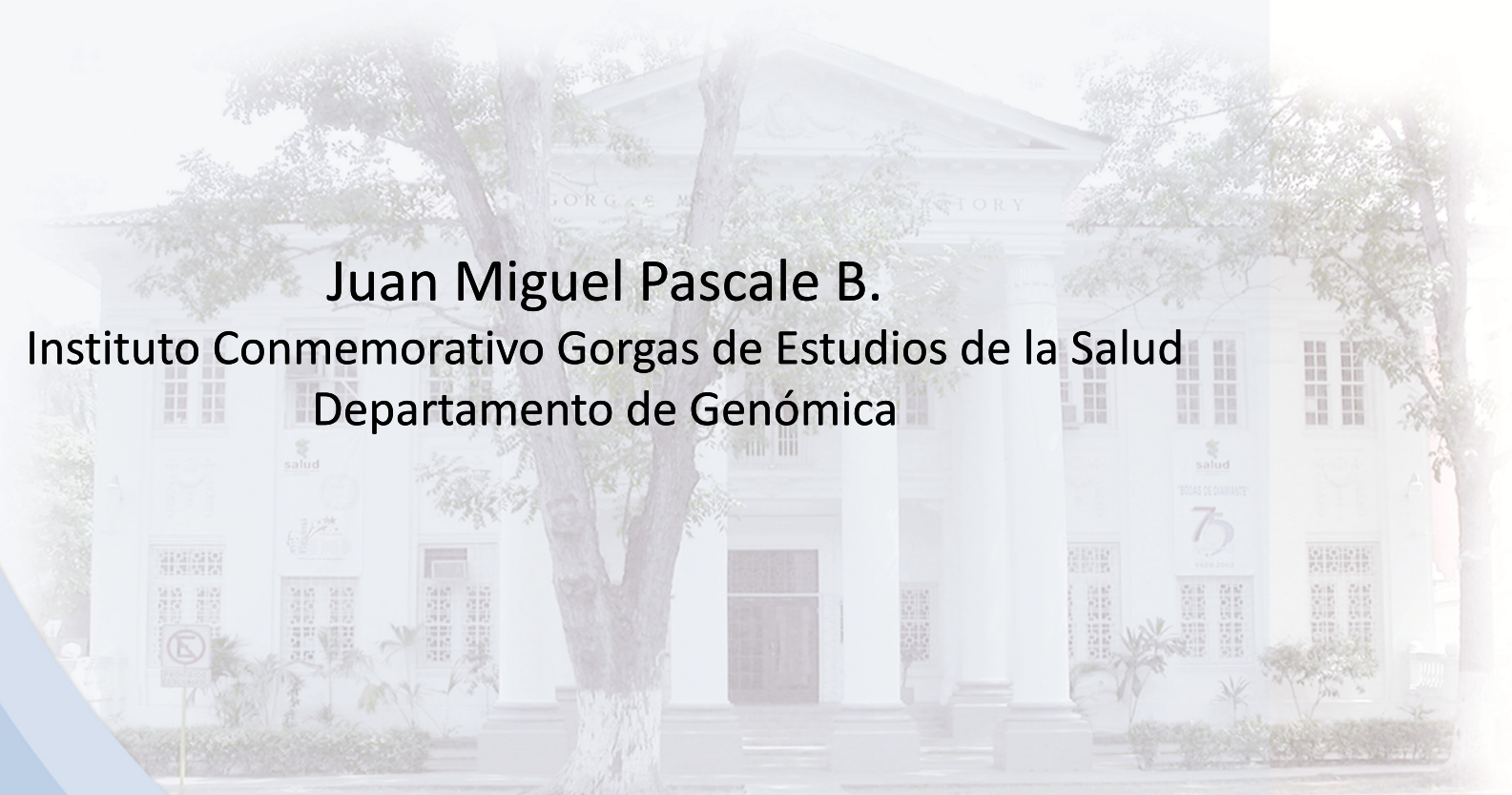




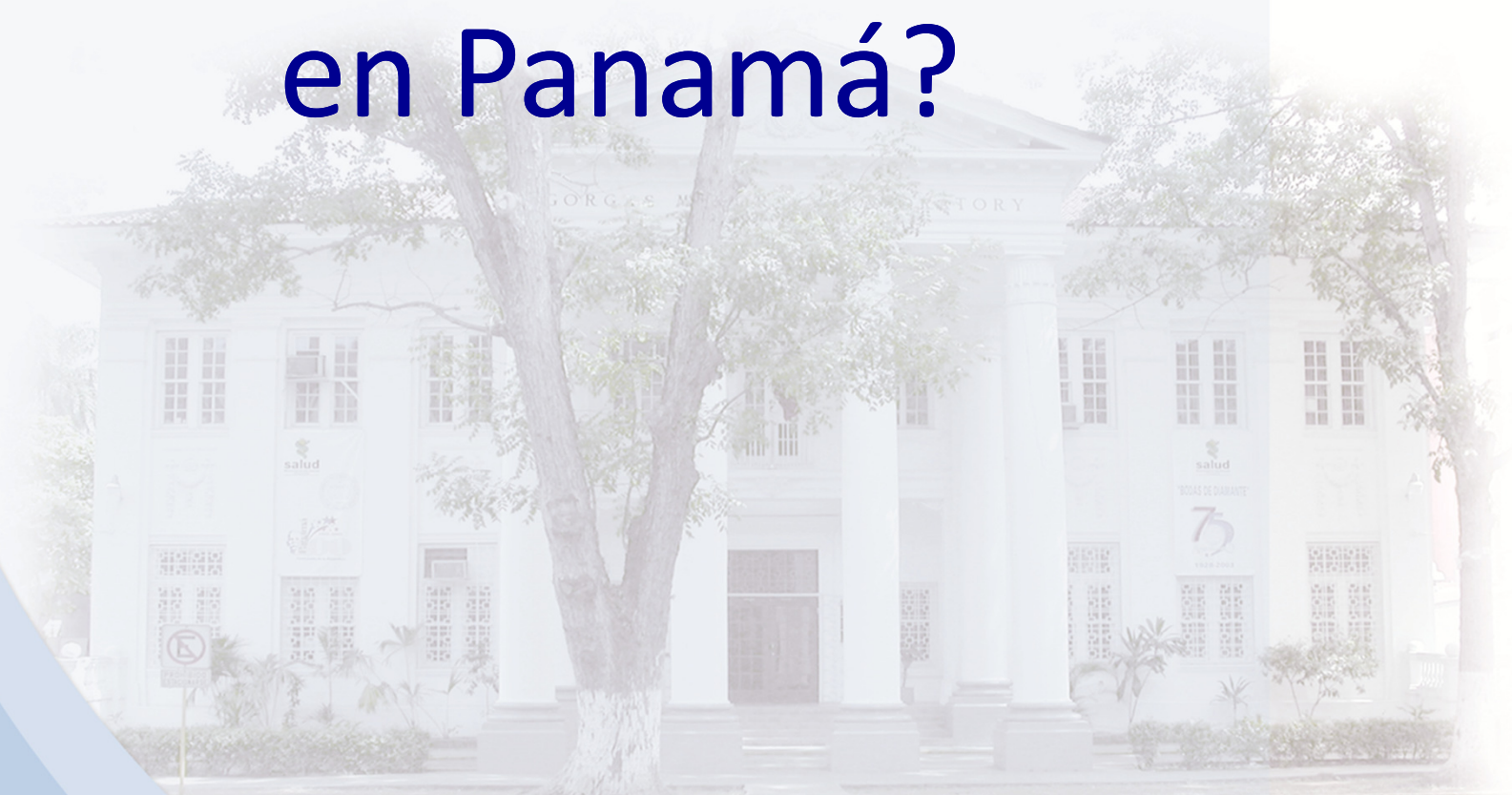
Resistencia Transmitida en Panamá

Juan Miguel Pascale B.

Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud
Departamento de Genómica

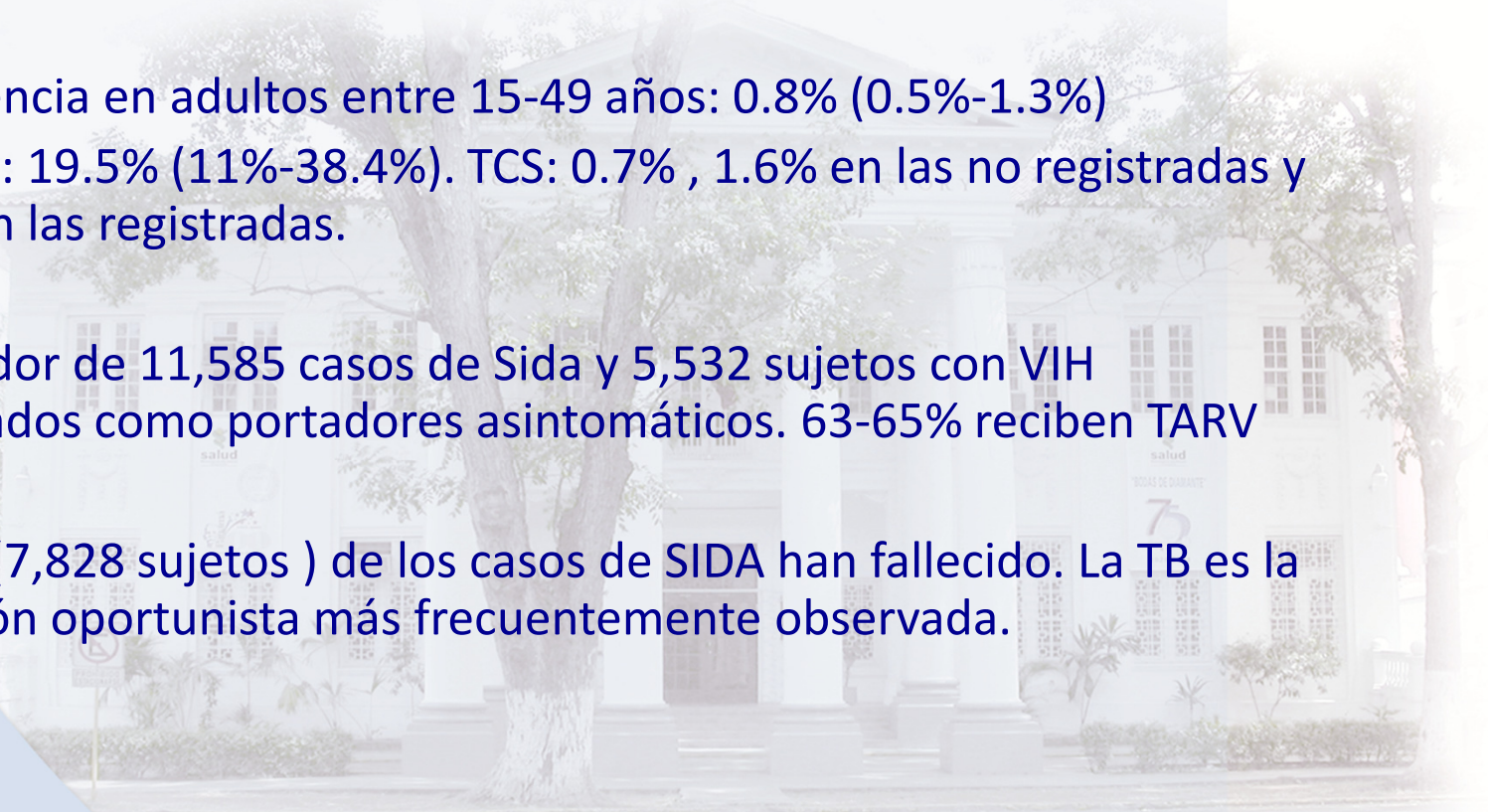


¿Cuál es la situación de VIH en Panamá?

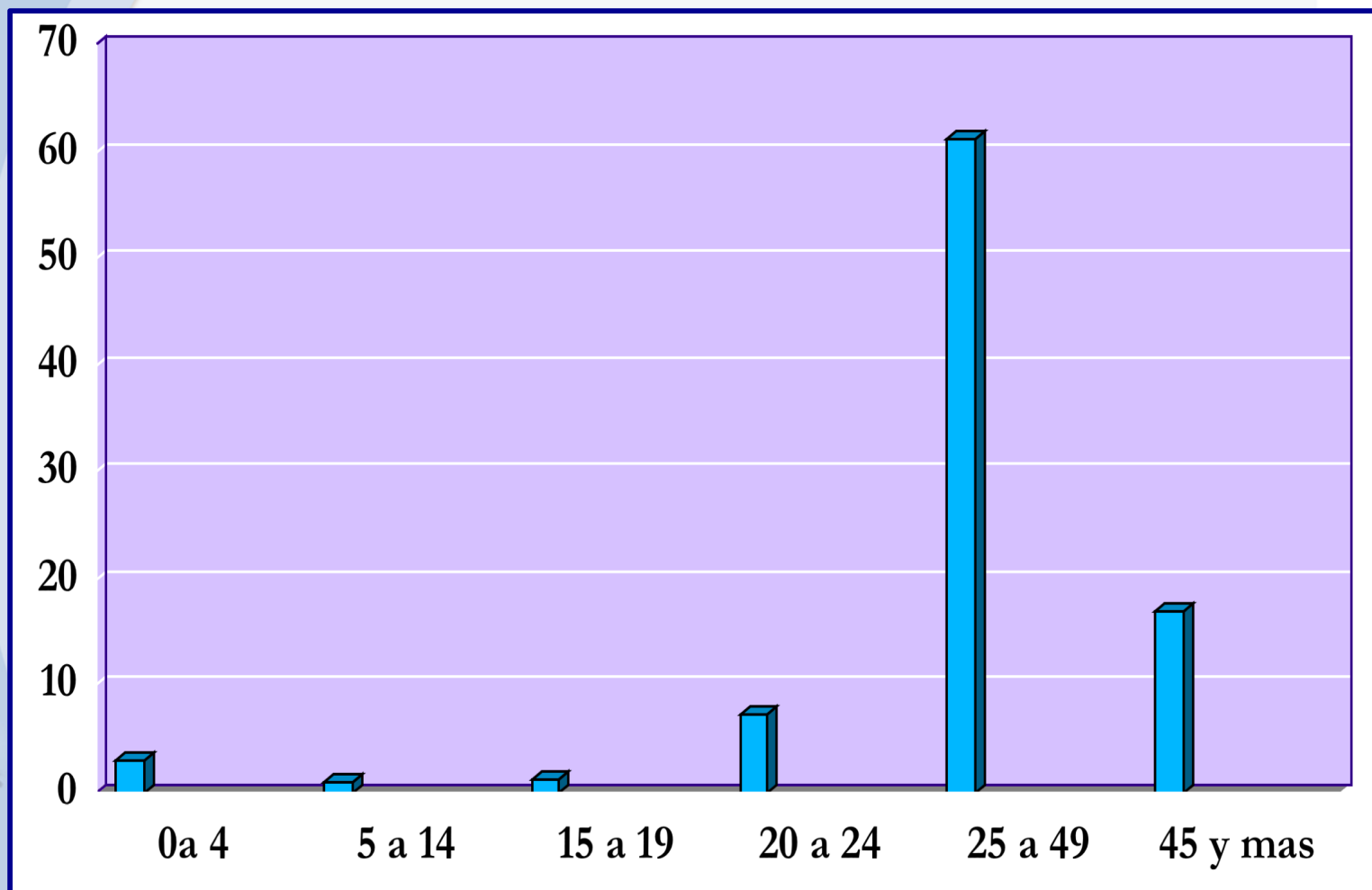


VIH en Panamá

- Panamá tiene 3.5 millones de habitantes.
- Hay alrededor de 18,000 individuos viven con el VIH.
- La relación hombre mujer es de 3:1.
- Prevalencia en adultos entre 15-49 años: 0.8% (0.5%-1.3%)
- En HSH: 19.5% (11%-38.4%). TCS: 0.7% , 1.6% en las no registradas y 0.2% en las registradas.
- Alrededor de 11,585 casos de Sida y 5,532 sujetos con VIH reportados como portadores asintomáticos. 63-65% reciben TARV
- 67.6% (7,828 sujetos) de los casos de SIDA han fallecido. La TB es la infección oportunista más frecuentemente observada.



CASOS DE SIDA SEGÚN GRUPO DE EDAD, PANAMÁ 1984 - 2009



¿Indicaciones y tipo de TARV?



Indicaciones para el TARV en Adolescentes y Adultos en Panamá

Categoría clínica	Conteo de CD4 células/mm ³	Carga viral en número de copias	Recomendaciones
Enfermedad definitoria de sida o síntomas severos	Cualquier valor	Cualquier valor	Dar tratamiento
Asintomático	≤350 mm ³	Cualquier valor	Dar tratamiento
Asintomático	350-500 mm ³	≥100,000 copias	Dar tratamiento
Asintomático	>350 mm ³	<100,000 copias	Diferir el tratamiento y dar seguimiento con CD4 y carga viral.

Esquemas de TARV usados en Panamá en Adultos y Adolescentes

Tratamiento de elección para iniciar terapia en adolescentes y adultos con VIH:

2 INTR + 1 INNTR

- 1. 3TC o FTC + TDF + EFV (preferido)**
- 2. AZT + 3TC + EFV**

Tratamiento de segunda línea en adolescentes y adultos con VIH:

2 INTR + 1 IP/r

- 1. AZT + ABC o ddi + LPV/r**
AZT + ABC o ddi + SQV + RTV
AZT + ABC o ddi + ATZ + RTV
- 2. TDF + ABC + LPV/r**
TDF + ABC + SQV + RTV
TDF + ABC + ATZ + RTV

¿Indicaciones de la prueba de resistencia en Panamá?



VIH en Panamá

Indicaciones de prueba de resistencia:

- Pacientes con fallo virológico, con carga viral $\geq 2,000$ copias/ml.
- Pacientes con niveles sub-óptimos de supresión de carga viral después de 4 a 6 meses de TARV estable.
- Mujeres embarazadas previo al inicio de TARV (sin atrasar el inicio del mismo)
- Mujeres embarazadas con TARV que permanezcan con carga viral $\geq 1,000$ copias/ml.



RESISTENCIA EN SUJETOS NO TRATADOS



Selección de Sujetos WHO-TDR

- **Criterio de inclusión (iniciales)**

- Pacientes que van a inciaar TARV sin importar fecha de diagnóstico

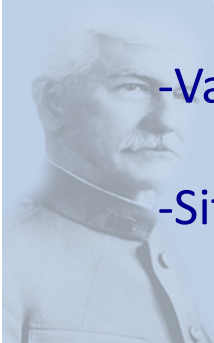
- Muestras de pacientes VIH positivo **confirmado** por pruebas serológicas o por pruebas moleculares como la PCR proviral para VIH.

- No estar recibiendo TARV

- Muestras conservadas en archivo a -70°C y con un volumen mayor de 500 µl.

- Valores de linfocitos TCD4+: no específico

- Situación Geográfica: Todo el país

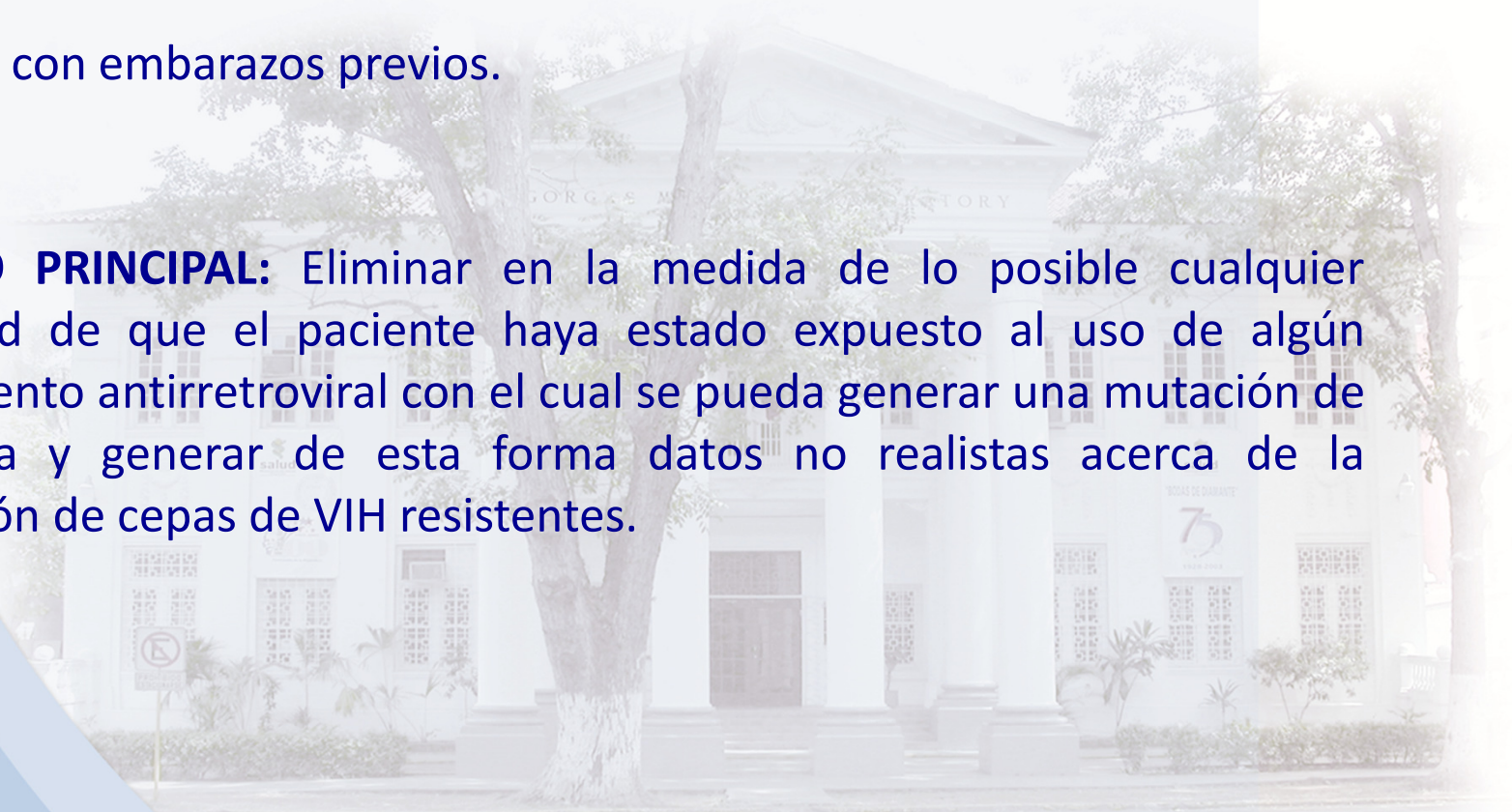


Selección de Sujetos WHO-TDR

Criterios de Exclusión

- Pacientes estén recibiendo tratamiento con ARV.
- Mujeres con embarazos previos.

OBJETIVO PRINCIPAL: Eliminar en la medida de lo posible cualquier posibilidad de que el paciente haya estado expuesto al uso de algún medicamento antirretroviral con el cual se pueda generar una mutación de resistencia y generar de esta forma datos no realistas acerca de la transmisión de cepas de VIH resistentes.



Flujo de Trabajo

Extracción de RNA

Producto Purificado

RT-PCR (1 hr)

PCR-1 (1:45 hrs)

PCR nested (2:10 hrs)

Purificación PCR

Cuantificación

Rxn de Secuenciación (3:30 hrs)

Purificación de Sec.

Secuenciación (1h)

Edición de Secuencias

Análisis de Datos en Stanford

Reporte de Resultados

HIVdb: Genotypic Resistance Interpretation Report

Report Date: 20-Nov-2009 10:23:57 PST

Sequence Includes HIV codons: 4-98
Sequence Includes HIV codons: 99-324

There are no mutations or deletions
Sequence and % identity to closest reference strain:

Accession	% Identity
U01450	100%
U01451	100%

Sequence Quality Assessment

Gene	GA Problems	Codons
pol	Stop Codons, Frame Shifts	None
pol	SLD/GA IN	None
pol	Protease Resistant	None

Gene: GA Problems: Codons

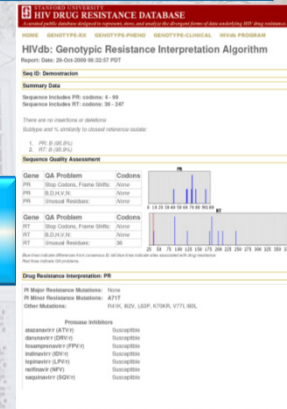
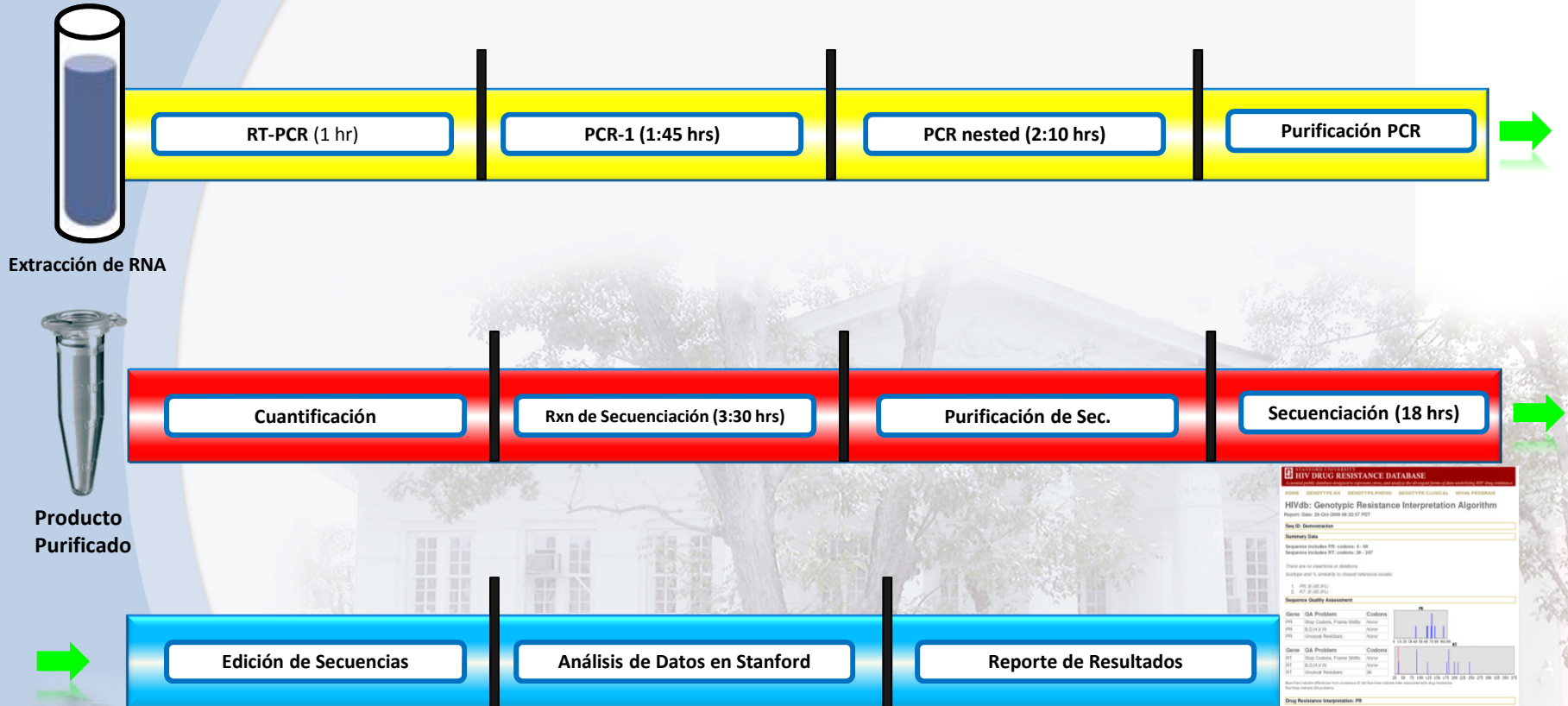
Gene	GA Problems	Codons
pol	Stop Codons, Frame Shifts	None
pol	SLD/GA IN	None
pol	Protease Resistant	None

Drug Resistance Interpretation: HIV

Drug Resistance Interpretation: HIV	Protease Inhibitors
Major Resistance Monitoring: None	None
Minor Resistance Monitoring: None	None
Other Monitoring: None	None

Protease Inhibitors

Protease Inhibitors	Resistance
Didanosine (DDI)	None
Zalcitabine (ZDV)	None
Stavudine (d4T)	None
Lamivudine (3TC)	None
Abacavir (ABC)	None
Nucleoside (NRTI)	None
Integrase (INRTI)	None



Programas electrónicos para evaluación de la Resistencia transmitida de VIH

CPR: Calibrated Population Resistance tool

Version 4.1 beta (updated 11/05/08)

Jan. 20, 2009: 2009 SDRM list now available. (2008 list available as an option. To see difference, [click here.](#))

CPR is a tool for analysis of HIV-1 protease and/or RT sequence data sets. For program details please see the [release notes](#). Click [here](#) for an example data set. **Note: CPR only accepts nucleotide sequence data in FASTA format!**

Sequences



Fasta Input

Paste nucleotide sequence data in FASTA format in the box below.

Identifier (Optional)

DRM List

SDRM (2009)

SDRM (2009)

SDRM (2008)

SDRM (2007)

IAS-USA major (2007)

RESET

Analysis Options

☐ Genotypic Resistance

☐ STAR Genotype

ANALYZE

CPR Form (<http://cpr.stanford.edu/cpr/>)

Mutaciones que indican la transmisión de un virus resistente en pacientes naïve

ITIAN

M	K	D	T	K	L	V	F	Y	F	Q	M	L	T	K
41	65	67	69	70	74	75	77	115	116	151	184	210	215	219
L	R	E/G/N	D	E/R	I/V	A/M/T/S	L	F	Y	M	I/V	W	C/D/E/F/I/N/S/V/Y	E/N/Q/R
		Ins/del												

ITINAN

L	K	K	V	V	Y	Y	G	P	M
100	101	103	106	179	181	188	190	225	230
I	E/P	N/S	A/M	F	C/I/V	C/H/L	A/E/S	H	L

IP

L	L	D	V	M	I	G	I	F	I	G	L	V	N	I	I	N	L
23	24	30	32	46	47	48	50	53	54	73	76	82	83	84	85	88	90
I	I	N	I	I/L	A/V	M/V	L/V	L/Y	A/L/M/S/T/V	A/C/S/T	V	A/C/F/L/M/S/T	D	A/C/V	V	D/S	M

Esta tabla recoge aquellas mutaciones que, estando presentes en pacientes *naïve* sin exposición previa a tratamiento antirretroviral, confirman la transmisión de un virus resistente según la última lista publicada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Bennett D, et al., 2009).

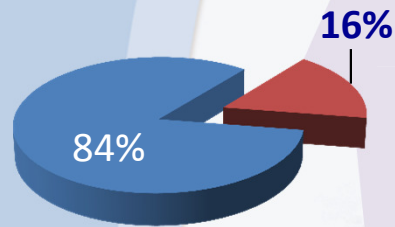
Granate: Mutaciones de reversión.

Ins/del: inserciones o deleciones entre las posiciones 67 y 69.

Frecuencia de las mutaciones asociadas a transmisión de cepas resistentes a los inhibidores de transcriptasa inversa y proteasa

n=242

Sujetos no TARV
2007-2012



■ SIN MUTACIONES ASOCIADAS A TRANSMISIÓN

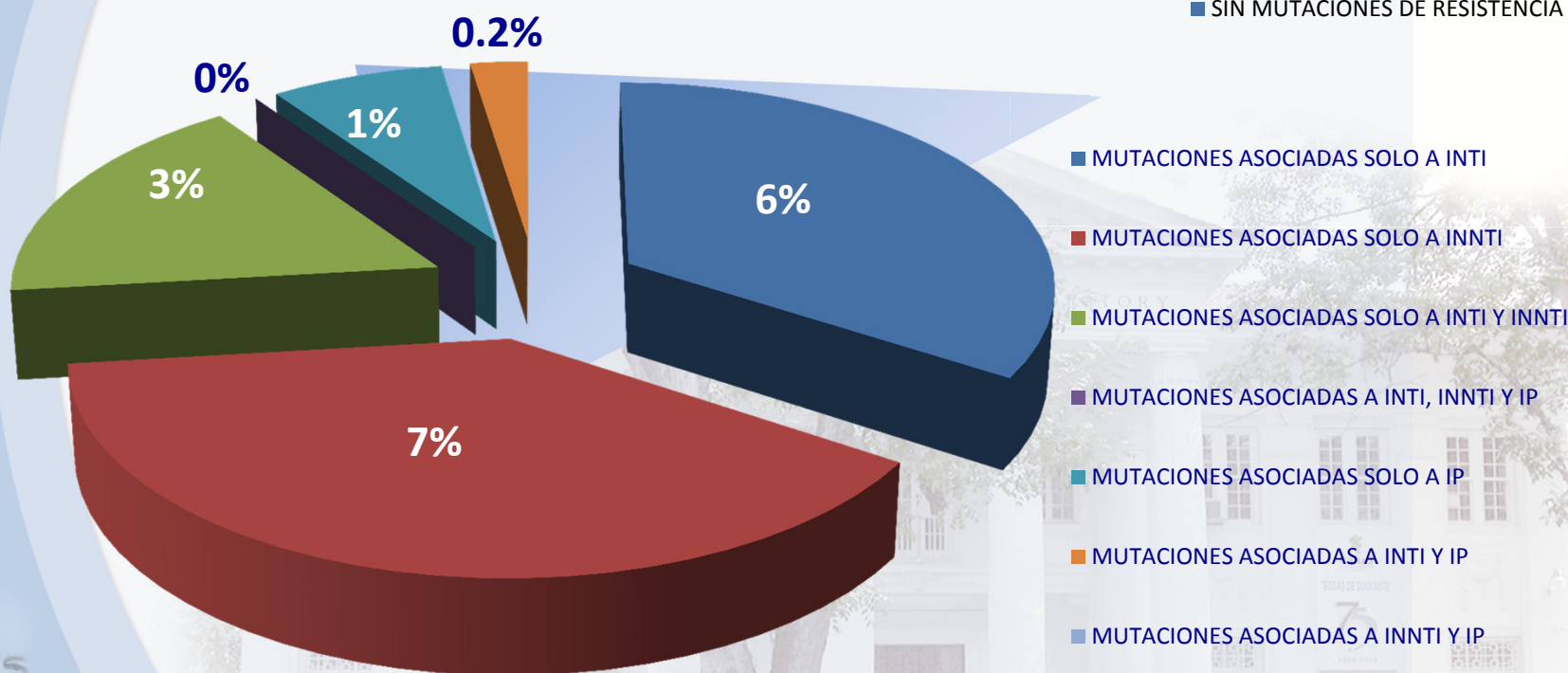
■ AL MENOS UNA MUTACIÓN ASOCIADA A TRANSMISIÓN

INTI			INNTI			PROTEASA		
MUTACIÓN	#	%	MUTACIÓN	#	%	MUTACIÓN	#	%
M41L	6	2.5%	L100I	0	0.0%	L23I	0	0.0%
K65R	0	0.0%	K101E/P	0	0.0%	L24I	0	0.0%
D67E/G/N	0	0.0%	K103N	11	4.5%	D30N	0	0.0%
T69D	0	0.0%	K103S	0	0.0%	V32I	0	0.0%
K70E/R	0	0.0%	V106A/M	0	0.0%	M46I	3	1.2%
L74I/V	0	0.0%	V179F	0	0.0%	M46L	1	0.4%
V75A/M/S/T	0	0.0%	Y181C	1	0.4%	I47A/V	0	0.0%
F77L	0	0.0%	Y181I	0	0.0%	G48M/V	0	0.0%
Y115F	0	0.0%	Y181V	0	0.0%	I50L/V	0	0.0%
F116Y	0	0.0%	Y188L	0	0.0%	F53LY	0	0.0%
Q151M	0	0.0%	Y188C	0	0.0%	I54L/M/S/T/V	0	0.0%
M184I	0	0.0%	Y188H	0	0.0%	Q58E	1	0.4%
M184V	1	0.4%	G190S	1	0.4%	G73A/C/S/T	0	0.0%
L210W	0	0.0%	G190A	0	0.0%	T74P	0	0.0%
T215C	0	0.0%	G190E	0	0.0%	L76V	0	0.0%
T215D	2	0.8%	P225H	5	2.1%	V82A/C/F/L/M/S/T	0	0.0%
T215E	1	0.4%	M230L	0	0.0%	N83D	0	0.0%
T215F	1	0.4%				I84A/C/V	0	0.0%
T215I	1	0.4%				I85V	1	0.4%
T215N	0	0.0%				N88D/S	0	0.0%
T215S	0	0.0%				L90M	0	0.0%
T215V	0	0.0%						
T215Y	1	0.4%						
K219N	0	0.0%						
K219R	0	0.0%						
K219Q	1	0.4%						
K219E	1	0.4%						

Frecuencia de las mutaciones que confieren resistencia en pacientes que no estén recibiendo TARV

n=242

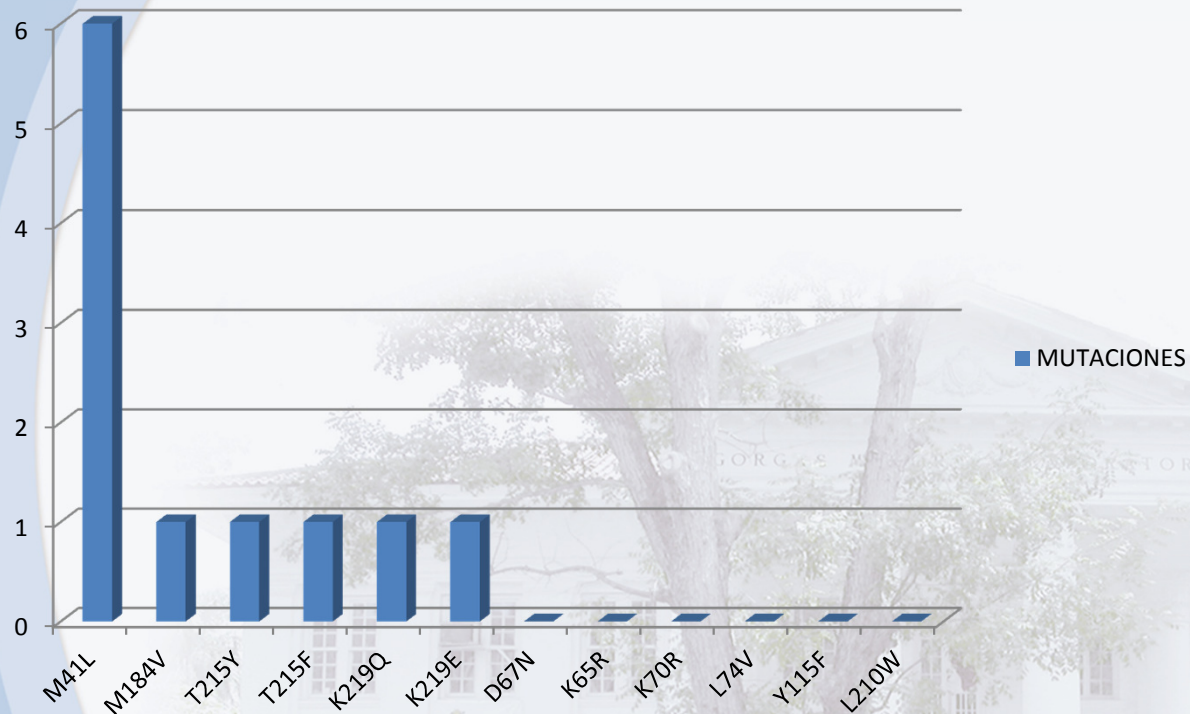
Sujetos no TARV
2007-2012



GEN DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA



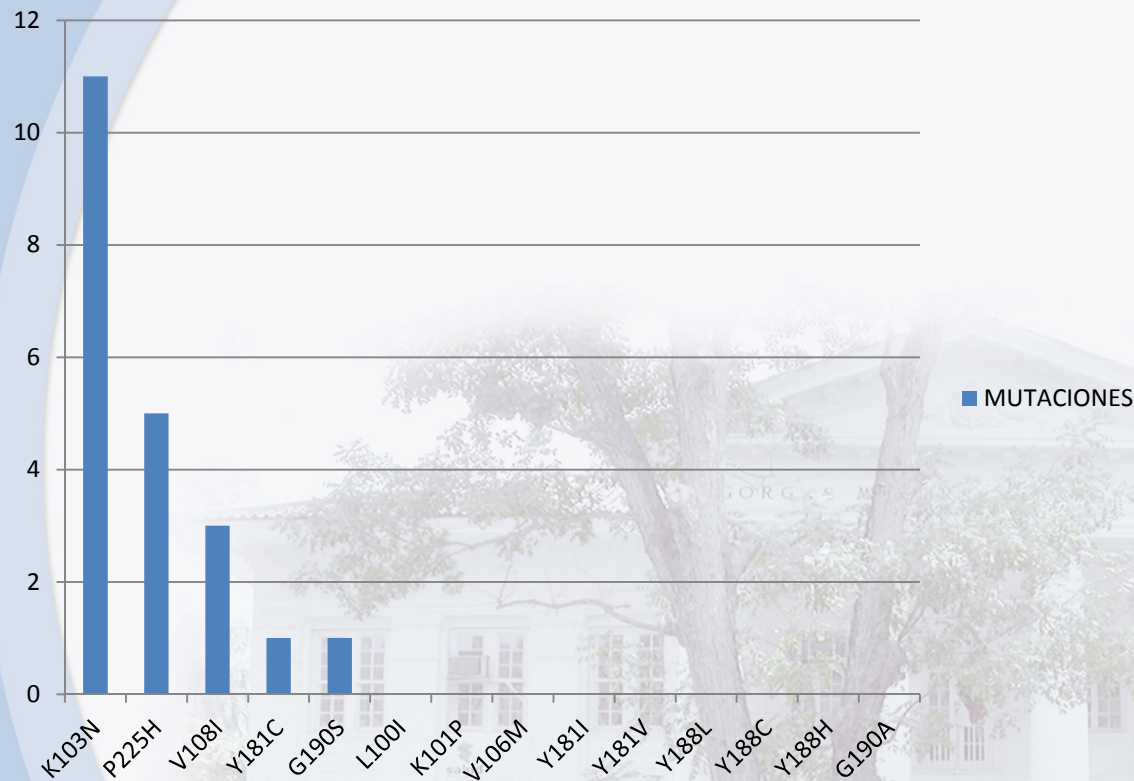
Mutaciones de importancia asociadas a los Inhibidores Nucleosídicos de la Transcriptasa Inversa (INTI)



MUTACIÓN	#
M41L	6
M184V	1
T215Y	1
T215F	1
K219Q	1
K219E	1
D67N	0
K65R	0
K70R	0
L74V	0
Y115F	0
L210W	0

ZIDOVUDINE y STAVUDINE

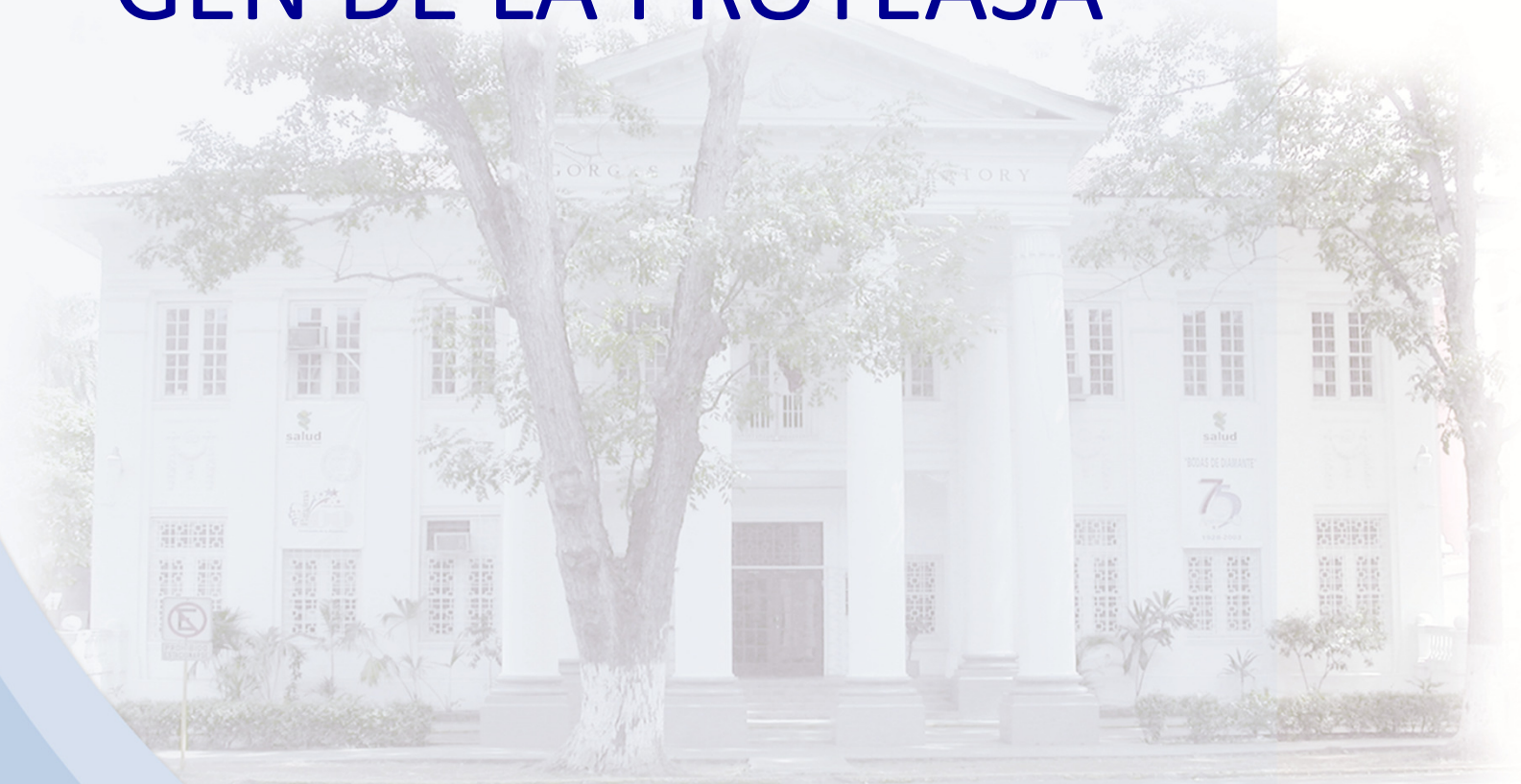
Mutaciones de importancia asociadas a los Inhibidores No Nucleosídicos de la Transcriptasa Inversa (INNTI)



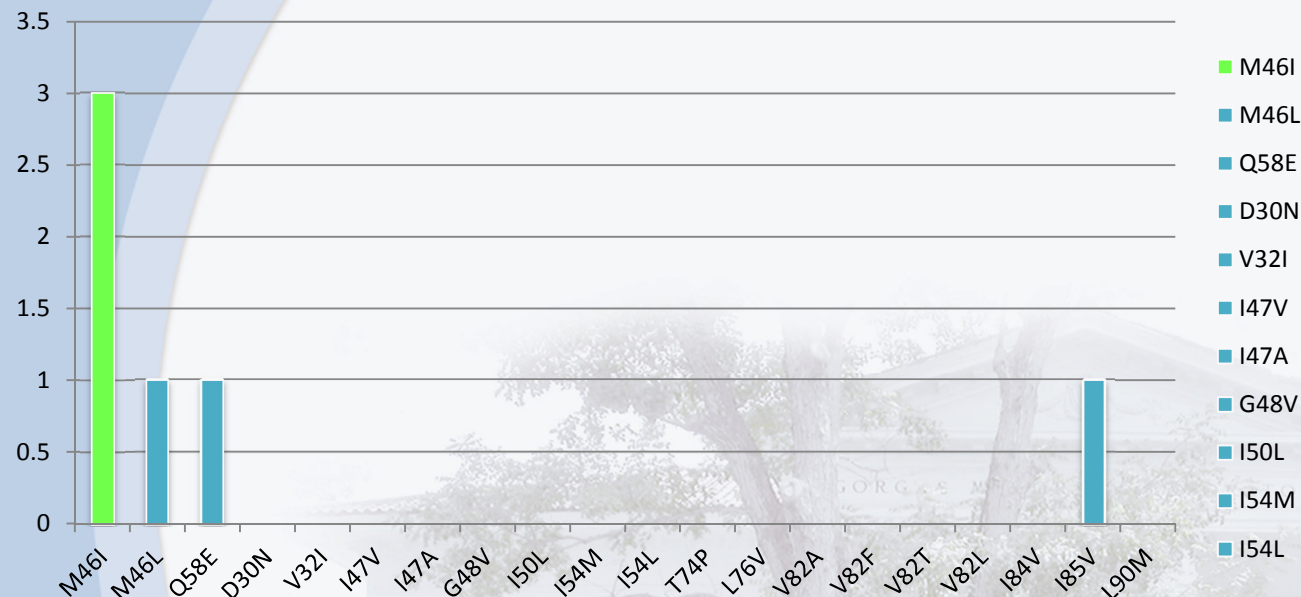
MUTACIONES	#
K103N	11
P225H	5
V108I	3
Y181C	1
G190S	1
L100I	0
K101P	0
V106M	0
Y181I	0
Y181V	0
Y188L	0
Y188C	0
Y188H	0
G190A	0

EFAVIRENZ y NEVIRAPINE

GEN DE LA PROTEASA



Mutaciones de importancia asociadas a los Inhibidores de Proteasa (IP)



MUTACIONES	#
M46I	3
M46L	1
Q58E	1
D30N	0
V32I	0
I47V	0
I47A	0
G48V	0
I50L	0
I54M	0
I54L	0
T74P	0
L76V	0
V82A	0
V82F	0
V82T	0
V82L	0
I84V	0
I85V	1
L90M	0

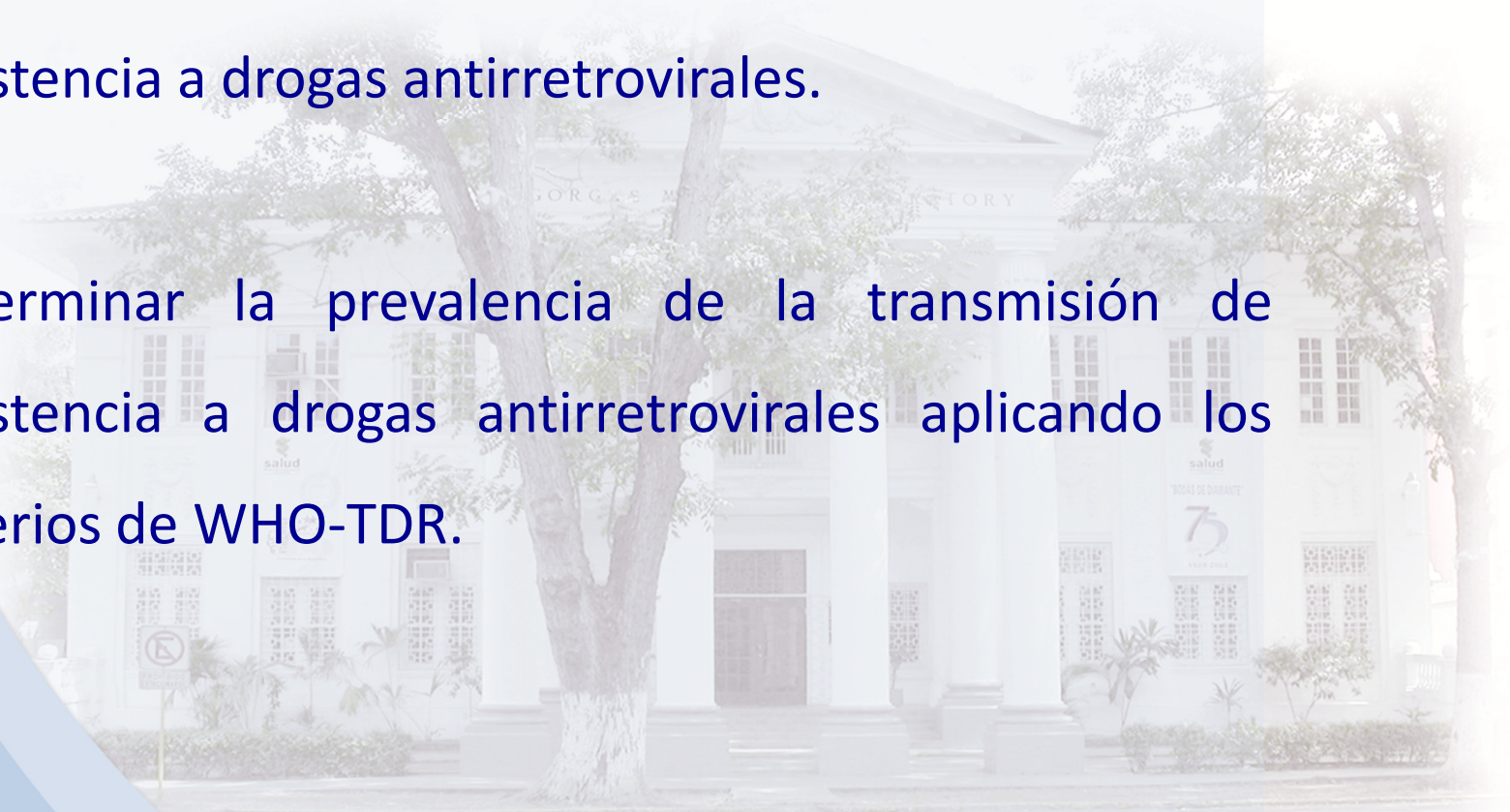
MEDICAMENTOS	M46I/L	Q58E
atazanavir/r (ATV/r)	Potencial bajo nivel de resistencia	Susceptible
darunavir/r (DRV/r)	Susceptible	Susceptible
fosamprenavir/r (FPV/r)	Potencial bajo nivel de resistencia	Susceptible
indinavir/r (IDV/r)	Potencial bajo nivel de resistencia	Susceptible
lopinavir/r (LPV/r)	Potencial bajo nivel de resistencia	Susceptible
nelfinavir (NFV)	Bajo nivel de resistencia	Susceptible
saquinavir/r (SQV/r)	Susceptible	Susceptible
tipranavir/r (TPV/r)	Susceptible	Potencial bajo nivel de resistencia

RESISTENCIA TRANSMITIDA



OBJETIVOS GENERALES

1. Identificar las mutaciones presentes en los genes que codifican para la transcriptasa inversa y para la proteasa del VIH-1 y que están relacionados con la resistencia a drogas antirretrovirales.
2. Determinar la prevalencia de la transmisión de resistencia a drogas antirretrovirales aplicando los criterios de WHO-TDR.



Selección de Sujetos WHO-TDR

- **Criterio de inclusión (iniciales)**

- Pacientes ART-naïve

- Muestras de pacientes VIH positivo **confirmado** por pruebas serológicas o por pruebas moleculares como la PCR proviral para VIH.

- Diagnóstico reciente un año o menos. (período de colección de 12 meses)

- Edad del paciente: menor de 25 años de edad

- Muestras conservadas en archivo a -70°C y con un volumen mayor de 500 μl .

- Valores de linfocitos TCD4+ mayores a 500 células/ μl

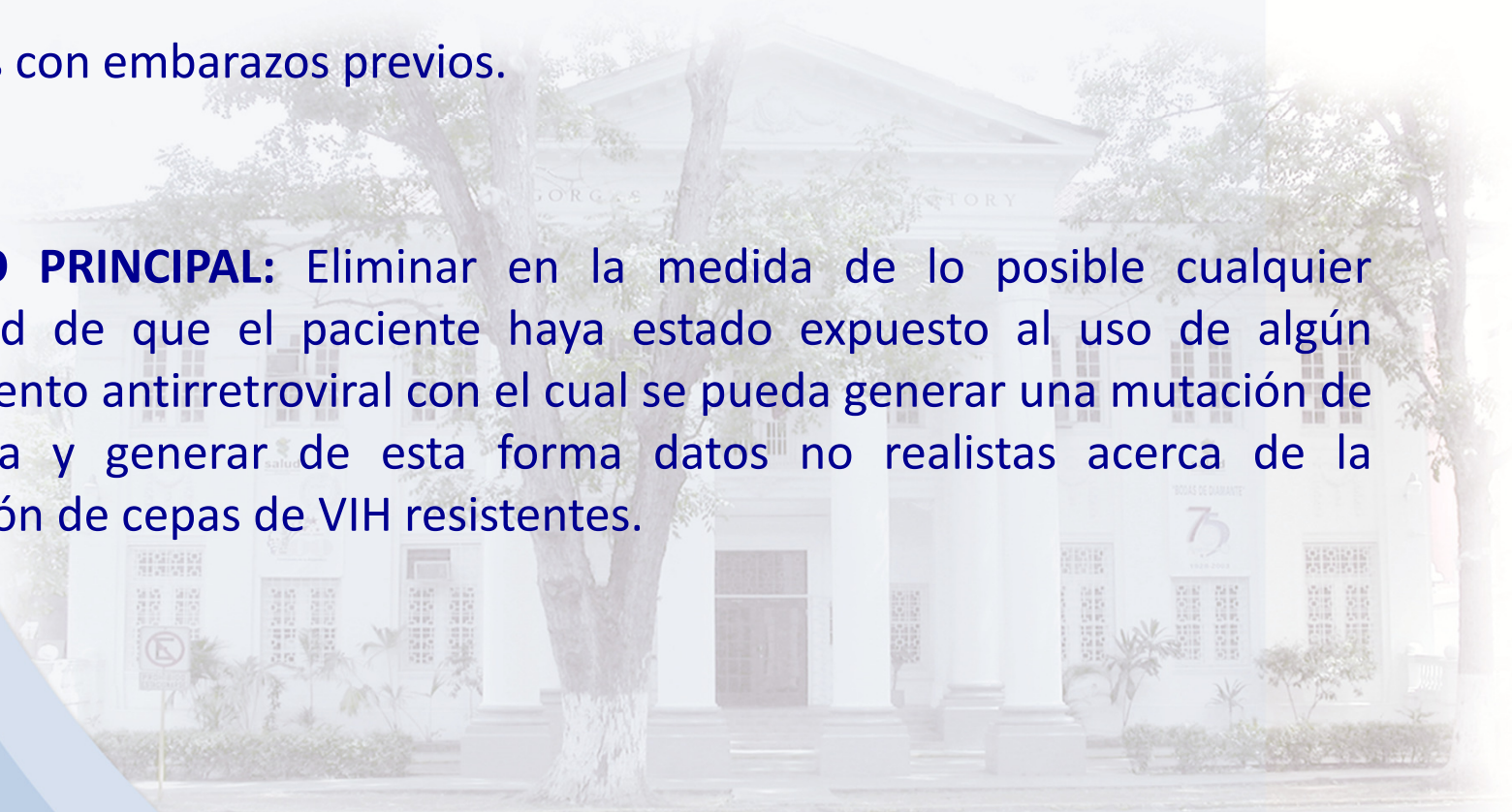
- Situación Geográfica: Ciudad de Panamá

Selección de Sujetos WHO-TDR

Criterios de Exclusión

- Pacientes que hayan o estén recibiendo tratamiento con ARV.
- Mujeres con embarazos previos.

OBJETIVO PRINCIPAL: Eliminar en la medida de lo posible cualquier posibilidad de que el paciente haya estado expuesto al uso de algún medicamento antirretroviral con el cual se pueda generar una mutación de resistencia y generar de esta forma datos no realistas acerca de la transmisión de cepas de VIH resistentes.



Selección de Sujetos WHO-TDR

- **Modificación del muestreo recomendado por WHO:**

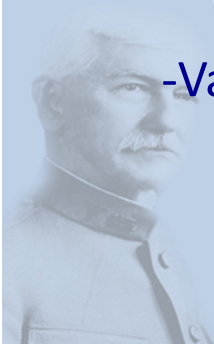
- Edad del paciente:

- WHO: menores de 25 años

- Panamá: hasta 26 años (con previa serología negativa de VIH)

- Periodo de colección de la muestra se extendió a 32 meses

- Valores de Linfocitos TCD4+ estaban en un promedio de 400 células/ μ l



Resultados

- Las muestras del estudio guardaban una relación de hombre:mujer de aproximadamente 2 a 1.
- Todas las muestras eran de pacientes que residían en la ciudad de Panamá.
- Seis pacientes mostraron una o más mutaciones asociadas a resistencia transmitida a drogas.

Original research

Castillo et al. • HIV transmitted drug resistance in Panama

TABLE 2. Epidemiological and genotyping data for 47 eligible adult HIV-infected patients selected consecutively from all HIV-positive patients attending the Gorgas Memorial Institute for Health Studies, Panama City, Panama, March 2008 to October 2010

No.	Sex	Age (years)	Diagnosis date			Mutations			
			Day	Month	Year	NRTI	NNRTI	Minor protease	Major protease
2	M	22	4	8	2008	<u>M41L</u>	None	None	None
3	M	23	1	10	2008	A62V, T215L	<u>K103N, Y181C, P225H</u>	None	None
15	M	19	1	5	2009	<u>M41L, A62V, T215F/L</u>	<u>K103N, P225H</u>	None	None
31	M	19	3	2	2010	<u>M41L</u>	None	None	None
32	M	23	1	3	2010	<u>M41L</u>	None	None	None
36	F	20	17	3	2010	None	None	<u>I85V</u>	None

Mutaciones más frecuentes: M41L y la K103N

P225H incrementa la resistencia a EFV resistance en combinación con la K103N.

Resultados de Adultos recién infectados con VIH

Gráfico # 1
Distribución de Mutaciones según Inhibidor

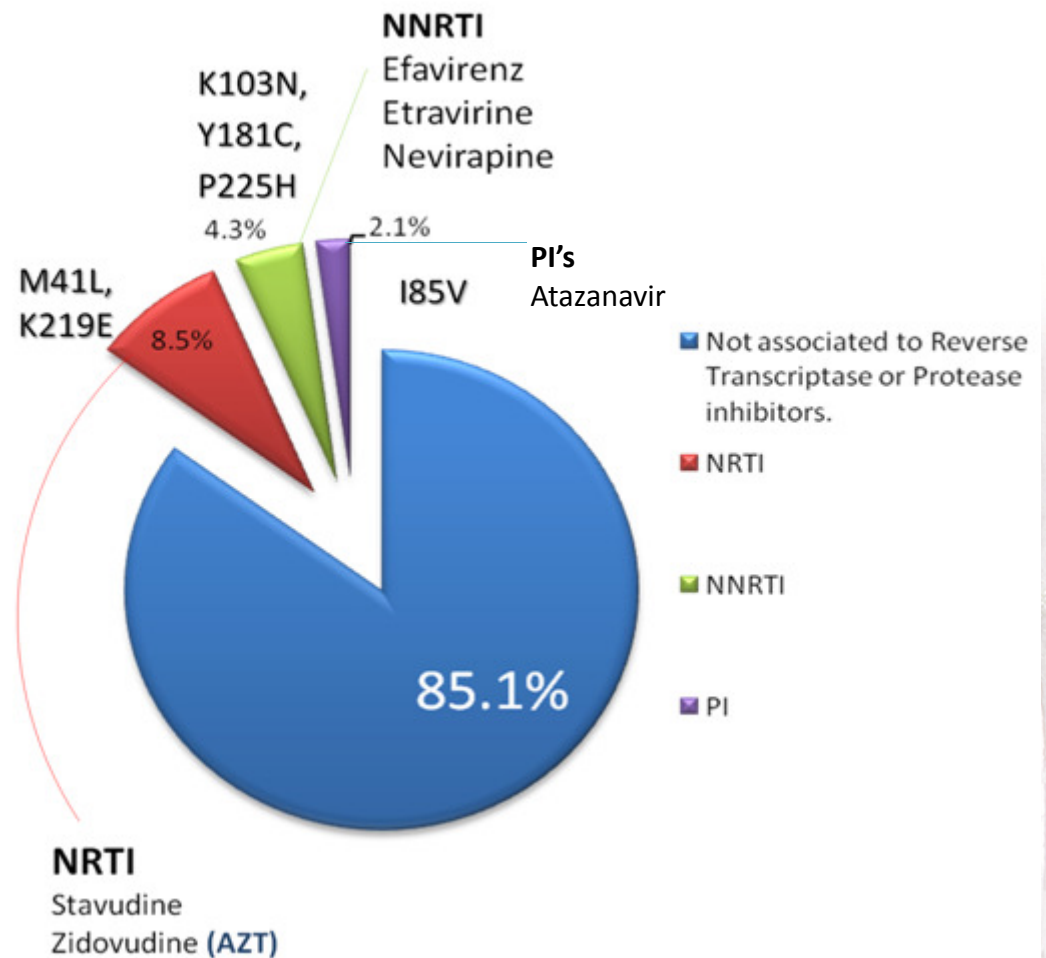
Un 12.8% de los pacientes mostró al menos una mutación asociada a resistencia transmitida a drogas ARVs.

La prevalencia de mutaciones de resistencia transmitida asociados a:

Los inhibidores nucleosídicos 8.5%,

Los inhibidores no nucleosídicos 4.3%

Los inhibidores de proteasa 2.1%



Mutaciones detectadas en adultos recién infectados y medicamentos asociados.

MUTACIÓN INTI	MEDICAMENTO	MUTACIÓN INNTI	MEDICAMENTO
• K219Q • M41L	• Stavudine, Zidavudine • Stavudine, Zidavudine	• K103N • Y181C • P225H	• Efavirenz, Nevirapine • Efavirenz, Nevirapine, Etravirine, • Efavirenz

Esquema 1: *Combivir®* (AZT 300 mg/3TC 150 mg) VO 1 tableta cada 12 horas + Efavirenz 600*

mg VO 1 tableta cada noche.

Esquema 2: *Atripla® (Emtricitabina 200mg /Tenofovir 300mg /Efavirenz 600mg) VO 1 tableta cada 24 horas.*

Resistencia Transmitida

Epidemiología molecular y vigilancia de farmacoresistencia del virus de inmunodeficiencia humana en la región mesoamericana

Avila-Ríos S¹, García-Morales C¹, Soto-Nava M¹, Mendizabal-Burastero R², Girón-Callejas A², Escobar I², Zaldívar Y³, Sosa N³, Pascale JM^{3}, Mejía-Villatoro C^{2*}, Reyes-Terán G^{1*}*

¹Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, México D. F.; ²Hospital Roosevelt, Guatemala, Guatemala; ³Instituto Conmemorativo Gorgas de la Salud, Panamá, Panamá

Cohorte de 122 individuos de Panamá con Dg reciente y no TARV. Células T CD4+ promedio de 430 células/ μ l).

Utilizando un puntaje de Stanford ≥ 15 , la prevalencia global de TDR fue de 8.2%).

La prevalencia de mutaciones para resistencia a NNRTIs fue la más alta (5.7%), seguida por NRTIs (2.6%).

El subtipo B fue el más prevalente pero también BF.

Resistencia en sujetos no tratados

De los 242 sujetos incluídos del 2007 hasta el 2012, 39 (16%) presentaron mutaciones asociadas a resistencia, que es ligeramente superior a lo observado usando el cálculo de WHO-TDR.

Esto podría asociarse al hecho de que un grupo de pacientes, especialmente de los primeros años, llegaron en fase SIDA. Actualmente esto ha cambiado.

Las mutaciones más frecuentes estaban asociadas a resistencia a INNTI, en su mayoría, a INTI o a ambos, y muy pocas mutaciones para la proteasa.

Resistencia Transmitida

Detectamos una resistencia transmitida moderada entre 5% y 15%. Estos datos concuerdan con lo observado por Ávila et al. para Panamá (TR:8.5%)

Necesidad de estudios de RT en grupos de riesgo.

Mutaciones INNTR fueron las más comunes.
Mutaciones a IP son infrecuentes.

Importante revisar los criterios de WHO para TDR de tal manera que puedan usarse en países con prevalencias menores del 1% y poblaciones pequeñas

Agradecimientos

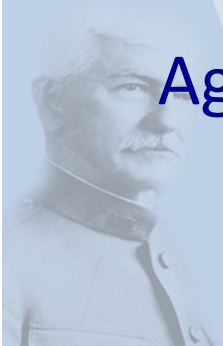
SENACYT y al GORGAS.

NETROPICA (Ivette Lorenzana).

Horacio Salomón en IRS-VIH, Buenos Aires.

Santiago Ávila y Gustavo Reyes-Terán INER-CIENI.

Agencia Internacional de Energía Atómica.



GRACIAS-OBRIGADO

