

*Originalni rad/
Original article*

Correspondence to:

Danijela Đurić Petković

Vojnomedicinska akademija

Institut za mikrobiologiju

Crnotravska 17

Beograd

telefon 063 440-482

danieladjuricpetkovic@gmail.com

**PRAĆENJE CMV VIREMIJE NAKON
TRANSPLANTACIJE MATIČNIH ČELIJA
HEMATOPOEZE**

**MONITORING OF CMV VIRAL LOAD
AFTER STEM CELL TRANSPLANTATION**

Danijela Đurić-Petković¹, Elizabeta Ristanović¹

¹Vojnomedicinska akademija, Institut za mikrobiologiju, Beograd

Ključne reči

Citomegalovirus, alogena transplantacija, viremija.

Key words

Cytomegalovirus, allogeneic transplantation, viral load.

Sažetak

Citomegalovirus (CMV) je uzročnik brojnih komplikacija nakon transplantacije matičnih ćelija hematopoeze (TMČH) kao što su pneumonija, retinitis, gastroenteritis, hepatitis, infekcije CNS. CMV je jedan od najznačajnijih faktora mortaliteta i morbiditeta nakon transplantacije matičnih ćelija. Za praćenje naših pacijenata koristili smo CMV DNK kvantitativni Real-time test lančane reakcije polimeraze. Naš cilj je bio utvrđivanje viremije CMV kod pacijenata nakon TMČH.

UVOD

CMV pripada porodici Herpesviridae, potporodici Betaherpesvirinae. Najveći je među herpes virusima, veličine 150-200 μm sa dvolančanom linearnom DNK. Ovaj virus može inficirati različite ćelije kao što su epitelne, ćelije hematopoeze i vezivno tkivo.⁽¹⁾ Primarna infekcija se uglavnom javlja u detinjstvu kao asimptomatska ili slična mononukleozi. Nakon primarne infekcije virus uspostavlja latenciju u mnogim ćelijama domaćina kao što su leukociti, limfociti, parenhim bubrega i jetre. Kasnije, u toku života dolazi do reaktivacije virusa naročito kod imunokompromitovanih sa teškom kliničkom slikom. Infekcija CMV je jedan od najznačajnijih faktora morbiditeta i mortaliteta nakon transplantacije matičnih ćelija hematopoeze (TMČH) i solidnih organa. U periodu od 2 godine nakon transplantacije najčešći uzrok mortaliteta su relaps bolesti, bolest kalem protiv domaćina i oportunističke infekcije.⁽²⁾ CMV bolest praćena je zahvatanjem brojnih organa sa nastankom pneumonije, retinitisa, gastroenteritisa, hepatitisa, pancitopenije, infekcije CNS, odloženog prihvatanja ili odbacivanja grafta. Infekcija može nastati reaktivacijom latentnog virusa (najčešći oblik nakon transplantacije), reinfekcijom ili kao primarna infekcija, najčešće od 30-og do 120-og dana nakon transplantacije. U riziku su seropozitivni pacijenti pre transplantacije ili seronegativni recipijenti seropozitivnog donora. Ostali faktori rizika su starost pacijenta, brzina oporavka imunog sistema, imunosupresija nakon zračenja, terapija antitimocitnim globulinom, hemioterapijski protokol i drugi. Pacijenti koji primaju alemtuzumab i antilimfocitni globulin uglavnom razvijaju kasnu CMV infekciju.⁽³⁾ Restitucija imunog sistema nakon

transplantacije zavisi od starosti pacijenta, HLA podudarnosti, izvora matičnih ćelija, sastava grafta, od režima kondicioniranja kao i upotrebe kortikosteroida.⁽⁴⁾ Kod oko 50% transplantiranih dolazi do replikacije CMV, a kod 20-25% do klinički manifestne infekcije.⁽⁵⁾ CMV je donedavno bio glavni uzročnik infekcija nakon TMČH u oko 50%, ali je stalni monitoring i upotreba hemioprolifakse doprinela smanjenju komplikacija uzrokovanih ovim patogenom.^(6,7)

CMV bolest je i dalje veliki terapijski i dijagnostički problem kod pacijenata sa TMČH. Viremija je pokazatelj aktivnog virusnog umnožavanja u ciljnim organima ili diseminovane bolesti. Dokazivanje viremije pre pojave prvih kliničkih simptoma omogućava rano lečenje i sprečavanje nastanka teškog oblika bolesti. U terapiji se najviše koriste ganciklovir, foskarnet i imunoglobulini. Preemptivna antivirusna terapija sprovodi se u skladu sa praćenjem CMV viremije i dovela je do smanjenja incidence citomegalovirusne bolesti nakon transplantacije ali ne utiče na procenat preživljavanja kod razvijene bolesti.⁽⁸⁾

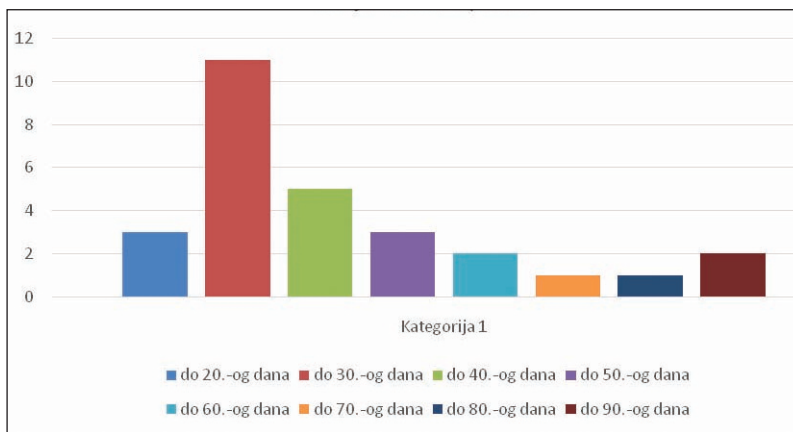
METOD

Praćeno je ukupno 50 pacijenata koji su transplantirani na Klinici za hematologiju Vojnomedicinske akademije u periodu 2015. i 2016. godine. Kod svih transplantiranih urađena je alogena transplantacija koštane srži. Od ukupnog broja, 24 su muškarci a 26 žene. Praćeni su sto dana nakon transplantacije, testiranjem na prisustvo virusne DNK Real Time PCR metodom. Sakupljeno je ukupno 488 uzoraka krvi od 50 pacijenata. Dva mililitra krvi je obrađeno i ekstrahovano je plazma koja je čuvana na temperaturi od -70°C. Svi uzroci plazme testirani su na prisustvo CMV DNK testom GeneProof detekcijom specifične sekvence gena koji kodira

4IE antigen, na aparatu Roche LightCycler 2.0, sa limitom detekcije od 250c/ml. Ekstrakcija virusne DNK rađena je manuelnom metodom, kitom za ekstrakciju DNA Universal Kit Zymo Research.

REZULTATI

Od 50 pacijenata kod kojih je urađena alogena transplantacija koštane srži na Klinici za hematologiju VMA sakupljeno je 488 uzoraka krvi i testirani su na prisustvo CMV. Indikacije za alogenu transplantaciju koštane srži najčešće su bila akutna mijeloidna leukemija i akutna limfatična leukemija. Prisustvo CMV u plazmi detektovano je kod 27 pacijenta (54%) u prvih 100 dana nakon transplantacije. Broj virusnih kopija kretao se od $3,36 \times 10^2$ C/ml do $2,78 \times 10^4$ C/ml. Reaktivacija CMV najčešće je detektovana u periodu od 20.-og do 30.-og dana nakon transplantacije- kod 11 pacijenata (40,74%) - grafikon 1. Srednja vrednost reaktivacije u danima nakon transplantacije iznosi 35,15 dana i kretala se u rasponu od 11.-og do 87.-og dana.



Grafikon 1 Reaktivacija CMV po danima nakon transplantacije matičnih ćelija hematopojeze

DISKUSIJA

Herpes virusi su najčešći uzročnici morbiditeta i mortaliteta kod pacijenata nakon transplantacije koštane srži i solidnih organa. Ova grupa virusa uspostavlja latenciju u različitim ćelijama domaćina, virusni genom je prisutan ali bez replikacije virusa. Najvažniju ulogu u kontroli latentnog CMV ima imunološki sistem domaćina. U slučaju imunosupresije dolazi do reaktivacije i produktivne infekcije. Nedavna studija pokazala je da su CD14⁺ monociti koji ekspimiraju površinski marker B7-H14 pretežno mesto latencije u perifernoj krvi zdravih davalaca.⁽⁹⁾ Diferencijacija u zrele mijeloidne dendritične ćelije i makrofage praćena je hromatinskim remodeliranjem CMV i to predstavlja neposredni rani promotor koji olakšava reaktivaciju i produkciju virusa.⁽¹⁰⁾ Alogena stimulacija i pro-inflamatorni citokini- INF γ , TNF i IL-6 pokreću sazrevanje i reaktivaciju mijeloidnih ćelija i utiču na reaktivaciju virusa⁽¹¹⁾. Pored pomenutog serološkog statusa recipijenta i donora, faktori rizika reaktivacije su starost recipijenta, HLA nekompatibilnost, iscrpljivanje T ćelija, bolest kalem protiv domaćina, visoke doze kortikosteroida i drugi.⁽¹²⁾ Međutim, ključni mehanizmi latencije i reaktivacije i dalje su nepoznati.

Zahvaljujući efikasnim antivirusnim tretmanima, naročito ganciklovirom, citomegalovirusna bolest se razvija kod malog broja pacijenata i obično je udružena sa komorbiditetima i drugim komplikacijama nakon transplantacije. Uvođenje savremenih molekularnih metoda i kvantifikacije virusa dovelo je i do smanjene smrtnosti nakon transplantacije organa. Kontinuirani monitoring omogućava detekciju viremije CMV, njeno praćenje i uključivanje terapije. Prisustvo viremije CMV ne znači i posledično razvoj citomegalovirusne bolesti. Neće svaki pacijent sa viremijom razviti citomegalovirusnu bolest koja se javlja kod 5% transplantiranih.⁽¹³⁾ Povećanje broja kopija virusne DNK omogućava brzu detekciju i terapiju te sprečavanje daljeg razmnožavanja virusa. Očekivano, u našem istraživanju kod velikog broja pacijenata uočena je CMV viremija i to kod 54% što je i očekivano jer je prokuženost CMV u opštoj populaciji visoka.⁽¹⁴⁾ Oko 60% seropozitivnih recipijenata razvija CMV viremiju.⁽¹⁵⁾ U različitim studijama stopa reaktivacije prisutna je kod 30-60% transplantiranih. Ovaj visok procenat može se objasniti da su u grupu pozitivnih pacijenata svrstani i oni koji su imali bar jednom u toku praćenja prisutnu CMV viremiju. Viremija se zahvaljujući kontinuiranom praćenju otkriva vrlo rano što omogućava promptno terapijsko reagovanje. Na taj način viremija je pod kontrolom, a samim tim smanjena je mogućnost nastanka teške kliničke slike. Antivirusna terapija ima i svoje toksične efekte pa je stalno praćenje molekularnim metodama omogućilo i davanje terapije samo onim pacijentima sa detektovanom viremijom. CMV viremija prisutna je u proseku nakon 35,15 dana što odgovara prethodnim rezultatima u našoj ustanovi.⁽¹⁶⁾ U ovom radu prikazana je važnost kontinuiranog praćenja pacijenata nakon transplantacije na prisustvo CMV. Ove pacijente treba pratiti i na ostale viruse - EBV, HSV1, HSV2, VZV, HHV6, HHV7 i druge oportunističke mikroorganizme.

ZAKLJUČAK

Razvoj virusološke dijagnostike omogućio je praćenje različitih virusnih bolesti kao i efekta same terapije. Pojedini testovi omogućavaju praćenje pacijenata multipleks PCR testovima. Na ovaj način iz jednog uzorka moguća je detekcija velikog broja različitih infektivnih uzročnika. Osim toga, razvijaju se i testovi sa sve nižim pragom detekcije kako bi ranije otkrili prisustvo virusa. Nova saznanja o molekularnim mehanizmima ćelijske latencije, kao i utvrđivanje faktora koji dovode do reaktivacije i razvoja citomegalovirusne bolesti su veoma značajna. Sve ove metode unapređuju prevenciju citomegalovirusne bolesti, koja je mnogo lakša nego lečenje klinički ispoljene forme.

Abstract

Background/Aim. Cytomegalovirus (CMV) causes major complications after allogeneic stem cell transplantation (SCT) such as pneumonia, retinitis, gastroenteritis, hepatitis, CNS infections. CMV is still a major cause of morbidity and mortality after hematopoietic cell transplantation. For CMV DNA monitoring in the samples of our patients we used quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) assays. The aim was use to determine CMV loads in patients undergoing SCT. **Methods:** A total of 50 SCT patients were studied during a 100 days period after transplantation for the presence of CMV DNA. Polymerase chain reaction (PCR) CMV DNA was performed on 488 full blood samples using Gene Proof CMV DNA tests. **Results:** CMV viremia was detected in 27/50 (54%) of the patients. The median posttransplantation time for the first positive PCR result was 35,15 days after SCT. Detected viral CMV load was between 336 copies/ml and 27800 copies/ml. **Conclusion.** Early detection of CMV in blood is very important for preemptive therapy. It is better to prevent than to treat CMV disease and its possible consequences.

LITERATURA

- Minton K. Viral immunity: How CMV bypasses immune memory. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 288.
- Gratwohl, A., Brand, R., Frassoni, F., Rocha, V., Niederwieser, D., Reusser, P., et al. Cause of death after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in early leukaemias: an EBMT analysis of lethal infectious complications and changes over calendar time. *Bone Marrow Transplant.* 36 ; 2005. 757–769. doi: 10.1038/sj.bmt.1705140.
- Ozdemir E., Saliba R.M., Champlin R.E., Couriel D.R., Giralt S.A., DeLima M, Khouri .I.F., Hosing C., Kornblau S.M., Anderlini P., Shpall E.J., Qazilbash M.H., Mollrem J.J., Chemaly R.F., Komanduri K.V. Risk factors associated with late cytomegalovirus reactivation after allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant* 2007; 40: 125-136.
- Luo X.H., Chang Y.J., Huang X.J. Improving cytomegalovirus specific T cell reconstitution after haploidentical stem cell transplantation. *J Immunol Res* 2014; 2014: 631951.
- Meyers J.D., Ljungman P., Fisher L.D. Cytomegalovirus excretion as a predictor of cytomegalovirus disease after marrow transplantation: importance of cytomegalovirus viremia. *J Infect Dis*, 1990;162: 373–80.
- Meijer E., Boland G.J., Verdonck L.F. Prevention of cytomegalovirus disease in recipients of allogeneic stem cell transplants. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 647–57.
- Reusser P., Einsele H., Lee J., Volin L., Rovira M., Engelhard D., et al. Randomised multicenter trial of foscarnet versus ganciclovir for pre-emptive therapy of cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2002; 99: 1159–64.
- Broers, A. E., van Der Holt, R., van Esser, J. W., Gratama, J. W., Henzen-Logmans, S., Kuenen-Boumeester, V., et al. Increased transplant-related morbidity and mortality in CMV-seropositive patients despite highly effective prevention of CMV disease after allogeneic T-cell-depleted stem cell transplantation. *Blood* 95,2000; 2240–2245.
- Zhu D., Pan C., Sheng J., Liang, H., Bian Z., Liu Y., et al. Human cytomegalovirus reprogrammes haematopoietic progenitor cells into immunosuppressive monocytes to achieve latency. *Nat. Microbiol.* 3, 2018; 503–513. doi:10.1038/s41564-018-0131-9.
- Reeves M. B., Lehner P. J., Sissons J. G., Sinclair J.H. An in vitro model for the regulation of human cytomegalovirus latency and reactivation in dendritic cells by chromatin remodelling. *J. Gen. Virol.* 86 (Pt 11), 2005a; 2949–2954. doi:10.1099/vir.0.81161-0.
- Forte E., Swaminathan S., Schroeder M. W., Kim J. Y., Terhune S. S. and Hummel M. Tumor necrosis factor alpha induces reactivation of human cytomegalovirus independently of myeloid cell differentiation following post-transcriptional establishment of latency. *MBio* 9, 2018; e01560-18. doi: 10.1128/ mBio.01560-18.
- Takenaka K., Nishida T., Asano-Mori Y., Oshima K., Ohashi K., Mori T. et al. Cytomegalovirus reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is associated with a reduced risk of relapse in patients with acute myeloid leukemia who survived to day 100 after transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 21, 2015; 2008-2016. doi:10.1016/j.bbmt.2015.07.019.
- De la Camara R. CMV in hematopoietic Stem Cell transplantation. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2016; 8(1): e2016031, doi: 10.4084/MJHID.2016.031.
- Cannon, M. J., Schmid, D. S., and Hyde, T. B. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev. Med. Virol.* 20,2010; 202–213. doi: 10.1002/rmv.655.
- George, B., Pati, N., Gilroy, N., Ratnamohan, M., Huang, G., Kerridge, I., et al. Pre-transplant cytomegalovirus (CMV) serostatus remains the most important determinant of CMV reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the era of surveillance and preemptive therapy. *Transpl. Infect. Dis.* 12, 2010; 322–329. doi: 10.1111/j.1399-3062.2010.00504.x.
- Kuljić-Kapulica N., Stamatović D., Savić D., Jovanović D., Tukić Lj., Anđelković N. Praćenje infekcije citomegalovirusom posle alogene transplantacije matičnih ćelija hematopoeze. *Vojnosanitetski pregled* 2010, vol. 67, br. 5, str. 375-378.

■ The paper was received / Rad primljen: 17.06.2020.
Accepted / Rad prihvaćen: 22.06.2020.