

*Agnieszka Bednarska, Regina Podlasin, Grzegorz Karczewski, Teresa Łoch,
Andrzej Horban, Marek Radkowski*

OCENA UŻYTECZNOŚCI METODY *MULTIPLEX* PCR W DIAGNOSTYCE ZMIAN W OŚRODKOWYM UKŁADZIE NERWOWYM PACJENTÓW ZAKAŻONYCH HIV I CHORYCH NA AIDS

Wojewódzki Szpital Zakaźny w Warszawie
Dyrektor: Andrzej Horban
Zakład Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych
Akademii Medycznej w Warszawie,
Kierownik: Marek Radkowski

Choroby ośrodkowego układu nerwowego nadal są częstym powikłaniem zakażenia HIV. Rutynowa diagnostyka neurologiczna w przypadku tych patologii często bywa nieswoista lub długotrwała.

Natomiast wielokrotnie dowiedziono już przydatności i wysokiej swoistości metod molekularnych takich jak PCR. Zastosowanie metody tzw. multiplex PCR do badania płynu mózgowo-rdzeniowego pozwala dodatkowo usprawnić diagnostykę i zmniejszyć jej koszty.

Słowa kluczowe: multiplex PCR, HIV, AIDS, OUN

Key words: multiplex PCR, HIV, AIDS, neurological disorders

WSTĘP

Choroby ośrodkowego układu nerwowego (OUN) są częstym powikłaniem zakażenia ludzkim wirusem upośledzenia odporności (HIV). Nawet przy stosowanym obecnie, bardzo skutecznym leczeniu antyretrowirusowym (HAART), nadal stanowią one jedną z głównych przyczyn zgonów chorych z AIDS (1).

Wśród przyczyn zmian w ośrodkowym układzie nerwowym znajdują się zakażenia patogenami oportunistycznymi takimi jak *Toxoplasma gondii*, JC virus (JCV), cytomegalowirus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV), a także inne zakażenia wirusowe lub bakteryjne oraz nowotwory mózgu.

U pacjentów z AIDS najczęstszą przyczyną zmian ogniskowych są: toksoplazmoza mózgu wywołana zakażeniem *T.gondii* i chłoniak pierwotny mózgu związany z zakażeniem EBV (2,3,4). Rzadziej rozwija się u nich postępująca wieloogniskowa encefalopatia (5).

Zapalenie mózgu wywołane zakażeniem CMV ma zwykle postać rozlaną i występuje najczęściej u pacjentów z bardzo małą liczbą limfocytów CD4 (6,7). Zastosowanie HA-

ART zmniejszyło znacznie częstość występowania tzw. *CMV encephalitis*, mimo to nie powinno się pomijać tej jednostki chorobowej w diagnostyce różnicowej (1).

Badanie płynu mózgowo-rdzeniowego, obok badań obrazowych, ma zasadnicze znaczenie w diagnostyce chorób ośrodkowego układu nerwowego, jednak w przypadku chorych zakażonych HIV często badania te są zbyt mało swoiste. Hodowle lub próby biologiczne, ze względu na długi czas oczekiwania na wynik, mają małe zastosowanie praktyczne. Natomiast wielokrotnie dowiedziono przydatności i wysokiej swoistości metod molekularnych takich jak łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR) (8-17,2). Zastosowanie metody PCR dla stwierdzania obecności materiału genetycznego kilku patogenów jednocześnie, tzw. *multiplex PCR*, pozwala przyspieszyć diagnostykę, zmniejszyć ilość pobieranego materiału oraz ograniczyć koszty (18).

Nasze badanie miało na celu ocenę przydatności metody *multiplex PCR* w diagnostyce chorób ośrodkowego układu nerwowego u osób zakażonych HIV, hospitalizowanych w Wojewódzkim Szpitalu Zakaźnym, w latach 1996 -2003.

MATERIAŁ I METODY

Badano retrospektywnie próbki płynu mózgowo-rdzeniowego pobrane od 27 pacjentów zakażonych HIV: czterech kobiet i dwudziestu trzech mężczyzn w wieku od 26 lat do 54 lat. Podstawowe dane kliniczne o pacjentach przedstawiono w tabeli I.

Pobierano płyn mózgowo-rdzeniowy (PMR) od chorych, u których wystąpiły objawy sugerujące zajęcie procesem chorobowym ośrodkowego układu nerwowego. Nakłucie lędźwiowe wykonywano przy braku przeciwwskazań i po uzyskaniu ustnej zgody od pacjenta. Po wykonaniu rutynowych badań diagnostycznych pozostałą ilość PMR zamrażano i przechowywano w temp. -80°C do chwili badania.

Uzyskany wynik reakcji PCR porównywano z rozpoznaniem klinicznym postawionym na podstawie badania PMR: ogólnego, bakteriologicznego, mikologicznego i wirusologicznego, badania neurologicznego chorego oraz badań obrazowych ośrodkowego układu nerwowego (tomografii komputerowej, rezonansu magnetycznego) wykonanych u pacjenta. W ośmiu przypadkach dostępny był wynik badania autopsyjnego mózgu.

Izolacji DNA do badania dokonywano przy użyciu zestawu do ekstrakcji kwasów nukleinowych (High Pure Viral Nucleic Acid Kit, Roche). Następnie przeprowadzano dla każdej próbki dwie odrębne reakcje PCR stosując odpowiednio gotowe mieszaniny starterów firmy Innogenetics N.V.: pierwszy zestaw dla HSV-1, HSV-2, VZV, HHV-6, drugi zestaw dla CMV, EBV, JCV, *T.gondii*. Mieszanina reakcyjna zawierała również niezbędne do przeprowadzenia reakcji składniki: bufor, dNTP, MgCl_2 , polimerazę Taq w stężeniach zalecanych przez producenta.

Celem zwiększenia czułości w przypadku 18 spośród 27 próbek podjęto próbę powtórnego przeprowadzenia reakcji z użyciem możliwie większej ilości badanego materiału (trzykrotnie większa ilość DNA). Grupa ta obejmowała również trzech pacjentów, u których znany był wynik badania sekcyjnego mózgu (postępująca wieloogniskowa encefalopatia (PML), *CMV encephalitis*, toksoplazmoza OUN). W tych trzech przypadkach badanie przeprowadzono dwukrotnie, używając 5 μL i 15 μL wyizolowanego DNA.

Amplifikację przeprowadzono posługując się instrumentem firmy Perkin-Elmer model 480 wg schematu: 15 min w 94°C , 40 cykli po 30 sek w 94°C , 30 sek w 54°C , 30 sek

Tabela I. Pacjenci zakażeni HIV z klinicznym i/lub sekcyjnym rozpoznaniem patologii OUN wywołanej przez jeden z patogenów wykrywalnych użytym w badaniu testem *multiplex* PCR

Table I. Patients HIV positive with established clinical and/or histopathological diagnosis of neurological disorder caused by one of pathogens detected by used in the experiment *multiplex* PCR

Pacjent	Rozpoznanie kliniczne	Wynik badania sekcyjnego	Wynik multiplex PCR
1	CMV encephalitis	CMV encephalitis	CMV
2	CMV encephalitis	Nd	CMV, EBV
3	Toksoplazmoza OUN	Toksoplazmoza OUN	T.gondii
4	Toksoplazmoza OUN	Nd	Ujemny
5	Kryptokoza OUN	PML	Ujemny*
6	CMV encephalitis	CMV encephalitis, toksoplazmoza OUN	Ujemny*
7	CMV encephalitis	Toksoplazmoza OUN	Ujemny*
8	PML	Zapalenie mózgu o niejasnej etiologii	JCV
9	Toksoplazmoza OUN, PML	Nd	Ujemny
10	Toksoplazmoza OUN	Nd	Ujemny
11	Toksoplazmoza OUN	Nd	Ujemny
12	CMV encephalitis	Nd	CMV
13	Toksoplazmoza OUN	Nd	Ujemny
14	Toksoplazmoza OUN	Nd	CMV

* badanie wykonane dwukrotnie, po raz drugi z większą ilością materiału

Nd – nie wykonano

w 72°C. Po zakończeniu ostatniego cyklu próbki były inkubowane przez 10 min w 72°C. Produkty PCR poddano hybrydyzacji przy zastosowaniu zestawu LIPA CNS firmy Innogenetics N.V. Użyto po 10 µL zamplifikowanego DNA.

WYNIKI

Dla 6 spośród 27 próbek (22%) uzyskano wynik dodatni dla jednego lub dwóch badanych patogenów. Najczęściej, bo aż w 4 próbkach PMR stwierdzono obecność CMV-DNA. W jednym z tych przypadków wystąpiła koinfekcja CMV i EBV. Był to jedyny przypadek wykrycia EBV-DNA. U 2 z tych pacjentów wcześniej wykonany rutynowo PCR wykazał obecność CMV-DNA w płynie mózgowo-rdzeniowym. Dodatkowo, spośród badanych 27 osób ośmioro miało również wykonane uprzednio badanie na obecność CMV-DNA w PMR metodą PCR. Wszystkie wyniki były negatywne co potwierdzono w trakcie obecnego badania metodą *multiplex* PCR.

W jednym przypadku stwierdzono zakażenie JCV, również u jednej osoby zakażenie *T. gondii*.

Łącznie uzyskano wynik pozytywny dla jednego z badanych patogenów w siedmiu przypadkach.

Spośród tych siedmiu pozytywnych wyników badania metodą *multiplex* PCR pięć było zgodne z postawionym wcześniej rozpoznaniem klinicznym. W dwóch przypadkach również z wynikiem badania sekcyjnego mózgu. W 2 przypadkach wykryto DNA patogenu, którego nie brano pod uwagę jako etiologii zaburzeń neurologicznych (CMV i EBV).

Wyniki negatywne dotyczyły ośmiu pacjentów, u których podejrzewano zapalenie mózgu o etiologii CMV, JCV lub *T. gondii* na podstawie objawów klinicznych i radiologicznych oraz trzech pacjentów, u których to rozpoznanie postawiono pośmiertnie. W tych trzech przypadkach powtórzenie badania z potrójną ilością materiału nie potwierdziło rozpoznania sekcyjnego.

DYSKUSJA

Multiplex PCR jest uważany za użyteczną technikę diagnostyczną, ponieważ do badania wymagana jest mała ilość materiału, a w czasie jednej reakcji możliwe jest wykrycie wielu patogenów. Wynik można uzyskać już po kilku godzinach, co bardzo usprawnia diagnostykę i umożliwia wczesne rozpoczęcie ewentualnego leczenia.

Spośród zbadanych 27 próbek płynów mózgowo-rdzeniowych w 6 uzyskano wynik dodatni (22%). Jest to o ok. 40% mniej niż w badaniach innych autorów, w których zastosowano inne zestawy diagnostyczne, np. oparte na technice *multiplex nested* PCR (37% w badaniu Quereda, 36% w badaniu Cinque) (8,18). Różnica ta może wynikać z faktu, że testy te nie były zaprojektowane i używane do diagnostyki zakażenia *T. gondii*. W przypadku wykluczenia diagnostyki *T. gondii* odsetek wyników dodatnich w naszym badaniu zwiększał się do 28%.

W wykonanym badaniu u 2 pacjentów podejrzewano PML na podstawie obrazu klinicznego, natomiast w jednym przypadku rozpoznanie to postawiono na podstawie wykonanej autopsji. Tylko u jednego pacjenta wykryto obecność JCV-DNA, ale była to inna osoba niż ta, u której stwierdzono PML w badaniu sekcyjnym.

U pacjentów z ewidentnymi objawami PML oraz obecnym JCV-DNA w tkance mózgowej często wykrywa się JCV-DNA w płynie mózgowo-rdzeniowym (11). Częstość wykrywania JCV-DNA metodą PCR rośnie wraz ze wzrostem wirerii JCV w PMR, a co za tym idzie wraz z progresją choroby (8,11,12). Mimo, że JCV może być obecny w OUN u pacjentów bez PML, OUN pełni w tych przypadkach rolę rezerwuaru (miejsca latentnego zakażenia). Stosując technikę PCR nie stwierdzono wyników fałszywie dodatnich, choć wynik ujemny nie wyklucza PML (9,11,12). Tak należy prawdopodobnie wytłumaczyć wynik ujemny PCR u pacjenta, u którego stwierdzono PML autopsyjnie. Należy podkreślić, że w badaniu obrazowym mózgu, nie wykazano zmian charakterystycznych dla PML. W płynie mózgowo-rdzeniowym stwierdzono obecność antygeny kryptokokowego, a zatem kryptokokoza OUN była przyczyną objawów klinicznych i zgonu chorego.

W drugim przypadku w badaniu NMR OUN stwierdzono wprawdzie obszary hypodensyjne, ale ostatecznie rozpoznano toksoplazmozę mózgu, gdyż zmiany ustąpiły w wyniku leczenia przeciwtoksoplazmozowemu.

Natomiast pacjent z dodatnim wynikiem PCR na obecność JCV-DNA w PMR miał również zmiany w OUN odpowiadające PML.

Pozytywny wynik na obecność DNA *T. gondii* otrzymano w jednym przypadku. Wynik ten zgodny był z rozpoznaniem klinicznym i sekcyjnym. U 6 osób na podstawie objawów klinicznych również podejrzewano toksoplazmozę mózgu, ale nie udało się tego potwierdzić metodą *multiplex* PCR. U 2 innych osób rozpoznanie to postawiono na podstawie badania autopsyjnego. Wszyscy ci pacjenci otrzymywali leczenie przeciw toksoplazmozie już przed pobraniem PMR do badania. Zaawansowane stadium choroby, gwałtowny przebieg, rozległe zmiany w tomografii komputerowej lub rezonansie magnetycznym OUN zwiększają prawdopodobieństwo wykrycia materiału genetycznego *T. gondii* w płynie mózgowo - rdzeniowym (10,16). Jednocześnie stosowanie leczenia, szczególnie jeśli trwa ono dłużej niż tydzień przed badaniem, prawdopodobieństwo to zdecydowanie zmniejsza (10,17). W naszym badaniu, w każdym przypadku stosowanie leczenia mogło mieć wpływ na wynik PCR.

Nie uzyskano ani jednego wyniku fałszywie dodatniego, co jest zgodne z pracami, w których test PCR wykrywał DNA *T. gondii* bardzo swoiście, jednak brak wyniku dodatniego nie wykluczał toksoplazmowego zapalenia mózgu (9,10,16,19).

Najczęściej wykrywanym w naszym badaniu wirusem był CMV. Dodatni wynik uzyskano w czterech przypadkach, w tym w 3 zgodnie z rozpoznaniem klinicznym. Wśród tych trzech przypadków *CMV encephalitis* (CMVE) potwierdzono badaniem sekcyjnym lub wcześniej wykonanym PCR. U czwartego pacjenta CMV nie był brany pod uwagę jako czynnik etiologiczny zmian. Był to pacjent z małą liczbą limfocytów CD4, u którego objawy zapalenia mózgu ustąpiły po zastosowaniu leczenia przeciw toksoplazmozie. Wykrycie materiału genetycznego CMV w PMR w takim przypadku może być związane z istniejącą już replikacją wirusa w OUN i rozwijającym się zapaleniem mózgu, jednak w na tyle początkowej jego fazie, że nie dochodzi do rozwoju zmian organicznych. Inną przyczyną może być zanieczyszczenie PMR krwią obwodową (8,18). Zastosowane leczenie antyretrowirusowe i wzrost liczby CD4 prawdopodobnie spowodowały u tego pacjenta brak rozwoju objawów choroby cytomegalowirusowej.

Wynik negatywny CMV-DNA u chorego z objawami klinicznymi zapalenia mózgu i autopsyjnie potwierdzonym CMVE jest trudny do interpretacji. Mógłby wynikać z zastosowania leczenia przeciw HIV, ale brak jest na ten temat danych w dostępnej dokumentacji klinicznej.

Wielokrotnie udowodniono, że możliwe jest wykrycie EBV-DNA u pacjentów zakażonych HIV bez klinicznych czy radiologicznych cech pierwotnego chłoniaka mózgu. U wielu spośród tych chorych objawy te rozwijają się w późniejszym czasie (8,14,15). W naszym badaniu EBV-DNA stwierdzono u jednej chorej. Ze względu na jednoczesne wykrycie w PMR obecności CMV-DNA objawy zapalenia mózgu wiązano z CMV. Ponieważ niedostępne jest badanie radiologiczne OUN, a sekcja mózgu nie została wykonana, nie można wykluczyć, że przyczyną zgonu był również chłoniak pierwotny mózgu.

PODSUMOWANIE

W przypadku diagnostyki chorób ośrodkowego układu nerwowego u pacjentów zakażonych HIV podobne objawy kliniczne, mało charakterystyczne wyniki badań obrazowych i laboratoryjnych, takich jak badanie ogólne płynu mózgowo-rdzeniowego, często nie po-

zwalają na postawienie ostatecznego rozpoznania. Dodatkowo, ze względu na immunosupresję występującą u tych pacjentów, do wywołania objawów klinicznych wystarcza niewielka ilość patogenu (20). Z tego też powodu metoda PCR, jako czuła i swoista, wydaje się niezwykle pomocna i użyteczna. Technika *multiplex* pozwalająca na wykrywanie DNA kilku patogenów jednocześnie, przyspiesza i usprawnia diagnostykę. Zestaw LIPA-CNS użyty w tym badaniu wykazuje wysoką swoistość. W żadnym z przypadków nie uzyskano wyniku fałszywie dodatniego, w większości wynik zgodny był z rozpoznaniem klinicznym i autopsyjnym. Wadą testu jest brak kontroli pozytywnej reakcji PCR – możliwa jest jedynie kontrola hybrydyzacji. Należy się więc liczyć z wynikiem fałszywie ujemnym. Wadą wydaje się również brak drugiego etapu reakcji PCR (*nestingu*). Prawdopodobnie to właśnie miało największy wpływ na małą czułość tego zestawu.

A Bednarska, R Podlasin, G Karczewski, T Loch, A Horban, M Radkowski

UTILITY OF *MULTIPLEX* PCR FOR DIAGNOSIS OF NEUROLOGICAL DISORDERS IN HIV – INFECTED PATIENTS AND PATIENTS WITH AIDS

SUMMARY

Objective: evaluation of *multiplex* PCR utility for diagnosis of central nervous system disorders in HIV – infected patients.

Methods: multiplex PCR assay for simultaneous detection of HSV-1, HSV-2, VZV, HHV-6, CMV, EBV, JCV, *T. gondii* DNA in 27 CSF samples from HIV-infected patients was used. PCR results were compared with clinical diagnosis and histopathological examination of brain obtained at autopsy.

Main observations: five of seven positive results were corresponding with clinical diagnosis. In two cases also with autopsy.

Results: DNA of one or more pathogens was found in 6 out of 27 (22%) samples: CMV DNA in four patients, JCV DNA and *T.gondii* DNA in one patients each. In one case co-infections of CMV and EBV was found.

Conclusions: Multiplex PCR is a useful diagnostic method. LIPA-CNS test has high specificity. Lack of nesting step of the reaction and PCR positive control verification could cause a relatively low sensitivity of the test.

PIŚMIENNICTWO

1. Gray F, Chretien F, Vallat-Decouvelaere AV, i in. The changing pattern of HIV neuropathology in the HAART era. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2003;62(5): 429-440.
2. Mamidi A, De Simone J, Pomerantz R Central nervous system infections in individuals with HIV-1 infection *J Neurovir* 2002;8:158-167.
3. Antinori A, Larussa D, Cingolani A, i in. Prevalence, associated factors, and prognostic determinants of AIDS-related toxoplasmic encephalitis in the era of advanced highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis.* 2004;39(11): 1681-91.
4. Pluda JM, Yarchoan R, Jaffe ES, i in. Development of non-Hodgkin lymphoma in a cohort of patients with severe human immunodeficiency virus (HIV) infection on long-term antiretroviral therapy. *Ann Intern Med.* 1990;113(4): 276-82.
5. Berger JR, Pall L, Lanska D, Whiteman M. Progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with HIV infection. *J Neurovirol.* 1998;4(1): 59-68.
6. Holland NR, Power C, Mathews VP, i in. Cytomegalovirus encephalitis in acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Neurology.* 1994;44(3 Pt 1): 507-514.

7. Vinters HV, Kwok MK, Ho HW, i in. Cytomegalovirus in the nervous system of patients with the acquired immune deficiency syndrome. *Brain*. 1989;112 (Pt 1): 245-68.
8. Cinque P, Vago L, Dahl H, i in. Polymerase chain reaction on cerebrospinal fluid for diagnosis of virus-associated opportunistic diseases of the central nervous system in HIV-infected patients. *AIDS* 1996;10: 951-958.
9. Antinori A, Ammassar A, De Luca A, i in. A decision-making analysis based on clinical and neuroradiologic characteristics combined with polymerase chain reaction assays in CSF. *Neurology* 1997; 48: 687-694.
10. Julander I, Martin C, Lappalainen M, i in. Polymerase chain reaction for diagnosis of cerebral toxoplasmosis in cerebrospinal fluid in HIV-positive patients. *Scand J Infect Dis* 2001, 33: 538-541.
11. Vago L, Cinque P, Sala E, i in. JCV-DNA and BKV-DNA in the CNS tissue and CSF of AIDS patients and normal subjects. Study of 41 cases and review of the literature *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1996;12(2): 139-46.
12. Hammarin A-L, Bogdanovic G, Svedhem V, i in. Analysis of PCR as a tool for detection of JC virus DNA in Cerebrospinal fluid for diagnosis of progressive multifocal leukoencephalopathy *J Clin Microbiol* 1996; 34(12): 2929-2932.
13. Giri J, Gregoresky J, Silguero P, i in. Polyoma virus JC DNA detection by polymerase chain reaction in CSF of HIV infected patients with suspected progressive multifocal leukoencephalopathy *Am Clin Lab*. 2001;20(9): 33-35.
14. Bossolasco S, Cinque P, Ponzoni, Mi in. Epstein – Barr virus DNA load in cerebrospinal fluid and plasma of patients with AIDS-related lymphoma *J Neurovirol*. 2002; 8(5): 432-438.
15. Brink N, Sharvell Y, Howard M, i in. Detection of Epstein – Barr virus and Kaposi's sarcoma – associated herpesvirus DNA in CSF from persons infected with HIV who had neurological disease *J Neurosurg Psychiatry* 1998; 65: 191-195.
16. Joseph P, Calderon M, Gilman R, i in. Optimaization and evaluation of a PCR assay for detecting toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS *J Clin Microbiol* 2002; 40(12): 4499-4503.
17. Novati R, Castagna A, Morsica G, i in. Polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii* DNA in the cerebrospinal fluid of AIDS patients with focal brain lesions *AIDS*. 1994;8(12): 1691-1694.
18. Quereda C, Corral I, Laguna F, i in. Diagnostic utility of a multiplex Herpesvirus PCR assay performed with cerebrospinal fluid from human immunodeficiency virus-infected patients with neurologic disorders. *J Clin Microbiol* 2000; 38(8): 3061-3067.
19. Roberts T, Storeh G Multiplex PCR for diagnosis of AIDS – related central nervous system lymphoma and toxoplasmosis *J Clin Microbiol* 1997; 35(1): 268-269.
20. Podlasin R, Bednarska A, Jagodzińska-Hamann L, i in. Choroby ośrodkowego układu nerwowego u osób zakażonych HIV-analiza przypadków. *Problemy HIV/AIDS* 1997 3(2): 77-82.

Otrzymano: 15.06.2005

Adres autorki:

Lek med. Agnieszka Bednarska
Wojewódzki Szpital Zakaźny
ul Wolska 37, 01-201 Warszawa
tel. (22) 335 52 16
e-mail: basand@mp.pl