

*Barbara Zawilińska<sup>1</sup>, Beata Piątkowska-Jakubas<sup>2</sup>, Jolanta Kopeć<sup>1</sup>,  
Ewa Daszkiewicz<sup>1</sup>, Ewa Kleszcz<sup>1</sup>, Sława Szostek<sup>1</sup>, Patrycja Mensah-Glanowska<sup>2</sup>,  
Dorota Hawrylecka<sup>2</sup>, Aleksander Skotnicki<sup>2</sup>*

## ZAKAŻENIA WIRUSEM EPSTEINA-BARR (EBV) U PACJENTÓW LECZONYCH ALLOGENICZNYM PRZESZCZEPIENIEM KOMÓREK HEMOPOETYCZNYCH (ALLO-HCT)

<sup>1</sup>Zakład Wirusologii Katedry Mikrobiologii CM UJ w Krakowie  
kierownik Katedry: Piotr Heczko

<sup>2</sup>Katedra i Klinika Hematologii CM UJ w Krakowie  
kierownik Katedry: Aleksander Skotnicki

*Supresja odpowiedzi komórkowej u chorych leczonych allo-HCT sprzyja reaktywacji EBV. Obraz kliniczny aktywnego zakażenia EBV przypomina zakażenie wywołane cytomegalowirusem, a rozwijająca się po-transplantacyjna choroba limfoproliferacyjna (PTLD) może stanowić bezpośrednie zagrożenie życia. Wczesne rozpoznanie objawowego zakażenia EBV jest podstawą do rozpoczęcia terapii przeciwwirusowej i redukcji poziomu immunosupresji.*

*Słowa kluczowe: wirus Epsteina Barr, immunosupresja, przeszczep szpiku kostnego*  
*Key words: Epstein Barr virus, immunosuppression, bone marrow transplantation*

### WSTĘP

Zakażenie EBV u pacjentów w stanie immunosupresji może stanowić zagrożenie życia. Odpowiedź humoralna i komórkowa u osób immunokompetentnych warunkuje bowiem utrzymanie stanu równowagi, ogranicza replikację wirusa i proliferację zakażonych limfocytów B. Supresja odpowiedzi komórkowej sprzyja reaktywacji endogennego wirusa. Jej następstwem jest pełny cykl replikacyjny EBV z lizą komórki zakażonej, obecność wirusa we krwi i okresowe lub stałe jego wydzielanie, a także wzrost miana przeciwciał anty-EBNA i pojawienie się przeciwciał anty-EA.

Dodatkowymi czynnikami ryzyka rozwoju aktywnego zakażenia EBV u pacjentów po przeszczepieniu komórek hemopoetycznych są: zastosowanie napromieniania całego ciała (TBI – *total body irradiation*) w kondycjonowaniu, T – deplecja materiału przeszczepowego, użycie globuliny antylimfocytarnej (ATG) lub przeciwciał monoklonalnych anty-CD3, niepełna zgodność w układzie HLA pomiędzy dawcą i biorcą (1).

Obraz kliniczny zakażenia EBV u chorych leczonych immunosupresyjnie przypomina objawy zakażenia wywołanego cytomegalowirusem i jego rozpoznanie jest możliwe tylko na podstawie badań wirusologicznych lub oceny histopatologicznej biopsji narządów zakażonych. Do objawów tych należą: gorączka, leukopenia, zapalenie płuc, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu, w krwi obwodowej mogą pojawiać się atypowe limfocyty, profil enzymów wątrobowych odpowiadać może wirusowemu zapaleniu wątroby. Zakażenie to może prowadzić także do rozwoju procesów rozrostowych, głównie w postaci chłoniaków B-komórkowych (potransplantacyjnej choroby limfoproliferacyjnej – ang. PTLD), o wysokiej, bo sięgającej 50-80% śmiertelności (2).

Wczesne rozpoznanie aktywnego zakażenia EBV może być podstawą do rozpoczęcia terapii przeciwwirusowej, ewentualnej redukcji poziomu immunosupresji, jak również zastosowania przeciwciał monoklonalnych anti-CD20 i/lub CD24 (3). Trwają także badania nad działaniem leczniczym cytokin – IFN-alfa i IL-6.

Celem badań była ocena częstości i przebiegu klinicznego aktywnego zakażenia EBV u pacjentów po nie manipulowanym allo-HCT od zgodnego dawcy rodzinnego.

#### MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono w grupie 56 chorych (28 kobiet i 28 mężczyzn), średnia wieku  $33,9 \pm 11$  lat, leczonych allo-HCT z powodu nowotworów układu krwiotwórczego (54 osoby) lub ciężkiej anemii aplastycznej (2 chorych). U 48 pacjentów zastosowano standardową mieloablację (busulfan + cyklofosfamid), u 6 kondycjonowanie zredukowane (RIC – ang. *reduced-intensity conditioning*), a u chorych z anemią aplastyczną – cyklofosfamid lub cyklofosfamid + ATG. W profilaktyce choroby przeszczep przeciw biorcy (GvHD) stosowano cyklosporynę A (CSP) i metotreksat lub CSP i mykofenolan mofetilu. Określono status serologiczny wobec EBV w układzie dawca-biorca. W okresie potransplantacyjnym oznaczano przeciwciała anti-EA, VCA i EBNA metodą immunoenzymatyczną (DiaSorin) oraz wirusowe DNA metodą nested PCR (nPCR). Pacjenci byli badani wielokrotnie, zwykle 1-2 razy/mies. przez okres od 1-36 miesięcy od przeszczepu (średnio  $6 \pm 5$  miesięcy).

Materiałem do badań molekularnych była zawiesina leukocytów ( $1 \times 10^6$ ) uzyskiwanych z krwi obwodowej po rozdziale 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), wykorzystującego zdolność wiązania DNA do złóż krzemionkowych w wysokich stężeniach soli chaotropowych. Stopień oczyszczenia i stężenie DNA oznaczano spektrofotometrycznie przy  $\lambda = 260$  i  $280$  nm.

Do wykrywania DNA EBV posłużono się metodą nPCR opisaną przez *Venarda* i wsp. (5). Używano starterów zewnętrznych swoistych dla genu kodującego białko EBNA2 i starterów wewnętrznych charakterystycznych dla EBV1 i EBV2, dających produkty reakcji odpowiednio o długości 497 i 150 bp. Amplifikację prowadzono w aparacie firmy Biometra, w objętości 50  $\mu$ l zawierającej 20  $\mu$ l próbki badanej oraz 10 mM TRIS-HCl pH 8,3; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 2U Taq polimerazy (Finnzyme); 200  $\mu$ M dNTP i 0,5  $\mu$ M starterów. Stosowano 30 cykli w następujących warunkach termicznych: 94°C przez 3 min., 94°C – 1,5 min., 60°C przez 1 min., 72°C – 2 min. Końcowe wydłużanie w 72°C prowadzono przez 10 min.

Do każdego badania dołączano kontrole: dodatnią (hodowla Namalwa – Human Burkitt Lymphoma – zawierająca w 1 komórce inkorporowane 2 cząsteczki EBV) i ujemną (woda oraz leukocyty izolowane od osoby seronegatywnej). Produkty reakcji poddawano elektroforezie w 2% żelu agarozowym i identyfikowano w świetle UV, po wybarwieniu bromkiem etydyny.

Czułość reakcji PCR określono poprzez amplifikację DNA izolowanego z  $1 \times 10^6$  komórek Namalwa, stosując 10-krotne jego rozcieńczenia aż do negatywizacji wyniku. Kontrola ta posłużyła do wykreślenia krzywej wzorcowej i ilościowej oceny DNA-emii.

Aktywne zakażenie EBV rozpoznawano na podstawie obecności przeciwciał anti-EA i/lub wirusowego DNA w leukocytach krwi obwodowej. W przypadkach pozytywnej DNA-emii jej poziom oceniano ilościowo, stosując rozcieńczenia analogiczne jak w przypadku komórek Namalwa.

W ocenie stanu klinicznego pacjentów uwzględniano badanie fizykalne, wyniki badań laboratoryjnych (w tym aminotransferazy wątrobowe, bilirubina), badania serologiczne i wirusologiczne w kierunku zakażeń cytomegalowirusem (CMV) i wirusami zapalenia wątroby typu B i C.

## WYNIKI

Aktywne zakażenie EBV typu 1 stwierdzono u 27 (48%) biorców komórek hemopoetycznych, przy czym u większości (16 osób) podstawą rozpoznania było wykazanie jedynie EBV DNA we krwi obwodowej (Tab. 1). U 11 osób wykazano obecność przeciwciał anti-EA, u żadnej nie obserwowano znamiennego przyrostu przeciwciał anti-EBNA. U 5 spośród 7 seronegatywnych osób nastąpiła serokonwersja przeciwciał anti-VCA, której towarzyszyła DNA-emia (3 pacjentów) potwierdzająca zakażenie pierwotne.

Wartości DNA-emii u większości pacjentów wynosiły ok. 200 kopii/1 mln komórek, sporadycznie osiągały wartości od 2-200 tys. kopii/1 mln (u 10 pacjentów), a u jednego z chorych, u którego w wyniku zakażenia pierwotnego rozwinął się chłoniak B-komórko-

Tabela I. Występowanie zakażeń EBV w zależności od statusu serologicznego dawca/biorca

Table I. Incidence of EBV infections and sero-status of donor-recipient

Dawca- biorca	Liczba pacjentów	p-ciała anti-EA	DNA EBV (+)	Liczba zakażonych EBV*	Liczba z objawami
+ / +	39	8	16	19	7
- / +	10	1	3	3	1
+ / -	5	2	2	4	2
- / -	2	-	1	1	-
Ogółem	56	11	22	27	10

\* – potwierdzona obecnością wirusowego DNA izolowanego z leukocytów krwi obwodowej i/lub obecnością przeciwciał anti-EA

wy, potwierdzony w badaniu histopatologicznym, poziom DNA szacowano na 2 mln. Tylko u 9 pacjentów DNA EBV wykazywano w okresie do + 100 doby po przeszczepieniu, przy czym u 3 z nich było ono rezultatem zakażenia pierwotnego. Zazwyczaj DNA wykrywano w pierwszym roku po transplantacji (śr. + 138 ± 92 dni), chociaż obserwowano go także w okresie późnym, nawet po 3 latach.

Aktywne zakażenie EBV przebiegało u większości osób bez widocznych objawów klinicznych; u 7 osób towarzyszyło mu mierne podwyższenie poziomu aminotransferaz wątrobowych, u 2 wystąpiła biegunka, a u 4 nastąpiło zaostrzenie reakcji przeszczep przeciw biorcy (*graft versus host disease* – GvHD). Jedna osoba zmarła z powodu monoklonalnego procesu limfoproliferacyjnego, który doprowadził w 65 dobie po HCT do niewydolności wielonarządowej (opis przypadku zawiera praca *Rudzkiego* i wsp. (6)). Warto także odnotować, że u 16 pacjentów z zakażeniem EBV (tj. 59%) wykrywano równocześnie aktywną infekcję CMV.

## DYSKUSJA

U osób immunokompetentnych liczebna przewaga limfocytów T cytotoksycznych rozpoznających EBV w stosunku do zakażonych latentnie limfocytów B zapewnia utrzymanie stanu równowagi i uniemożliwia nieograniczoną proliferację komórek B zakażonych wirusem (1,7). Postępowanie związane z transplantacją zaburza ten stan równowagi, co przejawia się reaktywacją i namnażaniem EBV, a w konsekwencji rozwojem choroby z procesami rozrostowymi włącznie. Częstość PTLD jest różna w zależności od rodzaju przeszczepu i prowadzonej terapii immunosupresyjnej. Ponad 50% PTLD jest wynikiem zakażenia pierwotnego, stąd też częściej stwierdza się ją u pacjentów pediatrycznych (8). U biorców nerek PTLD występuje z częstością 1-2%, natomiast po przeszczepach płuco-serca odsetek ten wzrasta nawet do 5-10% (9). U biorców allogenicznych komórek hemopoetycznych powikłanie to występuje bardzo rzadko (<1%), ale w przypadku przeszczepień od dawców niespokrewnionych i nie w pełni zgodnych, po T-deplecji materiału przeszczepowego ryzyko rozwoju PTLD oceniane jest nawet na 24% (10,11). W obserwowanej grupie chorych chłoniak B-komórkowy był przyczyną zgonu jednego pacjenta (co stanowi 1,8%), a jego rozwój był spowodowany zakażeniem pierwotnym i zastosowanym do kondycjonowania cyklofosfamidem w połączeniu z wysokimi dawkami ATG.

Określenie poziomu DNA-emii (EBV-load) u biorców allo-przeszczepów może być dobrym wykładnikiem określającym ryzyko rozwoju PTLD (2,12,13,14). Ustalenie wartości predykccyjnej dla PTLD jest dość trudne, ze względu na brak standaryzacji metod określających wirusowe DNA. Stosowane są różne techniki umożliwiające ilościową ocenę DNA-emii (np. kompetycyjny PCR, reakcja PCR w czasie rzeczywistym), jak również różny materiał biologiczny (leukocyty, krew pełna, surowica) do izolacji DNA (15). W badaniach własnych zastosowano metodę półilościową opisaną przez *Venarda* i wsp. (5), która w przybliżony sposób umożliwia ocenę DNA-emii w leukocytach izolowanych z krwi obwodowej. U większości badanych poziom EBV oceniano na 200 kopii/1 mln leukocytów, chociaż w pojedynczych przypadkach – u dwóch pacjentów, wynosił on powyżej 200 tys./1 mln komórek. Za wyjątkiem jednego chorego, z grupy ryzyka rozwoju PTLD, wartości te były przemijające i aktywne zakażenie EBV nie stanowiło u tych osób bezpośredniego zagrożenia życia. Dlatego wydaje się, że u chorych, którzy nie są narażeni

na tego rodzaju powikłanie, stałe monitorowanie poziomu DNA EBV we krwi obwodowej nie znajduje klinicznego uzasadnienia.

### WNIOSKI

1. Dominującym typem EBV w polskiej populacji jest typ 1.
2. Rozpoznanie aktywnego zakażenia u pacjentów leczonych przeszczepieniem komórek hemopoetycznych jest możliwe na podstawie ilościowej oceny wirusowego DNA w leukocytach krwi obwodowej. Badania serologiczne, w których ocenia się przeciwciała dla poszczególnych antygenów wirusowych mają mniejsze znaczenie diagnostyczne w różnicowaniu aktywnej formy zakażenia EBV.
3. Ze względu na powszechne zjawisko reaktywacji wirusa w okresie potransplantacyjnym i zazwyczaj bezobjawowy charakter zakażenia, wydaje się, że w przypadku przeszczepień nieobciążonych dodatkowymi czynnikami ryzyka rozwoju choroby EBV i PTLD, ciągle monitorowanie EBV nie ma wystarczającego uzasadnienia klinicznego.
4. Często obserwowane równoczesne zakażenie EBV i CMV u biorców allo-przeszczepów może wskazywać na protekcyjne oddziaływanie tych wirusów.

*B Zawilińska, B Piątkowska-Jakubas, J Kopeć, E Daszkiewicz, E Kleszcz, S Szostek,  
P Mensah-Glanowska, D Hawrylecka, A Skotnicki*

### EPSTEIN-BARR VIRUS (EBV) INFECTIONS IN PATIENTS TREATED WITH ALLOGENIC HEMATOPOIETIC CELLS TRANSPLANTATION (ALLO-HCT)

#### SUMMARY

Objective: assessment of frequency and clinical course of EBV infection in patients that underwent non-manipulated allo-HCT from matched-related donors.

Methods: active EBV infection was confirmed based on the presence of anti-EA antibodies (ELISA) and/or viral DNA (nPCR) isolated from peripheral leukocytes. For positive DNA-isolations semi-quantitative analysis were done. Patients were examined repeatedly, the time of monitoring was approximately  $6 \pm 5$  months.

Results: active EBV infection was confirmed in 27 among 56 examined allo-HCT recipients. Primary infection was detected in 5 patients, in the remaining patients it was probably the result of virus reactivation. In most cases EBV-load was approximately 200 copies per 1 million of leukocytes, 1 patient with lymphoproliferative disorder (PTLD) had 2 million copies. EBV infection was asymptomatic in most cases (17), in 7 cases aminotransferase levels were insignificantly increased, in 2 – diarrhea was observed and in 4 patients GvHD was intensified.

Conclusions: in recipients without risk of PTLD, permanent monitoring of the EBV-load has no clinical justification.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Gross T, Loechelt B. Epstein-Barr virus associated disease following blood or marrow transplant. *Pediatr Transplantation* 2003;7 (s.3):44-50.
2. Stevens S, Verschuuren E, Pronk I, i in. Frequent monitoring of Epstein-Barr virus DNA load in unfractionated whole blood is essential for early detection of posttransplant lymphoproliferative disease in high-risk patients. *Blood* 2001;97:1165-1171.

3. Ghobrial I, Habermann T, Ristow K, i in. Prognostic factors in patients with post-transplant lymphoproliferative disorders (PTLD) in the rituximab era. *Leuk Lymphoma* 2005;46:191-196.
4. The T, van der Berg A, Harmsen M, i in. The cytomegalovirus antigenemia assay: a plea for standarization. *Scand J Infect Dis* 1995;99:25-29.
5. 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.
6. Rudzki Z, Werda L, Piątkowska-Jakubas B, i in. Fatal post-transplant lymphoproliferative disorder following allogeneic bone marrow transplantation for aplastic anemia. *Pol J Pathol.* 2002; 53:35-40.
7. Smets T, Latinne D, Bazin H, i in. Ratio between Epstein-Barr viral load and anti- Epstein-Barr virus specific T-cell response as a predictive marker of posttransplant lymphoproliferative disease. *Transplantation* 2002;73:1603-1610.
8. Johannessen I. Epstein-Barr virus, post-transplant lymphoproliferative disease and animal models. *Rev Medical Microbiol* 2002;13:129-140.
9. Barrett JC. Post-transplantation lymphoproliferative disease. *Herpes* 2000;7:4-8.
10. Loren A, Porter D, Stadtmauer E, i in. Post-transplant lymphoproliferative disorder: a review. *Bone Marrow Transplant* 2003;31:145-155.
11. Hale G, Waldmann H. Risks of developing Epstein-Barr virus – related lymphoproliferative disorders after T-cell-depleted marrow transplants. *Blood* 1998;91:3079-3083.
12. von Esser J, van der Holt B, Meijer E, i in. Epstein-Barr virus (EBV) reactivation is a frequent event after allogeneic stem cell transplantation (SCT) and quantitatively predicts EBV-lymphoproliferative disease following T-cell-depleted SCT. *Blood* 2001;98:972-978.
13. Gärtner B, Schäfer H, Marggraf K, i in. Evaluation of use of Epstein-Barr viral load in patients after allogeneic stem cell transplantation to diagnose and monitor posttransplant lymphoproliferative disease. *J Clin Microbiol* 2002;40:351-358.
14. Aalto S, Juvonen E, Tarkkanen J, i in. Lymphoproliferative disease after allogeneic stem cell transplantation – pre-emptive diagnosis by quantification of Epstein-Barr virus DNA in serum. *J Clin Virol* 2003;28:275-283.
15. Campe H, Jaeger G, Abou-Ajram C, i in. Serial detection of Epstein-Barr virus DNA in sera and peripheral blood leukocyte samples of pediatric renal allograft recipients with persistent mononucleosis-like symptoms defines patients at risk to develop post-transplant lymphoproliferative disease. *Pediatr Transplantation* 2003;7:46-52.

Praca została częściowo sfinansowana przez grant MNiI nr 3 P04C 023 25.

Otrzymano: 14.11.2005 r.

**Adres autora:**

Barbara Zawilińska  
Zakład Wirusologii Katedry Mikrobiologii CM UJ w Krakowie  
ul. Czysła 18, 31-121 Kraków  
tel. (0-12) 634 54 00  
e-mail: [mbzawili@cm-uj.krakow.pl](mailto:mbzawili@cm-uj.krakow.pl)