

Received: 2014.01.23
Accepted: 2014.11.19
Published: 2015.02.21

Infekcje ludzkim wirusem cytomegalii po transplantacji macierzystych komórek krwiotwórczych – metody diagnostyczne i znaczenie monitorowania poziomu DNA wirusa

HCMV infections after hematopoietic stem cell transplantation – diagnostic methods and importance of viral DNA level monitoring

Joanna Bocian¹, Danuta Januszkiewicz-Lewandowska^{1,2,3}

¹Zakład Diagnostyki Medycznej w Poznaniu

²Instytut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu

³Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego Klinika Onkologii Hematologii i Transplantologii Pediatrycznej w Poznaniu

Streszczenie

Zakażenie wirusem hCMV jest powszechne. Nosicielami wirusa jest 30-90% populacji. U osób będących w stanie immunosupresji skuteczna eliminacja wirusa przez komórki efektorowe układu odpornościowego nie jest możliwa. Aktywna infekcja hCMV u pacjentów poddanych HSCT może się stać przyczyną poważnych komplikacji potransplantacyjnych, niepowodzenia transplantacji, a nawet zgonu. Oprócz bezpośrednich skutków infekcji hCMV obserwuje się również u biorców przeszczepów działanie pośrednie, takie jak pogłębianie stanu immunosupresji czy rozwój/zaostrenie GvHD. Diagnostyka laboratoryjna zakażeń hCMV jest obecnie rutynowo stosowana u pacjentów poddanych HSCT. Zastosowanie znajdują przede wszystkim metody molekularne, pozwalające na szybką i czułą detekcję materiału genetycznego wirusa. Metody oparte na reakcji PCR zastąpiły starsze, takie jak kultury wirusowe lub detekcja antygenów wirusowych. Użycie metod ilościowych, jak R-T PCR, umożliwia identyfikację pacjentów z grupy wysokiego ryzyka rozwoju choroby hCMV, szybkie wdrożenie odpowiedniej profilaktyki lub leczenia, a także obserwowanie skuteczności terapii, dodatkowo ułatwiając podejmowanie decyzji co do jej modyfikacji. Zastosowanie leczenia wyprzedzającego, opierającego się na monitorowaniu poziomu DNA wirusa, doprowadziło w ostatnich latach do znacznego obniżenia chorobotwórczości i śmiertelności w wyniku aktywnej infekcji hCMV u pacjentów po HSCT. Strategia profilaktyki wybiórczej pozwala również na ograniczenie grupy pacjentów kwalifikowanych do rozpoczęcia toksycznego leczenia przeciwwirusowego, opóźniającego rozwój swoistej odpowiedzi immunologicznej wobec wirusa. Wystąpienie objawowej choroby hCMV nadal wiąże się z wysoką śmiertelnością wśród biorców HSCT. Diagnostyka infekcji hCMV wymaga dalszego rozwoju, a obecnie stosowane metody ilościowe ujednolicenia i optymalizacji.

Słowa kluczowe:

ludzki wirus cytomegalii • transplantacja macierzystych komórek krwiotwórczych • poziom DNA hCMV • diagnostyka molekularna • profilaktyka



Summary

HCMV infection is very common. The virus infects 30-90% of population. In immunocompromised patients effective elimination of the virus by immune system is limited by immunosuppressive therapy. Active hCMV infection after HSCT can lead to severe posttransplant complications, graft failure or even death. In addition to direct effects of hCMV infection the virus can cause indirect effects in transplant recipients such as increased immunosuppression or GvHD development/progression. Laboratory diagnostic of hCMV infections after HSCT is now routinely used. Fast and sensitive molecular methods that detect hCMV genetic material are found particularly useful. Quantitative methods, such as R-T PCR, enable identification of patients at high risk of developing hCMV disease and fast employment of appropriate prophylaxis or treatment. Moreover it allows precise monitoring of treatment efficiency and facilitates therapy – related decisions. In last years pre-emptive therapy, which depends on viral load molecular monitoring, significantly reduced morbidity and mortality of active hCMV infections in HSCT recipients. Selective prophylaxis approach enables reduction of patients treated with toxic antiviral therapy which is associated with delayed restoration of virus – specific immune response. Occurrence of symptomatic hCMV disease is still associated with high mortality among HSCT recipients. HCMV infection diagnosis requires further development. Quantitative methods should be unified and optimized.

Keywords: human cytomegalovirus • hematopoietic stem cell transplantation • hCMV DNA level • molecular diagnosis • prophylaxis

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1141100>

Word count: 5464

Tables: 1

Figures: 3

References: 41

Adres autorki: Joanna Bocian, Zakład Diagnostyki Medycznej, ul. Dobra 38, 60-595 Poznań; e-mail: asiabocian@wp.pl

CHARAKTERYSTYKA WIRUSA

Ludzki wirus cytomegalii (human cytomegalovirus, hCMV), nazywany częściej cytomegalowirusem, według taksonomii wirusologicznej jest sklasyfikowany jako ludzki herpeswirus 5 (human herpesvirus 5, HHV-5). Jest to gatunkowo swoisty patogen, należący do podrodziny *Betaherpesvirinae*. Budowa hCMV jest typowa dla herpeswirusów. Genom wirusa w postaci liniowego dwuniciowego kwasu deoksyrybonukleinowego (double-stranded deoxyribonucleic acid, dsDNA) jest umiejscowiony w ikosaedralnym kapsydzie otoczonym przez białkową macierz (tegument). Te elementy są otoczone pochodzącą z retikulum endoplazmatycznego komórki gospodarza dwuwarstwą lipidową z zakotwiczonymi w niej licznymi glikoproteinami wirusowymi. Całość tworzy pojedynczy wirion o średnicy 200-300

nm [6,27]. HCMV jest największym herpeswirusem infekującym człowieka. Jego genom tworzy około 235 000 par zasad i składa się z sześciu części: dwóch regionów sekwencji unikalnych – długiej UL (unique long) i krótkiej US (unique short) oraz czterech elementów będących sekwencjami powtórzonymi. Region UL jest ograniczony przez długie powtórzenia terminalne (terminal repeat long, TRL) oraz długie powtórzenia wewnętrzne (internal repeat long, IRL), natomiast region US przez krótkie powtórzenia terminalne (terminal repeat short, TRS) oraz krótkie powtórzenia wewnętrzne (internal repeat short, IRS). Sekwencje IRL i IRS są odwróconymi powtórzeniami sekwencji TRL i TRS. Całkowity genom hCMV jest więc kombinacją elementów o konfiguracji TRL-UL-IRL-IRS-US-TRS (ryc.1). Rozmiary poszczególnych elementów mogą się różnić pomiędzy szczepami wirusa [3,24].



Ryc. 1. Schemat organizacji genomu wirusa hCMV – opis w tekście (wg [3,5,21,26] zmodyfikowano)

W poznaniu mechanizmów chorobotwórczości hCMV konieczne jest zrozumienie cyklu życiowego wirusa oraz dwóch jego najistotniejszych procesów: ekspresji genów wirusowych oraz następującej replikacji genomu hCMV. Cykl życiowy hCMV, tak jak w przypadku innych wirusów z rodziny *Herpesviridae*, składa się z fazy litycznej, podczas której zachodzi wytwarzanie wirionów potomnych oraz fazy latentnej (tzw. stan uśpienia). Wirus cytomegalii charakteryzuje się długim cyklem życiowym (około 96 godzin). Pierwszym jego etapem jest adsorpcja wirionu do błony komórki docelowej. W ten proces są zaangażowane glikoproteiny wirusowe oddziałujące z receptorami obecnymi na komórce gospodarza. W wyniku kolejnych oddziaływań białek otoczki wirusowej z powierzchnią komórki dochodzi do fuzji warstw lipidowych. Po etapie fuzji zainicjowana zostaje tzw. produktywna infekcja, która charakteryzuje się skoordynowaną kaskadową syntezą białek. Przebiega ona w 3 fazach:

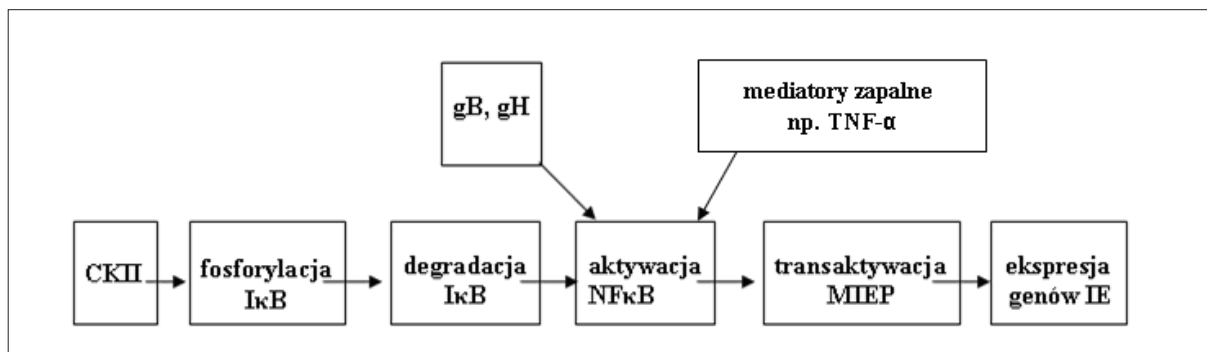
- 1) wczesnej natychmiastowej IE (intermediate-early),
- 2) wczesnej E (early), nazywanej często w literaturze fazą delayed early,
- 3) późnej L (late).

W fazie IE powstają białka zaangażowane w replikację DNA, natomiast w fazach E i L białka strukturalne, konieczne w procesie składania wirionów potomnych. Kluczową rolę w namnażaniu wirusa pełnią główne geny fazy IE (major IE genes, MIE). Gdy wirus dostaje się do wnętrza komórki dochodzi do szybkiej transaktywacji głównego promotora genów natychmiastowych wczesnych (major immediate – early promoter, MIEP), co uruchamia ekspresję genów IE. MIEP ulega transaktywacji w wyniku aktywacji NF-κB (nuclear factor kappa B, czynnik jądrowy kappa B) [3,25,29,40]. HCMV wykorzystuje wiele mechanizmów, by we wczesnych etapach infekcji doprowadzić do szybkiej aktywacji NF-κB. Jednym z takich mechanizmów jest prawdopodobnie pakowanie do wirionów potomnych cząsteczek komórkowej kinazy CKII (casein kinase II, kinaza kazeiny II), dla której substratem jest m.in. inhibitor czynnika NF-κB (inhibitor κB, IκB). Bezpośrednia fosorylacja IκB, przez uwolnioną z wirionu hCMV kinazę, powoduje jego ubikwitynację oraz degradację w proteasomie, co uwalnia NF-κB i umożliwia jego translokację

do jądra komórkowego. W wyniku tego mechanizmu wewnątrzkomórkowe ścieżki sygnalizacyjne zależne od NF-κB są szybko indukowane w zainfekowanych komórkach i dochodzi do promocji efektywnej transaktywacji MIEP (ryc. 2). Wzrost aktywności NF-κB następuje już w pierwszych 5 minutach po wnikięciu wirusa do komórki docelowej i dotyczy zarówno infekcji pierwotnej, jak i reaktywacji. Również główne glikoproteiny otoczki hCMV (gB oraz gH) inicjują kaskady sygnalizacyjne zależne od NF-κB [3,7,25]. Aktywacja NF-κB i transaktywacja MIEP pełnią najprawdopodobniej wiodącą rolę w reaktywacji hCMV. Podejrzewa się, że może to być główny mechanizm „wybudzania” hCMV związanego z działaniem różnorodnych mediatorów zapalnych. Jest to szczególnie interesujące z punktu widzenia transplantologii, ze względu na istnienie zależności między występowaniem stanów zapalnych, innych infekcji oraz choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (graft versus host disease, GvHD) a reaktywacją hCMV [3,7,30,37,40].

W wyniku produktywnej infekcji dochodzi do składania wirusowych cząstek potomnych. Konsekwencją pierwotnej infekcji hCMV jest przejście wirusa w stan latencji. U osób zdrowych jedynie okresowo ulega on spontanicznym ograniczonym reaktywacjom. Zakażenie latentne charakteryzuje się ograniczoną ekspresją białek wirusowych – jest to jedna ze strategii wirusa pozwalająca na unikanie odpowiedzi ze strony układu immunologicznego, a tym samym całkowitej eliminacji z organizmu. Dokładne mechanizmy, poprzez które wirus ustala i utrzymuje stan uśpienia oraz ulega reaktywacji są nadal niedostatecznie poznane. Komórki, które są głównym rezerwuarem uśpionego hCMV to monocyty i makrofagi, natomiast aktywna replikacja może zachodzić w wielu różnych typach komórek, takich jak komórki endotelialne, epitelialne, nerwowe, fibroblasty, miofibroblasty, hepatocyty, trofoblasty, komórki dendrytyczne, neutrofile oraz komórki mięśni gładkich [3,20,23,40].

Zakażenie hCMV jest powszechne. Szacuje się, że w zależności od lokalizacji geograficznej, statusu socjoekonomicznego oraz wieku, nosicielami wirusa jest 30-90% populacji. Wirus jest przenoszony drogą kropelkową, przez ślinę, moczu, krew i preparaty krwiopochodne, drogą płciową, z matki na dziecko poprzez



Ryc. 2. Przykłady mechanizmów aktywacji NF-κB prowadzące do ekspresji genów cyklu litycznego hCMV – opis w tekście (wg [3,22,24,27,36] zmodyfikowano)



transfer łożyskowy oraz z mlekiem matki, a także z przeszczepionym narządem lub komórkami macierzystymi [3,18,20,35]. Najczęściej do pierwotnej infekcji dochodzi w dzieciństwie. Infekcja hCMV jest relatywnie niegroźna dla zdrowego człowieka z prawidłowo funkcjonującym układem immunologicznym, najczęściej przebiega bezobjawowo. Jednak nawet u zdrowej osoby wirus nie zostaje wyeliminowany przez organizm. Komplikacje związane z pierwotną infekcją hCMV u osoby immunokompetentnej są bardzo rzadkie, podejrzewa się jednak hCMV o wpływ na etiopatogenezę niektórych chorób nowotworowych, sercowo-naczyniowych oraz autoimmunologicznych. HCMV jest również częstą przyczyną wrodzonych infekcji wirusowych. Skutkiem zakażenia w okresie płodowym może być wystąpienie wad wrodzonych, upośledzenia umysłowego czy głuchoty [5,35,37,40].

INFEKcje HCMV po HSCT: OBJAWY, CZĘSTOTLIWOŚĆ, CZYNNIKI RYZYKA

HCMV jest jednym z najistotniejszych wirusów związanych z powikłaniami posttransplantacyjnymi, niepowodzeniami transplantacji, a także zgonami po HSCT [8,19,20,22]. Stan immunosupresji uniemożliwia skuteczną eliminację wirusa przez komórki efektorowe układu odpornościowego. Główną przyczyną jest niedobór swoistych wobec hCMV limfocytów T cytotoksycznych (cytotoxic T lymphocytes, CTL). Natomiast niedobór swoistych limfocytów T pomocniczych zwiększa ryzyko rozwoju późnej choroby hCMV oraz śmiertelność po HSCT. Rola odpowiedzi humoralnej pozostaje niejasna: przeciwciała nie wydają się chronić przed infekcją, najprawdopodobniej ich funkcją jest jedynie ograniczanie progresji choroby [18,20]. Coraz większym zainteresowaniem badaczy cieszą się wrodzone mechanizmy odporności związane z kontrolowaniem namnażania wirusa po HSCT. W ostatnich latach udowodniono wpływ wybranych polimorfizmów genów związanych z funkcjonowaniem m.in. komórek NK oraz monocytów na rozwój infekcji/choroby hCMV po HSCT [3,20,21].

Do aktywnego namnażania wirusa po HSCT może dojść w wyniku pierwotnej infekcji osoby seronegatywnej lub infekcji wtórnej pacjenta seropozytywnego. Mimo iż wirus przenoszony jest licznymi drogami, infekcja pierwotna jest w tym wypadku najczęściej rezultatem przetoczenia wirusa wraz z materiałem przeszczepowym lub z produktami krwi zawierającymi leukocyty zainfekowane latentnie. Infekcja wtórna może wynikać z reaktywacji wirusa endogennego lub nadkażenia (reinfekcji) innym szczepem hCMV. Infekcja hCMV po HSCT jest najczęściej wynikiem reaktywacji szczepu biorcy. Za jedno z istotnych źródeł wirusa uważa się zainfekowane latentnie komórki zrębu szpiku, które nie giną podczas kondycjonowania przygotowującego do zabiegu HSCT. Immunosupresja i/lub stymulacja alloantigenami może wywołać replikację wirusa, ponadto możliwy jest też transfer wirionów z komórek zrębu biorcy do komórek progenitorowych hematopoezy pochodzących od dawcy

w wyniku ich bliskiego kontaktu [23,34,35,37,39]. Reaktywację hCMV od reinfekcji innym szczepem wirusa odróżnia się, stosując sekwencjonowanie swoistych regionów genomu hCMV lub wykorzystując różne metody molekularne pozwalające na analizę określonych genów hCMV, o których wiadomo, że są polimorficzne. Genotypowanie szczepów hCMV nie jest jeszcze rutynowo stosowane w praktyce klinicznej, natomiast staje się popularnym tematem badań w celu określenia korelacji szczep-ryzyko aktywnej infekcji/nawracającej infekcji/choroby hCMV po transplantacji [4,19].

Aktywna infekcja hCMV związana z replikacją genomu wirusa i uwalnianiem wirionów potomnych po HSCT może przebiegać jako infekcja bezobjawowa, zespół/syndrom hCMV (postać wiremiczna choroby hCMV) lub jako inwazyjna choroba hCMV, zarówno wcześniej, jak i późno po transplantacji (przed/po 100 dniach od zabiegu) (ryc. 3). Raporty dotyczące częstotliwości aktywnej infekcji hCMV w tej grupie pacjentów znacznie różnią się, co wynika głównie z odrębności dotyczących czułości stosowanych metod diagnostycznych oraz różnego doboru materiału badanego [17,18,19,20,27,35,37]. Aktywna infekcja hCMV definiowana jest jako detekcja wirusa (najczęściej wirusowego DNA, RNA lub antygeny pp65) we krwi lub jej frakcjach u pacjenta hCMV-seronegatywnego (infekcja pierwotna) lub hCMV-seropozytywnego (reaktywacja lub reinfekcja innym szczepem). Międzynarodowa definicja choroby hCMV wymaga wykrycia wirusa lub składników jego wirionu metodami o odpowiedniej swoistości i czułości w materiale uzyskanym przez biopsję lub inną inwazyjną procedurę przy jednoczesnym stwierdzeniu objawów klinicznych ze strony objętych chorobą organów/układów. Za niewystarczającą uznaje się w takiej sytuacji detekcję wirusa z wykorzystaniem oznaczeń wykonanych we krwi. Przy braku symptomów wskazujących na inwazyjną chorobę hCMV i przy jednoczesnej detekcji wirusa lub jego składników oraz występowaniu związanej z infekcją gorączki rozpoznaje się zespół hCMV (u pacjentów otrzymujących wysokie dawki leków immunosupresyjnych gorączka może jednak nie wystąpić). W wiremicznej infekcji hCMV występują często bóle mięśniowo-stawowe, osłabienie i supresja hematopoezy. Choroba hCMV zająć może każdy organ/układ. Częstą, niebezpieczną postacią choroby hCMV po HSCT jest śródmiąższowe zapalenie płuc przebiegające najczęściej z gorączką, dusznością, suchym kaszlem i hipoksją. Śmiertelność przekracza 50%. Jedną z częstszych postaci choroby hCMV jest także zapalenie błony śluzowej przewodu pokarmowego przebiegające z nudnościami, dysfagią, wymiotami, bólami brzucha, biegunką, perforacją oraz krwawieniem. Zajęcie siatkówki przez chorobę hCMV po transplantacji jest obecnie rzadkie, choć obserwacje wskazują tendencję wzrostową. Wczesnym objawem jest spadek ostrości widzenia. U około 60% pacjentów choroba obejmuje obie gałki oczne. Brak leczenia wiąże się z wysokim ryzykiem utraty wzroku. Rzadko występuje zajęcie wątroby, nerek, pęcherza moczowego, mięśnia sercowego, trzustki [7,8,17,18,19,20]. W 2011 r. Schmidt-Hieber i wsp. opubli-

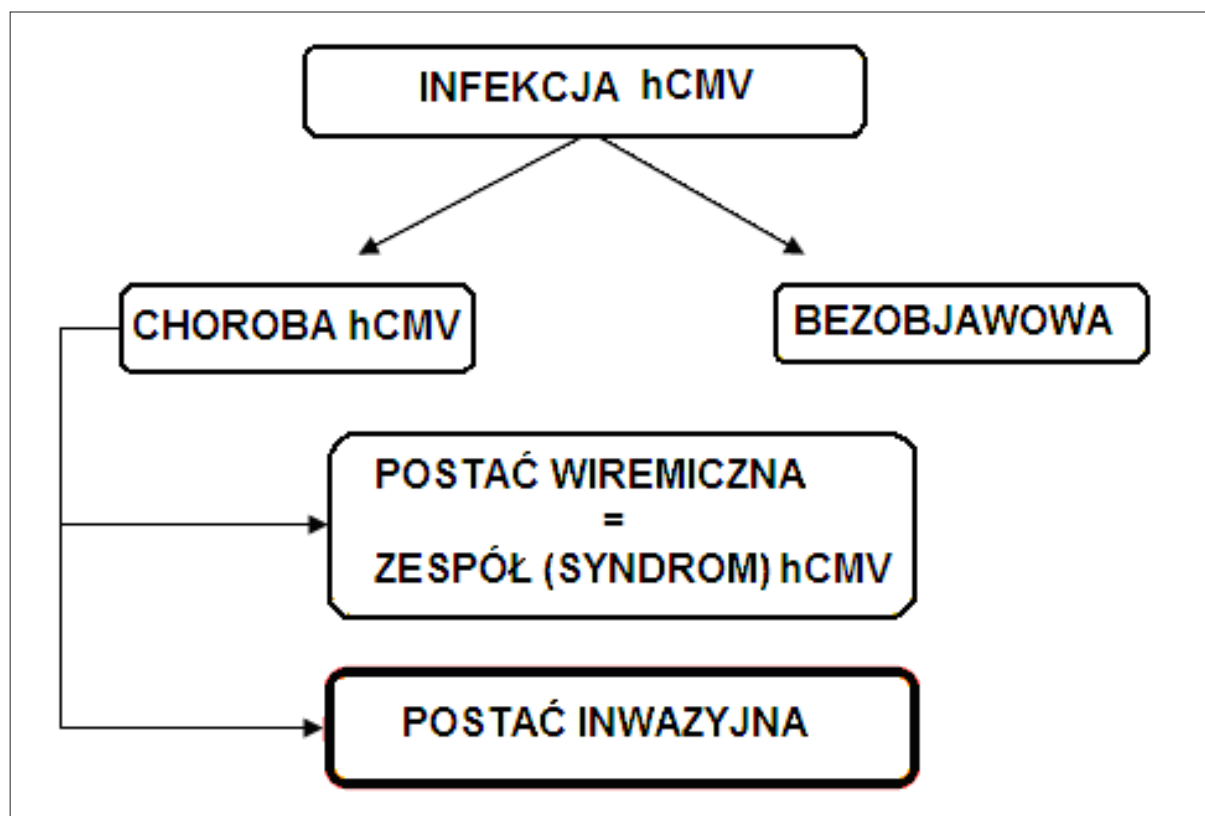
kowali dane dotyczące częstości wirusowego zapalenia mózgu po allo-HSCT (1,2%). HCMV był przyczyną tych powikłań w 6% przypadków [32].

Ponieważ infekcja hCMV może skutkować niewydolnością hematopoety, stanowi wyjątkowo istotne zagrożenie dla biorców HSCT. Mechanizmy supresji hematopoety w wyniku infekcji hCMV nie są do końca poznane. Sugeruje się, że odpowiedzialne są zarówno bezpośrednia infekcja komórek progenitorowych hematopoety (prawdopodobnie również komórek macierzystych), jak i indukowane przez hCMV zaburzenia w wytwarzaniu cytokin przez komórki zrębu szpiku kostnego, zaangażowanych w regulację krwiotworzenia. Udowodniono, że niektóre szczepy kliniczne hCMV mogą hamować tworzenie kolonii granulocytarnych i erytrocytarnych *in vitro* [23,34,39].

Niektórzy autorzy odradzają używania terminu „syndrom hCMV” w odniesieniu do biorców HSCT, ze względu na mnogość czynników mogących powodować gorączkę i supresję szpiku w okresie potransplantacyjnym (m.in. inne wirusy, tj. HHV-6 czy adenowirus). Wobec charakterystycznych objawów oraz stwierdzonej infekcji hCMV w celu rozpoznania „syndromu hCMV” zaleca się wykluczenie co najmniej infekcji HHV-6 [19]. Sugeruje się, że infekcja hCMV może się przyczyniać również do niepowodzenia HSCT (hCMV – associated graft failure), przebiegającego z ciężką pancytopenią oraz hipoplazją

szpiku. Wymagane jest wówczas stwierdzenie obecności wirusa w szpiku oraz wykluczenie odrzucenia przeszczepu, wznowy choroby podstawowej i infekcji HHV-6 [19,34].

Oprócz bezpośrednich skutków infekcji hCMV, w postaci ww. objawów klinicznych, obserwuje się również u biorców przeszczepów liczne działania pośrednie. Immunomodulujące właściwości wirusa sprawiają, że jest on istotnym czynnikiem ryzyka rozwoju innych infekcji oportunistycznych poprzez pogłębianie stanu immunosupresji. Dodatkowy mechanizm, w wyniku którego wzrasta ryzyko kolejnych zakażeń polega na tworzeniu tzw. wrót infekcji przez hCMV wskutek uszkodzenia błon śluzowych [3,30,39,40]. Śmiertelność po HSCT w wyniku infekcji bakteryjnych i grzybiczych wzrasta szczególnie w przypadku rozwoju pierwotnej infekcji hCMV [17]. Podejrzewa się również wpływ wirusa hCMV na procesy onkogenezy, zaobserwowano bowiem, że u chorych zainfekowanych wirusem hCMV do rozwoju potransplantacyjnych zespołów limfoproliferacyjnych (posttransplant lymphoproliferative disorders, PTLD) dochodzi 7-10 razy częściej [5,7,8,41]. Ponadto istnieje wyraźny związek między infekcją hCMV po allo-HSCT a GvHD. Rozwój/zaostrenie GvHD sprzyja reaktywacji hCMV, m.in. w wyniku uwalniania mediatorów zapalnych, takich jak np. czynnik martwicy nowotworu α (tumor necrosis factor α , TNF- α), przez pogłębienie immunosupresji w związku z zastosowaniem steroidoterapii w leczeniu



Ryc. 3. Możliwy przebieg infekcji hCMV po HSCT – opis w tekście (wg [6,16,17,18] zmodyfikowano)



GvHD. Reaktywacja hCMV może powodować rozwój/zaostrenie GvHD (najprawdopodobniej w wyniku poliklonalnej aktywacji limfocytów B przez hCMV i wytwarzanie autoprzeciwciał) [37,40].

Do aktywnej replikacji hCMV dochodzi u około 75-80% hCMV-seropozytywnych biorców allo-HSCT. Bez stosowania odpowiedniej profilaktyki choroba hCMV rozwija się wówczas nawet w 20-35% przypadków i charakteryzuje się wysoką śmiertelnością (30-50%). Obecnie czułe metody diagnostyczne umożliwiające wczesną interwencję kliniczną znacznie obniżają częstość rozwoju choroby hCMV [4,17,20]. Ryzyko przeniesienia wirusa hCMV w przypadku kombinacji serostatusów R-/D+ (recipient/donor, biorca/dawca) wynosi 30-40% [8,15,17,37].

Reaktywacja hCMV u biorców auto-HSCT jest rzadkim powikłaniem – dotyczy 4,2% biorców otrzymujących niezmodyfikowany materiał przeszczepowy. Jednak w przypadku selekcji komórek CD34+ ryzyko infekcji wzrasta do 22,6%, a przy dodatkowym oczyszczeniu za pomocą przeciwciał anti-CD20 do 89%. Śmiertelność w wyniku choroby hCMV w dwóch pierwszych grupach pacjentów wynosi odpowiednio 2,1 oraz 12,9% [7,8,37].

Do rozwoju infekcji hCMV po HSCT dochodzi najczęściej w ciągu pierwszych trzech miesięcy po transplantacji – w okresie najsilniejszej immunosupresji. W przypadku stosowania profilaktyki przeciwwirusowej infekcja może ujawnić się jednak znacznie później [2,7,17,28,37]. Do tej pory zidentyfikowano wiele czynników predysponujących do rozwoju aktywnej infekcji hCMV (tabela 1), co umożliwia zakwalifikowanie pacjentów do odpowiednich grup ryzyka. Czynniki te pokrywają się w dużej mierze z czynnikami ryzyka reaktywacji innych herpeswirusów i wywoływanych przez nie jednostek chorobowych. Dla biorców allo-HSCT jednym z najistotniejszych czynników ryzyka jest niekorzystna kombinacja serologiczna względem hCMV. Seropozytywność biorcy względem hCMV wiąże się z wysokim ryzykiem choroby hCMV, opóźnionym wszczęciem w zakresie neutrofilów i płytek krwi oraz pozostaje istotnym czynnikiem ryzyka śmiertelności związanej z transplantacją (TRM, transplant – related mortality) [19]. Mimo stosowania leczenia wyprzedzającego, układ R-/D+ wiąże się z 30% ryzykiem rozwoju aktywnej infekcji hCMV, często o ciężkim przebiegu [4,16,18,20]. Powikłania bakteryjne i grzybicze w tym wypadku wiążą się z wysoką śmiertelnością (18,3% w porównaniu z 9,7% dla statusu R-/D-) [20]. Jeżeli to możliwe, dla biorców seronegatywnych dobiera się seronegatywnego dawcę, ponadto przetacza się preparaty krwiopochodne ubogoleukocytarne lub od hCMV-negatywnych dawców. Jeżeli te warunki są spełnione ryzyko pierwotnej infekcji u tych pacjentów jest bardzo niskie. U pacjentów seropozytywnych optymalny dobór dawcy jest kontrowersyjny. Badania potwierdzają, że w przypadku doboru dawcy niespokrewnionego układ R+/D+ wiąże się z redukcją TRM w porównaniu z kombinacją R+/D-. Innym badaczom nie udaje się potwierdzić tej zależności [17,18,19,20]. Dla hCMV-pozytywnych

biorców macierzystych komórek hematopoezy od zgodnych dawców rodzinnych nie potwierdzono do tej pory przewagi któregośkolwiek serostatusu dawcy [17,20,37]. Ryzyko infekcji hCMV zależy też od rodzaju i stopnia immunosupresji (największe ryzyko niesie zastosowanie przeciwciał wywołujących T-deplecję *in vivo*, zarówno poliklonalnych, jak i monoklonalnych), rodzaju dawcy oraz stopnia niezgodności względem badanych antygenów zgodności tkankowej HLA (human leukocyte antigen) [7,8]. Zastosowanie T-deplecji materiału przeszczepowego również niesie zwiększone ryzyko infekcji hCMV. Istotne może okazać się także pochodzenie materiału przeszczepowego: rekonstrukcja hCMV-swoistej odporności może być znacznie opóźniona po transplantacji komórek pochodzących z krwi pępowinowej (cord blood stem cell transplantation, CBSCT) [17,18,19,20,26]. W wielu badaniach udało się również wykazać wpływ niektórych polimorfizmów genów zaangażowanych w funkcjonowanie układu immunologicznego na reaktywację i chorobę hCMV po allo-HSCT. Z większym ryzykiem wiążą się np. niektóre polimorfizmy dla receptora C – C chemokin typu 5 (chemokine receptor 5, CCR5), interleukiny 10 (interleukin-10, IL-10) oraz białka chemotaktycznego dla monocytów typu 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) [21].

DIAGNOSTYKA LABORATORYJNA INFЕКЦИИ hCMV U BIORCÓW HSCT – PRZEGLĄD STOSOWANYCH METOD

Diagnostyka laboratoryjna zakażeń hCMV jest obecnie rutynowo stosowana u pacjentów w stanie immunosupresji. Wykorzystywane są przede wszystkim metody, które pozwalają na szybką i czułą detekcję wirusa lub jego elementów (białka, kwasy nukleinowe). W ciągu ostatnich dwudziestu lat metody diagnostyczne stosowane w detekcji wirusów znacznie się zmieniły.

Tabela 1. Czynniki ryzyka rozwoju infekcji hCMV po allo-HSCT – opis w tekście (wg [6,7,15,16,17,18])

Czynniki ryzyka infekcji hCMV po allo-HSCT

- niekorzystna kombinacja serologiczna względem hCMV
 - * R-/D+ (większe ryzyko infekcji pierwotnej o ciężkim przebiegu)
 - * R+/D – (raporty dotyczące wyższej TRM)
- niezgodność w zakresie antygenów HLA
- dobór dawcy niespokrewnionego
- głęboka immunosupresja
- T – deplecja *in vitro* lub *in vivo*
- rozwój GvHD
- inne infekcje i stany zapalne
- CBSCT
- niektóre polimorfizmy genów zaangażowanych w funkcjonowanie układu immunologicznego

hCMV – ludzki wirus cytomegalii, allo-HSCT – allogeniczna transplantacja macierzystych komórek hematopoetycznych, R – biorca, D – dawca, TRM – śmiertelność zależna od transplantacji, HLA – antygeny ludzkich leukocytów, GvHD – choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi, CBSCT – transplantacja macierzystych komórek z krwi pępowinowej.

Obecnie użycie molekularnych metod ilościowych pozwala na monitorowanie replikacji hCMV i innych herpeswirusów, co umożliwia identyfikację pacjentów wysokiego ryzyka rozwoju choroby, szybkie wdrożenie odpowiedniej profilaktyki/leczenia, a także obserwowanie skuteczności terapii, dodatkowo ułatwiając podejmowanie decyzji, co do jej modyfikacji. Metody stosowane w diagnostyce infekcji hCMV dzieli się na umożliwiające:

- a) wykrycie swoistych przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom wirusowym (metody serologiczne),
- b) izolację zdolnego do replikacji wirusa (detekcja wiremii),
- c) wykrycie antygeny pp65 hCMV (detekcja antygenemii),
- d) wykrycie DNA hCMV (detekcja poziomu DNA „DNAemia”),
- e) wykrycie RNA hCMV (detekcja poziomu RNA, „RNAemia”).

Należy zaznaczyć, że terminy „DNAemia” i „RNAemia” są zarezerwowane dla detekcji kwasów nukleinowych wirusa we krwi lub jej frakcjach. Metody detekcji DNA i RNA zalicza się do tzw. metod molekularnych [19].

METODY SEROLOGICZNE

Metody serologiczne umożliwiają detekcję przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom wirusa i stwierdzenie przebytej infekcji (przeciwciała klasy IgG) lub toczącej się ewentualnie świeżo przebytej (przeciwciała klasy IgM). U osób będących w stanie immunosupresji przeciwciała anty-hCMV IgM pojawiają się jednak zbyt późno lub wcale, stąd metody serologiczne nie mogą być wykorzystywane w wykrywaniu i monitorowaniu infekcji hCMV w tej grupie pacjentów. Metody te pozwalają jednak na ocenę ryzyka rozwoju choroby hCMV na podstawie określenia nosicielstwa hCMV u dawcy i biorcy przed zabiegiem. Najpopularniejszą metodą detekcji swoistych antygenowo przeciwciał jest test immunoenzymosorpcyjny ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) [7,20,35].

METODY DETEKЦИИ WIREMII hCMV

Do najstarszych technik detekcji wirusa hCMV należą klasyczne kultury wirusowe polegające na namnażaniu wirusa w hodowlach komórkowych i obserwacji charakterystycznych efektów cytopatycznych. Najczęściej badanie takie przeprowadza się na kulturach fibroblastów, z zastosowaniem komórek krwi, moczu, płynu mózgowo-rdzeniowego lub popłuczyn z drzewa oskrzelowego (bronchoalveolar lavage, BAL), jako materiału badanego. Tradycyjny test łyśinkowy jest metodą bardzo czasochłonną (efekty cytopatyczne obserwowane po 2-6 tygodniach), niezbyt czułą, kosztowną, charakteryzującą się niską powtarzalnością wyników. Test nie jest stosowany w rutynowym monitorowaniu infekcji hCMV po HSCT [2,7,20,33].

Nowszą metodą jest technika „shell vial” łącząca zalety izolacji wirusa oraz metod detekcji jego antygenów, określana często jako metoda szybkich hodowli komórkowych. W metodzie tej na hodowlę fibroblastów rosnących w pojedynczej warstwie nanosi się materiał badany i poddaje wirowaniu, co umożliwia szybszą adsorpcję i penetrację wirusa. Po inkubacji komórki utrwała się i poddaje barwieniu immunofluorescencyjnemu z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko białkom wirusowym powstającym wcześniej w przebiegu infekcji hCMV. Jednym z częściej wybieranych jest białko fazy IE pp72. Wykorzystując metodę „shell vial”, wyniki można uzyskać po 16-48 godzinach, ponadto jest to metoda o wysokiej swoistości. Istotne wady tej metody to niska czułość, konieczność posiadania hodowli komórkowych oraz wykonania badania w krótkim czasie od pobrania materiału, ponadto możliwość wystąpienia nieswoistej toksyczności wobec zastosowanej hodowli. Również ta metoda nie jest stosowana w regularnym oznaczaniu wiremii hCMV, jest jednak bardzo użyteczna w diagnozowaniu choroby hCMV, szczególnie w postaci zapalenia płuc (wykrywanie obecności hCMV w BAL) [2,7,16,20,33].

Mikroskopia elektronowa pozwalająca na uwidocznienie pojedynczych wirionów nie znajduje zastosowania klinicznego w detekcji infekcji hCMV. Metoda ta jest wykorzystywana najczęściej w pracach badawczych mających na celu np. potwierdzenie zdolności wirusa do infekowania konkretnych rodzajów komórek, wywoływania w nich zmian morfologicznych, zmian w organizacji cytoszkieletu itp. [23].

METODA DETEKЦИИ ANTYGENEMII PP65 hCMV

Fosfoproteina pp65 (produkt wirusowego genu *UL83*) jest wczesnym białkiem strukturalnym hCMV. Występuje w jądrze komórkowym oraz cytoplazmie zainfekowanej komórki. W literaturze jest również określana jako lower matrix phosphoprotein [3,38]. Detekcja antygeny pp65 w leukocytach krwi obwodowej polega na zastosowaniu metody immunocytochemicznej umożliwiającej wyznaczenie komórek wykazujących jego ekspresję z użyciem przeciwciał monoklonalnych. W wykrywaniu antygeny pp65 możliwe jest zastosowanie detekcji bezpośredniej (tylko przeciwciała pierwszorzędowe) lub pośredniej (przeciwciała pierwszo- i drugorzędowe). Wizualizacja może odbywać się z zastosowaniem przeciwciał sprzężonych z fosfatazą alkaliczną, peroksydazą chrzanową lub barwnikiem fluorescencyjnym. Wyniki uzyskane za pomocą tej metody wykazują dobrą korelację z przebiegiem klinicznym infekcji. Jest ona wysoce swoista (80-100%). Czułość metody detekcji antygeny pp65 jest co prawda znacznie wyższa niż kultur wirusowych i sięga 100% dla choroby hCMV, natomiast dla bezobjawowej infekcji wynosi już tylko 60-70%. Czas wykonania oznaczenia wynosi nie więcej niż 6 godzin. Istotne wady tej metody to brak możliwości zastosowania jej we wczesnym etapie po HSCT ze względu na zbyt niski poziom leukocytów, konieczność przeprowadzenia



badania w krótkim czasie od pobrania materiału badanego (do 8 godzin), brak automatyzacji, czasochłonność, problematyczna standaryzacja oraz subiektywizm oceny preparatów [2,7,15,26,28].

METODY DETEKЦИИ DNA

Metody wykrywania DNA hCMV znajdujące zastosowanie kliniczne to przede wszystkim klasyczna łańcuchowa reakcja polimerazy (polimerase chain reaction, PCR) oraz jej modyfikacje, takie jak „nested PCR” oraz R-T PCR (real-time PCR, PCR w czasie rzeczywistym). Inne, rzadziej stosowane metody to m.in. hybrydyzacja *in situ*, technika przechwytywania hybryd (hybrid capture, HC) oraz test z użyciem rozgałęzionego DNA (branched-chain DNA, bDNA).

Opracowanie metody PCR w 1983 r. okazało się przełomem m.in. w diagnostyce wirusologicznej. Technika PCR, pozwalająca na powielenie najmniejszych ilości DNA, jest obecnie uważana za najbardziej czułą w diagnostyce hCMV po HSCT. Metoda ta składa się z trzech etapów, cyklicznie powtarzanych przy zastosowaniu odpowiednio dobranego profilu temperaturowo-czasowego: denaturacji matrycy w postaci dsDNA, przyłączenia starterów flankujących amplifikowany region oraz ich wydłużania przez termostabilną polimerazę DNA w wyniku przyłączenia komplementarnych trifosforanów deoksyrybonukleozydów (deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP). Tak powielony fragment genomu wirusa poddaje się elektroforezie i uwidacznia za pomocą barwnika interkalującego, świecącego w UV.

W diagnostyce infekcji hCMV popularna jest również metoda „nested PCR” (gniazdowy PCR, wewnętrzny PCR), polegająca na przeprowadzeniu dwóch następujących po sobie reakcji PCR, przy czym druga wykorzystuje startery flankujące amplikon z pierwszej reakcji. Startery użyte w pierwszej reakcji są określane jako zewnętrzne, natomiast w drugim etapie są to tzw. startery wewnętrzne. Technika „nested PCR” charakteryzuje się większą czułością i swoistością, jednak dodatkowo manipulacje z nią związane wiążą się z wyższym ryzykiem kontaminacji badanego materiału. Dwie opisane metody pozwalają na jakościową ocenę poziomu DNA hCMV, przez co umożliwiają wczesną detekcję infekcji hCMV po HSCT. Mogą się jednak okazać zbyt czułe w zastosowaniu klinicznym. Detekcja DNA hCMV bowiem niekoniecznie jest związana z aktywną replikacją wirusa i zwiększonym ryzykiem rozwoju choroby hCMV. Wysoka czułość technik opartych na amplifikacji DNA umożliwia detekcję latentnej postaci wirusa, co nie wymaga zastosowania toksycznego leczenia przeciwwirusowego [15,26,28,31]. Technika R-T PCR pozwala na ocenę amplifikacji produktu w czasie trwania reakcji, przez co nie tylko umożliwia szybką detekcję DNA hCMV, ale również jego dokładną ocenę ilościową. Ilościowa ocena przyrostu produktu amplifikacji w czasie jest możliwa dzięki detekcji proporcjonalnego przyrostu fluorescencji. Źródłem fluorescencji w metodzie R-T

PCR mogą być barwniki interkalujące dsDNA, wyznaczone oligonukleotydowe sondy lub startery. Do najczęściej stosowanych należą: barwnik SYBR Green oraz sondy molekularne typu TaqMan, Hybridization Probes, Molecular Beacons oraz Scorpion. Strategie opierające się na zastosowaniu sond molekularnych komplementarnych do powielanego fragmentu DNA wykorzystują zjawisko transferu energii między dwoma fluorochromami lub fluorochromem i związkiem wygaszającym fluorescencję (quencher), które znajdują się na końcach 5' i 3' sondy (fluorescence resonance energy transfer, FRET). W niektórych systemach fluorescencja pojawia się w wyniku zbliżenia fluorochromów i transferu energii wywołującego emisję światła (Hybridization Probes), w innych, gdy dochodzi do fizycznej separacji barwnika reporterowego i wygaszacza (TaqMan, Molecular Beacons, Scorpion). Również w zależności od wybranej techniki fluorescencja pojawia się na etapie hybrydyzacji sondy (Hybridization Probes, Molecular Beacons, Scorpions) lub syntezy DNA (SYBR Green, TaqMan). Odpowiednia aparatura i oprogramowanie komputerowe umożliwiają określenie punktu Ct (threshold cycle) określanego również, jako Cp (crossing point). Punkt ten wyznacza liczbę cykli, po których wykryta fluorescencja przekracza wartość progową, co odpowiada wejściu reakcji PCR w fazę wykładniczego przyrostu produktu. Poziom DNA wirusa badanej próbki jest odczytywany poprzez porównanie uzyskanej wartości Ct z krzywą standardową, sporządzoną z użyciem gotowych stężeń DNA wirusa. Przewaga R-T PCR nad klasyczną reakcją amplifikacji wynika przede wszystkim z możliwości oceny ilościowej wyjściowego stężenia matrycy, ponadto z jej znacznie większej czułości, skróconego czasu reakcji, pozwalającego na szybsze otrzymanie wyniku oraz działania na zasadzie tzw. „systemu zamkniętego”. Jednocześnie przebiegająca amplifikacja i detekcja DNA zmniejsza ryzyko kontaminacji oraz wizualizację i analizę produktu jeszcze w czasie trwania reakcji. W porównaniu z innymi metodami detekcji R-T PCR wyróżnia pełna automatyzacja oraz możliwość jednoczesnego wykonania oznaczenia w wielu próbkach. Technika ta jest znacznie mniej pracochłonna niż np. oznaczanie antygenemii. Wady R-T PCR to stosunkowo wysoki koszt oznaczenia oraz potrzeba standaryzacji metody [2,10,15,28,31,36].

Jako materiał badany w metodach opartych na reakcji PCR można użyć prawie każdą tkankę lub płyn ustrojowy. W przypadku pacjentów w stanie immunosupresji najczęściej bada się krew lub jej frakcje, moczu oraz płyn mózgowo-rdzeniowy. Badanie z wykorzystaniem leukocytów jest kontrowersyjne, gdy ich poziom jest niski, szczególnie wcześniej po HSCT. Ocena poziomu DNA w BAL nie jest zalecana, ze względu na brak wystarczających danych dotyczących korelacji wyników takich pomiarów z przebiegiem klinicznym cytomegalowirusowego zapalenia płuc. Oznaczenie z użyciem osocza może natomiast uniemożliwić detekcję niskiego poziomu DNA, np. w trakcie wyprzedzającej terapii przeciwwirusowej [2,10,16,18,20].

Hybrydyzacja *in situ* jest metodą umożliwiającą detekcję DNA wirusowego w utrwalonych preparatach tkanekowych. Polega na zastosowaniu wyznakowanej sondy komplementarnej do fragmentu poszukiwanego DNA. Jest to jednak metoda stosunkowo czasochłonna, kosztowna i niewystarczająco czuła w detekcji kwasów nukleinowych hCMV, by stosować ją w rutynowym oznaczaniu [2].

Metody bDNA oraz HC są ilościowymi metodami opartymi na amplifikacji sygnału detekcji swoistego DNA. Pierwsza z nich wykorzystuje multimetry bDNA dostarczające wiele miejsc wiązania wyznakowanych enzymem sond. Detekcja odbywa się w wyniku dodania substratu i pomiaru chemiluminescencji, której poziom jest proporcjonalny do ilości DNA w próbce. Detekcji hCMV DNA z użyciem tej metody dokonuje się głównie w leukocytach i płynie mózgowo-rdzeniowym. Mimo iż metoda wykazuje czułość zbliżoną do detekcji antygenemii pp65 nie znajduje szerokiego zastosowania. Z kolei metoda HC wykorzystuje przeciwciała skierowane przeciwko hybrydom utworzonym przez DNA hCMV obecnym w materiale badanym i sondy RNA. W wyniku dodania substratu możliwy jest pomiar chemiluminescencji proporcjonalnej do ilości wirusowego DNA w próbce. Materiałem badanym najczęściej jest krew obwodowa. Test jest szybki i prosty, jednak również niepopularny w zastosowaniu klinicznym [2].

METODY DETEKЦИИ RNA

Metody detekcji RNA są wykorzystywane do identyfikacji produktów transkrypcji wirusów, takich jak hCMV, których materiał genetyczny stanowi DNA. W przypadku pacjentów po HSCT najbardziej użyteczną techniką detekcji poziomu RNA hCMV wydaje się metoda amplifikacji kwasów nukleinowych oparta na sekwencji (nucleic acid sequence – based amplification, NASBA). Metoda ta polega na izotermicznej amplifikacji RNA, wykorzystującej trzy enzymy: polimerazę RNA faga T7 (Pol. RNA T7), RNazę H, odwrotną transkryptazę (reverse transcriptase, RT) oraz dwa specyficzne startery, z których jeden zawiera sekwencję promotorową dla Pol. RNA T7. Modyfikacje NASBA umożliwiają analizę produktu amplifikacji w czasie rzeczywistym. Opracowano również multipleksową technikę R-T NASBA, która umożliwia jednoczesną ilościową ocenę dwóch transkryptów genomu hCMV: wczesnego IE1 oraz późnego pp67. Metody oparte na NASBA uważa się za porównywalnie użyteczne co ilościowe oznaczenia PCR, są one jednak mniej popularne [11,12,18,20].

Mimo dominującej obecnie roli techniki PCR i jej odmian w diagnostyce infekcji hCMV u pacjentów po HSCT, metody, tj. izolacja hCMV w kulturach komórkowych, „shell vial”, badania immunohistochemiczne oraz hybrydyzacja *in situ* znajdują zastosowanie w rozpoznawaniu poszczególnych postaci choroby hCMV. Przydatne bywają również badania histopatologiczne umożliwiające obserwację charakterystycznych dla infekcji hCMV

efektów cytotatycznych (powiększenie zainfekowanej komórki przebiegające z obrzękiem cytoplazmy i jądra komórkowego, obecność ciałek inkluzyjnych) [8,20,35]. Uważa się, że ze względu na swoją bardzo wysoką czułość PCR, jako jedyna metoda potwierdzająca chorobę CMV toczącą się w danym narządzie/układzie, jest niewystarczająca i w tym zastosowaniu jej wykorzystanie nie jest rekomendowane (zbyt niska wartość predykcyjna dodatnia). Wyjątkowe sytuacje stanowią: choroba OUN rozpoznawana na podstawie objawów klinicznych oraz obecności hCMV w płynie mózgowo-rdzeniowym potwierdzonej badaniem PCR oraz cytomegalowirusowa choroba przebiegająca z zajęciem siatkówki, gdzie za wystarczające jest uznawane badanie oftalmologiczne. Szczególne trudności napotyka się podczas diagnozowania cytomegalowirusowego zapalenia przewodu pokarmowego ze względu na częste współwystępowanie infekcji hCMV z jelitową postacią GvHD. Rekomenduje się w tym przypadku stawianie diagnozy, gdy występują objawy kliniczne, zmiany w obrazie endoskopowym śluzówki, detekcję wirusa metodą kultur wirusowych w badaniu histopatologicznym, immunohistochemicznym lub z zastosowaniem hybrydyzacji *in situ*. Detekcja DNA wirusa metodą PCR w biopsji nie jest uznawana za wystarczającą [18,19,20].

MONITOROWANIE INFEKЦИИ hCMV po HSCT

Celem monitorowania markerów zakażenia hCMV po HSCT jest zapobieganie objawowej infekcji wirusowej i wystąpienia zarówno bezpośrednich, jak i pośrednich efektów z nią związanych. Ze względu na swoją skuteczność, objawiającą się redukcją zachorowalności i śmiertelności, molekularny monitoring infekcji hCMV stał się rutynowym postępowaniem po allo-HSCT. Zastosowanie bazującej na monitorowaniu infekcji hCMV profilaktyki wybiórczej umożliwia optymalizację leczenia przeciw-wirusowego w tej grupie pacjentów. Zalecane jest systematyczne monitorowanie infekcji hCMV u wszystkich biorców allo-HSCT (niezależnie od stosowanej strategii profilaktycznej) przez 100 dni od transplantacji lub dłużej (u biorców przeszczepów od dawców niespokrewnionych lub niezgodnych w zakresie antygenów HLA, gdy rozpoznano GvHD i/lub doszło do aktywnej infekcji hCMV). Oznaczenia antygenemii, poziomu DNA lub RNA we krwi obwodowej powinny być wykonywane co najmniej raz w tygodniu [1,16,17,18,19,20].

Systematyczne monitorowanie infekcji hCMV nie jest rutynowo stosowane u pacjentów po auto-HSCT, natomiast jest wskazane, gdy występują czynniki ryzyka i/lub charakterystyczne objawy.

Obecnie za zalecane w monitorowaniu infekcji hCMV uważa się techniki pozwalające na detekcję aktywnej replikacji wirusa zanim pojawią się jej objawy kliniczne, ponadto czas oczekiwania na wynik nie powinien przekraczać 24 godzin. Do takich metod zalicza się m.in. wykrywanie antygeny pp65 w leukocytach oraz detekcję DNA hCMV za pomocą reakcji



PCR lub jej modyfikacji. W ostatnich latach największą popularnością i uznaniem cieszy się technika R-T PCR. Spośród wszystkich zalet tej metody szczególnie ważna jest wiarygodność wyników uzyskanych od pacjentów w stanie neutropenii. Metoda pozwala ponadto na bardzo wczesne rozpoznanie aktywnej infekcji hCMV (pozytywny wynik R-T PCR przeważnie wyprzedza pozytywny wynik antygenemii o wiele dni). Największym problemem monitorowania infekcji hCMV po HSCT metodami molekularnymi jest brak jednoznacznych międzynarodowych standardów określających wartość progową, która wskazuje na konieczność włączenia leczenia wyprzedzającego [2,8,15,18,22].

PROFILAKTYKA I LECZENIE CHOROBY hCMV po HSCT

Stosowanie odpowiedniej profilaktyki umożliwia znaczną redukcję zachorowalności i śmiertelności w wyniku infekcji hCMV po HSCT [4,16,17,18,19,20]. Profilaktyka rozpoczyna się już na etapie doboru dawcy. Pierwszym krokiem jest określenie serostatusu dawcy i biorcy wobec wirusa. Jeżeli to możliwe seronegatywnym biorcom dobiera się seronegatywnych dawców. Optymalny dobór jest jednak utrudniony ze względu na częste nosicielstwo wirusa, ponadto gdy biorcą jest dziecko, a dawcą osoba dorosła znacznie trudniej uniknąć kombinacji R-/D+. W przypadku dawców niespokrewnionych lub niezgodnych w zakresie antygenów HLA rekomenduje się dobór R+/D+. Innym elementem profilaktyki jest stosowanie preparatów krwiopochodnych ubogoleukocytarnych lub pochodzących od dawców hCMV-negatywnych. Taka strategia jest szczególnie zalecana dla doboru R-/D-. Przy stosowaniu preparatów po deplecji leukocytów wymaga się, by ich liczba była niższa od 5×10^6 w przeliczeniu na przetaczaną jednostkę. Obecnie w profilaktyce nie rekomenduje się stosowania immunoglobulin [18].

Najistotniejszą rolę obecnie przypisuje się profilaktyce farmakologicznej, która może być prowadzona na dwa sposoby. W ciągu ostatnich lat najpopularniejszą strategią stała się profilaktyka wybiórcza (tzw. leczenie wyprzedzające, pre-emptive therapy) bazująca na bardzo czułych i wysoce swoistych metodach diagnostycznych pozwalających na szybką identyfikację pacjentów z grupy wysokiego ryzyka rozwoju choroby hCMV (ilościowy monitoring antygenemii, poziomu DNA lub RNA). Strategia ta jest uznawana za wysoce skuteczną, umożliwiającą wgląd w tempo replikacji wirusa, ułatwiającą podejmowanie decyzji co do włączenia/odstawienia/zmiany leczenia. Jedną z najważniejszych zalet tej strategii jest też ograniczenie liczby pacjentów kwalifikowanych do toksycznego leczenia przeciwwirusowego. Inna strategia, określana jako profilaktyka uniwersalna, polega na włączeniu odpowiedniej farmakoterapii w ciągu 10 dni od transplantacji. Znajduje zastosowanie przede wszystkim u pacjentów bardzo wysokiego ryzyka rozwoju choroby hCMV [2,7,17,20,31].

Zarówno w profilaktyce, jak i w leczeniu choroby hCMV są stosowane przede wszystkim trzy leki blokujące wirusową polimerazę DNA: gancyklowir, foskarnet i cidofovir. Głównym działaniem niepożądanym gancyklowiru jest mielotoksyczność. Natomiast foskarnet i cidofovir mają znaczące działanie nefrotoksyczne. Problemem przy stosowaniu leków przeciwwirusowych jest niska biodostępność, interakcje z innymi lekami oraz wpływ na opóźniony rozwój swoistej, skierowanej przeciwko hCMV, odpowiedzi immunologicznej, co predysponuje do rozwoju późnej infekcji hCMV [9,27,37,38]. Terapia przeciwwirusowa w profilaktyce wybiórczej powinna trwać 2 tygodnie, a jeżeli po tym czasie wirus jest dalej wykrywany w badaniach diagnostycznych, to dłużej. Jako lek pierwszego rzutu rekomenduje się gancyklowir lub foskarnet. Cidofovir powinien być rozważany jako lek drugiego rzutu przy uważnym monitorowaniu funkcji nerek. W przypadku rozwoju choroby hCMV stosuje się gancyklowir lub foskarnet jako lek pierwszego rzutu. Wysokie dawki immunoglobulin, mimo ich kontrowersyjnego znaczenia dla wyników terapii, włącza się jedynie wtedy, gdy występuje cytomegalowirusowe zapalenie płuc. Jako drugą linię terapii należy rozważać gancyklowir z foskarnetem w pełnych dawkach lub cidofovir [18].

OPORNOŚĆ KLINICZNYCH SZCZEPÓW hCMV NA LEKI PRZECIWWIRUSOWE — ZNACZENIE DIAGNOSTYKI

Istotnym problemem jest narastająca oporność szczepów klinicznych hCMV na stosowane leki przeciwwirusowe, która wynika z mutacji w genie *UL97* i/lub *UL54*. Gen *UL97* koduje kinazę, katalizującą pierwszą z trzech fosforylacji uaktywniających gancyklowir. Natomiast gen *UL54* koduje wirusową polimerazę DNA, stąd mutacje w tym genie mogą skutkować opornością na wszystkie wymienione leki. Ponieważ infekcje opornymi na leczenie szczepami hCMV wiążą się z cięższym przebiegiem klinicznym, częstymi nawrotami wysokich wartości poziomu DNA oraz zwiększając ryzyko niepowodzenia transplantacji, coraz większego znaczenia nabierają metody diagnostyczne umożliwiające detekcję mutacji w genach *UL97* i *UL54* oraz takie, które pozwalają ocenić wpływ konkretnych zmian w genotypie wirusa na jego fenotyp. Obecnie ponad 80% opornych na gancyklowir szczepów klinicznych niesie jedną z siedmiu dobrze poznanych mutacji w genie *UL97* (M460V/I, H520Q, C592G, A549V, L595S, C603W) [9,13,14]. Znane mutacje są wykrywane najczęściej za pomocą metod analizy sekwencji, takich jak badanie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (restriction fragment length polymorphism, RFLP) czy sekwencjonowanie z zastosowaniem dideoksynukleotydów. Ze względu na wysokie koszty pirosekwencjonowanie nie znajduje obecnie zastosowania w diagnostyce klinicznej. Sekwencjonowanie DNA wirusa umożliwia również wykrycie innych zmian w jego materiale genetycznym. Problemem jest rozstrzygnięcie czy są to nieistotne z klinicznego punktu widzenia polimorfizmy, czy też związane z lekoopornością mutacje.

Pomocne okazują się metody fenotypowania rekombinacyjnego. Metody te wykorzystują rekombinację homologiczną między szczepem klinicznym a szczepem referencyjnym hCMV. Rekombinowany wirus, niosący interesującą mutację może być następnie efektywnie namnożony oraz poddany testom wrażliwości z zastosowaniem kultur komórkowych. Zaawansowane metody fenotypowania rekombinacyjnego wykorzystują coraz częściej sztuczne chromosomy bakteryjne (BAC, bacterial artificial chromosome). Z zastosowaniem BACs wykryto niedawno nowe mutacje w genie *UL54* istotnie wpływające na lekooporność wirusa. Duże nadzieje wiąże się z zastosowaniem tych metod w przyszłości. Badania oporności hCMV wymagają dalszego rozwoju i standaryzacji [13,14].

PODSUMOWANIE

Wprowadzenie monitorowania infekcji hCMV z zastosowaniem metod opartych na reakcji amplifikacji materiału genetycznego wirusa znacznie zmniejsza problem jego chorobotwórczości u osób w stanie

immunosupresji, ale go nie eliminuje. Znaczenie użyteczności metod molekularnych opartych na swoistej amplifikacji DNA hCMV jest w tym przypadku nieocenne. Umożliwiają one bardzo wczesne rozpoznanie nasilonej replikacji hCMV, a tym samym podjęcie szybkiej interwencji terapeutycznej. Połączenie monitoringu molekularnego i leczenia wybiórczego znacznie zwiększa szanse pacjenta na uniknięcie jednych z najczęstszych komplikacji po zabiegu allo-HSCT, jakie stanowią aktywne infekcje wywołane przez ludzkiego cytomegalowirusa. Opracowanie międzynarodowych standardów z zakresu metod ilościowej oceny poziomu DNA hCMV pozwoliłoby na zoptymalizowanie takiej strategii. Biorąc pod uwagę liczbę prowadzonych badań skupiających się na biologii wirusa, badań klinicznych nad nowymi lekami przeciwwirusowymi, szczepionkami i innymi metodami immunoterapii oraz ciągle rosnące znaczenie metod biologii molekularnej w nowoczesnej diagnostyce klinicznej, w najbliższych latach należy oczekiwać kolejnych przełomów w profilaktyce i leczeniu infekcji hCMV u osób w stanie immunosupresji [1].

PIŚMIENICTWO

- [1] Abu-Khader A., Krause S.: Rapid monitoring of immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation – a comparison of different assays for the detection of cytomegalovirus-specific T cells. *Eur. J. Haematol.*, 2013; 91: 534-545
- [2] Boeckh M., Boivin G.: Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1998; 11: 533-554
- [3] Crough T., Khanna R.: Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2009; 22: 76-98
- [4] Dieamant D.C., Bonon S.H., Peres R.M., Costa C.R., Albuquerque D.M., Miranda E.C., Aranha F.J., Oliveira-Duarte G., Fernandes V.C., De Souza C.A., Costa S.C., Vigorito A.C.: Cytomegalovirus (CMV) genotype in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *BMC Infect. Dis.*, 2013, 13: 210
- [5] Dobrzańska J., Sawczuk-Chabin J., Warzocha K.: Rola wirusów w etiopatogenezie chłoniaków niezłośliwych. *Onkol. Prakt. Klin.*, 2006; 2: 64-72
- [6] Dolan A., Cunningham C., Hector R.D., Hassan-Walker A.F., Lee L., Addison C., Dargan D.J., McGeoch D.J., Gatherer D., Emery V.C., Griffiths P.D., Sinzger C., McSharry B.P., Wilkinson G.W., Davison A.J.: Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.*, 2004; 85, 1301-1312
- [7] Durlik M., Dęborska-Materkowska D., Grenda R., Kaliciński P., Klinger M., Ołdakowska-Jedynak U., Rowiński W., Rutkowski B., Zembala M.: Zalecenia Polskiego Towarzystwa Transplantacyjnego, Krajowego Konsultanta w dziedzinie Transplantologii Klinicznej dotyczące postępowania profilaktycznego i leczniczego w zakażeniu wirusem cytomegalii u biorców przeszczepów narządowych. Warszawa 2010. <http://www.p-t-t.org/recommendations/form/idr/8> (14.05.2014)
- [8] Durlik M., Grenda R., Jędrzejczak W.W., Kaliciński P., Klinger M., Ołdakowska – Jedynak U., Podlasin B., Rutkowski B., Waszczuk – Gajda A., Zembala M.: Zalecenia Polskiego Towarzystwa Transplantacyjnego, Krajowych Konsultantów w dziedzinie: Transplantologii Klinicznej, Chorób Zakaźnych, Hematologii i Nefrologii dotyczące postępowania profilaktycznego i leczniczego w zakażeniu wirusem cytomegalii. *Nefrol. Dializoter. Pol.*, 2007; 11: 89-99
- [9] Erice A.: Resistance of human cytomegalovirus to antiviral drugs. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1999; 12: 286-297
- [10] Espy M.J., Uhl J.R., Sloan L.M., Buckwalter S.P., Jones M.F., Vetter E.A., Yao J.D., Wengenack N.L., Rosenblatt J.E., Cockerill F.R. 3rd, Smith T.F.: Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2006; 19: 165-256
- [11] Gerna G., Baldanti F., Lilleri D., Parea M., Alessandrino E., Pagani A., Locatelli F., Middeldorp J., Revello M.G.: Human cytomegalovirus immediate-early mRNA detection by nucleic acid sequence-based amplification as a new parameter for preemptive therapy in bone marrow transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.*, 2000; 38: 1845-1853
- [12] Grejser A.E., Adriaanse H.M., Dekkers C.A., Middeldorp J.M.: Multiplex real-time NASBA for monitoring expression dynamics of human cytomegalovirus encoded IE1 and pp67 RNA. *J. Clin. Virol.*, 2002; 24: 57-66
- [13] Hakki M., Chou S.: The biology of cytomegalovirus drug resistance. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 2011; 24: 605-611
- [14] James S.H., Prichard M.N.: The genetic basis of human cytomegalovirus resistance and current trends in antiviral resistance analysis. *Infect. Disord. Drug Targets*, 2011; 11: 504-513
- [15] Kaniuka S., Piekarska A., Grabarczyk P., Prejzner W., Bieniaszewska M., Kisielewska J., Brojer E., Zaucha J.M.: Określenie progowej liczby kopii wirusa CMV w reakcji PCR w czasie rzeczywistym wskazującej na aktywną replikację wirusową u chorych po allogenicznej transplantacji komórek krwiotwórczych. *Acta Haematol. Pol.*, 2009; 40: 659-671
- [16] Lin R., Liu Q.: Diagnosis and treatment of viral diseases in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J. Hematol. Oncol.*, 2013; 6: 94
- [17] Ljungman P.: CMV infections after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, 2008; 42 (Suppl. 1): S70-S72



- [18] Ljungman P, de la Camara R, Cordonnier C, Einsele H, Engelhard D, Reusser P, Styczynski J, Ward K., European Conference on Infections in Leukemia: Management of CMV, HHV-6, HHV-7 and Kaposi-sarcoma herpesvirus (HHV-8) infections in patients with hematological malignancies and after SCT. *Bone Marrow Transplant.*, 2008; 42: 227-240
- [19] Ljungman P, Griffiths P, Paya C.: Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin. Infect. Dis.*, 2002; 34: 1094-1097
- [20] Ljungman P, Hakki M., Boeckh M.: Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, 2011; 25: 151-169
- [21] Loeffler J., Steffens M., Arlt E.M., Toliat M.R., Mezger M., Suk A., Wienker T.F., Hebart H., Nürnberg P., Boeckh M., Ljungman P., Trensche R., Einsele H.: Polymorphisms in the genes encoding chemokine receptor 5, interleukin-10, and monocyte chemoattractant protein 1 contribute to cytomegalovirus reactivation and disease after allogeneic stem cell transplantation. *J. Clin. Microbiol.*, 2006; 44: 1847-1850
- [22] Markiewicz M., Kyrzc-Krzemień S.: Allogeniczne przeszczepienie komórek krwiotwórczych: stan obecny i perspektywy rozwoju. *Post. N. Med.*, 2011; 24: 479-485
- [23] Michelson S., Rohrlich P., Beisser P., Laurent L., Perret E., Prévost M.C., Monchatre E., Duval M., Marolleau J.P., Charbord P.: Human cytomegalovirus infection of bone marrow myofibroblasts enhances myeloid progenitor adhesion and elicits viral transmission. *Microbes Infect.*, 2001; 3: 1005-1013
- [24] Murphy E., Yu D., Grimwood J., Schmutz J., Dickson M., Jarvis M.A., Hahn G., Nelson J.A., Myers R.M., Shenk T.E.: Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 14976-14981
- [25] Nogalski M.T., Podduturi J.P., DeMeritti I.B., Milford L.E., Yurochko A.D.: The human cytomegalovirus virion possesses an activated casein kinase II that allows for the rapid phosphorylation of the inhibitor of NF- κ B, I κ B α . *J. Virol.*, 2007; 81: 5305-5314
- [26] Onishi Y., Mori S., Higuchi A., Kim S.W., Fukuda T., Heike Y., Tanosaki R., Minematsu T., Takaue Y., Sasaki T., Furuta K.: Early detection of plasma cytomegalovirus DNA by real-time PCR after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Tohoku J. Exp. Med.*, 2006; 210: 125-135
- [27] Osińska E., Tomaszewska A., Dzieciatkowski T.: Zakażenia beta-herpeswirusami u osób z niedoborami odporności. *Post. Mikrobiol.*, 2009; 48: 267-276
- [28] Peres R.M., Costa C.R., Andrade P.D., Bonon S.H., Albuquerque D.M., de Oliveira C., Vigorito A.C., Aranha F.J., de Souza C.A., Costa S.C.: Surveillance of active human cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell transplantation (HLA sibling identical donor): search for optima cutoff value by real-time PCR. *BMC Infect. Dis.*, 2010; 10: 147
- [29] Poole E., King C.A., Sinclair J.H., Alcami A.: The UL144 gene product of human cytomegalovirus activates NF κ B via a TRAF6-dependent mechanism. *EMBO J.*, 2006; 25: 4390-4399
- [30] Razonable R.: Direct and indirect effects of cytomegalovirus: can we prevent them? *Inferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 2010; 28: 1-5
- [31] Sahin D.G., Gunduz E., Kasifoglu N., Akay O.M., Us T., Gulbas Z.: Cytomegalovirus DNAemia detected with real-time polymerase chain reaction in hematopoietic stem cell transplant patients. *Adv. Ther.*, 2013; 30: 784-791
- [32] Schmidt-Hieber M., Schwender J., Heinz W.J., Zabelina T., Kühl J.S., Mousset S., Schüttrumpf S., Junghans C., Silling G., Basara N., Neuburger S., Thiel E., Blau I.W.: Viral encephalitis after allogeneic stem cell transplantation: a rare complication with distinct characteristics of different causative agents. *Haematologica*, 2011; 96: 142-149
- [33] Siennicka J., Litwińska B., Kańtoch M.: Metoda „shell vial” w diagnostyce zakażeń wywołanych wirusem cytomegalii. *Med. Dośw. Mikrobiol.*, 1998; 50: 293-299
- [34] Simmons P., Kaushansky K., Torok-Storb B.: Mechanisms of cytomegalovirus-mediated myelosuppression: perturbation of stromal cell function versus direct infection of myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990; 87: 1386-1390
- [35] Simon K., Dziemińko I.: Obraz kliniczny zakażeń Herpesviridae w stanach obniżonej odporności – u chorych po przeszczepach szpiku kostnego i narządów mięszkowych. *Przeł. Epidemiol.*, 2003; 57: 289-297
- [36] Smith T.F., Espy M.J., Mandrekar J., Jones M.F., Cockerill F.R., Patel R.: Quantitative real-time polymerase chain reaction for evaluating DNAemia due to cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, and BK virus in solid-organ transplant recipients. *Clin. Infect. Dis.*, 2007; 45: 1056-1061
- [37] Sobczak-Pluta A., Wrześień-Kuś A., Wierzbowska A., Lech-Marañda E., Robak T.: Zapobieganie reaktywacji i leczenie zakażenia wirusem cytomegalii (CMV) u chorych po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych. *Acta Haematol. Pol.*, 2003; 34: 169-180
- [38] Steininger C.: Novel therapies for cytomegalovirus disease. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.*, 2007; 2: 53-72
- [39] Taichman R.S., Nassiri M.R., Reilly M.J., Ptak R.G., Emerson S.G., Drach J.C.: Infection and replication of human cytomegalovirus in bone marrow stromal cells: effects on the production of IL-6, MIP-1 α , and TGF- β 1. *Bone Marrow Transplant.*, 1997; 19: 471-480
- [40] Varani S., Landini M.P.: Cytomegalovirus-induced immunopathology and its clinical consequences. *Herpesviridae*, 2011; 2: 6
- [41] Zallio F., Primon V., Tamiazzo S., Pini M., Baraldi A., Corsetti M.T., Gotta F., Bertassello C., Salvi F., Rocchetti A., Levis A.: Epstein-Barr virus reactivation in allogeneic stem cell transplantation is highly related to cytomegalovirus reactivation. *Clin. Transplant.*, 2013; 27: E491-E497

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.