

Comparison of quantitative HCMV DNAemia in whole blood and leukocytes, and Real-Time PCR in a BMT patient

Elio De Nisco¹, Pia Carmen Melillo¹, Gabriella Storti², Maria Landi¹, Raffaele Ariola¹, Franca Romeo¹, Anna Todisco¹

1 Unità Operativa Complessa di Virologia, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, "S.G. Moscati", Avellino
2 Ematologia con Unità di Trapianto, Dipartimento di Oncoematologia, AORN "S.G. Moscati", Avellino

Key words: HCMV, DNAemia, Real-Time PCR, BMT

Confronto tra DNAemia quantitativa di HCMV in sangue intero e leucociti con metodica PCR Real-Time in una paziente BMT

SUMMARY

Background. HCMV is the most opportunistic viral agent in the transplantation of bone marrow and solid organ. Early therapy based on the detection of HCMV pp65 antigen in peripheral blood leukocytes, has led to a significant reduction in the incidence of related HCMV diseases. The pp65 antigenemia is difficult to standardize, while the quantification of HCMV DNA by Real-Time PCR is an alternative diagnostic approach with greater sensitivity and reproducibility, providing important information in the management of infected patients.

Objectives. The aim of this study was the comparative analysis of quantitative HCMV DNAemia in leukocytes and in whole blood, with Real-time PCR, in a BMT patient with HCMV *post*-transplant reactivation, in order to analyze the relationship between levels of viral DNA at different time-points obtained in the two biological matrices.

Study Design. The presence of HCMV DNA was detected in whole blood and peripheral blood leukocytes in a patient who underwent allogeneic marrow transplant for Ph1 + acute lymphoblastic leukemia in molecular remission. After 5-6 months, the patient has increased molecular Bcr-Abl (Philadelphia chromosome). It was activated immune reaction by means of tapering (lowering the dose of cyclosporine) that uses the GvL effect to turn negative the Philadelphia chromosome positivity (Bcr/Abl negativity). Later, the patient develops GvHD and cortisone is administered. The persistence of grafts treated with immunosuppressants periodically reactivates HCMV infection. The DNA extraction from whole-blood was performed by automatic extractor QIACUBE (Qiagen), while extraction from leukocytes was performed on a standard number of leukocytes (EXTRAcell-Nanogen). The extracted DNA was amplified by Real-Time Alert Q-PCR (Nanogen). The samples were analyzed weekly for about 5 months from 1 year after transplantation.

Results. The patient at 1 year after transplantation, has three HCMV reactivation at 56th, 62th and 67th week. In all reactivations a good overlap values of viraemia in both whole blood leukocytes is shown.

Conclusions. Our data confirm that the whole blood is a biological matrix with diagnostic similar performance not only to pp65 antigenaemia, as supported by extensive scientific literature, but also to the DNAemia in leukocytes that has been for a long time considered the elective matrix for evaluating the post-transplant HCMV infection, for pre-emptive therapy particularly in BMT patients.

INTRODUZIONE

Il 40-80% degli individui nei paesi industrializzati e la quasi totalità degli individui nei paesi in via di sviluppo vanno incontro ad infezione da Citomegalovirus umano (HCMV) che, nei soggetti con buone funzioni immunitarie, decorre, di norma, in modo asintomatico. L'infezione da HCMV, al contrario, è un'importante causa di morbilità e mortalità nei pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCTR) e di organo solido (SOD) (6, 7, 16). Il

Citomegalovirus è associato alle cellule e i leucociti polimorfonucleati (PMNLs) risultavano essere il compartimento più appropriato per la sua quantificazione. La terapia preventiva basata sulla rilevazione dell'antigene pp65 di HCMV su leucociti da sangue periferico ha condotto ad una significativa riduzione dell'incidenza di patologie HCMV correlate nella popolazione immunodepressa (3). Tale procedura diagnostica, però, presenta delle limitazioni dovute alla laboriosità della tecnica stessa, al tempo ristretto di processazione

Corresponding author: Anna Todisco

U.O.C. Virologia, A.O.R.N. "S.G. Moscati"

Contrada Amoretta, 83100 - Avellino - Tel./Fax: 0825 203659

E-mail: antodisco@aosgmoscati.av.it

del campione e alla lettura soggettiva dei vetrini. Queste restrizioni vengono superate con l'introduzione dei saggi molecolari; la quantificazione del DNA di HCMV mediante PCR è vista come un approccio diagnostico alternativo, con sensibilità e riproducibilità maggiori, semi-automatizzato e di più facile standardizzazione (8, 9).

Numerosi studi hanno comparato la viremia, mediante PCR, nei leucociti da sangue periferico (PBL) e nel plasma; HCMV è stato rilevato più frequentemente nei PBL e la carica virale era significativamente più alta che nel plasma (4, 5, 18). Più recentemente, la Real-Time PCR ha permesso lo studio delle cinetiche di HCMV ed è stata utilizzata per misurare la DNAemia in vari compartimenti sanguigni di pazienti immunocompromessi, i risultati sono stati anche confrontati con l'antigenemia pp65 (10, 11).

Raffrontato con l'antigenemia pp65, il sangue intero (WB) risulta essere la matrice di elezione per la quantificazione di HCMV DNAemia, poiché permette la quantificazione della carica virale sia nelle cellule che nel comparto extra-cellulare (1, 2, 15, 19).

Scopo del presente studio è stato l'analisi comparativa tra HCMV DNAemia quantitativa da sangue intero (dopo estrazione automatizzata) e HCMV DNAemia da leucociti (dopo estrazione manuale), con metodica Real-Time PCR, nel *follow-up* di una paziente sottoposta a trapianto di midollo osseo (BMT) con riattivazione *post-trapianto* dell'infezione, per analizzare il rapporto tra livelli di DNA virale, ottenuti dalle due matrici biologiche, a diversi *time-points*.

MATERIALI E METODI

La presenza del HCMV DNA è stata ricercata nel sangue intero e nei leucociti di sangue periferico in una paziente sottoposta a trapianto allogenico di midollo per leucemia acuta linfoblastica Ph1+ in remissione molecolare. Dopo 5-6 mesi la paziente presenta incremento del gene di fusione Bcr-Abl, valutato mediante PCR quantitativa, e del cromosoma Philadelphia, rilevato attraverso analisi di citogenetica. Viene attivata una reazione immune mediante tapering delle ciclosporine, per sfruttare l'effetto *graft versus leukemia* (GvL) che negativizza la positività al cromosoma Philadelphia e, successivamente, il trascritto di fusione Bcr-Abl. Nel frattempo la paziente sviluppa una *Graft-versus-host disease* (GvHD) di grado III contro cute, fegato ed intestino e le viene somministrato cortisone; la persistenza della *graft* trattata con immunosoppressori riattiva periodicamente l'infezione da HCMV.

L'estrazione del DNA su sangue intero è stata effettuata mediante estrattore automatico

QIAcube e utilizzo di QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany); questo sistema semi-automatico ha permesso di evitare contaminazioni e di maneggiare in modo sicuro campioni potenzialmente infetti.

L'estrazione del DNA cellulare, invece, è stata eseguita su 500000 leucociti derivanti da sangue periferico (EXTRAcELLR - Nanogen Advanced Diagnostics, Torino, Italy), apportando delle modifiche al protocollo di estrazione. Di fatto, nel pretrattamento del campione abbiamo notato la perdita di parte della quota di cellule utile al saggio (500000 leucociti prelevati sulla base del valore dell'emocromo del campione in esame); per questo, è stata introdotta la conta leucocitaria in camera di Burkner, al fine di eseguire correttamente i calcoli finali per il dosaggio del titolo di HCMV DNA e standardizzare ulteriormente il campione di partenza (risultati espressi in copie/100000 cellule, seguendo le indicazioni del manuale di istruzioni).

RISULTATI

La paziente, ad 1 anno dal trapianto, tra la 53° e la 55° settimana presenta una viremia su matrice leucocitaria con valori costanti (circa 500 copie/1x10⁵ cellule) e una viremia su sangue intero di 13778 copie/mL, con un lieve incremento in 54° settimana (19168 copie/mL); nel periodo successivo (56° settimana) si evidenzia un picco di riattivazione virale (DNAemia sangue intero: 74617 copie/mL; DNAemia leucociti: 1360 copie/1x10⁵ cellule; Tabella 1). In seguito a trattamento antivirale massivo la paziente riduce drasticamente la viremia fino a negativizzarsi nel comparto leucocitario ma mantenendo una viremia residua su sangue intero (58° settimana: 583 copie/mL, 59° settimana: 94 copie/mL). In 60°-61° settimana si manifesta un graduale incremento della DNAemia, che evolve in un secondo picco di riattivazione virale (62° settimana) di entità più modesta rispetto al primo, in cui si evince un andamento comune dei valori di viremia in entrambe le matrici biologiche (21168 copie/mL e 500 copie/1x10⁵ cellule; Tabella 1); un successivo trattamento antivirale negativizza la viremia nei due comparti biologici (63° settimana). Tra la 63° e la 65° settimana si rileva l'assenza del DNA virale nei leucociti associata ad un graduale incremento della viremia su sangue intero (64° settimana: 26 copie/mL; 65° settimana: 589 copie/mL), evidenziando una terza ripresa della fase replicativa virale, che risulterà visibile nel comparto leucocitario soltanto due settimane dopo (66° settimana: 136 copie/1x10⁵ cellule). Quest'ultima riattivazione evolve in un terzo picco (67° settimana; DNAemia sangue intero: 15334 copie/mL,

DNAemia leucociti 1060 copie/1x10⁵ cellule; Tabella 1), che si negativizza le settimane successive (68°-72° settimana).

DISCUSSIONE

L'alta mortalità associata a malattia HCMV correlata nei trapianti, ha evidenziato che la migliore strategia di controllo dell'infezione risulta essere la prevenzione; gli approcci di prevenzione sono fondamentalmente due: profilassi antivirale e terapia precoce. Entrambi gli approcci evidenziano una riduzione dell'incidenza e della severità della malattia HCMV correlata, anche se il più corretto risulta essere la terapia precoce. Infatti, la profilassi antivirale basata su somministrazione di ganciclovir (GCV) e altri farmaci antivirali espone i pazienti ad effetti tossici causati dalla prolungata esposizione a queste molecole; in particolare il GCV contribuisce ad aumentare la neutropenia rendendo suscettibili questi pazienti, già immunocompromessi, ad infezioni fungine e batteriche importanti, nonché alla generazione di ceppi HCMV resistenti (20). La terapia *pre-emptive*, al contrario, consiste nella somministrazione di farmaci antivirali soltanto quando la carica virale nel

sangue supera un valore soglia indicativo di progressione a malattia HCMV correlata (10000 copie/ml da sangue intero in pazienti BMT) (7, 13, 14); di conseguenza, la terapia precoce richiede un monitoraggio costante della carica virale nel tempo, per risultare efficiente strumento di prevenzione (12, 17).

Come supportato da ampia letteratura scientifica, il sangue intero è una matrice biologica con performance diagnostica sovrapponibile all'antigenemia pp65; i nostri dati evidenziano un andamento correlabile anche tra DNAemia su sangue intero e DNAemia su matrice leucocitaria (Figura I).

Dai risultati ottenuti emerge, tuttavia, che il DNA di HCMV tende a evidenziarsi nel sangue intero dei pazienti trapiantati prima che nei leucociti (64°-65° settimana), il che dimostra una maggiore sensibilità di tale matrice biologica nel rilevare precocemente l'infezione da HCMV (7); per di più appare chiaro che una procedura automatizzata, come l'estrazione del DNA da sangue intero, risulti di più facile standardizzazione rispetto a una procedura manuale, come quella descritta per l'estrazione da leucociti, che risulta essere più laboriosa.

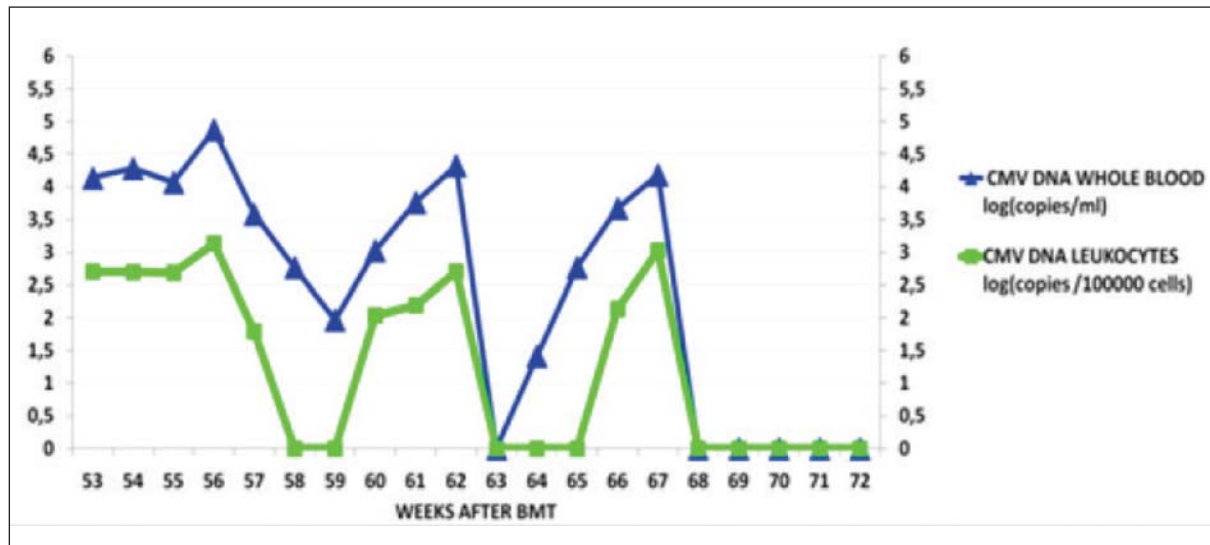


Figura I. Correlazione tra HCMV DNA in sangue intero e in leucociti da sangue periferico.

Tabella I. Monitoraggio della HCMV DNAemia in sangue intero e in leucociti da sangue periferico

Settimane dopo BMT	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
DNAemia in Sangue intero (copies/mL)	13778	19168	11667	74617	3833	583	94	1055	5834	21168	0	26	589	4645	15334	0	0	0	0	0
DNAemia in Leucociti (copies/1x10 ⁵ cellule)	500	496	484	1360	63	0	0	108	156	500	0	0	0	136	1060	0	0	0	0	0

BIBLIOGRAFIA

1. Alice T, Cerutti F, Pittaluga F, et al. Evaluation of a novel real-time PCR system for cytomegalovirus DNA quantitation on whole blood and correlation with pp65-antigen test in guiding pre-emptive antiviral treatment. *J Virol Methods* 2008; 148: 9-16.
2. Alice T, Enrietto M, Pittaluga F, et al. Quantitation of cytomegalovirus DNA by real-time polymerase chain reaction in peripheral blood specimens of patients with solid organ transplants: comparison with end-point PCR and pp65 antigen test. *J Med Virol* 2006; 78: 915-22.
3. Boeckh M, Boivin G. Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 533-54.
4. Boivin G, Handfield J, Toma E, et al. Comparative evaluation of the cytomegalovirus DNA load in polymorphonuclear leukocytes and plasma of human immunodeficiency virus-infected subjects. *J Infect Dis* 1998; 177: 355-60.
5. Freymuth F, Gennetay E, Petitjean J, et al. Comparison of nested PCR for detection of DNA in plasma with pp65 leukocytic antigenemia procedure for diagnosis of human cytomegalovirus infection. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1614-8.
6. Gerna G, Lilleri D, Caldera D, et al. Validation of a DNAemia cutoff for preemptive therapy of cytomegalovirus infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41: 873-9.
7. Gerna G. Management of human cytomegalovirus infection in Hematopoietic stem cell transplant recipients: guidelines of the "societa' italiana di virologia-siv". 15 giugno 2009, http://www.siv-virologia.it/files/linee_guida/Management%20of%20HCMV%20HSCT%20SIV.pdf.
8. Halwachs-Baumann G, Wilders-Truschnig M, Enzinger G, et al. Cytomegalovirus diagnosis in renal and bone marrow transplant recipients: the impact of molecular assays. *J Clin Virol* 2001; 20: 49-57.
9. Humar A, Gregson D, Caliendo AM, et al. Clinical utility of quantitative cytomegalovirus viral load determination for predicting cytomegalovirus disease in liver transplant recipients. *Transplantation* 1999; 68: 1305-11.
10. Lazzarotto T, Gabrielli L, Varani S, Landini MP. Comparison of the pp65 antigenemia assay and the COBAS AMPLICOR CMV MONITOR TEST for the detection of the Cytomegalovirus viremia in transplant recipients. *8th International Cytomegalovirus conference. Asilomar Conference Grounds, Monterey, CA. 2001.*
11. Lazzarotto T, Gabrielli L, Varani S, et al. Diagnosi *in vitro* di infezione da Citomegalovirus nel paziente trapiantato: antigenemia e PCR quantitativa. *EsaDia* 2000; novembre 10-5.
12. Lazzarotto T, Sassi M, Gabrielli L, et al. Real-Time PCR assay and antigenemia assay: optimal threshold for guiding preemptive therapy in transplant recipients. *2nd European Congress of Virology, Madrid, September 2004.*
13. Lilleri D, Gerna G, Furione M, et al. Use of a DNAemia cut-off for monitoring human cytomegalovirus infection reduces the number of preemptively treated children and young adults receiving hematopoietic stem-cell transplantation compared with qualitative pp65 antigenemia. *Blood* 2007; 110: 2757-60.
14. Lilleri D, Lazzarotto T, Ghisetti V, et al. SIV-AMCLI Transplant Surveillance Group. Multicenter quality control study for human cytomegalovirus DNAemia quantification. *New Microbiol* 2009; 32:245-53.
15. Mengelle C, Sandres-Sauné K, Pasquier C, et al. Automated extraction and quantification of human cytomegalovirus DNA in whole blood by real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3840-5.
16. Paya CV. Prevention of cytomegalovirus disease in recipients of solid-organ transplants. *Clin Infect Dis* 2001; 32:596-603.
17. Petrisli E, Chiereghin A, Gabrielli L, et al. Early and late virological monitoring of cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, and human herpes virus 6 infections in small bowel/multivisceral transplant recipients. *Transplant Proc* 2010; 42: 74-8.
18. Piiparinen H, Höckerstedt K, Grönhagen-Riska C, et al. Comparison of plasma polymerase chain reaction and pp65-antigenemia assay in the quantification of cytomegalovirus in liver and kidney transplant patients. *J Clin Virol* 2001; 22: 111-6.
19. Razonable RR, Brown RA, Wilson J, et al. The clinical use of various blood compartments for cytomegalovirus (CMV) DNA quantitation in transplant recipients with CMV disease. *Transplantation* 2002; 73: 968-73.
20. Salzberger B, Bowden RA, Hackman RC, et al. Neutropenia in allogeneic marrow transplant recipients receiving ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease: risk factors and outcome. *Blood* 1997; 90: 2502-8.