ramr
Revista Americana de Medicina Respiratoria

ARTÍCULO ORIGINAL

RAMR 2015;4:301-305
ISSN 1852 - 236X

Circulación de virus de influenza A y cepas resistentes a oseltamivir en el período invernal del año 2013

Autores: Ignacio Javier Chiesa, Josefina Chinton, María Silvia Pérez, Jonatan Nahuel Paliaris, María Gabriela García, Daniel Alberto Pirola

Laboratorio de Medicina Genómica - MANLAB

Correspondencia:
Lic. Ignacio J. Chiesa
Domicilio postal: Laboratorio MANLAB. Marcelo T. de Alvear 2263
(C.P.:1120) Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
Tel: (54-11)4511-9661
Fax: (54-11) 4826-1465
Email: Ignacio.chiesa@ manlab.com.ar

Recibido: 10.04.2015
Aceptado: 26.08.2015

Resumen

Inicialmente el virus de influenza A(H1N1)pdm09 fue susceptible a los inhibidores de neuraminidasa oseltamivir y zanamivir. Las cepas virales resistentes presentan una sustitución que produce un cambio del aminoácido histidina (H) por una tirosina (Y) en el codón 274 del gen de la neuroaminidasa. El objetivo del trabajo fue realizar un análisis retrospectivo de los resultados obtenidos en muestras estudiadas para influenza A durante el periodo junio - agosto de 2013 y en las muestras positivas determinar la presencia de la mutación H274Y. Se estudiaron 1783 muestras de pacientes con diagnóstico presuntivo de influenza A(H1N1)pdm09, 171 (9.6%) resultaron positivas, a estas se les estudió la presencia de la mutación H274Y. Únicamente dos muestras presentaron la mutación de resistencia. Los métodos para detectar cepas de influenza A(H1N1)pdm09 resistentes son necesarios para ayudar a los médicos en la selección de la terapia antiviral apropiada de la influenza.

Palabras clave: influenza A virus, H1N1, oseltamivir

Abstract

Circulation of Influenza A Viruses and Oseltamivir-Resistant Strains during the 2013 Winter

Initially the circulating influenza virus A(H1N1)pdm09 was susceptible to neuraminidase inhibitors oseltamivir and zanamivir. Virtually all resistant viruses possess a substitution at codon 274 of the neuraminidase gene which produces a change of the amino acid histidine (H) to a tyrosine (Y). The aims of the study were to perform a retrospective analysis of samples studied in the Laboratory of Genomic Medicine - MANLAB for influenza A during the period June to August 2013 in Buenos Aires, and to determine the presence of the H274Y mutation. 1783 samples from patients with a presumptive diagnosis of influenza A(H1N1) pdm09 were studied, the virus was detected in 171 samples (9.6%). Then, we studied the presence of the mutation H274Y. Only two samples showed the characteristic resistance mutation. Methods for detecting oseltamivir-resistant A(H1N1)pdm09 influenza strains are needed to assist physicians in the selection of appropriate antiviral therapy for influenza treatment.

Key words: Influenza A, H1N1, oseltamivir resistance

El virus de influenza A(H1N1)pdm09 fue aislado por primera vez en abril de 2009 en Estados Unidos y Méjico, y desde entonces se ha propagado por todo el mundo[1, 2]. En la Argentina, el virus se detectó por primera vez en mayo del 2009 en un paciente proveniente de Estados Unidos[3, 4]. El Ministerio de Salud de Argentina reportó ese año un total de 12.000 casos confirmados y 600 defunciones.

El virus de la influenza pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*, es uno de los virus respiratorios humanos más comunes. El genoma del virus es un ARN de cadena única de sentido negativo que contiene aproximadamente 13.500 nucleótidos distribuidos en ocho segmentos ubicados en un intervalo de 890-2340 nucleótidos y cada segmento codifica para una o dos proteínas. El genoma del virus de la influenza A está sujeto a frecuentes variaciones genéticas que alteran su estructura antigénica lo que origina epidemias y pandemias que afectan a la especie humana.

La temporada de influenza del 2009 en el mundo se caracterizó por la aparición y circulación de un nuevo virus de influenza humana, influenza

A(H1N1)pdm09; inicialmente susceptible a los inhibidores de neuraminidasa oseltamivir y zanamivir, pero resistente a amantadina[5].

La neuraminidasa es una glicoproteína presente en la envoltura de la cápside del virus de la influenza, la misma es considerada como un objetivo clave para la terapia antiviral. Esta enzima es esencial para la proliferación del virus y su infectividad. Los aminoácidos presentes en el sitio activo de la proteína están altamente conservados entre diferentes subtipos de neuraminidasas de virus de la influenza, es por eso que los inhibidores de esta enzima han demostrado tener actividades antivirales contra una amplia gama de virus de influenza.

Oseltamivir es el agente antiviral recomendado para el tratamiento y profilaxis por vía oral de la infección con el virus de la influenza. Este agente antiviral inhibe selectivamente las neuraminidasas del virus influenza, importantes para la entrada de virus en células no infectadas y la liberación de partículas virales recién formadas[6].

Después de la pandemia ocurrida en el año 2009, se han reportado en el mundo numerosos casos de cepas resistentes a oseltamivir[7, 8]. Prácticamente todos los virus resistentes poseen una sustitución en el codón 275 del gen de la neuroaminidasa, que produce un cambio del aminoácido histidina (H) por una tirosina (Y) (H275Y), según el subtipo neuroaminidasa 1 (N1). La misma sustitución es referida como H274Y si se utiliza para la numeración la secuencia del subtipo N2 de la neuroaminidasa.

Se han descripto mutaciones asociadas a la resistencia al oseltamivir en la neuroaminidasa viral en cepas de influenza A H3N2v, que también posee el gen M identificado en el virus pandémico H1N1, 2009. Este gen puede incrementar la transmisibilidad entre humanos, comparado con otras variantes de influenza. Esta cepa se detectó por primera vez en las personas en julio de 2011.

La circulación global de cepas resistentes a oseltamivir de influenza A(H1N1)pdm09 es aproximadamente del 1%[9], pero la preocupación de la comunidad sobre la circulación de estas cepas resistentes ha aumentado. Los riesgos de transmisión de la cepa resistente son la alta carga viral y la extensa diseminación que ocurre en niños y en pacientes inmunocomprometidos. La exposición a bajas concentraciones de inhibidores de la neuroaminidasa viral durante la profilaxis constituye un factor de riesgo para desarrollo de la resistencia a la droga. La mayoría de los virus resistentes se han detectado en pacientes inmunosuprimidos bajo tratamiento con oseltamivir[10]. Por lo tanto, la profilaxis y el tratamiento antiviral efectivo son de vital importancia para dichos pacientes.

En la Argentina se reportó por primera vez el virus A(H1N1)pdm09 resistente a oseltamivir (H274Y) en abril de 2010, en un niño de 3 años trasplantado de médula ósea que recibió tratamiento con oseltamivir durante 10 días[11].

Se han descripto además, otros dos casos de virus A(H1N1)pdm09 resistente a oseltamivir en noviembre de 2010, en pacientes que estaban hospitalizados y recibieron tratamiento con dicha droga[3].

En el presente trabajo el objetivo fue realizar un análisis retrospectivo de los resultados obtenidos en muestras estudiadas en el Laboratorio de Medicina Genómica de MANLAB para influenza A durante el periodo junio-agosto de 2013 en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y provincia de Buenos Aires. Y determinar la presencia de la mutación H274Y en el virus de influenza A(H1N1)pdm09 que le confiere resistencia a oseltamivir en muestras donde se detectó el virus de influenza A(H1N1)pdm2009 en el mismo período de tiempo y región geográfica. MANLAB es un laboratorio privado de diagnóstico bioquímico y genómica que recibe muestras de otros laboratorios de distintas regiones del país. En el presente trabajo se analizaron solamente los resultados de las muestras provenientes de laboratorios de distintas localidades de la provincia de Buenos Aires.

Para esto, se realizó un estudio retrospectivo de los resultados obtenidos de 1783 muestras de pacientes con diagnóstico presuntivo de la influenza A(H1N1)pdm09. Los mismos se obtuvieron en el laboratorio de Medicina Genómica de MANLAB en el período junio - agosto 2013. A partir de este estudio se seleccionó el número de muestras a analizar resistencia al oseltamivir.

Los datos de los pacientes fueron anonimizados previo a su estudio para resguardar su privacidad.

Para analizar la resistencia a oseltamivir, se estudiaron 171 muestras con resultado positivo para ARN del virus influenza A(H1N1)pdm09.

Para la extracción de ácidos nucléicos se utilizó el kit comercial *MagnaPure Compact Nucleic Acid Isolation Kit* (Roche).

Para detectar la infección con el virus de la influenza A(H1N1)pdm09 y del virus estacional de la influenza A, se utilizaron primero las enzimas del kit *AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents* (Applied Biosystem) para realizar la transcrip-

ción reversa del ARN viral junto al kit *Pandemic H1N1/09 Assay Set v 2.0* (Applied Biosystem), el cual contiene un panel de cebadores y sondas para uso en ensayos TaqMan® Real Time-PCR para la detección cualitativa y la caracterización *in vitro* del virus de la influenza A(H1N1)pdm09 en muestras respiratorias. Específicamente, para la detección del virus estacional se utilizaron sondas y cebadores que reconocen el gen M2 de todos los subtipos del virus de la influenza A, y para la detección del virus de la influenza A(H1N1)pdm09 se utilizaron cebadores y sondas que reconocen el gen hemaglutinina (HA) de esta cepa.

Para evaluar la resistencia a oseltamivir, se estudió la sustitución H274Y en la proteína neuroaminidasa. Primero, se realizó una transcripción reversa (RT-PCR) del ARN extraído con el kit *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (Roche)*. Posteriormente se realizó una PCR en tiempo real con el kit *LightMix Kit Influenza A Virus HxN1 Tamiflu Resistance (TIBMOLBIOL)* en el instrumento *LightCycler 2.0 (Roche)*.

Dicho kit amplifica un fragmento de 277 pares de bases del gen neuroaminidasa N1 del virus influenza A utilizando cebadores específicos influenza A(H1N1)pdm2009. La mutación es detectada con una sonda simple (SimpleProbe®) H274 específica (detectada en el canal de 530 nm). Dado que esta secuencia no es totalmente conservada, la sonda contiene bases correspondientes a los virus H1N1 estacionales y pandémicos, lo que resulta en una diferencia de un nucleótido para cualquier virus. Esta diferencia en la secuencia de un nucleótido produce un cambio en la temperatura de "melting" (Tm) de los productos amplificados siendo la misma de 55 °C para cualquier virus sensible a oseltamivir y 51,5 °C para virus resistentes que poseen la mutación H274Y.

Los resultados obtenidos mostraron que durante el periodo de junio a agosto del año 2013 se procesaron 1783 muestras, 171 (9,6%) resultaron positivas para el virus A(H1N1)pdm09, 105 (5,6%) muestras fueron positivas para el virus influenza A estacional y 1507 (84,5%) fueron muestras negativas (Figura 1).

Considerando las muestras mensualmente, en el mes de junio se procesaron 615 muestras de influenza; 112 (18,2%) resultaron A(H1N1) pdm09 positivas, 33 (5,4%) positivas para el virus estacional y 470 (76,4%) negativas para ambos. En julio se procesaron 835 muestras de las cuales 56 (6,7%) resultaron positivas para A(H1N1)pdm09, 53 (6,3%) positivas para el virus estacional y 726 (86,9%) negativas. En agosto se procesaron 338 muestras de las cuales 3 (0,9%) muestras resultaron A(H1N1)pdm09 positivas, 19 (5,7%) positivas para el virus estacional y 311 (93,4%) negativas (Tabla 1).

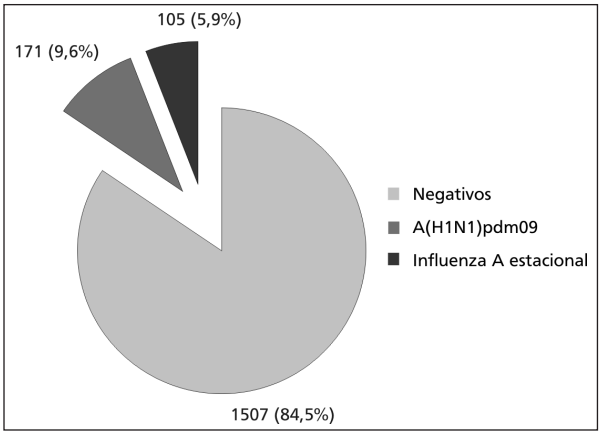

Figura 1. Porcentaje de muestras positivas para la detección del virus A(H1N1)pdm09 en el período junio-agosto de 2013

El mayor número de muestras detectables para el virus influenza A(H1N1)pdm09 se observó en el mes de junio. Si bien no hay una significancia estadística, se observó que para la influenza A estacional la mayor cantidad de muestras detectables se obtuvo en el mes de julio (Tabla 1).

Del análisis de la presencia de la mutación H274Y que confiere resistencia a oseltamivir en las 171 muestras positivas, solo en dos se detectó la mutación característica de la resistencia.

El primer caso pertenece a un paciente de sexo femenino de 50 años de edad con antecedentes de leucemia linfática aguda (LLA), por la cual en agosto 2012 recibió un tratamiento alogénico de células hematopoyéticas. La paciente presentaba enfermedad injerto contra huésped e ingresó con un cuadro de neumonía e influenza A(H1N1) pdm09 con neutropenia. No respondió al tratamiento con oseltamivir y falleció.

A la paciente se le estudió previamente la mutación H274Y y presentaba una infección con virus sensible al oseltamivir. Diez días después, sobre una nueva muestra, se le realizó el estudio de resistencia y presentó la mutación antes mencionada.

El segundo caso encontrado fue en una paciente de sexo femenino de 57 años internada por insu-

TABLA 1. Evaluación del porcentaje de positividad de influenza A por RT PCR en función del mes estudiado en 2013

	Junio		Julio		Agosto		Total	
	(N)	(%)	(N)	(%)	(N)	(%)	(N)	(%)
Influenza A(H1N1)pdm09	112	18,2	56	6,7	3	0,9	171	9,7
Influenza A Estacional	33	5,4	53	6.3	19	5,7	105	5,7
Negativa	470	76,4	726	87	311	93,4	1507	84,6
Total	615	100	835	100	333	100	1783	100

ficiencia respiratoria. Se trataba de una paciente inmunocompetente y recibió tratamiento con oseltamivir durante la internación. La muestra analizada fue tomada a las 48 horas de recibir tratamiento. Dicha muestra dio detectable para el virus de influenza A(H1N1)pdm09 y presentó la sustitución H274Y asociada a la resistencia a oseltamivir.

En el mes de junio, el 18,2% de las muestras analizadas fueron positivas para influenza A(H1N1) pdm09. Este resultado es menor al reportado en el año 2009 en la provincia de Buenos Aires en el mismo mes que fue del 54% cuando ocurrió la epidemia en donde emergió el virus[4]. Es posible que esta diferencia se deba a que una mayor parte de la población se encontraba ya protegida contra el virus con vacunas que contienen cepas A(H1N1) pdm09.

La mutación asociada a resistencia se encontró en dos pacientes, uno de ellos inmunosuprimido y bajo tratamiento con oseltamivir durante 11 días. Dicho paciente presentó previamente una infección con virus sensible al agente antiviral antes mencionado con lo que se puede inferir que no se trató de una resistencia primaria (contagio de persona a persona). Estos resultados coinciden con datos reportados previamente en otras regiones del mundo donde se encontraron virus que poseían la sustitución H274Y en pacientes inmunosuprimidos y con tratamiento con oseltamivir[12].

Existen casos donde se encontró una rápida selección de la mutación H274Y en pacientes en terapia con oseltamivir (entre 9 y 14 días). Esto sugiere que la terapia prolongada con un solo agente antiviral puede generar condiciones que son óptimas para el desarrollo de mutaciones asociadas a resistencia. Por lo tanto, discontinuar el tratamiento con oseltamivir o combinar con zanamivir puede ser una estrategia apropiada para prevenir estas mutaciones[13].

En el segundo caso, el paciente estaba infectado con una cepa viral a la cual se le detectó la sustitución que le confiere resistencia a oseltamivir al segundo día de internación y de haber recibido la droga.

Se han descripto casos de virus influenza A(H1N1)pdm09 resistentes en personas inmunocompetentes que no fueron tratadas con el agente antiviral antes mencionado, lo que demuestra el potencial de propagación de cepas resistentes de persona a persona[14]. En la Argentina, hasta el momento, no se han publicado este tipo de casos.

En el presente estudio se detectó la mutación asociada a resistencia a oseltamivir en un paciente inmunocompetente al segundo día de internación. Si bien no se cuenta con datos del paciente previos al estudio, podemos inferir que se ha contagiado el virus resistente de persona a persona debido al corto período de tratamiento con el agente antiviral.

La ausencia de otros casos descriptos en estudios previos, en pacientes no internados e inmunocompetentes infectados con la cepa resistente del virus que posee la sustitución H274Y, sugieren que el virus resistente con la sustitución H274Y no se ha diseminado en la zona de proveniencia de las muestras.

Actualmente, la mutación H274Y es muy poco frecuente, pero debe ser estudiada en pacientes que reciben profilaxis o tratamientos prolongados con oseltamivir. El impacto clínico de una infección con una cepa resistente puede ser una amenaza importante para pacientes inmunosuprimidos, así como también podría serlo para pacientes inmunocompetentes.

La inducción de la resistencia en inmunosuprimidos resalta la importancia del monitoreo de la terapia en estos pacientes. Todas las intervenciones posibles deben realizarse para evitar el surgimiento del virus A(H1N1)pdm09 resistente a oseltamivir, incluyendo la vacunación previa de inmunosuprimidos y de las personas que los rodean[15].

Los métodos para detectar cepas de influenza A(H1N1)pdm09 resistentes a oseltamivir son herramientas fundamentales para orientar a los profesionales médicos en la selección de la terapia antiviral de la influenza apropiada.

Conflictos de interés: Los autores declaran que no tienen conflictos de intereses.

Bibliografía

1. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: swine influenza A (H1N1) infections - California and Texas, April 2009. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2009; 58: 435-7.
2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of swine-origin influenza A (H1N1) virus infection - Mexico, March - April 2009. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2009; 58: 467-70.
3. Barrero PR, Viegas M, Valinotto LE, Mistchenkp AS. Genetic and Phylogenetic Analysis of Influenza A H1N1 pdm Virus in Buenos Aires. J Virol 2011; 85(2): 1058-66.
4. Echavarría M, Querci M, Marcone D et al. Pandemic (H1N1) 2009 Cases, Buenos Aires, Argentina. Emerg Infect Dis 2010; 16(2): 311-3.
5. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Drug susceptibility of swine-origin influenza A (H1N1) viruses, April 2009. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2009; 58(16):433-5
6. Wang MZ, Tai CY, Mendel DB. Mechanism by which mutations at His274 alter sensitivity of influenza A virus N1 neuraminidase to oseltamivir carboxylate and zanamivir. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 3809-16.
7. Hurt AC, Deng YM, Ernest J et al. Oseltamivir-resistant influenza viruses circulating during the first year of the influenza A(H1N1) 2009 pandemic in the Asia-Pacific region, March 2009 to March 2010. Euro Surveill 2011; 16: 24-31.
8. Dharan NJ, Gubareva LV, Meyer JJ et al. Infections with oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) virus in the United States. JAMA 2009; 301: 1034-1041.
9. Hurt AC, Ernest J, Deng YM et al. Emergence and spread of oseltamivir-resistant A(H1N1) influenza viruses in Oceania, South East Asia and South Africa. Antiviral Res 2009; 83(1):90-3.
10. Hurt AC, Hardie K, Wilson NJ et al. Characteristics of a widespread community cluster of H275Y oseltamivir-resistant A(H1N1)pdm09 influenza in Australia. J Infect Dis 2012; 206: 148-57.
11. Cane A, Casanueva E, Lolster T et al. First Isolation of a Oseltamivir - Resistent Influenza A (H1N1) Strain in Argentina. Pediatr Infect Dis J 2010; 29(4): 384.
12. Ledesma J, Vicente D, Pozo F et al. Oseltamivir-resistant pandemic influenza a (H1N1) 2009 viruses in Spain. J Clin Virol 2011; 51: 205-8.
13. Memoli MJ, Hrabal RJ, Hassantoufighi A, Eichelberger MC, Taubenberger JK. Rapid Selection of Oseltamivir and Peramivir-Resistant Pandemic H1N1 Virus during therapy in 2 Imunocompromided Host. Clin Infec Dis 2010; 50(9):1252-5
14. Le QM, Wertheim HF, Tran ND, van Doorn RH, Tran Hien N, Horby P. A community cluster of oseltamivir-resistant cases of 2009 H1N1 influenza. N Engl J Med 2010; 362: 86-7.
15. Bouhy X, Hamelin ME, Boivin G. Emergence of Oseltamivir-Resistant Pandemic H1N1 Virus during Prophylaxis. N Engl J Med 2009; 361(23): 2296-7.