

*Tomasz Dzieciatkowski^{1,2}, Maciej Przybylski^{1,2}, Agata Sulowska², Maja Mucha³,
Miroslaw Łuczak^{1,2}*

WYKRYWANIE DNA WIRUSA CYTOMEGALII U PACJENTÓW
SAMODZIELNEGO PUBLICZNEGO CENTRALNEGO SZPITALA
KLINICZNEGO W WARSZAWIE W LATACH 2002-2006

¹Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Akademia Medyczna w Warszawie

Kierownik: Miroslaw Łuczak

²Zakład Mikrobiologii, Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny

Kierownik: Miroslaw Łuczak

³I Wydział Lekarski, Akademia Medyczna w Warszawie

Kierownik: Marek Krawczyk

Choroby wywoływane przez wirusa cytomegalii dotyczą głównie dzieci oraz osób z niedoborami immunologicznymi, u których przebieg infekcji jest znacznie bardziej niebezpieczny i często zagrażający życiu, dlatego też wskazane jest u nich badanie poziomu wirusowego DNA techniką PCR. Celem pracy było określenie częstości wykrywania kwasu nukleinowego HHV-5 (CMV) u pacjentów Samodzielnego Publicznego Centralnego Szpitala Klinicznego w Warszawie w latach 2002-2006 za pomocą metod biologii molekularnej.

Słowa kluczowe: HHV-5, CMV, reakcja łańcuchowej polimerazy, real-time PCR

Key words: HHV-5, CMV, polymerase chain reaction, real-time PCR

WSTĘP

Herpeswirus człowieka typu 5 (HHV-5, znany powszechnie jako CMV) zaliczany jest do podrodziny β -herpesvirinae (1). Patogen ten jest szeroko rozpowszechniony na całym świecie - u ponad 60% osób w państwach rozwiniętych stwierdza się w badaniach serologicznych obecność przeciwciał przeciwko HHV-5 w klasie IgG, a w krajach Trzeciego Świata odsetek ten wzrasta do 95% (2). Po często bezobjawowym zakażeniu pierwotnym wirus przechodzi w stan latencji w makrofagach oraz prawdopodobnie w subpopulacji CD8⁺ limfocytów T i w komórkach gruczołów wydzielania wewnętrznego (3,4). Podobnie jak pozostali członkowie rodziny *Herpesviridae*, ma on zdolność do przetrwania w organizmie gospodarza, pozostając w stanie chwiejnej równowagi z układem odpornościowym (5). U osób immu-

nokompetentnych ewentualne objawy chorobowe są słabo wyrażone i przebiegają głównie pod postacią zespołu mononukleozopodobnego, asymptomatycznej gorączki oraz bardzo rzadko powikłań neurologicznych (6). W przypadkach zaburzeń odporności wynikających z: dodatkowego zakażenia (HIV), niedojrzałości układu immunologicznego (zakażenia wrodzone i noworodki) czy immunosupresji (pacjenci po przeszczepach czy chemioterapii), zakażenia wirusem cytomegalii są zdecydowanie częstsze i o groźniejszym przebiegu (7). Nasilenie objawów klinicznych spowodowanych przez HHV-5 uzależnione jest od wielu czynników, m.in. wieku i stanu ogólnego pacjenta, wydolności układu odpornościowego czy wieku, w którym pacjent przebył zakażenie pierwotne (8). Do najczęściej obserwowanych wówczas schorzeń zaliczane jest wirusowe zapalenie płuc, zaburzenia funkcjonowania wątroby (9), a także zwiększona podatność na wtórne zakażenia bakteryjne i grzybicze (10). U pacjentów po zabiegach transplantacyjnych obserwuje się dodatkowo: zespół mielosupresyjny (9) i nasilenie choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD) (2).

Celem pracy było określenie częstości wykrywania DNA wirusa cytomegalii u pacjentów Samodzielnego Publicznego Centralnego Szpitala Klinicznego w Warszawie w latach 2002-2006 za pomocą metod biologii molekularnej.

MATERIAŁ I METODY

Badaniom poddano 2486 próbek pobranych od 604 pacjentów hospitalizowanych w SP CSK. Materiał użyty do badań w 63% stanowiła krew pełna, 29% surowica krwi, 7% płyn mózgowo-rdzeniowy, zaś 1% mocz. Materiały pochodzące od pacjentów z w Kliniki Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych pobierane były wielokrotnie od poszczególnych pacjentów w odstępach 7-10 dni w ramach rutynowego monitorowania wykonywanego po zabiegach hematologicznych. Próbkę pochodzące z innych klinik SP CSK pobierane były jednorazowo przy istniejących przesłankach klinicznych wskazujących na możliwość zakażenia HHV-5.

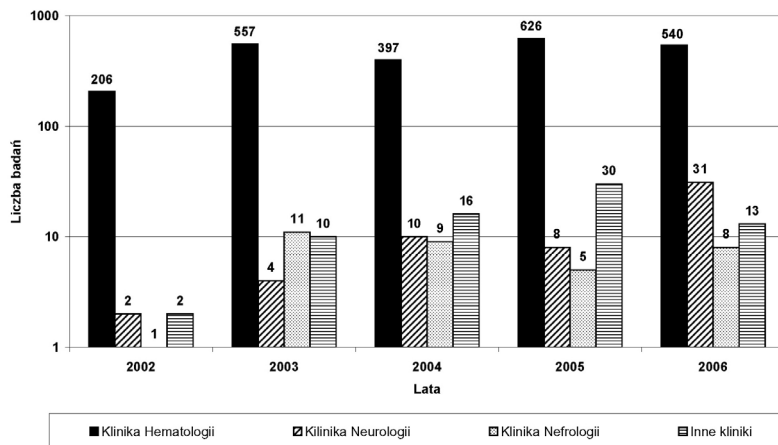
Izolacji całkowitego DNA dokonywano z 200 µl materiału klinicznego przy użyciu zestawu DNA Mini Kit (Qiagen®), zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta.

Do amplifikacji sekwencji wirusa cytomegalii zastosowano metodę PCR z użyciem specyficznych starterów powielających region MIE HHV-5 (11). Mieszanina reakcyjna o końcowej objętości 50 µl zawierała 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, po 0,3 µM każdego ze starterów, 3 mM MgCl₂, po 0,2 mM każdego dNTP, 1,25 U polimerazy Taq (Invitrogen®) oraz 10 µl wyizolowanego DNA. PCR składał się z 40 cykli: denaturacja - 2 min, przyłączanie starterów w temp. 65°C - 1,5 min i wydłużanie łańcuchów - 1 min. Amplifikacja kończyła się 10 min elongacją nici DNA (11). Kontrolę dodatnią stanowiło DNA szczepu wzorcowego HHV-5 AD169, zaś ujemną całkowite DNA wyizolowane z niezakażonej linii komórkowej HFFF-2 (fibroblasty płuca człowieka). Wizualizacji dokonywano w transiluminatorze UV po rozdziale elektroforetycznym produktów PCR w 1% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny.

W próbkach dodatnich bądź wątpliwych stosowano dodatkowo badania potwierdzenia oparte na metodach ilościowych (12). Liczbę kopii wirusa określano metodą real-time PCR na aparacie LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics®), używając komercyjnego zestawu CMV LC PCR Kit firmy Artus®. Oznaczenia prowadzono w dwukrotnych powtórzeniach dokładnie według zaleceń producenta testu.

WYNIKI

W badanym okresie zaobserwowano systematyczny wzrost liczby wykonywanych badań w kierunku wirusa cytomegalii, przy czym dominowały próbki pochodzące z Kliniki Hematologii i Onkologii, które stanowiły 93,6% wszystkich materiałów pobranych w tym kierunku (rys.1). Wysoki odsetek badań pochodzących z tej kliniki wynika z konieczności systematycznego monitorowania pacjentów poddanych chemioterapii oraz immunosupresji po przeszczepach komórek krwiotwórczych.



Ryc.1. Liczba badań w kierunku DNA cytomegalowirusa wykonana w latach 2002-2006
Fig.1 Number of HHV-5 DNA examinations in years 2002 and 2006

Podczas badań w kierunku herpeswirusa typu 5 wykonanych w latach 2002-2006 technikami biologii molekularnej obecność specyficznych sekwencji HHV-5 stwierdzono ogółem w 132 próbkach klinicznych pochodzących od 56 pacjentów. Stanowiło to zaledwie 9,3% z ogólnej liczby wykonanych oznaczeń (tab. I).

Tabela I. Procent badań i pacjentów SP SCK, u których wykryto DNA HHV-5 w latach 2002-2006

Table I. Frequency of HHV-5 positive examinations and patients from Public Independent Central Clinical Hospital in Warsaw in years 2002-2006

Rok	Liczba badań ogółem	Liczba badań dodatnich	Procent wyników dodatnich	Liczba pacjentów	Liczba pacjentów dodatnich	Procent pacjentów dodatnich
2002	211	26	13,3%	52	11	21,2%
2003	582	53	9,1%	126	18	14,3%
2004	432	14	3,2%	154	10	6,5%
2005	669	20	3,0%	112	10	8,9%
2006	592	19	3,2%	160	7	4,4%
razem	2486	132	5,3%	604	56	9,3%

Wszystkie osoby, u których wykryto obecność DNA cytomegalowirusa pochodziły z Kliniki Hematologii i Onkologii i stanowiły łącznie 11,4% jej badanych pacjentów (tab. II). DNA HHV-5 w badaniach metodami biologii molekularnej stwierdzano najczęściej w pierwszym półroczu po zabiegu transplantacji komórek krwiotwórczych (od 45 do 130 dnia), zdecydowanie rzadziej w okresie późniejszym. Wiremia na poziomie wykrywalnym technikami molekularnymi utrzymywała się najczęściej przez 3-5 tygodni.

Tabela II. Procent badań i pacjentów z Kliniki Hematologii, u których wykryto DNA HHV-5 w latach 2002-2006

Table II. Frequency of HHV-5 positive examinations and patients from Department of Hematology, Oncology and Internal Medicine in years 2002-2006

Rok	Liczba badań z Kliniki Hematologii	Liczba badań dodatnich z Kliniki Hematologii	Procent badań dodatnich z Kliniki Hematologii	Liczba pacjentów z Kliniki Hematologii	Liczba pacjentów dodatnich z Kliniki Hematologii	Procent pacjentów dodatnich z Kliniki Hematologii
2002	206	26	12,6%	47	11	20,4%
2003	557	53	9,5%	101	18	17,8%
2004	397	14	3,5%	124	10	8,1%
2005	626	20	3,2%	99	10	10,1%
2006	540	19	3,5%	122	7	5,7%
razem	2326	132	5,7%	493	56	11,4%

Badany ilościowo za pomocą metody real-time PCR poziom wiremii u większości osób wyniósł zazwyczaj ok. 1200-1700 kopii/ml krwi (12), choć sporadycznie (u 8 badanych) osiągał wartości powyżej 10 000 kopii/ml krwi. Aktywne zakażenie wirusem cytomegalii przebiegało często bez wyraźnie zaznaczonych objawów klinicznych. Pełnoobjawową chorobę cytomegalowirusową rozpoznawaną według zaleceń Ljungmana (13) stwierdzono tylko u pięciu osób po allogenicznym przeszczepie komórek krwiotwórczych. Obserwowano u nich wówczas zapalenie płuc o prawdopodobnej etiologii HHV-5 oraz dodatkowo zaostrenie choroby przeszczep przeciw gospodarzowi (GvHD).

Sporadycznie u pacjentów w okresie wykrywalnego poziomu DNA HHV-5 stwierdzano jednocześnie w badaniu PCR sekwencje charakterystyczne dla innych herpesvirusów - głównie wirusa Epsteina-Barr (3 osoby) oraz ludzkiego herpeswirusa typu 6 (1 osoba).

DYSKUSJA

Molekularna diagnostyka zakażeń HHV-5 odgrywa obecnie ważną rolę nie tylko w wykrywaniu pacjentów z grup wysokiego zagrożenia chorobą cytomegalowirusową, ale również w ustalaniu standardów i prowadzeniu racjonalnej terapii antywirusowej. Zakażenia HHV-5 pozostają bowiem jedną z głównych przyczyn zgonów u pacjentów z immunosupresją (14). U chorych hematologicznych i onkologicznych ich częstość waha się od 10 do 80% (14). Zaobserwowana wśród pacjentów Kliniki Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych Akademii Medycznej w Warszawie częstotliwość wykrywania wirusowego DNA, wynosząca 11,4%, należy więc do wyjątkowo niskich (tab. II). Zaskakujący jest natomiast brak

wyników świadczących o zakażeniach wirusem cytomegalii u pacjentów z zaburzeniami neurologicznymi, zarówno w płynie mózgowo-rdzeniowym, jak i w surowicy krwi. Może to świadczyć o występowaniu u osób dorosłych neuroinfekcji o innej etiologii niż HHV-5, a przebiegających z podobnymi objawami klinicznymi.

Obserwowany stały spadek liczby wyników dodatnich oraz liczby pacjentów, u których wykrywano DNA HHV-5 można prawdopodobnie tłumaczyć precyzyjnym doborem w zakresie antygenów HLA par dawca-biorca (co umożliwiła zmniejszenie stosowanej terapii immunosupresyjnej ułatwiającej reaktywację wirusa) oraz wprowadzeniem najnowszych metod profilaktyki poprzyszczepowej. Ograniczenie czasu trwania wirerii, a więc liczby wyników dodatnich, może być również wynikiem użycia w diagnostyce ultraczułych metod biologii molekularnej. Stosowana obecnie rutynowo w SP CSK technika real-time PCR, gwarantuje wykrycie materiału genetycznego wirusów przy niezwykle niskim poziomie wirerii (12, 15), wynoszącym około kilkadziesiąt kopii/ml krwi. Poziom wirerii w większości zdiagnozowanych przypadków zakażeń HHV-5 zaliczał się do grupy niskich (12) oraz średnich i rzadko przekraczał 10000 kopii/ml, co umożliwiało wczesne zastosowanie odpowiedniego leczenia przeciwwirusowego i ograniczenie czasu trwania choroby do 2-3 tygodni. Jest to zgodne z obserwacjami innych autorów, gdzie opisywana skuteczność chemioterapii zależała w dużej mierze od poziomu wirusa we krwi (8, 16) i spadała wraz z upływem czasu od początku zakażenia (16). Stosowana rutynowo terapia gancyklowirem, prócz swego działania mielotoksycznego, coraz częściej nie przynosi pożądanych rezultatów ze względu na rosnący odsetek szczepów HHV-5 opornych na ten lek (17), jednak nadal jest terapią z wyboru w tzw. leczeniu wyprzedzającym (*pre-emptive strategy*). Lekiem równoważnym w leczeniu pacjentów z reaktywacją zakażenia HHV-5 jest foscarnet, który choć powoduje wolniejsze narastanie oporności i ma niższą mielotoksyczność, niesie za sobą zwiększone ryzyko nefrotoksyczności (17). Istotne jest więc jak najszybsze ograniczenie podawanych dawek w miarę spadku liczby wykrywanych kopii wirusa.

WNIOSKI

1. Częstotliwość wykrywania DNA wirusa cytomegalii u pacjentów Kliniki Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych Akademii Medycznej w Warszawie należy do niskich, w porównaniu z analogicznymi danymi światowymi.
2. W latach 2002-2006 nie stwierdzano metodami biologii molekularnej obecności DNA HHV-5 u pacjentów SP CSK z zaburzeniami neurologicznymi, co może świadczyć o częstym występowaniu u osób dorosłych neuroinfekcji o innej etiologii.
3. Technika real-time PCR jest niezwykle przydatna do wykrywania i monitorowania zakażeń wirusem cytomegalii o niskim poziomie wirerii.

T Dzieciatkowski, M Przybylski, A Sulowska, M Mucha, M Łuczak

FREQUENCY OF IDENTIFICATION OF CYTOMEGALOVIRUS DNA IN PATIENT OF
PUBLIC INDEPENDENT CENTRAL HOSPITAL IN WARSAW IN YEARS 2002-2006

SUMMARY

Objective: The present study shows frequency of presence of cytomegalovirus DNA in patients of Public Independent Central Clinical Hospital in Warsaw in years 2002-2006.

Materials and Methods: 2486 clinical samples taken from 604 patients in years 2002-2006 were tested for the presence of HHV-5 DNA using the qualitative in-house PCR method and quantitative real-time PCR assay.

Results: Positive results were obtained in 5,3% of all examinations made during described period. All of positive samples came from Department of Hematology, Oncology and Internal Medicine patients - most of them was after stem cell transplantation.

Conclusions: These findings underline the value of PCR methods used in current diagnostics procedures. The high level of sensitivity and rapidity provided by this assays is favorable for the use in the detection of HHV-5 DNA in clinical specimens.

PIŚMIENNICTWO

1. Minson AC, Davison A, Eberle R, i in. Herpesviruses. W: van Regenmortel MHV, Faquet CM, Bishop DHL i in., red. Virus taxonomy - classification and nomenclature of viruses. Seventh report of ICTV. San Diego: Academic Press;2000:203-25.
2. Griffiths PD, Clark DA, Emery VC. Betaherpesviruses in transplant recipients. *J Microb Chem* 2000;45:29-34
3. Roizman B, Desrosiers RC, Fleckenstein B, i in. The Family Herpesviridae: an update. *Arch Vir* 1992;123(3-4):425-49.
4. Sinclair J, Sissons P. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 2006;87(7):1763-79.
5. Soderberg-Naucler C. Human cytomegalovirus persists in its host and attacks and avoids elimination by the immune system. *Crit Rev Immunol* 2006;26(3):231-64.
6. Taylor GH. Cytomegalovirus. *Am Fam Physician* 2003;67(3):519-24.
7. Steininger C, Puchhammer-Stockl E, Popow-Kraupp T. Cytomegalovirus disease in the era of highly active antiretroviral therapy (HAART). *J Clin Virol* 2006;37(1):1-9.
8. Griffiths PD, Walter S. Cytomegalovirus. *Curr Opin Infect Dis* 2005;18(3):241-5.
9. Torok-Storb B, Boeckh M, Hoy C, i in. Association of specific cytomegalovirus genotypes with death from myelosuppression after marrow transplantation. *Blood* 1997;90 (5):2097-102.
10. George MJ, Snyderman DR, Werner BG, i in. The independent role of cytomegalovirus as a risk factor for invasive fungal disease in orthotopic liver transplant recipients. *Am J Med* 1997;103(2):106-13.
11. Demmler GJ, Buffone GJ, Schimbor CM, i in. Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification. *J Infect Dis* 1988;185(6):1177-84.
12. Dzieciatkowski T, Przybylski M, Tomaszewska A, i in. Comparison of two methods used for monitoring low-copy cytomegalovirus infection in a patient with chronic myeloid leukemia after unrelated umbilical cord blood transplantation. *Arch Immunol Ther Exp* 2007;55(3):199-203.
13. Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002; 34:1094-97.

14. Hebart H, Jahn G, Sinzger Ch, i in. CMV Infection in Bone Marrow and Solid Organ Transplant Patients in the Era of Antiviral Prophylaxis. *Herpes* 2000;7(1):13-7.
15. Schaade L, Knockelkorn P, Ritter K, i in. Detection of Cytomegalovirus DNA in Human Specimens by LightCycler PCR. *J Clin Microb* 2000;38(11):4006-09.
16. Emery VC. Investigation of CMV disease in immunocompromised patients. *J Clin Pathol* 2001; 54(2):84-8.
17. Reusser P, Einsele H, Lee J, i in. Randomized multicenter trial of foscarnet versus ganciclovir for preemptive therapy of cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2002;99(4):1159-64.

Otrzymano: 9.08.2007 r.

Adres autorów do korespondencji:

dr n. wet. Tomasz Dzieciatkowski
Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej
Akademia Medyczna w Warszawie
ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa
tel/fax: 022 599 17 78
e-mail: dzieciatkowski@wp.pl