

Tadeusz Wojciech Łapiński, *Oksana Kovalchuk, Anna Parfieniuk, Robert Flisiak

WYSTĘPOWANIE AKTYWNEGO ZAKAŻENIA CMV WŚRÓD CHORYCH NA PRZEWLEKŁE WIRUSOWE ZAPALENIE WĄTROBY TYPU C ORAZ JEGO WPŁYW NA PRZEBIEG CHOROBY I LECZENIE

PREVALENCE, CLINICAL AND THERAPEUTICAL IMPLICATIONS OF ACTIVE CMV INFECTION IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C

Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

*Zakład Biologii Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

STRESZCZENIE

Wirus cytomegalii (CMV) u osób z nieprawidłową odpowiedzią immunologiczną może powodować uszkodzenie wątroby. W przewlekłym zapaleniu wątroby typu C obserwuje się zaburzenia swoistej i nieswoistej odpowiedzi immunologicznej oraz procesów apoptozy.

Celem badań była ocena częstości występowania zakażenia CMV wśród przewlekłe zakażonych HCV, wpływ tego zakażenia na parametry morfologiczne krwi oraz wczesną odpowiedź na leczenie przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C (PWZW-C).

Materiał i Metody. Badaniem objęto 123 chorych przewlekłe zakażonych HCV. Zakażenie CMV rozpoznawano na podstawie obecności CMV DNA w surowicy, wykrywanego metodą rt-PCR z użyciem starterów swoistych wobec genu pp 65 wirusa.

Wyniki. Aktywną replikację CMV stwierdzono u 18/123 chorych (14,6%). U większości zakażonych (16/18) wiremia była niska. Nie obserwowano korelacji pomiędzy wiramią HCV i CMV. Aktywność ALT wśród zakażonych HCV oraz HCV/CMV była porównywalna. Nie stwierdzano różnic w stężeniach hemoglobiny, liczbie erytrocytów, leukocytów, neutrofilii i płytek krwi pomiędzy grupami chorych z monoinfekcją HCV i z współzakażeniem HCV/CMV. Nie stwierdzono różnic aktywności zapalnej oraz nasilenia włóknienia w tkance wątrobowej w zależności od aktywnej replikacji CMV. Dodatkowe zakażenie CMV nie wpływało na uzyskanie wczesnej odpowiedzi na leczenie PWZW-C.

Podsumowanie. Aktywną replikację CMV stwierdza się u ponad 14% osób przewlekłe zakażonych HCV. Współzakażenie CMV nie wpływa na parametry biochemiczne i stan morfologiczny wątroby chorych oraz na skuteczność terapii -C.

Słowa kluczowe: zakażenie CMV, współzakażenie CMV HCV

ABSTRACT

Infection with human cytomegalovirus (CMV) may lead to liver damage in immunocompromised individuals. Chronic hepatitis C is featured by impairment of innate and specific immunity as well apoptotic cell death.

The aim of the study was to assess the frequency of CMV infection in patients with chronic hepatitis C. The influence of CMV infection on parameters of full blood count and early virologic response to the treatment were evaluated.

Materials and methods. One hundred twenty three patients with chronic hepatitis C were enrolled in the study. Infection with CMV was diagnosed through the detection of CMV DNA in sera by means of RT-PCR method. The starters used in the study were specific for pp65 gene of CMV.

Results. Active CMV replication was observed in 18/123 individuals (14,6%). Majority of them (16/18) have low level of CMV viraemia. There were no apparent correlations between HCV and CMV viral loads. Hemoglobin concentration, erythrocytes, leucocytes and platelet count, absolute neutrophil count and activity of alanine transaminase was similar in HCV and HCV/CMV-infected patients. Active CMV infection did not influence inflammatory activity and fibrosis in liver tissue. The early virologic response to anti-HCV therapy was independent of CMV infection.

Conclusions. Active CMV infection affects over 14% of studied population of patients with chronic hepatitis C. Coinfection with CMV has not influence on the laboratory biochemical parameters and injury of liver tissue. Moreover, it does not affect the efficacy of anti-HCV treatment.

Key words: CMV infection, chronic HCV infection

WSTĘP

Ludzki wirus cytomegalii (CMV) należy do wirusów rodziny Herpesviridae, podrodziny Betaherpesvirinae, taksonomicznie określany jest, jako herpes 5. Wirus zbudowany jest z dwuniciowego DNA, białkowego kapsydu i osłonki lipoproteinowej. Replikacja wirusa odbywa się wyłącznie wewnątrzkomórkowo, etapowo, w jądrze oraz cytoplazmie komórki. Wirus wykazuje właściwości cytopatyczne, a zakażenie utrzymuje się do końca życia. Wśród osób z prawidłową odpornością immunologiczną zakażenie jest samo ograniczające się. U większości tych osób, infekcja jest bezobjawowa, ale u niektórych, występuje gorączka, astenia, bóle głowy, powiększenie śledziony i węzłów chłonnych, bóle mięśniowe, a u 19% zakażonych osób zapalenie wątroby (1, 2).

Zakażenie CMV u osób z niedoborami immunologicznymi jest przyczyną poważnych uszkodzeń wielonarządowych stanowiących zagrożenie życia. Uszkodzenie wątroby przez CMV prowadzi do stanu zapalnego oraz powstawania ziarninaków zależnych od bezpośrednich i pośrednich efektów cytopatycznej aktywności CMV, które są wynikiem udziału białek MHC klasy I w prezentowaniu na hepatocytach antygenów wirusowych. Limfocyty T o fenotypie CD8 są odpowiedzialne za aktywację procesów immunologicznych eliminujących komórki zakażone CMV. Niedostateczna sprawność tych limfocytów otwiera drogę aktywacji wirusa. Ponadto CMV wiąże się poza komórką z β 2-mikroglobuliną utrudniając rozpoznanie wirusa przez swoiste przeciwciała. Wykazano również, że CMV ma zdolność stymulacji limfocytów B do syntezy nieprawidłowych immunoglobulin, odpowiedzialnych za procesy autoimmunologiczne.

W przewlekłym zapaleniu wątroby typu C (pwzw-C) obserwuje się zaburzenia swoistej i nieswoistej odpowiedzi immunologicznej oraz procesów apoptozy. Wydaje się, że zakażenie CMV, angażując układ immunologiczny, a szczególnie komórkową odpowiedź, może wpływać na przebieg kliniczny oraz skuteczność terapii przeciwwirusowej zakażonych HCV. Ma to szczególne znaczenie wśród zakażonych HCV kwalifikowanych do transplantacji lub którym przeszczepiono wątrobę (3).

CEL BADAŃ

Oceniono częstość występowania aktywnej replikacji CMV wśród osób przewlekle zakażonych HCV oraz zależność tego zakażenia w odniesieniu do genotypu HCV, wiremii, zmian histopatologicznych w wątrobie. Określono wpływ aktywnego zakażenia CMV na parametry morfologiczne krwi, a ponadto wpływ współzakażenia CMV na wczesną odpowiedź terapii chorych z pwzw-C.

MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto 123 chorych przewlekle zakażonych HCV, 46 kobiet i 77 mężczyzn w wieku średnio 42 ± 13 lat. Zakażenie genotypem 1 rozpoznano u 98, genotypem 3 u 21, a u 4 badanych genotypem 4. W badanej grupie 75 osób było leczonych przeciwwirusowo interferonem pegylowanym alfa (PegIFN α) -2a lub -2b w dawkach tygodniowych odpowiednio: 180 mg i 1,5 mg/kg, stosowanych w skojarzeniu z rybawiryną w dawkach zależnych od masy ciała 1000-1200mg. Terapię prowadzono u chorych zakażonych genotypem 1 przez 48 tygodni, a u zakażonych genotypem 3 przez 24 tygodnie. Pozostałych 48 chorych oczekiwało na rozpoczęcie leczenia.

Zakażenie HCV potwierdzono wykryciem w surowicy krwi RNA tego wirusa. Genotyp HCV oraz ocenę wiremii określono metodą real time - PCR (Syngen Biotech, USA) pozwalającą na wykrycie 100 kopii wirusów HCV w 1 ml krwi. Wiremię oceniono u wszystkich chorych przed rozpoczęciem terapii, a u leczonych dodatkowo w 12 tygodniu terapii w celu określenia wczesnej odpowiedzi wirusologicznej (EVR) na leczenie, definiowanej, jako uzyskanie w tym punkcie czasowym terapii ujemnego wyniku badania HCV RNA.

Aktywne zakażenie CMV rozpoznawano na podstawie wykrycia CMV DNA w surowicy. Z 200 μ l osocza izolowano CMV DNA metodą magnetyczną za pomocą aparatu do automatycznej izolacji kwasów nukleinowych „NucliSENS easy MAG” firmy BIOMERIEUX (Francja) i umieszczano w 50 μ l buforu do elucji. CMV DNA wykrywano metodą PCR ze starterami swoistymi wobec genu pp 65 wirusa. Obecność CMV DNA oznaczano techniką rt-PCR z barwnikiem fluorescencyjnym SYBR Green i starterami swoistymi wobec genu UL75 wirusa. Analizę wykonywano wykorzystując aparat ABI Prism 7900 HT f. Applied Biosystems (USA). Do obliczeń stężeń wykorzystano krzywą wzorcową sporządzoną z ekstraktów DNA z paneli kontrolnych CMV-dodatnich surowic o mianie wirusa od 5×10^2 do 5×10^5 kopii genomu/ml. Surowice kontrolne traktowano w sposób identyczny jak surowice badane. Czulość detekcji CMV DNA wyniosła w badaniu jakościowym 5×10^2 kopii genomu/ml, a w badaniu ilościowym 5×10^3 kopii genomu/ml.

Badania przeprowadzono wśród chorych kwalifikowanych do terapii przeciwwirusowej, którzy zgodnie ze standardami postępowania, w okresie kwalifikacji mieli wykonaną biopsję wątroby. Stan morfologiczny wątroby określano zgodnie z klasyfikacją Scheuer'a¹(4).

1 Obraz morfologiczny bioptatów wątroby ocenił dr hab. Anatol Panasiuk w Klinice Chorób Zakaźnych i Hepatologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Wszystkim chorym przed leczeniem oraz w grupie chorych leczonych w 12 tygodniu terapii określono stężenie hemoglobiny, liczbę erytrocytów, leukocytów, neutrofilii i płytek krwi.

Po uprzednim zaakceptowaniu badania przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku chorzy wyrazili świadomą zgodę na uczestnictwo w badaniach.

Wyniki przedstawiano, jako średnie i odchylenie standardowe (\pm SD). Analizę statystyczną przeprowadzono używając testów U Manna – Whitneya, Spearmana i t-Studenta. Poziom istotności określono w przypadku $p < 0,05$.

WYNIKI

Wśród 123 chorych przewlekle zakażonych HCV, aktywną replikację CMV stwierdzono u 18 (14,6%). U 16 spośród 18 zakażonych HCV, ze względu na niski poziom wirerii, RNA oceniano wyłącznie testami jakościowymi, czulszymi od testów ilościowych.

W grupie chorych z aktywną replikacją CMV, 16 było zakażonych genotypem 1 HCV, jeden genotypem 3 i jeden genotypem 4. Średnia wireria HCV u współzakażonych CMV ($7,5 \times 10^4 \pm 1,3 \times 10^5$ kopii/ml) była niższa w porównaniu do wirerii stwierdzanej wśród zakażonych wyłącznie HCV ($2,4 \times 10^5 \pm 7,2 \times 10^5$ kopii/ml). Jednak różnica ta nie była statystycznie istotna. Nie obserwowano korelacji pomiędzy wirerią HCV i zawartością CMV DNA. Średnia aktywność ALT u zakażonych HCV oraz HCV i CMV była porównywalna (97 ± 57 U/I vs. 82 ± 58 U/I). Nie stwierdzano różnic stężenia hemoglobiny, liczby erytrocytów, leukocytów, neutrofilii i płytek krwi pomiędzy chorymi z monoinfekcją HCV i z koinfekcją CMV (tab.I).

Tabela I. Parametry morfologiczne krwi w grupach chorych zakażonych HCV i ze współzakażeniem HCV/CMV

Table I. Parameters of full blood count in patients with chronic hepatitis C and patients coinfecting with HCV/CMV.

grupy chorych	n		hemoglobina g/dl	erytrocyty $\mu\text{l} \times 10^6$	leukocyty $\mu\text{l} \times 10^3$	neutrofile $\mu\text{l} \times 10^3$	płytki krwi $\mu\text{l} \times 10^3$
HCV	105	$x \pm SD$	14,2	4,6	5,4	2,8	179
			1,5	0,5	1,5	1,1	55
HCV/CMV	18	$x \pm SD$	14,7	4,7	5,5	2,8	179
			1,2	0,4	1,9	1,3	58

x - średnia; SD – odchylenie standardowe

Współzakażenie CMV nie miało wpływu na prawdopodobieństwo uzyskania EVR w trakcie leczenia

pwzw-C. Jak przedstawiono w tabeli II w grupie chorych zakażonych genotypem 1 HCV, EVR (niewykrywalne HCV RNA w 12 tygodniu leczenia) uzyskano u 27/48 (56%) chorych. Częściową odpowiedź wyrażoną obniżeniem wirerii w 12 tygodniu leczenia o więcej niż 2 logarytmy stwierdzono u 15/48 (31%), a brak odpowiedzi obserwowano u 6/48 (13%) leczonych. Wśród pacjentów ze współzakażeniem genotypem 1 HCV i CMV, EVR uzyskano u 7/11 chorych (64%), częściową odpowiedź u 2/11 (18%), a brak odpowiedzi u 2/11 (18%) leczonych (tab. II). Porównanie częstości uzyskania EVR w obu grupach nie wykazało różnicy istotnej statystycznie. Podobnej analizy nie można było przeprowadzić dla chorych zakażonych genotypem 3 HCV gdyż grupa ta obejmowała wyłącznie pacjentów z monoinfekcją HCV.

Tabela II. Skuteczność terapii PWZW-C w grupach chorych zakażonych HCV i ze współzakażeniem HCV/CMV w zależności od genotypu HCV.

Table II. The efficacy of the treatment of chronic hepatitis C with regard to HCV genotype, in groups of patients with HCV monoinfection and HCV/CMV coinfection.

zakażenia HCV	n	EVR - wczesna odpowiedź na leczenie pwzw-C (w 12 tygodniu)		
		pełna HCV RNA niewykrywalne	częściowa Obniżenie HCV RNA >2 log pierwotnej wartości	brak odpowiedzi Brak spadku lub obniżenie HCV RNA <2 log pierwotnej wartości
HCV, genotyp 1	48	27 (56%)	15 (31%)	6 (13%)
HCV/CMV genotyp 1	11	7 (64%)	2 (18%)	2 (18%)
HCV genotyp 3	14	9 (64%)	2 (14%)	3 (22%)

Nie stwierdzono różnic aktywności zapalnej oraz nasilenia włóknienia w tkance wątrobowej zależnej od aktywnej replikacji CMV. W grupie chorych bez zakażenia CMV, średnia aktywność zapalna wynosiła $G=2,4$, a włóknienie $S=1,4$ zaś wśród zakażonych HCV i CMV, $G=2,3$, a $S=1,4$.

DYSKUSJA

Aktywna replikacja CMV wśród chorych z prawidłową aktywnością układu immunologicznego jest zjawiskiem rzadkim. Badania Li i wsp. (5) przeprowadzone wśród 406 osób przyjmujących dożylnie środki odurzające wykazały u 70% aktywne zakażenie HCV, a tylko u 3,5% aktywne zakażenie CMV. Badania te, podobnie jak nasze określały obecność CMV DNA

w surowicy potwierdzające aktywną replikację tego wirusa. Zakażenie CMV utrzymuje się do końca życia, a częstość występowania swoistych przeciwciał przeciwko CMV, szacuje się nawet na 80% wśród osób dorosłych, co jednak zdecydowanie różni się od częstości wykrywania CMV DNA. W badaniach własnych nie określano obecności przeciwciał, ponieważ nie są one markerem aktywnej replikacji CMV (6) zaś częstość występowania CMV DNA była wysoka, ponad czterokrotnie częstsza od wyników prezentowanych przez Li i wsp. (5). Wynikać to może z badania różnych populacji, a także z różnic metodologicznych. Zwrócić należy uwagę, że w naszych badaniach wiramia CMV była niska, co utrudniało dokładną ocenę ilościową.

Spośród komórek Th, najważniejszą rolę w kształtowaniu odporności immunologicznej związanej z zakażeniem HCV odgrywają limfocyty Th1 i Th2. Zaburzenia mechanizmów kontrolujących syntezę cytokin w tych limfocytach, związane ze zróżnicowanym ich pobudzaniem przez HCV, przyczynia się do nieprawidłowej odpowiedzi immunologicznej, a w konsekwencji do aktywacji zmian zapalnych i włóknienia w wątrobie (7). CMV może hamować aktywność immunologiczną powodując wystąpienie stanu immunotolerancji wobec innych zakażeń, na przykład HCV. Słaba ekspresja receptorów CMV na zakażonych komórkach utrudnia ich rozpoznanie przez komórki NK i NKT (8). W badaniach Sadeghi i wsp. (9) przeprowadzonych u chorych po przeszczepie nerki wykazano, że aktywacja CMV wpływa na wzrost stężenia sIL-2R, IL-6 i IL-10 oraz spadek stężenia IFN-gamma w surowicy, co jest związane z aktywacją limfocytów Th2 i blokadą Th1. Działanie takie może wpływać na pogłębienie dysregulacji syntezy cytokin wśród osób jednocześnie zakażonych HCV i CMV. Jednak w badaniach własnych nie wykazano dodatkowego, negatywnego wpływu zakażenia CMV na nasilenie zmian zapalnych i włóknienia w morfologicznej ocenie wątroby, stężenie wiramii HCV czy też wczesną odpowiedź wirusologiczną. Prawdopodobnie związane jest to z dostateczną wydolnością układu immunologicznego zakażonych HCV. Istotne znaczenie zakażenia CMV ujawnia się w okresie znacznego spadku odporności, między innymi u chorych po przeszczepach. W takich sytuacjach może dochodzić do licznych, klinicznych objawów zakażenia CMV lub ułatwieniu przez CMV zakażeń grzybiczych i bakteryjnych (10). Razeghi i wsp. (11) analizując stan chorych po przeszczepie nerek, u których doszło do aktywacji CMV, obserwowali wpływ tego wirusa na wystąpienie niedokrwistości u 64%, trombocytopenii u 47% i leukopenii u 21% chorych. Badania obecności CMV DNA jakie przeprowadził Thomasini i wsp. (12) wśród chorych po przeszczepie wątroby wykazały, że wbrew powszechnej opinii infekcja ta jest częsta, a jednym z najczęstszych jej objawów są zaburzenia

hematologiczne, w tym trombocytopenia. Przeprowadzone przez nas badania nie wskazały na jakikolwiek wpływ CMV na parametry morfologiczne krwi wśród zakażonych HCV kwalifikowanych do terapii pzw-C. Wydaje się to zrozumiałe, ponieważ oceniana grupa chorych, przeciwieństwie do chorych po transplantacji nie otrzymywała żadnych leków zmniejszających aktywność układu immunologicznego. Fatalne skutki aktywacji CMV u młodego pacjenta z chłoniakiem z komórek T, leczonego immunosupresyjnie opisują (Halaburda i wsp.), (13). Aktywne zakażenie CMV może powodować wystąpienie włóknienia płuc, zapalenia drobnych naczyń (14, 15), a u noworodków włóknienia w wątrobie (16). W naszych badaniach nie stwierdzono wpływu aktywnego zakażenia CMV na nasilenie zmian zapalnych lub włóknienie w tkance wątrobowej, ponieważ pacjenci nie mieli zaburzeń immunologicznych, a stosowany w terapii interferon nasilił aktywność tego układu.

PODSUMOWANIE

W przeprowadzonych badaniach wykazano występowanie aktywnego zakażenia CMV u 14% osób przewlekle zakażonych HCV. Nie wykazano zależności pomiędzy aktywnością zakażenia CMV i HCV. Nie stwierdzono wpływu aktywnego zakażenia CMV na aktywność zapalną i włóknienie w wątrobie, obraz morfologiczny krwi jak i skuteczność terapii pzw-C.

W świetle uzyskanych wyników wydaje się, że współzakażenie CMV chorych z HCV nie wpływa na skuteczność terapii pzw-C. Jednak dla poparcia tego wniosku należałoby przeprowadzić badania na większej grupie chorych współzakażonych HCV i CMV.

PIŚMIENNICTWO

1. Rafailidis PI, Mourtzoukou EG, Varbobitis IC, i in. Severe cytomegalovirus infection in apparently immunocompetent patients: a systematic review. *Virology* 2008;5:47.
2. Vujacich C, Vidiella G, Barcelona L, i in. Cytomegalovirus infection with hepatic involvement in immunocompetent adults. *Medicina (B Aires)* 2006;66:206-10.
3. Ramírez S, Pérez-Del-Pulgar S, Fornis X. Virology and pathogenesis of hepatitis C virus recurrence. *Liver Transpl* 2008 [Suppl 2]:S27-35.
4. Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: A need for reassessment. *J Hepatol* 1991;13:372-6.
5. Li JR, Gong RY, Tian KL, i in. Study on the blood-borne virus co-infection and T lymphocyte subset among intravenous drug users. *World J Gastroenterol* 2007;16:2357-62.

6. Naumnik B, Małyszko J, Chyczewski L, i in. Comparison of serology assays and polymerase chain reaction for the monitoring of active cytomegalovirus infection in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2007;9:2748-50.
7. Fujimoto T, Tomimatsu M, Iga D, i in. Changes in the Th1/Th2 ratio during a 24-week course of an interferon alpha-2b plus ribavirin combination therapy for patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23:e432-7.
8. Powers C, DeFilippis V, Malouli D, i in. Cytomegalovirus immune evasion. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008;325:333-59.
9. Sadeghi M, Daniel V, Naujokat C, i in. Dysregulated cytokine responses during cytomegalovirus infection in renal transplant recipients. *Transplantation* 2008;2:275-85.
10. Olczak-Kowalczyk D, Pawłowska J, Cukrowska B i in. Local presence of cytomegalovirus and *Candida* species vs oral lesions in liver and kidney transplant recipients. *Ann Transplant.* 2008;4:28-33.
11. Razeghi E, Hadadi A, Mansor-Kiaei M, i in. Clinical manifestation, laboratory findings, and the response of treatment in kidney transplant recipients with CMV infection. *Transplant Proc* 2007;4:993-6.
12. Thomasini RL, Sampaio AM, Bonon SH, i in. Detection and monitoring of human herpesvirus 7 in adult liver transplant patients: impact on clinical course and association with cytomegalovirus. *Transplant Proc.* 2007;5:1537-9.
13. Halaburda K, Nasiłowska-Adamska B, Grabarczyk P. i in. Limited predictive value of real-time quantitative PCR cytomegalovirus monitoring in the blood. Fatal CMV pneumonia in an autologous stem cell transplant recipient previously treated with alemtuzumab. *Ann Transplant.* 2007;2:37-40.
14. Vannella KM, Moore BB. Viruses as co-factors for the initiation or exacerbation of lung fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2008;1:2.
15. Cohen P, Guillevin L. Vasculitis associated with viral infections. *Presse Med* 2004;33:1371-84.
16. Tang YT, Guan XQ, Zhao RQ. The clinicopathological study of infantile cytomegalovirus hepatitis. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2009;1:21-3.

Otrzymano: 28.01.2009 r.

Zakwalifikowano do druku: 23.04.2009 r.

Adres do korespondencji:

Dr hab. n. med. Tadeusz Wojciech Łapiński,
Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
15 - 540 Białystok, ul. Żurawia 14;
tel./fax (48 - 85) 7- 41 - 69 - 21;
e-mail: twlapinski@wp.pl