

MOŽNOSTI RYCHLÉHO PRŮKAZU GANCICLOVIR REZISTENTNÍCH KMENŮ LIDSKÉHO CYTOMEGALOVIRU (HCMV, CMV) U PACIENTŮ PO TRANSPLANTACI LEDVINY. DETEKCE BODOVÝCH MUTACÍ V UL97 GENU HCMV SPOJENÝCH S REZISTENCÍ VŮČI GANCICLOVIRU

Jiří Psohlavec¹, Miroslav Förstl¹, Jiří Horáček¹, Lenka Plíšková², Zbyněk Veselský³, Petr Fixa⁴

¹Ústav klinické mikrobiologie a Národní referenční laboratoř pro cytomegaloviry, FN v Hradci Králové

²Ústav klinické biochemie a diagnostiky, FN v Hradci Králové

³Urocentrum, Praha

⁴Klinika gerontologická a metabolická, FN v Hradci Králové

Dlouhodobá léčba cytomegalovirových infekcí (CMV, HCMV) u imunokompromitovaných pacientů, zahrnujících také příjemce transplantátu ledviny, ganciclovirem může vést k selhání léčby. Rezistence vůči gancicloviru je spojená s mutacemi v UL97 regionu virového genomu a/nebo s mutacemi ve virové DNA polymeráze (UL54). UL97 gen kóduje fosfotransferázu, která je nezbytná pro monofosforylaci gancicloviru. V naší studii jsme provedli analýzu UL97 genu klinických kmenů HCMV izolovaných z pacientů po prodělané transplantaci ledviny. Tyto klinické izoláty získané z třiceti vzorků od třiceti příjemců transplantované ledviny byly amplifikovány polymerázovou řetězovou reakcí a analyzovány metodou RFLP (metoda restrikční analýzy DNA). Studovány byly specifické bodové mutace spojené s rezistencí vůči gancicloviru v kodonech 460, 520, 591, 592, 594, 595, 599, 603 a 607. Nenalezli jsme žádné izoláty obsahující kteroukoli z výše zmíněných mutací. RFLP detekce bodových mutací v HCMV UL97 genu spojených s rezistencí vůči gancicloviru může být velkým přínosem pro časnou detekci rezistence vůči gancicloviru.

Klíčová slova: ganciclovir, HCMV, rezistence, UL97.

POSSIBILITIES OF RAPID DETECTION OF GANCICLOVIR-RESISTANCE HUMAN CYTOMEGALOVIRUS STRAINS IN PATIENTS AFTER KIDNEY TRANSPLANTATION. DETECTION OF POINT MUTATIONS IN THE HCMV UL97 GENE ASSOCIATED WITH GANCICLOVIR RESISTANCE

Long-term treatment of HCMV-infected immunocompromised patients, including kidney transplant recipients, with ganciclovir may result in failure of therapy. Resistance to ganciclovir is related to mutations in the UL97 region of the viral genome and/or mutations in the viral DNA polymerase (UL54). UL97 gene encoding a phosphotransferase which is essential for monophosphorylation of ganciclovir. We analyzed UL97 gene of clinical HCMV strains isolated from renal transplant recipients. These clinical isolates obtained from 30 samples of thirty renal transplant recipients were amplified by polymerase chain reaction and analyzed by RFLP analysis. The specific point mutations conferring with ganciclovir resistance, including mutations in codons 460, 520, 591, 592, 594, 595, 599, 603 and 607, were investigated. We didn't find any isolates carried any of these mutations. RFLP detection of point mutations in HCMV UL97 gene conferring with ganciclovir resistance may be a great contribution for early detection of ganciclovir resistance.

Key words: ganciclovir, HCMV, resistance, UL97.

Úvod

Rozvoj transplantační medicíny s sebou přináší celou řadu pozitivních skutečností, především snížení mortality a signifikantní zvýšení kvality života transplantovaných pacientů. Spolu s těmito pozitivními jevy se objevují i určitá negativa spojená s transplantací orgánů a s následnou progresivní imunosupresivní léčbou. Jedním z nich je výskyt oportunních infekcí podstatně zhoršujících prognózu.

Z virových agens představují jednu z nejzávažnějších komplikací aktivní a klinicky manifestní cytomegalovirové (HCMV, CMV) infekce. Dlouhodobá léčba ganciclovirem je v těchto případech nezbytná. Nevýhodou dlouhodobé terapie do budoucna je především možnost selekce ganciclovir rezistentních kmenů CMV a selhání léčby. Z tohoto důvodu je nezbytná včasná detekce tohoto jevu a z ní vyplývající další terapeutický postup u takto ohrožených pacientů.

Jednou z možností včasného zachytu ganciclovir rezistentních kmenů HCMV je detekce bodových mutací v genu kódujícím specifickou virovou protein kinázu – fosfotransferázu UL97, která hraje klíčovou roli v aktivaci gancicloviru. Virová proteinkináza nazývaná také fosfotransferáza je specifický protein kódovaný genem UL97 čítajícím 2 124 páry bází, jehož kompletní nukleotidová sekvence je plně odsekvencována. Tato proteinkináza je esenciální pro aktivaci gancicloviru na ganciclovir monofosfát, který je

Konkrétně se jedná o bodové mutace v následujících kodonech :

Met460 → Val(ATG → ATT), Hist520 → Glu(CAC → CAG), Ala591 → Val(GCC → GTC), Cys592 → Gly(TGC → GGC), Cys603 → Trp(TGC → TGG), Lys599 → Thr(AAG → ACG), Ala594 → Val(GCG → GTG), Leu595 → Ser příp. → Phe(TTG → TCG příp. TTT), Cys607 → Tyr(TGT → TAT) (1, 3, 7, 8, 12, 14, 16, 17, 19).
 Substituce metioninu, který je nahrazen valinem případně isoleucinem v kodonu 460 je dána změnou jednoho nukleotidu v daném úseku (A → G 1378 případně G → T 1380) (1, 8, 9, 16, 22).
 Substituce histidinu nahrazeného glutaminem v kodonu 520 je dána změnou cytosinu v guanin v nukleotidové pozici 1560 UL97 genu (15).
 Substituce alaninu valinem v kodonu 591 je dána změnou cytosinu v tymin v nukleotidové pozici 1772 UL97 genu (17, 21).
 Substituce cysteinu glycinem v kodonu 592 je dána změnou tyminu v guanin v nukleotidové pozici 1774 UL97 genu (17).
 Substituce alaninu, který je nahrazen valinem v kodonu 594 je dána změnou nukleotidu cytosinu na tymin v nukleotidové pozici 1781 UL97 genu (1, 7, 8, 9, 12, 16).
 Substituce leusinu, který je nahrazen serinem v kodonu 595, je dána změnou nukleotidu tyminu na cytosin v nukleotidové pozici 1784 UL97 genu (1, 8, 9, 12, 16).
 Substituce leucinu, který je nahrazen fenylalaninem v kodonu 595, je dána změnou nukleotidu guaninu na tyminin v nukleotidové pozici 1785 UL97 genu (1, 8, 9, 12, 16).
 Substituce lysinu, který je nahrazen threoninem v kodonu 599 je dána změnou nukleotidu adeninu na cytosin v nukleotidové pozici 1796 UL97 genu, která je někdy doprovázena změnou cytosinu na tymin v nukleotidové pozici 1794 (14).
 Substituce cysteinu tryptofanem v kodonu 603 je dána změnou cytosinu v guanin v nukleotidové pozici 1809 UL97 genu (17, 22).
 Substituce cysteinu nahrazeného tyrosinem v kodonu 607 je dána změnou nukleotidu G → A v nukleotidové pozici 1820 (TGT → TAT) (3, 6, 22).

Amplifikační reakce s primery CPT 1088 (5- ACG GTG CTC ACG GTC TGG AT -3), CPT 1587M (5- CTG CAG CGG CAT GGG TCG GAA AGC AAG -3):

Vzorek 25 µl: 10× konc. pufr (1,5 mM Mg) 2,5 µl, dNTPs 2 µl, primery CPT 1088 1,25 µl a CPT 1587 M 1,25 µl, aqua pro inj. 15,3 µl, Taq polymeráza 0,2 µl, templát (DNA) 2,5 µl.
 PCR teplotní parametry byly následující: 40 cyklů-1 min při 94,5 °C, 1 min při 55 °C, a 1 min při 72 °C.
 Amplifikovaný materiál se ověřuje elektroforézou na 2% agar. gelu s eth. bromidem a srovnávacím markrem M XIII.
 Poté bylo 10 µl produktu amplifikace použito k digesci s NlaIII a AluI po dobu 2 h při 37 °C, dle daného schématu:
 • 10 µl amplif. produktu (500bp), 10U restr. enzymu NlaIII (1 µl), 1,2 µl 10× konc. pufru NE 4,
 • 10 µl amplif. produktu (500bp), 10U restr. enzymu AluI (1,25 µl), 1,25 µl 10× konc. pufru NE2.
 Detekce restrikčních fragmentů byla po provedené restrikci realizována elektroforézou na 3% agar. gelu. Vizualizace byla uskutečněna použitím ethidium bromidu, jako srovnávacího markeru bylo použito markeru M XIII.

Amplifikační reakce s primery CPT 1713 (5-CGG TCT GGA CGA GGT GCG CAT-3), CPT 1830M (5-ATT GAG CAG ACA GGC GTC GAA GCA GTG CGT GAG CTT GCC GTT CTT-3):

Vzorek 50 µl: 10× konc. pufr (1,5 mM Mg) 5 µl, dNTPs 4 µl, primery CPT 1088 2,5 µl a CPT 1587 M 2,5 µl, aqua pro inj. 30,6 µl, Taq polymeráza 0,4 µl, templát (DNA) 5 µl.
 PCR teplotní parametry byly následující: 40 cyklů-1 min při 94,5 °C, 1 min při 55 °C, a 1 min při 72 °C.
 Amplifikovaný materiál se ověřuje elektroforézou na 2% agar. gelu s eth. bromidem a srovnávacím markrem M XIII.
 Poté bylo 10 µl produktu amplifikace použito k digesci s HhaI, MseI, TaqI, HaeIII, a FseI po dobu 2 h při 37 °C, dle daného schématu:
 10 µl amplif. produktu (118bp), 10U restr. enzymu HhaI (0,5 µl), 1,15 µl 10× konc. pufru NE 4,
 10 µl amplif. produktu (118bp), 10U restr. enzymu MseI (5 µl), 1,65 µl 10× konc. pufru NE 2,
 10 µl amplif. produktu (118bp), 10U restr. enzymu TaqI (1 µl), 1,2 µl 10× konc. pufru BM,
 10 µl amplif. produktu (118bp), 10U restr. enzymu HaeIII (1 µl), 1,2 µl 10× konc. pufru NE 2,
 10 µl amplif. produktu (118bp), 10U restr. enzymu FseI (5 µl), 1,65 µl 10× konc. pufru NE 4.
 Detekce restrikčních fragmentů byla po provedené restrikci realizována elektroforézou na 5% MetaPhore agar. gelu. Vizualizace byla uskutečněna použitím sybr. green zeleně, jako srovnávacího markeru bylo použito markeru pUC19.

Amplifikační reakce s primery UL97 3 (5-TTA CAA CGA GCG CTG TGT GG-3), UL97 8(5-GAC GTA TTC GTG CAG CAT GG-3):

Vzorek 50 µl: 10× konc. pufr (1,5 mM Mg) 5 µl, dNTPs 4 µl, primery UL97 3 2,5 µl a UL97 8 2,5 µl, aqua pro inj. 30,6 µl, Taq polymeráza 0,4 µl, templát (DNA) 5 µl.
 PCR teplotní parametry byly následující: 40 cyklů-45 sec. při 94 °C, 45 sec. při 58 °C, a 2 min a 30 sec. při 72 °C.
 Amplifikovaný materiál se ověřuje elektroforézou na 2% agar. gelu s eth. bromidem a srovnávacím markrem M XIII.
 Poté bylo 10 µl produktu amplifikace použito k digesci s PshAI, AvalI a RsaI po dobu 2 h při 37 °C, dle daného schématu:
 10 µl amplif. produktu (525bp), 10U restr. enzymu PshAI (1 µl), 1,2 µl 10× konc. pufru NE 4,
 10 µl amplif. produktu (525bp), 10U restr. enzymu AvalI (1 µl), 1,2 µl 10× konc. pufru NE 4,
 10 µl amplif. produktu (525bp), 10U restr. enzymu RsaI (1 µl), 1,2 µl 10× konc. pufru NE 1.
 Detekce restrikčních fragmentů byla po provedené restrikci realizována elektroforézou na 3% agar. gelu. Vizualizace byla uskutečněna použitím ethidium bromidu, jako srovnávacího markeru bylo použito markeru M XIII.

Všechna vyšetření byla prováděna spolu s vyšetřením CMV kmene AD169, který byl použit jako negativní kontrola.

dále fosforylován na svou aktivní trifosfátovou formu buněčnými kinázami. Po vazbě gancicloviru na aktivní vazebné místo této specifické fosfotransferázy dochází k jeho fosforylaci (11). Alterací terciální struktury tohoto vazebného místa fosfotransferázy dochází ke znemožnění vazby gancicloviru na tento enzym, což má za následek selhání léčby (je znemožněna jeho aktivace). Tato změna struktury je dána substitucí aminokyselin uvnitř v řetězci této protein kinázy, která je zapříčiněna bodovými mutacemi eventu-

elně delecí v UL97 genu kódujícího specifickou virovou fosfotransferázu (1, 2, 7, 18, 19).

K těmto změnám může dojít již po 2měsíčním selektivním terapeutickém tlaku ganciclovirem podávaném per os! U pacientů přijímajících ganciclovir intravenózně se vyskytují mutantní virové kmeny rezistentní vůči gancicloviru po zhruba 3 měsíčním podávání (10)!

Na základě uvedených zjištění byla sestavena metodika detekce bodových mutací

v HCMV UL97 genu spojených s rezistencí vůči gancicloviru na bázi restrikční analýzy amplifikovaného úseku UL97 genu. RFLP assay byla nastavena konkrétně na detekci bodových mutací v kodonech 460, 520, 591, 592, 594, 595, 599, 603 a 607.

Cílem naší práce bylo sestavení a zavedení metody detekce bodových mutací v HCMV UL97 genu spojených s rezistencí vůči gancicloviru do rutinní diagnostické praxe s ohledem na možný diagnostický přínos v klinické praxi.

Pro vyšetření přítomnosti bodových mutací v kodonech 460 a 520 byl amplifikován úsek UL97 genu o velikosti 500bp obsahující kodony 361-592. Amplifikace byla provedena metodou PCR za použití primerů CPT 1088 (5- ACG GTG CTC ACG GTC TGG AT -3), CPT 1587M (5- CTG CAG CGG CAT GGG TCG GAA AGC AAG-3).

Následná restrikce amplifikačního produktu byla provedena v případě průkazu bodové mutace v kodonu 460 pomocí restrikčního enzymu NlaIII(CATG ↓). Výsledkem nepřítomnosti bodové mutace v tomto kodonu byla digesce 500bp ampikonu na čtyři úseky o velikosti 167bp, 126bp, 198bp, 9bp, jejichž přítomnost byla stanovena elektroforeticky způsobem, který byl uveden v předcházející kapitole (obrázek 1).

V případě průkazu bodové mutace v kodonu 520 byla následná restrikce amplifikačního produktu provedena pomocí restrikčního enzymu AluI(AG ↓ CT). Výsledkem nepřítomnosti bodové mutace v tomto kodonu byla digesce 500bp ampikonu na dva úseky o velikosti 188bp, 312bp, jejichž přítomnost byla stanovena elektroforeticky způsobem, který byl uveden v předcházející kapitole (obrázek 2).

Pro vyšetření přítomnosti bodových mutací v kodonech 591, 592, 594 a 595 byl amplifikován úsek UL97 genu o velikosti 118bp obsahující kodony 571-610. Amplifikace byla provedena metodou PCR za použití primerů CPT 1713 (5-CGG TCT GGA CGA GGT GCG CAT-3), CPT 1830M (5-ATT GAG CAG ACA GGC GTC GAA GCA GTG CGT GAG CTT GCC GTT CTT-3).

Následná restrikce amplifikačního produktu byla provedena v případě průkazu bodové mutace v kodonu 591 pomocí restrikčního enzymu HaeIII(GG ↓ CC). Výsledkem nepřítomnosti bodové mutace v tomto kodonu byla digesce 118bp ampikonu na dva úseky o velikosti 59bp, 59bp, jejichž přítomnost byla stanovena elektroforeticky způsobem, který byl uveden v předcházející kapitole (obrázek 3).

V případě průkazu bodové mutace v kodonu 592 byla následná restrikce amplifikačního produktu provedena pomocí restrikčního enzymu FseI (GGCC ↓ GGCC). Výsledkem nepřítomnosti bodové mutace v tomto kodonu byla digesce 118bp ampikonu na jeden úsek o velikosti 118bp, jehož přítomnost byla stanovena elektroforeticky způsobem, který byl uveden v předcházející kapitole (obrázek 4).

V případě průkazu bodové mutace v kodonu 594 byla následná restrikce amplifikačního produktu provedena pomocí restrikčního enzymu HhaI(GCG ↓ C). Výsledkem nepřítomnosti bodové mutace v tomto kodonu byla digesce 118bp ampikonu na čtyři úseky o velikosti 18bp, 38bp, 12bp, 50bp, jejichž přítomnost byla stanovena elektroforeticky způsobem, který byl uveden v předcházející kapitole (obrázek 5).

V případě průkazu bodových mutací v kodonu 595 byla následná restrikce amplifikačního produktu provedena pomocí restrikčních enzymů MseI(T ↓ TAA) (změna G → T v nukleotidové pozici 1785) a TaqI(CATG ↓) (změna T → C v nukleotidové pozici 1784). Výsledkem nepřítomnosti bodové mutace v tomto kodonu byla digesce 118bp ampikonu enzymem MseI na dva úseky o velikosti 42bp, 76bp a enzymem TaqI na jeden úsek o velikosti 118bp, jejichž přítomnost byla stanovena elektroforeticky způsobem, který byl uveden v předcházející kapitole (obrázky 6, 7).

Pro vyšetření přítomnosti bodových mutací v kodonech 599, 603 a 607 byl amplifikován úsek UL97 genu o velikosti 525bp obsahující kodony 256-781. Amplifikace byla provedena metodou PCR za použití primerů UL97 3 (5-TTA CAA CGA GCG CTG TGT GG-3), UL97 8 (5-GAC GTA TTC GTG CAG CAT GG-3).

Následná restrikce amplifikačního produktu byla provedena v případě průkazu bodové mutace v kodonu 599 pomocí restrikčního enzymu RsaI(GT ↓ AC). Výsledkem nepřítomnosti bodové mutace v tomto kodonu byla digesce 525bp ampikonu na dva úseky o velikosti 468bp, 58bp, jejichž přítomnost byla stanovena elektroforeticky způsobem, který byl uveden v předcházející kapitole.

V případě průkazu bodové mutace v kodonu 603 byla následná restrikce amplifikačního produktu provedena pomocí restrikčního enzymu AvaI(G ↓ GNCC). Výsledkem nepřítomnosti bodové mutace v tomto kodonu byla digesce 525bp ampikonu na dva úseky o velikosti 235bp, 291bp, jejichž přítomnost byla stanovena elektroforeticky způsobem, který byl uveden v předcházející kapitole (obrázek 8).

V případě průkazu bodové mutace v kodonu 607 byla následná restrikce amplifikačního produktu provedena pomocí restrikčního enzymu PshAI(GACNN ↓ NNGTC). Výsledkem nepřítomnosti bodové mutace v tomto kodonu byla digesce 525bp ampikonu na dva úseky o velikosti 348bp, 178bp, jejichž přítomnost byla stanovena elektroforeticky způsobem, který byl uveden v předcházející kapitole (obrázek 9).

Interpretace přítomnosti bodových mutací (které jsme v našem šetření nezaznamenali) je následující:

Výsledkem bodové mutace v kodonu 460 odpovědné za rezistenci vůči gancicloviru, jejíž přítomnost námi nebyla prokázána, je ztráta restrikčního místa pro NlaIII v tomto kodonu. Produktem digesce 500bp ampikonu jsou tři úseky o velikosti 167bp, 324bp, 9bp. Detekce těchto restrikčních úseků je dále prováděna stejně jako v případě nepřítomnosti bodové mutace.

Výsledkem bodové mutace v kodonu 520 odpovědné za rezistenci vůči gancicloviru, jejíž přítomnost námi nebyla prokázána, je přítomnost restrikčního místa pro AluI v tomto kodonu. Produktem digesce 500bp ampikonu jsou tři úseky o velikosti 188bp, 285bp, 27bp. Detekce těchto restrikčních úseků je dále prováděna stejně jako v předcházejícím případě.

Výsledkem bodové mutace v kodonu 591 odpovědné za rezistenci vůči gancicloviru, jejíž přítomnost námi nebyla prokázána, je ztráta restrikčního místa pro HaeIII v tomto kodonu. Produktem digesce 118bp ampikonu je jeden úsek o velikosti 118bp, k restrikci tedy nedojde. Detekce tohoto restrikčního úseku je dále prováděna stejně jako v případě nepřítomnosti bodové mutace.

Výsledkem bodové mutace v kodonu 592 odpovědné za rezistenci vůči gancicloviru, jejíž přítomnost námi nebyla prokázána, je přítomnost restrikčního místa pro FseI v tomto kodonu. Produktem digesce 118bp ampikonu jsou dva úseky o velikosti 61bp, 57bp. Detekce těchto restrikčních úseků je dále prováděna stejně jako v předcházejícím případě.

Výsledkem bodové mutace v kodonu 594 odpovědné za rezistenci vůči gancicloviru, jejíž přítomnost námi nebyla prokázána, je ztráta restrikčního místa pro HhaI v tomto kodonu. Produktem digesce 118bp ampikonu jsou tři úseky o velikosti 18bp, 38bp, 62bp. Detekce těchto restrikčních úseků je dále prováděna stejně jako v předcházejícím případě.

Výsledkem bodových mutací v kodonu 595 odpovědných za rezistenci vůči gancicloviru, jejíž přítomnost námi nebyla prokázána, je přítomnost restrikčního místa pro MseI případně pro TaqI v tomto kodonu. Produktem digesce 118bp ampikonu enzymem MseI jsou tři úseky o velikosti 42bp, 46bp, 30bp. V případě digesce enzymem TaqI je výsledkem přítomnost dvou restrikčních úseků o velikosti 47bp, 71bp. Detekce těchto restrikčních úseků je dále prováděna stejně jako v předcházejícím případě.

Výsledkem bodové mutace v kodonu 599 odpovědné za rezistenci vůči gancicloviru, jejíž přítomnost námi nebyla prokázána, je přítomnost restrikčního místa pro RsaI v tomto kodonu. Produktem digesce 525bp ampikonu jsou tři úseky o velikosti 325bp, 142bp, 58bp. Detekce těchto restrikčních úseků je dále prováděna stejně jako v případě nepřítomnosti bodové mutace.

Výsledkem bodové mutace v kodonu 603 odpovědné za rezistenci vůči gancicloviru, jejíž přítomnost námi nebyla prokázána, je přítomnost restrikčního místa pro AvaI v tomto kodonu. Produktem digesce 525bp ampikonu jsou tři úseky o velikosti 235bp, 186bp, 104bp. Detekce těchto restrikčních úseků je dále prováděna stejně jako v předcházejícím případě.

Výsledkem bodové mutace v kodonu 607 odpovědné za rezistenci vůči gancicloviru, jejíž přítomnost námi nebyla prokázána, je ztráta restrikčního místa pro PshAI v tomto kodonu. Produktem digesce 525bp ampikonu je jeden úsek o velikosti 525bp. Detekce tohoto restrikčního úseku je dále prováděna stejně jako v předcházejícím případě.

Obrázek 1. Analýza kodonu 460 restr. enzymem NlaIII (500bp = 167bp, 126bp, 198bp, 9bp)



Obrázek 4. Analýza kodonu 592 restr. enzymem FseI (118bp = 118bp)



Obrázek 7. Analýza kodonu 595 restr. enzymem TaqI (118bp = 118bp)



Obrázek 2. Analýza kodonu 520 restr. enzymem AluI (500bp = 118bp, 312bp)



Obrázek 5. Analýza kodonu 594 restr. enzymem HhaI (118bp = 18bp, 38bp, 12bp, 50bp)



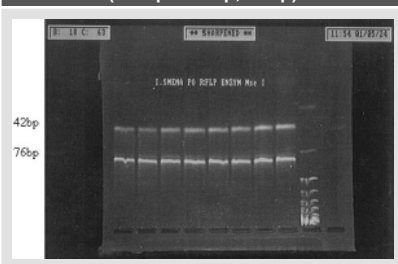
Obrázek 8. Analýza kodonu 603 restr. enzymem AvaII (525bp = 235bp, 291bp)



Obrázek 3. Analýza kodonu 591 restr. enzymem HaeIII (118bp = 59bp, 59bp)



Obrázek 6. Analýza kodonu 595 restr. enzymem MseI (118bp = 42bp, 76bp)



Obrázek 9. Analýza kodonu 607 restr. enzymem PshAI (525bp = 347bp, 178bp)



Materiál a metody

Vzorky

Tricet zamrazených (- 70 °C) virových izolátů CMV získaných z nasofaryngaálního výtěru (nutný transport v Parkerově odběrovém a transportním médiu) nebo z moči pacientů po prodělané transplantaci ledviny z let 1997–2000.

Izolace

Izolace virové DNA byla provedena dle standardního protokolu za použití QIAamp DNA kitu.

Amplifikace, restrikce a detekce

UL97 region HCMV genomu byl podroben amplifikaci PCR a analyzován metodou RFLP.

Výsledky

Přítomnost bodových mutací v genu UL97 pro specifickou virovou fosfotransferázu odpovědných za rezistenci vůči gancicloviru v kodonech 460, 520, 591, 592, 594, 595, 599, 603 a 607 byla stanovována u 30 vzorků z virových izolátů 30 pacientů po prodělané transplantaci ledvin z let 1997–2000 s aktivní CMV infekcí bez klinické manifestace. Těmto pacientům byl po zjištění aktivní virové infekce

ce preemptivně podáván ganciclovir i. v. po dobu 14 dní.

V naší práci jsme nezaznamenali žádný případ mutace ve vyšetřovaných kodonech, které je možné prokázat ztrátou přirozených nebo přítomností přídatných restrikčních míst pro dané endonukleázy. Nenalezli jsme tedy žádné mutace v UL97 genu pro specifickou virovou protein kinázu – fosfotransferázu spojené s rezistencí vůči gancicloviru.

Diskuze

Rezistence vůči gancicloviru vyvolaná bodovými mutacemi v UL97 genu je v 90–95 % případů důvodem selhání léčby ganciclovirem. Klasické metody vyšetření citlivosti antivirotik založené na kultivaci viru jsou sice velice spolehlivé, avšak z časového hlediska (několik dní) ne zcela ideální. Především v klinické praxi, kdy na včasném zjištění skutečnosti přítomnosti rezistentního a vůči antivirotové terapii intaktního viru často závisí úspěšnost zvládnutí posttransplantačních infekčních komplikací. Na druhou stranu zjištění opírající se o klinické manifestace selhání antivirové terapie v mnoha případech již nedávají takové terapeutické možnosti jako v případě časného odhalení přítomnosti rezistentního viru v nejčasnějším stadiu, které je díky

dostupným citlivým molekulárně-biologickým metodám možné.

Lze se tedy domnívat, že nejvhodnějším postupem včasné detekce ganciclovir rezistentních CMV kmenů, který poskytuje možnost adekvátního terapeutického postupu, je pravidelný screening přítomnosti rezistentních virových kmenů u pacientů léčených dlouhodobě ganciclovirem.

Jednou z možností vyšetření přítomnosti ganciclovir rezistentních kmenů CMV je detekce bodových mutací v UL97 genu CMV metodou RFLP, kterou jsme na našem pracovišti použili. Výhodou této metodiky je především rychlost, která je v klinické praxi nezbytná, a relativní finanční dostupnost.

V našem šetření nebyla zjištěna přítomnost ganciclovir rezistentních kmenů CMV jak vyplývá z údajů uvedených v kapitole o výsledcích.

Závěr

V naší studii zahrnující 300 vyšetření přítomnosti bodových mutací v inkriminovaných kodonech ve vzorcích získaných od 30 pacientů po prodělané transplantaci ledviny s aktivní CMV infekcí bez její klinické manifestace nebyla zjištěna ani v jednom případě přítomnost bodové mutace

a tím přítomnost ganciclovir rezistentního kmene CMV. Všichni pacienti, kterým byl po zjištění aktivní infekce preemptivně podáván ganciclovir po dobu 14 dní, zůstali i po prodělané terapii prosti klinické manifestace CMV infekce.

Možnost detekce bodových mutací v kodonech 460, 520, 591, 592, 594, 595, 599,

603 a 607 CMV UL97 genu pro specifickou virovou fosfotransferázu metodou RFLP se zdá být do budoucna velice perspektivní i přes to, že v České republice nebyly zatím tyto kmeny detekovány. Je totiž reálné a správné předpokládat, že se s nimi v blízké době setkáme.

Tato práce byla vypracována v rámci výzkumného záměru MŠMT CEZ: J13/98: 111500001 (Závažná orgánová selhání, experimentální a klinické aspekty, možnosti prevence a terapeutického ovlivnění).

Literatura

1. Abraham B, Lastere S, Reynes J, Bibollet-Ruche F, Vidal N. Ganciclovir resistance and UL97 gene mutations in cytomegalovirus blood isolates from patients with AIDS treated with ganciclovir. *J Clin Virol.* 1999; 13: 141–148.
2. Baldanti F, Sarasini A, Silini E, Barbi M, Lazzarin A. Four dually resistant human cytomegalovirus strains from AIDS patients: single mutations in UL97 and UL54 open reading frames are responsible for ganciclovir- and foscarnet-specific resistance, respectively. *Scand J Infect Dis Suppl.* 1995; 99: 103–104.
3. Baldanti F, Underwood MR, Talarico CL, Simoncini L, Sarasini A, Biron KK, Gerna G. The Cys607–Tyr change in the UL97 phosphotransferase confers ganciclovir resistance to two human cytomegalovirus strains recovered from two immunocompromised patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; Feb, 42 (2): 444–446.
4. Baldanti F, Biron KK, Gerna G. Interpreting human cytomegalovirus antiviral drug susceptibility testing: the role of mixed virus populations. *J Infect Dis.* 1998; Mar. 177 (3): 823–824.
5. Baldanti F, Simoncini L, Talarico CL, Sarasini A, Biron KK, Gerna G. Emergence of a ganciclovir-resistance human cytomegalovirus strain with a new UL97 mutation in an AIDS patient DNA. *AIDS.* 1998; May 7, 12 (7): 816–818.
6. Baldanti F, Simoncini L, Sarasini A, Zavaroni M, Grossi P, Revallo MG, Gerna G. Ganciclovir resistance as a result of oral ganciclovir in a heart transplant recipient with multiple human cytomegalovirus strains in blood. *Transplantation.* 1998; Aug 15, 66 (3): 324–329.
7. Boivin G, Gilbert C, Morissette M, Handfield J, Goyette N. A case of ganciclovir-resistant cytomegalovirus (CMV) retinitis in a patient with AIDS: longitudinal molecular analysis of the CMV viral load and viral mutations in blood compartments. *AIDS.* 1997; Jun, 11 (7): 867–873.
8. Chou S, Erice A, Jordan C, et al. Analysis of the UL97 phosphotransferase coding sequence in clinical cytomegalovirus isolates and identification of mutation conferring ganciclovir resistance. *J Infect Dis* 1995; 171: 576–583.
9. Chou S, Guentzel S, Michels KR, Miner RC, Drew WL. Frequency of UL97 phosphotransferase mutations related to ganciclovir resistance in clinical cytomegalovirus isolates. *J Infect Dis* 1995; 172: 239–242.
10. Chou S, Marousek G, Guentzel S, Follansbee SE, Poscher ME, Lalezari JP, Miner RC, Drew WL. Evolution of mutations conferring multidrug resistance during prophylaxis and therapy for cytomegalovirus disease. *J Infect Dis* 1997; Sep, 176 (3): 786–789.
11. De Clercq E. Acyclic Nucleoside Phosphonates in the Chemotherapy of DNA Virus and Retrovirus Infections. *Intervirology.* 1997; 40: 295–303.
12. Erice A, Gil-Roda C, Pérez JL, et al. Antiviral susceptibilities and analysis of UL97 and DNA polymerase sequences of clinical cytomegalovirus isolates from immunocompromised patients. *J Infect Dis* 1997; May, 175 (5): 1087–1092.
13. Erice A, Gil-Roda C, Pérez JL, et al. Antiviral susceptibilities and analysis of UL97 and DNA polymerase sequences of clinical cytomegalovirus isolates from immunocompromised patients. *J Infect Dis* 1997; 175: 1087–1092.
14. Faizi Khan R, Mori S, Eizuru Y, Kumura Ishii K, Minamishima Y. Genetic analysis of a ganciclovir-resistant human cytomegalovirus mutant. *Antiviral Res.* 1998; Dec, 40 (1–2): 95–103.
15. Hanson MN, Preheim LC, Chou S, Talarico CL, Biron KK. Novel mutation in the UL97 gene of clinical cytomegalovirus strain conferring resistance to ganciclovir. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; May, 39 (5): 1204–1205.
16. Liu W, Kuppermann BD, Martin DF, Wolitz RA, Margolis TP. Mutations in the cytomegalovirus UL97 gene associated with ganciclovir-resistant retinitis. *J Infect Dis* 1998; May, 177 (5): 1176–1181.
17. Prix L, Hamprecht K, Holzhueter B, Handgretinger R, Klingebiel T. Comprehensive Restriction Analysis of the UL97 Region Allows Early Detection of Ganciclovir-Resistant Human Cytomegalovirus in an Immunocompromised Child. *J Infect Dis.* 1999; 180: 491–495.
18. Sarasini A, Baldanti F, Furione M, Percivalle E, Brerri R, Barbi M, Gerna G. Double resistance to ganciclovir and foscarnet of four human cytomegalovirus strains recovered from AIDS patient. *J Med Virol.* 1995; Nov, 47 (3): 237–244.
19. Smith IL, Cherrington JM, Jiles RE, Fuller MD, Freeman WR, Spector SA. High-level resistance of cytomegalovirus to ganciclovir is associated with alterations in both the UL97 and DNA polymerase genes. *J Infect Dis.* 1997; Jul, 176 (1): 69–77.
20. Snoeck R, Andrei G, De Clercq E. Patterns of resistance and sensitivity to antiviral compounds of drug-resistant strains of human cytomegalovirus selected in vitro. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1996; Jul, 15 (7): 574–579.
21. Wolf DG, Lee DJ, Spector SA. Detection of human cytomegalovirus mutations associated with ganciclovir resistance in cerebrospinal fluid of AIDS patient with central nervous system disease. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; Nov, 39 (11): 2552–2554.
22. Zhou L, Harder TC, Ullmann U, Rautenberg P. Rapid detection by reverse hybridization of mutations in the UL97 gene of human cytomegalovirus conferring resistance to ganciclovir. *J Clin Virol.* 1999; 13: 53–59.