MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2008, 60: 155 - 161

Joanna Siennicka

PORÓWNANIE METOD ILOŚCIOWEGO OZNACZANIA DNA CMV W PRÓBKACH MATERIAŁU KLINICZNEGO POBRANEGO OD PACJENTÓW PO PRZESZCZEPIENIU NERKI Z OBJAWOWYM I BEZOBJAWOWYM ZAKAŻENIEM CMV

Zakład Wirusologii NIZP-PZH w Warszawie
Kierownik: doc. dr hab. *Bogumiła Litwińska*

Przedstawiono wyniki oznaczeń przeprowadzonych trzema metodami pozwalającymi na ilościowe określenie poziomu DNA wirusa cytomegalii (hybrydyzacja, PCR-Amplicor, PCR w czasie rzeczywistym). Na podstawie wyników badania próbek pochodzących od pacjentów po przeszczepieniu nerki z objawowym i bezobjawowym zakażeniem CMV określono poziomy odcięcia związane z wysokim prawdopodobieństwem wystąpienia objawowej formy zakażenia.

Zakażenie wirusem cytomegalii pozostaje jednym z głównych problemów u osób z obniżoną odpornością immunologiczną. Określenie poziomu DNA wirusa (*viral load*) i jego wzrostu w czasie, oraz wyznaczenie poziomu DNA wirusa związanego z ryzykiem wystąpienia zakażenia objawowego (*viral load threshold for disease*) ma podstawowe znaczenie prognostyczne i terapeutyczne u biorców przeszczepów (14). Stwierdzono, że zależność prawdopodobieństwa wystąpienia zakażenia objawowego od wzrostu poziomu DNA wirusa ma charakter rosnącej funkcji sigmoidalnej (2,4), przy czym poziom odcięcia (*threshold*) nie jest wartością stałą. Wartość ta zależy od danej grupy przeszczepów, metody badawczej i rodzaju badanego materiału.

Celem badań było porównanie trzech technik biologii molekularnej, pozwalających na ilościowe oznaczenie DNA wirusa cytomegalii i określenie dla każdej z nich wartości poziomu odcięcia związanego z wysokim prawdopodobieństwem wystąpienia objawowej formy zakażenia CMV u pacjentów po przeszczepieniu nerki.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 37 próbkach surowicy i pełnej krwi, uzyskanych od 17 pacjentów (12 kobiet i 5 mężczyzn) w wieku od 24 do 53 lat (średnia wieku 39,4) poddanych przeszczepieniu nerki w Instytucie Transplantologii AM w Warszawie w okresie od lipca 1997 do maja 1998r. Próbki przechowywano w stanie głębokiego zamrożenia (-70^{0}C). U 15 z 17 badanych osób, w ciągu pierwszych 3 miesięcy po przeszczepieniu stwierdzono

zakażenie CMV potwierdzone laboratoryjnie metodą antygenemii pp65 lub/i obecnością przeciwciał IgM lub/i metodą shell vial. U trzech pacjentów było to zakażenie pierwotne. Siedmiu pacjentów rozwinęło objawową formę zakażenia CMV, przy czym u dwóch z nich było to zakażenie wieloobjawowe. Część (n=16) próbek pochodziła od pacjentów z objawami zakażenia z okresu manifestacji objawów klinicznych. Pozostałe próbki (n=21) pobrano od pacjentów niewykazujących w chwili pobrania materiałów objawów zakażenia, przy czym część z nich (n=19) pochodziła od osób, u których potwierdzono istnienie zakażenia CMV w jakimkolwiek okresie trzymiesięcznej obserwacji innymi metodami, lub bezobjawowych (n=2), których wyniki badania metodami innymi niż molekularne dały wynik negatywny.

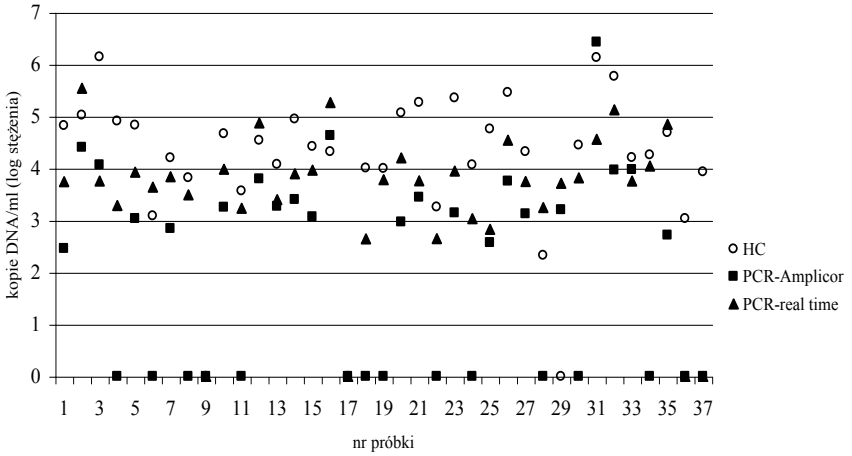
Oznaczenia metodą hybrydyzacji (HC) wykonywano zgodnie z procedurą testu Hybrid Capture System CMV DNA test (Murex Diagnostic). Z 3,5 ml krwi obwodowej uzyskiwano leukocyty (PBL), w których badano obecność DNA wirusa CMV przy użyciu sondy RNA wykrywanej metodą chemiluminiscencji. Wyniki odczytywano z krzywej standardowej jako ilość pg DNA CMV w 1 ml krwi. Uzyskaną wartość przeliczano na liczbę kopii DNA CMV według równania: 2075pg/ml=5x10^3 kopii DNA CMV.

Oznaczeń metodą PCR-Amplicor dokonywano w surowicy krwi badanych pacjentów przy użyciu zestawu COBAS AMPLICOR CMV Monitor test (Roche). DNA wyizolowane z 200 µl badanej surowicy podlegało amplifikacji równolegle ze standardem o znanej liczbie kopii DNA. Standard posiadał identyczne miejsca przyłączania starterów jak poszukiwane sekwencje DNA, różnił się jedynie obecnością swoistego dla sondy miejsca pozwalającego na odróżnienie amplikonu standardu od amplikonów CMV. Produkty reakcji wykrywano w procesie hybrydyzacji ze swoistymi sondami sprzężonymi z biotyną, którą wykrywano w reakcji barwnej przy użyciu przeciwciał skoniugowanych z awidyną. Wyniki odczytywano z krzywej kalibracyjnej i wyrażano jako liczbę kopii DNA CMV w ml.

Oznaczenia metodą r-t PCR zostały wykonywane w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie, dzięki uprzejmości pani prof. *Ewy Brojer* i pana dr *Piotra Grabarczyka*, zgodnie z metodą podaną przez *Machida* i wsp. (7) i procedurą wystandaryzowaną i opisaną przez *Grabarczyka* i wsp. (5). Materiałem wyjściowym do oznaczeń była surowica (200 µl), z której izolowano DNA przy użyciu QIAmp DNA Mini kit (Qiagen) i eluowano do objętości 50 µl.

WYNIKI

DNA CMV wykryto w 21 spośród 37 próbek wszystkimi trzema metodami a 2 próbki (nr 9 i 17) dały wynik zgodnie negatywny (Rycina 1). Średni poziom DNA CMV był statystycznie wyższy ($p<0,006$, test t-Studenta) w próbkach pozytywnie zgodnych, w porównaniu z próbkami dającymi wyniki rozbieżne: 4,91 *versus* 3,48 dla HC; 3.54 *versus* 0,23 dla PCR Amplicor; 4,17 *versus* 2,90 dla r-t PCR, log kopii/ml. Korelacja wyników wszystkich 3 metod ilościowego oznaczania DNA CMV była statystycznie znamienna ($r>0,52$; $p<0,001$), najlepsza dla metod PCR wykrywających materiał genetyczny wirusa w surowicy ($r=0,63$, $p<0,0001$). Dla wszystkich 3 metod poziomy DNA CMV stwierdzane w próbkach pobranych od pacjentów wykazujących objawy zakażenia CMV były znacząco wyższe ($p<0,05$; test t-Studenta) w porównaniu z uzyskiwanymi od osób bezobjawowych: 4,79 *versus* 3,58 dla HC; 3,06 *versus* 1,36 dla PCR Amplicor oraz 4,23 *versus* 2,88 dla r-t PCR, log kopii/ml (Tabela I). Opierając się na analizie poziomów wirusowego DNA w próbkach pochodzących



Rycina 1 Wyniki ilościowego oznaczania poziomu DNA CMV przy zastosowaniu różnych technik laboratoryjnych.

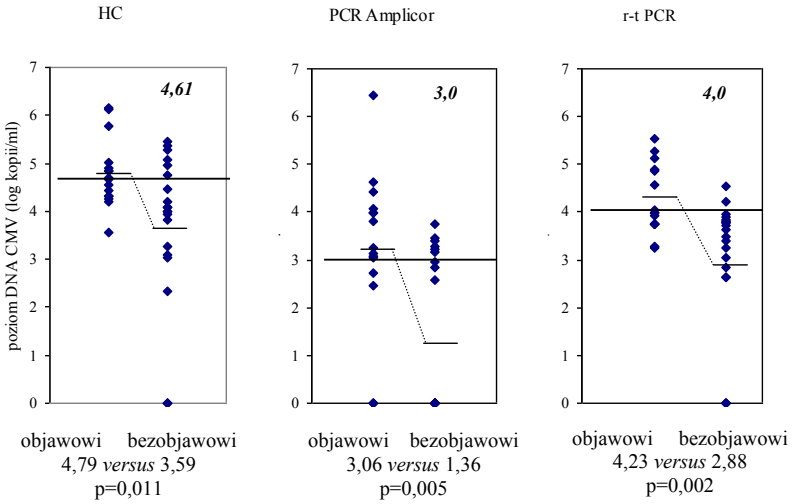
Tabela I Porównanie wyników oznaczenia poziomu DNA CMV w zależności od formy zakażenia.

Forma zakażenia		Liczba badanych próbek	Log liczby kopii DNA CMV/ml (średnia geometryczna)		
			HC	PCR Amplicor	PCR real time
Zakażenie bezobjawowe	Brak potwierdzenia laboratoryjnego	2	1,91	0,00	1,75
	Zakażenie potwierdzone laboratoryjnie (IgM i/lub pp65 i/lub sv)	19	3,76	1,51	3,00
	ogółem	21	3,58	1,36	2,88
Zakażenie objawowe		16	4,79	3,06	4,23
Ogółem		37	4,10	2,10	3,47

od pacjentów objawowych i bezobjawowych, oraz w przypadku HC i PCR Amplicor na danych piśmiennictwa [6,8,12] i wcześniejszych doświadczeniach własnych [3,13] określono poziomy DNA mierzone daną metodą laboratoryjną, związane z wystąpieniem objawowej formy zakażenia CMV (*threshold for disease*). Poziom związany z wysokim prawdopodobieństwem ($p<0,05$, test Fishera) wystąpienia objawów klinicznych zakażenia wyniósł dla zastosowanego wariantu metody r-t PCR 4 log, dla metody hybrydyzacji 4,61 a dla PCR Amplicor 3 log kopii DNA CMV/ml materiału badanego (Rycina 2).

DYSKUSJA

Ustalone poziomy odcięcia DNA CMV, związane z wysokim prawdopodobieństwem wystąpienia objawowej formy zakażenia u pacjentów po przeszczepieniu nerki różniły się



Rycina 2 Poziomy DNA CMV oznaczane metodą hybrydyzacji, PCR Amplicor oraz real-time PCR związane z wystąpieniem zakażenia objawowego u pacjentów po przeszczepieniu nerki (kursywą na wykresie oznaczono wartości odcięcia (*threshold for disease*).

w zależności od zastosowanej techniki i wyniosły: 4,61 log kopii/ml dla metody hybrydyzacji, 4 dla r-t PCR oraz 3 dla PCR-Amplicor. Odmienność technik, oprócz różnic proceduralnych, dotyczyła rodzaju badanego materiału (pełna krew *versus* surowica) oraz wyjściowej objętości badanej próbki (3,5ml pełnej krwi w hybrydyzacji *versus* 0,2ml surowicy w metodzie PCR). W rezultacie dla techniki hybrydyzacji, posiadającej z założenia niższą czułość niż metoda PCR, której istotą jest powielanie poszukiwanej sekwencji DNA, wartość poziomu odcięcia była najwyższa. Należy zwrócić przy tym uwagę, że wzajemna korelacja wyników otrzymanych tymi metodami była wysoka (regresja liniowa; p=<0,001). Wydaje się więc, że kluczowy wpływ na uzyskane rezultaty miał rodzaj materiału. Obserwacja ta jest zgodna z wynikami badań zaprezentowanych przez *Caliendo* i wsp. (1), oraz *Tonga* i wsp. (15). Pierwsze z nich (1) dotyczyły porównania, przy zastosowaniu specjalnie skonstruowanego standardu DNA CMV zawierającego wewnątrzkomórkowego wirusa, analitycznej czułości 3 komercyjnych testów, w tym stosowanych do badań prezentowanych w tej pracy, testu PCR-Amplicor i Hybrid Capture. Stwierdzono, że czułość PCR-Amplicor była jedynie o 1,5-2 log wyższa niż testu Hybrid Capture. Jednocześnie autorzy zaznaczają, że mimo porównań dokonywanych na standardzie zawierającym zakażone komórki, a więc w pewnym sensie markującym materiał kliniczny, przeprowadzone oznaczenia nie mają przełożenia na wyniki badania surowicy, pełnej krwi czy izolowanych frakcji komórkowych. Stwierdzenie to znajduje potwierdzenie w pracy opublikowanej przez *Tonga* i wsp. [15], w której oznaczenia dokonywane testem Hybrid Capture generowały wyniki o ponad log wyższe niż w przypadku użycia testu PCR-Amplicor.

Wobec coraz powszechniejszego stosowania metod opartych o technikę real-time PCR rośnie liczba prac odnoszących wyniki ilościowych oznaczeń DNA CMV uzyskanych tą metodą do wyników otrzymywanych za pomocą testów o ustalonej wartości diagnostycznej. *Razonable* i wsp. (11) donoszą, że zastosowana przez nich wersja r-t PCR generowała

wyniki o około 1 log niższe w stosunku do PCR-Amplicor. W innych pracach, podobnie jak w prezentowanej, można znaleźć dane świadczące o wyższej czułości ilościowych oznaczeń metodą PCR w wersji real time w stosunku do PCR-Amplicor (9,10), a z kolei *Wirgart* i wsp. (16) stwierdzają, że metody są równocenne dla próbek zawierających $>10^3$ kopii CMV DNA/ml. Jakkolwiek, wobec różnorodności metodyk oznaczeń techniką PCR w czasie rzeczywistym, rozbieżności w uzyskiwanych wynikach nie są czymś zaskakującym. W związku z powyższym szczególnej wagi nabiera konieczność wyznaczenia poziomów DNA wirusa, związanych z różnymi formami zakażenia. W przypadku ilościowych oznaczeń metodą hybrydyzacji (Hybrid Capture system CMV DNA test) oraz PCR (Cobas Amplicor CMV Monitor test), ustalone wartości odcięcia charakteryzujące wystąpienie objawów zakażenia CMV wśród biorców przeszczepów narządowych ($4,1x10^4$ kopii/ml i 10^3 kopii/ml badanego materiału, odpowiednio), pokrywają się z obserwacjami innych autorów (6,8,12). Przyjęta na 10^4 kopii/ml wartość cut-off dla zastosowanej w niniejszej pracy metody r-t PCR, wobec wysokiej korelacji z wynikami uzyskanymi testami komercyjnymi o ustalonej wartości klinicznej, może stanowić punkt wyjścia do szerszych obserwacji w grupie pacjentów biorców przeszczepów narządowych.

PODSUMOWANIE

1. Najwyższą czułość w porównaniu do innych metod, wykazała metoda hybrydyzacji, co prawdopodobnie było związane z rodzajem i objętością badanej próbki.
2. Poziomy odcięcia związane z wysokim prawdopodobieństwem wystąpienia objawowej formy zakażenia CMV u pacjentów po przeszczepieniu nerki określono na 4,61 log kopii DNA CMV/ml materiału badanego dla metody hybrydyzacji, 4 log dla zastosowanego wariantu metody PCR w czasie rzeczywistym oraz na 3 log dla metody PCR Amplicor.

J. Siennicka

COMPARISON OF QUANTITATIVE METHODS OF DNA CMV INVESTIGATION IN CLINICAL SAMPLES OBTAINED FROM SYMPTOMATIC AND ASYMPTOMATIC PATIENTS UNDERGO RENAL TRANSPLANTATION

SUMMARY

Cytomegalovirus infection is one of the main problem in immunocompromised patiens. Quantitative assessment of CMV load (*viral load*), rate of increase of load and determination of DNA level above which the likelihood of disease is high (*viral load threshold for disease*) have significant prognostic and therapeutic importance at transplant recipients. The aim of this work was the comparison of 3 quantitative molecular techniques and assessment the threshold for disease for each of them. The study was undertaken with 37 samples of serum and the whole from 17 renal transplant recipients. Part of samples (n=16) comes from symptomatic patients, and were taken in period of clinical symptoms demonstration. The samples ware investigated by hybridization method (HC) performed accordingly to Hybrid the Capture procedure, PCR Amplicor test (COBAS AMPLICOR CMV the Monitor test) and real time PCR (r-t PCR). In 21 out of 37 samples DNA CMV was detected by all 3 methods,

2 samples gave concordant negative results. The CMV DNA level measured by all 3 methods was significantly higher ($p<0,05$; t-Student test) in samples from symptomatic patients than from asymptomatic: 4,79 *versus* 3,58 for HC; 3,06 *versus* 1,36 for PCR-Amplicor and 4,23 *versus* 2,88 log DNA copies/ml for r-t PCR. The threshold for disease connected with high likelihood of disease ($p<0,05$; Fisher test) was established at 4 log for r-t PCR method, 4,61 for hybridization and 3 log DNA CMV copies/ml for PCR Amplicor.

PIŚMIENNICTWO

1. *Caliendo AM, Yen-Lieberman B, Baptista J* i inni. Comparison of molecular tests for detection and quantification of cell-associated cytomegalovirus DNA. J Clin Microbiol 2003; 41: 3509-13.
2. *Cope AV, Sweny P, Sabin C* i inni. Quantity of cytomegalovirus viruria is a major risk factor for cytomegalovirus disease after renal transplantation J Med Virol 1997; 52: 200-5.
3. *Durlik M, Siennicka J, Litwińska B* i inni. Clinical manifestations and diagnosis of cytomegalovirus infection in renal allograft recipients. Transplant Proc 2001; 33: 1237-9.
4. *Gor D, Sabin C, Prentice HG* i inni. Longitudinal fluctuations in cytomegalovirus load in bone marrow transplant patients: relationship between peak virus load, donor/recipient serostatus, acute GVHD and CMV disease. Bone Marrow Transplant 1998; 21: 597-605.
5. *Grabarczyk P, Brojer E, Nasiłowska B*. Ilościowe badaniae DNA CMV techniką Real-time PCR: standaryzacja metody i wstępne wyniki u chorych hematologicznych. Acta Haemat Pol 2003; 34: 447-457.
6. *Imbert-Marcille BM, Cantarovich D, Ferre-Aubineau V* i inni. Usefulness of DNA viral load quantification for cytomegalovirus disease monitoring in renal and pancreas/renal transplant recipients. Transplantation 1997; 63: 1476-81.
7. *Machida U, Kami M, Fukui T* i inni. Real-time automated PCR for early diagnosis and monitoring of cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation. J Clin Microbiol 2000; 38: 2536-42.
8. *Martin-Davila P, Fortun J, Gutierrez C* i inni. Analysis of a quantitative PCR assay for CMV infection in liver transplant recipients: an intent to find the optimal cut-off value. J Clin Virol 2005; 33: 138-44.
9. *Pang XL, Chui L, Fenton J* i inni. Comparison of LightCycler-based PCR, COBAS amplicor CMV monitor, and pp65 antigenemia assays for quantitative measurement of cytomegalovirus viral load in peripheral blood specimens from patients after solid organ transplantation. J Clin Microbiol 2003; 41: 3167-74.
10. *Piiparinen H, Hockerstedt K, Gronhagen-Riska C, Lautenschlager I*. Comparison of two quantitative CMV PCR tests, Cobas Amplicor CMV Monitor and TaqMan assay, and pp65-antigenemia assay in the determination of viral loads from peripheral blood of organ transplant patients. J Clin Virol 2004; 30: 258-66.
11. Razonable RR, Brown RA, Espy MJ, Rivero A, Kremers W, Wilson J, Groettum C, Smith TF, Paya CV. Comparative quantitation of cytomegalovirus (CMV) DNA in solid organ transplant recipients with CMV infection by using two high-throughput automated systems. J Clin Microbiol 2001; 39: 4472-6.
12. *Rollag H, Sagedal S, Kristiansen KI* i inni. Cytomegalovirus DNA concentration in plasma predicts development of cytomegalovirus disease in kidney transplant recipients. Clin Microbiol Infect 2002; 8: 431-4.
13. *Siennicka J, Rechnio M, Durlik M* i inni. Quantitative detection of CMV DNA by PCR and hybridizaton methods in renal transplant recipients. Acta Microbiol Pol 2000; 49: 261-4.

14. The challenge of CMV infection and disease in transplantation. Recomendations from the IHMF Managemenmt Strategies Workshop and 8th Annual Meeting of the IHMF. 2000. Eds. Griffiths PD, Whitley RJ.
15. *Tong CY, Cuevas LE, Williams H, Bakran A*. Comparison of two commercial methods for measurement of cytomegalovirus load in blood samples after renal transplantation. J Clin Microbiol 2000; 38: 1209-13.
16. *Wirgart BZ, Andersson P, Grillner L*. Evaluation of the ReSSQ assay in relation to the COBAS AMPLICOR CMV MONITOR test and an in-house nested PCR method for detection of cytomegalovirus DNA. J Clin Microbiol 2005; 43: 4057-63.

PODZIĘKOWANIA

Autorka pragnie podziękować pani prof. Magdalenie Durlik, dyrektorowi Instytutu Transplantologii AM w Warszawie za udostępnienie materiałów diagnostycznych od pacjentów Instytutu Transplantologii AM oraz pani prof. Ewie Brojer i panu dr Piotrowi Grabarczykowi z Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie, gdzie dokonano oznaczeń metodą PCR w czasie rzeczywistym.

Otrzymano: 23 IV 2008r.

Adres Autora: 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, Zakład Wirusologii NIZP-PZH