

Estudio de sensibilidad *in vitro* del virus herpes simple a aciclovir y foscarnet. ¿Son necesarios los estudios de sensibilidad de forma rutinaria?

Isabel Losada^a, Ángeles Cañizares^a, Teresa Hellín^b, Paloma Martí-Belda^b y Antonio Guerrero^c

^aServicio de Microbiología. Complejo Hospitalario Juan Canalejo. A Coruña.

^bServicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Ramón y Cajal. Madrid.

^cServicio de Microbiología. Hospital de la Ribera. Alzira. Valencia.

FUNDAMENTOS. El objetivo de este estudio es conocer la prevalencia de resistencias del virus herpes simple (VHS) a aciclovir y foscarnet.

PACIENTES Y MÉTODO. Se realizó un estudio de sensibilidad *in vitro* a VHS aislados de pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y no infectados por el VIH (grupo control) mediante una prueba de cribado cualitativo. Cuando la prueba de cribado fue positiva se utilizó el método de reducción de efecto citopático para calcular la DI_{50} . Se consideró sensibilidad al aciclovir a una $DI_{50} < 1 \mu\text{g/ml}$; una sensibilidad intermedia al aciclovir, a una $DI_{50} 1-2 \mu\text{g/ml}$ y resistente, a $DI_{50} \geq 2 \mu\text{g/ml}$. Se consideró resistencia al foscarnet a $DI_{50} \geq 100 \mu\text{g/ml}$.

RESULTADOS. Se estudiaron 84 cepas de VHS de 49 pacientes con infección por el VIH y 19 de un grupo control. En el grupo control no existió ninguna cepa resistente al aciclovir y la infección sólo recurrió en un paciente. Los enfermos infectados por el VIH tuvieron una cepa resistente a aciclovir y una cepa moderadamente resistente a este fármaco, con una buena respuesta al tratamiento. En este grupo, el 24,4% de los pacientes tuvo recurrencia de la infección. No se detectaron resistencias al foscarnet.

CONCLUSIONES. La tasa de VHS resistente al aciclovir es muy baja y no se detectó resistencia al foscarnet. La baja tasa de resistencia no justificaría la realización rutinaria de la prueba de sensibilidad *in vitro* de antivíricos frente al VHS.

Palabras clave: Virus herpes simple. Aciclovir. Foscarnet. Resistencia.

In vitro susceptibility study of herpes simplex virus to acyclovir and foscarnet. Are routine susceptibility studies necessary?

BACKGROUND. The objective of this study was to investigate the prevalence of resistance of herpes simplex virus to acyclovir and foscarnet.

PATIENTS AND METHOD. An *in vitro* susceptibility study of HSV strains isolated from HIV-infected and non-infected (control group) patients was conducted by means of qualitative screening. When the screening results were positive, the method for reducing cytopathic effect was utilized for calculating ID₅₀. An ID₅₀ < 1 $\mu\text{g/ml}$ indicated susceptibility to acyclovir, ID₅₀ 1-2 $\mu\text{g/ml}$ was intermediate susceptibility to acyclovir and a value of ID₅₀ $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ denoted resistance. Resistance to foscarnet was considered at ID₅₀ $\geq 100 \mu\text{g/ml}$.

RESULTS. The study involved investigating 84 HSV strains, 49 HIV-infected patients, and 19 control patients. In the control group, no strains resistant to acyclovir were present and infection recurred in only one patient. In patients with HIV infection, one acyclovir resistant strain was detected and one moderately resistant to acyclovir, with good response to acyclovir treatment. In this group, 24.4% of patients presented recurrent infection. No resistance to foscarnet was detected.

CONCLUSION. Percentage of HSV strains resistant to acyclovir is very low and resistance to foscarnet was not detected. These data suggest that routine *in vitro* susceptibility testing of antiviral drugs against HSV does not seem to be necessary.

Key words: Herpes simplex virus. Acyclovir. Foscarnet. Resistance.

Introducción

Las infecciones por VHS son comunes en pacientes inmunodeprimidos. El aciclovir (o su profármaco) es el tratamiento de elección y, en caso de falta de respuesta, el foscarnet es el tratamiento alternativo. Se han obtenido cifras del 4,7-15% de resistencias al aciclovir¹⁻³ y también se han descrito resistencias al foscarnet⁴. La cifra de

Este trabajo ha sido financiado con un Proyecto FIS-96-0030-01.

Correspondencia: Dra. I. Losada Castillo.
Servicio de Microbiología. Complejo Hospitalario Juan Canalejo.
Ctra. de As Xubias, 84. 15006 A Coruña.
Correo electrónico: isabelllosada@hotmail.com

Manuscrito recibido el 3-04-2001; aceptado el 19-07-2001.

resistencias al aciclovir hallada por Englund et al¹ del 4,7% se obtuvo en pacientes inmunocomprometidos de los que los infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) suponían el 6,8%. Así mismo, obtuvo el mayor porcentaje de resistencias en pacientes trasplantados de medula ósea en los que la resistencia a aciclovir alcanzó cifras del 14%. Por otra parte, Safrin et al⁵ estudiaron 243 aislados de pacientes infectados por el VIH y en el 66% de los enfermos se aisló VHS resistente al aciclovir.

El objetivo de este estudio es conocer la prevalencia de resistencia *in vitro* a aciclovir y foscarnet de VHS aislados de muestras clínicas de pacientes infectados por el VIH en nuestro medio, así como comparar las tasas de resistencias a aciclovir y foscarnet de estos pacientes con un grupo control de enfermos no infectados por el VIH.

Pacientes y método

Se analizaron los VHS aislados de todos los pacientes que acudieron a la consulta de enfermedades de transmisión sexual del Hospital Ramón y Cajal de Madrid entre noviembre de 1994 y febrero de 1998, infectados y no infectados por el VIH. También se estudiaron otros aislamientos de VHS del Hospital Ramón y Cajal de Madrid en pacientes infectados y no infectados por el VIH entre 1994 y 1998. Tres cepas procedieron de los hospitales La Paz y La Princesa de Madrid y Miguel Servet de Zaragoza. Se estudiaron todas las cepas aisladas en el Hospital Juan Canalejo de A Coruña en 1998.

Las variables analizadas fueron: recurrencia de la infección, tipo de muestra y tipo de VHS aislado. Se recogieron muestras clínicas de los pacientes con sospecha de infección que fueron sembrados en células MRC-5. Cuando se produjo un efecto citopático compatible con VHS se identificaron mediante inmunofluorescencia directa (IFD) utilizando anticuerpos monoclonales para VHS 1 y 2 (Syva Microtrack).

Las pruebas de sensibilidad frente a aciclovir y foscarnet de los VHS se realizaron en células VERO mediante un método de cribado cualitativo descrito previamente^{6,7}, que se realizó en placas de 96 pocillos. Se utilizaron concentraciones de aciclovir de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y de foscarnet de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se realizaron diluciones de VHS desde uno hasta 10^{-7} . Se observó el efecto citopático y se comparó con una columna control sin antivírico. Cuando la prueba de cribado fue positiva se realizó el método de reducción de efecto citopático, según se ha descrito con anterioridad⁸.

Se utilizaron como criterios de sensibilidad los descritos por Safrin et al⁹, que definen la resistencia a aciclovir cuando la $\text{DI}_{50} \geq 2 \mu\text{g}/\text{ml}$ y la resistencia al foscarnet cuando la $\text{DI}_{50} \geq 100 \mu\text{g}/\text{ml}$. Se consideró que existía una sensibilidad intermedia cuando $\text{DI}_{50} = 1-2 \mu\text{g}/\text{ml}$.

TABLA 1. Resumen de los resultados del grupo control y del grupo de infectados por el VIH

	Grupo control	Infectados por el VIH
Cepas estudiadas	19	65
Pacientes estudiados	19	49
Cepas sensibles al ACV	19 (100%)	63 (96,9%)
Cepas sensibles al FOS	19 (100%)	65 (100%)
Cepas resistentes al ACV	–	1 (1,53%) $\text{DI}_{50} = 6,45 \mu\text{M}$
Cepas moderadamente resistentes al ACV	–	1 (1,53%) $\text{DI}_{50} = 1,22 \mu\text{M}$
Cepas resistentes al FOS	–	–
Recidiva de la infección	1	12

ACV: aciclovir; FOS: foscarnet; DI_{50} : dosis inhibitoria del 50%.

Resultados

Se estudiaron 84 cepas de VHS correspondientes a 68 pacientes, de los cuales 49 estaban infectados por el VIH y 19 no lo estaban. Las cepas correspondieron a VHS-1 ($n = 28$) y a VHS-2 ($n = 56$).

De los pacientes no infectados por el VIH, once procedieron de la consulta de enfermedades de transmisión sexual, cinco de consulta de dermatología, uno de la unidad de cuidados intensivos y otro había recibido un trasplante de medula ósea.

Las muestras clínicas de las que procedieron los aislamientos fueron: 43 úlceras genitales, 12 úlceras/exudados no filiados, 9 lesiones orales, 9 exudados anales/rectales, 4 muestras del tracto respiratorio, 3 orinas, una sangre, un exudado de piel, un exudado uretral y una biopsia esofágica.

En los pacientes sin infección por el VIH, la sensibilidad a aciclovir y foscarnet fue del 100% de las cepas ($n = 19$). Se observó sólo una recurrencia de la infección en un paciente sin infección por el VIH durante el período del estudio.

Los pacientes infectados por el VIH presentaron sensibilidad a foscarnet en el 100% de las cepas ($n = 65$), mientras que el 96,9% ($n = 63$) de las cepas fueron sensibles a aciclovir, el 1,53% ($n = 1$) fue moderadamente resistente y el 1,53% ($n = 1$) fue resistente. La cepa con resistencia moderada ($\text{DI}_{50} = 1,22 \mu\text{M}$) procedió de un paciente con infección por el VIH con lesiones y aislamiento de VHS-1 en diferentes localizaciones, que no había recibido antivíricos con anterioridad y que fue tratado con aciclovir con buena respuesta al tratamiento. La cepa resistente a aciclovir, VHS-2, con $\text{DI}_{50} = 6,45 \mu\text{M}$, procedió de un paciente con infección por el VIH, sin clínica, que había sido tratado con aciclovir con buena respuesta en un episodio de enfermedad previo. El 81% de los pacientes infectados por el VIH procedentes de la consulta de enfermedades de transmisión sexual no habían tomado tratamiento antivírico previo. Doce de los pacientes con infección por el VIH tuvieron recurrencia de la infección (tabla 1).

Discusión

La prevalencia de la resistencia a aciclovir del VHS en la población estudiada es muy baja y no se observó resistencia al foscarnet. El aciclovir, de acuerdo con nuestra experiencia, continúa siendo, por tanto, una terapia eficaz frente a las infecciones por VHS, incluso en pacientes infectados por el VIH.

Estos datos contrastan con otros de la bibliografía española y muy concretamente con las experiencias en los Hospitales 12 de Octubre² y Gregorio Marañón³ de Madrid. Cotarelo³ estudió la sensibilidad de VHS en 219 pacientes, de los que 113 estaban infectados por el VIH y 116 no lo estaban (57 enfermos habían recibido un trasplante de órgano sólido), y encontró un 12,9% de cepas resistentes a aciclovir y un 2,42% de cepas resistentes al foscarnet en los pacientes infectados por el VIH, diferencia no atribuible al tipo de técnica empleada, ya que utilizó una técnica rápida de cribado similar a la empleada por nosotros. Quizá esta diferencia podría deberse a que las cepas estudiadas por este autor fueron aisladas en el

período 1991-1995, cuando los fármacos antirretrovíricos no estaban tan desarrollados y el grado de inmunodepresión de los pacientes era mayor. Este autor estudió a 12 pacientes infectados por el VIH con cepas resistentes al aciclovir y 12 positivos para el VIH con cepas sensibles a aciclovir, y encontró que la media de los linfocitos CD4/mm³ fue de 44 frente a 62; además, el 91,7 frente al 8,3% habían recibido tratamiento previo con aciclovir. En el caso de la experiencia del Hospital 12 de Octubre, Gimeno² estudió a 198 pacientes, de los cuales sólo el 26,8% estaba infectados por el VIH y el resto eran trasplantados de órgano sólido o enfermos hematológicos, por lo que su población globalmente difiere de la nuestra. Además utilizó, para determinación de la sensibilidad, un método diferente al nuestro (Hybriwix Probe System). Este grupo encontró un 9,1% de resistencia a aciclovir, que se elevaba al 15,1% en el caso de los pacientes infectados por el VIH. Al igual que nosotros, no encontraron ninguna cepa resistente al foscarnet. Como en la población de infectados por el VIH del Hospital Gregorio Marañón, en el 12 de Octubre el 54,7% tenía recuentos de linfocitos CD4 menores a 50/mm³ y el 77,4% de los linfocitos CD4 respecto al total de linfocitos fue menor al 12%. En nuestros pacientes, el grupo de infectados por el VIH pertenecientes a la consulta de enfermedades de transmisión sexual tenían una media de CD4 de 100,23 ± 91,8/mm³ (datos no expuestos).

La cepa resistente a aciclovir, en nuestro estudio, no se asoció a manifestaciones clínicas y la moderadamente resistente tuvo buena respuesta al tratamiento. El paciente en el que se aisló la cepa resistente había sido tratado con aciclovir con anterioridad, y el tratamiento previo con aciclovir se describe como un factor de riesgo de resistencia del VHS según varios autores¹⁻³. Las discrepancias clinicoviroológicas (respuesta clínica con resistencia *in vitro* al fármaco) se han referido en la bibliografía^{1,2,8}. La correlación entre los resultados de sensibilidad *in vitro* a los antimicrobianos y la respuesta clínica es más estrecha cuando el grado de resistencia es elevado. Como describe Gimeno², se encuentra una variabilidad en la respuesta clínica entre cepas moderadamente sensibles (a partir de DI₅₀ = 1 µg/ml de aciclovir), ya que éstas responden a dosis aumentadas de aciclovir, y las resistentes que no responden a aciclovir. Por ello, hemos incluido el criterio de cepas de sensibilidad intermedia al aciclovir, que Safrin et al no habían considerado⁹.

Las recurrencias de la infección en pacientes positivos para el VIH está determinada por factores del huésped (como la inmunodepresión) y de la cepa. En los pacientes

sin infección por el VIH existieron menos recurrencias. En los pacientes inmunodeprimidos, las resistencias de VHS están incrementadas^{2,10}, sobre todo en infectados por el VIH³, probablemente por haber recibido tratamientos previos. El hecho de que en el grupo estudiado de pacientes infectados por el VIH procedentes de una consulta de enfermedades de transmisión sexual un 81% no tenga el factor de riesgo de haber tomado tratamiento antivírico previo, podría justificar la baja prevalencia de resistencia en nuestra población. Las 2 cepas resistentes en este estudio correspondieron a pacientes infectados por el VIH y no se detectaron cepas resistentes en el grupo control.

El VHS-2 se ha asociado con una mayor prevalencia de resistencia². En este estudio, la cepa resistente fue VHS-2 y la moderadamente resistente fue VHS-1. El 66,6% de las cepas fueron VHS-2, pues la mayoría de los pacientes procedieron de una consulta de enfermedades de transmisión sexual.

El aciclovir continúa siendo la terapia de elección en las infecciones por VHS, ya que las tasas de resistencia son bajas. Se han desarrollado nuevos fármacos que no necesitan de la timidincinasa vírica para ser activados y que pueden ser candidatos en el caso de resistencias al aciclovir, como son foscarnet y cidofovir¹¹. La baja tasa de resistencia encontrada no justificaría la realización de forma rutinaria de pruebas de sensibilidad *in vitro* de antivíricos frente a VHS.

Bibliografía

- Englund JA, Zimmerman ME, Swierkosz EM, Goodman JL, Scholl DR, Balfour HH. Herpes simplex resistant to acyclovir. Ann Intern Med 1990;112: 416-22.
- Gimeno C. Virus herpes simplex resistentes a drogas antivirales: incidencia y significación clínica en pacientes inmunocomprometidos. [Tesis doctoral]. Madrid: Facultad de Medicina, Universidad Complutense, 1996.
- Cotarelo M. Virus herpes simplex: estudio de sensibilidad *in vitro* frente a antivirales en un hospital general. [Tesis doctoral.] Madrid: Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, 1997.
- Safrin S, Kemmerly S, Plotkin B, Smith T, Weissbach N, Veranez D, et al. Foscarnet-resistant herpes simplex virus infection in patients with AIDS. J Infect Dis 1994;169:193-6.
- Safrin S, Elbeik T, Phan L, Robinson D, Rush J, Elbaggari A, et al. Correlation between response to acyclovir and foscarnet therapy *in vitro* susceptibility result for isolates of herpes simplex virus from human immunodeficiency virus infected patients. Antimicrob Agents Chemother 1994;38: 1246-50.
- Safrin S, Elbeik T, Mills J. Rapid screen test for *in vitro* susceptibility of clinical herpes simplex virus isolates. J Infect Dis 1994;169:879-82.
- Tebas P, Scholl D, Jollick J, McHarg K, Arens M, Olivo PD. A rapid assay to screen for drug-resistant herpes simplex virus. J Infect Dis 1998;177: 217-20.
- Antiviral Susceptibility Testing. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Isenberg: American Society for Microbiology, 1992.
- Safrin S, Elbeik T, Phan L, Robinson D, Rush J, Elbaggari A, et al. Correlation between response to acyclovir and foscarnet therapy and *in vitro* susceptibility result for isolates of herpes simplex virus from human immunodeficiency virus-infected patients. Antimicrob Agents Chemother 1994;38: 1246-50.
- Snoeck R. Antiviral therapy of herpes simplex. Int J Antimicrob Agents 2000;16:157-9.
- Reusser P. Herpesvirus resistance to antiviral drugs: a review of the mechanisms, clinical importance and therapeutic options. J Hosp Infect 1996; 33:235-48.