

**IMPACTO DE LA APLICACIÓN DE LOS ENSAYOS GENOTÍPICOS
DE RESISTENCIA DEL VIH-1 EN LA TERAPIA
ANTIRRETROVIRAL EN CUBA.**

2009-2015.

ENTIDAD EJECUTORA PRINCIPAL: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"

AUTORES PRINCIPALES: Yoan Alemán Campos, Vivian Kouri Cardella, Lissette Pérez Santos.

OTROS AUTORES: Jorge Pérez, Carlos Fonseca, Lilia M. Ortega, Dianne Díaz, Yudira Soto, Yenisleidys Martínez, Jorge Campos, Celia M Limia, Delmis Álvarez.

COLABORADORES: Kristel Van Laethem, Yoeri Schrooten, Anne-Mieke Vandamme, María I Lantero, José Joanes.

AUTOR PARA LA CORRESPONDENCIA:

Yoan Alemán Campos.

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" Autopista Novia del Mediodía Km. 6 1/2 entre Carretera Central y Autopista Nacional Apdo. postal 601 Marianao 13. CP:11400.

Teléfono: 2553551 Fax: 53 -7 2046051

Correo electrónico: jcaleman@ipk.sld.cu

RESUMEN

Antecedentes:

Más de 24.000 personas están viviendo con el VIH en Cuba y más del 70% estaban recibiendo tratamiento antirretroviral a finales de 2015. Estudios previos han informado una incidencia alarmante de subtipos no B y de resistencia del VIH-1 a los antirretrovirales (ARV) en Cuba. En países con amplios recursos, los pacientes con VIH resistente a múltiples fármacos son tratados con Maraviroc. En Cuba, este medicamento nunca se ha utilizado y hay pocos informes sobre la caracterización molecular del lazo V3 del VIH-1, relacionado con resistencia a esta droga. Estas condiciones indican la necesidad urgente de la vigilancia de la resistencia a los ARV. Con este fin en el año 2009 fue implementado por Aleman et al. un ensayo genotípico casero que permite la determinación de la resistencia del VIH-1 a los inhibidores de la proteasa (IP) y la transcriptasa inversa análogos (ITIAN) y no análogos de nucleósidos (ITINAN). Además, actualmente la

susceptibilidad de los subtipos no-B a los ARV es objeto de mucha atención, son escasos los datos de secuenciación de estos subtipos y se recomienda una mayor investigación sobre este tema.

Objetivo: Evaluar el impacto de la aplicación de los ensayos genotípicos de resistencia del VIH-1 en la terapia antirretroviral en Cuba.

Diseño del estudio: Se evaluó la exactitud, la fidelidad (sensibilidad y especificidad) y la precisión (repetitividad y reproducibilidad) del ensayo genotípico casero y se comparó con el ensayo comercial ViroSeq (aprobado por la FDA). Utilizando el ensayo casero se analizaron 926 muestras de plasma recibidas en el IPK entre abril del 2009 y diciembre 2014 para estudios de resistencia a los ARV (584 de pacientes con fallo de la terapia y 342 de individuos no tratados). Se empleó el ensayo descrito por Van Laethem K et al. para la determinación del tropismo viral y la resistencia al Maraviroc en 42 muestras de plasma recibidas entre enero de 2014 y enero del 2015. También se realizó este análisis en 317 secuencias cubanas obtenidas de la base de datos de Los Álamos.

Resultados: El ensayo casero logró un alto grado de exactitud. La sensibilidad y la especificidad en la detección de mutaciones de resistencia fueron 94.1% y 99.5%, respectivamente. La precisión del ensayo casero fue muy alta, con valores de repetitividad y reproducibilidad de 98.7% y 99.9%, respectivamente. Empleando este ensayo se observó que la distribución de los subtipos no cambió significativamente entre 2009 y 2014, aunque la incidencia de los recombinantes BG se incrementó a partir del 2009 ($p=0.002$). La incidencia de mutaciones de resistencia en muestras de individuos no tratados fue alta (11,4%), principalmente a la combinación ITIAN+ITINAN, la más utilizada en la primera línea de terapia en Cuba. En las muestras de pacientes tratados la resistencia a IP disminuyó a partir del 2009 ($p<0.05$). Desde ese año también se observa una disminución de la incidencia de la multidrogorresistencia ($p=0,003$) y de la resistencia completa a ITIAN y a IP ($p<0.0001$). Las mutaciones M184V y L210W (asociadas con resistencia al ABC, FTC, 3TC, AZT y d4T) incidieron con más frecuencia en las muestras del CRF19_cpx ($p<0.0001$), mientras que I50V y V82T (relacionadas con la resistencia a LPV/r) prevalecieron entre las formas recombinantes BG ($p<0,05$). El tropismo X4 fue predominante en los virus CRF19_cpx ($p=0.011$) lo cual pudiera limitar el empleo del Maraviroc en los pacientes infectados con este recombinante.

Conclusiones: El IPK dispone de un ensayo de resistencia con elevadas fidelidad y precisión. Con la aplicación en Cuba de los ensayos genotípicos ha disminuido la frecuencia de la resistencia del en los pacientes tratados; sin embargo, la resistencia en individuos no tratados es alta. Algunos recombinantes circulantes en Cuba presentan proporción alta de mutaciones asociadas a la resistencia a ciertos antirretrovirales. El CRF19_cpx es una forma genética con una proporción alta de virus X4-tropical lo que apoya la hipótesis de que este recombinante cubano pudiera ser un virus más patogénico.

COMUNICACIÓN CORTA.

I. Antecedentes.

El descubrimiento de la terapia antirretroviral (TARV) produjo un incremento sustancial en la supervivencia y en la calidad de vida de los pacientes infectados con VIH. Sin embargo, debido a que el virus no puede ser eliminado, esta terapia debe mantenerse durante toda la vida. 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 a los ARV. Estos son: la falta de potencia de las combinaciones sub-óptimas en los regímenes que contienen inhibidores de la proteasa no potenciados; opciones limitadas para las sustituciones de los ARV cuando es necesario o la insuficiente adherencia al 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.

Más de 24.000 personas están viviendo con el VIH en Cuba y más del 70% estaban recibiendo tratamiento ARV a finales de 2015 (Registro Nacional de VIH, Ministerio de Salud, Cuba). El acceso a la terapia ARV ha aumentado rápidamente desde el 2001 en Cuba y esto ha reducido marcadamente la mortalidad y la morbilidad por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH)/Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). En nuestro país las pruebas de carga viral no pudieron ser implementadas hasta el año 2003 y la frecuencia de la realización de los estudios de CD4 y de carga viral ha sido menor que lo recomendado en las pautas internacionales. Esto crea un potencial para la continuidad de la replicación viral, resultando en la emergencia y transmisión de variantes resistentes, siendo necesaria la implementación de los ensayos de resistencia tanto para la vigilancia como para el seguimiento individual del éxito de la terapia en cada paciente.

Estudios recientes han encontrado una incidencia alarmante de resistencia del VIH-1 a los antirretrovirales en Cuba, indicando la necesidad urgente de la vigilancia de laboratorio mediante la realización de los ensayos genotípicos de resistencia a los medicamentos. Desde el año 2009 fue implementado un ensayo genotípico casero para la determinación de la resistencia del VIH-1 a los inhibidores de la proteasa (IP) y la transcriptasa inversa análogos (ITIAN) y no análogos de nucleósidos (ITINAN), introduciéndose en la práctica clínica habitual en el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Este ensayo contribuye a ofrecer una mejor opción de tratamiento después de un fracaso de la terapia, a la disminución de la acumulación de resistencia del VIH-1 a los fármacos en pacientes que no responden al tratamiento antiviral y a evitar la posterior propagación a los pacientes recientemente infectados. Además, permite el estudio

de la resistencia en pacientes no tratados previamente y estima la transmisión de resistencia a los medicamentos.

Aunque la incidencia del VIH-1 en Cuba es baja (0,2%), la epidemia se caracteriza por una diversidad genética viral inusualmente alta, en contraste con el resto de la región del Caribe, donde predomina el subtipo B. Las formas genéticas reportadas incluyen los subtipos B, C, G, H, formas recombinantes circulantes BG (CRF20_BG, CRF23_BG y CRF24_BG) y dos CRFs complejos: el CRF18_cpx y el CRF19_cpx, que también se conocen como CRFs cubanos. El subtipo B representa sólo un tercio de la epidemia cubana mientras que los recombinantes BG y varios CRF se están expandiendo actualmente en Cuba. Por otra parte, un informe reciente mostró que la variante viral CRF19_cpx se asocia exclusivamente con la progresión rápida a SIDA en individuos cubanos.

A pesar de los logros alcanzados con la TARV en Cuba, muchos pacientes han estado expuestos a varios regímenes de tratamiento y tienen un riesgo cada vez mayor de desarrollar resistencia simultánea a múltiples drogas ARVs. Actualmente, en países con amplios recursos, los pacientes con VIH resistente a múltiples fármacos son tratados con el Maraviroc que es un antagonista del uso selectivo del correceptor CCR5. Sin embargo, la mayor preocupación en la administración terapéutica de los inhibidores del correceptor es la posibilidad de que se produzca la resistencia por un cambio en el uso de CCR5 a CXCR4, o que la subpoblación de virus X4-trópico llegue a dominar la población de virus del paciente. En Cuba, el Maraviroc nunca se ha utilizado hasta la fecha y hay pocos informes sobre la caracterización molecular y la variabilidad genética del lazo V3 del VIH-1, relacionada con el uso del correceptor. Además, la asociación de variantes genéticas cubanas específicas con el tropismo viral no se ha descrito en detalles.

Los estudios de la variabilidad genética del VIH-1 cobran cada día más importancia pues contribuyen al diseño de nuevas estrategias terapéuticas y a la formulación de candidatos vacunales. El conocimiento de la distribución de las variantes genéticas tiene gran valor ya que puede incidir en la exactitud de las pruebas de diagnóstico, las de la determinación de la carga viral y en los ensayos genotípicos de resistencia del VIH-1 a la TARV. Además, la susceptibilidad de los diferentes subtipos del VIH-1 a las drogas ARV es actualmente objeto de mucha atención. En todo el mundo son escasos los datos de secuenciación de subtipos no- B y se recomienda una mayor investigación de este tema.

II. Rendimiento de un sistema casero para la determinación del genotipo de VIH-1 y la evaluación de la resistencia a los antirretrovirales en Cuba (Alemán et al., 2015).

La realización de los ensayos genotípicos para la determinación de la resistencia del VIH-1 a las drogas antirretrovirales tiene un precio elevado, por esta razón no son utilizados comúnmente en países con restricciones económicas. De aquí que en el año 2009 fue diseñado un procedimiento casero más asequible, teniendo

en cuenta las circunstancias epidemiológicas y económicas de Cuba. En el presente estudio fue evaluado el rendimiento del ensayo casero usando muestras clínicas de pacientes infectados con varios subtipos de VIH-1 y con diferentes patrones de resistencia. Para la evaluación de la fidelidad, se analizaron 14 muestras clínicas y se utilizó como método estándar de referencia el ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0. La media de la identidad de la secuencia nucleotídica entre ambos ensayos fue de 98.7%±1.0. Además, fueron idénticos el 99.0% de los aminoácidos en las posiciones relacionadas con la resistencia a las drogas antirretrovirales. La sensibilidad y la especificidad en la detección de las mutaciones de resistencia fue de 94.1% y 99.5% respectivamente. Solo se observaron pocas discordancias en los patrones de interpretación de la resistencia a las drogas. La repetitividad y la reproducibilidad fueron evaluadas usando 10 muestras clínicas con tres réplicas de cada muestra. La precisión del ensayo casero alcanzó valores de repetitividad y reproducibilidad de 98.7% y 99.9%, respectivamente. El ensayo casero logró el criterio de aceptación para todas las características de resolución, demostrando un elevado grado de fidelidad y una precisión muy alta.

III. Alta frecuencia de resistencia del VIH-1 a los medicamentos antivirales y de los subtipos no B en pacientes que no responden al tratamiento antiviral en Cuba. (Kouri et al., 2014)

La TARV se inició en Cuba en el año 2001 y se reportaron bajas frecuencias de resistencia a los antirretrovirales en las muestras de 2003. El objetivo de este estudio es analizar el perfil de la resistencia y la distribución de los subtipos en muestras de pacientes cubanos que no responden a la terapia. En este estudio fueron compilados los datos clínicos y los resultados de los ensayos genotípicos de resistencia de 588 pacientes expuestos a la TARV que asisten al Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" en La Habana entre los años 2009 y 2013. Las pruebas de resistencia a los medicamentos se realizaron como parte de la atención clínica de rutina. Las mutaciones y los niveles de resistencia a los medicamentos se determinaron utilizando la base de datos Rega versión 8.0.2. El ochenta y tres por ciento de los pacientes recibieron únicamente TARV compuesta al menos por tres fármacos. Los pacientes del 2009 al 2010 fueron tratados por más tiempo (mediana: 4,9 frente al 2,7 años) y fueron expuestos a más regímenes de TARV (mediana: 4 vs 2 regímenes) en comparación con los pacientes del 2011 al 2013. Además, se observó que la distribución de los subtipos no cambió significativamente entre 2009 y 2014, aunque la incidencia de los recombinantes BG se incrementó significativamente a partir del 2009 ($p=0.002$). Nuestro estudio encontró una alta incidencia de resistencia a las drogas antirretrovirales y apoya la necesidad de un control de laboratorio adecuado en la práctica clínica y el acceso a opciones de tratamiento en caso de fallo virológico.

IV. Fármaco-resistencia del VIH-1 en Cuba después de la implementación

de los ensayos genotípicos de resistencia a los antirretrovirales.

La emergencia de la resistencia del VIH-1 a los medicamentos puede limitar los beneficios sostenidos de la terapia ARV, siendo necesaria la vigilancia de la resistencia a los medicamentos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el impacto de la aplicación de los ensayos genotípicos de resistencia del VIH-1 en el nivel y los perfiles de resistencia del VIH-1 a los medicamentos antirretrovirales en individuos no tratados previamente y en pacientes con fallo a la TARV en Cuba. Fueron analizados un total de 926 resultados de los ensayos genotípicos de resistencia del VIH-1 a los medicamentos llevadas a cabo como parte de la atención clínica de rutina en el laboratorio de ITS del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK, La Habana, Cuba) entre abril de 2009 y diciembre 2014. Se incluyeron muestras de 584 pacientes con fallo de la terapia y 342 de individuos no tratados. Los ensayos genotípicos de resistencia del VIH-1 se llevaron a cabo usando una metodología descrita anteriormente. El subtipo del VIH se determinó utilizando la herramienta Rega version 3 y fue confirmado por análisis filogenético manual empleando MEGA V6. La incidencia de mutaciones de resistencia a fármacos en pacientes no tratados se analizó mediante Calibrated Population Resistance (CPR) tool version 6.0. La interpretación de la resistencia a los medicamentos se llevó a cabo mediante el algoritmo Rega version 9.1.0. La mayoría de los pacientes eran varones (481; 82,4%) y pertenecían al grupo de riesgo hombres que tienen sexo con hombres (441; 75,5%). El subtipo B fue el más frecuente en el estudio, pero la mayoría de las muestras eran de formas recombinantes circulantes (CRF). En general, la incidencia de las mutaciones en las muestras del grupo de individuos no tratados fue alta (11,4%), principalmente a la combinación de NRTI+NNRTI que es la más utilizada en primera línea de terapia en Cuba. En las muestras de pacientes tratados la resistencia a los PI disminuyó significativamente a partir de 2009 ($p < 0.05$). Desde ese año también se observa una disminución significativa de la incidencia de la multidrogoresistencia ($p = 0,003$) y de la resistencia completa a ITIAN y a IP ($p < 0.0001$). Las mutaciones M184V y L210W (asociadas con resistencia al ABC, FTC y 3TC, AZT y d4T) incidieron significativamente con más frecuencia en las muestras del CRF19_cpx ($p < 0.0001$), mientras que las mutaciones I50V y V82T (relacionadas con la resistencia a LPV/r) prevalecieron entre las formas recombinantes BG ($p < 0,05$). Después de la implementación de los ensayos genotípicos de resistencia del VIH-1 a la terapia antirretroviral en Cuba, la frecuencia de la resistencia a la terapia en los pacientes con fallo al tratamiento está disminuyendo en el tiempo. La diversidad genética en Cuba es alta y está cambiando, incrementándose la circulación de las formas recombinantes circulantes y disminuyendo la incidencia del subtipo B. Algunos recombinantes circulantes en Cuba presentan una proporción alta de mutaciones asociadas a la resistencia a los antirretrovirales que más se utilizan en las terapias de primera y segunda línea en nuestro país.

V. Determinación del tropismo dado por el uso del correceptor en el

VIH-1 que circula en Cuba mediante un ensayo genotípico (Kourí et al., 2016).

Los virus con tropismo R5 predominan en el momento de la infección inicial del VIH-1 y en la fase tardía de la enfermedad se produce un cambio a tropismo X4 aproximadamente en el 50% de los pacientes. El objetivo de este estudio fue asociar diferentes variantes de VIH-1 cubano con el uso del correceptor y analizar las implicaciones en el uso de inhibidores del correceptor. El subtipo de VIH-1 se determinó en 42 muestras de individuos cubanos utilizando COMET V.2, Rega Subtyping tool V.3 y análisis filogenético. El tropismo se predijo utilizando el algoritmo geno2pheno [co-receptor]. Además, todas las secuencias cubanas del lazo V3 del VIH-1 depositadas previamente en la base de datos de Los Alamos se analizaron para la comparación de subtipo y tropismo según el uso de co-receptor. Los subtipos detectados con más frecuencia fueron CRF20-23-24_BG (35,7%), subtipo B (33,3%) y CRF19_cpx (14,3%) cuando se analizaron regiones *pol* y V3. En general, el 61,9% de las muestras fueron virus R5 y 14,3% eran X4. Los virus CRF19_cpx eran más a menudo R5X4/X4 (5/6 muestras, $p=0,009$) o cepas X4 (3/6 muestras, $p=0,019$). El análisis adicional de 359 secuencias cubanas del gen *env* demostró que el 29,3% eran virus X4. Curiosamente, el 43,6% de las CRF19_cpx eran virus R5X4/X4, lo que confirma la asociación anterior ($p=0,011$). Aminoácidos característicos en el lazo V3 (V/T12, R13, P18, V19, G22) se identificaron en frecuencias más altas en los virus CRF19_cpx que en el subtipo B ($p<0,0001$). El CRF19_cpx es una forma genética con una alta proporción de virus X4-tropical. Esto apoya el aumento de la patogenicidad de CRF19_cpx, que puede conducir a la progresión rápida de la enfermedad. La alta frecuencia de tropismo X4 en pacientes infectados con CRF19_cpx implicaría que los antagonistas del CCR5 pudieran ser ineficaces en la mayoría de estos pacientes.

Impactos del resultado

• **Impactos científicos.**

1. Se evaluó un ensayo genotípico capaz de amplificar y secuenciar los genes de la proteasa y la reverso transcriptasa del VIH-1 en condiciones de gran variabilidad genética.
2. Se confirma la amplia diversidad de subtipos de VIH-1 y el incremento de algunas formas recombinantes cubanas asociadas con mutaciones de resistencia; lo cual tiene un impacto directo en los regímenes de terapia que se prescriben actualmente en Cuba y en el desarrollo de nuevos candidatos vacunales.
3. El empleo adecuado y oportuno de los ensayos genotípicos de resistencia en Cuba ha posibilitado la reducción de los niveles de resistencia a los PI, de la resistencia completa a los a los inhibidores de la reverso transcriptasa, de la proteasa y de la resistencia múltiple a drogas en pacientes tratados.

4. La resistencia alta en individuos no tratados justifica la necesidad de realizar un estudio nacional para la vigilancia de la resistencia transmitida.
5. Se aporta al MINSAP una herramienta que permite la vigilancia y el monitoreo de la efectividad de las estrategias terapéuticas establecidas en Cuba.

- **Impacto social**

1. El mejor manejo clínico de la resistencia a los antirretrovirales en los pacientes tratados mejora su calidad de vida incrementando la posibilidad de éxito de la terapia ARV.

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS QUE AVALAN EL RESULTADO.

1. Alemán, Y., Vinken, L., Kouri, V., Pérez, L., Álvarez, A., Abrahantes, Y., Fonseca, C., Pérez, J., Correa, C., Soto, Y., Schrooten, Y., Vandamme, A.M., Van Laethem, K., 2015. Performance of an in-house human immunodeficiency virus type 1 genotyping system for assessment of drug resistance in Cuba. PloS one 10, e0117176.
2. Kourí, V., Alemán, Y., Díaz, D., Pérez, L., Limia, C.M., Soto, Y., Martínez, Y., Baños, Y., Yaniris, Campos, C., Ortega, L.M., Pérez, J., Hengge, U., 2016. Co-Receptor Tropism Determined by Genotypic Assay in HIV-1 Circulating in Cuba. Journal of AIDS & clinical research 7.
3. Kouri, V., Alemán, Y., Pérez, L., Pérez, J., Fonseca, C., Correa, C., Aragonés, C., Campos, J., Álvarez, D., Schrooten, Y., Vinken, L., Limia, C., Soto, Y., Vandamme, A.M., Van Laethem, K., 2014. High frequency of antiviral drug resistance and non-b subtypes in HIV-1 patients failing antiviral therapy in Cuba. Journal of the International AIDS Society 17, 19754.