

Monitoring EBV infekcie u detských pacientov po transplantácii krvotvorných buniek (TKB)

Katarína Kováčová¹, Daniela Hučková¹, Ivana Boďová², Júlia Horáková²

¹Medirex, a. s., Bratislava

²Klinika detskej hematológie a onkológie LF UK a NÚDCH, TJKD, Bratislava

Epsteinov-Barrovej vírus (EBV) je ubikvitárne rozšírený γ -herpes vírus. Po infikovaní imunokompetentných jedincov zväčša navodí celoživotnú asymptomatickú infekciu, avšak u imunokompromitovaných pacientov môže spôsobiť vážne komplikácie. U príjemcov krvotvorných buniek po alogénnej transplantácii (alo-TKB) môže EBV infekcia viesť k vzniku posttransplantačného lymfoproliferatívneho ochorenia (PTLD). EBV-PTLD je životohrožujúca komplikácia s vysokou mortalitou 80 – 90 % a incidenciou medzi 0,5 – 1,3 %. U 71 detských pacientov po alo-TKB transplantovaných na Klinike detskej hematológie a onkológie LF a UK, Transplantačnej jednotke kostnej drene v Bratislave v období rokov 2013 až 2017 bola sledovaná hladina EBV DNA v súvislosti s výskytom EBV infekcie, možnými rizikovými faktormi jej vzniku a rozvoja EBV-PTLD. Kvantitatívna real-time PCR metóda bola uskutočnená zo vzoriek nezrazenej krvi u všetkých pacientov. Vysoká hladina EBV DNA v krvi bola pozorovaná v 57 % prípadov z aktívne infikovaných príjemcov (52 %). Zhodný nepríbuzenský darca a CMV reaktivácia boli asociované s vysokou vírusovou hladinou EBV DNA. U 2 pacientov sa rozvinulo EBV-PTLD ochorenie. Kľúčom včasnej liečby PTLD je pravidelné sledovanie hladiny EBV DNA metódou kvantitatívnej PCR v korelácii s rizikovými faktormi a klinickými príznakmi pacienta. Imunoterapeutická intervencia zahŕňa redukciu imunosupresie a podávanie anti-CD20 monoklonálnej protilátky (rituximab), adoptívnu imunoterapiu s podávaním EBV-špecifických T-buniek alebo infúzie darcovských lymfocytov.

Kľúčové slová: Epsteinov-Barrovej vírus (EBV), posttransplantačné lymfoproliferatívne ochorenie (PTLD), transplantácia krvotvorných buniek (TKB), rituximab

Monitoring EBV infection in children patients after Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT)

Epstein-Barr Virus (EBV) is a ubiquitous γ -herpesvirus. EBV usually established a lifelong asymptomatic infection in immunocompetent people. On the other hand, EBV can cause severe problems in immunocompromised patients. In recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplant (allo-HSCT), EBV infection may progress to the onset of a post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD). EBV-PTLD is a life-threatening complication with a high mortality rate of 80-90 % and incidence between 0.5 – 1.3 %. In 71 paediatric allogeneic allo-HSCT recipients transplanted at Department of Paediatric Haematology and Oncology, Haematopoietic Stem Cell Transplantation Unit, Comenius University Children's Hospital, Bratislava between 2013 and 2017, there were investigated the impact of routine EBV DNA monitoring the incidence of EBV infection, the potential risk factors and the development of EBV-PTLD. Quantitative real-time PCR assay was performed on all blood samples for all patients. High EBV DNAemia levels were observed in 57 % of the actively infected recipients (52 %). Matched-unrelated donor transplant and CMV reactivation were associated with the high viral load. Two patients developed EBV PTLD. The key to the initiation of early treatment is regular EBV DNA PCR monitoring in correlation with clinical symptoms and presence of risk factors. Immunotherapeutic intervention includes reduction of immunosuppression and administration of anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab), adoptive immunotherapy with the administration of EBV-specific T-cells or donor lymphocyte infusion (DLI).

Keywords: Epstein-Barr Virus, post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD), Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT), rituximab

NewsLab, 2018; roč. 9 (1): 21 – 26

Úvod

Epsteinov-Barrovej vírus (EBV) patrí medzi ľudské herpetické vírusy (ľudský herpes vírus 4, HHV-4). Človek je jediným prirodzeným hositeľom. Ide o ubikvitárne rozšírený vírus s výskytom viac ako 90 % v dospeljej populácii. Zdrojom nákazy je chorý jedinec alebo bezpríznakový nosič, ktorý vylučuje vírus slinami. Zaznamenal sa však aj prenos materským mliekom, krvou, transplantátmi a pohlavným stykom⁽¹⁾.

Ochorenie vyvolané infekciou EBV nie je preventabilné očkovaním a nie sú k dispozícii ani iné hromadné preventívne opatrenia na zabránenie prenosu EBV. Primárna infekcia EBV u detí vo väčšine prípadov prebieha asymptomaticky alebo ju sprevádzajú nešpecifické syndrómy. Vývoj syndrómu infekčnej mononukleózy je charakteristický pre primoinfekciu v adolescentnom veku, keď sú mladí dospelí infikovaní EBV prostredníctvom bozkávania (kissing disease). Inkubačný

čas trvá obyčajne 6-8 týždňov. Hlavnými cieľovými bunkami EBV sú B-lymfocyty, ktoré sú napádané po tom, čo sa vírus namnoží v epiteliálnych bunkách orofaryngu. Infikované B-lymfocyty aktivujú imunitnú odpoveď, sprostredkovanú predovšetkým cytotoxickými T-lymfocytmi a NK bunkami, ktoré sú schopné zlikvidovať väčšinu infikovaných buniek. Napriek tomu malá časť napadnutých B-lymfocytov preživa a stáva sa rezervoárom doživotnej perzistencie vírusu v organizme. Ťažkosti spojené s reaktiváciou EBV alebo s chronickou perzistentnou infekciou sú častejšie prítomné u pacientov s oslabenou imunitnou odpoveďou. EBV infekcia sa často dáva do súvislostí s niektorými druhmi lymfómov a neoplázií (Burkittov lymfóm endemický, Hodgkinov lymfóm asociovaný s AIDS, non-Hodgkinov lymfóm mozgu asociovaný s AIDS, periférny T-bunkový lymfóm, extranodálny NK-/T-lymfóm, niektoré typy karcinómu nosohltana, zažívacieho traktu a zriedka i karcinómu prsníka).

Posttransplantačné lymfoproliferatívne ochorenie (PTLD)

Posttransplantačné lymfoproliferatívne ochorenie (PTLD) je heterogénna skupina ochorení. Príčinou vzniku PTLD je potlačenie imunitného systému a súčasne chronická antigénna stimulácia zo strany transplantátu. Svetová zdravotnícka organizácia na základe morfológických, imunofenotypických, genetických a klinických vlastností definuje 4 hlavné kategórie PTLD: 1. včasné (skoré) lézie, 2. polymorfna PTLD, 3. monomorfna PTLD a 4. klasický Hodgkinov lymfóm – typu PTLD. Približne 80 % PTLD vzniknutých po transplantácii krvotvorných buniek (TKB) alebo solídnych orgánov (SOT) má spojitosť s EBV. Pred rokom 2000 bola mortalita na PTLD približne 85 %⁽²⁾. V súčasnosti umiera približne jedna tretina z diagnostikovaných PTLD pacientov⁽³⁾. Infikované B-lymfocyty nekontrolovateľne proliferujú a imunosuprimované T-lymfocyty nie sú schopné zvládnuť infekciu. Ide o reaktiváciu vírusu po transplantácii alebo o primárnu infekciu získanú od darcu. Približne 20 % PTLD je EBV-negatívnych, ich etiológia nie je celkom objasnená. EBV-pozitívne PTLD vznikajú skôr, väčšinou 6 – 10 mesiacov po transplantácii, zatiaľ čo EBV-negatívne PTLD neskôr, 4-5 rokov po transplantácii⁽⁴⁾. Priemerný výskyt PTLD po alogénnej transplantácii krvotvorných buniek sa pohybuje okolo 3 %. U detských pacientov je vo všeobecnosti incidencia PTLD vyššia ako u dospelých, pravdepodobne z dôvodu vyššej incidence negatívneho EBV sérostatusu⁽⁵⁾. U príjemcov po prijatí štepu sa pohybuje od 1,2 % v prípade zhodného príbuzenského darcu, do 2,8 % od nezhodného príbuzenského darcu a od 4,0 % v prípade zhodného nepríbuzenského darcu, do 11,2 % v prípade nezhodného nepríbuzenského darcu⁽³⁾. Frekvencia PTLD u príjemcov solídnych orgánov závisí od typu transplantovaného orgánu. Najnižšie riziko je pri transplantácii obličky (1-2 %), stredné riziko (2-3 %) sa uvádza pri transplantácii pečene a srdca a najvyššie riziko vzniku PTLD majú príjemcovia srdce – pľúca (7 – 9 %) alebo pečeň – črevo (7 – 11 %)⁽⁶⁾. Väčšina PTLD u príjemcov orgánového transplantátu má pôvod v B-lymfocytoch príjemcu, zatiaľ čo u príjemcov kmeňových krvotvorných buniek má PTLD pôvod väčšinou v darcovských B-lymfocytoch⁽⁷⁾. Frekvenciu a závažnosť PTLD ovplyvňujú rôzne rizikové faktory, medzi ktoré patria: detský alebo vyšší vek pacienta (deti do 5. roka života, pacienti nad 50 rokov), EBV

sérostatus príjemcu a darcu, primárne imunodeficity (hlavne X viazané lymfoproliferatívne ochorenie, Wiskottov-Aldrichov syndróm, familiárna hemofagocytová lymfohistiocytóza), in vivo alebo in vitro T-bunková deplécia, redukovaný prípravný režim s použitím anti-tymocytového globulínu (ATG) alebo použitím alemtuzumabu (anti-CD52), nepríbuzná/nehodná transplantácia, pupočníková transplantácia, choroba štepu proti hostiteľovi GVHD (graft versus host disease), CMV infekcia.

Diagnostika

Včasná diagnóza EBV-PTLD je kľúčom adekvátneho terapeutického zásahu a má dominantné postavenie vo výbere liečebného postupu, pretože EBV-PTLD máva rýchly a progresívny priebeh. V diagnostike EBV-PTLD okrem klinických príznakov, ktoré môžu byť často nešpecifické (horúčka, lymfadenopatia, hepatosplenomegália, respiračné zlyhávanie, CNS symptomatológia, multiorgánové zlyhávanie) a orgánového postihnutia, má dôležité postavenie sledovanie hladiny EBV DNA metódou PCR. Táto metóda má vysokú senzitivitu, ale samotný vzostup hladiny EBV DNA nemusí byť vždy špecifický pre rozvoj EBV-PTLD. Pri interpretácii a hodnotení výsledku EBV DNA nálož je potrebné zohľadniť aj vyšetrený materiál, v ktorom bola nálož EBV DNA stanovená – vyšetrenie z plnej krvi, z plazmy, zo séra alebo z mononukleárných buniek v periférnej krvi pacienta. Incidencia EBV DNA-émie sa pohybuje medzi 0,1 – 63 % a závisí od typu transplantátu, senzitivity metódy, definovanej hladiny DNA-émie a načasovaniu monitorovania EBV DNA.

Podľa odporúčaní z ECIL-6 (European Conference on Infection in Leukemia-6) je potrebné týždenné monitorovanie hladiny EBV DNA minimálne 4 mesiace po transplantácii⁽⁸⁾. Cut-off hladiny EBV DNA pre riziko vzniku PTLD nie sú definované. V literatúre sa uvádzajú nasledujúce hodnoty na podanie preemptívnej terapie: viac ako 50 000 EBV kópií/ml séra⁽⁹⁾, viac ako 10 000 kópií/ μ g PBMC⁽¹⁰⁾, 1 000 kópií/ml⁽¹¹⁾ alebo viac ako 300 kópií/ 10^5 PMNC⁽¹²⁾.

Samotná prítomnosť EBV DNA v krvi pacienta nemusí znamenať EBV asociované PTLD ochorenie. Na definitívne potvrdenie je nevyhnutný histologický dôkaz z patologického ložiska postihnutého orgánu. Odporúčanou metódou, ktorá má veľkú senzitivitu a špecifickosť je detekcia RNA kódovanej EBV pomocou *in situ* hybridizácie (EBER-ISH) so značenými fluorescenčnými sondami. Metóda imunohistochemického dôkazu vírusových proteínov má dobrú špecifickosť, ale nižšiu senzitivitu, vírusové proteíny sú variabilne exprimované v PTLD biopsiách. Detekcia EBV DNA metódou PCR v patologických ložiskách má vysokú senzitivitu, ale nízku prediktívnu hodnotu⁽¹³⁾.

Terapia

Včasná a adekvátna liečba EBV-PTLD u imunodeficientných pacientov vychádza z aktuálnych výsledkov sledovanej nálož EBV DNA metódou kvantitatívnej PCR v korelácii s rizikovými faktormi a klinickými príznakmi. U rizikových pacientov sa odporúča profylaktická antivírusová liečba (acyklovir, gancyklovir) s pravidelným podávaním sérových imunoglobulínov, ktorá však pri rozvinutom PTLD už nemá terapeutický význam. Preemptívna liečba, ako aj samotná liečba EBV-PTLD, zahŕňa imunoterapeutickú intervenciu, pri

ktorej v prvom kroku sa odporúča redukcia imunosupresie v prípade, ak pacient nemá závažnú GVHD. Zníženie alebo vysadenie imunosupresie vedie k urýchlenej regenerácii imunitného systému. Ak sa znížením imunosupresie u pacienta navodí aspoň parciálna úprava imunitného systému, môže byť úspešná aj eradikácia EBV infikovaných B-lymfocytov. Následne v druhom kroku v závislosti od klinického štádia sa začína podávanie anti-CD20 monoklonálnej protilátky (rituximab) v monoterapii, prípadne v kombinácii s chemoterapiou, v dávke 375 mg/m², raz do týždňa do negativity EBV DNA. Zvyčajne sú potrebné 1 – 4 dávky rituximabu. Terapeutická odpoveď samotného rituximabu sa udáva 90 % pri preemptívnej liečbe, 65 % pri samotnej liečbe PTLD a v kombinácii s redukciami imunosupresie dosahuje vyše 80 %. Rituximab by sa mal použiť v preemptívnej terapii PTLD len vtedy, ak sa predpokladá rýchly a agresívny priebeh PTLD, pretože podávanie rituximabu u pacientov ešte viac prehĺbi imunodeficienciu. Antivirotiká, ktoré sa používajú pri liečbe iných herpetických vírusov (napr. acyklovir, gancyklovir) majú na EBV obmedzený účinok, keďže pôsobia len pri replikácii DNA vírusu. Proliferujúce bunky v PTLD lézii sú predominantne latentne infikované, preto je liečba PTLD neefektívna. Pre rizikových pacientov sa antivirotiká používajú v profylaxii. V terapii sa využíva aj infúzia donorských lymfocytov (DLI), ktorá u séropozitívnych darcov obsahuje aj EBV-špecifické T-bunky. Veľkou nevýhodou DLI je zvýšené riziko vzniku ťažkej až fatálnej GVHD. Terapia pomocou podávania EBV-špecifických T-buniek je vysokoefektívna, viac ako v 90 % v prípade preemptívnej liečby a približne v 75 % pri liečbe PTLD. Na rozdiel od DLI nemá závažnejšie komplikácie. Jej nevýhodou je sťažená dostupnosť v mnohých transplantáčnych centrách. Rádioterapia sa používa výnimočne, využitie má len pri kontrolovanej lokálnej lézii PTLD. Jednoznačnou indikáciou na začatie chemoterapie je progresia PTLD u pacientov, ktorí neodpovedali na imunoterapeutickú intervenciu a liečbu rituximabom. Chemoterapia musí byť dôkladne zvážená pre jej toxicitu, zvýšené riziko infekčných komplikácií a riziko potlačenia alogénneho štepu. Z novších terapeutických postupov sa skúša podávanie monoklonálnych protilátok anti-CD19, anti-CD21, anti-CD24, anti-CD30.

Materiál a metódy

Metóda

Vzorky boli vyšetřované v týždenných intervaloch počas prvých asi 100 dní po transplantácii, neskôr s nižšou frekvenciou a v závislosti od klinického stavu pacienta. Monitorovanie EBV infekcie sa uskutočnilo zo vzorky plnej krvi (komerčná odberová skúmavka s EDTA). DNA bola izolovaná z 200 µl krvi s použitím komerčnej izolačnej súpravy MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (ROCHE, Nemecko) a s využitím prístroja MagNA Pure LC 2.0 (ROCHE, Nemecko). Následne sa uskutočnila amplifikácia, detekcia a kvantifikácia EBV DNA pomocou real-time PCR s použitím diagnostickej súpravy Epstein-Barr Virus (EBV) PCR Kit (GeneProof, Česká republika) na analyzátoře Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research, Austrália). Detekcia EBV je založená na princípe amplifikácie špecifickej sekvencie DNA génu kódujúceho nukleárny antigén 1 (EBNA 1) a merania nárastu koncentrácie amplifikačného produktu v priebehu PCR pomocou fluores-

cenčne značených sond. Hladina EBV DNA bola vyjadrená v kópiách/ml krvi. Pacienti boli rozdelení na základe hodnoty EBV DNA do nasledujúcich rizikových skupín: nízke riziko s negatívnym nálezom EBV DNA a hladinou EBV DNA nižšou ako 10 000 kópií/ml, stredné riziko s hladinou 10 000 – 100 000 kópií/ml a vysoké riziko pre hladinu EBV DNA vyššiu ako 100 000 kópií/ml. Okrem stanovenia EBV DNA boli pacienti monitorovaní pre CMV infekciu.

Štatistická analýza

Boli porovnávané výsledky stanovenia EBV DNA s výskytom rizikových faktorov u pacientov. Údaje boli analyzované pomocou štatistického softvéru OpenEpi, verzia 3.01 (http://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm) a chí-kvadrát test bol použitý na vyhodnotenie štatistických rozdielov. P hodnota menšia ako 0,05 bola považovaná za indikátor štatistickej významnosti.

Súbor pacientov

V období od roku 2013 až po október 2017 bolo u 93 detských pacientov (59 chlapcov a 34 dievčat) uskutočnená transplantácia krvotvorných buniek na Transplantačnej jednotke kostnej drene na Klinike detskej hematológie a onkológie LF a UK v Bratislave. Priemerný vek pacientov v čase transplantácie bol 8 rokov (v rozsahu od 0 až 20 rokov) s mediánom 7 rokov. Z celkového počtu 93 pacientov (100 transplantácií) bola u 22 (22 %) pacientov uskutočnená autológna transplantácia u 71 (78 %) pacientov alogénna transplantácia. Sedem pacientov podstúpilo alogénnu transplantáciu krvotvorných buniek dvakrát (3 chlapci a 4 dievčatá). EBV sérostatus pacientov po autológnej transplantácii bol nasledujúci: 8 EBV séronegatívny, 12 séropozitívny, u 2 nebol údaj dostupný. EBV sérostatus príjemca/darca (R/D = recipient/donor) v čase alogénnej transplantácie bol u 71 pacientov nasledujúci: R+/D+ u 42 (59 %) pacientov, R+/D- u 5 (7 %) pacientov, R-/D- u 3 (4 %) pacientov, R-/D+ u 6 (9 %) pacientov. EBV sérostatus darcu nebol dostupný v 15 (21 %) prípadoch, z nich 13 (18 %) R+/D? a 2 (3 %) R-/D. Najčastejšími diagnózami pacientov po alogénnej transplantácii boli lymfatická leukémia 26 (37 %) a myeloická leukémia 14 (20 %). Prehľad diagnóz udáva **tabuľka 1**.

U pacientov po alogénnej transplantácii bol v 17 (24 %) prípadoch zhodný v HLA príbuzenský darca (darca – súrodenc, len v jednom prípade matka) a v 54 (76 %) prípadoch zhodný v HLA nepríbuzenský darca. Zdrojom krvotvorných buniek bola v 45 (63 %) prípadoch kostná dreň, 26 (37 %) periférne bunky. Prípravný režim s redukovanou intenzitou (RIC = reduced-intensity conditioning) malo 19 (27 %) pacientov a myeloablatívny prípravný režim (MAC = myeloablative

Tabuľka 1. Zastúpenie diagnóz u 71 pacientov po alogénnej TKB

č. dg.	názov diagnózy	počet
C91	Lymfatická leukémia	26
C92	Myeloická leukémia	14
D61	Iné aplastické anémie	8
D81	Kombinovaná imunitná nedostatočnosť	7
D46	Myelodysplastické syndrómy	6
C93	Monocytočná leukémia	2
	Ostatné	8

conditioning) malo 51 (73 %) pacientov. U pacientov, ktorí podstúpili dve transplantácie, 6 z nich malo myeloablatívny prípravny režim a 1 pacient redukovaný prípravny režim.

Výsledky

Počas obdobia roku 2013 až po október 2017 bola realizovaná transplantácia krvotvorných buniek u 93 pacientov, z toho 22 (24 %) podstúpilo autológnu a 71 (76 %) alogénnu transplantáciu. V skupine pacientov po autológnej transplantácii bolo vyšetrených 116 vzoriek, s priemerom 5 vyšetrení na pacienta. U žiadneho pacienta z tejto skupiny nenastala EBV primoinfekcia ani EBV reaktivácia v sledovanom období. V skupine pacientov po alogénnej transplantácii bolo uskutočnených 1 710 vyšetrení, s priemerom 24 vyšetrení na pacienta. U 34 (48 %) pacientov nenastala EBV primoinfekcia ani EBV reaktivácia. EBV DNA pozitívita bola zaznamenaná u 37 (52 %) pacientov. U 16 (23 %) pacientov bola hladina EBV DNA menej ako 10 000 kópií/ml s mediánom 1 800 kópií/ml (rozsah: 360 – 8 100 kópií/ml). Hladinu EBV DNA v rozmedzí 10 000 až 100 000 kópií/ml malo 11 (15 %) pacientov s mediánom 23 400 kópií/ml (rozsah: 12 000 – 85 000 kópií/ml). V prípade 10 (14 %) pacientov dosiahla hladina EBV DNA hodnotu vyššiu ako 100 000 kópií/ml s mediánom 292 000 kópií/ml (rozsah: 107 000 – 6 000 000 kópií/ml) (**graf 1**).

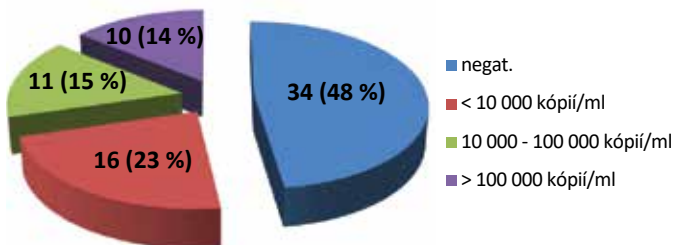
Reaktivácia EBV nastala v rozmedzí 14 až 355 dní po transplantácii s mediánom 41 dní po transplantácii. U pacientov,

u ktorých hladina EBV DNA nepresiahla 10 000 kópií/ml, bol medián času reaktivácie 57 dní (rozsah: D+21 až D+355), u pacientov s hladinou EBV 10 000 až 100 000 kópií/ml bol medián 34 dní (rozsah: D+18 až D+254) a u pacientov s hladinou viac ako 100 000 kópií/ml bol medián 31 dní (rozsah: D+14 až D+110) (**graf 2**).

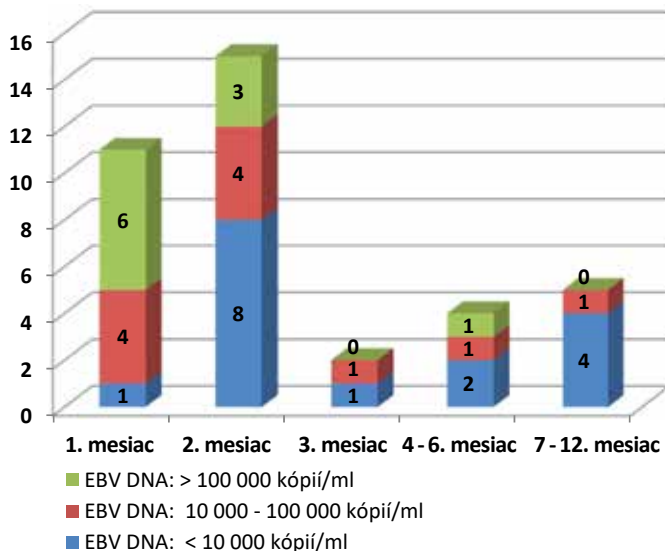
Dĺžka trvania EBV virémie sa pohybovala v rozmedzí 1 až 210 dní s mediánom trvania 25 dní. U pacientov, u ktorých hladina EBV DNA nepresiahla 10 000 kópií/ml, bol medián dĺžky trvania virémie 11 dní (rozsah: 1 až 210 dní), u pacientov s hladinou EBV 10 000 až 100 000 kópií/ml bol medián 55 dní (rozsah: 14 až 189 dní) a u pacientov s hladinou viac ako 100 000 kópií/ml bol medián 28 dní (rozsah: 17 až 57 dní) (**graf 3**).

Pre hodnotenie súvislosti charakteristík pacienta a rizikových faktorov s rizikom reaktivácie EBV DNA boli pacienti rozdelení do skupiny s hladinou EBV DNA menej ako 10 000 kópií/ml, resp. viac ako 10 000 kópií/ml. Zvýšené riziko reaktivácie EBV sa nepotvrdilo v súvislosti s pohlavím ($P = 0,249$), s diagnózou ($P = 0,801$), s pôvodom štepu ($P = 0,480$), s EBV sérostatusom príjemca/darca ($P = 0,215$) a s typom prípravného režimu ($P = 0,1486$). Naopak chí-kvadrát test ukázal významnú asociáciu medzi hladinou EBV DNA viac ako 10 000 kópií/ml a typom darcu ($P = 0,014$) a výskytom CMV reaktivácie ($P = 0,005$).

Graf 1. Kvantitatívne stanovenie EBV DNA u pacientov po alogénnej TKB



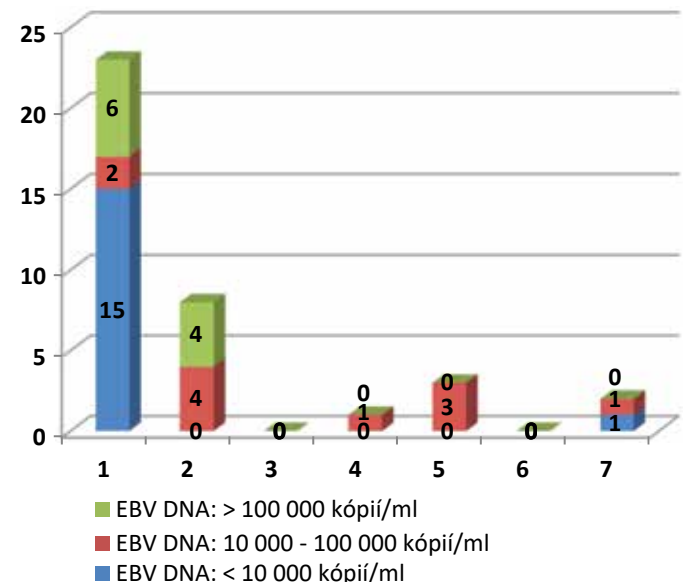
Graf 2. Nástup EBV reaktivácie po TKB



Diskusia

EBV-PTLD je vzácna, ale často fatálna komplikácia po alogénnej transplantácii krvotvorných buniek. Rýchla diagnostika je nutná pre začatie terapie s cieľom zabrániť vzniku samotného ochorenia. Súčasné liečebné stratégie, ako podávanie anti-CD20 monoklonálnej protilátky (rituximab) a EBV-špecifických cytotoxických T-lymfocytov, významne znižujú riziko smrti po rozvoji EBV PTLD ochorenia. V období od roku 2013 do októbra 2017 na Transplantačnej jednotke kostnej drene na Klinike detskej hematológie a onkológie LF a UK v Bratislave bolo transplantovaných 93 detských pacientov. Autológna transplantácia sa uskutočnila

Graf 3. Dĺžka EBV virémie po TKB v mesiacoch



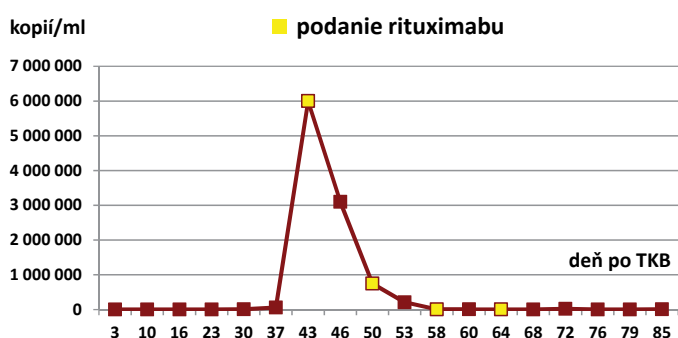
u 22 pacientov a alogénna transplantácia u 71 pacientov. Monitoring EBV infekcie bol realizovaný u všetkých pacientov pomocou kvantitatívnej real-time PCR. Ako materiál na vyšetrenie bola použitá nezrazená krv s EDTA. U 34 (48 %) pacientov po autológnej transplantácii nenastala EBV primoinfekcia ani EBV reaktivácia. Ako uvádzajú aj iné štúdie^(14,15) incidencia EBV DNA v krvi je po alogénnej transplantácii vysoká, v sledovanom súbore bola 52 %. Podľa odporúčaní z ECIL-6 (European Conference on Infection in Leukemia-6) je potrebné týždenné monitorovanie hladiny EBV DNA minimálne 4 mesiace po transplantácii⁽⁸⁾. V sledovanom súbore k reaktivácii EBV dochádzalo najčastejšie v prvých dvoch mesiacoch (70 %) po transplantácii. Medián času pre rozvoj EBV PTLD po TKB sa udáva 2 až 4 mesiace. Rozvoj PTLD neskôr ako po 12 mesiacoch po TKB sa opisuje len v 4 % prípadov. Prípady PTLD vyskytujúce sa viac ako po 5 rokoch od TKB sú extrémne vzácné⁽⁸⁾. V našom súbore sa vyskytli 2 prípady pacientov s EBV PTLD ochorením, u oboch so začiatkom v druhom mesiaci po TKB. V literatúre sa uvádzajú rôzne hladiny EBV DNA pre podanie preemptívnej terapie od 1 000 kópií/ml až 50 000 kópií/ml^(9,10,11,12). Vzhľadom na to boli pacienti v sledovanom súbore rozdelení do 3 rizikových skupín. Hladina EBV DNA nižšia ako 10 000 kópií/ml predstavovala nízke riziko rozvoja PTLD, hladina 10 000 až 100 000 kópií/ml stredné riziko a hladina vyššia ako 100 000 kópií/ml vysoké riziko. U všetkých 16 pacientov, u ktorých hladina EBV DNA nepresiahla 10 000 kópií/ml, samovoľne poklesla do negativity. Pacienti nemali žiadne klinické príznaky EBV infekcie a nebola im podávaná terapia. V skupine 11 pacientov s hladinou EBV DNA medzi 10 000 – 100 000 kópií/ml, 10 pacienti nevykazovali žiadne symptómy EBV infekcie a nebola im podaná terapia. Hladina EBV DNA u nich postupne klesla do negativity. Len v jednom prípade bola pacientovi podaná preemptívne terapia pri hladine 62 000 kópií/ml EBV DNA v 3 dávkach rituximabu (D+56, D+63, D+71). Na 75. deň od transplantácie nastala negativita EBV DNA. U 10 pacientov s hladinou vyššou ako 100 000 kópií/ml sa prejavovali známky EBV infekcie, dvom z nich nebola podaná terapia rituximabom, 6 pacientom bola preemptívne podaná terapia. Dvaja pacienti, u ktorých bolo histologicky potvrdené EBV-PTLD ochorenie, podstúpili cieľenú terapiu. Prvým z nich bol štvorročný chlapec po alogénnej nepríbuzenskej transplantácii kostnej drene s lymfatickou leukémiou, s EBV sérostatusom R+/D?, so zhodou v HLA systéme 9/10, s MAC režimom. Posttransplantačnou komplikáciou bola akútna GVHD

(D+26). Pozitívny nález EBV DNA bol prvýkrát zaznamenaný na 30 deň po TKB. Od D+41 nastalo zväčšenie lymfatických uzlín, febrility a hepatosplenomegália. V D+43 bola zaznamenaná maximálna hladina EBV DNA (6 000 000 kópií/ml), čo viedlo k podozreniu na lymfoproliferatívne ochorenie asociované s EBV. Bola podaná prvá dávka rituximabu. Na D+45 sa vykonala exstirpácia lymfatickej uzliny a histologický nález potvrdil difúzny veľkobunkový B-lymfóm. Na D+50 pri hladine EBV DNA 745 000 kópií/ml bola podaná už cieľene druhá dávka rituximabu, na D+58 tretia a na D+64 štvrtá dávka rituximabu, následkom čoho poklesla hladina EBV DNA až do negativity. Na D+90 nastali ďalšie komplikácie ako respiračná insuficiencia, trombocytopenia, hepatosplenomegália a pacient bol so zhoršeným klinickým stavom preložený na ARO. Na D+95 pacient v dôsledku multiorgánového zlyhania exitoval. Na **grafe 4** je znázornená hladina EBV DNA v závislosti odo dňa po TKB.

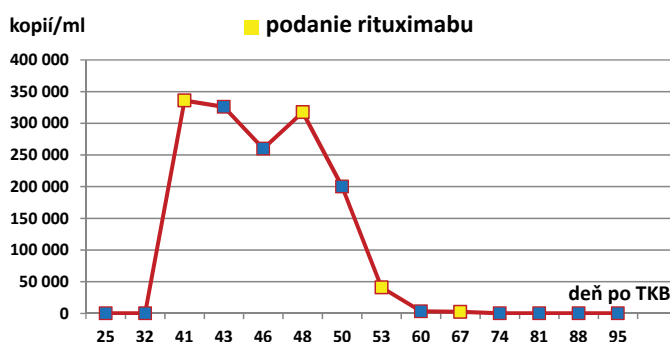
Druhým pacientom bol osemnásťročný chlapec po alogénnej nepríbuzenskej transplantácii periférnych buniek s myelickou leukémiou, s EBV sérostatusom R-/D+, v zhode v HLA systéme 10/10, s MAC režimom. Posttransplantačnou komplikáciou bola CMV a EBV reaktivácia. 32 dní po TKB bol pacient EBV DNA negatívny. Od D+41 nastalo zväčšenie lymfatických uzlín a febrility. V D+41 bola prvýkrát zaznamenaná prítomnosť EBV DNA v krvi a zároveň bola aj maximálna (336 000 kópií/ml). Bola podaná prvá dávka rituximabu. Na D+47 bolo histologicky potvrdené EBV PTLD. Na D+48 pri hladine EBV DNA 317 500 kópií/ml bola podaná cieľene druhá dávka rituximabu, na D+55 tretia a na D+63 štvrtá dávka. Hladina EBV DNA poklesla v D+74 až do negativity. Na **grafe 5** je znázornená hladina EBV DNA v závislosti odo dňa po TKB.

Pravdepodobnosť reaktivácie EBV a prípadne rozvoja PTLD môžu zvyšovať niektoré charakteristiky pacienta a rizikové faktory, medzi ktoré patria: detský alebo vyšší vek pacienta, EBV sérostatus príjemcu a darcu, primárne imunodeficity, in vivo alebo in vitro T-bunková deplécia, redukovaný prípravový režim s použitím anti-tymocytového globulínu (ATG) alebo použitím alemtuzumabu (anti-CD52), nepríbuzná/neshodná transplantácia, pupočníková transplantácia, ochorenie GVHD, CMV infekcia. U príjemcov štepu po nepríbuzenskej transplantácii je incidencia EBV-PTLD 2,6 – 3,3 % pre myeloablatívny prípravový režim (MAC) a 7 – 12,9 % pre prípravový režim s redukovanou intenzitou (RIC). Oba pacienti, u ktorých sa rozvinulo EBV-PTLD, podstúpili myeloablatívny prípravový režim. V zhode s predchádzajúcou štúdiou⁽¹⁶⁾ sme

Graf 4. Monitoring EBV DNA u štvorročného pacienta s EBV-PTLD



Graf 5. Monitoring EBV DNA u osemnásťročného pacienta s EBV-PTLD



potvrdili, že zvýšené riziko reaktívácie EBV DNA je aj u príjemcov po TKB od nepríbuzenského darcu. Zvýšenú hladinu EBV DNA nad 10 000 kópií/ml malo 20 (37 %) z 54 pacientov po nepríbuzenskej transplantácii a len 1 (6 %) pacient zo 17 po príbuzenskej transplantácii krvotvorných buniek, čo môže súvisieť s použitím anti-tymocytového globulínu (ATG), ktorý je asociovaný s rizikom vzniku EBV infekcie aj s rizikom rozvoja PTLD^(2,17,18). Preukázala sa významná asociácia medzi hladinou EBV DNA vyššou ako 10 000 kópií/ml a výskytom CMV reaktívácie. V skupine pacientov, v ktorej nastala CMV reaktívacia, bola EBV DNA viac ako 10 000 kópií/ml dokázaná v 10 z 18 (56 %) prípadov, zatiaľ čo v skupine pacientov bez CMV reaktívácie sa zvýšená hladina EBV DNA objavila v 11 (21 %) z 53 prípadov. Zvýšené riziko reaktívácie EBV sa nepotvrdilo v súvislosti s pohlavím, diagnózou, pôvodom štepu, s EBV sérostatusom príjemca/darca a s typom prípravného režimu pred transplantáciou.

LITERATÚRA

1. Odumade OA, Hogquist KA, Balfour HH Jr. Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections. *Clin Microbiol Rev* 2011; 24(1):193-209.
2. Curtis RE, Travis LB, Rowlings PA, et al. Risk of lymphoproliferative disorders after bone marrow transplantation: a multi-institutional study. *Blood* 1999; 94: 2208-2216.
3. Styczynski J, Gil L, Tridello G, et al. Response to rituximab-based therapy and risk factor analysis in Epstein Barr Virus-related lymphoproliferative disorder after hematopoietic stem cell transplant in children and adults: a study from the Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Clin Infect Dis* 2013; 57(6): 794-802.
4. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al. *Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon : IARC Press 2001; 264-269.
5. Green M, Michaels MG. Epstein-Barr virus infection and posttransplant lymphoproliferative disorder. *Am J Transplant* 2013; 13(Suppl 3): 41-54.
6. Allen UD, Preiksaitis JK; AST Infectious Diseases Community of Practice. Epstein-Barr virus and posttransplant lymphoproliferative disorder in solid organ transplantation. *Am J Transplant* 2013;13(Suppl 4): 107-120.
7. Spiro IJ, Yandell DW, Li C, et al. Brief report: lymphoma of donor origin occurring in the porta hepatis of a transplanted liver. *N Engl J Med* 1993; 329: 27-29.
8. Styczynski J, van der Velden W, Fox CHP, et al. Management of Epstein-Barr Virus infections and post-transplant lymphoproliferative disorders in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Sixth European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-6) guidelines. *Haematologica* 2016; 101(7): 803-811.
9. Aalto SM, Juvonen E, Tarkkanen J, et al. Epstein-Barr viral load and disease prediction in a large cohort of allogeneic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis*, 2007; 45: 1305-1309.
10. Hoshino Y, Kimura H, Tanaka N, et al. Prospective monitoring of the Epstein-Barr virus DNA by a real-time quantitative polymerase chain reaction after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2001; 115: 105-111.

Záver

PTLD ochorenie asociované s EBV sa vyskytuje u pacientov po alogénnej transplantácii krvotvorných buniek a po orgánovej transplantácii. Je to pomerne zriedkavá posttransplantačná komplikácia, avšak vyznačuje sa vysokou mortalitou. Rýchlosť stanovenia správnej diagnózy môže byť rozhodujúca pri výbere adekvátnej liečby. Monitoring hladiny EBV DNA metódou kvantitatívnej PCR v pravidelných intervaloch minimálne počas 4 mesiacov po alogénnej transplantácii je nevyhnutnou súčasťou starostlivosti o transplantovaných pacientov. Včasné zachytenie nárastu hladiny EBV DNA a preemptívne podanie anti-CD20 monoklonálnej protilátky (rituximab) môže zabrániť vzniku a progresii PTLD, a tak odvrátiť prípadné fatálne následky.

11. Sica S, Metafuni E, Bellesi S, Chiusolo P. Epstein-barr virus related lymphoproliferations after stem cell transplantation. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2009; 1(2): e2009019. doi: 10.4084/MJHID.2009.019.
12. Cesaro S, Murrone A, Mengoli C, et al. The realtime polymerase chain reaction-guided modulation of immunosuppression enables the preemptive management of Epstein-Barr virus reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2005; 128: 224-233.
13. van der Velden WJ, Mori T, Stevens WB, et al. Reduced PTLD-related mortality in patients experiencing EBV infection following allo-SCT after the introduction of a protocol incorporating pre-emptive rituximab. *Bone Marrow Transplant* 2013; 48(11): 1465-1471.
14. Carpenter B, Haque T, Dimopoulou M, et al. Incidence and dynamics of Epstein-Barr virus reactivation after alemtuzumab-based conditioning for allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. *Transplantation* 2010; 90(5): 564-570.
15. Dominiotto A, Tedone E, Soracco M, et al. In vivo B-cell depletion with rituximab for alternative donor hemopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2012; 47(1): 101-106.
16. Chiereghin A, Prete A, Belotti T, et al. Prospective Epstein-Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disorder prevention program in pediatric allogeneic hematopoietic stem cell transplant: virological monitoring and first-line treatment. *Transpl Infect Dis* 2016; 18(1): 44-54.
17. Sundin M, Le Blanc K, Ringdén O, et al. The role of HLA mismatch, splenectomy and recipient Epstein-Barr virus seronegativity as risk factors in post-transplant lymphoproliferative disorder following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2006; 91(8): 1059-1067.
18. Wachowiak J, Grund G. Infectious complications in children conditioned for allogeneic haematopoietic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning or with treosulfan-based reduced toxicity preparative regimen. *Rep Pract Oncol Radiother* 2007; 12(3): 175-179.



Mgr. Ing. Kováčová Katarína
Medirex, a. s.
Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava
e-mail: katarina.kovacova@medirex.sk