

Sensibilidad del citomegalovirus frente a fármacos antivíricos en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana con coriorretinitis en España

M. Ángeles Cañizares^a, Isabel Losada^a, M. Jesús Pérez-Eliás^b, Juan González^c, Rafael Rubio^d, José Luis Casado^b y Antonio Guerrero^a

^aServicio de Microbiología. Complejo Hospitalario Juan Canalejo. A Coruña. ^bServicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Ramón y Cajal. Madrid. ^cServicio de Medicina Interna. Hospital La Paz. Madrid. ^dUnidad de VIH. Hospital 12 de Octubre. Madrid.

OBJETIVOS. El objetivo de este estudio prospectivo fue determinar la prevalencia de resistencia *in vitro* de citomegalovirus (CMV) al ganciclovir (GCV) y al foscarnet (FOS) en pacientes con sida y coriorretinitis. Además los resultados de la sensibilidad *in vitro* fueron comparados con la respuesta clínica al tratamiento.

PACIENTES Y MÉTODOS. Se incluyeron en el estudio 36 pacientes diagnosticados de retinitis por CMV y sida. Se realizaron ensayos de sensibilidad a antivíricos en 51 cepas clínicas de CMV procedentes de estos pacientes. La sensibilidad *in vitro* se comparó con la respuesta clínica al tratamiento. Los criterios de resistencia utilizados fueron dosis inhibitoria 50 (DI₅₀) GCV > 5 µM y DI₅₀ FOS > 400 µM.

RESULTADOS. Ninguna de las cepas de CMV estudiadas fue resistente al GCV o al FOS; sin embargo, 6 pacientes que tuvieron recidivas de la coriorretinitis durante la terapia de mantenimiento y aislamiento en el momento de la misma tuvieron una media de DI₅₀ de las cepas (n=8) de 1,95 µM para el GCV (desviación estándar [DE] 0,71) y 115,2 µM para el FOS (DE 34,7). Estos pacientes respondieron bien cuando los fármacos fueron utilizados a dosis de inducción.

CONCLUSIÓN. La sensibilidad *in vitro* no predice el buen control de la infección cuando se usa el fármaco a dosis de mantenimiento; esto sugiere que estas cepas deberían considerarse de resistencia intermedia.

Palabras clave: Citomegalovirus, resistencia, coriorretinitis, VIH.

Cytomegalovirus sensitivity to anti-retroviral agents in patients infected with the human immunodeficiency virus with chorioretinitis in Spain

OBJECTIVES. To determine the prevalence of the *in vitro* resistance rate of cytomegalovirus (CMV) to gancyclovir (GCV) and foscarnet (FOS) among patients with AIDS and chorioretinitis. Furthermore, *in vitro* sensitivity results were compared with the clinical response to therapy.

PATIENTS AND METHODS. Thirty-six patients with the diagnosis of CMV retinitis and AIDS were included in the study. Antiviral sensitivity testing was performed to 51 clinical CMV strains from these patients. The *in vitro* sensitivity was compared with the clinical response to therapy. The resistance criteria were the inhibitory dose₅₀ (ID₅₀) GCV > 5 µM and ID₅₀ FOS > 400 µM.

RESULTS. None of the CMV tested strains was resistant to GCV or FOS; however, six patients who had relapses of chorioretinitis while on maintenance therapy and isolation during the condition had mean ID₅₀ of strains (n=8) of 1,95 µM for GCV (standard deviation [SD] of 0.71) and 115.2 for FOS (SD, 34.7). These patients responded well when drugs were used at induction doses.

CONCLUSION. The *in vitro* sensitivity testing is not a good predictor of infection control when the drug is used at maintenance doses. This suggests that these strains should be classified in the intermediate resistant category.

Key words: Cytomegalovirus, resistance, chorioretinitis, HIV.

Introducción

Las infecciones por citomegalovirus (CMV) son la causa más importante de morbilidad y mortalidad en pacientes inmunodeprimidos, especialmente en receptores de trasplantes de médula ósea y de órgano sólido, y en pacientes con sida. En estos últimos, el CMV era la causa más común de infección vírica oportunista antes de la utilización de las terapias antirretrovíricas altamente efectivas. La retinitis producida por el citomegalovirus (RCMV) afecta entre el 20%-40% de los pacientes con sida, y es la manifestación más común de la enfermedad^{1, 2}.

Correspondencia: Dra. M. A. Cañizares.
Servicio de Microbiología.
Complejo Hospitalario Juan Canalejo.
As Xubias, 84.
15006 A Coruña.
Correo electrónico: angelina@canalejo.org

Este trabajo fue financiado en parte por el Fondo de Investigaciones Sanitarias: FIS nº 960030-01.

Manuscrito recibido el 3-4-2001; aceptado el 4-7-2001.

Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 2001; 19: 471-474

El ganciclovir (GCV), el foscarnet (FOS) y el cidofovir, incluido más recientemente, constituyen el tratamiento estándar para la infección por CMV¹ y se han asociado con la aparición de diferentes tipos de resistencia^{1,3}.

Se asume que los ensayos de sensibilidad *in vitro* de los microorganismos deben correlacionarse estrechamente con la respuesta clínica. Desafortunadamente existen pocos estudios que han valorado de forma crítica la efectividad de la terapia antimicrobiana utilizando los resultados de los ensayos de sensibilidad *in vitro* y su correlación con la respuesta clínica. La cuestión fundamental es saber si los ensayos de sensibilidad *in vitro* predicen la respuesta clínica del paciente⁴.

El objetivo de este estudio fue determinar la prevalencia de resistencia *in vitro* de CMV al GCV y al FOS en pacientes con coriorretinitis infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y correlacionar los resultados de la sensibilidad *in vitro* con la respuesta clínica al tratamiento.

Pacientes y métodos

Se diseñó un estudio prospectivo en el que se incluyeron pacientes infectados por el VIH diagnosticados de coriorretinitis por examen oftalmoscópico y que tuvieran al menos un aislamiento de CMV en sangre y/u orina. Se recogieron muestras de sangre y orina de estos pacientes en el momento del diagnóstico de la RCMV (previas al tratamiento antivírico), mensualmente a lo largo del estudio y en el momento de presentar recidiva de la enfermedad. También se obtuvieron muestras de otros orígenes cuando existió sospecha de infección por CMV extrarretiniana. El estudio comprendió el período entre noviembre de 1994 y septiembre de 1997. Treinta aislamientos procedieron del Hospital Ramón y Cajal (19 pacientes), siete del Hospital 12 de Octubre (cuatro pacientes) y trece del Hospital La Paz (trece pacientes), todos ellos de Madrid.

Se determinó la sensibilidad *in vitro* al GCV y FOS de los aislados clínicos de CMV procedentes de estos pacientes. Se estudiaron 51 cepas de CMV de 36 pacientes. Las muestras a partir de las cuales se aisló el CMV fueron: orina (n=40), sangre (n=8), biopsias (n=2) y líquido cefalorraquídeo (LCR) (n=1). Las muestras se procesaron para cultivo siguiendo la metodología estándar, en células MRC-5 e identificación por efecto citopático (ECP). Para el estudio de la sensibilidad *in vitro* se utilizó el ensayo clásico de reducción de placas de efecto citopático en células MRC-5⁵ para todos los aislados clínicos de CMV y se incluyó una cepa patrón sensible AD169 (VIRCELL, S.L.).

Ensayo de reducción de placas para citomegalovirus (n=51)

Se utilizaron placas de 24 pocillos con células MRC-5 recientes. Se añadió a cada pocillo de la placa un inóculo vírico de 50-100 unidades formadoras de placas (UFP) por 0,2 ml. Tras la centrifugación, diferentes diluciones de los fármacos antivíricos (0-24 µM para GCV y 0-800 µM para FOS) se pusieron en contacto con el virus. Como controles en cada prueba se incluyeron pocillos blancos (sin CMV) y pocillos sin agente antivírico. Cada dilución se estudió por triplicado. Las placas se incubaron a 37 °C durante seis a ocho días. Tras la incubación las monocapas se fijaron con metanol, se tiñeron con giemsa al 10% y se contó el número de placas de ECP en un microscopio invertido a 100 x. El cálculo de la dosis inhibitoria 50 (DI₅₀) se realizó utilizando el método de Reed y Muench modificado⁶. Se utilizaron los criterios de resistencia para GCV y FOS descritos previamente que consideran CMV resistente al GCV DI₅₀ > 5 µM y al FOS DI₅₀ > 400 µM⁷.

Análisis estadístico

El programa Access (Microsoft) se utilizó para construir la base de datos con las diferentes variables y el programa SPSS para el análisis de frecuencia y comparación de medias.

Tratamiento de los pacientes

Los pacientes recibieron tratamiento estándar según criterio clínico con GCV o FOS de acuerdo con las dosis recomendadas. Para GCV (Roche®): 5 mg/kg cada doce horas durante 14-21 días de tratamiento de inducción y 6 mg/kg/día cinco días a la semana o 5 mg/kg/día siete días a la semana de tratamiento de mantenimiento. Para FOS (Astra®) las dosis fueron 60 mg/kg cada ocho horas o 90 mg/kg cada doce horas para el tratamiento de inducción y 90-120 mg/kg/día siete días a la semana para el tratamiento de mantenimiento.

Resultados

De los 36 pacientes incluidos en el estudio, nueve eran mujeres (25%) y 27 hombres (75%), con una edad comprendida entre 27 y 50 años (mediana 36). En el momento de su inclusión en el estudio tenían sida 28 pacientes (77,8%), todos ellos en un estadio C3. El factor de riesgo fue en un 38,9% de los casos las relaciones homosexuales, en el 30,6% el ser usuarios de drogas por vía parenteral, en el 25% de los casos las relaciones heterosexuales y en dos pacientes era desconocido. De los 36 pacientes, 24 (66,7%) murieron durante el desarrollo del estudio con un tiempo medio de supervivencia desde el diagnóstico de la RCMV de 35,9 semanas. Doce pacientes sobrevivieron hasta el final del estudio con una media de seguimiento de 47,7 semanas. Veinte pacientes (55,6%) presentaron al menos una recidiva clínica de su retinitis durante el seguimiento del estudio y de ellos murieron el 90%; no recidivaron 16 pacientes, de los cuales sobrevivió el 62,5%.

Ninguno de los aislamientos de CMV estudiados fue resistente *in vitro* al GCV o al FOS. De las 51 cepas analizadas, 40 fueron aisladas en el momento del diagnóstico de la RCMV y correspondían, por tanto, a pacientes que no habían recibido ningún tratamiento con fármacos antivíricos; once cepas fueron aisladas después de iniciado el tratamiento, de las cuales ocho se aislaron en el momento de la recidiva clínica de la RCMV (tres aislamientos de sangre y cinco de orina) y tres aislamientos (uno de sangre, otro de orina y otro de biopsia hepática) no se relacionaron con manifestaciones retinianas. Con respecto a estas once cepas aisladas bajo presión de tratamiento, seis de ellas procedían de pacientes tratados con GCV y cinco de pacientes tratados previamente con FOS. La media de semanas de tratamiento en estos casos fue de 11,6 (4-19) para los pacientes tratados con GCV y de 7,6 (2-14) para los tratados con FOS. Los valores de las DI₅₀ para ambos fármacos en los dos grupos de pacientes se presentan en la tabla 1. No se observaron diferencias en los datos de sensibilidad entre las cepas sometidas a tratamiento previo con GCV o FOS y las que no habían recibido presión previa de tratamiento. De los pacientes que presentaron recidivas clínicas, se obtuvieron aislamientos en el momento de la misma a partir de muestras

TABLA 1. Sensibilidad de cepas clínicas de citomegalovirus y tratamiento*

	Sin tratamiento	Tratamiento con GCV	Tratamiento con FOS	Total
n	40	6	5	51
DI ₅₀ GCV (µM)	1,97 (1,04-4,0)	1,65 (1,14-2,04)	2,54 (1,65-3,19)	1,99 (1,04-4,0)
DI ₅₀ FOS (µM)	111,7 (36,6-195,2)	112,3 (86,5-184)	124,1 (96,0-179,5)	112,6 (36,6-195,2)
Semanas Tratamiento	-	11,6 (4-19)	7,6 (2-14)	-

DI: dosis inhibitoria; GCV: ganciclovir; FOS: foscarnet.
*Datos en media y rango entre paréntesis.

de seis de ellos (ocho cepas). Tres de estos pacientes habían sido tratados previamente con GCV una media de 14 semanas, 2 habían sido tratados previamente con FOS una media de 13 semanas y uno que tuvo dos aislamientos en dos recidivas fue tratado con ambos fármacos. Los valores medios de las DI₅₀ de estas cepas fueron de 1,9 µM (rango: 1,14-3,19) para GCV y de 115,2 µM (86,5-179,5) para FOS. La recidivas no se asociaron, por tanto, a la aparición de resistencia *in vitro*. No se encontraron diferencias significativas cuando se compararon las DI₅₀ de los aislamientos sin presión previa de tratamiento con las DI₅₀ de los aislados en el momento de recidivas clínicas de pacientes tratados previamente (tabla 2). Cuando se analizaron los valores de las DI₅₀ de las cepas aisladas de pacientes que no habían recibido tratamiento previo no se vieron diferencias significativas entre los que posteriormente tuvieron recidiva y los que no la tuvieron (tabla 2).

Discusión

En los pacientes muy inmunodeprimidos con enfermedad por el CMV, como es el caso de pacientes con coriorretinitis y sida, la terapia prolongada con fármacos antiviricos es necesaria. Un riesgo asociado a este uso prolongado es la aparición de resistencias⁸. En nuestro estudio, ninguna de las cepas de CMV aisladas de pacientes con coriorretinitis y sida presentaron resistencia *in vitro* a GCV o FOS de acuerdo con los criterios establecidos previamente². Seis pacientes que presentaron recidivas clínicas de su retinitis después del tratamiento de mantenimiento con GCV o FOS y que tuvieron aislamiento de CMV en ese momento presentaron unos datos de DI₅₀ sensibles a ambos fármacos. Estos pacientes respondieron clínicamente cuando los fármacos fueron utilizados a altas dosis (dosis de inducción).

En los pacientes infectados con el VIH, la prevalencia de resistencias primarias y secundarias al GCV se encuentra entre el 0,9% y el 64% de acuerdo con los criterios usualmente aceptados^{1,7,9-11}. Así, en un estudio en el que se introdujeron pacientes con RCMV que no habi-

an sido tratados previamente, la prevalencia de resistencia al GCV fue del 2% y al FOS del 4%⁹; en otro que analizó 31 pacientes con sida y RCMV tratados con GCV la incidencia total de cepas resistentes fue del 7,8%, y el 38% de los pacientes que fueron tratados con GCV por vía intravenosa durante más de 3 meses excretaron cepas de CMV resistentes a GCV¹⁰. Dabs et al observaron en su estudio que el 11,4% de sus pacientes tratados con GCV presentaron aislamientos resistentes después de 6 meses de tratamiento y el 27,5% después de 9 meses¹². La mayoría de las cepas de CMV de nuestro estudio fueron aisladas en el momento del diagnóstico de la coriorretinitis, por lo que este estudio analiza fundamentalmente resistencia primaria y nuestros resultados están en concordancia con los descritos por otros autores⁹.

Se han publicado diferentes valores de DI₅₀ para definir la resistencia de los aislados clínicos de CMV, con una variabilidad de DI₅₀ entre 5 y 12 µM para definir resistencia al GCV y entre 300 y 400 µM para definirla al FOS^{2,7,13,14}. Estos datos muestran la variabilidad significativa entre métodos y laboratorios. Las variables que afectan los resultados de sensibilidad *in vitro* incluyen el tipo de línea celular empleada, el tamaño de inóculo vírico, el método utilizado y el laboratorio que ha realizado el ensayo⁸. Los criterios más ampliamente aceptados para sensibilidad en pacientes infectados con el VIH y con coriorretinitis por CMV quizá deberían ser reconsiderados, ya que los fármacos y las dosis utilizados (GCV y FOS) para la retinitis por CMV consiguen concentraciones intravítreas en el límite o subterapéuticas¹⁵. La resistencia, entendida por un alto valor de la DI₅₀, tiene un excelente valor predictivo para predecir una respuesta clínica desfavorable en pacientes con las defensas inmunes deficientes; sin embargo, la sensibilidad, entendida por un bajo valor de la DI₅₀, tiene un valor predictivo insuficiente para predecir una respuesta clínica favorable⁴. Nuestros valores de DI₅₀, catalogados como sensibles de acuerdo con los criterios habituales, deberían considerarse como de resistencia intermedia de acuerdo con su capacidad para predecir la respuesta desfavorable cuan-

TABLA 2. DI₅₀ de las cepas clínicas de citomegalovirus en relación con la recidiva clínica

Evolución clínica	Cepas de CMV sin tratamiento previo			Cepas de CMV con tratamiento previo		
	n	DI ₅₀ GCV*	DI ₅₀ FOS*	n	DI ₅₀ GCV*	DI ₅₀ FOS*
Con recidiva	28	1,93 (0,68)	115,2 (39,7)	8	1,90 (0,71)	115,2 (34,7)
Sin recidiva	12	2,07 (0,93)	103,2 (26,8)	3	2,30 (0,91)	124,2 (51,8)

*: µM. Datos de media y desviación estándar entre paréntesis.
DI: dosis inhibitoria; CMV: citomegalovirus; GCV: ganciclovir; FOS: foscarnet.

do se trata de pacientes con coriorretinitis y sida, ya que fracasan con dosis de mantenimiento y responden clínicamente cuando se utilizan dosis de inducción.

Creemos que la mala evolución de la RCMV a pesar de no haber encontrado datos de resistencia *in vitro* en nuestros aislados de CMV de pacientes que tuvieron recidivas de la RCMV y que habían sido sometidos a presión de tratamiento antivírico, puede deberse a varias causas; en primer lugar, al corto tiempo de tratamiento en la mayoría de los casos, en segundo lugar, a que los pases necesarios en el laboratorio para conseguir una carga vírica suficiente que permita realizar el ensayo *in vitro* pueden seleccionar cepas de CMV que no sean representativas de la población original de virus⁸, y en tercer lugar porque los valores de sensibilidad *in vitro* no se correspondan con la sensibilidad *in vivo* dada la escasa penetración de los fármacos en la coriorretina¹⁵. Esto explicaría la discordancia entre sensibilidad *in vitro* y sensibilidad *in vivo*, y justificaría que aunque nuestras cepas tengan valores de DI_{50} similares a los de la cepa patrón sensible AD169, deberían considerarse de sensibilidad intermedia debido a su deficiente respuesta *in vivo*.

Son necesarios criterios de consenso para las técnicas y los puntos de corte que indican sensibilidad para el caso de la RCMV ya que la evolución clínica de ésta, bajo tratamiento de mantenimiento en pacientes con sida, sugiere que los valores de las DI_{50} para considerar una cepa como sensible deberían ser menores.

Bibliografía

- Jabs DA, Enger C, Dunn JP, Forman M. Cytomegalovirus retinitis and viral resistance: ganciclovir resistance. *J Infect Dis* 1998; 177(3): 770-773.
- Studies of ocular complications of AIDS (SOCA) in collaboration with the AIDS Clinical Trial Group. Cytomegalovirus (CMV) culture results, drug resistance, and clinical outcome in patients with AIDS and CMV retinitis treated with foscarnet or ganciclovir. *J Infect Dis* 1997; 176(1): 50-58.
- Eric A, Chou S, Biron KK, Stanat SC, Balfour HH Jr, Jordan MC. Progressive disease due to ganciclovir-resistant cytomegalovirus in immunocompromised patients. *New Engl J Med* 1989; 320(5): 289-293.
- Johnson CC. *In vitro* testing: correlations of bacterial susceptibility, body fluid levels and effectiveness of antibacterial therapy. En: Lorian V, ed. *Antibiotics in laboratory medicine*. (4th ed). Philadelphia: lippincot, Williams & Wilkins, 1996.
- Swierkosz EM, Biron KK. Antiviral susceptibility testing. En: Iseberg HD, ed. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, supplement 1. Washington, D. C.: American Society for Microbiology, 1994; 8.26.1-8.26.21.
- Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* 1938; 27: 493-497.
- Drew LW, Miner R, Saleh E. Antiviral susceptibility of cytomegalovirus: criteria for detecting resistance to antivirals. *Clin Diagn Virol* 1993; 1: 179-183.
- Eric A. Resistance of Human Cytomegalovirus to Antiviral Drugs. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(2): 286-297.
- Jabs DA, Dunn JP, Enger C, Forman M, Bressler N, Charache P. Cytomegalovirus retinitis and viral resistance. Prevalence of resistance to diagnosis, 1994. *Arch Ophthalmol* 1996; 114(7): 809-814.
- Drew WL, Miner RC, Busch DF, Follansbee SE, Gullett J, Mehalko SG, et al. Prevalence of resistance in patients receiving ganciclovir for serious cytomegalovirus infection. *J Infect Dis* 1991; 163(4): 716-719.
- Kuppermann BD. Therapeutic options for resistant cytomegalovirus retinitis. *J Acquir Immun Def Syndr Human Retrovirol* 1997; 14 (Supl 1): s13-s21.
- Jabs DA, Enger C, Dunn JP, Forman M. Cytomegalovirus retinitis and viral resistance: ganciclovir resistance 1998; 177: 770-773.
- Eric A, Gil-Roda C, Pérez J, Balfour HH Jr, Sannerud KJ, Hanson MN, et al. Antiviral susceptibilities and analysis of UL97 and DNA polymerase sequences of clinical cytomegalovirus isolates from immunocompromised patients. *J Infect Dis* 1997; 175: 1.087-1.092.
- Chow S, Marousek G, Parenti DM, Gordon SM, LaVoy AG, Ross JG, et al. Mutation in region II of the DNA polymerase gene conferring foscarnet resistance in cytomegalovirus isolates from 3 subjects receiving prolonged antiviral therapy. *J Infect Dis* 1998; 178: 526-530.
- Arévalo JF, González C, Capparelli E, Kirsch LS, García RF, Quiceno JI, et al. Intravitreal and plasma concentrations of ganciclovir and foscarnet after intravenous therapy in patients with AIDS and cytomegalovirus retinitis. *J Infect Dis* 1995; 172(4): 951-956.