

VIGILANCIA DE LA RESISTENCIA ANTIRRETROVIRAL (ARV) Y VARIANTES GENÉTICAS DE VIH-1, EN CUBA. 2007-2011

Autores Principales: Vivian Kourí¹, Lissette Pérez y Yoan Alemán

Autores: Jorge Pérez, Carlos Fonseca, Yeisel Abrahantes, Carlos Aragonés, Consuelo Correa, Orlando Martínez, Lilia M. Ortega, Daniel Pérez, Jorge Campos, Alina Álvarez, Yudira Soto, Celia M. Limia, Delmis Álvarez, Jorge Pérez-Lastre, Ida González, Juan C. Millán, Clara Barrios, María I. Lantero y Jose Joanes

Colaboradores: Orlando Martínez, Kristel Van Laethem, Yoeri Schrooten, Nathalie Dekeersmaeker, Lore Vinken, Stijn Imbrechts, Gertjan Beheydt, Anne-Mieke Vandamme.

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). Autopista Novia del Mediodía Km. 6^{1/2} entre Carretera Central y Autopista Nacional Apdo. postal 601 Marianao 13. Teléf. 255355. Fax. 53 -7 204 6051

¹Autor de Correspondencia. Correo electrónico vkouri@ipk.sld.cu

Vivian Kourí Cardellá (15%). Diseño del estudio, procesamiento y análisis de las muestras.

Lissette Perez Santos (15%). Diseño del estudio, procesamiento y análisis de las muestras.

Yoan Alemán Campos (15%). Diseño del estudio, procesamiento y análisis de las muestras.

Jorge Pérez Ávila (11%). Selección de los pacientes, información clínica y análisis de resultados.

Carlos Fonseca Gómez (11%). Selección de los pacientes, información clínica y análisis de resultados.

Yeisel Abrahantes Rodríguez (6%). Selección de los pacientes no tratados, información de los pacientes, análisis de resultados.

Carlos Aragonés López (4%). Análisis estadísticos.

Consuelo Correa Sierra (3%). Procesamiento y análisis de las muestras.

Orlando Martínez (2%). Análisis bioinformáticos.

Lilia M. Ortega González (1%). Selección de los pacientes, información clínica.

Daniel Pérez Correa (1%). Selección de los pacientes, información clínica.

Jorge Campos Díaz (1%). Análisis estadísticos.

Alina Álvarez López (1%). Colecta de la muestra y procesamiento.

Yudira Soto Brito (1%). Procesamiento y análisis de las muestras.

Celia M. Limia León (1%). Procesamiento y análisis de las muestras.

Delmis Álvarez Gainza (1%). Análisis estadísticos.

Jorge Pérez-Lastre (1%). Selección de los pacientes en edad pediátrica, información clínica.

Ida González Núñez (1%). Selección de los pacientes en edad pediátrica, información clínica.

Juan C. Millán Marcelo (1%). Selección de los pacientes, información clínica.

Clara Barrios Rodríguez (1%). Toma de muestra.

María I. Lantero Abreu (1%). Datos epidemiológicos y demográficos de los pacientes.

Jose Joanes Fiol (1%). Datos epidemiológicos y demográficos de los pacientes.

RESUMEN

Antecedentes: Uno de los mayores avances en la medicina lo constituyó el descubrimiento de los medicamentos antirretrovirales (ARV) y especialmente el empleo de la terapia altamente efectiva (TARVAE). Esto ha conllevado a un incremento en la sobrevivencia de los pacientes con VIH/SIDA. Sin embargo, debido a que esta terapia debe mantenerse durante toda la vida, pueden aparecer una serie de factores que impacten negativamente en el éxito del tratamiento, resultando en el desarrollo de resistencia ARV. La emergencia de la resistencia del VIH-1 a los ARVs puede limitar los beneficios de la terapia; aún más, estos virus pueden ser transmitidos a otros individuos, limitando aún más la efectividad de la terapia ARV. En Cuba, la TARVAE se comenzó a utilizar en el año 2001, con la producción de 6 medicamentos (AZT, 3TC, d4T, ddI, NVP e IDV), de ellos, la combinación más utilizada es: AZT-3TC-NVP. Hasta la fecha alrededor del 40% de los pacientes infectados se encuentran bajo TARVAE. Hasta el año 2009 no se contaba con la vigilancia de resistencia ARV en el país, aunque se habían realizado algunos estudios con muestra cubanas fuera del país.

Objetivos: La presente investigación se ha realizado con el objetivo de establecer en Cuba la vigilancia de la resistencia ARV y de los subtipos de VIH que circulan actualmente.

Diseño del estudio: Se estandarizó un ensayo casero para determinar resistencia genotípica de VIH, mediante secuenciación del gen *pol*. Se estudiaron los datos recopilados sobre la Resistencia ARV de VIH-1 en los pacientes (tratados: 383 y no tratados: 403) que asistieron al Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK) en La Habana en los años 2003 y 2007-2011. Se determinaron las variantes de VIH-1 y las mutaciones de resistencia a los medicamentos ARV, así como los niveles de resistencia.

Resultados: Se logró implementar en Cuba un ensayo casero para determinar resistencia genotípica. Se observa una gran variedad de subtipos y formas recombinantes de VIH-1 en los pacientes estudiados. Las formas genéticas más prevalentes fueron el Subtipo B (39%), mientras que las formas no B fueron mayoría. La frecuencia de los diferentes subtipos y recombinantes no cambió significativamente entre 2003 y 2007-2011, a excepción de las formas recombinantes BG, las que aumentaron tanto en pacientes tratados como en no tratados ($p < 0.05$). Al comparar los niveles de resistencia a las drogas ARV de los virus aislados de pacientes del 2003 con los del 2009-2011, se observaron diferencias significativas para cada Inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleósidos (ITIAN), de no nucleósidos (ITINAN) e inhibidor de proteasas (IP) ($p < 0.0001$). Los mayores niveles de resistencia estuvieron en correspondencia con los medicamentos que se emplean en la terapia cubana de primera línea (3TC:78%, AZT: 62%, NVP:72%), aunque también se observa resistencia cruzada a otros medicamentos que no se emplean con frecuencia en el país. Además, se observó que el nivel de resistencia para cada clase de fármaco aumentó significativamente con el número de cambios de terapia ($p < 0.05$). La resistencia completa (FCR) a ITIAN, ITINAN, IP y la multidrogo resistencia (MDR) se detectó en el 31,8%, 37,9%, 18,5% y el 15,4% de los 383 pacientes analizados, respectivamente. Los pacientes del periodo 2009-2011 presentaron un incremento significativo de virus con FCR y MDR comparados a los del 2003. En el 7.2% (29/401) de los virus se detectaron mutaciones relacionadas con resistencia transmitida (pacientes no tratados). En el año 2003 fue de un 4.0% (1.6%-4.8%), mientras que se incrementó a un 12.5% (7.2%-14.5%) en el periodo 2007-2011. La resistencia se incrementó de forma significativa en pacientes con diagnóstico reciente de la infección, 14.8 % (8.0 %-17.0 %) en 2007-2011 contra 3.8 % (0.9 %-4.7 %) en 2003 (OR 3.9, IC 1.5 - 17.0, $p = 0.02$).

Conclusiones: Este estudio encontró una alta prevalencia de la resistencia a los medicamentos ARV en pacientes tratados y un incremento de la resistencia transmitida y apoya la necesidad de un adecuado control de laboratorio en la práctica clínica, así como la disponibilidad de nuevas opciones de medicamentos en caso de fallo virológico.

COMUNICACIÓN CORTA

I. Antecedentes:

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida, actualmente reconocido como sida fue descrito en 1981, por el Centro para el Control de las Enfermedades. Existen dos agentes productores del sida, el virus de inmunodeficiencia humana tipo I (VIH-1), que tiene una distribución mundial y es el responsable de la mayor parte de los casos; y el virus de inmunodeficiencia humana tipo II (VIH-2), que predomina en el continente africano, aunque se reportan casos importados en Europa y América.

Según datos del 2011 se calcula que 34 millones de personas viven con el VIH en el mundo y de estos cerca de la mitad desconocen su estado serológico respecto al mismo. En este mismo año 2,5 millones de personas contrajeron la infección por el VIH y 1,7 millones de personas fallecieron a causa de enfermedades relacionadas con el sida (www.unaids.org).

El VIH es un virus altamente variable, por lo que se han descrito múltiples variantes genéticas de ambos virus, particularmente del VIH-1. En el continente africano es donde se ha descrito la mayor circulación de subtipos y formas recombinantes del VIH-1, así como VIH-2. Debido a la circulación de múltiples subtipos del VIH los individuos son susceptibles de infectarse con más de un subtipo de VIH que, unido a la característica del genoma viral de presentar dos moléculas de ARN, es frecuente que se mezclen más de una variante viral en el mismo sujeto ocurriendo la aparición de formas recombinantes del virus. Estos recombinantes predominan en las regiones geográficas donde co-circulan más de un subtipo viral, como ocurre en África.

Uno de los mayores avances en la medicina lo constituyó el descubrimiento de los medicamentos antirretrovirales (ARV) y especialmente el empleo de la terapia ARV altamente efectiva (TARVAE) o combinada. Esto ha conllevado a que el sida pasara de ser una enfermedad irremediablemente mortal, a convertirse en una enfermedad crónica. Sin embargo, debido a que el virus no puede ser eliminado, esta terapia debe mantenerse durante toda la vida, por lo que existen una serie de factores que pueden producir un impacto negativo en el éxito del tratamiento a corto o largo plazo, resultando en el desarrollo de resistencia ARV, una de las principales causas de fallo de los regímenes de tratamiento. La emergencia de la resistencia del VIH-1 a los medicamentos puede limitar los beneficios sostenidos de la terapia ARV en entornos con pruebas de laboratorio y opciones de medicamentos limitados, aún más estos virus con mutaciones de resistencia pueden ser transmitidos a otros individuos, limitando aún más la efectividad de la terapia ARV.

En Cuba desde 1986, cuando se diagnosticó el primer caso positivo al VIH, y hasta diciembre del 2012 se han reportado 17625 personas viviendo con VIH, de ellas 7,542 han desarrollado sida y 2,977 han fallecido por esta causa (Registro

Nacional VIH MINSAP, informe de balance 2012). La transmisión sexual es el factor de riesgo más importante, a la que corresponde 99% de los casos reportados, la transmisión vertical, parenteral y la exposición ocupacional, constituyen otras causas de infección. El mayor número de casos se reporta en el sexo masculino con un 81%, donde los hombres que tienen sexo con otros hombres constituyen el 89%. Las edades de mayor incidencia corresponden a grupos entre los 24 y 49 años, según datos del Programa Nacional de Prevención y Control de las Infecciones de Transmisión Sexual VIH/sida del Ministerio de Salud Pública de Cuba (Registro Nacional VIH MINSAP, informe de balance 2012).

Desde el inicio de la epidemia cubana se ha reportado la circulación de diversas variantes genéticas de VIH-1 en el país, probablemente debido a que algunos de las primeras personas diagnosticadas adquirieron la infección en África. La TARVAE se comenzó a utilizar en el país en el año 2001, con la producción de 6 medicamentos (AZT, 3TC, d4T, ddI, NVP e IDV), de ellos, la combinación más utilizada en la terapia de primera línea es: AZT-3TC-NVP. Actualmente, más de un 40% de los individuos viviendo con VIH están recibiendo TARVAE.

Hasta el año 2009 no se contaba con la vigilancia de resistencia ARV en Cuba, aunque se habían realizado algunos estudios con muestra cubanas fuera del país. El último había sido realizado a partir de muestras tomadas en el año 2003. La presente investigación se ha realizado con el objetivo de establecer en Cuba la vigilancia de la resistencia ARV y de los subtipos de VIH que circulan actualmente.

II. Estandarización de un sistema casero de genotipificación de Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1) para la evaluación de resistencia a las drogas antirretrovirales (ARV) en Cuba

Los ensayos comerciales de resistencia del VIH-1 a los medicamentos no son rentables en países con recursos limitados debido a que son muy caros. Por lo tanto, nos propusimos implementar un procedimiento casero de PCR-secuenciación más rentable, teniendo en cuenta las circunstancias epidemiológicas y económicas de Cuba. El límite inferior de detección de amplificación se determinó haciendo diluciones seriadas de 20 muestras de plasma y osciló entre 84 y 529 copias de ARN/mL para los subtipos A1, B, C, CRF18_cpx, CRF19_cpx y los recombinantes BG. Posteriormente, se evaluó el rendimiento en 380 muestras de plasma de pacientes que asistían a la práctica clínica de rutina en el IPK. La tasa de éxito de la amplificación por RCP fue de 91%. El éxito de las reacciones de secuenciación con los cebadores diseñados osciló entre 95 y 100% y se obtuvo una secuencia consenso que codifica toda la proteasa y los primeros 335 codones de la transcriptasa inversa en todas las muestras amplificadas. Sin embargo, no en todos los casos las secuencias obtenidas cubrieron la región de interés de forma bidireccional. Los análisis filogenéticos revelaron que, de las muestras secuenciadas con éxito, 35% eran del subtipo B, 20% de recombinantes BG, 13% CRF19_cpx, 9% CRF18_cpx, 8%

subtipo C, 3% subtipo G y 12% eran otras variantes. En general, el ensayo casero proporcionó buenos resultados, fue posible con reactivos disponibles en Cuba y el costo fue cerca de la mitad del de ensayos comerciales.

III. Alta frecuencia de resistencia a las drogas antirretrovirales (ARV) y de subtipos no B de VIH-1, en pacientes cubanos infectados con fallo a la terapia.

La emergencia de la resistencia del VIH-1 a los medicamentos puede limitar los beneficios sostenidos de la terapia antirretroviral (ARV) en entornos con pruebas de laboratorio y opciones de medicamentos limitados. El objetivo del presente estudio es realizar la vigilancia de la resistencia a los medicamentos ARV y los subtipos del VIH-1 en pacientes cubanos con fallo a la terapia ARV. Se estudiaron los datos recopilados sobre la Resistencia ARV de VIH-1 en los pacientes que asistieron al Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK) en La Habana en los años 2003 y 2009-2011. El primer período incluye los resultados de un estudio transversal, mientras que el segundo estudio se realizó como parte del seguimiento de rutina de pacientes bajo terapia ARV. Se determinaron las mutaciones de resistencia a los medicamentos los niveles de resistencia utilizando la base de datos de resistencia de Stanford HIVdb, versión 6.0.9. Setenta y seis por ciento recibió únicamente terapia ARV que contiene al menos 3 fármacos, de los cuales el 79,1% alguna vez recibieron inhibidores de proteasa (IP) sin potenciar. Los pacientes del periodo 2009-2011 estuvieron tratados por más tiempo y expuestos a más regímenes de ARV. El Subtipo B (39%) y el CRF19_cpx (18%) fueron las formas genéticas más prevalentes. La distribución de subtipos no varió significativamente entre ambos periodos, a excepción del aumento de los recombinantes BG que se incrementaron del 6% al 14%. Las mutaciones a inhibidores de la transcriptasa reversa nucleósidos (ITIAN), inhibidores de la transcriptasa reversa no nucleósidos (ITINAN) e IP estuvieron presentes en el 69,5%, 54,8% y 44,4%, respectivamente. Se detectó resistencia completa a una clase (FCR) para ITIAN, ITINAN, PI y MDR en el 31,8%, 37,9%, 18,5% y 15,4%, respectivamente. La FCR a ITIAN, ITINAN, a IP y MDR estuvieron presentes en el 9,8%, 14,1%, 0%, 0% después del fallo de primera línea de tratamiento, y en el 19,8%, 20,8%, 2,9% y 2,9% después de segunda del fallo a la segunda línea de terapia. Este estudio encontró una alta prevalencia de la resistencia a los medicamentos ARV y apoya la necesidad de un adecuado control de laboratorio en la práctica clínica, así como la disponibilidad de nuevas opciones de medicamentos en caso de fallo virológico.

IV. Resistencia antirretroviral de VIH-1 en pacientes cubanos que no han recibido terapia

La terapia antirretroviral (ARV) se implementó en Cuba en el 2001. Hasta la fecha el 40% de los pacientes infectados han recibido tratamiento. Los objetivos de este estudio fueron analizar la distribución de subtipo, patrones y niveles de resistencia del VIH a las drogas ARV en pacientes no tratados. Se colectaron 401 muestras

de plasma de paciente en los años 2003 y 2007-2011. Se llevó a cabo el análisis del gen *pol* mediante el ensayo de resistencia genotípico, y para la interpretación se empleó la lista para la vigilancia de mutaciones de resistencia de la OMS, versión 2009. El impacto de la respuesta a la terapia de la primera línea se estimó por medio de las base de datos para la interpretación de resistencia de la Universidad de Stanford (HIVdb) versión 6.2.0 y la de Rega, versión 8.0.2. El análisis filogenético fue realizado usando el método de Neighbor-Joining. La mayoría de los pacientes eran masculinos (84.5%), hombres que tienen el sexo con hombres (78.1%) y de Ciudad de la Habana (73.6%). El Subtipo B fue el más frecuente (39.3%), seguido de CRF20-23-24_BG (19.5%), CRF19_cpx (18.0%) y CRF18_cpx (10.3%). En el 7.2% (29/401) de los virus se detectaron mutaciones relacionadas con resistencia transmitida, en el año 2003 fue de un 4.0% (1.6%-4.8%), mientras que se incrementó a un 12.5% (7.2%-14.5%) en el periodo 2007-2011. La resistencia se incrementó de forma significativa en pacientes con diagnóstico reciente de la infección, 14.8 % (8.0 %-17.0 %) en 2007-2011 contra 3.8 % (0.9 %- 4.7 %) en 2003 (OR 3.9, IC 1.5 - 17.0, $p=0.02$). En el 75.8 % de los virus se detectaron mutaciones de resistencia a una sola clase droga: 55.2 % a los inhibidores transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (ITIAN), 10.3% a los no análogos (ITINAN) y 10.3 % a los inhibidores de la proteasa (IP). El 20.7% y 3.4% de los virus contenían mutaciones de resistencia contra ITIAN + ITINAN y ITIAN + ITINAN + IP, respectivamente. La resistencia a las demás familias de fármacos (ITINAN e IP) sólo se detectaron a partir del 2008. Las mutaciones más frecuentes fueron T215Y/rev (44.8%), M41L (31.0%), M184V (17.2%) y K103N (13.8%). La mediana del índice de susceptibilidad genotípica para los regímenes de primera línea más comúnmente empleados en la terapia cubana, fue de 2.5. Esta investigación enfatiza la necesidad de realizar un estudio de vigilancia nacional para evaluar los niveles de resistencia transmitida, ya que la misma podría poner en peligro la eficacia de regímenes de la primera línea prescritos e indicaría la necesidad de implementar los ensayos de resistencia genotípicos en la población no tratada.

Impactos científicos del resultado

- Por primera vez en Cuba se implementa un método para vigilancia de resistencia y de variantes virales de VIH circulantes en el país.
- A través de la implementación de esta tecnología, se pueden vigilar los niveles de resistencia que existen en pacientes tratados, y la resistencia transmitida, así como evaluar la efectividad de los regímenes terapéuticos existentes.
- Se confirma la gran variedad de variantes virales de VIH-1 que se encuentran circulando en Cuba actualmente, y el incremento de la formas recombinantes BG, lo que tiene un impacto directo en el desarrollo de candidatos vacunales cubanos.
- Los resultados obtenidos indican la necesidad urgente de ampliar el acceso a potentes fármacos ARV, así como mejorar el monitoreo de la carga viral y de contar con una vigilancia nacional de resistencia.
- Contar con esta metodología beneficia de manera directa al paciente que vive con VIH, y al médico de asistencia que cuenta con un soporte de laboratorio para realizar un cambio en la terapéutica del paciente.

- Todo esto contribuirá a elevar la calidad de vida de los pacientes cubanos con VIH y de manera indirecta beneficiara al Sistema de Salud Cubano.

Impacto social del resultado

Contar con esta metodología beneficia de manera directa al paciente que vive con VIH, y al médico de asistencia que cuenta con un soporte de laboratorio para realizar un cambio en la terapéutica del paciente. Todo esto contribuirá a elevar la calidad de vida de los pacientes cubanos con VIH y de manera indirecta beneficiara al Sistema de Salud Cubano.

Publicaciones científicas que avalan el resultado

Publicaciones:

1. Kourí V, y cols. High frequency of antiviral drug resistance and non-B subtypes in HIV-1 patients failing antiviral therapy in Cuba. *J Clin Virol.* 2012;55:348-55.
2. Pérez L, y cols. Antiretroviral drug resistance in HIV-1 therapy-naive patients in Cuba. *Infection, Genetics and Evolution.* 2013;16:144-50.

Otros avales

- **Aval del Programa Nacional de Prevención de VIH/ITS/SIDA (MINSAP)**
- **Premio en el CONCURSO PREMIO ANUAL DE LA SALUD 2013, categoría Artículo Científico**

- Eventos:

1. Congreso de la Sociedad Internacional de SIDA (IAS). Italia. Julio, 2011.
2. 11 International Congress on Drug Therapy in HIV Infection. Reino Unido, Nov. 2012.
3. Biotecnología Habana 2012. Cuba, marzo del 2012.
4. Taller de resistencia Microbiana. Cuba. Nov. 2012
5. Evento GP SIDA. Cuba, 2011, 2012, 2013.

- Proyectos Internacionales

1. Proyecto Internacional de Cooperación Interuniversitario (VLIR) con la región de Flanders (Universidad de Leuven) en Bélgica: Implementación de las pruebas de resistencia ARV en Cuba (Responsable).
2. Proyecto Internacional con la Región Valona en Bélgica: Caracterización virológica e Inmunológica de Cepas de VIH de pacientes cubanos con rápida progresión a SIDA. (Responsable). Concluyó en el 2012.

- Proyecto Ramal

Estudio de prevalencia de mutaciones de resistencia en pacientes VIH cubanos. Análisis filogenético y epidemiológico. (Participante). *Concluyó en el 2012.*

- Tesis

2 Tesis de Maestría en Virología (2010 y 2012) y una tesis de grado de la Facultad de Biología (2013).