

Tomasz Dzieciatkowski^{1,2}, Maciej Przybylski^{1,2}, Dariusz Kawecki¹, Małgorzata Gieryńska³, Agata Sulowska², Tigran Torosian⁴, Mirosław Łuczak², Wiesław Wiktor Jędrzejczak⁴, Grażyna Młynarczyk¹

CZĘSTOŚĆ WYKRYWANIA DNA LUDZKIEGO HERPESWIRUSA TYPU 6 U PACJENTÓW SAMODZIELNEGO PUBLICZNEGO CENTRALNEGO SZPITALA KLINICZNEGO W WARSZAWIE W LATACH 2003-2007

FREQUENCY OF DETECTION OF HUMAN HERPESVIRUS TYPE 6 DNA IN
PATIENTS OF PUBLIC INDEPENDENT CENTRAL HOSPITAL IN WARSAW
IN YEARS 2003-2007

¹Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny
Kierownik: Grażyna Młynarczyk

²Zakład Mikrobiologii, Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny
Kierownik: Mirosław Łuczak

³Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
Kierownik: Marek Niemiałowski

⁴Klinika Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych, Warszawski Uniwersytet Medyczny
Kierownik: Wiesław Wiktor Jędrzejczak

STRESZCZENIE

Zakażenia ludzkim herpeswirusem typu 6 są powszechne w populacji na całym świecie i powodują u ludzi choroby o różnym stopniu nasilenia, stanowią jednak poważne zagrożenie dla osób z zaburzeniami odporności. Celem pracy było określenie częstotliwości występowania DNA ludzkiego herpeswirusa typu 6 u pacjentów Kliniki Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych Samodzielnego Publicznego Centralnego Szpitala Klinicznego w latach 2003-2007. Zbadano 1357 próbek klinicznych pobranych od pacjentów po zabiegu przeszczepienia allogenicznego komórek krwiotwórczych metodami biologii molekularnej w kierunku obecności DNA HHV-6. Do badań zastosowano ilościową metodę real-time PCR, przy użyciu której stwierdzono wynik pozytywny w 12,5% wszystkich próbek i u 35,2% badanych pacjentów. U wszystkich badanych pacjentów obserwowano gorączkę o nieustalonej etiologii, zaś ponad 50% z nich miało zaostrzone objawy choroby "przeszczep przeciwko gospodarzowi" (GvHD). Ponadto dziewięć pacjentów z tej grupy zmarło w trakcie wykrywalnej wiremii herpeswirusa typu 6.

Słowa kluczowe: HHV-6, immunosupresja, reakcja łańcuchowej polimerazy, real-time PCR

ABSTRACT

Human herpesvirus 6 (HHV-6) has been recognized as a potential significant pathogen in haemopoietic stem cell transplant recipients. Different clinical manifestations have been described including fever, skin rash, bone marrow suppression and encephalitis. The aim of the study was to show frequency of presence of human herpesvirus type 6 DNA in patients of Public Independent Central Clinical Hospital in Warsaw in years 2003-2007. 1357 clinical samples taken from 71 a group of adult recipients of allogeneic HSCT were tested for the presence of HHV-6 DNA using the quantitative in-house real-time PCR assay. Positive results were obtained in 12,5% of all examinations made during described period and also in 35,2% of investigated patients. All of them developed fever of unknown origin, and over 50% had GvHD features. Nine individuals from this group died during detectable HHV-6 viremia.

Key words: HHV-6, immunosuppression, polymerase chain reaction, real-time PCR

WSTĘP

Ludzki herpeswirus typu 6 (*human herpesvirus type 6*; HHV-6), zaliczany jest do podrodziny β -herpesvirinae i występuje powszechnie w populacji na całym świecie. Analiza genetyczna wykazała jego bliskie pokrewieństwo z ludzkimi herpeswirusami typu: 7 (HHV-7) oraz 5 (HHV-5, znanym powszechnie jako CMV) (1), zaś badanie sekwencji nukleotydów w genomie pozwoliło na wyodrębnienie dwóch podtypów: HHV-6A oraz HHV-6B (2). U większości ludzi pierwotne zakażenie HHV-6 ma miejsce we wczesnym dzieciństwie (3). Podobnie jak pozostałe herpeswirusy, HHV-6 ma zdolność do ustalania stanu latencji w śliniankach (4), monocytach (5) lub też komórkach progenitorowych szpiku (6). W chwili obecnej zakażenia herpeswirusem typu 6 zostały powiązane z wieloma jednostkami chorobowymi (3), począwszy od stanów gorączkowych, poprzez neuroinfekcje (7) do chorób limfoproliferacyjnych włącznie (8).

Reaktywacja latentego wirusa, połączona z wystąpieniem objawów klinicznych zdarza się rzadko u osób ze sprawnym układem odpornościowym (9), lecz może mieć śmiertelny przebieg u osób poddanych immunosupresji (3). Wykorzystując techniki biologii molekularnej, obecność HHV-6 w osoczu stwierdzano u średnio 32% biorców przeszczepów narządowych oraz 30-48% biorców komórek krwiotwórczych (10). W tej ostatniej grupie chorych szczyt wirerii występuje zazwyczaj w ciągu pierwszych 4 tygodni po zabiegu przeszczepienia (11, 12), a czynnikami zwiększającymi ryzyko zakażenia jest przeszczep allogeniczny, zaawansowana choroba podstawowa oraz leczenie immunosupresyjne z użyciem wysokich dawek kortykosterydów (12). Ze względu na upośledzenie funkcjonowania układu odpornościowego u chorych opisanych powyżej, tradycyjne badania serologiczne wyrażają się często zbyt małą czułością i są zastępowane przez testy PCR (11,13).

Celem pracy było określenie częstości wykrywania DNA herpeswirusa typu 6 za pomocą metod biologii molekularnej u pacjentów Samodzielnego Publicznego Centralnego Szpitala Klinicznego w Warszawie z zaburzeniami hematologicznymi w latach 2003-2007.

MATERIAŁ I METODY

Badaniom poddano 1357 próbek pobranych od 71 pacjentów hospitalizowanych na Oddziale Intensywnej Opieki Hematologicznej SP CSK z powodu zabiegu przeszczepienia allogenicznych komórek krwiotwórczych (tab. I). Materiał użyty do badań w 47% stanowiła krew pełna, 52% surowica krwi, a 1% płyn mózgowo-

Tab. I. Charakterystyka badanej grupy pacjentów (n=71)
Tab.I. Characteristics of the study group (n=71)

Wiek (zakres)	18-56
Płeć (kobieta/mężczyzna)	27/44
Choroba podstawowa (liczba pacjentów/liczba pacjentów dodatnich)	
Ostra białaczka limfatyczna	18/4
Przewlekła białaczka limfatyczna	3/1
Chłoniak	
Hodgkin	2/1
Non-Hodgkin	1/1
Szpiczak	4/0
Ciężka anemia aplastyczna	3/2
Syndrom mielodysplastyczny	3/3
Ostra białaczka szpikowa	30/11
Przewlekła białaczka szpikowa	6/2
Chloroma	1/0

rdzeniowy. Materiały pobierane były wielokrotnie od poszczególnych pacjentów - pierwszy raz w dniu przeszczepienia, a następnie w odstępach 7-10 dni w ramach rutynowego monitorowania wirerii CMV wykonywanego po zabiegach hematologicznych.

Izolację DNA przeprowadzono przy użyciu zestawu High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostics®), zgodnie z procedurą dostarczoną przez producenta, zawieszając wyizolowane DNA w końcowej objętości 35 μ l buforu elucyjnego. Amplifikację sekwencji herpeswirusa typu 6 wykonywano techniką real-time PCR na aparacie LightCycler 2.0 z użyciem zestawu amplifikacyjnego LightCycler TaqMan Master (Roche Diagnostics®). W badaniu wykorzystano metodę specyficzną wykrywającą gen kodujący DNA polimerazę HHV-6, o progu czułości około 50 kopii wirusa na mililitr materiału badanego (13).

WYNIKI

Podczas badań w kierunku herpeswirusa typu 6 wykonanych w latach 2003-2007 technikami biologii molekularnej obecność specyficznych sekwencji HHV-6 stwierdzono łącznie w 169 próbkach, co stanowi 12,5% ogólnej liczby wykonanych oznaczeń. Odsetek osób, u których wykryto obecność DNA herpeswirusa typu 6 wynosił 35,2% badanych pacjentów poddanych zabiegowi przeszczepienia allogenicznych komórek krwiotwórczych w latach 2003-2007 (tab.II). DNA HHV-6 stwierdzano w ciągu pierwszych 6 tygodni po zabiegu transplantacji komórek krwiotwórczych (od 18 do 41dnia), zaś jego wykrywalny poziom utrzymywał się najczęściej przez 10-25 dni.

Badany ilościowo za pomocą metody real-time PCR liczba kopii wirusa u większości osób wynosił zazwyczaj ok. 800-2800 kopii/ml krwi. Dokładne powiązanie zakażeń HHV-6 ze śmiertelnością okołoprzeszczepową

Tab.II. Odsetek badań i pacjentów z Kliniki Hematologii, u których wykryto DNA HHV-6 w latach 2003-2007

Tab.II. Frequency of HHV-6 positive examinations and patients from Department of Hematology, Oncology and Internal Medicine in years 2003-2007

Rok	Liczba próbek do badania	Liczba próbek badań dodatnich	Odsetek próbek dodatnich	Liczba badanych pacjentów z Kliniki Hematologii	Liczba pacjentów dodatnich	Odsetek pacjentów dodatnich
Z Kliniki Hematologii						
2003	225	23	10,2%	5	2	40,0%
2004	287	43	15,0%	16	7	43,8%
2005	291	34	11,7%	20	6	30,0%
2006	301	40	13,3%	20	7	35,0%
2007	253	30	11,9%	10	3	33,3%
razem	1357	169	12,5%	71	25	35,2%

nie jest jednak możliwe, choć dziewięciu pacjentów (12,7%) zmarło w trakcie wykrywalnej wirerii. Objawy kliniczne obserwowane w tym czasie obejmowały zazwyczaj zapalenie płuc, zaostrzenie choroby - przeszczep przeciw gospodarzowi (GvHD) oraz dodatkowo zaburzenia neurologiczne.

DYSKUSJA

Herpeswirusy pozostają obecne w organizmie po zakażeniu pierwotnym do końca życia; zazwyczaj ich cykl replikacyjny znajduje się pod kontrolą układu odpornościowego, jednak ta jest zakłócona w przebiegu immunosupresji. Rozpowszechnienie wirusów z tej rodziny w populacji na całym świecie, spowodowało, że zarówno zakażenia pierwotne, jak i ich reaktywacja ze stanu latencji, stały się jedną z głównych przyczyn zgonów u pacjentów po przeszczepieniu narządów unaczynionych oraz komórek krwiotwórczych (3,14). Obecność DNA HHV-6 stwierdzano w Polsce zarówno u pacjentów z pierwszej (15), jak i drugiej grupy (11,16). Badana w innych ośrodkach częstość wykrywania DNA herpeswirusa typu 6 u pacjentów hematologicznych jest zbliżona do zaobserwowanej przez autorów i waha się pomiędzy 30-50% (9,10,12,16). Pomimo że posiadane dane z kraju są skąpe i pochodzą z nielicznych ośrodków, zakażenia ludzkim herpeswirusem typu 6 powinny być brane pod uwagę u osób z niedoborami immunologicznymi, zwłaszcza gdy rutynowe badania w kierunku innych herpeswirusów, takich jak CMV i EBV dają wyniki negatywne. W diagnostyce różnicowej, prócz testów biologii molekularnej, pomocny może być okres zachorowania, zaobserwowano bowiem, iż do zakażenia herpeswirusem typu 6 dochodzi zazwyczaj pomiędzy 18 a 41 dniem po przeszczepieniu, zaś zakażenia CMV i EBV zdarzają się najczęściej powyżej 45 dnia (16,17,18). Infekcje o etiologii HHV-6 są niebezpieczne również ze względu na naturalną odporność tego wirusa na acyklowir, rutynowo stosowany w profilaktyce przeszczepowej. Badania *in vitro*

wykazały bowiem, że replikacja herpeswirusa typu 6 jest hamowana wyłącznie przez gancyklowir, foskarnet i cidofovir (14,19).

Ograniczona czułość i dostępność testów serologicznych do badań w kierunku HHV-6, powiązana z koniecznością wczesnego zastosowania leczenia przeciwwirusowego zmusza do wykorzystywania w diagnostyce przeszczepowej metod biologii molekularnej (13,20). Dostępność półilościowych lub ilościowych metod monitorowania wirerii HHV-6, takich jak real-time PCR, może znacząco ułatwić szybką diagnostykę zakażenia, a w konsekwencji prawidłowe postępowanie terapeutyczne. Ze względu na stwierdzoną znaczną częstość występowania herpeswirusa typu 6 u biorców komórek krwiotwórczych w Klinice Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, wskazane są dalsze badania dotyczące zakażeń o etiologii HHV-6 u polskich pacjentów poddanych immunosupresji.

WNIOSKI

1. Częstość wykrywania DNA herpeswirusa typu 6 u pacjentów Kliniki Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego jest zbliżona z analogicznymi danymi światowymi.
2. Zakażenia spowodowane przez HHV-6 występują w innym okresie po zabiegu przeszczepienia komórek krwiotwórczych niż zakażenia wirusem cytomegalii; przebiegają jednak z podobnymi objawami klinicznymi
3. Technika real-time PCR jest niezwykle przydatna do wykrywania i monitorowania zakażeń o etiologii HHV-6.

PIŚMIENNICTWO

1. Davison A, Eberle R, Hayward GS, i in. Herpesviruses. W: CM Fauquet, MA Mayo, J Maniloff i in., red. Virus taxonomy - classification and nomenclature of viruses. VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press;2005:193-212.
2. Isegawa Y, Mukai T, Nakano K i in. Comparison of the complete DNA sequences of human herpesvirus 6 variants A and B. *J Virol* 1999;73:8053-63.
3. Zerr DM. Human herpesvirus 6: a clinical update. *Herpes* 2006;13:20-4.
4. Fox JD, Briggs M, Ward PA, i in. Human herpesvirus 6 in salivary glands. *Lancet* 1990;336:590-3.
5. Kondo K, Kondo T, Okuno T, i in. Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages. *J Gen Virol* 1991;72:1401-8.
6. Luppi M, Barozzi P, Morris C, i in. Human herpesvirus 6 latently infects early bone marrow progenitors in vivo. *J Virol* 1999;73:754-9.
7. Singh N, Paterson DL. Encephalitis caused by human herpesvirus-6 in transplant recipients: relevance of a novel neurotropic virus. *Transplantation* 2000;69:2474-9.
8. Salahuddin SZ, Ablashi DV, Markham PD, i in. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science* 1986;234:596-601.
9. Savolainen H, Lautenschlager I, Piiparinen H, i in. Human herpesvirus-6 and -7 in pediatric stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer* 2005;45:820-5.
10. Zerr DM, Corey L, Kim HW, i in. Clinical outcomes of human herpesvirus 6 reactivation after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 2005;40:932-40.
11. Dzieciatkowski T, Przybylski M, Torosian T, i in. Prevalence of human herpesvirus 6 antibodies and DNA in allogeneic stem cell transplant patients: two-year single centre experience. *Arch Immunol Ther Exp* 2008;56:201-6.
12. Yoshikawa T, Asano Y, Ihira M, i in. Human herpesvirus 6 viremia in bone marrow transplant recipients: clinical features and risk factors. *J Infect Dis* 2002;185:847-53.
13. Dzieciatkowski T, Przybylski M, Gieryńska M i in. Wykorzystanie metody real-time PCR do wykrywania DNA ludzkiego herpeswirusa typu 6. *Med Dośw Mikrobiol* 2008;60:259-65.
14. De Bolle L, Naesens L, De Clercq E. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:217-45.
15. Dęborska-Materkowska D, Sadowska A, Matłosz B, i in. Zakażenie ludzkim wirusem herpes typu 6 u biorcy alloprzeszczepu nerki - opis przypadku. *Przeł Epidemiol* 2006;60:141-6.
16. Zawilińska B, Kosz-Vnenchak M, Piątkowska-Jakubas B, i in. Mieszane zakażenia herpeswirusowe u biorców alloprzeszczepów komórek hemopoetycznych (allo-HSCT). *Przeł Epidemiol* 2008;62:39-46.
17. Dzieciatkowski T, Przybylski M, Tomaszewska A i in. Comparison of two methods used for monitoring low-copy cytomegalovirus infection in a patient with chronic myeloid leukemia after unrelated umbilical cord blood transplantation. *Arch Immunol Ther Exp* 2007;55:199-203.
18. Dzieciatkowski T, Przybylski M, Tomaszewska A i in. Porównanie dwóch metod ilościowego monitorowania zakażenia wirusem cytomegalii u pacjenta po allogenicznym przeszczepie szpiku z powodu ostrej białaczki szpikowej. *Acta Hemat Pol* 2008;39:485-91.
19. Burns WH, Sandford GR. Susceptibility of human herpesvirus 6 to antivirals in vitro. *J Infect Dis* 1990;162:634-7.
20. Ihira M, Yoshikawa T, Suzuki K, i in. Monitoring of active HHV-6 infection in bone marrow transplant recipients by real time PCR; comparison to detection of viral DNA in plasma by qualitative PCR. *Microbiol Immunol* 2002;46:701-5.

Otrzymano: 1.12.2008 r.

Zakwalifikowano do druku: 20.01.2009 r.

Adres do korespondencji:

dr n. wet. Tomasz Dzieciatkowski
Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa
tel/fax: 022 599 17 78
e-mail: dzieciatkowski@wp.pl