

Marisa Cobos¹, Liliana Aquilia², Clemente Raimondi¹¹ Facultad de Ciencias Médicas - UNLP - Hospital Español, La Plata²OMICASLAB, Laboratorio de Genómica Clínica e Inmunología del Trasplante, La Plata

Introducción: La emergencia de variantes farmacorresistentes de CMV bajo la presión selectiva de antivirales ha sido asociada con la presencia de mutaciones en la región codificante de la proteína quinasa, en el gen **UL97**, y en la región codificante para la ADN polimerasa viral en el gen **UL54**. Más del 90% de estas mutaciones ocurren en **UL97**, particularmente entre los codones 450 y 640 y entre los codones 250 al 740 del **UL54**.

Objetivo: Desarrollo de la metodología *in house* para la detección de mutaciones asociadas a farmacorresistencia de CMV a antivirales

Materiales y Métodos: Los estudios de farmacorresistencia se realizaron en muestras de sangre y líquido cefalorraquídeo de un receptor de trasplante renal con desarrollo de cerebelitis por CMV, ante la falta de respuesta al tratamiento con Ganciclovir (GCV). El método de elección para la detección e identificación de las mutaciones asociadas a resistencia, es la amplificación por PCR (Polimerasa chain reaction) de los fragmentos donde mapean las regiones descritas (Fig.1) y su posterior secuenciación y análisis genotípicos de los productos de amplificación, mediante método Sanger. El análisis nucleotídico determina la presencia o no de mutaciones asociadas a resistencia en comparación con cepas de referencia. Se aisló DNA de las muestras y se procedió a la detección cualitativa del genoma viral mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa Anidada (Nested-PCR). Se amplificaron mediante primers específicos (Figs.2-3), los fragmentos correspondientes a los genes **UL97** y **UL54** del Herpes Virus Humano 5 (Citomegalovirus). Los productos de amplificación obtenidos fueron purificados y sometidos a Secuenciación Sanger y posterior análisis nucleotídico bioinformático (Fig.4).

Figura 1: DISTRIBUCION GENÓMICA DE LOS SITIOS BLANCO ASOCIADOS A RESISTENCIA

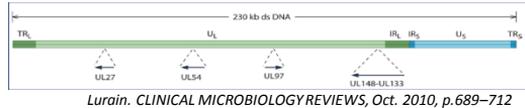


Figura 2: AMPLIFICACION GEN UL97, REGION RECOMENDADA: CODONES 400 A 707

REGIÓN 1: CODONES 439 A 557

Primer FW 5' TGG CCG ACG CTA TCA AAT TT-3'

Primer RW 5' CCC AGC GCC GAC AGC TCC GAC-3'

REGIÓN 2: CODONES 550 A 645

Primer FW 5' ATG TCG GAG CTG TCG GCG-3'

Primer RW 5' CGA CAC GAG GAC ATC TTG-3'

Figura 3: PROGRAMA DE CICLADO

- Desnaturalización a 95°C 2 min.
 - 45 ciclos de 95°C 20 segundos
 - 55°C por 30 segundos
 - 72°C por 30 segundos
- Elongación 72°C por 4 min / Enfr. a 37°C por 1 min.

Figura 4: SECUENCIAS OBTENIDAS: REF. WILD TYPE Y MUTACION EN 449

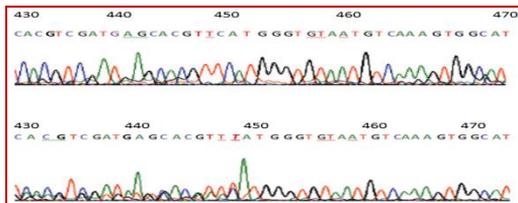


Figura 5: MUTACIONES EN GEN UL97 CONFIRMADAS EN LA MUESTRA ANALIZADA

Mutaciones asociadas a resistencia:
Q449K - M460I

Mutaciones no asociadas a resistencia:
D456E - L552E - D574E

Mutaciones silentes: C549C - P489P

Resultados: La secuencia correspondiente al gen **UL97** presentó mutaciones, alguna de ellas consideradas como polimórficas y otras sin asociación con farmacorresistencia, pero se detectó además, la presencia de las mutaciones M460I y Q449K, descritas en numerosos trabajos como seleccionadas por pacientes que han recibido GCV (Fig.5). Las mutaciones de **UL97** no afectan la susceptibilidad a foscarnet o cidofovir. El gen **UL54** no presentó mutaciones asociadas a farmacorresistencia (wild type). Previo a la recepción de los resultados, se rotó el tratamiento a foscarnet con resolución total de su cuadro y sin desarrollo de efectos adversos

Conclusiones: La farmacorresistencia debe sospecharse ante la falta de mejoría o recaídas en la enfermedad clínica o viremia, especialmente en presencia de factores de riesgo.

Si bien la rotación empírica de la medicación debe efectuarse de acuerdo a la severidad del cuadro, es necesario resaltar la importancia de la utilización de herramientas moleculares como metodología y apoyatura específica para la detección de variantes emergentes de resistencia frente a la necesidad de un cambio oportuno en el esquema terapéutico.