

J. Reina

Análisis de la disminución de la sensibilidad de las cepas gripales A (H5N1) aviares y humanas a los inhibidores de la neuraminidasa

Centro de Referencia de la Gripe Illes Balears
Unidad de Virología
Servicio de Microbiología
Hospital Universitario Son Dureta
Palma de Mallorca

Las mejores opciones para el control de las cepas gripales aviares (H5N1) incluyen la vacunación específica y la profilaxis y el tratamiento antiviral. Sin embargo, debido a que las cepas H5N1 presentan mutaciones antigénicas continuas, la elaboración de una cepa vacunal afin es por el momento imposible. Por tanto, durante las primeras fases de una pandemia, sólo se podrán aplicar las medidas de control basadas en los fármacos antivirales. En la actualidad sólo los inhibidores de la neuraminidasa (IN) (zanamivir y oseltamivir) son considerados efectivos en la profilaxis y el tratamiento de los pacientes con infección por el virus H5N1. La sensibilidad de las cepas H5N1 a los INs se clasifica en tres grupos. Las cepas del linaje I aisladas antes de 2004 se mostraban tan sensibles a los INs como las cepas de referencia (grupo 1). Sin embargo, las cepas del linaje I aisladas a partir de 2004 se mostraron 6-7 veces menos sensibles a los INs (grupo 2). Las cepas del linaje II aisladas de 2005 a 2007 presentaban una sensibilidad unas 15-30 veces menor al oseltamivir que las del linaje I (grupo 3). El descenso específico en la sensibilidad al oseltamivir en las cepas del linaje 2 aisladas en Camboya e Indonesia es un dato preocupante, especialmente por el hecho de que mantienen su patogenicidad y transmisibilidad en las aves y son claramente patógenas para los humanos. No se han observado variaciones en la sensibilidad frente al zanamivir. El zanamivir puede desempeñar un papel importante en el stock de antivirales frente a una pandemia. Debido a que las cepas del linaje 2 están difundiendo a gran parte de Europa y África, la colaboración en la detección y caracterización fenotípica frente a los INs es un proceso crítico para prever el futuro.

Palabras clave:
Gripe aviar. H5N1. Inhibidores de la neuraminidasa. Resistencia antiviral.

Rev Esp Quimioter 2008;21(1):32-36

Correspondencia:
Jordi Reina
Centro de Referencia de la Gripe Illes Balears
Unidad de Virología
Servicio de Microbiología
Hospital Universitario Son Dureta
Andrea Doria, 55
07014 Palma de Mallorca
Correo electrónico: jreina@hdsd.es

Analysis of decrease in sensitivity in influenza A (H5N1) avian and human strains to neuraminidase inhibitors

The options for efficient control of avian influenza A (H5N1) viruses include specific vaccination and antiviral prophylaxis and treatment. However, because H5N1 viruses undergo continuous antigen mutations, the production of a matched vaccine strain is currently not possible. Thus, during the early pandemic period, specific control measures would rely solely on antiviral drugs. Now only neuraminidase inhibitors (NIs) (zanamivir and oseltamivir) are considered for prophylaxis and therapy in patients with H5N1 infection. The sensitivities of H5N1 strains to the NIs fell into 3 groups. The clade I viruses isolated before 2004 were as sensitive to NIs than reference strains (first group). But the clade I viruses isolated from 2004 were 6 to 7-fold less sensitivity to NIs (second group). The clade II strains isolated from 2005 to 2007 demonstrated a 15 to 30 fold decrease in sensitivity to oseltamivir compared with clade I viruses (third group). The specific decrease in sensitivity to oseltamivir of both Cambodian and Indonesian clade 2 influenza H5N1 isolates is disturbing, especially because they maintain their pathogenicity and transmissibility in birds and are clearly pathogenic in humans. No altered sensitivity to zanamivir has been detected. Zanamivir may also play an important role in pandemic stockpiles. Because the clade 2 virus is now spread through parts of Europe and Africa, continued global collaboration and phenotypic testing of NIs sensitivity are critical for a future pandemic.

Key words:
Avian influenza. H5N1. Neuraminidase inhibitors. Antiviral resistance.

La principal medida para el control de una posible pandemia gripal causada por una cepa humana o aviar es la vacunación selectiva o universal de la población humana frente a la misma. Sin embargo, en estos momentos las características moleculares y la elevada capacidad de mutación y adaptación de la cepa aviar H5N1 parecen dificultar la obtención

de una vacuna frente a la misma en un corto período de tiempo¹⁻⁴. En el caso de que se produzca el inicio de una pandemia y se dispusiera de la cepa aviar adecuada para preparar una vacuna eficaz, se precisaría un período mínimo de 4-8 meses para disponer de la misma en cantidades significativas y poder aplicarse de una forma generalizada¹⁻⁶.

Como consecuencia de ello se hace necesario disponer de una alternativa terapéutica durante el período de fabricación vacunal. De los dos grupos de fármacos antivirales comercializados, los inhibidores de la proteína M2 y los inhibidores de la neuraminidasa, sólo estos últimos parece que deberían ser considerados una alternativa terapéutica frente a las cepas gripales aviarias H5N1⁷. El motivo radica en que hasta la fecha todas las cepas estudiadas de este subtipo, tanto las aviarias como las aisladas de personas infectadas, han mostrado invariablemente su resistencia a los primeros antivirales⁸. Sin embargo, la mayoría de estudios realizados con estas cepas han mostrado en general una sensibilidad constante a los IN oseltamivir y zanamivir. De este modo y con estas premisas, la OMS recomienda ante la situación pre-pandémica creada por la cepa aviar H5N1 el empleo del antiviral oseltamivir para el tratamiento de los casos clínicos confirmados y para la profilaxis postexposición en las personas de riesgo y el inicio de unos programas de almacenamiento de este antiviral ante la posibilidad del inicio de esta pandemia^{1,2}.

Desde la aparición de la cepa gripal aviar H5N1 en 1997 se han producido una serie de variaciones genéticas de la misma que han derivado en la cepa predominante de los brotes aviarias de 2003^{8,9}. Las cepas aviarias aisladas a partir de este momento pertenecían uniformemente al genotipo Z, aunque en 2004 se observó la aparición de una nueva variación genética que determinó la existencia y el mantenimiento de un segundo genotipo, el designado como V^{10,11}. A partir de 2004 cocirculan en el mundo los dos genotipos que han constituido la base de los llamados sublinajes aviarios (clades). Así, el sublinaje 1 (genotipo V) se ha extendido eminentemente por el Sudeste asiático (Vietnam, Tailandia, Camboya, Laos y Malasia). Por su parte, el sublinaje 2 (genotipo Z) y sus tres subclases han emergido y se han distribuido por China e Indonesia y a partir de allí se han expandido hasta llegar a Europa y África en 2005⁹⁻¹³ (tabla 1).

Una de las diferencias más importantes entre los dos linajes genéticos es la distinta sensibilidad de los mismos frente al oseltamivir, uno de los principales IN recomendado para la profilaxis y el tratamiento de las infecciones humanas causadas por las cepas gripales aviarias del subtipo H5N1^{14,15}. Por el contrario, en términos generales, los dos linajes presentan unas sensibilidades muy parecidas frente al zanamivir, otro de los inhibidores con posible utilidad humana^{15,16}.

La sensibilidad frente al oseltamivir puede clasificarse en tres grupos cuando se comparan sus valores con los obser-

Año	Genotipos
1999	Gs/Gd
2000	Gs/Gd, C
2001	A, B, C, D, E, X ₀
2002	Z, Z ⁺ , Y, B, W, X ₀ -X ₃
2003	Z, Z ⁺ , V
2004-2007	V (linaje 1) (Japón y Corea) Z (linaje 2) (tres sublinajes) Sudeste asiático, Europa y África

vados frente a la cepa humana H1N1 de referencia. El primer grupo lo constituyen las cepas del linaje 1 aisladas hasta 2004, que se han mostrado igual de sensibles que las cepas de referencia. Sin embargo, las cepas de este linaje aisladas a partir de 2005 en Camboya se han mostrado 6-7 veces menos sensibles al oseltamivir que las anteriores (sensibilidad intermedia) (segundo grupo); al proceder de la misma zona geográfica que las primeras, este dato hace pensar en un proceso de adaptación evolutiva o de selección inducida^{14,16}.

El tercer grupo es actualmente el más preocupante, ya que corresponde a las cepas del linaje 2 aisladas en Indonesia en 2005, que han mostrado sensibilidades 15-30 veces menores frente al oseltamivir (baja sensibilidad) comparadas con las observadas en las cepas de referencia y las del linaje 1¹⁶. Este dato no parece ser sólo local, sino que se ha confirmado fuera de este país por la comunicación de Govorskova et al.¹⁷ referente a la cepa humana A/Turkey/15/2006 (linaje 2), que se ha mostrado con una sensibilidad 60 veces inferior frente al oseltamivir que la cepa patrón de linaje 1 (A/Vietnam/1203/2004). Esta importante disminución de la sensibilidad es muy similar a la que provoca la clásica mutación N294S (asparagina/serina) en el gen de la neuraminidasa y la descrita recientemente en una cepa humana en Egipto y que parece haberse inducido como consecuencia del tratamiento con oseltamivir^{19,20}.

Lo interesante de estos datos es que mientras la sensibilidad frente a zanamivir se mantiene baja y constante, las sensibilidades frente al oseltamivir han ido disminuyendo progresivamente. Al analizar la estructura química de estos antivirales se puede comprobar cómo aunque ambos derivan de análogos del ácido siálico, el zanamivir presenta una única sustitución en el grupo guanidínico de la posición 4' del anillo glucídico, mientras que el oseltamivir presenta un grupo amino en la posición 4' y, además, un grupo hidrofóbico pentil-éter sustituyendo a la cadena de glicerol en la posición 6' del mismo anillo glucídico^{7,21,22}. De este modo la reorientación del ácido glutámico en la posición 276 de la

neuraminidasa (E276) del sitio activo se convierte en un elemento clave e imprescindible para crear un bolsillo hidrofóbico que permita la unión del grupo pentil-éter¹⁶. Por ello, las mutaciones que evitan o dificultan esta reorientación determinan la aparición de elevada resistencia (baja sensibilidad) al oseltamivir. De todas las descritas, las más frecuentemente detectadas han sido la H274Y (histidina/tirosina) y la R292K (arginina/lisina)^{7,23,24}. También se ha comprobado cómo la mutación en la posición E119V (ácido glutámico/valina) determina una resistencia al oseltamivir basada en una modificación en la reorientación del grupo 2-amino (tabla 2)²⁵. En términos generales las mutaciones que afectan a los sitios catalíticos (R292K, R152K) confieren a las cepas gripales resistencia cruzada frente al zanamivir y oseltamivir, mientras que las que afectan al tronco estructural de la enzima y, por tanto, a la configuración o reorientación global de la misma (H274Y, E119G/A/D), aparentemente sólo confieren resistencia al oseltamivir^{21,23,26}.

Los análisis sobre estructura y secuenciación realizados por diferentes autores sobre la neuraminidasa del virus gripal A han mostrado que el sitio activo catalítico de la misma posee unos residuos aminoácidos totalmente conservados en todos los 16 subtipos descritos^{16,21,23}. Los principales puntos que participan en el sitio catalítico de la enzima son la R118, D151, R152, R224, E276, R292, R371 y Y406^{27,28} y los que interactúan con el sustrato son básicamente los E119, R156, W178, S179, D/N198, I222, E227, H274, E277, N294 y E425^{23,24,28}. De este modo a la hora de diseñar nuevos IN es preciso basarlos en su interacción con alguna de las zonas conservadas para que sean eficaces en la mayoría de subtipos conocidos²⁹.

Los estudios de mutagénesis realizados sobre las zonas conservadas de la neuraminidasa han demostrado que la sustitución de algunos aminoácidos en estas zonas determinan una disminución de la propia actividad enzimática de la misma^{21,26}. La sustitución de los aminoácidos en las posiciones 119 y 227 de la N9 determina una reducción de su acti-

vidad enzimática y la sensibilidad al zanamivir²³. Por tanto, en el estudio de las cepas con sensibilidad disminuida a los IN es preciso secuenciar completamente el gen que la codifica y comprobar las sustituciones de aminoácidos para poder valorar el grado y significado de esta disminución farmacológica^{16,22}.

Las mutaciones en las zonas conservadas de la neuraminidasa no sólo determinan una disminución de su actividad catalítica, sino que además, y es un factor que hay que tener en cuenta, modifican el equilibrio o balance funcional entre la neuraminidasa y la hemaglutinina en el proceso de la replicación viral²⁵. Como consecuencia de ello las cepas con este tipo de mutaciones (R292K) pueden parecer resistentes a los antivirales (menor actividad replicativa) y simplemente presentar un desbalance replicativo funcional^{24,25}.

Los estudios recientes con cepas de ambos linajes han mostrado cómo se mantienen sensibles al compuesto 4-amino-Neu5Ac2en, lo cual parece indicar que el descenso en la fijación del oseltamivir se debe específicamente a las modificaciones de las interacciones alrededor del grupo 6-pentil-éter, lo cual explicaría por qué no se afecta la fijación a la neuraminidasa del zanamivir y se mantienen los valores de sensibilidad constantes¹⁶.

La disminución en la sensibilidad al oseltamivir tanto en las cepas del linaje 1 aisladas en 2005 en Camboya como en las pertenecientes al linaje 2 recientes es un dato preocupante, especialmente debido a que los estudios experimentales han mostrado que estas cepas mantienen su elevada patogenicidad y transmisibilidad para las aves y su patogenicidad para los seres humanos^{16,20}. Estos datos contrastan con comunicaciones previas que parecían indicar que las cepas con baja sensibilidad al oseltamivir presentaban una menor patogenicidad, excreción y transmisibilidad en humanos³⁰.

La aparición de cepas gripales aviarias H5N1 en seres humanos infectados en Egipto en 2006 (con la mutación N294S) ha alertado a la OMS. En un comunicado reciente establece que estas cepas siguen siendo totalmente sensibles al zanamivir y sólo menos sensibles al oseltamivir. Este organismo no ha modificado su recomendación sobre el valor y la eficacia del oseltamivir en la profilaxis y el tratamiento de las infecciones humanas por estas cepas. Sin embargo, sugiere que se realicen estudios sobre la sensibilidad natural de las cepas gripales aisladas en animales y la sensibilidad a otros antivirales³¹ y recomienda intensamente que se realice un tratamiento combinado con los dos fármacos antivirales (zanamivir y oseltamivir) en aquellas áreas o zonas geográficas en las que exista constancia de la presencia de cepas gripales con sensibilidad disminuida al oseltamivir¹⁹.

En el estudio previo realizado por Monto et al.³² sobre la detección de cepas gripales con resistencia a los IN se observa que en los 3 primeros años de su utilización (1996-1999) la tasa de resistencia era del 0,33%. La mayoría de cepas resistentes al oseltamivir se aislaron en personas que no ha-

Tabla 2

Principales mutaciones de la neuraminidasa que pueden determinar disminución de la sensibilidad al oseltamivir

Mutación	Consecuencia
H274Y	Disminución de la fijación
R292K	Disminución de la fijación
N294S	Disminución de la fijación
E276	Reorientación de la zona de fijación
E119	Reorientación de la zona de fijación
R118	Modificación catalítica
H252Y	Modificación de la zona globular

bían sido tratadas con este fármaco, lo cual hace pensar en que este valor corresponde a la resistencia primaria o natural existente en la población viral de una determinada zona geográfica. La mutación más frecuentemente detectada en las cepas resistentes era la clásica H274Y, ya descrita en diferentes zonas del mundo^{16,23}.

La consecuencia de esta baja sensibilidad al oseltamivir puede ser la dosificación subóptima de los pacientes tratados con este antiviral, de modo que al desconocerse este dato se esté administrando la dosis empírica (75 mg/12-24 h), que seleccionaría a las cepas existentes con mayor resistencia al antiviral^{7,16}. Algunos estudios ya han comunicado la emergencia de cepas resistentes del linaje 1 en pacientes tratados con dosis habituales de oseltamivir, lo cual parece indicar que en ciertas zonas geográficas se requerirá una terapia con dosis superiores a las previamente recomendadas (150 mg/12-24 h). Si además se confirman los estudios previos que demuestran que la mayoría de cepas gripales del linaje 2 son como mínimo 15-30 veces menos sensibles que las del linaje 1, parece ya casi obligatorio el inicio de una terapia específica con dosis elevadas en los pacientes con este tipo de infecciones^{16,33}.

La aparición y extensión de las cepas gripales aviarias (H5N1) de ambos linajes genéticos con sensibilidades disminuidas al oseltamivir pero con mantenimiento de una elevada sensibilidad al zanamivir plantean la necesidad de seguir considerando este antiviral posible alternativa terapéutica frente a una posible pandemia causada por las cepas gripales aviarias del subtipo H5N1. De este modo sería recomendable el almacenamiento de ambos tipos de antivirales hasta que se disponga de más datos sobre la verdadera realidad de este fenómeno viral.

BIBLIOGRAFÍA

1. The Writing Committee of the World Health Organization (WHO) consultation on human influenza A/H5. *N Engl J Med* 2005;353:1374-85.
2. World Health Organization. WHO global influenza preparedness plan. The role of the WHO and recommendations for national measures before and during pandemics, 2005.
3. Plan nacional de preparación y respuesta ante una pandemia de gripe. Ministerio de Sanidad y Consumo, 2005.
4. Webby RJ, Webster RG. Are we ready for pandemic influenza? *Science* 2003;302:1519-22.
5. Fedson DS. Pandemic influenza and the global vaccine supply. *Clin Infect Dis* 2003;46:1552-61.
6. Webby RJ, Pérez DR, Coleman JS. Responsiveness to a pandemic alert: use of reverse genetics for rapid development of influenza vaccines. *Lancet* 2004;363:1099-103.
7. Reina J. Inhibidores de la neuraminidasa y su potencial utilización en la pandemia de gripe aviar. *Med Clín (Barc)* 2005;125:780-3.
8. Li KS, Guan Y, Wang J, Smith GJD, Xu KM, Duan L, et al. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature* 2004;430:209-13.
9. Reina J, Ortiz de Lejarazu R. Mecanismos de patogenicidad y adaptabilidad humana de las cepas gripales aviarias A (H5N1). *Rev Esp Quimioter* 2005;18:273-80.
10. Guan Y, Peiris JS, Lipatov AS, Ellis TM, Dyrting KC, Krauss S, et al. Emergence of multiple genotypes of H5N1 avian influenza viruses in Hong Kong SAR. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:8950-5.
11. Shortridge K, Zhou N, Guan Y, Gao P, Ito T, Kawaoka Y, et al. Characterization of avian H5N1 influenza viruses from poultry in Hong Kong. *Virology* 1998;252:331-42.
12. Matrosovich M, Zhou N, Kawaoka Y, Webster RG. The surface glycoprotein of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J Virol* 1999; 73:1146-155.
13. World Health Organization. Avian influenza A (H5N1). *Weekly Epidemiol Rev* 2004;79:65-70.
14. Rameix-Welti MA, Agou F, Buchy P, Mardy S, Aubin JT, Veron M, et al. Natural variation can significantly alter sensitivity to oseltamivir of influenza A (H5N1) viruses. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:3809-15.
15. De Clercq E, Neysts J. Avian influenza A (H5N1) infection: targets and strategies for chemotherapeutic intervention. *Trends Pharmacol Sci* 2007;28:280-5.
16. McKimm-Breschkin JL, Selleck PW, Usman TB, Johnson MA. Reduced sensitivity of influenza A (H5N1) to oseltamivir. *Emerg Infect Dis J* 2007;13:1354-7.
17. Govorkova EA, Ilyushina NA, Boltz DA, Douglas A, Yilmaz N, Webster RG. Efficacy of oseltamivir therapy in ferrets inoculated with different clades of H5N1 influenza virus. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:1414-24.
18. World Health Organization. Tamiflu resistance found in Egypt patients. Destacado en prensa el 22 de enero de 2007. En: http://www.emro.who.int/csr/media/pdf/ai_press_22_01_07.pdf.
20. Le QM, Kiso M, Someya K, Sakai YT, Nguyen TH, Nguye KH, et al. Avian flu: isolation of drug-resistant H5N1 virus. *Nature* 2005; 437:1108.
21. McKimm-Breschkin JL, McDonald M, Blick TJ, Colman PM. Mutation in the influenza virus neuraminidase gene resulting in decreased sensitivity to the neuraminidase inhibitor 4-guanidino-Neu5Ac2en leads to instability of the enzyme. *Virology* 1996;225:240-2.
22. McKimm-Breschkin JL, Sahasrabushe A, Blick TJ, McDonald M, Colman PM, Hart GJ, et al. Mutations in a conserved residue in the influenza virus neuraminidase active site decreases sensitivity to Neu5Ac2en-derived inhibitors. *J Virol* 1998;72:2456-62.
23. McKimm-Breschkin JL. Resistance of influenza viruses to neuraminidase inhibitors: a review. *Antivir Res* 2000;47:1-17.
24. McKimm-Breschkin JL. Management of influenza virus infections with neuraminidase inhibitors: detection, incidence and implications of drug resistance. *Treat Respir Med* 2005;4:107-16.
25. Yen HL, Hoffmann E, Taylor G, Scholtissek C, Monto AS, Webster RG, et al. Importance of neuraminidase active-site residues to the neuraminidase inhibitor resistance of influenza viruses. *J Virol* 2006;80:8787-95.
26. McKimm-Breschkin JL, Trivedi T, Hampson A, Hay A, Klimov A, Tashiro M, et al. Neuraminidase sequence analysis and susceptibilities of influenza virus clinical isolates to zanamivir and oseltamivir. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:2264-72.

27. Colman PM. Influenza virus neuraminidase: structure, antibodies and inhibitors. *Protein Sci* 1994;3:1687-96.
28. Colman PM, Varghese JN, Laver WG. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature* 1983;303:41-4.
29. Smith BJ, McKimm-Breschkin JL, McDonald M, Fernley RT, Varghese JN, Colman PM. Structural studies of the resistance of influenza virus neuraminidase to inhibitors. *Med Chem* 2002;45:2207-12.
30. Yen HL, Herlocher LM, Hoffmann E, Matrosovich MN, Monto AS, Webster RG, et al. Neuraminidase inhibitor-resistant influenza viruses may differ substantially in fitness and transmissibility. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:4075-84.
31. Reina J. Peramivir. Un nuevo y potente inhibidor de la neuraminidasa para el tratamiento de las infecciones gripales. *Rev Esp Quimioter* 2006;19:317-22.
32. Monto AS, McKimm-Breschkin JL, Macken C, Hampson AW, Hay A, Klimov A, et al. Detection of influenza viruses resistant to neuraminidase inhibitors in global surveillance during the first 3 years of their use. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:2395-402.
33. Hurt AC, Selleck P, Komadina N, Shaw R, Brown I, Barr IG. Susceptibility of highly pathogenic A (H5N1) avian influenza viruses to the neuraminidase inhibitors and adamantanes. *Antiviral Res* 2007;73:228-31.