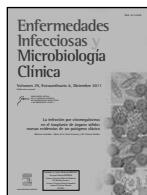




Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Estudios de resistencia. ¿Cuándo están indicados?

M. Ángeles Marcos

Servicio de Microbiología, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, España

RESUMEN

Palabras clave:

Citomegalovirus
Resistencia
Antivirales

La resistencia del citomegalovirus (CMV) a los antivirales es un problema emergente y obedece a la selección de mutaciones en el genoma del virus. La resistencia al ganciclovir es la más frecuente y más estudiada; sin embargo se ha descrito resistencia a todos los antivirales. Son factores de riesgo para el desarrollo de resistencias la ausencia de inmunidad preexistente para CMV, los receptores de pulmón y páncreas, las cargas virales altas, el intenso tratamiento inmunosupresor concomitante y la exposición prolongada o a valores subóptimos de ganciclovir. Se debe sospechar resistencia a los fármacos antivirales cuando, a pesar de una adecuada exposición al tratamiento durante 2 semanas, se detecta la presencia de cargas virales progresivas o estables, o se observa persistencia de síntomas clínicos. Sin embargo, no todos los fallos clínicos que aparecen durante el tratamiento pueden ser atribuidos a resistencia viral ni tampoco la presencia de resistencia debe ir asociada siempre a mala evolución clínica. Ante la sospecha de resistencia, es necesaria su confirmación mediante métodos fenotípicos o genotípicos. La mutación en el gen *UL97* es la más frecuente, en este caso el virus no es susceptible al ganciclovir pero sí a foscarnet y cidofovir. No es excepcional la mutación en *UL54*, de forma aislada o en combinación con *UL97*, asociándose en este último caso a multirresistencia y resistencia de alto grado. La detección precoz de la presencia de resistencias es fundamental para prevenir una evolución desfavorable y la aparición de multirresistencia. En los pacientes con respuesta lenta al tratamiento que no presentan mutaciones asociadas a resistencia, se recomienda realizar valores plasmáticos de ganciclovir así como estudio de inmunidad CMV-específica.

© 2011 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Resistance studies: when are they indicated?

ABSTRACT

Keywords:
Cytomegalovirus
Resistance
Antiviral agents

Cytomegalovirus (CMV) resistance to antiviral drugs is an emerging problem and is due to selection of mutations in the viral genome. Although ganciclovir resistance is the most common and widely studied, there is resistance to all antiviral agents. Risk factors for the development of resistance are the absence of preexisting immunity to CMV, lung and pancreas transplantation, high viral loads, intense concomitant immunosuppressive therapy and prolonged exposure to ganciclovir or suboptimal levels of this drug. Antiviral resistance should be suspected when, despite adequate treatment exposure for 2 weeks, an increase in viral load, or persistence or clinical progression of CMV disease are detected. However, failure to respond cannot always be attributed to antiviral resistance nor does resistance always lead to poor clinical outcome. When resistance is suspected, phenotypic and genotypic confirmation is required. The most common mutations are those in the *UL97* gene, which confers ganciclovir resistance. However, foscarnet and cidofovir can be used. The *UL54* mutation is not uncommon, whether alone or in combination with *UL97* mutations. The combination of *UL54* and *UL97* mutations is associated with high-grade and multiple resistance. Early detection of resistance is essential to prevent unfavorable outcome and the development of multi-drug resistance. In patients with a slow response to treatment and without mutations associated with resistance, plasma ganciclovir levels and specific CMV immunity should be investigated.

© 2011 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La resistencia del citomegalovirus (CMV) a los antivirales es un problema emergente en el paciente trasplantado de órgano sólido (TOS), cuya incidencia puede llegar al 5-10%, siendo menos frecuente en los trasplantados de riñón y alcanzando los porcentajes más altos entre los receptores de pulmón y de riñón-páncreas¹⁻³.

La resistencia del CMV a los antivirales obedece a la selección de mutaciones en el genoma del virus. El ganciclovir (GCV) ha sido el antiviral de elección para la profilaxis y el tratamiento de la enfermedad por CMV, de manera que la mayor parte de los estudios se refieren a la resistencia al GCV; sin embargo, se ha descrito igualmente la aparición de resistencias a cualquiera de los antivirales utilizados⁴.

Factores de riesgo y consecuencias clínicas

El factor de riesgo más importante que favorece la aparición de resistencia en el TOS es la ausencia de inmunidad preexistente para CMV (receptor seronegativo y donante seropositivo); sin embargo, se han descrito casos de resistencia en receptores seropositivos^{1,5}. Por tanto, existe otra serie de factores implicados, como: la prolongada exposición al antiviral; las concentraciones plasmáticas o tisulares subóptimas de GCV; los tratamientos intermitentes; las cargas virales altas, y la inmunosupresión intensa. Generalmente, esta última se acompaña de una replicación viral persistente, la cual en presencia de antiviral es la condición fundamental para la aparición de resistencia⁵. De hecho, hay una relación bidireccional entre carga viral y desarrollo de resistencia, ya que las cargas virales más altas son más difíciles de suprimir⁶. En la práctica clínica, no es raro que en un mismo paciente confluyan varios de estos factores¹.

Aunque no hay estudios que comparen directamente la evolución clínica en los pacientes con cepas de CMV resistentes y aquellos con cepas sensibles, la presencia de cepas resistentes se ha asociado frecuentemente a enfermedad invasiva, disfunción progresiva y rechazo del órgano trasplantado, e incluso a una elevada mortalidad, que puede llegar hasta el 69%⁷.

Se ha descrito una mayor incidencia de resistencia al GCV en pacientes que desarrollan enfermedad tardía por CMV³.

Sin embargo, no todos los fallos clínicos que aparecen durante el tratamiento pueden ser atribuidos a resistencia viral por adquisición

de mutaciones en el genoma viral^{2,8}. Ni tampoco la presencia de resistencia debe ir asociada siempre a mala evolución clínica³.

Mecanismos de resistencia

Actualmente existen fundamentalmente 3 antivirales para el tratamiento de las infecciones por CMV: GCV (su profármaco oral, vanganciclovir), foscarnet (FOS) y cidofovir (CDV), siendo el GCV el más utilizado. Estos compuestos inhiben la síntesis del ADN del CMV actuando sobre la ADN polimerasa viral⁹. El GCV debe ser fosforilado 3 veces para ser un compuesto activo; la primera fosforilación la realiza una proteíncinasa codificada por el gen *UL97* del CMV, y las 2 siguientes las realizan enzimas celulares. El GCV-trifosfato es un inhibidor competitivo del substrato de la ADN polimerasa del CMV y se incorpora al ADN viral, inhibiendo la replicación viral. El FOS es un inhibidor no competitivo de la ADN polimerasa del CMV que no requiere activación intracelular para desarrollar su efecto antiviral y que no se incorpora a la cadena de ADN viral. El CDV, al igual que el GCV, debe ser fosforilado para ser activo; es un inhibidor competitivo de la ADN polimerasa del CMV y se incorpora al ADN viral, pero su fosforilación se realiza exclusivamente por enzimas celulares (fig. 1).

La resistencia del CMV a los antivirales se debe fundamentalmente a mutaciones en el gen que codifica la proteíncinasa viral (gen *UL97*) y de manera menos frecuente, pero no excepcional, a mutaciones en el gen que codifica la ADN polimerasa viral (gen *UL54*)⁵. Si sólo existen mutaciones en *UL97*, los virus no son susceptibles a GCV pero sí a CDV y FOS. Si aparecen mutaciones en el gen *UL54* puede haber resistencia a uno o a todos los antivirales (GCV, CDV, FOS). Es posible la existencia conjunta de mutaciones en *UL97* y *UL54*, lo cual confiere un alto grado de resistencia y de reacciones cruzadas a varios antivirales⁵. Existe un número considerable de mutaciones desconocidas y de polimorfismos presentes, fundamentalmente en el gen *UL54*, que no confieren ningún efecto negativo en el virus³.

La mayor parte de las mutaciones en *UL97* responsables de resistencia al GCV se encuentran principalmente en los codones 460, 520 y 590-607. Las mutaciones M460V/I, C592G, A594V, L595S y C603W son las más frecuentes y confieren un alto grado de resistencia para GCV, excepto la mutación C592G que se considera una resistencia de grado bajo. Con respecto al gen *UL54*, el estudio de mutaciones debe-

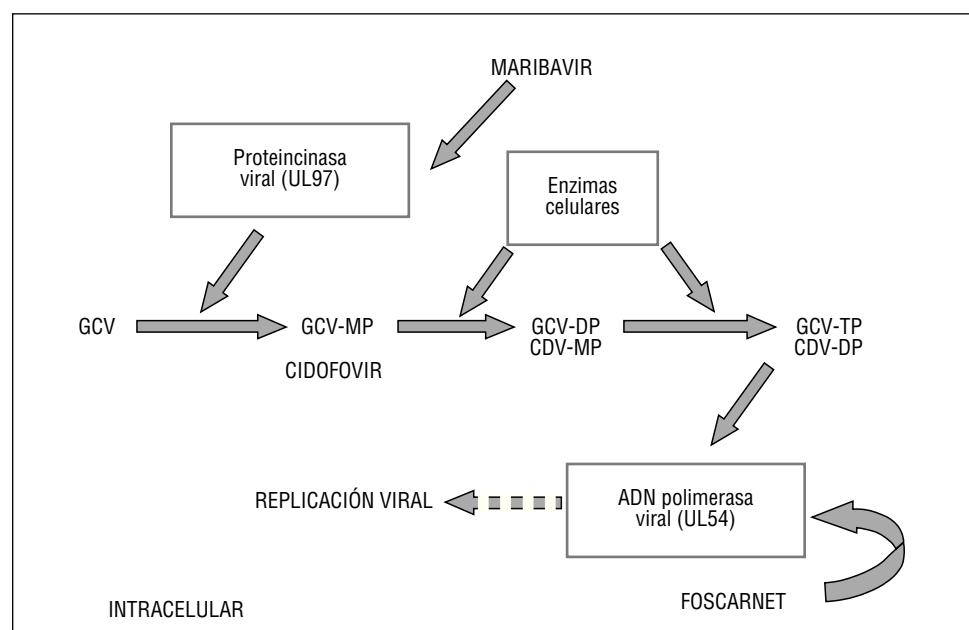


Figura 1. Mecanismos de acción de los antivirales anti-citomegalovirus. CDV: cidofovir; GCV: ganciclovir.

Tabla 1

Principales mutaciones asociadas a resistencia del citomegalovirus a los antivirales

Gen estudiado	Antivirales	Codones asociados con resistencia
UL54	FOS	495, 700, 715, 756, 838
	GCV, CDV	301, 408, 410, 412, 413, 501, 503, 513, 516, 521, 522, 545, 987
	GCV, FOS	776, 781, 787, 802, 809, 821
	GCV, FOS, CDV	588, 812, 813, 834, 841, 981
	CDV	805
UL97	GCV	405, 460, 466, 520, 590-607*
	Maribavir	353, 397, 409, 411

CDV: cidofovir; FOS: fosfarnet; GCV: ganciclovir.

*No todos los cambios en las secuencias entre 590 y 607 están asociados a resistencia.

rá ser más extenso y abarcar entre los codones 300 y 1.000. En el 85-95% de los pacientes, la resistencia a GCV resulta inicialmente de mutaciones en *UL97* y si el antiviral se sigue administrando pueden aparecer también mutaciones en *UL54*, de manera que la magnitud de la resistencia aumenta, ya que podría haber resistencia cruzada a FOS y CDV^{4,10} (tablas 1 y 2).

Cuándo está indicado realizar estudio de resistencias. Métodos disponibles

Durante las primeras 2 semanas de tratamiento puede objetivarse un aumento de la antigenemia o de la ADNemia en más de dos tercios de los pacientes, sin que ello suponga la presencia de cepas resistentes¹¹. Por ello, en estos casos no se encuentra indicada la realización de estudios de resistencia.

La resistencia a los fármacos antivirales deberá sospecharse ante la presencia de cargas virales progresivas o estables (resistencia virológica) o ante la persistencia de síntomas clínicos tras 2 semanas del inicio de un tratamiento antiviral adecuado (resistencia clínica). La resistencia clínica no necesariamente se acompaña de resistencia virológica, ya que puede estar originada por la presencia de factores relacionados con la respuesta inmune del receptor¹² o bien debido a que no se alcancen los valores adecuados del antiviral a nivel plasmático y/o tisular. Por ello, en los pacientes que presentan respuesta lenta al tratamiento y no tienen mutaciones asociadas a resistencia en el estudio virológico del CMV, sería aconsejable realizar la determinación de los valores plasmáticos de GCV^{13,14} así como el estudio de la inmunidad CMV- específica.

La detección precoz de la presencia de resistencias a los fármacos antivirales es fundamental para prevenir una evolución desfavorable y la aparición de multirresistencia, y debe confirmarse mediante métodos fenotípicos o genotípicos.

Métodos fenotípicos

Los métodos fenotípicos, entre los que se encuentra el método de reducción de placas como método de referencia, consisten en determinar la reducción de la replicación viral en presencia de concentraciones crecientes de antiviral sobre monocapas celulares infectadas con una suspensión titulada del virus. Estos métodos miden la concentración de antiviral necesaria para inhibir el 50% del crecimiento viral (IC_{50}). Los estudios fenotípicos requieren el aislamiento previo del virus, por lo que la limitación fundamental es el tiempo requerido hasta la obtención de resultados; además, su falta de estandarización condiciona variabilidad en ellos. Estos métodos deben reservarse para estudiar la sensibilidad *in vitro* a un antiviral, para caracterizar mutaciones no descritas previamente o para conocer el efecto combinado de varias de ellas¹⁵.

En el caso de detectar mutaciones no conocidas o no asociadas a un determinado perfil de resistencia, su caracterización *in vitro* se debe realizar mediante estudios fenotípicos recombinantes, que consisten en la transfección de la mutación de interés en el genoma de una cepa de referencia sensible para estudiar su patrón de resistencia fenotípico¹⁶.

Métodos genotípicos

Los métodos genotípicos son los más frecuentemente utilizados y consisten en la detección de mutaciones genéticas asociadas a resistencia. El método de elección consiste en la amplificación de regiones del genoma específicas del virus seguido de secuenciación. Esta técnica puede realizarse a partir de una cepa de CMV aislada en cultivo o, de forma más sencilla, directamente de muestra clínica, obteniéndose así los resultados en 2-3 días. Hay que tener en cuenta que la carga viral debe ser al menos de 1.000 copias/ml para obtener resultados. Las principales limitaciones de los métodos genotípicos radican en que no proporcionan un resultado cuantitativo y en la dificultad en su interpretación, ya que pueden detectarse mutaciones irrelevantes que no confieren resistencia^{17,18}.

La detección de las mutaciones más frecuentes mediante PCR a tiempo real o con la utilización de microchips de ADN es una opción rápida como método de cribado antes de la secuenciación; sin embargo, no nos permite conocer la presencia de otras mutaciones¹⁹.

Actitud frente al citomegalovirus resistente a ganciclovir

Ante la sospecha de resistencia, las decisiones terapéuticas deberían basarse en el análisis genotípico de los genes *UL97* y *UL54*, el estado inmune del paciente y la gravedad de la enfermedad. En algunos pacientes, sobre todo en los que no refieren una exposición prolongada a antivirales, la disminución de la terapia inmunosupresora puede ser una medida eficaz. Sin embargo, dependiendo de la severidad de la enfermedad por CMV, puede ser necesario instaurar un

Tabla 2Diferentes niveles de resistencia a ganciclovir (GCV) en mutaciones en *UL97*

Mutaciones (ejemplos)	GCV IC_{50} ratio*	Interpretación	Actitud
M460V, H520Q, A594V, L595S, C603W	5-10	Resistencia de alto grado	Cambio a FOS
C592G, A594T, L405P	2-3	Resistencia de bajo grado	Aumento de dosis de GCV. Estudiar mutaciones en <i>UL54</i> ; si está presente una mutación que confiere resistencia a GCV cambiar a FOS
N597D, L600I	< 2	Resistencia insignificante	Continuar con GCV
Q449K, H469Y, D605E	< 1,5	No resistencia a GCV	Continuar con GCV

FOS: fosfarnet; GCV: ganciclovir.

* IC_{50} cepa viral del paciente/ IC_{50} cepa viral salvaje de referencia (número de veces que aumenta la IC_{50} de la cepa del paciente respecto a la IC_{50} de la cepa salvaje, necesaria para inhibir el crecimiento del virus).

tratamiento empírico hasta que sean disponibles los resultados del estudio genotípico. Hay tratamientos alternativos empíricos que consisten en incrementar la dosis de GCV (superior a 10 mg/kg 2 veces al día para una función renal normal), asociar GCV y FOS²⁰ o administrar FOS de forma aislada.

Si el análisis genotípico revela la presencia de una mutación en *UL97* relacionada con resistencia de alto grado, la opción más adecuada es el cambio a FOS; sin embargo, si está relacionada con resistencia de bajo grado, es plausible continuar con GCV a dosis altas, siempre que se encuentre estable la función renal. En los casos en los que la mutación aparece en el gen *UL54*, que generalmente se asocia a GCV y CDV, se recomienda el cambio a FOS, ya que la resistencia cruzada a este fármaco es rara²¹. Las mutaciones responsables de resistencia a FOS generalmente sólo aparecen en pacientes que toman este fármaco (tabla 2).

En la actualidad, no disponemos de suficientes evidencias respecto al papel de los tratamientos alternativos ante la evidencia de CMV resistente a los antivirales empleados habitualmente. Sirolimus²², leflunomide²³ y artesunate²⁴ han mostrado buenos resultados en casos aislados; sin embargo, no hay suficientes evidencias acerca de su papel en el tratamiento de la infección por CMV resistente a GCV.

El reciente antiviral maribavir parece una buena opción frente a cepas resistentes a GCV²⁵. Tiene buena biodisponibilidad oral y no presenta toxicidad hematológica, renal ni hepática. Inhibe la *UL97* cinasa viral pudiendo interferir en la fosforilización de GCV, con lo cual no debería utilizarse en combinación con GCV; sin embargo, no afecta la actividad de FOS o CDV y puede administrarse conjuntamente. Se ha utilizado en casos aislados como terapia de rescate en pacientes con infección por CMV multirresistentes. Ya se ha descrito la aparición de resistencias con este fármaco²⁶.

Es necesario realizar estudios prospectivos con un mayor número de pacientes con sospecha de resistencia a los antivirales, que nos proporcionen un mejor conocimiento de los factores de riesgo asociados, de la evolución clínica de dichos pacientes, así como de la aparición de nuevas mutaciones y de la eficacia de nuevas terapias, para lo cual es imprescindible que ante la sospecha de resistencia realicemos de manera sistemática análisis genotípico del CMV.

Conflictos de intereses

La autora declara no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Limaye AP, Raghu G, Koelle DM, Ferrenberg J, Huang ML, Boeckh M. High incidence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus infection among lung transplant recipients receiving preemptive therapy. *J Infect Dis.* 2002;185:20-7.
2. Eid AJ, Arthurs SK, Deziel PJ, Wilhelm MP, Razonable RR. Emergence of drug-resistance cytomegalovirus in the era of valganciclovir prophylaxis: therapeutic implications and outcome. *Clin Transplant.* 2008;22:162-70.
3. Bouvin G, Goyette N, Rollag H, Jardine AG, Pescovitz MD, Asberg A, et al. Cytomegalovirus resistance in solid organ transplant recipients treated with intravenous ganciclovir or oral valganciclovir. *Antiviral Therapy.* 2009;14:697-704.
4. Lurain NS, Chou S. Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23:689-712.
5. Hantz S, Garnier-Geoffroy F, Mazeron M-C, Garrigue I, Merville P, Mengelle C, et al. Drug resistant cytomegalovirus in transplant recipients: a French cohort study. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65:2628-40.
6. Emery VC, Griffiths PD. Prediction of cytomegalovirus load and resistance patterns after antiviral chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:8039-44.
7. Isada CM, Yen-Lieberman B, Lurain NS, Schitz R, Kohn D, Longworth DL, et al. Clinical characteristics of 13 solid organ transplant recipients with ganciclovir-resistant cytomegalovirus infection. *Transpl Infect Dis.* 2002;4:189-94.
8. Bouv G, Goyette N, Gilbert C, Hunar A, Covington E. Clinical impact of ganciclovir-resistant cytomegalovirus infections in solid organ transplant patients. *Transpl Infect Dis.* 2005;7:166-70.
9. Mercorelli B, Sinigaglia E, Lorean A, Palù G. Human cytomegalovirus DNA replication: antiviral targets and drugs. *Rev Med Virol.* 2008;18:177-210.
10. Smith IL, Cherrington JM, Jiles RE, Fuller MD, Freeman WR, Spector SA. High level resistance of cytomegalovirus to ganciclovir is associated with alterations in both the *UL 97* and DNA polymerase genes. *J Infect Dis.* 1997;176:69-77.
11. Nichols WG, Corey L, Gooley T, Drew WL, Miner R, Huang M, et al. Rising pp65 antigenemia during preemptive anticytomegalovirus therapy after allogenic hematopoietic stem cell transplantation: risk factors, correlation with DNA load, and outcomes. *Blood.* 2001;97:867-74.
12. Kijpittayarat S, Eid AJ, Brown RA, Paya CV, Razonable RR. Relationship between toll-like receptor 2 polymorphism and cytomegalovirus disease after liver transplantation. *Clin Infect Dis.* 2007;44:1315-20.
13. Wiltshire H, Paya CV, Pescovitz MD, Human A, Domínguez E, Washburn K, et al. Pharmacodynamics of oral ganciclovir and valganciclovir in solid organ transplant recipients. *Transplantation.* 2005;79:1477-83.
14. Xu HR, Li XN, Chen WL, Liu GY, Chu NN, Yu C. A sensitive assay for simultaneous determination of plasma concentrations of valganciclovir and its active metabolite ganciclovir by LC/MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007;848:329-34.
15. Landry ML, Stanat S, Biron K, Brambilla D, Britt W, Jokela J, et al. A standardized plaque reduction assay for determination of drug susceptibilities of cytomegalovirus clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:688-92.
16. Chou S. Phenotypic diversity of cytomegalovirus DNA polymerase gene variants observed after antiviral therapy. *J Clin Virol.* 2011;50:287-91.
17. Fillet AM, Auray L, Alain S, Gourlai K, Imbert BM, Najioullah G, et al. Natural polymorphism of cytomegalovirus DNA polymerase lies in two nonconserved regions located between domains delta-C and II and between domains III and I. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:1865-8.
18. Gilbert C, Bouvin G. Human cytomegalovirus resistance to antiviral drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:873-83.
19. Göhring K, Mikeler E, Jahn G, Rohde F, Hamprecht K. Rapid semiquantitative real-time PCR for the detection of human cytomegalovirus *UL97* mutations conferring ganciclovir resistance. *Antivir Ther.* 2008;13:461-6.
20. Mylonakis E, Kallas WM, Fishman JA. Combination antiviral therapy for ganciclovir-resistant cytomegalovirus infection in solid-organ transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 2002;34:1337-41.
21. Eckle T, Lang P, Prix L, Jahn G, Klingebiel T, Handgretinger R, et al. Rapid development of ganciclovir-resistant cytomegalovirus infection in children after allogeneic stem cell transplantation in the early phase of immune cell recovery. *Bone Marrow Transplant.* 2002;30:433-9.
22. Ozaki KS, Camara NO, Nogueira E, Pereira MG, Granato C, Melaragno C, et al. The use of sirolimus in ganciclovir-resistant cytomegalovirus infections in renal transplant recipients. *Clin Transplant.* 2007;21:675-80.
23. Eid AJ, Razonable RR. New developments in the management of cytomegalovirus infection after solid organ transplantation. *Drugs.* 2010;70:965-81.
24. Shapira MY, Resnick JB, Chou S, Neumann AU, Lurain NS, Stamminger T, et al. Artesunate as a potent antiviral agent in a patient with late drug-resistant cytomegalovirus infection after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis.* 2008;46:1455-7.
25. Strasfeld L, Lee I, Tatarowicz W, Stephen V, Chou S. Virologic characterization of multidrug-resistant cytomegalovirus infection in transplant recipients treated with maribavir. *J Infect Dis.* 2010;202:104-8.
26. Chou S, Marousek GI, Senters AE, Davis MG, Biron KK. Mutations in the human cytomegalovirus *UL27* gene that confer resistance to maribavir. *J Virol.* 2004;78:7124-30.