

Клиническая значимость анализа количества цитомегаловирусов в крови для прогноза развития ЦМВ-инфекции у серонегативных реципиентов солидных органов от сероположительного донора

Атул Хумар,^{*} Карлос Пайя, Марк О. Песковиц, Эд Домингес, Кеннет Уошберн, Эмили Блумберг, Барбара Александер, Ричард Фриман, Нигель Хитон, Барбара Мюллер

Городская больница г. Торонто, Канада

Несмотря на профилактику цитомегаловирусной (ЦМВ) инфекции, после прекращения профилактики у ЦМВ-серонегативных реципиентов органов от ЦМВ-сероположительного донора (P-/D+) часто развивается ЦМВ-инфекция. Ранее выявление ЦМВ может позволить провести предупредительную терапию для предотвращения развития инфекции. Клиническая значимость количественного анализа содержания ЦМВ в крови для прогноза развития ЦМВ-инфекции была изучена у 364 больных P-/D+, получавших профилактику валганцикловиром или пероральным ганцикловиром в течение 100 дней. Анализ проводили каждые 2 недели до дня 100, а затем через 4, 4,5, 5, 6, 8 и 12 месяцев после трансплантации. За 12 месяцев ЦМВ-инфекция развилась у 64 больных (17,6%). При пороговом значении 400 копий ДНК/мл чувствительность анализа составила 38%, специфичность - 60%, достоверность прогноза наличия ЦМВ-инфекции - 17%, достоверность прогноза отсутствия ЦМВ-инфекции - 82%. Таким образом, регулярный контроль вирусной нагрузки в крови позволил бы предсказать развитие ЦМВ-инфекции только у 24 (38%) из 64 больных, у которых она в действительности развилась. При изменении порогового значения показатели теста не улучшились. Аналогично, низкую прогностическую чувствительность имело однократное измерение количества вируса в крови при окончании профилактики или через 4 месяца после трансплантации. В целом, регулярное измерение количества ЦМВ в крови имеет лишь небольшое значение для прогноза развития ЦМВ-инфекции.

Введение

Носительство цитомегаловируса (ЦМВ) остается важной причиной заболеваемости реципиентов трансплантатов солидных органов (ТСО) и может проявляться симптоматической инвазивной инфекцией тканей или "ЦМВ-синдромом" (лихорадка с лейкопенией или тромбоцитопенией или без них) (1,2). Помимо прямого влияния на заболеваемость, ЦМВ-носительство оказывает иммуносупрессивное действие, а ЦМВ-инфекция является независимым фактором риска развития оппортунистических инфекций и нарушения функции трансплантата (3-5). Риск появления ЦМВ-носительства после трансплантации прямо зависит от ЦМВ-серотипа донора и реципиента до пересадки органа, а также от применения моноклональных антител. Наибольший риск имеют ЦМВ-серонегативные реципиенты органов от ЦМВ-сероположительного донора (P-/D+), у которых заболеваемость ЦМВ-инфекцией достигает 60% при пересадке почки и 80% при пересадке печени (1,2).

Для снижения заболеваемости ЦМВ-инфекцией у больных в этой группе высокого риска применялись различные стратегии профилактики. Одна из них заключается в проведении профилактики всем больным подряд (сплошная профилактика). Эта стратегия предотвращает развитие ЦМВ-инфекции (6,7), особенно если профилактику проводят в течение 3 месяцев после трансплантации. Однако, несмотря на такую профилактику, за 6 месяцев после трансплантации ЦМВ-инфекция развивается примерно у 15% больных P-/D+, а за год - у 20% (8). Другой подход, называемый предупредительной терапией, включает скрининг больных для выявления

^{*} Автор для переписки: Atul Humar, e-mail atul.humar@uhn.on.ca

ЦМВ-носительства до появления симптомов ЦМВ-инфекции и проведение противовирусной терапии больным с ЦМВ-вирусемией для предотвращения развития ЦМВ-инфекции (9). Основным преимуществом такой стратегии является то, что противовирусные препараты получают только больные, имеющие высокий риск развития ЦМВ-инфекции. Возможной стратегией профилактики у больных Р-/Д+ является проведение сплошной профилактики с последующим регулярным контролем наличия ЦМВ-носительства до срока 1 год после трансплантации. Это может позволить рано обнаружить ЦМВ-носительство у тех больных, у которых развивается ЦМВ-инфекция, несмотря на проведение полного курса профилактики. При обнаружении вирусемии таким больным может быть проведена предупредительная терапия.

Хотя многочисленные диагностические тесты проходили проверку пригодности для применения в рамках стратегии предупредительной терапии, хорошие показатели чувствительности и специфичности прогноза ЦМВ-инфекции в определенных условиях имел количественный ПЦР-анализ содержания ЦМВ в крови. Мы провели оценку пригодности серийного анализа количества вируса в крови методом ПЦР для прогноза ЦМВ-инфекции у реципиентов СОР из группы высокого риска, получавших противовирусную профилактику в течение 3 месяцев.

Методы

Пациенты

Исследование проводилось в рамках международного рандомизированного исследования с двойным слепым контролем, в котором сравнивалась эффективность применения валганцикловира и перорального ганцикловира для первичной профилактики ЦМВ-инфекции у реципиентов ТСО Р-/Д+ (8). В этом исследовании больные были случайным образом распределены в соотношении 2:1 в группы, получавшие валганцикловир (900 мг 1 раз в день) или пероральный ганцикловир (1000 мг 3 раза в день) до дня 100 после трансплантации. Перед включением в исследование от всех больных получали информированное согласие. Для целей настоящего исследования данные о больных двух групп были объединены.

Схема исследования

От больных получали образцы крови в момент трансплантации (исходно), затем каждые 2 недели до дня 100 (окончание периода профилактики), и затем через 4, 4,5, 5, 6, 8 и 12 месяцев после трансплантации. Плазму крови отделяли и хранили до последующего количественного анализа содержания ЦМВ методом ПЦР. Лечащий врач не знал о том, какую профилактику получал данный больной, и не знал результатов ПЦР-анализа, поэтому больные не получали предупредительной терапии, исходя из этих результатов. Все анализы проводил лаборант, не знавший о клиническом состоянии больного.

Клинические определения

Развитие ЦМВ-инфекции контролировали в течение 12 месяцев после трансплантации. ЦМВ-инфекцию диагностировали по стандартным клиническим критериям и подразделяли на ЦМВ-синдром и инвазивную инфекцию тканей (10).

ЦМВ-синдром. Два и больше эпизодов лихорадки $\geq 38^{\circ}\text{C}$ за 7 дней с интервалом более 24 часов и наличие ЦМВ в крови, подтвержденное в централизованной лаборатории, а также одно из следующего: плохое самочувствие, атипичный лимфоцитоз ($>5\%$), тромбоцитопения, повышение уровня трансаминаз.

Инвазивная инфекция тканей. Симптомы и признаки (в том числе лабораторные показатели) нарушения функций органов и признаки наличия ЦМВ в биопсийном образце или другом подходящем образце (напр., бронхоальвеолярном смыве, спинномозговой жидкости).

Все случаи предполагаемой ЦМВ-инфекции рассматривались по слепому принципу независимым комитетом по оценке регистрируемых показателей.

Лабораторные методы

Количественный ПЦР-анализ плазмы крови проводили с помощью набора реагентов Cobas Amplicor CMV Monitor (Roche Diagnostic Systems, США) в соответствии с инструкцией производителя. Результаты представляли как количество копий вирусной ДНК в 1 мл плазмы крови. Порог измерения данного теста составляет 400 копий/мл.

Анализ

С помощью матрицы 2x2 рассчитывали чувствительность, специфичность, достоверность прогноза наличия (ДПН) и достоверность прогноза отсутствия (ДПО) ЦМВ-инфекции. Поскольку целью было предсказание последующего развития ЦМВ-инфекции, для анализа использовали только результаты, полученные до развития инфекции. Для первоначального анализа положительным результатом ПЦР-теста считали наличие вируса в количестве выше порога измерения. Поскольку данный тест количественный, рассчитывали чувствительность и специфичность при различных пороговых значениях и строили кривые изменения характеристик (КИХ) (11). Все статистические анализы проводили с помощью компьютерной программы SAS 8.0 (SAS Institute Inc., США).

Результаты

Пациенты

Для оценки прогностической значимости анализа количества вирусов в крови были объединены данные о 364 больных Р-/Д+, включенных в сравнительное исследование валганцикловира и ганцикловира (177 реципиентов трансплантата печени (в том числе 2 - печень + почка), 120 реципиентов почки, 56 - сердца, 11 - почки + поджелудочной железы). Подробные данные о заболеваемости этих больных ЦМВ-инфекцией опубликованы ранее (8). За год после трансплантации общая заболеваемость составила 17,6% (64 из 364 больных) и в двух группах больных была одинакова. Среди этих 64 случаев было 30 случаев инвазивной инфекции тканей и 34 случая развития ЦМВ-синдрома. В период проведения профилактики (до дня 100 после трансплантации) зарегистрировано лишь 4 случая ЦМВ-инфекции; большинство случаев (44 из 64, или 68,8%), развились в период между днем 100 и 6 месяцем после трансплантации. В период между 6 и 12 месяцем зарегистрировано 16 случаев ЦМВ-инфекции (25%).

Вирусология

В среднем, каждому больному было проведено 12 анализов крови. В период проведения профилактики доля больных с ЦМВ-вирусемией в обеих группах больных была низкой (валганцикловир - 2,5%, ганцикловир - 10,4%). К 6 и 12 месяцам после трансплантации частота вирусемии увеличилась, но в двух группах больных оставалась одинаковой. В целом, в эти сроки по крайней мере один положительный результат анализа (т.е. количество вируса более 400 копий/мл) имели соотв. 149 (40,1%) и 177 (48,6%) больных. Среднее содержание вируса у больных с ЦМВ-инфекцией составляло 34 062 копии/мл (медиана 20 150, диапазон <400 - 100 000), а у больных без ЦМВ-инфекции - 7719,5 копий/мл (медиана <400, диапазон <400 - 100 000).

Таблица 1. Показатели пригодности количественного анализа содержания вируса в крови для прогноза ЦМВ-инфекции

Срок тестирования (порог >400 копий/мл)	чувствительность (%)	специфичность (%)	достоверность прогноза наличия (%)	достоверность прогноза отсутствия (%)
суммарно по всем точкам	38	60	17	82
только день 100	4	96	14	84
только месяц 4	18	85	19	84

Прогноз ЦМВ-инфекции

Была проведена оценка пригодности результатов ПЦР-анализа ЦМВ, полученных до выявления ЦМВ-инфекции, для прогноза последующего развития ЦМВ-инфекции. За 12 месяцев ЦМВ-инфекция развилась у 64 больных (17,6%). При пороговом значении положительного результата 400 копий ДНК/мл чувствительность анализа для

прогноза развития ЦМВ-инфекции составила 38%, специфичность - 60%, ДПН - 17%, ДПО - 82% (таблица 1). Судя по этим данным, регулярный контроль количества вируса в крови позволил бы предсказать развитие ЦМВ-инфекции только у 24 (38%) из 64 больных, у которых она в действительности развилась. Поэтому, скорее всего, у большинства больных с ЦМВ-инфекцией измеримое количество вируса в крови появляется только после развития инфекции, а не до этого. Кроме того, у большинства больных с измеримой вирусемией ЦМВ-инфекция впоследствии не развивалась; об этом говорит величина ДПН всего 17%, которая отражает спонтанное исчезновение слабой ЦМВ-вирусемии у многих больных. У больных, имевших измеримую вирусемию до развития инфекции, средний срок от первого выявления вируса до развития инфекции составлял всего 12 дней (диапазон 2-100 дней). Такой срок имеют врачи для начала проведения предупредительной терапии, если данный тест будет использоваться в клинических условиях.

Была построена кривая изменения характеристик теста при изменении порогового значения положительного результата (рисунок 1). Повышение порога приводит лишь к слабому увеличению специфичности, но снижает чувствительность (таблица 2, рисунок 1). Например, при пороговом значении положительного результата >5000 копий/мл специфичность повысилась до 78%, но чувствительность упала до 19% (было обнаружено только 12 и 64 случаев ЦМВ-инфекции). Поэтому оптимальное пороговое значение положительного результата лежит в пределах 400-1000 копий/мл. При повышении этого значения выше 1000 копий/мл специфичность несколько увеличивается, но чувствительность снижается (чувствительность 33%, специфичность 65%, ДПН 17%, ДПО 82%).

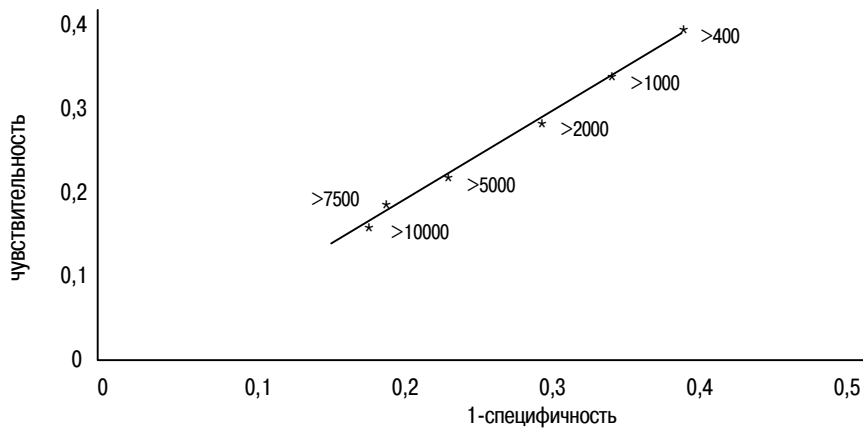


Рисунок 1. Кривая изменения характеристик прогноза ЦМВ-инфекции при изменении порогового значения положительного результата количественного ЦПР-анализа

Цифры на кривой соответствуют пороговому значению (копий ДНК/мл)

Таблица 2. Пригодность количественного анализа содержания вируса в крови для прогноза ЦМВ-инфекции при разных пороговых значениях положительного результата (суммарно по всем точкам)

Пороговое значение положительного результата	чувствительность (%)	специфичность (%)	достоверность прогноза наличия (%)	достоверность прогноза отсутствия (%)
>1000	33	65	17	82
>2000	27	70	16	82
>5000	19	78	15	82
>7500	16	82	16	82
>10 000	14	84	16	82
>15 000	13	86	16	82

Также была проведена оценка прогностической значимости результатов анализа, выполненного в конце периода профилактики (день 100) и через 4 месяца после трансплантации, чтобы определить клиническую

значимость более простой схемы обследования больных. Анализ в эти моменты времени имел хорошую специфичность, но очень низкую чувствительность для прогноза ЦМВ-инфекции (4% в день 100 и 18% через 4 месяца) (таблица 1). Кроме того, был проведен анализ зависимости характеристик теста от типа трансплантата; результаты этого анализа представлены в таблице 3. Группа реципиентов почки + поджелудочной железы включала всего 11 больных, что затрудняет интерпретацию результатов. Среди остальных больных анализ содержания вируса в крови имел несколько более высокую чувствительность у реципиентов печени. У больных, получавших профилактику валганцикловиром и ганцикловиром, прогностическая ценность тестирования количества вируса в крови была одинакова. Суммарно для всех сроков измерения чувствительность, специфичность, ДПН и ДПО анализа в группе больных, получавших ганцикловир (n=125), составляла соотв. 35%, 60%. 17% и 80%; для больных, получавших валганцикловир (n=239), эти цифры составили соотв. 39%, 60%, 17% и 83%. Из 364 больных, включенных в исследование, у 2 (по одному в каждой группе) анализ содержания ЦМВ в крови не проводился, и эти больные не были включены в анализ.

Обсуждение

Стратегии профилактики ЦМВ-инфекции после трансплантации органов включают полную профилактику, селективную профилактику и предупредительную терапию. Учитывая высокий риск развития ЦМВ-инфекции у больных P-/Д+, не получающих профилактики (до 80%), предпочтительной стратегией для них является полная профилактика (1,2). Это также может иметь дополнительное преимущество предотвращения опосредованных последствий размножения ЦМВ (напр., нарушения функций трансплантата), которые могут проявляться также и у больных, не имеющих ЦМВ-инфекции (5). Однако, несмотря на 3-месячную антивирусную профилактику, у 20% реципиентов ТСО P-/Д+ в течение года после

Таблица 3. Пригодность количественного анализа содержания вируса в крови для прогноза развития ЦМВ-инфекции у реципиентов разных типов трансплантатов (суммарно по всем точкам)

Тип трансплантата	чувствительность (%)	специфичность (%)	достоверность прогноза наличия (%)	достоверность прогноза отсутствия (%)
почка	25	68	16	80
печень	47	56	19	82
сердце	25	55	9	81
почка + поджелудочная железа	100	80	33	100

трансплантации развивается ЦМВ-инфекция; обычно это происходит после окончания профилактики, между 3 и 12 месяцем после трансплантации (8). Мы изучали, насколько регулярный контроль содержания вируса в крови полезен для прогноза развития ЦМВ-инфекции у получающих профилактику больных из группы высокого риска (P-/Д+), и, соответственно, для применения в рамках стратегии предупредительной терапии.

Чтобы диагностический тест можно было использовать для предупредительной терапии, он должен точно выявлять больных, у которых разовьется и не разовьется ЦМВ-инфекция. В группе из 364 реципиентов ТСО P-/Д+ мы обнаружили, что регулярный контроль количества вируса в крови имеет лишь небольшое клиническое значение. Если этот анализ проводить в изученные нами сроки в рамках стратегии предупредительной терапии, то он позволил бы предсказать только 24 из 64 реально развившихся случаев ЦМВ-инфекции. При этом в качестве кандидатов на развитие ЦМВ-инфекции будет определен ряд больных с ЦМВ-вирусемией, у которых в действительности инфекция не разовьется, и эти больные будут напрасно получать предупредительную терапию. Эта переходящая самоограничивающаяся вирусемия может быть частично обусловлена изменением патогенеза ЦМВ-инфекции у больных, получающих длительную антивирусную профилактику. Улучшение

иммунных функций после завершения антивирусной профилактики может приводить к спонтанному исчезновению вируса. Изменение порогового значения положительного результата теста лишь незначительно улучшало характеристики теста, как показано на рис.1. Однократное измерение количества вируса в крови в конце периода профилактики (день 100) или через 4 месяца после трансплантации тоже имело низкую чувствительность и, соответственно, клиническую значимость. Поскольку до дня 100 зарегистрировано очень мало случаев вирусемии и ЦМВ-инфекции, регулярный контроль количества вирусов в крови в этот период даст мало пользы. Учитывая эти данные, анализ результатов тестирования, проведенного в период с дня 100 до 6 месяца после трансплантации, т.е. в период, когда развивается большинство случаев инфекции, может иметь большее клиническое значение. Кроме того, более частый и регулярный анализ количества вирусов в крови может дать дополнительные данные, на основании которых могут быть определены стратегии тестирования, оптимальные для прогноза ЦМВ-инфекции. Дополнительное тестирование увеличивает стоимость лечения, но если оно позволит прогнозировать развитие ЦМВ-инфекции с достаточной точностью, то возможная экономия, полученная в результате не проведения лечения больным, у которых ЦМВ-инфекция маловероятна, может перевешивать дополнительные затраты на тестирование.

Для прогноза развития ЦМВ-инфекции у реципиентов ТСО применялись и оценивались разные методы. Прогностическая значимость тестов, основанных на вирусологическом посеве, оказалась разочаровывающе слабой из-за низкой чувствительности и длительности выполнения анализа (12,13). Другие тесты включают анализ антигена ЦМВ в крови, анализ мРНК, метод гибридизации ДНК, а также качественный и количественный ПЦР-анализ (11,14, 15,16-18). Исследования, в которых оценивались эти методы, очень разнородны, различаются по схеме профилактики, соблюдению слепого принципа и категории обследованных больных. Общее количество больных Р-/Д+, участвовавших в ранее проведенных исследованиях, невелико по сравнению с количеством участников нашего исследования. В опубликованных исследованиях специфичность и чувствительность тестов значительно варьируют. В целом, однако, в исследованиях с использованием количественных методов анализа получены лучшие результаты, чем у нас. Например, в исследовании с участием 50 реципиентов трансплантата почки, которым регулярно проводили ПЦР-анализ содержания вируса в крови, ЦМВ-инфекция развилась у 23 (46%) больных. Чувствительность анализа для прогноза последующего развития инфекции составила 65%, а специфичность – 59% (16). В другом исследовании с участием 97 реципиентов трансплантата печени чувствительность анализа содержания вируса в крови (с помощью набора Roche Amplicor) для прогноза последующего развития ЦМВ-инфекции составила 100% при специфичности 47,4%. В этом исследовании ЦМВ-инфекцию определяли по стандартным клиническим критериям (10). Однако большинство участников этих исследований не были Р-/Д+, не получали антивирусной профилактики, и анализ содержания вируса в крови им проводили чаще, чем мы (17). ПЦР-анализ плазмы крови может иметь меньшую чувствительность, чем анализ других типов образцов. Разонабл с соавт. сравнивали концентрацию ДНК ЦМВ в цельной крови, плазме и лейкоцитах 17 больных с ЦМВ-инфекцией и обнаружили максимальное содержание ДНК в цельной крови. Это позволяет предположить, что анализ цельной крови может иметь более высокую чувствительность для прогноза ЦМВ-инфекции в рамках стратегии предупредительной терапии (19). В исследовании с участием 30 реципиентов трансплантата почки было проведено сравнение нескольких тестов, используемых для прогноза ЦМВ-инфекции, в том числе анализа антигена ЦМВ в крови, ПЦР-анализа плазмы крови, ПЦР-анализа лейкоцитов периферической крови, гибридизации ДНК в цельной крови с помощью набора Nuclisens pp67 CMV. В результате показано, что анализ с использованием лейкоцитов периферической крови более чувствителен, чем анализ плазмы крови. Однако срок выполнения анализа лейкоцитов периферической крови составлял 9-10 дней, а анализа плазмы крови – 5-6 дней (14).

Наше исследование имеет несколько сильных аспектов. Во-первых, это крупнейшее из опубликованных до сих пор исследований с участием реципиентов ТСО Р-/Д+, у которых проводились такие анализы. Все данные, в том числе об исходе ЦМВ-инфекции, были получены проспективно в рамках международного исследования, в

котором регистрируемые показатели оценивались независимым комитетом по слепому принципу. Кроме того, поскольку лечащий врач не знал о результатах анализа содержания вирусов в крови больных, больные не получали предупредительной терапии на основе этих данных. Это позволяло оценить истинную прогностическую значимость данного анализа. Хотя все больные получали противовирусную профилактику, основной целью исследования была оценка того, какие клинические преимущества дает регулярное тестирование количества вирусов в крови в дополнение к противовирусной профилактике. Ограничениями данного исследования являются относительно высокая разнородность обследованной группы больных, включавшей реципиентов разных типов трансплантатов, а также неравномерные интервалы проведения анализов.

Данные о больных, получавших профилактику ганцикловиром и валганцикловиром, были объединены. При отдельном анализе в этих группах больных различия характеристик теста не обнаружено.

Таким образом, регулярный количественный анализ содержания ЦМВ в крови методом ПЦР имел лишь небольшое клиническое значение для прогноза развития ЦМВ-инфекции в большой группе реципиентов TCO R-/D+. Проведение анализов в период профилактики клинически не оправдан, а после окончания профилактики позволяет выявить примерно треть больных, у которых впоследствии разовьется инфекция. При этом также будут ложно-положительные результаты. Альтернативная стратегия скрининга может включать способы улучшения характеристик тестов. Например, это может достигаться путем более интенсивной схемы контроля. Однако через 3 месяца после трансплантации большинству больных не требуется частых внутривенных процедур, и многие из них могут счесть неудобным частую сдачу крови для тестирования ЦМВ. Возможно, что снижение порога измерения теста (напр., путем анализа лейкоцитов вместо плазмы крови) может увеличить чувствительность. Наконец, еще одной альтернативой для некоторых больных может быть удлинение срока профилактики свыше 3 месяцев; оптимальная длительность проведения профилактики валганцикловиром у реципиентов трансплантата легкого составляет не менее 180 дней (20).

Благодарность

Исследование финансировалось компанией Ф. Хоффманн-Ля Рош, Швейцария

Заявление о совпадении интересов

Атул Хумар и Марк Песковиц являются консультантами спонсора. Барбара Мюллер является сотрудником компании-спонсора. Эмили Блумберг получила гонорар за выступление от имени спонсора.