



Utilización de la secuenciación masiva en el estudio de mutaciones de resistencia a citomegalovirus en pacientes que reciben maribavir.

Paula Muñoz¹, Virginia Rodríguez¹, Marta Bodro^{2,7}, María Suárez-Lledó³, Montserrat Rovira³, Francesc Fernández³, María Ángeles Castel⁴, Ángela González⁵, Mireya Pujada¹, Anna Cervilla¹, Esther Carcelero⁶, Mar Mosquera¹, Àlex Soriano^{2,7}, Míkel Martínez¹, María Ángeles Marcos¹

1. Servicio de Microbiología, Hospital Clínic de Barcelona (HCB), Universidad de Barcelona (UB); 2. Servicio de Infecciosas, HCB, UB; 3. Servicio de Hematología, HCB; 4. Servicio de Cardiología, HCB; 5. Unidad de Trasplante Renal, HCB; 6. Servicio de Farmacia, HCB; 7. CIBERINFEC, Barcelona.

INTRODUCCIÓN

Maribavir (MBV) es uno de los antivirales más recientes, indicado en la infección por citomegalovirus humano (CMVH) refractaria, resistente o con toxicidad a antivirales clásicos, en pacientes inmunodeprimidos, como los receptores de trasplante de órgano sólido (SOT), trasplante de células madre hematopoyéticas (TPH) y/o células T con receptor de antígeno quimérico (CAR-T).

OBJETIVOS

- 1 Determinar la indicación de la administración de maribavir en cada uno de los pacientes.
- 2 Aplicar la secuenciación masiva (NGS) al estudio de mutaciones de resistencia a antivirales (MRAs) antes y después de la administración de maribavir en muestras previamente secuenciadas por secuenciación Sanger.

METODOLOGÍA

- Estudio descriptivo-retrospectivo.
- Se incluyeron 55 pacientes inmunodeprimidos con infección refractaria o con toxicidad a los antivirales clásicos que recibieron MBV, en seguimiento en el Hospital Clínic de Barcelona durante 2022-2026.
- Se recogieron muestras de plasma **previas al tratamiento con MBV** (n=44) en todos los pacientes con sospecha de resistencia, y en aquellos con infección refractaria, se analizaron muestras **posteriores al tratamiento** (n=26).

SECUENCIACIÓN SANGER

- 1 **Extracción de ADN**
Extraídas con *MagLEAD 12gC* (Palex Medical, España).
- 2 **Amplificación del ADN**
PCR Nested de los genes **UL27** (33667-34810 pb), **UL54** (78683-81160 pb) y **UL97** (142529-143361 pb y 143074-143903 pb) con el termociclador *ProFlex PCR System applied Biosystems* (ThermoFisher, EE. UU.).
- 3 **Secuenciación Sanger**
Con el secuenciador capilar *3500xL Genetic Analyzer for Human Identification* (ThermoFisher, EE. UU.) y análisis de secuencias con el programa *DNADragon* (Sequentix, Alemania).
- 4 **Estudio de mutaciones de resistencia**
Comparación de las secuencias consenso frente las secuencias de referencia de *Human betaherpesvirus 5 (txid 10359)* con el programa *Comprehensive Herpesviruses Antiviral drug Resistance Mutation Database* (CNR Herpesvirus, Francia).

SECUENCIACIÓN MASIVA

- 1 **Extracción de ADN**
Extraídas con *MagLEAD 12gC* (Palex Medical, España).
- 2 **Amplificación del ADN**
En muestras secuenciadas previamente por Sanger: PCR Nested de los genes **UL54** (78200-81928 pb) y **UL97** (141803-143926 pb) con el termociclador *ProFlex PCR System applied Biosystems* (ThermoFisher, EE. UU.) y mediante el protocolo de *ABL Diagnostics* (Palex Medical, España).
- 3 **Preparación de la librería**
Mediante el protocolo de *ABL Diagnostics* (Palex Medical, España), se fragmentó el ADN, se repararon los extremos y se unieron los índices para obtener la librería. Se cuantificaron las librerías mediante *Qubit dsDNA HS* (Invitrogen, ThermoFisher, EE. UU.) y se agruparon normalizadas a 2 ng/μL.
- 4 **Secuenciación masiva**
Se secuenciaron las librerías indexadas compatibles con la plataforma de secuenciación de alto rendimiento *Illumina* (Illumina, EE. UU.) y el secuenciador *MiSeq System* (Illumina, EEUU).
- 5 **Estudio de mutaciones de resistencia**
Se analizaron las secuencias con la herramienta bioinformática *DeepChek® - CMV Software (CE-IVD)* (ABL Diagnostics, Palex Medical, España).

RESULTADOS

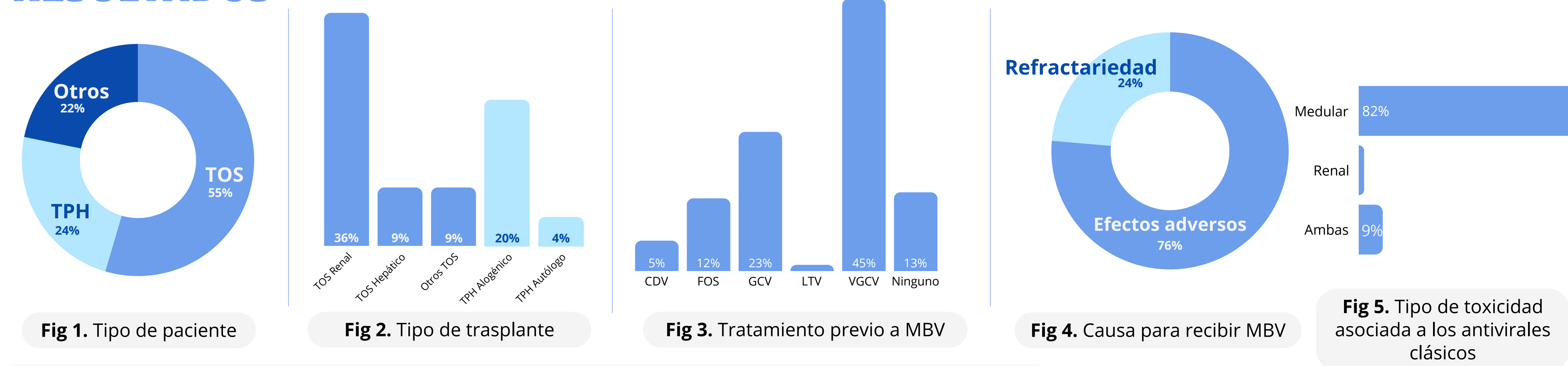


Tabla 1. Características de los pacientes.

Sexo (%)	H, 53%; M, 47%
Edad (años)	60 (49.5-67)
Duración del tratamiento con MBV (días)	31 (19.5-58)
Carga viral de CMVH antes de iniciar MBV (UI/ml)	968 (71.7-4897)
Mutaciones detectadas por secuenciación Sanger (número)	8
Mutaciones detectadas por NGS (número)	12

CMVH, Citomegalovirus humano; H, Hombre; M, Mujer; MBV, Maribavir; NGS, Secuenciación masiva; UI/ml, Unidades Internacionales por mililitro.

De los 55 pacientes incluidos, el estudio de resistencias se realizó en el 60% (n=33) de pacientes con sospecha de resistencia, de los cuales se detectaron por NGS mutaciones de resistencia y desconocidas en el 30% (n=10) (Tabla 2).

Tabla 2. Características descriptivas y virológicas de los pacientes con mutaciones detectadas.

Paciente	Tipo de paciente	Antiviral previo a MBV	Causa para recibir MBV	Duración MBV (días)	Carga viral previa a MBV (UI/ml)	Muestras pre-tratamiento con MBV		Muestras post-tratamiento con MBV		Replicación post-MBV
						SECUENCIACIÓN SANGER	SECUENCIACIÓN MASIVA	SECUENCIACIÓN SANGER	SECUENCIACIÓN MASIVA	
1	TOS Hepático	VGCV	Toxicidad medular	56	1200	NMD	NMD	UL97: T409M (MBV)	UL97: T409M (MBV) 99.5%	Sí
2	TOS Renal	VGCV, FOS, CDV	Refractariedad	94	553000	UL97: L595S (GCV)	UL97: L595S (GCV) 96.5%	-	-	No
3	TOS Renal	VGCV	Refractariedad	76	1940	UL97: A594V (GCV)	UL97: A594V (GCV) 99.6%	-	-	No
4	TOS Renopancreático	GCV, VGCV	Toxicidad medular	60	13100	UL54: P522S (GCV) UL97: D277E	UL54: P522S (GCV) 99.1% UL97: M460V (GCV) 4.4% y D277E 99%	-	-	No
5	TPH Alogénico	VGCV, FOS, CDV	Refractariedad	53	1410	UL97: A594V (GCV)	UL97: A594V (GCV) 99.3%	-	-	No
6	TPH Alogénico	VGCV	Toxicidad medular	57	3410	UL97: M460I (GCV)	UL97: M460I (GCV) 97.8%	-	-	No
7	TPH Alogénico	FOS, CDV	Toxicidad medular y renal	34	2840	NMD	UL97: E596G (GCV) 5.1%	-	-	No
8	TPH Alogénico	GCV	Toxicidad medular y renal	49	2850	NMD	UL54: V715M (FOS) 4.0%	-	-	No
9	CAR-T	VGCV	Toxicidad medular	5	49900	NMD	UL97: C592G (GCV) 5.8%	-	-	No
10	Hematológico	GCV, VGCV, FOS	Refractariedad	12	46700	UL54: del982 (GCV) UL97: M460V (GCV)	UL54: del982 (GCV) 87.9% UL97: M460V (GCV) 99.9%	-	-	No

CAR-T, Células T con receptor de antígeno quimérico; CDV, Cidofovir; FOS, Foscarnet; GCV, Ganciclovir; LTV, Letemovir; NMD, Ninguna mutación detectada; MBV, Maribavir; TOS, Trasplante de órgano sólido; TPH, Trasplante de progenitores hematopoyéticos; UI/ml, Unidades Internacionales por mililitro; VGCV, Valganciclovir; -, No replica. **Mutaciones de resistencia.** **Mutaciones desconocidas.**

CONCLUSIONES

La toxicidad a antivirales clásicos es la principal causa para iniciar tratamiento con MBV. La presencia de MRAs a MBV es infrecuente y la secuenciación masiva permite detectar MRAs presentes en subpoblaciones minoritarias. La aplicación de la NGS para el estudio de MRAs en citomegalovirus optimizaría el manejo del paciente trasplantado de manera precoz.