

Barbara Zawilińska<sup>1</sup>, Magdalena Kosz-Vnenchak<sup>2</sup>, Beata Piątkowska-Jakubas<sup>3</sup>,  
Jolanta Kopeć<sup>1</sup>, Ewa Daszkiewicz<sup>1</sup>, Aleksander B. Skotnicki<sup>3</sup>

## MIESZANE ZAKAŻENIA HERPESWIRUSOWE U BIORCÓW ALLOPRZESZCZEPÓW KOMÓREK HEMOPOETYCZNYCH (ALLO-HSCT)\*

<sup>1</sup>Zakład Wirusologii Katedry Mikrobiologii CM UJ w Krakowie

Kierownik Katedry: Piotr B. Heczko

<sup>2</sup>Pracownia Genetyki Molekularnej i Wirusologii,

Wydz. Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ w Krakowie

Kierownik Pracowni: Hanna Rokita

<sup>3</sup>Katedra i Klinika Hematologii CM UJ w Krakowie

Kierownik Katedry: Aleksander B. Skotnicki

*U pacjentów w stanie immunosupresji, leczonych przeszczepieniem komórek hemopoetycznych oceniono częstość występowania zakażeń limfotropowymi herpeswirusami: CMV, EBV, HHV6 i HHV7. Badania prowadzono w różnym czasie od transplantacji, a uzyskane wyniki analizowano w powiązaniu ze stanem klinicznym pacjentów. Próbowano także odpowiedzieć na pytanie, czy zakażenie jednym wirusem wpływa na przebieg zakażenia innymi herpeswirusami.*

*Słowa kluczowe: przeszczep szpiku kostnego, CMV, EBV, HHV6, HHV7*

*Key words: bone marrow transplantation, CMV, EBV, HHV6, HHV7*

### WSTĘP

Chorzy leczeni allogenicznym przeszczepieniem komórek hemopoetycznych (allo-HSCT) są w sposób szczególnie narażeni na zakażenia wirusami z rodziny *Herpesviridae*. Wynika to z szerokiego rozpowszechnienia tych wirusów w populacji oraz ich zdolności do latencji. Zakażenie w okresie potransplantacyjnym może być zarówno następstwem przeniesienia wirusa z przeszczepem lub krwią, jak również wynikiem reaktywacji wirusa ze stanu latencji. Możliwe jest także zakażenie drogą kropelkową. Pomimo profilaktycznego

---

\* Praca została sfinansowana w ramach projektów badawczych: 6 PO4C 022 20, N404 090 32/3224 i N401 082 32/1930.

podawania leków przeciwwirusowych, herpeswirusy są nadal główną przyczyną zachorowań i zgonów biorców przeszczepów (1, 2, 3). Ciężkość zakażenia uzależniona jest m.in. od stopnia immunosupresji oraz od swoistej odporności biorcy. Zazwyczaj zakażenia pierwotne przebiegają z pełnymi objawami klinicznymi, zakażenia wtórne często mają charakter poronny lub bezobjawowy. Symptomy zakażenia danym gatunkiem wirusa często nie są na tyle charakterystyczne, aby mogły stanowić podstawę rozpoznania klinicznego. Niejednokrotnie trudno je odróżnić od reakcji „przeszczep przeciw biorcy” (GvH). Niezależnie od postaci zakażenia - objawowej czy bezobjawowej, aktywacja danego wirusa może zapoczątkowywać lub zaostrzać reakcje odrzucania przeszczepu, opóźniać przyjęcie przeszczepu, sprzyjać rozwojowi innych zakażeń, a w przypadku zakażenia EBV - doprowadzać do stymulacji procesów rozrostowych.

Celem pracy było określenie częstości zakażeń wirusami CMV, EBV, HHV-6 i HHV-7 w różnym okresie po allo-HSCT. Chociaż wirusy te należą do dwóch odrębnych podrodzin – *Beta* i *Gammaherpesvirinae*, ich wspólną cechą jest limfotropizm. Badania miały na celu pokazanie ewentualnych wzajemnych oddziaływań pomiędzy poszczególnymi gatunkami tych herpeswirusów i ocenę tego stanu na przebieg kliniczny zakażenia.

## MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono w grupie 35 chorych (16 kobiet i 19 mężczyzn), śr. wieku  $31 \pm 8$  lat, poddanych allo-HSCT od zgodnego dawcy rodzinnego. Trzynastu biorców otrzymało komórki progenitorowe szpiku kostnego, 22 osoby - komórki izolowane z krążenia obwodowego. Wskazaniem do transplantacji była: ostra lub przewlekła białaczka limfatyczna lub mieloblastyczna (30 osób), ciężka anemia aplastyczna (2 chorych) oraz inne choroby nowotworowe układu krwiotwórczego (3 osoby). Dla oceny ryzyka rozwoju zakażenia CMV i EBV, w okresie kwalifikacji do przeszczepu określono status serologiczny w układzie dawca-biorca.

Po transplantacji zakażenie rozpoznawano na podstawie badań molekularnych. Pacjenci byli badani wielokrotnie, początkowo co tydzień, w okresie późniejszym 1-2 razy/mies. lub w trakcie wizyt kontrolnych.

Materiałem do badań molekularnych była zawiesina leukocytów ( $1 \times 10^6$ ) uzyskana poprzez rozdział w 6% dekstranie wg metody opisanej przez *The* i wsp. (4). Genomowe DNA izolowano przy użyciu zestawu kolumnkowego Genomic DNA Prep Plus (A&A Biotechnology). Stopień oczyszczenia i stężenie DNA oznaczano spektrofotometrycznie przy  $\lambda = 260$  i  $280$  nm.

Prawidłowość izolacji DNA sprawdzano wykrywając sekwencje dla beta-aktyny, zgodnie z metodyką opisaną w pracy *Guzika* i wsp. (5). Obecność CMV potwierdzano metodą nested PCR stosując startery komplementarne do genu kodującego glikoproteinę gB, opisane przez *Cranage* i wsp. (wg. 6). Do wykrywania DNA EBV posłużono się metodą opisaną przez *Venarda* i wsp. (7). Używano starterów zewnętrznych swoistych dla genu kodującego białko EBNA2 i starterów wewnętrznych charakterystycznych dla EBV-1 i EBV-2. Reakcję nested PCR zastosowano także do wykrywania DNA wirusów HHV-6A, HHV-6B i HHV-7 korzystając z sekwencji nukleotydowych i warunków reakcji opisanych przez *Chan* i wsp. (8). Amplifikacje prowadzono w aparacie firmy Biometria. Do każdego badania dołączano kontrole dodatnie (DNA pozyskane z hodowli komórkowych zakażonych odpowiednimi

wirusami lub od osób z potwierdzonym zakażeniem) i ujemne (woda i DNA izolowane z leukocytów osób serologicznie ujemnych). Produkty reakcji wykrywano elektroforetycznie. W ocenie stanu klinicznego pacjentów uwzględniano badanie fizykalne, wyniki badań laboratoryjnych (w tym morfologię krwi, aminotransferazy wątrobowe, bilirubinę) i badania w kierunku zakażeń wirusami zapalenia wątroby typu B i C.

W profilaktyce zakażeń herpeswirusowych, już w okresie przed przeszczepieniem komórek stosowano doustnie acyklowir w dawce 1600 mg/dobę, a następnie od ok. 5 do 72 dnia po przeszczepieniu w dawce 1000 mg/dobę, początkowo dożylnie a następnie doustnie. U pacjentów z laboratoryjnym potwierdzeniem zakażenia CMV lub ze wskazań klinicznych stosowano dożylnie gancyklowir (5 mg/kg co 12h przez 14 dni w terapii wyprzedzającej lub w dawce 10 mg/kg/dobę w leczeniu choroby wywołanej zakażeniem CMV). W przypadku podejrzenia mielosupresji wywołanej gancyklowirem podawano foscarnet (zapobiegawczo – 60 mg/kg co 12 h, leczniczo – 120 mg/kg/dobę). Dawki modyfikowano w zależności od klirensu kreatyniny, zgodnie z ogólnie przyjętymi zaleceniami.

## WYNIKI

Badania serologiczne dawcy i biorcy pozwoliły wyłonić 8 biorców allo-HSCT potencjalnie narażonych na rozwój pierwotnego zakażenia CMV i/lub EBV. W okresie po transplantacji badania molekularne były prowadzone przez 3 do 31 miesięcy, średnio  $11,7 \pm 7$  miesięcy. W tym czasie od każdego pacjenta pobrano średnio  $23 \pm 12$  razy próbki krwi obwodowej. Tylko u 2 osób (tj. 7%), w okresie 7 miesięcznej obserwacji nie stwierdzono zakażenia żadnym z badanych herpeswirusów. Zakażenie pierwotne CMV lub EBV-1 rozwinęło się u 6 chorych. U żadnej z 35 badanych osób nie wykryto obecności EBV-2 i HHV-6A. Uzyskane wyniki w odniesieniu do poszczególnych wirusów, a także analizowanych

Tabela I. Występowanie limfotropowych herpeswirusów u 35 badanych wielokrotnie biorców allo-HSCT

Table I. Occurrence of lymphotropic herpesviruses in 35 allo-HSCT recipients examined repeatedly

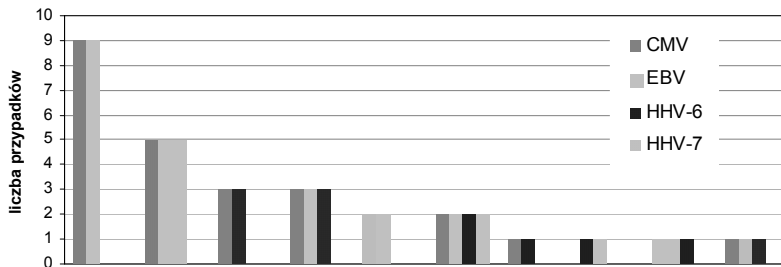
liczba zakażonych pacjentów	CMV	EBV-1	HHV-6B	HHV-7
	29 (83%)	23 (66%)	11 (31%)	12 (34%)
- z pojedynczymi wynikami (+)*	8	5	4	5
- z powtarzającymi się wynikami (+)**	21 (7,3±6)	18 (4,9±2)	7 (3,7±3)	7 (3,2±2)
w tym z: 1-krotnymi epizodami zakażenia	15	11	9	8
powtarzającymi się epizodami				
2-krotnie	10	8	2	4
3-krotnie	3	1		
4-krotnie i więcej	1	3		
<b>liczba dodatkich próbek w ogólnej liczbie badanych</b>	168/805 (21%)	91/430 (21%)	29/206 (14%)	28/200 (14%)

\* obecność wirusowego DNA stwierdzano w 1 lub 2 próbkach krwi

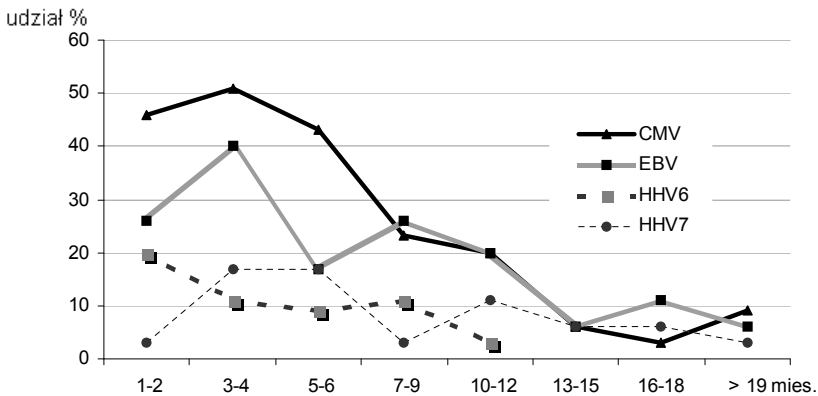
\*\* obecność wirusowego DNA stwierdzano w więcej niż 2 próbkach, w nawiasach podano średnią liczbę pozytywnych wyników

próbek materiału klinicznego, zestawiono w tabeli 1. U niektórych pacjentów obserwowano jednorazowe epizody zakażenia (choć utrzymujące się przez różny okres czasu), natomiast u innych, po otrzymaniu ujemnych wyników, pojawiały się kolejne zakażenia tym samym wirusem. Najczęściej identyfikowano zakażenia dwoma lub trzema wirusami (odpowiednio u 16 i 10 osób), u 2 badanych – czterema, natomiast pojedyncze zakażenie (i to tylko CMV) wystąpiło u 5 osób. Na ryc. 1 przedstawiono możliwe kombinacje występujących herpeswirusów wykrywanych u pacjentów z zakażeniami mieszanymi oraz czas po transplantacji, w którym ujawniały się te zakażenia. Najczęściej obserwowano je w pierwszych 4 miesiącach, chociaż pojawiały się one także w okresie odległym, nawet po 23 czy 30 miesiącach. U 6 osób zaobserwowano chroniczną wiremę: dwie osoby z zakażeniem CMV (dodatnie wyniki rejestrowano przez 5 i 8 miesięcy), dwie osoby z zakażeniem HHV-6 (wirus obecny przez 5 i 10 mies.) oraz po jednej osobie zakażonej EBV (przez 9 mies.) i HHV-7 (przez 27 mies.). Znamienne dla tych przypadków było to, że zakażenia ujawniły się już w 1-2 mies. po przeszczepieniu i towarzyszyły im okresowo inne wirusy. W 47 próbkach DNA pocho-

A. Liczba przypadków i rodzaj wirusa u pacjentów z zakażeniami mieszanymi  
A. Number of cases and type of virus in patients with mixed infections



B. Ujawnianie się poszczególnych wirusów w różnym czasie po transplantacji  
B. Appearance of particular herpesviruses in different periods after transplantation



Ryc. 1. Zakażenia limfotropowymi herpeswirusami u pacjentów leczonych allo-HSCT  
Fig. 1. Infections with lymphotropic herpesviruses in patients that underwent allo-HSCT

dających od 19 pacjentów, jednocześnie wykrywano obecność kilku wirusów. Najczęściej, bo w 70% występował CMV, EBV w 60%, HHV-6 w 45%, a HHV-7 w 38% takich materiałów. Współzakażenie u 6 osób miało miejsce już w pierwszych dwóch miesiącach po transplantacji i w 2 przypadkach można to było łączyć z pierwotnym zakażeniem CMV lub EBV. Z kolei u 6 pacjentów, u których zakażenie mieszane potwierdzono w okresie odległym (> 7 mies. od allo-HSCT), w sytuacjach gdy dotyczyło ono wirusów CMV i EBV (3 chorych) wiązało się ono z ciężkim przebiegiem klinicznym, a nawet zgonem (zapalenie płuc o etiologii CMV, ciężka uogólniona reakcja GvHD, zapalenie jelit wywołane zakażeniem CMV potwierdzone badaniem sekcyjnym). W przypadku zakażeń mieszanych wirusami EBV z HHV-6 lub HHV-7 nie stwierdzono pogorszenia stanu klinicznego osób badanych.

Śledząc kolejność pojawiania się poszczególnych epizodów zakażeń u pacjentów z zakażeniami mieszanymi zaobserwowano pewną kolejność zdarzeń. W pierwszym rzucie najczęściej pojawiał się CMV, rzadziej EBV i HHV-6. W kolejnych incydentach zakażeń (w II rzucie) CMV był także wirusem dominującym obok EBV i HHV-6. Przy następnych epizodach rolę wirusa dominującego przejmowały EBV i HHV-7.

Analiza kliniczna przeprowadzona u pacjentów z zakażeniami mieszanymi wykazała, że u 14 osób nastąpiło znamienne podwyższenie enzymów wątrobowych. Jedenaście osób cierpiało z powodu ostrych i/lub chronicznych reakcji odrzucania przeszczepu, wymagających intensywnego leczenia supresyjnego. U 10 chorych obserwowano znaczne obniżenie poziomu płytek krwi, w pojedynczych przypadkach – zapalenie płuc, zapalenie jelit oraz anemię i gorączkę. Zakażenia dotyczące wyłącznie CMV przebiegały w sposób łagodny; u 1 osoby obserwowano mierne podwyższenie aminotransferaz, u innej trombocytopenię. Zakażenia mieszane wirusami CMV i EBV charakteryzowały się najcięższym przebiegiem klinicznym. Nadkażenia wirusami HHV-6 lub HHV-7 nie pogarszały stanu zdrowia pacjentów. Spośród 2 osób, u których potwierdzono zakażenie 4 wirusami, jedna zmarła z powodu uogólnionej choroby wywołanej zakażeniem CMV. W okresie obserwacji nie stwierdzono zespołów limfoproliferacyjnych związanych z infekcją wirusową.

## DYSKUSJA

W naszych badaniach zastosowano jakościową metodę PCR do wykrywania limfotropowych herpeswirusów. Jako matrycę stosowano genomowe DNA izolowane z leukocytów krwi obwodowej.

I tu rodzi się pytanie, czy istotnie wykrywano wirusa aktywnie replikującego się czy też jego postać latentną. Rozwiązanie tego problemu byłoby możliwe przy zastosowaniu testów ilościowych np. *real-time* PCR (9), lub przez oznaczenie swoistych transkryptów, charakterystycznych dla produktywnego zakażenia, co jest celem dalszych badań. Niektórzy autorzy (10, 11) dla uniknięcia błędów związanych z możliwością amplifikacji latentnego wirusa stosowali do badań DNA, izolowane z surowicy lub osocza. Próbę taką wykonywano także w materiale własnym, ale wyniki dodatnie uzyskano tylko w nielicznych próbkach (dane nie publikowane), prawdopodobnie w przypadkach z wysokimi wartościami DNA-emii. Ponieważ wszyscy pacjenci, u których badania laboratoryjne wskazywały na zakażenie herpeswirusami otrzymywali leki przeciwwirusowe, sytuacje takie zdarzały się niezmiernie rzadko. Inną metodą umożliwiającą ograniczenie wyników fałszywie dodatnich jest od-

powiednie ustawienie progu wykrywalności reakcji PCR. W doświadczeniach własnych, przeprowadzonych na próbkach uzyskanych od zdrowych, seropozytywnych osób ustalono, że 20 ng genomowego DNA to ilość w której zazwyczaj nie wykrywa się latentnego wirusa CMV metodą nested PCR. U badanych biorców allo-HSCT wyniki pozytywne uzyskano w 21% materiałów testowanych w kierunku CMV i EBV oraz 14% próbek badanych pod kątem zakażenia HHV-6 i HHV-7. U wszystkich pacjentów z wynikami pozytywnymi, w kolejnych badaniach nie wykrywano wirusowego DNA, co świadczyłoby o eliminacji wirusa z krwi. Niestety u niektórych osób, badanych w późniejszym okresie, dochodziło do kolejnych aktywizacji zakażenia, dwu, trzy a nawet 4-krotnych (tabela 1), najczęściej CMV i EBV. Pogłębione badania w oparciu o genotypowanie wykrywanych w izolatach fragmentów DNA mogłyby dopiero odpowiedzieć na pytanie, czy było to zakażenie tym samym wirusem czy też wirusem innego pochodzenia.

W prowadzonej dość długo obserwacji, bo średnio przez ok. 1 rok, mieszane zakażenia herpeswirusowe wykryto u większości osób (80%). Najczęściej występowały one w pierwszych 6 miesiącach po transplantacji, chociaż zdarzały się także w okresie dużo późniejszym. Obok CMV dominującym wirusem był EBV-1. Zakażenia wirusami *Herpes* typu 6 i 7 występowały rzadziej. Inną tendencję obserwowali w podobnej grupie pacjentów Wang i wsp. z ośrodka w Sztokholmie (1). Wprawdzie odsetek osób z zakażeniami mieszanymi był podobny (87%), ale przeważały zakażenia HHV-6 i HHV-7 (odpowiednio 70% i 76%), pomimo że zapobiegawczo stosowano acyklowir w dużo wyższych dawkach (800 mg 4 razy dziennie). Autorzy ci obserwowali także po 6 miesiącach od transplantacji wyraźny wzrost liczby pacjentów zakażonych EBV, czego nie wykazaliśmy w naszych badaniach. U badanych przez nas biorców allo-HSCT znamienne natomiast było to, że mieszane zakażenia CMV i EBV charakteryzowały się najcięższym przebiegiem klinicznym.

#### PODSUMOWANIE I WNIOSKI

1. Stwierdzono, że zakażenia mieszane wystąpiły u 80% badanych (28/35) i były najczęściej wynikiem ujawniania się poszczególnych herpeswirusów w różnym okresie po transplantacji.
2. Dominowały zakażenia dwoma lub trzema wirusami, w tym głównie CMV i EBV (65%).
3. W tak opisanych zakażeniach mieszanych obserwowano określoną tendencję pojawiania się poszczególnych wirusów w kolejnych epizodach zakażeń – w pierwszym i drugim dominowały zakażenia CMV, rzadziej EBV i HHV-6, natomiast w kolejnych rolę wirusów dominujących przejmowały EBV i HHV-7.
4. W korelacji z objawami klinicznymi zakażenia mieszane CMV z EBV charakteryzowały się najcięższym przebiegiem. Dodatkowe nadkażenia wirusami HHV-6 lub HHV-7 nie wpływały w sposób zasadniczy na pogorszenie stanu zdrowia pacjentów, chociaż wykrycie zakażenia 4 badanymi wirusami u jednego pacjenta zakończyło się niepomyślnie.
5. Przeprowadzone badania nasuwają przypuszczenie, że stwierdzane ciężkie zakażenia CMV u pacjentów poddanych transplantacji mogą być wynikiem nie tyle patogennego działania wyłącznie wirusa CMV co addytywnego efektu replikacji innych herpeswirusów.

*B Zawilińska, M Kosz-Vnenchak, B Piątkowska-Jakubas, J Kopeć, E Daszkiewicz,  
A B Skotnicki*

## HERPESVIRUSES MIXED INFECTIONS IN ALLOGENEIC STEM CELL RECIPIENTS (ALLO-HSCT)

### SUMMARY

**Aim.** Assessment of frequency and clinical course of infections with herpesviruses: CMV, EBV, HHV-6 and HHV-7 in patients that underwent non-manipulated allo-HSCT from matched-related donors.

**Methods:** 35 recipients of age  $31 \pm 8$  years. Serological status of donor and recipient against CMV and EBV assessed before transplantation. After transplantation, herpesviruses infection was confirmed based on the presence of viral DNA isolated from peripheral leukocytes, using nested PCR method. Patients were examined repeatedly, during  $11.7 \pm 7$  months of observation.

**Results and conclusions:** mixed infections appeared in 80% of allo-HSCT recipients. Infections with two or three viruses dominated, especially CMV and EBV (65%). We observed specific tendency of appearance of particular herpesviruses in each episode – in the first and the second episodes CMV dominated, EBV or HHV-6 infections were rare, whereas in the successive episodes EBV and HHV-7 were the leading viruses. In correlation with clinical symptoms mixed CMV and EBV infections were characterised by the most severe course. Superinfections with HHV-6 or HHV-7 had no significant influence on the progression of illness. Our observations may suggest that the serious CMV infections in allo-HSCT recipients are the result of not only the pathogenic properties of CMV but of the additive effect of replication of other herpesviruses.

### PIŚMIENNICTWO

1. Wang F, Dahl H, Linde A, i in. Lymphotropic herpesviruses in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1996; 88: 3615-3620.
2. Gasparetto E, Ono S, Escuissata D, i in. Cytomegalovirus pneumonia after bone marrow transplantation: high resolution CT findings. *Br J Radiology* 2004; 77: 724-727.
3. Zekri A, Mohammed W, Samra M, i in. Risk factors for cytomegalovirus, hepatitis B and C virus reactivation after bone marrow transplantation. *Transplant Immunol* 2004; 13: 305-311.
4. The TH, van den Berg AP, Harmsen MC, i in. The cytomegalovirus antigenemia assay: a plea for standardization. *Scand J Infect Dis Suppl.* 1995; 99: 25-29.
5. Guzik K, Bzowska M, Dobrucki J i in. Heat-shocked monocytes are resistant to *Staphylococcus aureus*-induced apoptotic DNA fragmentation due expression of HSP 72. *Inf Immunol* 1999; 67: 4216-4222.
6. Mitchell SM, Fox JD, Tedder RS, i in. Vitreous fluid sampling and viral genome detection for the diagnosis of viral retinitis in patients with AIDS. *J Med Virol* 1994; 43: 336-340.
7. Venard V, Carret A, Pascal N, i in. A convenient semi-quantitative method for the diagnosis of Epstein-Barr virus reactivation. *Arch Virol* 2000; 145: 2211-2216.
8. Chan P, Peiris J, Yuen K, i in. Human herpesvirus-6 and human herpesvirus-7 infections in bone marrow transplant recipients. *J Med Virol* 1997, 53: 295-305.
9. Verkruse L, Storch G, Devine S, i in. Once daily ganciclovir as initial pre-emptive therapy delayed until threshold CMV load > 10000 copies/ml: a safe and effective strategy for allogeneic stem cell transplant patients. *Bone Marrow Transplant* 2006; 37: 51-56.



10. Gentile G, Picardi A, Capobianchi A, i in. A prospective study comparing quantitative Cytomegalovirus (CMV) polymerase chain reaction in plasma and pp65 antigenemia assay in monitoring patients after allogeneic stem cell transplantation. *BMC Infectious Diseases* 2006; 6: 167-177.
11. Wagner HJ, Wessel M, Jabs W, i in. Patients at risk for development of posttransplant lymphoproliferative disorder: plasma versus peripheral blood mononuclear cells as material for quantification of Epstein-Barr viral load by using real-time quantitative polymerase chain reaction. *Transplantation* 2001; 72: 1012-1019.

Otrzymano: 17.10.2007 r.

**Adres autora:**

Barbara Zawilińska

Zakład Wirusologii Katedry Mikrobiologii CM UJ w Krakowie

ul. Czysza 18, 31-121 Kraków

tel. (12) 634 54 00; e-mail: mbzawili@cm-uj.krakow.pl