORETHAN 3 FROM (41L, 67N, 70R, 210W, 215ACDEGHILNSVFY, 219QEHNHNR) (Intermediate Resistant GSS 0.5)</p>
AZT	<p>SIR: I</p> <p>Intrp: Intermediate Resistance</p> <p>Expln: Total score: 30.0 M41L (15.0), M41L + L210W (10.0), M184V (-10.0), L210W (15.0)</p>	<p>SIR: S</p> <p>Intrp: Susceptible</p> <p>Expln: No rules were triggered</p>	<p>SIR: I</p> <p>Intrp: Intermediate Resistant GSS 0.5</p> <p>Expln: SELECT ATLEAST 2 AND NOTMORETHAN 3 FROM (41L, 67GN, 69AN, 70R, 210W, 215ACDEGHILNSVFY, 219EHNQR) (Intermediate Resistant GSS 0.5)</p>
DAT	<p>SIR: I</p> <p>Intrp: Intermediate Resistance</p> <p>Expln: Total score: 30.0 M41L (15.0), M41L + L210W (10.0), M184V (-10.0), L210W (15.0)</p>	Drug Score Not Available	<p>SIR: I</p> <p>Intrp: Intermediate Resistant GSS 0.5</p> <p>Expln: SELECT ATLEAST 2 AND NOTMORETHAN 3 FROM (41L, 67N, 69ADGN, 70R, 210W, 215ACDEGHILNSVFY, 219EHNQR) (Intermediate Resistant GSS 0.5)</p>
DDI	<p>SIR: I</p> <p>Intrp: Intermediate Resistance</p> <p>Expln: Total score: 40.0 M41L (10.0), M41L + L210W (10.0), M184V (10.0), L210W (10.0)</p>	Drug Score Not Available	<p>SIR: S</p> <p>Intrp: Susceptible GSS 1</p> <p>Expln: No rules were triggered</p>
FTC	<p>SIR: R</p> <p>Intrp: High-Level Resistance</p> <p>Expln: Total score: 60.0 M184V (60.0)</p>	<p>SIR: R</p> <p>Intrp: Resistance</p> <p>Expln: 184VI (Resistance)</p>	<p>SIR: R</p> <p>Intrp: Resistant GSS 0</p> <p>Expln: 184VI (Resistant GSS 0)</p>
3TC	<p>SIR: R</p> <p>Intrp: High-Level Resistance</p> <p>Expln: Total score: 60.0 M184V (60.0)</p>	<p>SIR: R</p> <p>Intrp: Resistance</p> <p>Expln: 184VI (Resistance)</p>	<p>SIR: R</p> <p>Intrp: Resistant GSS 0</p> <p>Expln: 184VI (Resistant GSS 0)</p>
TDF	<p>SIR: S</p> <p>Intrp: Potential Low-Level Resistance</p> <p>Expln: Total score: 10.0 M41L (5.0), M41L + L210W (10.0), M184V</p>	<p>SIR: S</p> <p>Intrp: Susceptible</p> <p>Expln: No rules were triggered</p>	<p>SIR: S</p> <p>Intrp: Susceptible GSS 1</p> <p>Expln: No rules were triggered</p>

PCDT 2024

Critérios para a realização do teste de genotipagem:

- Pessoa vivendo com HIV ou aids em uso de Tarv;
- Falha virológica confirmada: dois exames consecutivos com carga viral detectável, sendo o último exame com carga viral > 500 cópias/mL.

Genotipagem pré-
tratamento:

Gestantes

Crianças

PREP

Necessidade de uso

EFV

Antes de solicitar

O exame deve ser coletado na vigência da Tarv

Algumas mutações ficam arquivadas rapidamente após a interrupção da Tarv, devido à ausência da pressão seletiva exercida pelo medicamento, e acabam não aparecendo no exame realizado.

A carga viral deve estar detectável

Com viremia baixa, a amplificação do genoma viral é mais difícil. No contexto de viremia muito baixa, mutações existentes podem não ser detectadas.

Solicitação

Genotipagem convencional (ITRN, ITRNN e IP)

Solicitar para toda falha virológica.

Integrase (raltegravir, dolutegravir)

Solicitar em caso de falha atual ou prévia a INI.

Interpretação e elaboração do esquema de resgate

Mutações detectadas	Provável redução da susceptibilidade; entretanto, os ITRN retêm atividade residual mesmo na presença de mutações.
Mutações não detectadas	Não significam necessariamente medicamento ativo. Na ausência de pressão seletiva (suspensão do medicamento) ou em situações de carga viral baixa, pode não ser possível detectar as subpopulações virais minoritárias com mutações de resistência.
Considerar o histórico de esquemas ARV, de falhas e de testes de genotipagem	Mutações selecionadas no passado podem não ser detectáveis na ausência do medicamento; contudo, reemergem rapidamente após a reintrodução deste. A resistência é cumulativa: as mutações detectadas em diferentes testes de uma mesma pessoa devem ser somadas.
Considerar os resultados como "atuais" no máximo até 6 meses após a coleta de amostra	Considerando-se o ritmo médio do acúmulo de novas mutações na vigência de falha, após um período de 6 meses podem surgir novas mutações e ocorrer perda adicional de opções de tratamento.
Estruturar o esquema de resgate a partir da orientação de MRG capacitados e atualizados periodicamente pelo Ministério da Saúde	A interpretação do teste e a escolha do melhor esquema de resgate são complexas e demandam experiência e atualização contínua no manejo da falha virológica.

Aspectos Importantes:

- Genotipagem subestima resistência após falhas múltiplas

	Genotipagem anterior	Genotipagem recente	Diferença
--	----------------------	---------------------	-----------

A presença da mutação prediz a resistência, mas a sua ausência não prediz susceptibilidade

ITRNN	38,5%	24,5%	14,0%
IP	27,9%	15,6%	12,3%

Mensagens finais:

- Considerar adesão e coleta na vigência de ARV
- Análise do uso prévio de ARV e histórico de genotipagens, pois a mutação pode deixar de existir na ausência de pressão seletiva da droga, e reaparecer com a mesma;
- Benefício real da genotipagem – seguir critérios.
- Algoritmos tem deficiência, algumas vezes com discordância de interpretação