



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

Facultad de medicina  
División de Estudios de Posgrado

**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS  
"ISMAEL COSÍO VILLEGAS"**

**Tesis:**

**PREVALENCIA DE RESISTENCIA BASAL  
A OSELTAMIVIR EN PACIENTES  
HOSPITALIZADOS POR NEUMONIA POR  
INFLUENZA AH1N1 PDM09 QUE  
REQUIRIERON USO DE TERAPIA  
PROLONGADA O COMBINADA DE  
ANTIVIRALES EN EL INER DE  
NOVIEMBRE DEL 2013 A MAYO DEL  
2014.**

Para obtener el grado de Especialista en:  
**Neumología**

PRESENTA:  
**DR. GUSTAVO ADOLFO ROSALES CHAVEZ**  
TUTOR Y ASESOR:  
**DR. JOSÉ ARTURO MARTÍNEZ OROZCO**



**MÉXICO D. F. NOVIEMBRE 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



Facultad de medicina  
División de Estudios de Posgrado

## INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS "ISMAEL COSÍO VILLEGAS"

**PREVALENCIA DE RESISTENCIA BASAL A  
OSELTAMIVIR EN PACIENTES HOSPITALIZADOS  
POR NEUMONIA POR INFLUENZA AH1N1 PDM09  
QUE REQUIRIERON USO DE TERAPIA  
PROLONGADA O COMBINADA DE ANTIVIRALES EN  
EL INER DE NOVIEMBRE DEL 2013 A MAYO DEL  
2014.**

Tesis de Posgrado para obtener el grado de Especialista en:  
**Neumología**

PRESENTA:  
**DR. GUSTAVO ADOLFO ROSALES CHAVEZ**

TUTOR Y ASESOR:  
**DR. JOSÉ ARTURO MARTÍNEZ OROZCO**



MÉXICO D. F. NOVIEMBRE 2015

---

**DR. JUAN CARLOS VÁZQUEZ GARCÍA**

DIRECTOR DE ENSEÑANZA

---

**DRA. MARGARITA FERNÁNDEZ VEGA**

SUBDIRECTOR DE ENSEÑANZA

---

**DRA. MARÍA DEL CARMEN CANO SALAS**

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE POSGRADO

---

**DR. JOSÉ ARTURO MARTÍNEZ OROZCO**

ASESOR Y TUTOR DE TESIS. JEFE DEL SERVICIO DE  
MICROBIOLOGÍA CLÍNICA. INER

AGRADECIMIENTOS:

A mis padres y a Dios por hacer todo esto posible...

## Índice

<b>Agradecimientos</b> .....	<b>1</b>
<b>Índice</b> .....	<b>2</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>3</b>
<b>Marco Teórico</b> .....	<b>3</b>
<b>Justificación</b> .....	<b>5</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>6</b>
<b>Material y métodos</b> .....	<b>6</b>
Tipo de estudio.....	6
Población de estudio.....	12
Consideraciones éticas y aprobación por el comité respectivo.....	7
Definición de variables .....	8
Criterios de inclusión.....	9
Criterios de exclusión.....	9
Análisis estadístico.....	9
Declaración de financiamiento .....	10
Declaración de conflicto de intereses .....	10
<b>Resultados</b> .....	<b>11</b>
<b>Discusión</b> .....	<b>12</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>12</b>
<b>Bibliografía</b> .....	<b>15</b>

## **INTRODUCCIÓN**

A lo largo del tiempo el virus de la Influenza ha sido una de las causas más importantes año con año de infecciones del tracto respiratorio, resultando en importante morbilidad y mortalidad. En Marzo 2009 surgió un nuevo virus de Influenza en México y California que después presentó propagación a nivel mundial. A partir de esta pandemia del 2009 se ha prestado mayor atención en la prevención de esta enfermedad, la importancia de su rápido diagnóstico, así como tratamiento. Además se ha descrito que durante un periodo de brote de Influenza, aumenta la demanda de atención hospitalaria, aumentan las infecciones nosocomiales y la mortalidad por cualquier causa.

La mayoría de personas que se ven afectadas por Influenza presentan una enfermedad autolimitada y con un curso benigno, sin embargo se han identificado ya factores de riesgo asociados a desarrollar una presentación severa y diseminada de la enfermedad. Algunos de los factores de riesgo identificados para presentar una enfermedad por Influenza de mayor severidad son la edad, el estrato socioeconómico, las comorbilidades, obesidad, embarazo, falta de inmunización, un inicio tardío del tratamiento antiviral, coinfecciones bacterianas, desarrollo de falla en otros órganos, necesidad de ventilación mecánica, necesidad de estancia en UCI, requerir terapia de sustitución renal entre otros. Sin embargo, durante la epidemia 2009 se observaron casos severos en pacientes sanos y sin comorbilidades. Se desconoce la incidencia y/o prevalencia al momento de resistencia a Oseltamivir y los genes involucrados en los pacientes hospitalizados en esta Institución; por lo que pretendemos determinar la misma, así como definir si existen características demográficas especiales que se asocien a la presencia de la misma.

## **MARCO TEÓRICO**

Más del 99 por ciento de los aislamientos de influenza circulando en los Estados Unidos durante la pandemia de 2009 a 2010 fueron de una cepa sensible a oseltamivir y zanamivir<sup>1</sup>. Ya es conocida la baja tasa de resistencia al oseltamivir entre las cepas pandémicas de la gripe A H1N1pdm09 en contraste con la tasa extremadamente elevada entre las cepas estacionales de la gripe A H1N1.

Una minoría de cepas de influenza A H1N1 pandémica presenta resistencia al oseltamivir; esta se detectó a partir de pacientes de varios países, entre ellos Japón, Estados Unidos, China, Hong Kong, Singapur, Vietnam, Dinamarca y Australia<sup>1, 4</sup>. Entre 37 casos en los Estados Unidos, 76 por ciento ocurrieron en pacientes con inmunosupresión grave y el 89 por ciento ocurrieron en pacientes que habían recibido oseltamivir; de este modo, ambas características parecen ser factores de riesgo para el desarrollo de resistencia al oseltamivir<sup>2</sup>. Por el contrario, en un grupo de pacientes de la comunidad, en Vietnam resistentes al oseltamivir en la pandemia de gripe A H1N1, ninguna de las personas había recibido profilaxis con oseltamivir<sup>3</sup>.

La mutación H274Y de la neuraminidasa, se identificó como la causa de la resistencia extendida al oseltamivir entre pacientes infectados con influenza A H1N1 estacional aislados a partir de 2007; también fueron detectados en

aislamientos de pacientes con oseltamivir resistente en la infección de influenza A H1N1 pandémica<sup>4,5</sup>.

Dos grupos de pacientes nosocomiales infectados con Influenza A H1N1 pandémica resistente al oseltamivir se identificaron en Gales y Estados Unidos; ambos grupos pertenecientes a salas de hematología y oncología<sup>6,7</sup>.

En un estudio, 8 de cada 10 casos los pacientes tenían virus resistentes al oseltamivir y 4 de 8 se infectaron por transmisión directa del virus resistente<sup>6</sup>. La mayoría de los pacientes cuya clínica se informó de los cursos se recuperó sin complicaciones<sup>5,8</sup>, aunque algunos pacientes inmunocomprometidos murieron<sup>7,9</sup>. En un estudio de casos y controles, los pacientes infectados con un virus resistente al oseltamivir tenían más probabilidades de ser inmunocomprometidos y desarrollar complicaciones respiratorias que los pacientes infectados con un virus susceptible a oseltamivir<sup>10</sup>.

El rápido desarrollo de la resistencia a oseltamivir fue descrito en el trasplante de células hematopoyéticas, los receptores y los pacientes con tumores malignos durante el tratamiento para la pandemia de influenza A H1N1<sup>11,12</sup>. Todos los virus aislados de estos pacientes permanecieron sensibles al zanamivir. Uno de los receptores desarrolló resistencia no sólo al oseltamivir, sino también para el peramivir<sup>11</sup>.

La transmisión comunitaria sostenida de influenza A H1N1 resistente al oseltamivir fue identificado en 29 personas en Australia<sup>13,14</sup>. El análisis de la secuencia en la hemaglutinina y neuraminidasa indicaron que las cepas resistentes estaban estrechamente relacionadas, lo que sugiere la propagación de una sola variante. Sólo un paciente había recibido oseltamivir antes de la recolección de la muestra respiratoria para las pruebas de resistencia.

Utilizando la secuenciación profunda, fue censada la población del virus en un niño de 15 años de edad con leucemia de células T e infección por Influenza A H1N1 pandémica, para lo que estaba recibiendo oseltamivir<sup>15</sup>. Se encontró que el paciente presentaba tres variantes genéticas virales poligénicas, distintas filogenéticamente, sugerente de una infección mixta. En respuesta al tratamiento, una de las variantes desarrolló la mutación H274Y a neuraminidasa, que confiere resistencia al oseltamivir.

En otro estudio, se utilizó la secuenciación ultra profunda para evaluar las poblaciones de virus de Influenza A H1N1 pandémica a partir de muestras nasofaríngeas de dos individuos infectados de una sola familia y de un niño inmunodeprimido infectado<sup>17</sup>. La mutación H274Y estaba presente como una variante menor en individuos infectados antes del inicio de la terapia. Además, los aislamientos que poseen la mutación H274Y fueron transmitidas junto con las cepas oseltamivir susceptible. La mutación H275Y no se pudo detectar por ensayos de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa convencionales o mediante secuenciación de Sanger.

Desde diciembre de 2010, se encontró una variante de Influenza A H1N1 pandémica que posee una mutación en el residuo 247 del gen de la neuraminidasa (S247N), esta se ha detectado en 22 muestras de la región de Asia Pacífico recogida para la Red de Vigilancia Global de Influenza de la Organización Mundial de la Salud<sup>18</sup>. Esta mutación confiere alguna resistencia a oseltamivir y zanamivir; la media concentración máxima inhibitoria (IC50) de oseltamivir se ha



multiplicado por seis y el zanamivir se multiplicó por tres . Durante los tres primeros meses de 2011, 9 de 28 muestras (32%) en una región del norte de Australia y 10 de 80 muestras (12,5%) de Singapur contenían la mutación S247N; la mayoría de los aislamientos se han detectado en dos grupos en estas regiones. Esta variante también se ha detectado pocas veces desde 2009 en la gripe H1N1 estacional y en la gripe aviar H5N1 aislados en otras partes del mundo. Cuando se combina con la mutación H275Y, como se detectó en un paciente inmunodeprimido tratado con oseltamivir, la doble mutación S247N/H275Y tuvo un aumento de 7.000 veces en CI50 al oseltamivir y un aumento de cinco veces en CI50 al zanamivir.

Muestras de virus aislados de Influenza A H1N1 pandémica que poseen la mutación H274Y neuraminidasa resistente a Oseltamivir de pacientes inmunocomprometidos, mantuvieron aptitud replicativa, transmisibilidad y virulencia en un modelo de hurones<sup>18</sup>. Un estudio en México reporta que durante la transición del primera (mayo-julio) para la segunda ola (septiembre-noviembre) de la pandemia, se encontraron variantes genéticas en el gen de la neuraminidasa, lo que sugiere una asociación de estas mutaciones con resistencia a oseltamivir<sup>19</sup>.

Hay casos raros reportados en el mundo, sobretudo en pacientes inmunocomprometidos de mutaciones en las cepas del virus de Influenza A H1N1 multidrogoresistentes<sup>20, 21</sup>. Algunos autores han asociado el uso de terapia prolongada con retardo en el inicio del tratamiento, comorbilidades y otros factores no muy bien identificados más que a la presencia o no de las mutaciones ya comentadas<sup>23, 24</sup>. Según la información disponible sobre vigilancia epidemiológica y control de la resistencia en los últimos años, oseltamivir y zanamivir siguen siendo los antivirales recomendados para el tratamiento de la infección por gripe A/H1N1pdm09, ya que más del 99% de los virus circulantes en la actualidad son sensibles a esos fármacos. Amantadina y rimantadina, otros antivirales que han sido asociados al tratamiento con oseltamivir durante la pandemia, no deben utilizarse debido a la elevada tasa de resistencia que presentan las cepas circulantes del virus de la gripe A/H1N1pdm09 frente a estos agentes<sup>1, 25</sup>.

En una cohorte observacional, que compara las características clínicas entre pacientes hospitalizados sensibles y resistentes a oseltamivir con la mutación(H275Y) por gripe estacional de H1N1; solo encontraron diferencias significativas en carga viral y edad mayores en los que resultaron ser resistentes, asimismo la mayoría de los pacientes recibieron terapia antiviral combinada sin diferencias en mortalidad, días de estancia o admisión a unidad de cuidados intensivos<sup>26</sup>.

## **JUSTIFICACIÓN**

En México y nuestra Institución no se tiene definida la prevalencia de resistencia basal a inhibidores de la neuraminidasa principalmente en pacientes que requirieron una terapia prolongada o combinación de antivirales durante su hospitalización que pudieran sugerir dicha entidad.

Es importante definirla pues los principales problemas de salud pública son la transmisión de virus resistentes de los cuales en ocasiones desconocemos si estos conservan la capacidad de causar enfermedad o si la propagación se

mantiene, lo que podría contribuir al uso de terapia prolongada o combinada de antivirales y/o la muerte por falta de respuesta a tratamiento.

Con este estudio podremos determinar la frecuencia de virus resistentes entre todos los virus de influenza AH1N1pdm09 que circulan a nivel local y en el mundo en diferentes temporadas, así como algunos de los genes involucrados.

Actualmente por la baja prevalencia reportada durante el 2009-2010 no se justifica la búsqueda sistemática de resistencia a inhibidores de la neuraminidasa a reserva de una evolución tórpida y la PCR persistente positiva, para ello se recomienda en primer lugar obtener cultivo viral de muestra respiratoria para confirmar la no viabilidad del virus con el objeto de suspender o no el tratamiento, y en segundo lugar descartar aparición de resistencia al fármaco empleado mediante secuenciación, lo cual es muy costoso. Sin embargo con el uso indiscriminado de oseltamivir desde la pandemia del 2009 entre otros factores como resistencias transmitidas, desconocemos cual ha sido la evolución de dicha prevalencia y los factores asociados para desarrollarla.

Es finalmente el tratamiento antiviral adecuado y oportuno para influenza AH1N1pdm09 que reducirá el tiempo de eliminación del virus (aclaramiento viral), llevando a una menor duración de la enfermedad y sus complicaciones; siendo pues importante definir la presencia de resistencia en nuevas épocas que nos de una pauta de manejo y comportamiento estacional.

## **OBJETIVOS**

Primario:

Determinar la prevalencia basal de resistencia basal a oseltamivir en pacientes hospitalizados con el diagnóstico de neumonía por influenza AH1N1pdm09 durante el período de Noviembre 2013 a mayo 2014 en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Secundarios:

Reportar la frecuencia de resistencia a oseltamivir de los genes H274Y, H275Y y S247N en pacientes hospitalizados con neumonía por Influenza AH1N1pdm09 durante el período de Noviembre 2013 a mayo 2014 en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Determinar el riesgo de aparición de genes de resistencia según: uso previo de antivirales, uso prolongado y/o combinado de antivirales, exposición previa a un contacto con influenza ya en tratamiento (resistencia transmitida).

Descubrir si existen diferencias clínicas y desenlaces entre los pacientes hospitalizados con neumonía por Influenza AH1N1pdm09 y reporte de alguna resistencia a oseltamivir.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

- Tipo de estudio

Este es un estudio de investigación clínica y epidemiológica, observacional, descriptivo y comparativo. Se estudiaron todos los pacientes con diagnóstico de influenza AH1N1pdm09 por método de PCR en tiempo real según protocolo de los CDC de Atlanta identificados dentro del laboratorio de Microbiología Clínica del periodo del 1 de Noviembre de 2013 al 31 de Mayo de 2014 en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y que hayan sido hospitalizados.

- Consideraciones éticas y aprobación por el comité respectivo

Debido al carácter descriptivo del estudio, retrospectivo con información tomada de expedientes y considerando que éste reporte está exento de cualquier riesgo a los sujetos de quienes se obtendrán los datos, no se obtendrá consentimiento informado. La información individual de los pacientes incluidos quedará confidencial.

Se asignó el código de proyecto E0814 por el Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias con fecha de aprobación en Agosto de 2014.

Adicionalmente, se hizo una aprobación genérica para protocolos de investigación relacionados a la influenza.

- Métodos

Obtuvimos una lista con nombre, número de expediente, folio y fecha de toma de muestra de todos los pacientes con diagnóstico confirmado de Influenza AH1N1pdm09 a través de RT-PCR en el departamento de virología/biología molecular del servicio de microbiología clínica INER del periodo del 01 de Noviembre de 2013 al 31 de Mayo de 2014 según criterios diagnósticos por protocolo de CDC. De los cuales se procesaron las muestras ultracongeladas.

Las secuencias de neuraminidasa de Influenza A H1N1 pandémica disponibles en las bases de datos de dominio público fueron alineados utilizando software BioEdit (versión 5.0.6, la Universidad Estatal de Carolina del Norte). De manera similar, los genes M de estos virus también fueron alineados utilizando software BioEdit. Se hizo un consenso de las secuencias a partir de ambas bases de datos y se utilizaron para diseñar primers de pirosecuenciación (tabla 1) donde se resumen las secuencias de primers y la pirosecuenciación reversa de transcripción PCR (piro-RT-PCR) que se utilizaron.

Los ARN virales se extrajeron a partir de muestras clínicas o se utilizaron aquellos que ya cuenten con extracción y haya remanente de muestra en el laboratorio. Las amplificaciones se realizaron con el sistema de un solo paso SuperScript III RT-PCR con Taq platino enzima de alta fidelidad (Invitrogen, Carlsbad, CA) por 45 ciclos, con los primers que se utilizan a 20µM.

Se usaron tres conjuntos de primers de RT-PCR para generar tres amplicones del segmento de gen de neuraminidasa que cubre las secuencias que codifican los residuos diana. Un par de primers se

emplearon para amplificar un fragmento de 230pb que contienen las secuencias que codifican para los 5 aminoácidos responsables de la resistencia a los adamantanos (Tabla 1). Las reacciones de pirosecuenciación se hicieron como se ha descrito. Brevemente, los productos de PCR biotinilados se lavaron a través de una serie de tampones, y se generó un ADN de cadena simple que se utiliza como una plantilla de hibridación para primers de secuenciación específicos para el residuo, que se usó a una concentración de 100µM.

Primer propósito y primer	Secuencia	Residuo o gen objetivo
Piro RT-PCR		
H1N1pdm-N1-F256	5'-GCSGGCAATTCCTCTCTYTG-3'	H1N1pdm-N1 fragmento A
H1N1pdm-N1-R730-biot	5'-CGGTCATTACAGTAAARCAHGAACC-3'	H1N1pdm-N1 fragmento B
H1N1pdm-N1-F524	5'-ARTCAGTYGCTTGGTCAGCAAG-3'	H1N1pdm-N1 fragmento Ca
H1N1pdm-N1-R908-biot	5'-CAYGGTCGATTGARGSCATG-3'	
H1N1pdm-N1-F780	5'-GGGGAAGATTGTAAAATCAGTYGA-3'	
H1N1pdm-N1-R1273-biot	5'-CWACCCAGAARCAAGGYCTTATG-3'	
Pirosecuenciación		
H1N1pdm-N1-F804	5'-GYTGAATGCMCCTAATT-3'	H274c
H1N1pdm-N1-F864	5'-CACRTGTGKTGCAG-3'	N294c

Tabla

Las muestras de material genético designadas para pirosecuenciar, son amplificadas por un primer biotinilado mediante RT-PCR, para posteriormente ser inmovilizadas en perlas de cefaroz, marcadas con estreptavidina. Se agregaron 2µl de perlas por muestra, 40 µl de buffer de ligación, 15 µl del producto de PCR, y 23 µl de agua grado molecular (volumen final: 80 µl por reacción), se sella la placa y agita a 1400 rpm, colocamos la placa en la estación de lavado, y después del proceso de lavado colocamos la placa dentro del equipo para ser leída. Se cargaron los datos a una USB y analizamos los resultados con el Software Pyromark en busca de las mutaciones H275Y, H274Y (15) y S247N (9). Se revisaron los resultados existentes de la lista obtenida previamente sobre resistencia a oseltamivir y se vaciaron en una base de datos de SPSSv19-. Obtuvimos de los expedientes clínicos, imagenológicos y de laboratorio de los casos analizados datos demográficos, clínicos, laboratoriales, de estancia hospitalaria, uso de antivirales, radiológicos.

- Definición de variables
  - Variables independientes
  - Variables dependientes

NOMBRE DE LA VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERATIVA	TIPO DE VARIABLE	INDICADOR
Resistencia a oseltamivir	Resistencia identificada en el virus de influenza AH1N1pdm09 a inhibidores de neuraminidasa "oseltamivir"	Identificación de resistencia a oseltamivir mediante pirosecuenciación de los genes H274Y, H275Y y S247N en muestras ultracongeladas con diagnostico de virus influenza AH1N1	Cualitativa	1: H275Y 2: H274Y 3: S274N 4: NINGUNA

- Criterios de inclusión

- Pacientes hospitalizados en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias con diagnóstico de influenza AH1N1pdm09 por método de PCR en tiempo real según protocolo de los Centros de control de enfermedades (CDC) de Atlanta; identificados dentro del laboratorio de Microbiología Clínica del INER del periodo del 1 de Noviembre de 2013 al 31 de Mayo de 2014.
- Que cuente con expediente clínico completo.
- Pacientes Expuestos: Pacientes con uso previo de oseltamivir a dosis estándar o prolongada y/o contacto con un paciente con el diagnostico de influenza ah1n1pdm09 ya en tratamiento.
- Pacientes No expuestos: Todo paciente sin uso previo de antivirales o exposición a un contacto en tratamiento antiviral.

- Criterios de exclusión

- Pacientes a los cuales se les haya hecho el diagnóstico de Influenza AH1N1pdm09 en otro lugar que no sea el laboratorio de microbiología clínica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.
- Pacientes cuya muestra inicial diagnóstica almacenada en el laboratorio de microbiología clínica no sea suficiente para el proceso de pirosecuenciación.

- Criterios de eliminación

- Pacientes con diagnóstico de Influenza A H1N1 que se hayan trasladado a otras instituciones posterior a su ingreso.

- Análisis estadístico

Se obtuvieron medidas de tendencia central, dispersión, frecuencias y porcentajes analizadas utilizando el programa SPSS19.

Se calculó:

Incidencia acumulada:

Definida como el número de casos nuevos del evento de interés que se desarrollan en una población durante un periodo de tiempo determinado.

$$IA = \frac{\text{no de casos nuevos en el seguimiento}}{\text{Total de la población en riesgo al inicio del seguimiento}}$$

La prueba  $\chi^2$  de Pearson (o la prueba exacta de Fisher, según corresponda) fué utilizada para comparar las frecuencias de variables nominales cualitativas, entre dos grupos. La prueba t de Student se utilizó en la comparación de variables cuantitativas continuas de distribución normal, así como U de Mann-Whitney en caso de distribución no paramétrica. Todos los valores de p para comparaciones y correlaciones se calcularon a dos colas y considerados como significativos cuando  $p < 0,05$ . Se construyeron modelos multivariados mediante regresión logística para identificar factores independientemente asociados a resistencia a oseltamivir. Se empleó el paquete estadístico PASW v19.0 en todos los cálculos de este informe.

Riesgo Relativo (RR):

Medida de la magnitud de la asociación entre el factor de exposición y la enfermedad. Estima el riesgo de que los sujetos expuestos presenten la enfermedad en relación a los no expuestos. La exposición es el uso previo de antivirales o exposición a un contacto ya en tratamiento con oseltamivir.

Pacientes Expuestos: Pacientes con uso previo de oseltamivir a dosis estándar o prolongada y/ contacto con un paciente con el diagnóstico de influenza ah1n1pdm09 ya en tratamiento.

Pacientes No expuestos: Todo paciente sin uso previo de antivirales o exposición a un contacto en tratamiento antiviral.

	Enfermos (resistencia)	Sanos (sin resistencia)	Total
Expuestos	a	b	a+b
No expuestos	c	d	c+d

$$RR: \frac{\text{incidencia expuestos}}{\text{Incidencia no expuestos}} = \frac{a / (a+b)}{c / (c+d)}$$

-Declaración de financiamiento

No existe fuente de financiamiento y afiliaciones institucionales y corporativas más que las que han sido señaladas en la "institución de adscripción".

-Declaración de conflicto de intereses

El autor y los colaboradores hacen constar que no tienen asociaciones comerciales que puedan significar un conflicto de interés con el objetivo y desarrollo de la tesis.

## RESULTADOS

Se analizaron 149 expedientes de 167 pacientes obtenidos de la lista de pacientes con diagnóstico de influenza en el laboratorio de microbiología clínica en el periodo definido para el estudio, de estos 126 son del subtipo AH1N1 84.6%, 12 de B 8.1%, 9 de H3 6% y 2 de H1N1 estacional 1.3%. De los 149 61.1% eran del sexo masculino y 38.9% del sexo femenino, con una media de edad de 39.37 años  $\pm$ 20SD.

Los diagnósticos enviados para el procesamiento de muestra fueron 45.5% neumonía, 40.4% influenza, 14.1% otros diagnósticos. Del tipo de muestra enviado para diagnóstico del cual se obtendrá material genético para el análisis de resistencia 88.1% corresponden a hisopados nasofaríngeos, 7.9% a aspirados traqueales y 5% lavados bronquioalveolares. De los factores de riesgo que se identificaran como predictores de resistencia a oseltamivir hemos encontrado que solo el 3% de los pacientes refieren vacunación previa en el expediente y 97% no recibieron vacunación previa. Dentro de viajes recientes 4% refirieron alguno en las últimas 4 semanas, 94.9% no viajaron y 1% se desconocía el estado de viajes recientes. 8.7% refirieron uso previo de antiviral tipo oseltamivir, 91.3% no lo usaron. De los tratamientos antivirales en general recibidos 6.3% no recibieron tratamiento al ingreso, 88.9% oseltamivir, .8% amantadina/rimantadina, 2.4% recibieron triple terapia antiviral y 1.6% recibió oseltamivir/ribavirina.

Una terapia antibacteriana previa al diagnóstico de influenza fue instaurada en el 63.5% de los pacientes

De los pacientes que usaron cualquier tipo de terapia antiviral analizados la mediana de uso fue La media de tratamiento antiviral fue de 9 días  $\pm$ 20SD mínimo de 0 días y máximo de 27.

El estado inmunológico basal se ha identificado en la literatura internacional como factor de riesgo a resistencia por lo que se ha encontrado que 1% tenía VIH al momento del diagnóstico, .8% presentaban una enfermedad reumatológica de base, 8.7% alcoholismo, 40.5% obesidad, 8.7% DM2, 10.3% HAS 8.7% asma, 2.4% EPOC, .8% cáncer, .8% tuberculosis, 1.6% neumopatía intersticial, trastornos hepáticos .8%, uso crónico de esteroides .8%.

En cuanto al cuadro clínico al momento del ingreso de los pacientes con influenza en general fueron principalmente los siguientes signos y síntomas: fiebre, que la presentaron 115 pacientes (77.2%), tos, 97 pacientes (65.1%), disnea, 89 pacientes (59.7%) y artralgias, 59 (39.6%).

SIRA (síndrome de distrés respiratorio agudo) se definió según los criterios utilizados en el año 2011 en el congreso de la Sociedad Europea de Medicina Intensiva realizado en la ciudad de Berlín, avalados por la Sociedad Americana de Tórax (ATS), el cual es una lesión pulmonar aguda, donde el tiempo de inicio es dentro de la primera semana de conocido el daño o nuevo deterioro de los síntomas respiratorios, con imágenes radiológicas con opacidades bilaterales, falla respiratoria no explicable completamente por una insuficiencia cardíaca o sobrecarga de líquidos y presencia de hipoxemia con un índice de oxigenación menor de 300; el cual se estratifica en tres niveles: Leve, moderado y grave de acuerdo a la hipoxemia presente; de tal modo que una PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> de 201 a 300

mmHg se considera leve, una PaO/FiO<sub>2</sub> menor o igual de 200 mmHg es considerado como moderado y una PaO/FiO<sub>2</sub> menor o igual a 100 es un SIRA grave; un PEEP mínimo de 5 cmH<sub>2</sub>O se incluyó en la definición. Ya definido SIRA, 109 pacientes (73.2%) cumplieron con estos criterios al momento del ingreso hospitalario.

Todos los pacientes tuvieron radiografía de tórax al ingreso, pero solamente 74 pacientes de los 149 (49.7%) tuvieron tomografía de tórax durante su estancia intrahospitalaria.

Los hallazgos radiológicos por radiografía de tórax o por tomografía de tórax mas frecuentes encontrados al momento del ingreso: consolidación con broncograma aéreo 46 pacientes (30.2%), vidrio despolido 40 (26.8%) e infiltrado alveolar difuso 36 (24.2%).

35 pacientes (23.5%) requirieron estancia en terapia intensiva, 40 pacientes (26.8%) requirieron ventilación mecánica no invasiva durante su estancia hospitalaria y casi la mitad de los pacientes, 69 (46.3%) requirieron manejo avanzado de la vía aérea y ventilación mecánica invasiva.

Referente a mortalidad hospitalaria fallecieron 25 de los 149 pacientes (16.8%) y las principales causas de mortalidad de acorde al certificado de defunción fueron choque séptico, influenza, lesión renal, falla orgánica múltiple y neumonía. De los pacientes con influenza AH1N1pdm09 la mortalidad fue del 16.7%.

## DISCUSIÓN

Como se esperaba al principio del estudio la resistencia a Oseltamivir fue menor al 1%, los pacientes que recibieron terapia prolongada a antivirales fueron los que tuvieron desenlaces peores. La observación en la mayoría de los estudios es que la mutación más comúnmente asociada con la resistencia a oseltamivir (H275Y) está presente en la población viral de algunos individuos antes del inicio del tratamiento. Además, esta población menor resistente a los medicamentos no podía ser revelado por métodos convencionales, tales como las pruebas de resistencia fenotípica y secuenciación de Sanger. Esta observación es importante para un número de razones. En primer lugar, la existencia previa de Y275 significa que la selección para la resistencia a los medicamentos procederá mucho más rápidamente después de la aparición de la presión de selección de drogas que si los virus sólo están presentes en la población, porque no hay tiempo de espera para la mutación aparezca. Más aún, la presencia de la mutación Y275 en huéspedes no tratados indica que esta mutación no es fuertemente perjudicial en ausencia de tratamiento con oseltamivir y probablemente no necesita mutaciones compensatorias para permitir su fijación. De hecho, en ambos casos estudiados aquí, no se observaron cambios de aminoácidos que se fijaron concordante con Y275 y sólo una única mutación sinónimo (en NS1).

Si la mutación Y275 está presente en huéspedes antes del inicio del tratamiento, entonces también es probable que haya sido transmitida entre los individuos como una variante de menor importancia. Esto a su vez sugiere que puede no ser a menudo una población importante durante la transmisión de virus de la gripe. De hecho, la infección mixta de múltiples variantes de virus de la gripe se han



observado tanto en la infección natural humana y la infección animal experimental y, por lo tanto, puede ser común.

Además, nuestro protocolo de muestreo en el caso de transmisión cruzada dicta que no podemos excluir que hubo una rápida selección de resistencia al oseltamivir.

Sin embargo, esto implicaría la selección extremadamente rápida de la resistencia y no cambiar la observación central que múltiples variantes se transmiten entre ellos, porque ambos H275 y Y275 se encontraron en el padre.

Las nuevas mediciones ultraprofundas de secuenciación de las poblaciones virales intra-huésped, promete transformar nuestra comprensión de la evolución de la resistencia a los medicamentos en las infecciones virales agudas, lo que permite la disección del espectro mutacional en un nivel mayor de precisión. De hecho, es sorprendente que, en los casos 2, RT-PCR convencional no pudo detectar la presencia de resistencia a oseltamivir, aunque Y275 estaba presente en la población viral. Sin embargo, a pesar de su indudable potencial, la secuenciación ultra-profunda también tiene una serie de dificultades analíticas inherentes. En primer lugar, porque el protocolo de secuenciación conduce a la generación de la secuencia corta lee, posiciones de nucleótidos pueden no estar relacionados, ya sea en o entre los genes excepto si son lo suficientemente cerca como para que aparezca en la misma secuencia de leer o si tienen el mismo patrón de prevalencia. Es fundamental para garantizar que las variantes genéticas de menor importancia no son el resultado de la PCR y / o artefactos de secuenciación. La amplificación conduce al problema bien conocido de los duplicados de PCR, a veces resultando en distorsión severa a las proporciones observadas de los verdaderos subpoblaciones variante y la posible creación de secuencias variantes falsas a través de errores de PCR. Para hacer frente a estos problemas, cada muestra de nuestro estudio fue amplificado en 4 reacciones independientes utilizando diferentes códigos de barras, lo que nos permite un seguimiento de los productos de amplificación y su respectiva secuencia lee. El trabajo futuro se utilice un enfoque rentable simple y más utilizando cebadores modificados que incluyen etiquetas únicas para cada plantilla.

## **CONCLUSIONES**

La prevalencia de resistencia basal a oseltamivir en nuestro centro es similar a lo reportado a nivel mundial a pesar de no haber aislado resistencias en pacientes vírgenes a tratamiento.

En pacientes en quienes se encuentra la mutación habrá que ahondar mas en la investigación o series mas grandes para tratar de hacer una correlación con factores de riesgo y desenlaces. Asimismo sigue sin justificarse la necesidad de realizar búsqueda intencionada de genes de mutación como protocolo, pues la prevalencia es baja y el costo beneficio es pobre.

## BIBLIOGRAFÍA

1. - Thorlund K, Awad T, Boivin G. Systematic review of influenza resistance to the neuraminidase inhibitors. *BMC Infect Dis*. 2011;11:134.
2. - Graitcer SB, Gubareva L, Kamimoto L, et al. Characteristics of patients with oseltamivir-resistant pandemic (H1N1) 2009, United States. *Emerg Infect Dis* 2011; 17:255.
3. - Le QM, Wertheim HF, Tran ND, et al. A community cluster of oseltamivir-resistant cases of 2009 H1N1 influenza. *N Engl J Med* 2010; 362:86.
- 4.- European Center for Disease Prevention and Control. Oseltamivir-resistant pandemic (H1N1) 2009 influenza virus, October 2009. European center for disease prevention and Control.
- 5.- Baz M, Abed Y, Papanburg J, et al. Emergence of oseltamivir-resistant pandemic H1N1 virus during prophylaxis. *N Engl J Med* 2009; 361:2296.
- 6.- Moore C, Galiano M, Lackenby A, et al. Evidence of person-to-person transmission of oseltamivir-resistant pandemic influenza A(H1N1) 2009 virus in a hematology unit. *J Infect Dis* 2011; 203:18.
- 7.- Chen LF, Dailey NJ, Rao AK, et al. Cluster of oseltamivir-resistant 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infections on a hospital ward among immunocompromised patients--North Carolina, 2009. *J Infect Dis* 2011; 203:838.
- 8.- World Health Organization. Viruses resistant to oseltamivir (Tamiflu) identified, 8 July 2009 World health organization.
- 9.- Center for Infectious Diseases Research and Policy. Clusters of resistant H1N1 cases reported in UK, US.
- 10.- Calatayud L, Lackenby A, Reynolds A, et al. Oseltamivir-resistant pandemic (H1N1) 2009 virus infection in England and Scotland, 2009-2010. *Emerg Infect Dis* 2011; 17:1807.
- 11.- Memoli MJ, Hrabal RJ, Hassantoufighi A, et al. Rapid selection of oseltamivir- and peramivir-resistant pandemic H1N1 virus during therapy in 2 immunocompromised hosts. *Clin Infect Dis* 2010; 50:1252.
12. Tramontana AR, George B, Hurt AC, et al. Oseltamivir resistance in adult oncology and hematology patients infected with pandemic (H1N1) 2009 virus, Australia. *Emerg Infect Dis* 2010; 16:1068.
- 13.- Hurt AC, Hardie K, Wilson NJ, et al. Community transmission of oseltamivir-resistant A(H1N1)pdm09 influenza. *N Engl J Med* 2011; 365:2541.
- 14.- 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.
- 15.- Ghedin E, Laplante J, DePasse J, et al. Deep sequencing reveals mixed infection with 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus strains and the emergence of oseltamivir resistance. *J Infect Dis* 2011; 203:168.
- 16.- Ghedin E, Holmes EC, DePasse JV, et al. Presence of oseltamivir-resistant pandemic A/H1N1 minor variants before drug therapy with subsequent selection and transmission. *J Infect Dis* 2012; 206:1504.
- 17.- Hurt AC, Lee RT, Leang SK, et al. Increased detection in Australia and Singapore of a novel influenza A(H1N1)2009 variant with reduced oseltamivir and zanamivir sensitivity due to a S247N neuraminidase mutation. *Euro Surveill* 2011; 16.
- 18.- Memoli MJ, Davis AS, Proudfoot K, et al. Multidrug-resistant 2009 pandemic influenza A(H1N1) viruses maintain fitness and transmissibility in ferrets. *J Infect Dis* 2011; 203:348.
- 19.- Juan Téllez-Sosa y cols. Using High-Throughput Sequencing to Leverage Surveillance of Genetic Diversity and Oseltamivir Resistance: A Pilot Study during the 2009 Influenza A(H1N1) Pandemic. *Plos one*. Org, Jul 2013, Vol 8, 7:e67010.
- 20.- Nguyen HT, Fry AM, Loveless PA, et al. Recovery of a multidrug-resistant strain of pandemic influenza A 2009 (H1N1) virus carrying a dual H275Y/I223R mutation from a child after prolonged treatment with oseltamivir. *Clin Infect Dis* 2010; 51:983.
- 21.- van der Vries E, Stelma FF, Boucher CA. Emergence of a multidrug-resistant pandemic influenza A (H1N1) virus. *N Engl J Med* 2010; 363:1381.
- 22.- Varough M. Deyde y cols. Detection of Molecular Markers of Drug Resistance in 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) Viruses by Pyrosequencing antimicrobial agents and chemotherapy, Mar. 2010, p. 1102–1110; 54: 3.
- 23.- Seung M. Ryoo y cols. Factors promoting the prolonged shedding of the pandemic (H1N1) 2009 influenza virus in patients treated with oseltamivir for 5 days, DOI:10.1111/irv.12065. Epub 2012 Dec 26.
- 24.- Silvia Meschi, y cols. Duration of viral shedding in hospitalized patients infected with pandemic H1N1, *BMC Infectious Diseases* 2011, 11:140.
- 25.- Ministerio de Sanidad y Política Social. Guía del manejo clínico de la neumonía adquirida en el comunidad en el adulto durante la pandemia por el virus influenza A (H1N1).
- 26.- Martin C. W. y cols. Comparisons of oseltamivir-resistant (H275Y) and concurrent oseltamivir-susceptible seasonal influenza A(H1N1) virus infections in hospitalized adults, 2008–2009. *Influenza Journal* DOI:10.1111/j.1750-2659.2012.00387. Epub 2012 Jun 14.