ARTIGO ORIGINAL / *ORIGINAL ARTICLE*

Detecção Genotípica da Resistência ao Ganciclovir em Estirpes do Vírus Citomegálico Humano

Genotypic Detection of Ganciclovir Resistance in Human Cytomegalovirus Strains

/ **Sofia Paiva Martins**[1] / **Paulo Paixão**[1] / **Patrícia Matias**[2] / **Maria José Rebocho**[2] / **Teresa Marques**[1,2]

[1] Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal.
[2] Hospital de Santa Cruz – Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental, Portugal.

Correspondência:
Sofia Paiva Martins
Departamento de Microbiologia
Campo Mártires da Pátria, 130
1169-056 Lisboa
Telefone: 351 218803076
Fax: 351 218803012
e-mail: sofiapaivamartins@yahoo.com

/ Resumo

O Vírus Citomegálico Humano (VCM) é uma das principais causas de morbilidade e mortalidade nos indivíduos imunocomprometidos, necessitando estes de efectuar terapêuticas, geralmente prolongadas, com ganciclovir/valganciclovir.

O objectivo do estudo foi a detecção genotípica da resistência ao ganciclovir em estirpes do VCM em doentes sujeitos a transplantação renal, cardíaca e pulmonar. Como método de genotipagem foi utilizada a reacção em cadeia de polimerase (PCR) à qual se seguiu a sequenciação dos fragmentos do ADN do VCM compreendidos entre os codões 460-520 e 590-607.

Cinquenta amostras clínicas de doentes infectados pelo VCM foram estudadas, mas em apenas 39 se obteve amplificação de fragmentos do ADN.

Detectaram-se as seguintes mutações no gene UL97 em amostras clínicas de dois transplantados renais: Valina466 → Metionina e Leucina595 → Serina. É de referir que a mutação no codão 595 é uma das mais frequentes e está descrita como associada à resistência ao ganciclovir.

Em suma, que seja do nosso conhecimento, é a primeira vez que se descreve em Portugal uma estirpe do VCM com uma mutação associada com a resistência ao ganciclovir.

Palavras-chave: Vírus Citomegálico Humano, Resistência, Ganciclovir

/ Abstract

The Human Cytomegalovirus (CMV) is one of the main causes of morbidity and mortality among immunocompromised patients, and usually needs a long treatment with ganciclovir/valganciclovir.

The objectives of this study were the genotypic detection of mutations associated with ganciclovir resistance, in renal, cardiac and pulmonary transplant population. The genotyping method used was a Polymerase Chain Reaction (PCR) followed by sequenciation of CMV DNA fragments between codons 460-520 and 590-607.

Fifty clinical samples of patients infected with CMV were studied, but only in 39 was the DNA fragment amplification possible.

Two mutations were detected in the UL97 gene of renal transplant recipients: Valine466_Methionine and Leucine595_Serine. The mutation in codon 595 is one of the most frequent in this gene, and was previously described as associated with ganciclovir resistance.
To our knowledge, this is the first report of CMV strains with mutations associated with ganciclovir resistance, in Portugal.

Key- words: *Cytomegalovirus, Resistance, Ganciclovir*

/ Introdução

O Vírus Citomegálico Humano (VCM) é uma das principais causas de morbilidade e mortalidade nos indivíduos imunocomprometidos, nomeadamente nos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana e nos sujeitos a transplantação (1).

Dentro dos agentes antivíricos utilizados no tratamento de infecções pelo VCM, contam-se o ganciclovir e a sua pró-droga, o valganciclovir, o foscarnet e o cidofovir (1,2).

Embora estes agentes antivíricos tenham indicação para o tratamento da doença sintomática pelo VCM, recentemente começaram também a ser utilizados em regimes profiláticos e em regimes referidos como "preemphve", de modo a prevenir episódios sintomáticos, especialmente nos transplantados (1,3). Na sequência da utilização destas diferentes estratégias terapêuticas ou profiláticas, têm surgido estirpes resistentes aos diferentes agentes antivíricos (4,5,6).

A resistência do VCM aos antivíricos pode resultar de alterações em dois produtos de genes víricos, na pUL97 – fosfotransferase que é codificada pelo gene UL97, ou na pUL54 – DNA polimerase vírica que é codificada pelo gene UL54 (1). A proteína codificada pelo gene UL97, pUL97 (fosfotransferase), é responsável pela fosforilação inicial do ganciclovir nas células infectadas pelo vírus citomegálico humano e consequentemente está envolvida na resistência do vírus a este antivírico (1, 7, 8).

As mutações neste gene têm como principal consequência a incapacidade da enzima reconhecer o ganciclovir como substrato e de o fosforilar, pelo que o vírus adquire resistência a este fármaco. Na ausência da fosforilação inicial, as enzimas celulares não têm capacidade para efectuar uma segunda e terceira fosforilação do ganciclovir, originando a forma activa deste fármaco – ganciclovir trifosfato (9).

As mutações associadas com a resistência ao ganciclovir no gene UL97 podem resultar de substituições ou pequenas delecções de aminoácidos nos codões 460 e 520 ou na região compreendida entre os codões 590 e 607 (1). As estirpes do VCM com mutações apenas no gene UL97 permanecem susceptíveis ao foscarnet e ao cidofovir, uma vez que estes antivíricos não necessitam de fosforilação por parte desta enzima codificada pelo vírus para a sua activação.

A segunda proteína vírica envolvida na resistência a todos os antivíricos utilizados no tratamento de infecções pelo VCM é a pUL54, DNA polimerase vírica (1). Enquanto que as mutações no gene UL97 são o mecanismo mais comum de resistência ao ganciclovir, demonstrou-se que as estirpes do VCM também podem ter mutações no gene UL54. No entanto, deve ser referido que estas mutações raramente acontecem sem que existam mutações no gene UL97. As mutações no gene UL54 são o mecanismo adicional de resistência ao ganciclovir e o único mecanismo de resistência ao cidofovir e ao foscarnet (10).

Este estudo tinha como principal objectivo a detecção genotípica da resistência ao ganciclovir em estirpes do vírus citomegálico humano isoladas em doentes sujeitos a transplantação de órgãos sólidos (transplantados renais, cardíacos e pulmonares).

/ Material e Métodos

O produto biológico utilizado foi o sangue (leucócitos), colhido em doentes submetidos a transplantação renal, cardíaca ou pulmonar, monitorizados através da técnica de antigenémia. O objectivo desta técnica consistia na pesquisa do antigénio pp65 do VCM, presente nos leucócitos de indivíduos infectados, e utilizava-se para o diagnóstico e seguimento da infecção pelo VCM em indivíduos transplantados.

Para extrair o ADN das amostras clínicas foi utilizado o kit "QIAamp® DNA Mini Spin" (Qiagen) e foi seguido o protocolo "Blood and Body Fluid Spin", de acordo com as instruções do fabricante.

Após a extracção do ADN, a amplificação dos fragmentos do ADN foi efectuada por uma técnica de PCR, utilizando sequências iniciadoras específicas (comunicação pessoal por Nell Lurain) para amplificar duas regiões do gene UL97, uma primeira região que contém os codões 460 a 520 e uma segunda região que contém os codões 590 a 607.

Resumidamente, o primeiro par de sequências iniciadoras foi o P460 (5` - CACGTTGGCCGACGCTATCA – 3`) e o P520 (5` - GCCGACAGCTCCGACATGCAATA – 3`) que amplifica um fragmento com 354 pares de bases (pb). O segundo par de sequências iniciadoras foi o P590 (5` - (CATGCCGCTGCAGAAGCTGCTCA – 3`) e o P607 (5` - ATGGTCTGCGAGCATTCGTGGTA - 3`) que amplifica um fragmento com 406 pb e por último um terceiro par de sequências iniciadoras o P590 (5` - CATGCCGCTGCAGAAGCTGCTCA – 3`) e o P607A (5` - GACAGGCGCCGTAGCTCATT - 3`) que amplifica um fragmento com 287 pb do gene UL97. Na amplificação do ADN do VCM da região compreendida entre o codão 590 e 607 foram utilizados dois pares de sequências iniciadoras para testar qual deles apresentava uma maior sensibilidade.

O programa de amplificação consistiu na desnaturação inicial durante 1 minuto a 94ºC, seguindo-se 40 ciclos de

TABELA I – RESULTADOS OBTIDOS COM AS DIFERENTES SEQUÊNCIAS INICIADORAS.

Sequências iniciadoras	Nº de amostras
Amplificação com as **3 sequências iniciadoras**: P460/P520; P590/P607; P590/P607A	32
Amplificação com **2 sequências iniciadoras**: P460/P520; P590/P607	6
Amplificação com **2 sequências iniciadoras**: P460/P520; P590/P607A	2
Amplificação com **1 sequência iniciadora**: P460/P520	3
Sem amplificação com qualquer das sequências iniciadoras	7

desnaturação a 94ºC durante 1 minuto, hibridação a 68ºC durante 2 minutos e extensão a 72ºC durante 3 minutos, com extensão final a 72ºC durante 5 minutos.

Os produtos de amplificação foram conservados a 4ºC até se efectuar a sua visualização em gel de agarose a 1,5%, contendo brometo de etídio.

Os produtos de amplificação, após purificação (kit "QIAquick PCR Purification" (Qiagen)) foram sequenciados na empresa *STABVIDA*. As características da sequenciação do ADN foram as seguintes: Modelo do sequenciador: ABI3700 da *Applied Biosystem*; química de sequenciação: *BigDye Versão 1.1* da *Applied Biosystem*; programa de amplificação: desnaturação durante 1 minuto a 96ºC e de seguida 24 a 25 ciclos de desnaturação a 96ºC durante 10 segundos, hibridação a 50ºC durante 5 segundos e extensão a 72ºC durante 4 minutos. O *software* utilizado para a análise do ADN foi o *Sequencing analysis 3.7*.

A análise das sequências do ADN foi efectuada recorrendo a três programas: *Chromas* versão 1.45, CLUSTAL W e *BioEdit*.

Foi também utilizada a base de dados *GenBank* para fazer a comparação das sequências do ADN da estirpe AD169 laboratorial com a sequência do ADN do gene UL97 da estirpe AD169 (*GenBank* X17403).

/ Resultados

Foram utilizadas 50 amostras clínicas de doentes infectados pelo vírus citomegálico humano, previamente testadas pela técnica de antigenémia. Em relação à amplificação de fragmentos do ADN do VCM em amostras clínicas pela técnica de PCR, verificámos que em 64% (correspondente a 32 amostras clínicas) houve amplificação com todos os pares de sequências iniciadoras, enquanto que em 14% (correspondente a 7 amostras clínicas) não houve amplificação com qualquer um dos pares de sequência iniciadores utilizados: P460/P520, P590/P607 e P590/P607A.Três amostras clínicas (6%) só obtiveram resultados positivos com o par P460/P520. Nas amostras em que se verificou discrepância na amplificação dos fragmentos do ADN do VCM com as sequências iniciadoras P590/P607 e P590/P607A verificámos que com o par de sequências iniciadoras P590/P607 houve amplificação em 12% das amostras e com o par de sequências iniciadoras P590/P607A houve amplificação em 4% das amostras, o que corresponde, respectivamente, a seis e duas amostras clínicas (Tabela I). No entanto, aplicando um teste probabilístico concluiu-se que a diferença não é significativa (Teste dos Sinais de *Wilcoxon*; $p = 0,05$).

Apenas foram sequenciados 39 dos 50 fragmentos do ADN do VCM amplificados, isto porque, como já foi referido anteriormente, sete amostras clínicas não amplificaram com qualquer par de sequências iniciadoras e três amostras clínicas só amplificaram um fragmento do ADN com um par de sequências iniciadoras. Convém ainda referir que, com uma das amostras clínicas, não foi possível obter resultados (erros na leitura dos nucleótidos) no processo de sequenciação, pelo que foi igualmente excluída do estudo.

Das 39 amostras clínicas (78 sequências), 24 (48 sequências) foram obtidas de 14 doentes sujeitos a transplantação renal, 14 (28 sequências) de sete doentes sujeitos a transplantação cardíaca e uma (2 sequências) de um doente submetido a transplantação pulmonar.

Dos 14 doentes sujeitos a transplantação renal, 12 doentes (86%) eram seropositivos e os restantes dois (14%) eram seronegativos para o VCM. Todos os doentes seropositivos para VCM tiveram uma infecção secundária (reactivação de um vírus latente ou reinfecção por uma estirpe diferente) pelo VCM após o transplante, enquanto que os doentes seronegativos para o VCM tiveram uma infecção primária pelo VCM após o transplante do órgão.

Em relação aos doentes sujeitos a transplantação cardíaca, todos eram seropositivos para o VCM e todos eles tiveram infecções secundárias (reactivação ou reinfecção) após a transplantação.

Foram detectadas duas mutações no gene UL97 do VCM, localizadas nos codões 595 (L595S) e 466 (V466M).

/ Discussão

Este trabalho teve como objectivo determinar a sequência do gene UL97 compreendida entre os codões 460 e 520 e entre os codões 590 e 607 e analisar as sequências deduzidas dos aminoácidos relativamente à presença de mutações associadas à resistência ao ganciclovir.

Nas amostras clínicas em que houve amplificação de fragmentos do ADN do VCM com os três pares de sequências

iniciadoras, a maioria possuía grandes quantidades do ADN visto que, ao analisarmos os resultados obtidos pela técnica de antigenémia para estas amostras, foi possível verificar que a maioria delas apresentava um elevado número de leucócitos positivos (isto é, infectados pelo VCM) por 50000 células totais (maior que 10 leucócitos positivos/50000 células totais), confirmando assim os resultados obtidos na técnica da PCR.

A ausência de amplificação de fragmentos do ADN do VCM nas outras amostras clínicas deveu-se, provavelmente, ao facto de a quantidade de ADN ser reduzida. Analisando os resultados obtidos pela técnica de antigenémia, podemos verificar que estas amostras clínicas apresentavam, na sua maioria, um baixo número de leucócitos positivos por 50000 células totais (menor que 3 leucócitos positivos/50000 células totais). Embora não exista um limiar universalmente aceite para separar os resultados das antigenémias em "baixas" ou "elevadas", deve ser referido que, segundo um trabalho anterior da mesma equipa, antigenémias com resultados inferiores a 10 leucócitos positivos por 50000 células totais estavam mais associadas a infecções assintomáticas (11).

Comparando os resultados obtidos com as sequências iniciadoras P590/P607 e P590/P607A, verificou-se que com o par P590/P607 houve amplificação de fragmentos do ADN num maior número de amostras clínicas do que com o par P590/P607A, o que nos poderia levar a dizer que o primeiro par apresenta uma maior sensibilidade do que o segundo. No entanto, ao aplicar-se o teste probabilístico designado por Teste dos Sinais de *Wilcoxon*, não foi possível encontrar diferenças significativas entre os dois pares de sequências iniciadoras. As diferenças obtidas podem explicar-se pelo facto de se estarem a amplificar cargas víricas baixas, o que pode originar diferenças entre alíquotas de uma mesma amostra, quando testada por duas técnicas diferentes. Este argumento é, de resto, o utilizado para se justificar a utilização de várias alíquotas de uma mesma amostra para pesquisa do VCM pela PCR, quando se presume que a carga vírica pode ser baixa, como por exemplo, nos líquidos amnióticos, o que poderá originar resultados discrepantes entre diferentes alíquotas (12).



A mutação no codão 595 do gene UL97 (Leucina595 → Serina) foi detectada numa amostra clínica de um doente sujeito a transplantação renal, seropositivo para o VCM e que recebeu um órgão de um dador também seropositivo para o VCM. Após o transplante, teve um episódio sintomático de infecção pelo VCM, com anemia e leucopenia como manifestações clínicas. O tipo de infecção que o doente apresentou, pós-transplante, poderá ter sido uma reactivação de um vírus latente ou uma reinfecção por uma nova estirpe do VCM. Analisando os dados clínicos, verificou-se que o doente teve uma exposição prolongada ao antivírico durante a terapêutica administrada para o tratamento da infecção pelo VCM. O primeiro curso de terapêutica consistiu na administração de valganciclovir durante cinco semanas e o segundo curso teve uma duração de seis meses. O aparecimento da mutação pode, assim, dever-se ao facto deste doente ter efectuado um curso terapêutico prolongado (superior a 3 meses), dado que quanto maior for o período de exposição ao antivírico maior será também a probabilidade de aparecimento de estirpes resistentes ao ganciclovir quer no sangue quer na urina (1, 13, 14).

A mutação Leucina595 → Serina encontrada neste doente é uma das mutações mais frequentes no gene UL97 e, com base em estudos de "transferência de genes", está associada a um dos maiores níveis de resistência ao ganciclovir, quando comparada com a estirpe parental (1, 2, 15, 16).

A mutação no codão 466 do gene UL97 do VCM, Valina466 → Metionina, foi detectada numa amostra clínica de um doente sujeito a transplantação renal, seronegativo para o VCM, tendo recebido um órgão de um dador seropositivo para o VCM. Após o transplante, apresentou uma infecção primária pelo VCM assintomática, provavelmente porque o órgão transplantado possuía um vírus latente (17). Analisando os dados clínicos, verificou-se que apresentava alguns factores de risco que favorecem o aparecimento de estirpes resistentes ao ganciclovir, nomeadamente o de não

possuir imunidade específica para este vírus, porque é D+/R- (dador seropositivo – receptor seronegativo) e por efectuar um regime profilático com valganciclovir durante três meses (exposição relativamente prolongada ao antivírico) (1, 6, 18, 19, 20). De referir, no entanto, que o valor clínico da profilaxia antivírica nos indivíduos com um elevado risco para o desenvolvimento de doença pelo VCM é controverso; embora diminua o risco de doença, trata-se de uma estratégia com elevados custos, nomeadamente porque expõe os doentes à toxicidade dos antivíricos (supressão medular e nefrotoxicidade) e selecciona estirpes resistentes (replicação vírica na presença do antivírico) (21). Esta mutação, Valina466 → Metionina, encontra-se na região conservada VI do gene UL97, não se sabendo ainda se confere alguma alteração na susceptibilidade ao ganciclovir (1, 22).

Considerando a necessidade de se efectuarem terapêuticas com agentes antivíricos, geralmente prolongadas, no doente imunocomprometido, *Gilbert e Boivin* (2005) (1) definiram algumas recomendações no que se refere à detecção genotípica da resistência aos antivíricos. Assim, esta deve ser sempre efectuada quando, sob terapêutica específica, as cargas víricas permanecerem estáveis ou aumentarem (monitorizadas pelo menos uma vez por semana), ou ainda se observarmos persistência dos sintomas clínicos durante uma ou mais semanas após o doente ter iniciado dose apropriada de terapia antivírica.

Em suma, que seja do nosso conhecimento, é a primeira vez que se descreve em Portugal uma estirpe do VCM com uma mutação associada à resistência ao ganciclovir.

Esta detecção sugere que, à semelhança do que acontece noutros países, se justificará pesquisar estas mutações em caso de má resposta à terapêutica antivírica adequada.

/ Bibliografia

1. Gilbert C, Boivin G. **Human Cytomegalovirus Resistance to Antiviral Drugs**. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:873-883.

2. Gilbert C, Bestman-Smith J, Boivin G. **Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: clinical impacts and molecular mechanisms**. *Drug Resist Update* 2002;5:88-114.

3. Boeckh M, Boivin G. **Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications**. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:533-554.

4. Drew WL, Miner RC, Busch DF, Follansbee SE, Gullett J, Mehalko SG, et al. **Prevalence of resistance in patients receiving ganciclovir for serious cytomegalovirus infection**. *J Infect Dis* 1991;163:716-719.

5. Erice A, Borrell N, Li W, Miller WJ, Balfour HH Jr. **Ganciclovir susceptibilities and analysis of UL97 region in cytomegalovirus isolates from bone marrow recipients with CMV disease after antiviral prophylaxis**. *J Infect Dis* 1998;178:531-534.

6. Limaye AP, Corey L, Koelle DM, Davis CL, Boeckh M. **Emergence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus disease among recipients of solid-organ transplants**. *Lancet* 2000;356:645-649.

7. Littler E, Stuart AD, Chee MS. **Human cytomegalovirus UL97 open reading frame encodes a protein that phosphorylates the antiviral nucleoside analogue ganciclovir**. *Nature* 1992;358:160-162.

8. Sullivan V, Talarico CL, Stanat SC, Davis M, Coen DM, Biron KK. **A protein kinase homologue controls phosphorylation of ganciclovir in human cytomegalovirus-infected cells**. *Nature* 1992;358:162-164.

9. Hanson MN, Preheim LC, Chou S, Talarico CL, Biron KK, Erice A. **Novel mutation in UL97 gene of clinical cytomegalovirus strain confering resistance to ganciclovir**. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39: 1204-1205.

10. Drew WL, Paya CV, Emery V. Cytomegalovirus (CMV) **Resistance to Antivirals**. *Am J Transplant* 2001;1:307-312.

11. Paixão P, Fernandes TB, Silva E, Rebocho MJ, Negrão AP, Marques T. **Pesquisa de antigenémia para Citomegalovírus em doentes sujeitos a transplantação cardíaca e renal**. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas* 1994;17(2):83-87.

12. Revello MG, Gerna G. **Pathogenesis and prenatal diagnosis of human cytomegalovirus infection**. *J Clin Virol* 2004;29(2):71-83.

13. Boivin G, Gilbert C, Gaudreau A, Greenfield I, Sudlow R, Roberts NA. **Rate of emergence of cytomegalovirus (CMV) mutations in leukocytes of patients with acquired immunodeficiency syndrome who are receiving valganciclovir as induction and maintenance therapy for CMV retinitis**. *J Infect Dis* 2001;184:1598-1602.

14. Jabs DA, Enger C, Dunn JP, Forman M. **Cytomegalovirus retinitis and viral resistance: ganciclovir resistance**. *J Infect Dis* 1998;177:770-773.

15. Chou S, Erice A, Jordan MC, Vercellotti GM, Michels KR, Talarico CL, et al. **Analysis of UL97 phosphotransferase coding sequence in clinical cytomegalovirus isolates and identification of mutations conferring ganciclovir resistance**. *J Infect Dis* 1995;171:576-583.

16. Chou S, Waldemer RH, Senters AE, Michels KS, Kemble GW, Miner RC, et al. **Cytomegalovirus UL97 phosphotransferase mutations that affect susceptibility to ganciclovir**. *J Infect Dis* 2002;185:162-169.

17. Sia IG, Patel R. **New strategies for prevention and therapy of cytomegalovirus infection and disease in solid-organ transplant recipients**. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:83-121.

18. Bhorade SM, Lurain NS, Jordan A, Leischner J, Villanueva J, Durazo R, et al. **Emergence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus in lung transplant recipients**. *J Heart Lung Transplant* 2002;21:1274-1282.

19. Limaye AP. **Ganciclovir-resistant cytomegalovirus in organ transplant recipients**. *Clin Infect Dis* 2002;35:866-872.

20. Limaye AP, Raghu G, Koelle DM, Ferrenberg J, Huang ML, Boeckh M. **High incidence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus infection among lung transplant recipients receiving preemptive therapy**. *J Infect Dis* 2002;185:20-27.

21. Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, Lembo D. **The human cytomegalovirus**. *Pharmacol Ther* 2003;98:269-297.

22. Boivin G, Gilbert C, Gaudreau A, Greenfield I, Sudlow R, Roberts NA. **Rate of emergence of cytomegalovirus (CMV) mutations in leukocytes of patients with acquired immunodeficiency syndrome who are receiving valganciclovir as induction and maintenance therapy for CMV retinitis**. *J Infect Dis* 2001;184:1598-1602.