

Quantifizierung von Cytomegalievirus (CMV)-DNA in Darmbiopsien mittels PCR zur Diagnostik der gastrointestinalen CMV-Erkrankung

Dr. med. Tina Ganzenmüller

Institut für Virologie



Hannover Medical School

Humanes Cytomegalievirus (CMV)

- behülltes DNA-Virus (Herpesviridae)
- Hohe Durchseuchung (bis 100%)
- Latenz als persistierende Infektion in verschiedenen Zelltypen (Epithel, Endothel, Monozyten/Makrophagen etc.)
- Übertragung:
 - über die Plazenta
 - Schmierinfektion
 - Transfusion/Transplantation

CMV-Erkrankung (*CMV disease*)

- CMV bedeutender Erreger v.a. beim Immunkompromittierten
- schwere Komplikationen in nahezu allen Organsystemen möglich
- Häufiger Manifestationsort ist u. a. der Gastrointestinal(GI)-Trakt

Gastrointestinale CMV Erkrankung

- erosiver/ ulzerativer Prozess
- kann an jeder Stelle auftreten
- **CMV-Enterokolitis** am häufigsten beobachtet⁽¹⁾

(1) Goodgame et al

Risikopatienten

- Allogen Stammzelltransplantierte (zweithäufigste CMV Endorganmanifestation)
- Organtransplantierte
- HIV/AIDS-Patienten
- Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung
- Patienten mit Immundefekten, Malignomen oder ältere Patienten etc.

(2) Schulenburg et al; (3) Baroco et al; (4) van Burik et al.

Diagnose der gastrointestinalen CMV-Erkrankung

- Klinische Symptome,
- makroskopische Endoskopie-Befunde,
- und Nachweis von CMV in Biopsien mittels Histologie (morphologische Untersuchung, Immunohistochemie etc.)

- CMV-Enterokolitis-Fälle bleiben z.T. undiagnostiziert/Abgrenzung zu ähnlichen Krankheitsbildern (z.B. GvHD) schwierig
- qualitative PCR **nicht** für CMV-Nachweis im Gewebe empfohlen, da positiver Vorhersagewert gering

Ziel dieser Studie

Quantifizierung von CMV-DNA mittels PCR in Darmbiopsien käme als zusätzliches Diagnostikum für in Frage.

Bislang kaum Daten zur Interpretation und diagnostischem Nutzen dieser Methode.

Retrospektive Studie

163 Biopsien aus dem unteren GI-Trakt, die zum Ausschluss einer CMV-Enterokolitis zur CMV-PCR eingeschendet wurden.

- Bestimmung der CMV Kopienzahl in den Biopsien **pro Zelle**:
Real-time PCRs auf CMV und das CRP-Gen (um die Zellzahl zu bestimmen und zu normalisieren)
→ Berechnung von "CMV Kopien/Zelle"
- Retrospektive Analyse von:
 - a) Histopathologischem Befund**
Morphologische Untersuchung/immunhistochemische Färbung
 - a) klinischer Diagnose**
 - b) CMV-Antigenämie (pp65-Antigen-Assay)**

Patienten

Characteristic	Number of patients n= 163 (%)
Age in years ^a	46 (1-80)
Sex, male	101 (62.0)
<u>Underlying disease</u>	
Stem cell transplantation (SCT)	64 (39.3)
Solid organ transplanation (SOT) ^b	41 (25.2)
HIV Infection	13 (8.0)
Inflammatory Bowel Disease (IBD)	23 (14.1)
Other diagnosis ^c	22 (13.5)

a Median (range)

b 15 kidney, 20 liver-, 6 other transplantations

c Others included: immunodefects, non-transplant malignancies or rheumatic disorders

Prävalenz von CMV-DNA in den Darmbiopsien

Nachweis von CMV-DNA, n (%)	Negativ	Positiv
	110/163 (67.5%)	53/163 (32.5%)

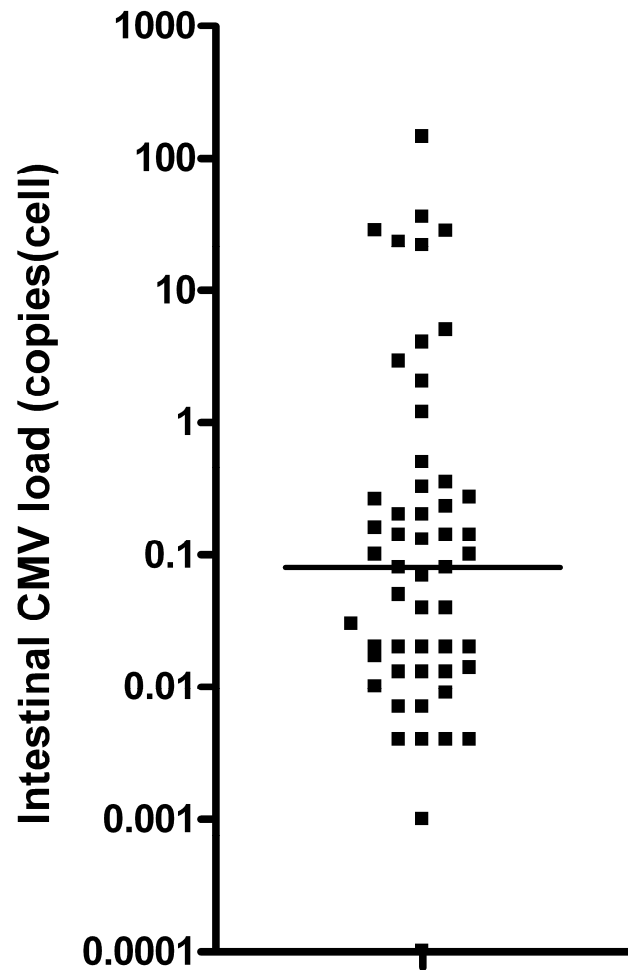
Keine der CMV-PCR negativen Proben hatte ein positives histopathologisches Ergebnis

→ **hoher negativer Vorhersagewert**

Nur 12/53 der CMV-PCR positiven Proben hatten ein histopathologisch positive Ergebnis

→ **niedriger positiver Vorhersagewert der qualitativen PCR!!**

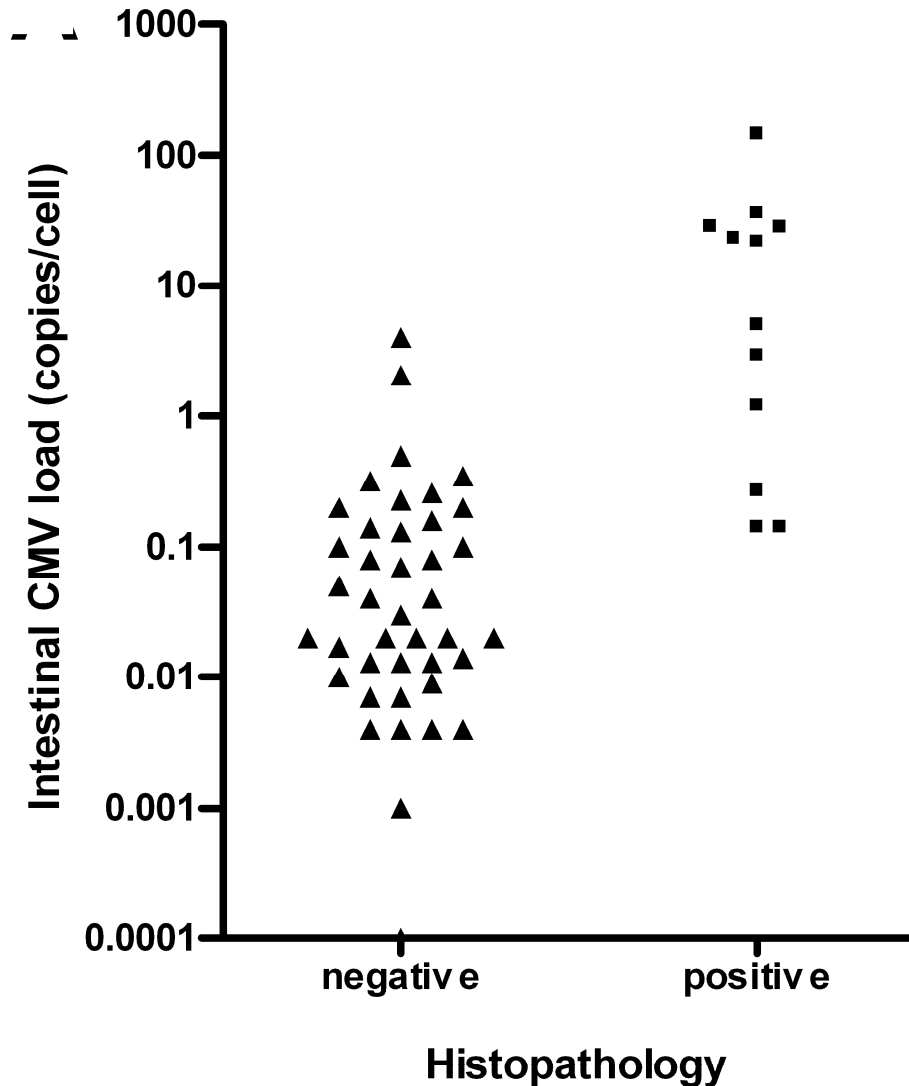
Quantifizierung der CMV-Last in Darmbiopsie



Mediane CMV Last =
 8×10^{-2} (1×10^{-4} – 1.4×10^2) copies/cell

→ **weite Spanne der intestinalen
CMV-last (> 6 Logstufen)**

Signifikant* höhere CMV-Last in histopathologisch positiven Darmbiopsien



→ quantitative PCR sollte benutzt werden

→ Möglichkeit einen cut-off zu definieren

* $p < 0.001$

Definition eines Schwellenwerts für die intestinale CMV-Last mit der Histologie als gold standard ($\text{cut-off}_{\text{histo}}$)

Cut-off (CMV-copies/cell)	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
qualitative PCR	1.0	0.73	0.23	1.0
Cut-off_{histo}: 0.14	1.0	0.93	0.52	1.0

PPV: Positiver Vorhersagewert; NPV: Negativer Vorhersagewert;
Cut-off_{histo}: Schwellenwert angepasst an die histologischen Ergebnisse

- Werte oberhalb des Cut-offs sagen eine histopathologisch bestätigte CMV-Enterokolitis besser voraus als die qualitative PCR
- Aber: CMV häufiger mittels PCR detektiert als histologisch bestätigt (n=12/53)

→ **Histopathologie als idealer/empfindlicher Gold-Standard?**

Klinische Kriterien zur Einteilung des Patientenkollektivs in CMV-Enterokolitis-Fälle und Fälle anderer Ätiologie*

„CMV-Enterokolitis“ :

- Verdächtiger Endoskopie-Befund
- Besserung durch antivirale Behandlung

n=26/163

Kontrollgruppe: „Non CMV-Ätiologie“ der Kolitis:

- akute Episoden einer CED oder GvHD
- Bakterielle Infekte etc.

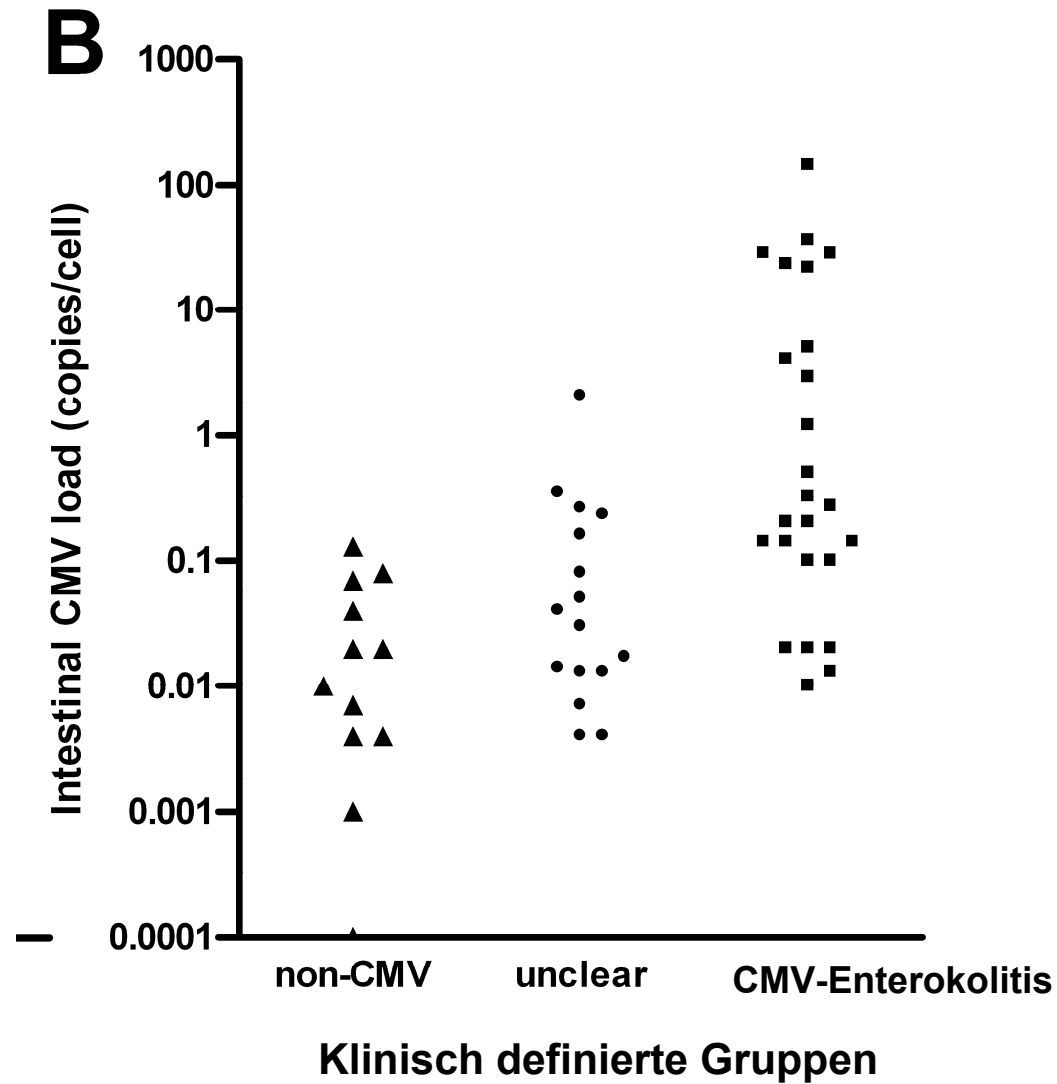
n=82/163

- Alle Biopsien der Kontrollgruppe histopathologisch negativ
- 12/26 der klinisch definierten CMV-Enterokolitis-Fällen waren histopathologisch positiv

→ Mittels klinischer Kriterien konnten 14 zusätzliche Fälle definiert werden, die histologisch negativ waren

Bei 47 Patienten war die Ätiologie nicht eindeutig klärbar („unclear“) bzw. es waren keine klinischen Daten verfügbar (n=8)

Signifikant höhere intestinale CMV-Last bei Patienten mit klinisch definierter CMV-Enterokolitis



Definition „klinischer“ Schwellenwert für die intestinale CMV-Last (cut-off_{clin}) im klinisch klassifizierten Kollektiv

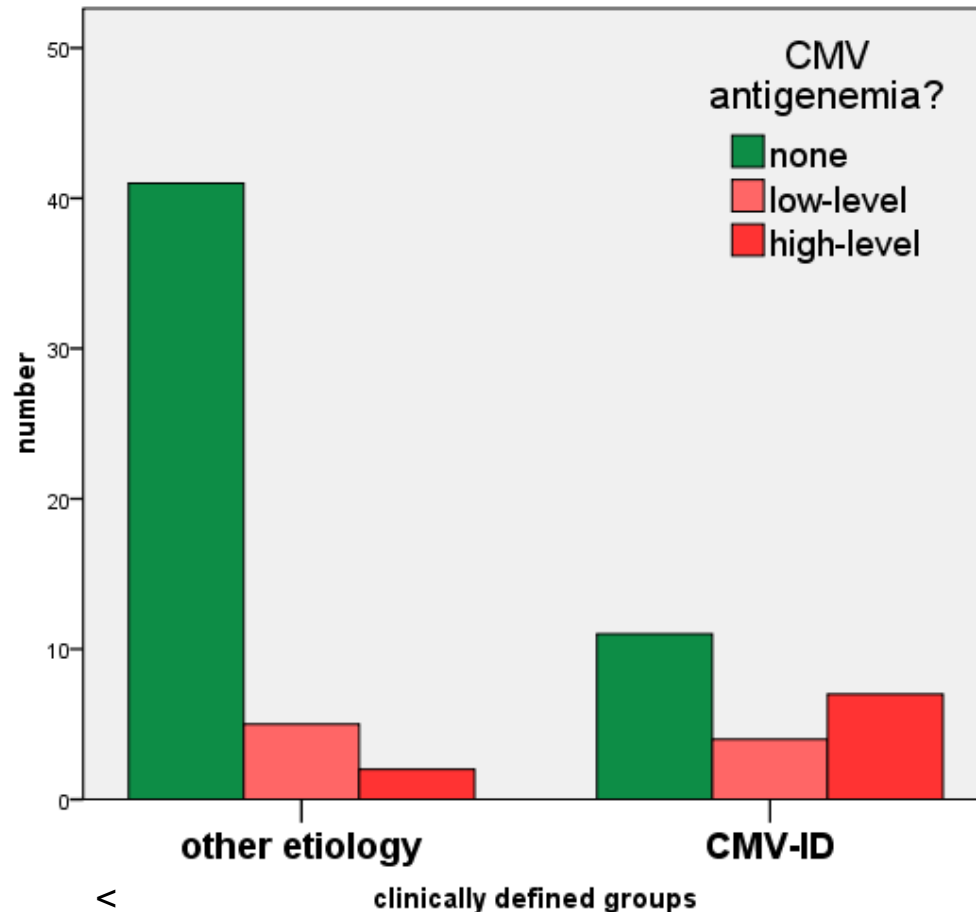
Cut-off (CMV-copies/cell)	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
qualitative PCR	0.96	0.85	0.68	0.99
Cut-off_{clin}: 0.01	0.96	0.91	0.78	0.99
Cut-off_{histo}: 0.14	0.69	1.0	1.0	0.91

PPV: Positiver Vorhersagewert; NPV: Negativer Vorhersagewert;
Cut-off_{clin}: Schwellenwert angepasst an die klinischen Kriterien

→ Der histologische Cut-off_{histo} ist hochspezifisch, aber es können klinisch relevante Fälle übersehen werden.

→ Der klinische Cut-off_{clin} zeigt eine akzeptable Sensitivität und Spezifität

Die Hälfte der Patienten mit klinisch definierter CMV-Enterokolitis zeigen keine CMV-Antigenämie*



68.2% der Patienten mit klinisch definierter CMV-Enterokolitis zeigten keine (11/22) oder nur eine low-level (4/22) CMV-Antigenämie.

→ **Lokale CMV Replikation?**
→ **Antigenämietestung alleine nicht ausreichend für die Diagnose! (7,8)**

*CMV-Antigenämie = positiver CMV pp65 Test innerhalb 10 Tage vor/nach Biopsie; Daten von 108 Patienten.
<10 positive/400 000 Zellen = low-level Antigenämie
≥10 positive/400 000 Zellen = high-level Antigenämie

Zusammenfassung

- Die PCR-Technik ist eine schnelle und objektive Methode (Turnover im Labor ca. 1-2 Werkzeuge)
- Mittels PCR-Quantifizierung von CMV-DNA in Darmbiopsien können Schwellenwerte definiert werden, mit deren Hilfe die CMV-ID genauer vorhergesagt werden kann als mit qualitativer PCR:
 - Histologisch adaptierter cut-off_{histo} liefert vergleichbare Ergebnisse wie die Histopathologie, allerdings können klinisch relevante Fälle übersehen werden.
→ **Geeignet zur Bestätigung**
 - Klinisch adaptierter cut-off_{clin} hat eine verbesserte Sensitivität obwohl die Spezifität leicht erniedrigt ist
→ **Geeignet zum Screening**

Vorteile aus der CMV-Quantifizierung in Darmbiopsien

- Unterstützung der Diagnosefindung bei histopathologisch unklaren Fällen; Adäquate Therapie (Immunsuppression vs. antivirale Therapie)
- Vermeidung von Übertherapie, die bei qualitativ positiven aber klinisch irrelevanten Fällen entstehen könnte.



Weitere prospektive Studien müssen klären, ob die Anwendung dieser Schwellenwerte die Diagnose und Behandlung der CMV-Enterokolitis in der klinischen Praxis verbessern können.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Clinical Virology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcv

Quantification of cytomegalovirus DNA levels in intestinal biopsies as a diagnostic tool for CMV intestinal disease

Tina Ganzenmueller^{a,*}, Cornelia Henke-Gendo^a, Jerome Schlué^b, Jochen Wedemeyer^c, Sabine Huebner^a, Albert Heim^a

^a Institute of Virology, Hannover Medical School, Carl-Neuberg-Straße 1, 30625 Hannover, Germany

^b Institute of Pathology, Hannover Medical School, Carl-Neuberg-Straße 1, 30625 Hannover, Germany

^c Department of Gastroenterology, Hepatology and Endocrinology, Hannover Medical School, Carl-Neuberg-Straße 1, 30625 Hannover, Germany



Hannover Medical School

Danke für Ihre Aufmerksamkeit