

Genotypering van het IMPDH-gen van infectieuze *Pneumocystis jirovecii* stammen uit niertransplantatieontvangers

Caroline Ferrante, Lize Cuypers, Katrien Bruyninckx - Moleculaire diagnostiek, UZ Leuven

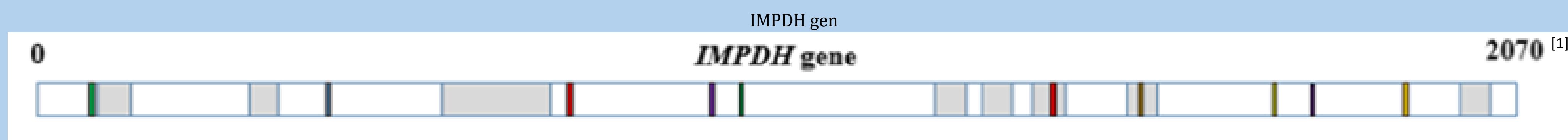
Introductie

Pneumocystis jirovecii is een schimmel die een belangrijke verwekker is van longinfecties, zoals **Pneumocystische pneumonie (PCP)**, bij immuun-gecompromitteerde patiënten. **Mycofenolzuur (MPA)** is een immunosuppressivum dat het voornamelijk genomen wordt door patiënten die een niertransplantatie ondergaan hebben. MPA remt het humaan enzyme **inosine monofosfaat dehydrogenase (IMPDH)** dat betrokken is bij DNA en RNA replicatie. MPA heeft ook antifungale eigenschappen en remt de groei en overleving van schimmels. Dit kan aanleiding geven tot selectie van *P. jirovecii*-stammen die minder gevoelig zijn aan MPA.

Uit een eerdere studie is gebleken dat er Single Nucleotide Polymorfisms (SNPs) gevormd kunnen worden door blootstelling aan MPA. Eén van de mogelijke SNPs die volgens de voorgaande studie aanleiding geeft tot minder gevoeligheid van MPA is de **mutatie Alanine-261-Threonine (G>A mutatie op positie 1020)** in het IMPDH-gen van *P. jirovecii*-stammen. Deze mutatie zou uitsluitend gevonden worden bij MPA behandelde transplantatiepatiënten. In de studie zijn de mutaties in het IMPDH-gen gegroepeerd volgens 8 types.

Het doel van de studie is het **identificeren van genetische varianten** in het IMPDH-gen van *P. jirovecii* stammen geïsoleerd uit MPA behandelde niertransplantatieontvangers die een *P. jirovecii* infectie ontwikkelden na hun transplantatie. De huidige studie omvat de genotypering van het IMPDH-gen van *P. jirovecii* isolaten van 26 patiënten die een niertransplantatie hebben ondergaan in UZ Leuven en PCP gekregen hebben.

In dit onderzoek worden **10 bronchoalveolaire-lavagevocht** onderzocht en bestudeerd welke mutaties aanwezig zijn in het IMPDH-gen van de *P. jirovecii* isolaten.



Resultaten

Patiënt	Lengte sequencing	Typering	Nucleotide op positie 1020
1	1-2070	IMPDH-1	G
2	1-2070	IMPDH-1	G
3	171-2070	IMPDH-1	G
4	1-2070	IMPDH-1	G
5	1-452 en 869-2070	IMPDH-5	G
6	1-2070	IMPDH-3	A
7	1-452 en 839-2002	IMPDH-5	G
8	871-1821	IMPDH-3	A
9	1-2070	IMPDH-1	G
10	1-2070	IMPDH-1	G

Slechts 2 patiënten zijn drager van de G>A mutatie. Dit resulteert in een Ala261Thr missens mutatie die behoort tot de IMPDH-3 groep. Dit resultaat geeft aan dat de missens mutatie IMPDH-3 niet voorkomt bij alle patiënten die een MPA-behandeling ondergaan hebben. De meest voorkomende mutatie behoort tot het IMPDH-1 type.

Conclusie

Door middel van genotypering van het IMPDH-gen van *Pneumocystis jirovecii* stammen bij niertransplantatieontvangers kan bijkomende informatie worden verkregen over de gevoeligheid van een patiënt voor MPA. Dit kan worden aangetoond door de aanwezigheid of afwezigheid van missense mutaties in het IMPDH-gen. Uit dit onderzoek blijkt dat de Ala261Thr missense mutatie, ook IMPDH-3 type, niet voorkomt bij alle transplantatie patiënten die behandeld zijn met het immunosuppressivum MPA, maar eerder bij een minderheid.

Materiaal en methode

De genotypering van het IMPDH-gen werd als volgt gedaan:

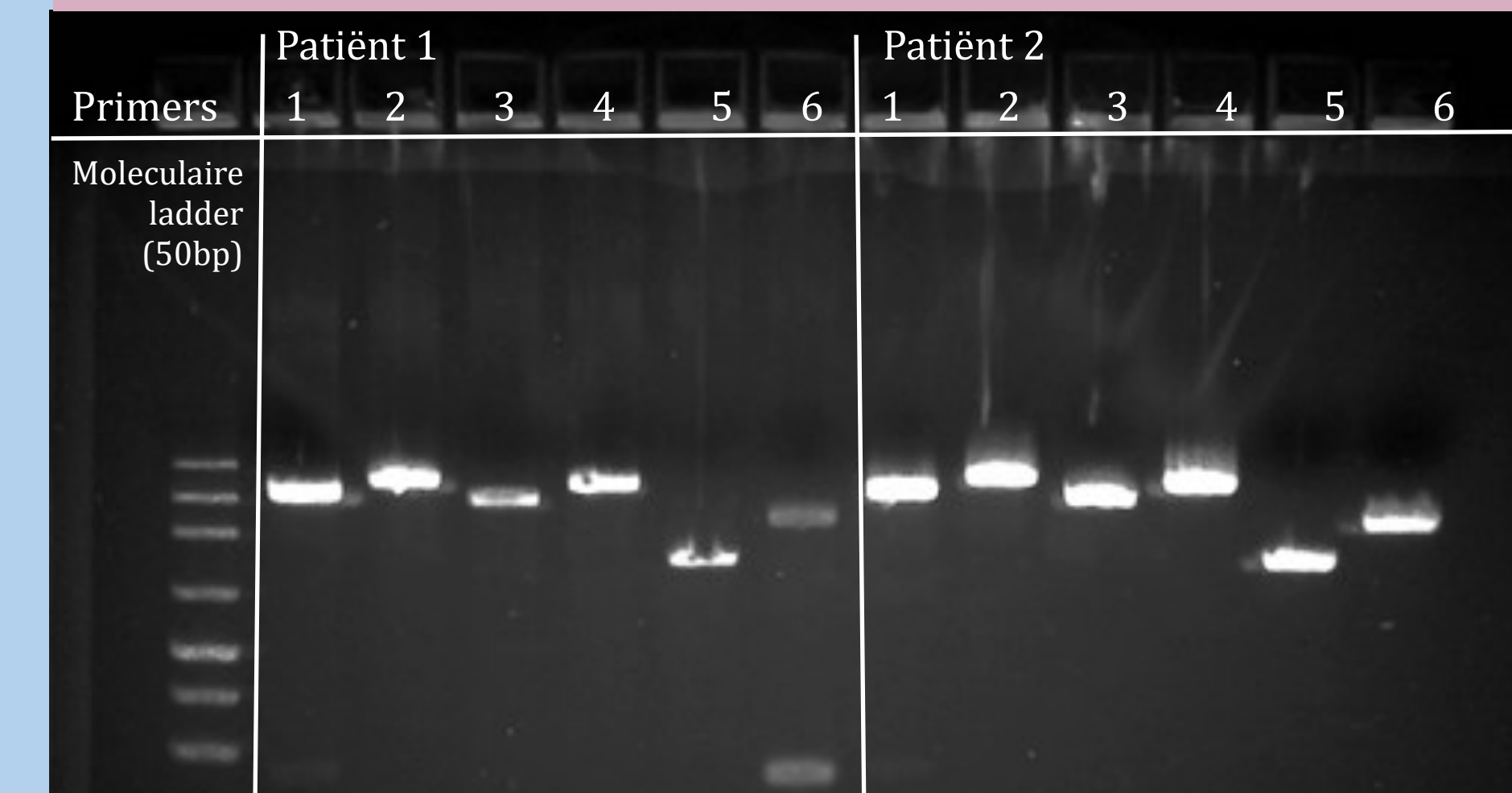
1. Extractie



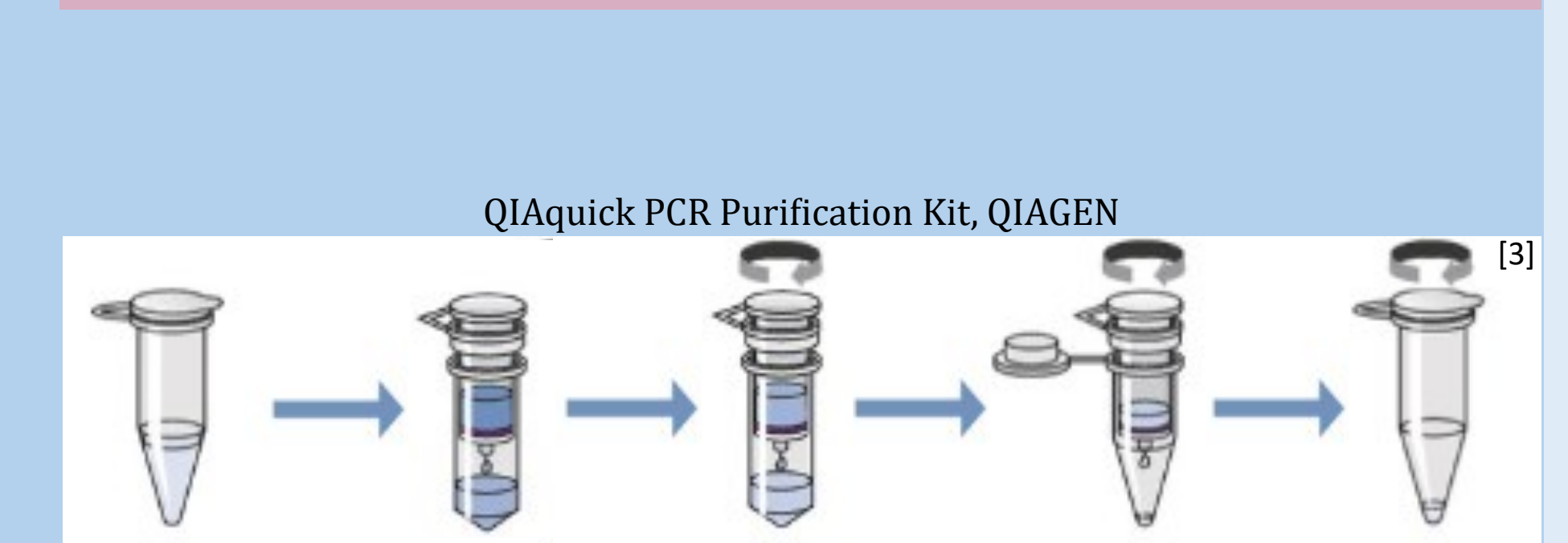
2. PCR-amplificatie

	Temperatuur	Tijd	Aantal Cycli
Initiële Denaturatie	95 °C	10 min	1
Denaturatie	94 °C	30 sec	45
Annealing	60 °C	45 sec	
Elongatie	72 °C	1 min	
Laatste elongatie	72 °C	10 min	1
Bewaring	4 °C		∞

3. Gelelektroforese



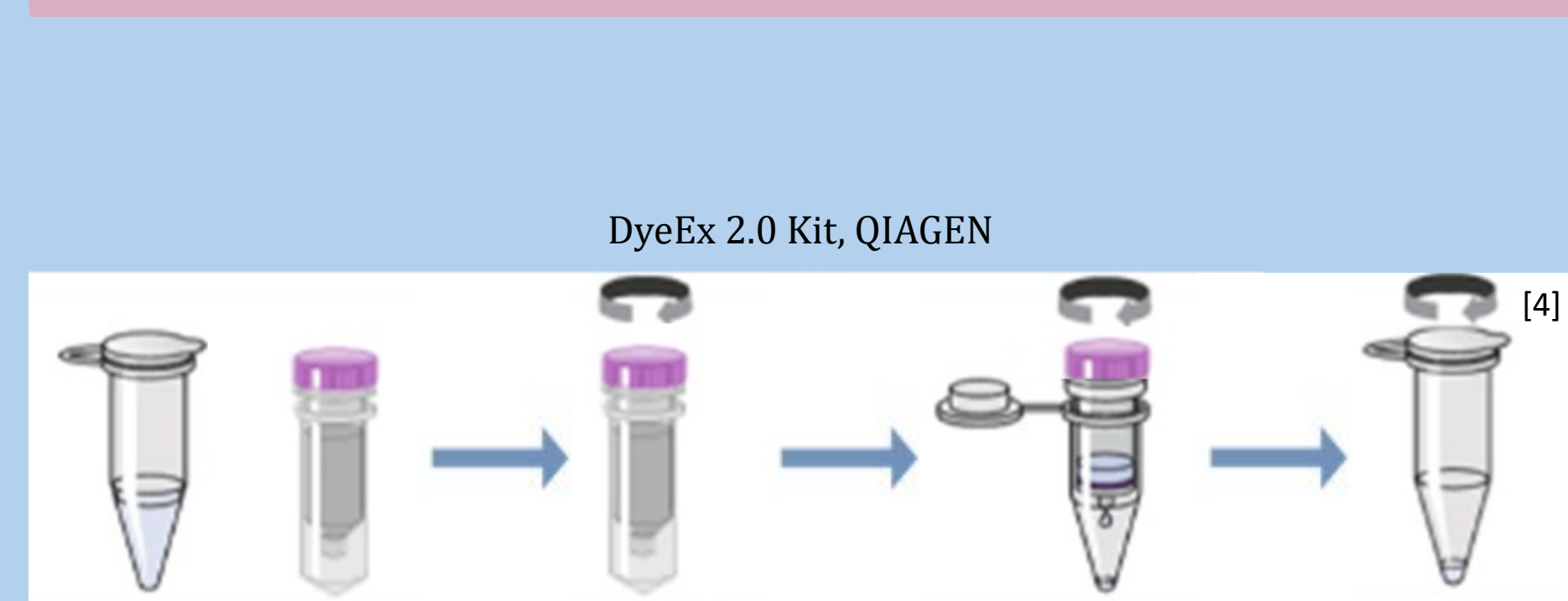
4. 1^{ste} Opzuivering



5. Cyclesequensing

	Temperatuur	Tijd	Aantal Cycli
Initiële Denaturatie	96 °C	10 min	1
Denaturatie	96 °C	30 sec	45
Annealing	50 °C	45 sec	
Elongatie	60 °C	1 min	
Bewaring	4 °C		∞

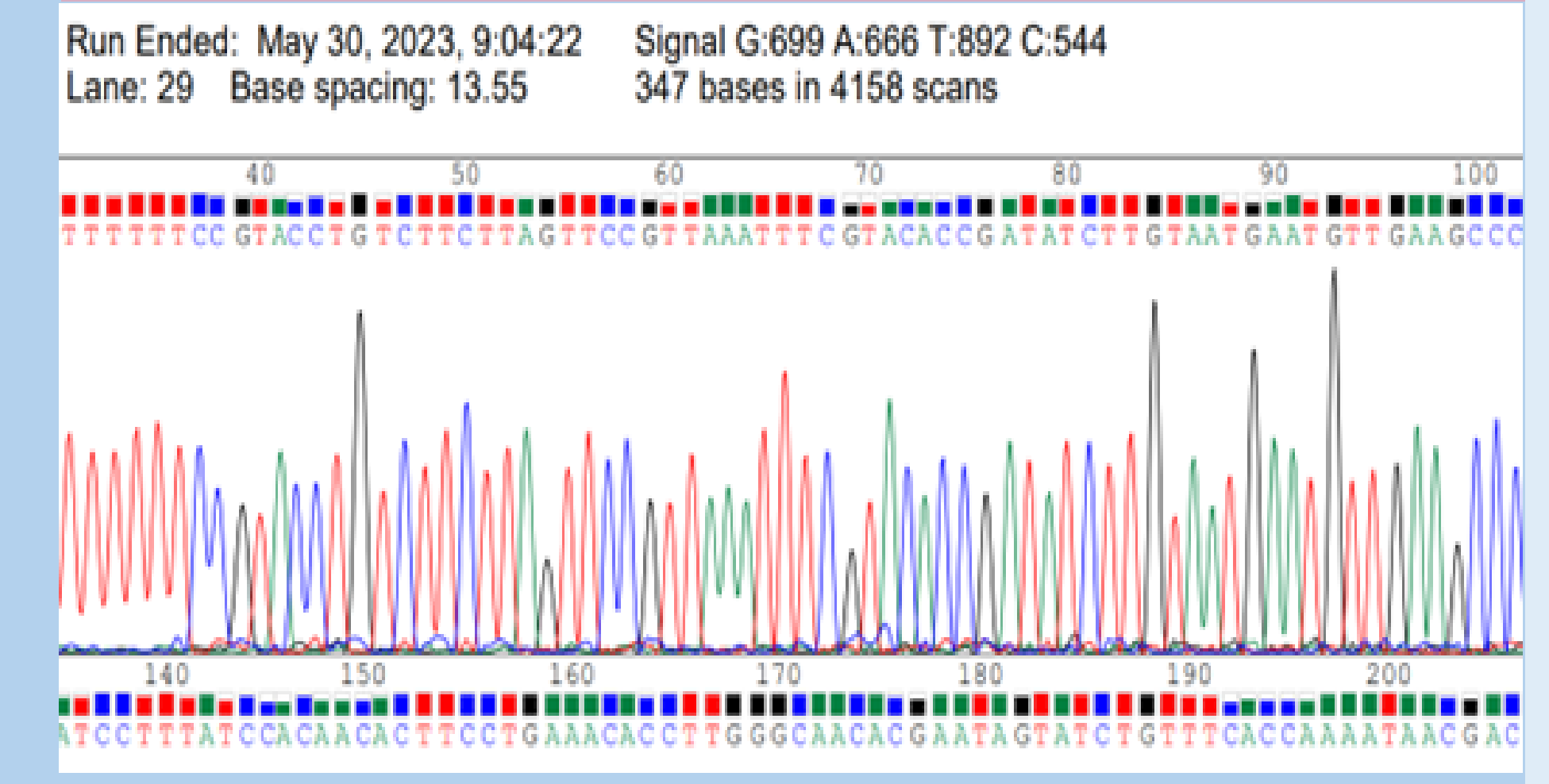
6. 2^{de} Opzuivering



7. Sanger-sequencing



8. Analyse



[1] Hoffmann, C. F., Nevez, G., Moal, M., Quinio, D., Nan, N. L., Papon, N., Bouchara, J., Meur, Y. L., & Gal, S. L. (2021). Selection of *Pneumocystis jirovecii* Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase Mutants in Solid Organ Transplant Recipients: Implication of Mycophenolic Acid. *Journal of Fungi*, 7(10), 849. <https://doi.org/10.3390/jof7100849>

[2] NucliSENS[®] easyMag[®]. (n.d.). bioMérieux. <https://www.biomerieux-usa.com/clinical/nuclisens-easymag>

[3] Sooyeon Kim. (2023, February 1). QIAquick Gel extraction kit & PCR Purification kit. *QIAquick Gel Extraction Kit & PCR Purification Kit* : Major Brands More Product Information. <https://dawnbio.com/product-information/?id=1911574&mode=view>

[4] DyeEx Kits. (n.d.). Qiagen.com. <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/dna-clean-up/dyeex-kits>

[5] 3730xl DNA Analyzer (latest version). (n.d.). <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A41046>