

MIROSLAW MARKIEWICZ, EWA RZENNO, AGNIESZKA KAROLCZYK, MAŁGORZATA STACHOWICZ,
MONIKA DZIERŻAK-MIETŁA, KINGA GWÓZDŹ, JOANNA DZIACZKOWSKA-SUSZEK

Ocena częstości występowania zakażeń wirusami hepatotropowymi u pacjentów poddanych allogenicznej transplantacji krwiotwórczych komórek macierzystych od dawcy niespokrewnionego*

Incidence of hepatotropic viruses infection in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from an unrelated donor

Katedra i Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku, Wydział Lekarski w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

KEYWORDS

allogeneic stem cell transplantation, cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, hepatitis B virus, hepatitis C virus, molecular diagnostics

SUMMARY

Introduction. The broad indications for allogeneic transplantation of hematopoietic stem cells (allo-HSCT) and the use of immunosuppression after transplantation pose a risk of frequent occurrence of viral infections.

Aim. The subject of the work is the analysis of serological status and prevalence of primarily (HBV, HCV) and secondarily (CMV, EBV) hepatotropic viruses in the group of patients treated with allo-HSCT from unrelated donors and assessment of the usefulness of serological and biomolecular methods in virological diagnostics both before and after transplantation.

Material and methods. The study included 157 patients after allo-HSCT performed due to hematopoietic system diseases in the period 01.2015-03.2017.

Results. The presence of anti-HBc and anti-EBV antibodies in the IgM class was demonstrated in 6 and 2.5% of patients before transplantation, in which DNA testing excluded presence of the viral load what allowed to perform the transplantation. Reactivation of HBV-DNA after transplantation was found in two patients with a long history of hepatitis B. In the post-transplant period, EBV viremia was detected in 31% of patients and CMV in 39% of patients. The frequency of CMV reactivation varied depending on the initial serological status of the donor-recipient pairs prior to transplantation. The reactivation of EBV and CMV had an effect on the survival of the patients and often occurred simultaneously. There was no case of HCV infection.

Conclusions. Molecular studies of hepatotropic viruses prior to allo-HSCT are justified in the presence of serological markers suggesting the possibility of infection, which most often concerns HBV and EBV. Examination of CMV-DNA and EBV-DNA after allo-HSCT enables to detect reactivation of the virus in a significant proportion of patients, which is associated with an increased risk of adverse course of the disease. CMV viremia, the detection of which enables the implementation of proper treatment, occurs most frequently in patients whose serological status of CMV before transplantation was positive.

WSTĘP

Szerokie wskazania do allogenicznego przeszczepienia krwiotwórczych komórek macierzystych (ang. *allogeneic hematopoietic stem cells transplantation* – allo-HSCT) oraz stosowanie immunosupresji w okresie po transplantacji stwarzają ryzyko częstego występowania infekcji wirusowych i predysponują do reaktywacji infekcji latentnych. Dlatego uzasadnione jest podjęcie badań oceniających

stan obronności humoralnej w odniesieniu do infekcji wirusowych u chorych przed allo-HSCT oraz występowanie wirusów hepatotropowych po przeszczepieniu i ich wpływ na przeżycie chorych.

Wykluczenie infekcji wirusowych u chorych przed allo-HSCT opiera się na badaniach serologicznych, które w razie podejrzenia infekcji uzupełniane są o diagnostykę molekularną. Pogłębianie diagnostyki wydłuża czas

*Praca finansowana w ramach projektu nr KNW-1-175/N/6/K.

niezbędny do akceptacji biorcy i może wpłynąć na brak możliwości utrzymania zaplanowanego terminu przeszczepienia, w przypadku wykrycia wirerii wykonanie przeszczepienia musi być bezwarunkowo odroczone. Diagnostyka stanu wirerii po allo-HSCT opiera się wyłącznie na badaniach metodami biomolekularnymi, gdyż ze względu na niedobory immunokompetentnych limfocytów oraz stosowaną immunosupresję obecność wirusa nie uruchamia reakcji odpornościowej z wytworzeniem przeciwciał, a tym samym metody serologiczne nie mają wówczas zastosowania.

Przedmiotem pracy jest analiza stanu serologicznego i częstości występowania przypadków zakażeń wirusami pierwotnie (HBV – wirus zapalenia wątroby typu B, HCV – wirus zapalenia wątroby typu C) oraz wtórnie (CMV – wirus cytomegalii, EBV – wirus Epsteina-Barr) hepatotropowymi w grupie pacjentów poddanych allo-HSCT od dawcy niespokrewnionego oraz ocena przydatności metod serologicznych i biomolekularnych w diagnostyce wirusologicznej zarówno przed przeszczepieniem, jak i po.

CEL PRACY

Celem pracy jest analiza stanu serologicznego i częstości występowania przypadków zakażeń wirusami pierwotnie (HBV – wirus zapalenia wątroby typu B, HCV – wirus zapalenia wątroby typu C) oraz wtórnie (CMV – wirus cytomegalii, EBV – wirus Epsteina-Barr) hepatotropowymi w grupie pacjentów poddanych allo-HSCT od dawcy niespokrewnionego oraz ocena przydatności metod serologicznych i biomolekularnych w diagnostyce wirusologicznej zarówno przed przeszczepem, jak i po nim.

MATERIAŁ I METODY

Badaniem objęto 157 pacjentów: 81 (52%) mężczyzn i 76 (48%) kobiet, mediana wieku 46 (18-72) lat, po allo-HSCT od dawcy niespokrewnionego wykonanym z powodu ostrej białaczki szpikowej (n = 70), ostrej białaczki limfoblastycznej (n = 30), zespołu mielodysplastycznego (n = 19), przewlekłej białaczki szpikowej (n = 8), włóknienia szpiku (n = 8) i innych chorób układu krwiotwórczego (n = 22) po leczeniu kondycjonującym TBI-Cy (41), BuFlu (36), BuCy (34), TreoFlu (32), TreoCy (6), TBI-Flu (3), TBI-Melphalan (3), BEAM (1) w okresie od stycznia 2015 do marca 2017 roku. Źródłem komórek macierzystych u wszystkich chorych była krew obwodowa, w trzech przypadkach materiał przeszczepowy pochodził z krioprezerwacji. Wszyscy chorzy otrzymywali standardową terapię immunosupresyjną w oparciu o myklosporynę A i metotreksat oraz globulinę antytymocytową przed przeszczepieniem, w 10 przypadkach dodatkowo zastosowano mykofenolan mofetylu.

Badanym materiałem była żylna krew obwodowa w objętości 6 ml pobrana na wersenian dwusodowy (EDTA). DNA wirusów CMV i EBV wyizolowano z krwi pełnej, DNA wirusa HBV z odwirowanego osocza (warunki wirowania: 2000 xg, 20 minut) za pomocą komercyjnie dostępnego kitu do izolacji firmy Roche Diagnostics (High Pure Viral Nucleic

Acid Kit – Roche Life Science). RNA wirusa HCV wyizolowano z odwirowanego osocza za pomocą kitu do izolacji firmy Marcherey (Nagel, Nucleospin Dx Virus).

Przed przeszczepieniem u biorców wykonano badania przesiewowe markerów serologicznych HBV (HBc-Ab, HBs-Ab, HBs-Ag), HCV (HCV-Ab), CMV (CMV-IgG, CMV-IgM), EBV (EBV-IgG, EBV-IgM). W przypadku podejrzenia infekcji wirusowej materiał genetyczny HBV-DNA, HCV-RNA, CMV-DNA i EBV-DNA amplifikowano na aparacie 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystem) przy użyciu kitów firmy Qiagen (QPCR: ilościowa reakcja łańcuchowej polimerazy). Dane dotyczące stanu wirusologicznego dawców uzyskano z raportów badań weryfikacyjnych wykonywanych w celu dopuszczenia ich do donacji, przesłanych przez rejestry dawców. Po przeszczepieniu CMV-DNA badano co tydzień, poczynając od uzyskania regeneracji leukocytów > 1 G/l, EBV zbadano u części (51) pacjentów, natomiast HBV i HCV badano wyłącznie w przypadku klinicznego podejrzenia zakażenia. Analizowano częstość występowania zakażeń wirusami hepatotropowymi w badanej grupie pacjentów w przebiegu poprzyszczepowym oraz odniesiono ją do wyjściowego stanu serologicznego pacjentów oraz ich dawców.

WYNIKI

U 9 (6%) chorych bezpośrednio przed przeszczepieniem stwierdzono obecność przeciwciał anti-HBc. U 3 pacjentów z wykrytymi przeciwciałami anti-HBc stosowano profilaktyczne leczenie lamiwudyną, u 1 pacjentki tylko przejściowo wobec negatywnej weryfikacji wyniku badania HBV-DNA, u 2 pozostałych pacjentów z dwu- i trzyletnim wywiadem wirusowego zapalenia wątroby typu B pomimo stosowania lamiwudyny w 27. oraz w 144. dobie po allo-HSCT wykazano obecność 4 i 12 IU/ml HBV-DNA wskazującą na reaktywację HBV i skierowano chorych do poradni chorób zakaźnych. Łącznie w okresie poprzyszczepowym wskazania do wykonania badania HBV-DNA zaistniały u 4 chorych w dobie 86. (21-159) [mediana (zakres)] po allo-HSCT. U pozostałych 2 chorych wynik badania HBV-DNA był negatywny, rozpoznano u nich postać wątrobową III stopnia ostrej choroby GVH, która przebiegała z podwyższonym stężeniem transaminaz.

U żadnego chorego przed przeszczepieniem nie wykryto przeciwciał anti-HCV i w związku z tym nie badano wówczas HCV-RNA. W okresie poprzyszczepowym u 2 chorych z wątrobową postacią GVHD wykluczona została obecność HCV-RNA. Były to zarazem jedyne przypadki chorych, u których zaistniało wskazanie do wykonania badania HCV-RNA.

Przed przeszczepieniem EBV-DNA zostało zbadane u 5 chorych, w 1 przypadku z powodu dolegliwości i stanów gorączkowych sugerujących możliwość infekcji wirusowej, w 4 przypadkach z powodu wykrycia przeciwciał anti-EBV w klasie IgM w trakcie badań kontrolnych rutynowo wykonywanych przed przeszczepieniem. Wynik badania EBV-DNA w każdym z tych przypadków był negatywny. W okresie poprzyszczepowym EBV-DNA zbadano

u 51 chorych. Wiremia EBV w ilości 2905 (1-523 957) kopii/ml [mediana (zakres)] została wykryta u 16 (31%) chorych w dobie 31. (23-657) [mediana (zakres)] po allo-HSCT i miała przebieg bezobjawowy. W tej grupie chorych przed allo-HSCT u 15 (94%) pacjentów i u 14 (88%) ich dawców obecne były przeciwciała anti-EBV w klasie IgG oraz u 3 (19%) chorych w klasie IgM.

U żadnego chorego przed przeszczepieniem nie stwierdzono obecności przeciwciał anti-CMV w klasie IgM ani nie podejrzewano zakażenia CMV i w związku z tym nie badano wówczas CMV-DNA. W okresie poprzszczepowym wiremia w ilości 97 (8-8607) kopii CMV/ml [mediana (zakres)] została wykryta u 62 (39%) chorych w dobie 42. (7-132) [mediana (zakres)] po allo-HSCT. Częstość reaktywacji CMV była różna w zależności od wyjściowego statusu serologicznego par dawca-biorca przed przeszczepieniem. Częstość występowania reaktywacji była największa w przypadku obecności przeciwciał anti-CMV u biorcy i ich braku (59%: 63 pary, 37 reaktywacji) lub obecności (31%: 75 par, 23 reaktywacje) u dawcy, natomiast najmniejsza w przypadku braku przeciwciał anti-CMV u biorcy i ich braku (0%: 11 par, 0 reaktywacji) lub obecności (13%: 8 par, 1 reaktywacja) u dawcy.

Wśród 51 chorych, u których zbadano molekularnie CMV i EBV po allo-HSCT, reaktywację EBV obserwowano u 13 (50%) z 26 pacjentów, u których doszło również do reaktywacji CMV oraz u 3 (12%) z 25 osób, u których nie obserwowano reaktywacji CMV.

Proporcja przeżywających chorych, u których wykryto wiremię EBV lub CMV, była niższa niż przy braku wiremii niezależnie od rodzaju wirusa: w przypadku wykrycia lub braku EBV przeżyło odpowiednio 69% (19 z 15 chorych) i 80% (28 z 35 chorych), a w odniesieniu do CMV odpowiednio 69% (42 z 61 chorych) i 81% (78 z 96 chorych). Z dwojga chorych, u których po allo-HSCT wystąpiła wiremia HBV, żyje tylko jeden.

DYSKUSJA

W badanej grupie wykazano obecność przeciwciał anti-HBc i anti-EBV w klasie IgM odpowiednio u 6 i 2,5% chorych, u wszystkich z nich wykluczono wiremię, co umożliwiło realizację zaplanowanej procedury przeszczepowej, natomiast u żadnego chorego przed przeszczepieniem nie obserwowano obecności przeciwciał anti-HCV ani anti-CMV w klasie IgM.

U obydwu chorych z wywiadem WZW B i obecnością przeciwciał anti-HBc, pomimo wykluczenia wiremii przed przeszczepieniem, w okresie poprzszczepowym obserwowano reaktywację HBV. Jest to spójne z danymi literaturowymi, według których u ponad 60% chorych z antygenem HBs przed przeszczepieniem obserwuje się reaktywację HBV po przeszczepieniu (1).

Po przeszczepieniu najczęściej obserwowano reaktywację CMV (u 39% chorych) i EBV (u 31% chorych), co uzasadnia rutynowe badanie obecności CMV-DNA oraz EBV-DNA

u pacjentów po allo-HSCT. Obserwowana mediana czasu reaktywacji CMV wynosiła 42 dni. Uzyskane wyniki są zbieżne z doniesieniem, według którego DNA wirusa cytomegalii zostało wykryte w 15-70% przypadków chorych po allo-HSCT w medianie od 31 do 53 dni (2).

Obserwowane występowanie wiremii EBV u 31% chorych jest porównywalne z raportowaną częstością występowania zakażenia EBV u 48% biorców komórek krwiotwórczych, w większości przypadków na podstawie wykazania EBV-DNA w krwi obwodowej (3). Raportowana przez różne ośrodki przeszczepowe częstość występowania EBV-DNA jest zróżnicowana i mieści się w szerokim zakresie 0,1-63% w zależności od rodzaju przeszczepienia, czułości metody, ustalonego progu wiremii oraz częstości i czasu oznaczeń (4).

Według zaleceń konferencji dotyczącej infekcji wśród pacjentów z rozpoznaną białaczką (European Conference on Infections in Leukemia – ECIL), cotygodniowe monitorowanie EBV-DNA powinno rozpoczynać się w ciągu pierwszego miesiąca po allo-HSCT z kontynuacją do co najmniej 4. miesiąca, a w razie wzrostu wiremii zaleca się zwiększenie częstości oznaczeń (4). Zalecenia częstego wielomiesięcznego monitorowania EBV-DNA są jednak trudne do zrealizowania. Zjawisko reaktywacji EBV w okresie poprzszczepowym jest powszechne i we wszystkich obserwowanych przypadkach przebiegała ona bezobjawowo. W związku z tym uzasadniony wydaje się pogląd, iż przy braku obecności dodatkowych czynników ryzyka ciągłe monitorowanie EBV nie znajduje wystarczającego uzasadnienia klinicznego.

W grupie 51 chorych, u których po allo-HSCT zbadano molekularnie zarówno CMV, jak i EBV, reaktywacja EBV występowała częściej w przypadku jednoczesnej reaktywacji CMV (50% chorych) niż u chorych, u których nie obserwowano reaktywacji CMV (12% chorych). Równoczesne występowanie CMV i EBV było obserwowane już uprzednio i interpretowane możliwością protekcyjnego oddziaływania tych wirusów (3). Monitorowanie poziomu DNA wirusa umożliwia zastosowanie leczenia wyprzedzającego, które doprowadziło w ostatnich latach do znacznego obniżenia chorobotwórczości i śmiertelności w wyniku aktywnej infekcji CMV u pacjentów po allo-HSCT (5).

Częstość reaktywacji CMV była uzależniona od statusu serologicznego w zakresie przeciwciał anti-CMV par dawca-biorca przed przeszczepieniem. Do reaktywacji CMV dochodziło najczęściej wówczas, gdy chory był dodatni, a dawca ujemny, nieco rzadziej, gdy również dawca był dodatni, natomiast najrzadziej wtedy, gdy status serologiczny chorego był ujemny. Podobnie inni autorzy wykazali, że ryzyko reaktywacji CMV i niepomyślnego przebiegu leczenia jest w znacznym stopniu zależne od statusu serologicznego dawcy (D) i biorcy (B) (D-/B+ > D+/B+ > D+/B- > D-/B-) (6, 7) oraz że seropozytywny biorca stanowi niezależny czynnik predykcyjny reaktywacji CMV (8).

WNIOSKI

Badania wirusów hepatotropowych przed allo-HSCT metodami molekularnymi są uzasadnione w przypadku stwierdzenia obecności markerów serologicznych, mogących wskazywać na zakażenie. Wykluczenie wirerii u serododatnich chorych umożliwia przeprowadzenie u nich allo-HSCT. Najczęściej dotyczy to występowania przeciwciał anty-HBc oraz anty-EBV IgM.

Badanie CMV-DNA i EBV-DNA po allo-HSCT umożliwia u istotnej części chorych wykrycie reaktywacji wirusa, która wiąże się ze zwiększeniem ryzyka niepożądanego przebiegu choroby. Wiremia CMV, której wykrycie umożliwia wdrożenie właściwego leczenia, występuje najczęściej u chorych, u których status serologiczny CMV przed przeszczepieniem był dodatni.

KONFLIKT INTERESÓW CONFLICT OF INTEREST

Brak konfliktu interesów
None

ADRES DO KORESPONDENCJI

Mirosław Markiewicz
Katedra i Klinika Hematologii
i Transplantacji Szpiku
Wydział Lekarski w Katowicach
Śląski Uniwersytet Medyczny
w Katowicach
ul. Dąbrowskiego 25, 40-032 Katowice
tel.: +48 507-100-165
mir.markiewicz@wp.pl

nadesłano: 17.01.2018

zaakceptowano do druku: 7.02.2018

PIŚMIENICTWO

1. Locasciulli A, Montante B, Morelli E et al.: Hepatitis B and C in hematopoietic stem cell transplant. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2009; 1(3): e2009016.
2. Dzieciatkowski T, Wróblewska M: Zakażenia wirusem cytomegalii oraz ich diagnostyka laboratoryjna u biorców komórek krwiotwórczych. *Diagn Lab* 2015; 51(1): 59-62.
3. Zawilińska B, Piątkowska-Jakubas B, Kopeć J et al.: Zakażenia wirusem Epsteina-Barr (EBV) u pacjentów leczonych allogenicznym przeszczepieniem komórek hematopoetycznych (allo-HCT). *Przegl Epidemiol* 2006; 60(1): 87-92.
4. Styczynski J, van der Velden W, Fox CP et al.: Management of Epstein-Barr Virus infections and post-transplant lymphoproliferative disorders in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Sixth European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-6) guidelines. *Haematologica* 2016; 101(7): 803-811.
5. Bocian J, Januszkiewicz-Lewandowska D: Infekcje ludzkim wirusem cytomegalii po transplantacji macierzystych komórek krwiotwórczych – metody diagnostyczne i znaczenie monitorowania poziomu DNA wirusa. *Postepy Hig Med Dosw* 2015; 69: 252-263.
6. Camargo JF, Komanduri KV: Emerging concepts in cytomegalovirus infection following hematopoietic stem cell transplantation. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* 2017; 10(4): 233-238.
7. Ljungman P, Hakki M, Boeckh M: Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Hematol Oncol Clin North Am* 2011; 25(1): 151-169.
8. Krenska A, Styczynski J, Dębski R et al.: Przedtransplantacyjne czynniki ryzyka reaktywacji zakażenia wirusem cytomegalii po przeszczepieniach allogenicznych komórek hematopoetycznych u dzieci i młodych dorosłych. *Acta Haem Pol* 2013; 44(4): 399-404.