

CMV-diagnostiek: een complex maar boeiend onderwerp

C.A. Bruggeman

De diagnostiek van virusinfecties berust enerzijds op het aantonen van het micro-organisme en anderzijds op detectie van de antistoffen tegen virale eiwitten. Voor de CMV-diagnostiek is het van groot belang een onderscheid te (kunnen) maken tussen CMV-infectie en CMV-ziekte. Door nieuwe ontwikkelingen op het gebied van de diagnostiek zijn er testen ter beschikking gekomen die een dergelijk onderscheid lijken mogelijk te maken. Een belangrijke ontwikkeling op dit gebied is de antigenemietest waarmee een viraal eiwitfosfoproteïne pp65 in leukocyten aantoonbaar is. Daarnaast zijn er de technieken voor detectie van viraal DNA en in mindere mate viraal mRNA.

In het bijzonder is het gebruik van genoom amplificatietesten, zoals PCR en NASBA voor detectie van CMV-DNA of RNA in leukocyten, een belangrijke aanwinst voor de CMV-diagnostiek. Door gebruik te maken van de kwantitatieve PCR is het mogelijk het verloop van een CMV-infectie bij (risico)patiënten te volgen. Voor patiënten die worden behandeld met antivirale middelen, is een kwantitatieve virusmonitoring van grote waarde omdat, op basis van een dergelijke laboratoriumuitslag, het beleid kan worden aangepast. **Trefwoorden:** cytomegalovirus, diagnostiek, PCR, antigenemietest, NASBA, serologie.

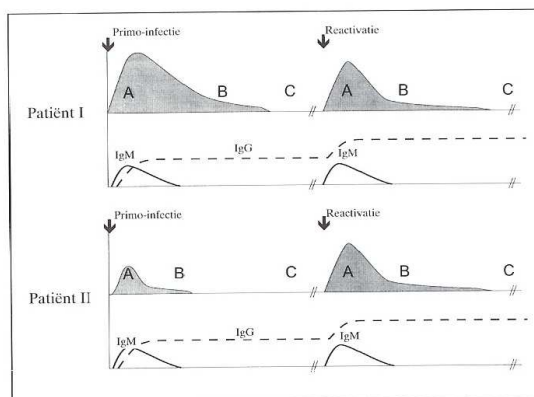
Vooraleer een overzicht te geven van de CMV-diagnostiek en in het bijzonder de nieuwe ontwikkelingen op dit gebied, gaat dit artikel in op enkele karakteristieke eigenschappen van het CMV voor zover die nuttig zijn voor het begrip van deze nieuwe ontwikkelingen.

Het virus en het infectieverloop

Cytomegalovirus (CMV) is een bèta-herpesvirus dat in hoge mate species-specifiek is. Het virus replicateert (in vitro) voornamelijk in fibroblasten, in vivo in velerlei cellen waaronder monocyten, endotheelcellen en gladde spiercellen.¹ De virusvermenigvuldiging verloopt in een welbepaalde volgorde. Eerst komen de onmiddellijk vroege of 'immediate early' (IE-)genen tot expressie die nodig zijn voor de volgende stap, met name de expressie van vroege of 'early' (E-)genen en als laatste, na de DNA-replicatie, komen de late (L-)genen tot expressie. Dit heeft tot gevolg dat er IE-, E- en L-mRNA in de cel ontstaat als ook IE-, E- en L-eiwitten.

In vivo leidt infectie van de immunocompetente gastheer tot een systemische infectie met kleine hoeveelheden virus in diverse organen en lichaamsvloeistoffen; hierbij treden nauwelijks klinische symptomen op. Na de infectie worden antistoffen gevormd die, naar wordt aangenomen, levenslang detecteerbaar zijn. Het virus blijft echter in de gastheer aanwezig in zogenaamd 'latente' toestand. Vanuit die latente toestand kan het virus reactiveren, hetgeen leidt tot een actieve infectie met virusreplicatie die systemisch kan verlopen. Wel is duidelijk dat in het algemeen deze systemische infectie, mede door de reeds aanwezige immuniteit, beperkter is in omvang dan de primo-infectie en ook meestal een milder beloop kent (figuur 1). Tot de factoren die leiden tot reactivatie, is vooral een ver-

minderde cellulaire immuniteit van belang. Bij de immunogecompromiteerde gastheer verloopt de primo-infectie in regel veel ernstiger dan bij de immunocompetente gastheer. Er wordt meer virus aangetroffen in de



Figuur 1. Schematische weergave van een CMV-infectieverloop, voor zover van belang voor de diagnostiek, bij twee patiënten. Patiënt I is immunogecompromiteerd bij de primo-infectie en patiënt II is immunocompetent op het tijdstip van de primo-infectie. Bij beide patiënten treedt er achtereenvolgens een acute infectie (A) op die na verloop van tijd overgaat in een chronische fase (B) die tenslotte resulteert in een latente infectie (C).

(■ geeft de mate van virus weer in het lichaam en in de excreta, bijvoorbeeld urine, in de diverse fases.)

Na een aantal jaren, als gevolg van immuunsuppressie, bijvoorbeeld bij orgaantransplantatie, treedt bij diezelfde twee patiënten reactivatie van latent virus op. Hierdoor ontstaan achtereenvolgens weer de drie fasen (A, B en C). Naast de aanwezigheid van infectieus virus, is in dit figuur ook de antistofrespons (IgG en IgM) bij deze twee patiënten schematisch weergegeven.

diverse organen, de excretie van virus is toegenomen en de viremische fase duurt langer.

Terwijl bij de immunocompetente gastheer een CMV-infectie niet leidt tot ziekte, kunnen ernstige complicaties optreden bij patiënten met verminderde afweer. De klinische symptomen die optreden, zijn in sterke mate afhankelijk van het 'onderliggende lijden'. Zo treden bij transplantatiepatiënten voornamelijk symptomen op als pneumonitis en hepatitis, terwijl bij aids-patiënten CMV-infectie kan leiden tot retinitis, colitis en encefalitis.

Diagnostiek

De laboratoriumdiagnostiek van virusinfecties is gebaseerd op twee pijlers:

- de detectie van het virus of onderdelen ervan (genoom of eiwitten);
- het aantonen van antistoffen tegen het virus.

Met het ontwikkelen van CMV-laboratoriumtesten en de interpretatie ervan, moet men echter met twee punten rekening houden. Ten eerste wordt een CMV-infectie gekenmerkt door een verloop dat is op te splitsen in een acute, een persisterende (chronische) en een latente fase. Het aantonen van latent virus is wellicht vanuit wetenschappelijk oogpunt interessant, doch is voor de diagnostiek niet relevant en zal hier dan ook niet worden besproken. De diagnostiek is primair gericht op het aantonen van 'actief' virus. Ten tweede verlopen CMV-infecties vaak subklinisch, waardoor de detectie van het virus op zichzelf niet voldoende is om automatisch te concluderen dat CMV het oorzakelijk agens is van de gevonden symptomatologie. De combinatie van laboratoriumuitslagen en het ziektebeeld dienen samen te worden geïnterpreteerd! Zoals eerder besproken, blijken klinische symptomen als gevolg van een CMV-infectie veelal slechts op te treden als sprake is van een immunodeficiëntie, zoals bij transplantatie- en aids-patiënten, maar ook in de embryonale en neonatale levensfase is sprake van een vorm van immunodeficiëntie.

Oorzakelijke agens aantonen in patiëntenmateriaal

Infectieus virus is aantoonbaar door een kweek op monolagen van embryonale fibroblasten. Aan de hand van het cytopathologisch effect (CPE) wordt het virus gedetecteerd. Omdat het ontstaan van het CPE lang kan duren (tot vier weken na inoculatie), is overgeschakeld op een snellere techniek. Deze techniek, ook versnelde kweek genoemd, is gebaseerd op het principe dat enkele uren na infectie IE-eiwitten ontstaan in de cel. Deze eiwitten kunnen zichtbaar worden gemaakt met behulp van specifieke (monoklonale) antilichamen. Op deze wijze is detectie van CMV in de cel reeds na 24 á 48 uur mogelijk.

De kweek wordt in het algemeen gebruikt om CMV aan te tonen in urine, speeksel, keelvlloeistof of in bloed. Ook in ander materiaal kan CMV worden gedetecteerd, bijvoorbeeld in broncho-alveolaire lavage (BAL) bij verdenking op pneumonie of amnionvocht in het geval van prenatale CMV-infectie.

Het aantonen van infectieus virus is een klassiek fenomeen in de diagnostische virologie. Het is een betrouwbare methode voor het aantonen van een actieve CMV-infectie. Vooral aanwezigheid van infectieus virus in bloed(cellen) is een marker voor actieve infectie en wordt vaak geassocieerd met het optreden van klinische symp-

tomen. Aanwezigheid van infectieus virus in andere excreta, zoals urine en keelspoelsel, moeten met de nodige voorzichtigheid worden gehanteerd wegens het veelvuldig voorkomen van asymptomatische uitscheiders, hetgeen vaak voorkomt als gevolg van reactivatie van latent virus.

Viraal DNA is aantoonbaar door middel van de polymerasekettingreactie (PCR). Deze techniek staat sterk in de belangstelling, onder andere wegens haar hoge sensitiviteit. Problemen zijn echter mogelijk met de interpretatie van de uitslagen ervan; immers vanuit theoretisch oogpunt gezien, is het met deze uiterst gevoelige techniek mogelijk latent virus te detecteren, hetgeen voor de diagnostiek niet relevant is.

De PCR is bruikbaar voor het aantonen van viraal DNA in weefsels, witte bloedcellen, plasma of serum en andere lichaamsvloeistoffen, zoals BAL en urine.²⁻⁴ De meeste toepassing echter gebeurt in bloed(cellen) door detectie van DNA.

Over de gevoeligheid van de PCR zijn de resultaten nogal uiteenlopend; dit wordt onder andere veroorzaakt doordat diverse laboratoria vaak eigen ontwikkelde PCR's gebruiken, waardoor onderlinge vergelijking moeilijk is. De verschillen zijn toe te schrijven aan technische aspecten, zoals het aantal cycli, de gebruikte primers en het type PCR.⁵⁻⁷ Vooral door de mogelijkheid tot kwantificering, biedt de PCR grote perspectieven.⁸ Belangrijke voordelen van de kwantitatieve PCR zijn:

- de mogelijkheid om het verloop van een infectie te volgen waardoor tijdig ingrijpen mogelijk is, in het bijzonder bij risicopatiënten;
- de mogelijkheid om patiënten die worden behandeld met antivirale middelen te volgen/te begeleiden.

Uit onderzoek van diverse groepen is ook gebleken dat er een relatie bestaat tussen de hoeveelheid viraal DNA en het optreden van klinische symptomen.^{8,9} Dat dit echter niet gelijk is voor alle patiënten blijkt uit onderzoek van Emery.⁸ Uit dit onderzoek bleek dat bij aids- en beenmergtransplantatiepatiënten CMV-ziekte optreedt in aanwezigheid van lagere CMV-DNA-concentraties in het bloed dan bij nier- en levertransplantatiepatiënten. Ook voor de diagnostiek van congenitale CMV-infecties lijkt detectie van CMV-DNA (via PCR) in serum van de pasgeborene een geschikte methode te zijn die echter nog niet algemeen wordt toegepast.¹⁰

Viraal mRNA-detectie is mogelijk, doch wordt tot op heden weinig gebruikt in de virologische diagnostiek. Voor detectie van RNA zijn de reverse transcriptase (RT) PCR en de 'Nucleic Acid Sequence-Based Amplification' (NASBA) mogelijk. Laatstgenoemde is inmiddels beschikbaar voor CMV-diagnostiek en wordt vooral gebruikt om RNA te detecteren in witte bloedcellen.¹¹ De RNA-detectie heeft als voordeel dat er onderscheid mogelijk is tussen de diverse stadia van de virusreproductie, door bijvoorbeeld detectie van IE-mRNA of L-mRNA, maar ook tussen actief versus latent aanwezig virus. Vooral dit laatste zou, althans theoretisch, interessante perspectieven kunnen bieden voor de herpesvirusdiagnostiek.

Virale eiwitten in geïnfecteerde cellen worden meestal aangegevoerd via immunohistochemische technieken waarbij gebruik wordt gemaakt van CMV-specifieke monoclonale antistoffen. De methode wordt in de CMV-diagnostiek vooral gebruikt voor detectie van CMV-eiwitten in

witte bloedcellen waarbij meestal gebruik wordt gemaakt van antistoffen gericht tegen het pp-65-ppUL83-eiwit. Deze test, antigenemietest genoemd, wordt in vele laboratoria gebruikt als methode voor de detectie van een actieve CMV-infectie, in het bijzonder bij orgaantransplantatiepatiënten.¹² Deze test is wat gevoeligheid betreft sterk vergelijkbaar met de PCR. De test is dan ook goed bruikbaar voor het volgen van patiënten die worden behandeld met antivirale middelen en de effectiviteit van de therapie. Bovendien zou de test duidelijk voordelen bieden op de versnelde kweek.¹³ Ook is bij de antigenemietest, evenals bij de PCR, een correlatie aangetoond tussen de mate van positiviteit (hier dus het aantal CMV-pp65 positieve cellen) en het optreden van klinische verschijnselen.

Aantonen van antistoffen

Het aantonen van antistoffen, ook wel serologisch onderzoek genoemd, is naast de viruskweek dé standaardmethode om een actieve virusinfectie te detecteren. Dit houdt in dat er ofwel een antistoftiterstijging in een serumpaars ofwel IgM-antistoffen in het serum van de patiënt dient te worden aangetoond. Bij de laatste moet echter opgemerkt worden dat de kwaliteit van de beschikbare commerciële testen vaak te wensen over laat. De interpretatie ervan dient dan ook met de nodige voorzichtigheid te worden gedaan wegens het voorkomen van veel foutpositieve resultaten. Om dit te voorkomen, is het noodzakelijk om steeds - naast de IgM-antistofbepaling - een andere, meer betrouwbare test (zoals kweek, antigenemie of PCR) te verrichten.

Voor de interpretatie van een serologisch onderzoek moet men, in het geval van een CMV-infectie, rekening houden met twee punten:

- niet elke actieve CMV-infectie leidt tot de vorming van IgM-antistoffen;¹⁴
- alhoewel de aanwezigheid van IgM-antistoffen voornamelijk wordt geassocieerd met een primaire infectie, blijken herinfecties (zowel exogene als endogene als gevolg van reactivatie van latent virus) met CMV ook te leiden tot IgM-antistofvorming.¹⁵

De IgM-antistoffen die worden gevormd, zijn voornamelijk gericht tegen twee virale eiwitten, met name pp150 en pp38.¹⁶

De waarde van 'nieuwe' testen

Zoals uit het voorgaande blijkt, is de klassieke CMV-diagnostiek, met name de kweek en de virusserologie, de laatste jaren uitgebreid met een veelheid aan nieuwe testen die zich vooral richten op de detectie van virus of delen ervan in bloed(cellen). De meest bekende zijn de antigenemie en de PCR. Beide technieken richten zich voornamelijk op de detectie van CMV-infectie door middel van onderzoek in bloed(cellen).

Alhoewel de resultaten van de diverse centra (nog) niet eenduidig zijn (soms zelf tegenstrijdig) en er nog gebrek is aan standaardisatie, moge het duidelijk zijn dat de nieuwe testen (PCR en antigenemie, maar ook de NASBA) een waardevolle uitbreiding zijn voor de CMV-diagnostiek en wel om de volgende redenen:

- over het algemeen genomen zijn deze testen zeer sensitief en hebben een hoge negatief voorspellende waarde, ook zijn ze in staat vaak als eerste een 'opkomende' CMV-infectie te detecteren;

- vooral, indien gebruik wordt gemaakt van kwantitatieve testen, is het mogelijk het verloop van een CMV-infectie te vervolgen¹⁷ en indien nodig te starten met antivirale therapie;^{3,18}
- de vermelde testen lijken geschikt voor monitoring bij patiënten die antivirale therapie krijgen.^{11,13,18,19} Ze kunnen daarbij gebruikt worden om de therapie aan te passen aan de ontwikkeling van de CMV-infectie en/of CMV-ziekte.

Samengevat: de nieuwe testen zijn nu reeds een waardevolle en zelfs onmisbare aanvulling voor de diagnostiek van CMV-infecties bij risicopatiënten (tabel I). Naast de voordelen die ze bieden ten aanzien van sensitiviteit en snelheid is er echter dringend behoefte aan standaardisering van deze technieken. Voor de antigenemietest is daar reeds een aanzet toe gedaan maar voor de andere testen dient dit nog te gebeuren.²⁰

Tabel I. Basisprincipes huidige CMV-diagnostiek.¹

Patiënten	Diagnostiek ²
Pasgeborenen (verdacht van congenitale CMV-infectie)	<ul style="list-style-type: none"> • Viruskweek uit urine (of uit keel-vloeistof) • Antigenemie of PCR (in bloedcellen) • CMV-IgM-antistoffen in serum in de eerste twee weken na de geboorte
Aids-patiënten (met aanwijzing voor klinische CMV-infectie)	<p>Detectie acute CMV-infectie</p> <ul style="list-style-type: none"> • Antigenemie of PCR (in bloedcellen) • Eventueel aangevuld met: <ul style="list-style-type: none"> - viruskweek uit bloed (of urine) - PCR of viruskweek uit ander lichaamsmateriaal (is afhankelijk van het ziektebeeld) <p>Monitoring antivirale therapie</p> <ul style="list-style-type: none"> • Kwantitatieve PCR of antigenemie (in bloedcellen)
Transplantatiepatiënten (in het bijzonder met risico op klinische CMV-infectie)	<p>Detectie acute CMV-infectie</p> <ul style="list-style-type: none"> • Antigenemie of PCR (in bloedcellen) • Eventueel aangevuld met: <ul style="list-style-type: none"> - viruskweek uit bloed of urine - PCR uit ander lichaamsmateriaal (is afhankelijk van het ziektebeeld) - CMV-IgM-antistoffen in serum <p>Vervolgen CMV-infectie/ ziekteverloop</p> <ul style="list-style-type: none"> • Kwantitatieve PCR of antigenemie (in bloedcellen) <p>Vervolgen antivirale therapie</p> <ul style="list-style-type: none"> • Kwantitatieve PCR of antigenemie (in bloedcellen)
Patiënten met 'andere' klachten (verdacht van CMV-infectie)	<ul style="list-style-type: none"> • Viruskweek uit urine (of uit keel-vloeistof of bloed) • Antigenemie of PCR (in bloedcellen) • CMV-antistoftiterstijging (serumpaars)

¹ De detectie van een actieve CMV-infectie gebeurt 'idealer' op diverse materialen in het bijzonder op bloedcellen en bij voorkeur met behulp van diverse technieken. Voor de detectie van CMV-ziekte is de combinatie van de laboratoriumuitslagen en de klinische symptomen noodzakelijk.

² Hier worden de huidige, meest gebruikte/geschikte diagnostische mogelijkheden aangeduid. Deze kunnen uiteraard steeds worden uitgebreid of vervangen door anderen.

De PCR lijkt in elk geval veelbelovende resultaten op te leveren, vooral voor het aantonen van een actieve infectie in bloed(cellen). Het gebruik van de PCR voor virusdetectie in andere materiaal zoals urine, keelspoelvoelstof en BAL, dient echter nog met de nodige reserve te gebeuren.

Het gebruik van de kwantitatieve PCR en mogelijk ook de NASBA biedt goede perspectieven. Alhoewel deze tot op heden nog vooral worden gebruikt in onderzoekscentra, is de verwachting dat ze binnen enkele jaren algemeen zullen worden ingevoerd in de reguliere diagnostiek.

Summary

CMV diagnostics: an overview

CMV infections frequently occur in the immunocompromised host. Differentiation between CMV infection and CMV disease is, especially in these patients, of great importance since in these patients 'asymptomatic' virus excretors frequently occurs while only part of them develop CMV disease. Combination of clinical picture with the results of laboratory tests for CMV are necessary for the diagnosis.

In recent years new tests with high sensitivity have been developed. Among them the CMV pp65-antigenemia assay is well known and is used in a lot of diagnostic laboratories. Several new techniques such as PCR and NASBA for detection of viral DNA and RNA are developed. Recently very promising data are obtained using quantitative PCR. By these genomic amplification techniques, it is possible to monitor the course of the CMV infection, which is very important for patients at risk for CMV disease. These tests can also be used for monitoring the response to antiviral therapy.

Keywords: cytomegalovirus, diagnosis, pp65-antigenemia, PCR, NASBA, antibody respons.

Literatuur

1. Sinzger C, Grefte A, Plachter B, Gouw AS, The TH, Jahn G. Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J Gen Virol* 1995; 76: 741-50.
2. Smith KL, Dunstan RA. PCR detection of cytomegalovirus: a review. *Br J Haematol* 1993; 84: 187-90.
3. Stephan F, Fajac A, Grenet D, et al. Predictive value of cytomegalovirus DNA detection by polymerase chain reaction in blood and bronchoalveolar lavage in lung transplant patients. *Transplantation* 1997; 63: 1430-5.
4. Cope AV, Sweny P, Sabin C, Rees L, Griffiths PD, Emery VC. Quantity of cytomegalovirus viraemia is a major risk factor for cytomegalovirus disease after renal transplantation. *J Med Virol* 1997; 52: 200-5.
5. Imbert Marcille BM, Cantarovich D, Ferre Aubineau V, Richet B, Souillou JP, Billaudel S. Usefulness of DNA viral load quantification for cytomegalovirus disease monitoring in renal and pancreas/renal transplant recipients. *Transplantation* 1997; 63: 1476-81.
6. Veal N, Payan C, Fray D, et al. Novel DNA assay for cytomegalovirus detection: comparison with conventional culture and pp65 antigenemia assay. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 3097-100.
7. Mazzulli T, Wood S, Chua R, Walmsley S. Evaluation of the Digene Hybrid Capture System for detection and quantitation of human cytomegalovirus viremia in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2959-62.
8. Emery VC. Relative importance of cytomegalovirus load as a risk factor for cytomegalovirus disease in the immunocompromised host. Basel, Monographs in Virology, KARGER, 1998.
9. Rasmussen L, Morris S, Hamed K, Merigan TC. Human cytomegalovirus DNA is present in CD45+ cells in semen from human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis* 1995; 171: 432-6.
10. Nelson CT, Ista AS, Wilkerson MK, Demmler GJ. PCR detection of cytomegalovirus DNA in serum as a diagnostic test for congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 3317-8.
11. Blok MJ, Goossens VJ, Vanherle SJV, et al. The diagnostic value of monitoring human cytomegalovirus (CMV) pp67 mRNA expression using nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) in renal allograft recipients. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1341-6.
12. The TH, Bij W van der, Berg AP van den, et al. Cytomegalovirus antigenemia. *Rev Infect Dis* 1990; 12 Suppl 7: S734-44.
13. Boeckh M, Goolley TA, Myerson D, Cunningham T, Schoch G, Bowden RA. Cytomegalovirus pp65 antigenemia-guided early treatment with ganciclovir versus ganciclovir at engraftment after allogeneic marrow transplantation: a randomized double-blind study. *Blood* 1996; 88: 4063-71.
14. Ives DV. Cytomegalovirus disease in AIDS. *AIDS* 1997; 11: 1791-7.
15. Kraat YJ, Stals FS, Christiaans MH, Lazzarotto T, Landini MP, Bruggeman CA. IgM antibody detection of ppUL80A and ppUL32 by immunoblotting: an early parameter for recurrent cytomegalovirus infection in renal transplant recipients. *J Med Virol* 1996; 48: 289-94.
16. Landini MP, Lazzarotto T, Maine GT, Ripalti A, Flanders R. Recombinant mono- and polyantigens to detect cytomegalovirus-specific immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2535-42.
17. Gerna G, Zipeto D, Parea M, et al. Monitoring of human cytomegalovirus infections and ganciclovir treatment in heart transplant recipients by determination of viremia, antigenemia, and DNAemia. *J Infect Dis* 1991; 164: 488-98.
18. Berg AP van den, Son WJ van, Haagsma EB, et al. Prediction of recurrent cytomegalovirus disease after treatment with ganciclovir in solid-organ transplant recipients. *Transplantation* 1993; 55: 847-51.
19. Einsele H, Ehninger G, Hebart H, et al. Polymerase chain reaction monitoring reduces the incidence of cytomegalovirus disease and the duration and side effects of antiviral therapy after bone marrow transplantation. *Blood* 1995; 86: 2815-20.
20. The TH, Berg AP van den, Harmsen MC, Bij W van der, Son WJ van. The cytomegalovirus antigenemia assay: a plea for standardization. *Scand J Infect Dis Suppl* 1995; 99: 25-9.

Prof. dr. C.A. Bruggeman
Academisch Ziekenhuis Maastricht
Afdeling Medische Microbiologie
Postbus 5800
6202 AZ Maastricht
E-mail: plu@lmib.azm.nl