

# MONITORIZAREA INFECȚIILOR VIRALE POSTTRANSPLANT DE CELULE STEM HEMATOPOIETICE LA COPIL – EXPERIENȚA CENTRULUI DE TRANSPLANT MEDULAR, INSTITUTUL CLINIC FUNDENI, BUCUREȘTI

*Monitoring posttransplant viral infections of hematopoietic stem cells  
in children – experience of Bone Marrow Transplant Center,  
Fundeni Clinical Institute, Bucharest*

**Dr. Anca Coliță<sup>1,2</sup>, Dr. Alina Tănase<sup>2</sup>, Dr. Ana Moise<sup>2</sup>,  
Conf. Dr. Ileana Constantinescu<sup>1,2</sup>, Prof. Dr. Constantin Arion<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Centrul de Diagnostic și Tratament „Dr. Victor Babeș”, București

<sup>2</sup>Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila”, București

## REZUMAT

Infecțiile virale posttransplant de celule stem hematopoietice sunt raportate cu o incidență redusă comparativ cu infecțiile fungice sau bacteriene, dar frecvent au evoluție mai gravă și mortalitate ridicată. Acest studiu analizează a) incidența și evoluția infecțiilor virale și b) corelația cu tratamentul imunosupresor pe un lot de 13 pacienți pediatrici care au efectuat transplant de celule stem hematopoietice în Centrul de Transplant Medular, Institutul Clinic Fundeni, București. Toți pacienții au fost monitorizați cu RT-PCR pentru CMV, EBV, ADV, VZV, HSV-1, HHV-6, HHV-8 și Nested PCR pentru JCV, BKV. Testarea virală a permis identificarea în 6 din 13 cazuri a reactivării CMV, în 3 cazuri a bolii CMV, 1 caz de reactivare EBV, 1 caz de encefalită HHV-6, 2 cazuri de cistită cu poliomavirusuri. Aspectele clinice cele mai severe au fost asociate cu imunosupresia agresivă pentru tratamentul reacției de grefă contra gazdă. Detectarea precoce și tratamentul specific reprezintă cei mai importanți factori prognostici ai infecției virale.

**Cuvinte cheie:** infecții virale, transplant celule stem hematopietice, copii

## ABSTRACT

Viral infections after stem cell transplant are less frequently reported compared to bacterial or fungal infections, but usually are more severe and associated with high mortality. This study analyzes the incidence and outcome of viral infections and correlation with immunosuppressive therapy in 13 patients receiving allogeneic stem cell transplantation in Bone Marrow Transplant Center, Fundeni Clinical Institute, Bucharest. All patients were monitored with RT-PCR for CMV, EBV, ADV, VZV, HSV-1, HHV-6, HHV-8 and with Nested PCR for JCV, BKV. The viral diagnosis showed 7 out of 13 cases reactivation of CMV, 3 cases of CMV disease, 1 case of EBV reactivation, 1 case of HHV-6 encephalitis, 2 cases of polyomavirus cystitis. The most severe clinical aspects have been associated with severe immunosuppression for GVHD. Early detection of viral infection and appropriate treatment are very important factors for outcome.

**Key words:** viral infection, stem cell transplantation, children

## INTRODUCERE

Infecțiile virale reprezintă o complicație majoră a transplantului de celule stem hematopoietice, cu o incidență mai redusă comparativ cu infecțiile fun-

gice sau bacteriene, dar frecvent cu evoluție mai gravă și mortalitate ridicată. În cazul pacienților transplantați, replicarea virală și progresia către boală sunt determinate de factori specifici, dependenți de pacient, de donator și de virus. Această

Adresă de corespondență:

Dr. Anca Coliță, Institutul Clinic Fundeni, Centrul de Transplant Medular, Clinica de Pediatrie, Șos. Fundeni Nr. 258, București  
e-mail: ancacolita@yahoo.com

interacțiune complexă este modulată de terapia imunosupresoare și de impactul asupra imunității celulare specifice antivirale. Virusurile care pot determina cel mai frecvent infecții posttransplant sunt: a) virusurile herpetice [virusul citomegalic (CMV), virusul Epstein-Barr (EBV), virusurile herpetice 6, 7, 8 (HHV6, HHV7, HHV8), herpes simplex 1 și 2 (HSV1, HSV2), virusul varicelo-zosterian (VZV)]; b) adenovirusurile (AdV) A,B, C, D, E, F; c) virusurile polyomatoase (BKV, JCV); d) enterovirusurile; e) parvovirusul B19; f) virusul sincițial respirator; g) virusurile gripa A și B; h) virusurile parainfluenza 1,2,3. Introducerea testelor de identificare virală bazate pe tehnici PCR (polymerase chain reaction) permite adoptarea strategiilor de tratament preemptive, dar utilizarea unei monitorizări extensive a reactivărilor virale posttransplant este costisitoare (1). Cunoașterea incidenței și epidemiologiei locale a diverselor infecții virale posttransplant permite adoptarea unui screening restrictiv doar pentru anumiți viruși, care să permită o intervenție terapeutică în timp util, cu un raport cost-beneficiu maxim.

## OBIECTIVE

Am realizat un studiu retrospectiv pentru a analiza: a) incidența și evoluția infecțiilor virale posttransplant de celule stem hematopoietice (CSH) la pacienții pediatrici la care s-a realizat monitorizarea prin tehnici PCR; b) interrelația dintre infecția virală și statusul imunosupresiei necesare pentru controlul reacției de greșă contra gazdă (GVHD – graft versus host disease).

## MATERIAL ȘI METODĂ

Lotul de studiu a inclus 13 copii care au efectuat transplant CSH de la donator familial în Centrul de Transplant Medular al Institutului Clinic Fundeni. Studiul realizat este retrospectiv. Compatibilitatea HLA între donator și primitor a fost demonstrată la nivel allelic pentru locii HLA de clasa I și II. Înainte de transplant s-a realizat analiza ELISA pentru anticorpi specifici IgG și IgM pentru CMV și EBV atât la donator, cât și la primitor. Consimțământul informat a fost semnat înainte de procedura de transplant de către familiile pacienților. Profilaxia infecțiilor virale s-a realizat cu Aciclovir. Detectarea infecțiilor virale s-a realizat prin teste RT-PCR pentru CMV, EBV, HSV1, HHV6, HHV8, ADV, VZV și teste Nested PCR pentru JCV și BKV. Monitorizarea infecțiilor virale cu CMV și EBV s-a realizat săptămânal, până în ziua 100 posttransplant

și ulterior lunar, pe toata durata administrării tratamentului imunosupresiv la pacienții cu reacție de greșă contra gazdă. Testele de identificare virală extinse s-au realizat la apariția febrei de etiologie neprecizată sau a unor simptome posibil asociate cu infecții virale posttransplant. Aprecierea stadiului reacției de greșă contra gazdă s-a realizat cu ajutorul criteriilor NIH. (2)

În cazul monitorizării CMV, valoarea pozitivă cut-off de la care s-a inițiat tratamentul preemptiv a fost considerată diferit în funcție de momentul posttransplant: a) în primele 100 zile posttransplant, valoarea cut-off a variat între 100-500-1000 copii/ml, ținând cont de factorii de risc prezenți, b) după ziua 100 posttransplant, s-a inițiat tratamentul specific anti CMV pentru valori >1.000 copii/ml sau în cazul creșterii semnificative a numărului de copii (de exemplu, creșterea de peste 5 ori a nivelului bazal în decurs de 2 săptămâni). (3)

În cazul monitorizării EBV, valoarea pozitivă cut-off a fost considerată 1.000 copii/ml.

Au fost utilizate următoarele definiții:

- Reactivarea virală – a fost definită prin valori pozitive, peste valoarea de cut-off, ale testelor PCR;
- Boala virală – a fost definită prin valori pozitive ale testelor PCR, la care se adaugă manifestări de organ și/sau confirmare histopatologică;
- Recurența virală – a fost definită prin reacții virale multiple.

## REZULTATE

Caracteristicile lotului de 13 pacienți pediatrici la care s-a efectuat allotransplant de celule stem hematopoietice sunt redate în Tabelul 1.

### Infecția cu virusuri herpetice

#### a. Infecția CMV

Infecția CMV posttransplant a reprezentat cel mai frecvent eveniment, fiind înregistrat la 7 din 13 pacienți (53,8%). Monitorizarea virusologică pentru CMV a demonstrat reactivarea virală în 6 cazuri (46,15%), cu o încărcătură virală între 280-35.000 copii/ml. Într-un singur caz s-a diagnosticat boala CMV per primam, bolnavul fiind fără GVHD, după ziua +100, nu beneficia de program de monitorizare virusologică. Terapia preemptivă cu valganciclovir oral a determinat negativarea probelor virusologice în interval de 30-45 de zile la 4 din cei 6 copii cu reactivări CMV.

**TABELUL 1.** Caracteristici clinice ale lotului de studiu

Caracteristica	Nr.
Sursa de celule stem	
– Celule stem periferice	11/13
– Măduvă osoasă	1/13
– Cordon ombilical	1/13
Sex donor/sex receptor	
– F/M	4
– F/F	2
– M/F	3
– M/M	4
Vârsta	
– Mediană	7
– Limite	1-16
Diagnostic	
– LAL	3
– LAM	5
– Insuficiență medulară	4
– Talasemie majoră	1
Condiționare	
– Mieloablativă	11
– Non-mieloablativă	2
Status CMV	
– D+/R+	13
– D+/R-	0
Status EBV	
– D+/R+	12
– D+/R-	1

Boala CMV a fost stabilită în 3 cazuri (23%):

– 1 caz cu gastroenterită CMV demonstrată prin viremie 22.000 copii/ml, hiperemia mucoasei gastroduodenale (endoscopie digestivă superioară) și biopsia de mucoasă intestinală care arată prezența de incluzii celulare înconjurate de un halou clar, realizând aspectul de „ochi de bufniță“ și răspuns favorabil la terapia cu ganciclovir. Pacientul, diagnosticat cu leucemie acută mieloblastică, a dezvoltat boală CMV tardivă, după ziua +100, în absența GVHD; nu se afla în program de monitorizare.

– 1 caz de pneumonie severă CMV (a necesitat suport ventilator pentru insuficiență respiratorie 96 de ore) demonstrată prin viremie 675 copii/ml, aspect radiologic de pneumonie interstițială cu răspuns la terapia cu ganciclovir. Acest pacient a prezentat recurențe ale reactivării CMV, dar trebuie menționată și non-complianța la terapia cu valganciclovir. Infecția CMV a reprezentat un trigger pentru GVHD la nivel pulmonar.

– 1 caz de hepatită asociată cu encefalită severă CMV (a necesitat suport ventilator pentru controlul HTA și convulsiilor 36 de ore) demonstrată prin viremie 35.000 copii/ml în ser, viremie 600 copii/ml în lichidul cefalo-rahidian, aspectul imagistic (rezonanță magnetică cerebrală) cu leziuni ale substanței albe sugestive pentru encefalită virală.

Pacientul a dezvoltat boala CMV sub tratament cu valganciclovir inițiat în urmă cu 7 zile, când monitorizarea virală a arătat peste 45.000 copii/ml. Acest pacient a prezentat, concomitent cu boala CMV, și cistită cu JCV. Evoluția a fost favorabilă sub tratament cu ganciclovir.

Recurența infecției CMV a fost înregistrată în 2 cazuri (15,4%).

#### **b. Infecția EBV**

Reactivarea infecției EBV s-a înregistrat într-un singur caz (7,7%) și a evoluat către boală limfo-proliferativă posttransplant la un pacient cu anemie aplastică formă foarte severă. Evoluția a fost nefavorabilă și a determinat decesul.

#### **c. Infecția HHV-6**

Encefalita HHV-6 s-a înregistrat la un pacient (7,7%) cu convulsii, hiponatremie severă și viremie 280 copii/ml. Reducerea imunosupresiei asociată cu tratament suportiv și ganciclovir a avut efect favorabil asupra evoluției clinice.

### **Infecția cu polyomavirusuri**

#### **a. Infecția JCV**

Cistita hemoragică cu JCV a fost diagnosticată la un pacient (7,7%) cu allotransplant medular pentru beta talasemie majoră concomitent cu boala CMV (hepatită și encefalită). Testele Nested PCR au fost pozitive atât în sânge, cât și în urină, iar ecografia vezicală a arătat îngroșarea semnificativă a mucoasei vezicale. Evoluția cistitei a fost îndelungată (6 săptămâni), a necesitat tratament suportiv și antialgic intens și a răspuns doar la reducerea tratamentului imunosupresor.

#### **b. Infecția BKV**

Cistita hemoragică cu BKV a fost înregistrată la un pacient (7,7%) cu allotransplant de celule stem hematopoietice pentru leucemie acută mieloblastică; testele Nested PCR au fost pozitive în ser și urină. Evoluția cistitei a fost îndelungată (9 săptămâni) și a răspuns doar la reducerea tratamentului imunosupresor.

Alte infecții virale – HSV, VZV, ADV, HHV-8 nu au fost identificate în lotul analizat.

În Tabelul 2 sunt prezentate complicațiile infecțioase și statusul reacției de grefă contra gazdă (GVHD).

## **DISCUȚII**

Pe lotul analizat am înregistrat o incidență a viremiei de 53,8% pentru CMV (46,15% reactivare

**TABELUL 2.** Complicațiile infecțioase virale – corelația cu severitatea GVHD

Complicație virală	Nr. cazuri	Manifestări clinice	Forma severă GVHD
Reactivare virală CMV	6/13	–	Absent 1/4 GVHD II 3/4 GVHD IV 2/4
Boală CMV	3/13	Gastroenterită Pneumonie Hepatită + encefalită	Absent GVHD IV GVHD III
Infecție HHV-6	1/13	Encefalită	GVHD IV
Infecție EBV	1/13	Boală limfoproliferativă posttransplant	Absent
Infecție JCV	1/13	Cistită hemoragică	GVHD III
Infecție BKV	1/13	Cistită hemoragică	GVHD IV
Fără complicații virale	5/13	–	Absent 4/5 GVHD IV 1/5

CMV și 23% boală CMV) și de 7,7% pentru EBV, HHV6, BKV și JCV. Reactivarea CMV a fost cel mai frecvent eveniment infecțios viral în evoluția posttransplant, determinat de ineficiența profilaxiei cu aciclovir la această categorie de pacienți. În contrast, nu am înregistrat niciun caz de infecție cu HSV sau VZV, virusuri care sunt eficient supresate de către aciclovir. Matthes-Martin & colab. (4) raportează o incidență de 36% a infecției CMV pe un lot de 98 de pacienți pediatrici posttransplant de celule stem hematopoietice. Incidența de peste 68% a reactivării CMV este raportată pe un grup de 116 pacienți adulți cu transplant de celule stem hematopoietice. (5) Factorii de risc pentru infecția CMV sunt GVHD stadiul II-IV și statusul CMV donor pozitiv – receptor negativ (6). Incidența crescută a infecției CMV pe lotul nostru poate fi atribuită unui procent crescut de forme severe de GVHD (stadiul II-IV) 46% sau foarte severe (stadiul III-IV) 30,8%. Pe lotul nostru am înregistrat doar combinația CMV donor pozitiv-receptor pozitiv.

Terapia preemptivă bazată pe monitorizare virală permite prevenirea bolii CMV la majoritatea pacienților (7,8). Pe lotul nostru, terapia preemptivă a fost eficientă la 4 din 6 pacienți. Doi dintre cei 6 pacienți cu reactivare CMV au evoluat spre boală CMV, într-un caz fiind menționată non-compliance la tratamentul antiviral. Am înregistrat un caz de boală CMV tardivă, la un pacient fără GVHD și fără tratament imunosupresor. Evoluția infecției CMV la toți pacienții a fost favorabilă sub tratament specific cu ganciclovir sau valganciclovir, chiar și în cazul encefalitei CMV asociată cu hepatită CMV, unde datele din literatură arată o mortalitate ridicată (9). În studiul Matthes-Martin (4) este raportată

evoluția fatală a 6 din 20 de pacienți cu viremie CMV.

Recurența infecției CMV a fost înregistrată doar în 15,4% (2 cazuri), procent mai scăzut decât 21,18% înregistrat de Moins-Teisserenc (5). Lillieri et al. (10) sugerează că infecțiile recurente cu CMV apar cu incidență crescută la pacienții fără recuperarea imunității specifice în ziua +60.

Reactivarea EBV a fost identificată într-un singur caz și a evoluat către boală limfoproliferativă posttransplant, cu evoluție fatală. Studiul Matthes-Martin a arătat că infecția EBV este simptomatică doar la 10% dintre pacienții cu viremie EBV, dar boala are evoluție fatală la 1 din 2 pacienți simptomatici (4).

Encefalita HHV6 a fost diagnosticată la un pacient (7,7%). Această complicație este foarte rară, fiind identificată doar la 9 din 2.628 de pacienți cu allotransplant de celule stem hematopoietice (9). Viremia HHV6 este notată la un procent semnificativ de copii, 66% (4), fără a fi asociată cu manifestări clinice.

Reactivarea polyomavirusurilor (BKV sau JCV) se asociază cu cistită hemoragică; infecția BKV este notată la 13% dintre copii posttransplant de celule stem hematopoietice (4). Cistita BKV apare tipic la momentul greșării și este asociată cu valori crescute și persistente ale viruriei BKV (11). BKV este frecvent identificat și în sânge, sugerând că inflamația vezicii urinare determină invazia sanguină. Pe lotul nostru am identificat un caz de cistită BKV și un caz de cistită JCV. În ambele situații, pacienții asociau forme severe de GVHD astfel încât evoluția cistitei a fost îndelungată, fiind ameliorată doar de reducerea imunosupresiei. Cistita hemoragică apare la 5% dintre pacienții cu transplant CSH, la 2-6 săptămâni posttransplant, dar durează 4-12 săptămâni (12). În lipsa unui tratament specific, eficient, anti-polyomavirusuri, singurele măsuri terapeutice sunt analgezicele și irigațiile vezicale. Unele studii arată rezultate favorabile cu administrare sistemică și intravezicală de Cidofovir (13), dar eficiența acestui medicament necesită confirmare pe loturi mai mari de pacienți.

Analiza corelației dintre complicațiile infecțioase virale și statusul reacției de greșă contra gazdă (Tabelul 2) arată incidența crescută a manifestărilor virale în formele severe de GVHD, care necesită intensificarea terapiei imunosupresoare. Reactivarea virală s-a observat în 6 cazuri, din care 5 au asociat GVHD stadiul II-IV, iar boala virală (CMV, EBV, HHV-6, JCV, BKV) s-a diagnosticat în 5 cazuri (2 pacienți au avut infecții multivirale), din care 3 au asociat GVHD gradul III-IV. Cinci dintre

pacienți nu au prezentat complicații virale, iar 4 dintre aceștia au dezvoltat doar GVHD stadiul I.

Tehnicile PCR de identificare virală permit: a) stabilirea etiologiei virale asociate unui anumit simptom; b) reactivarea virală tardivă; c) detectarea precoce a infecțiilor virale invazive; d) evaluarea răspunsului la tratament.

Incidența crescută a reactivării și/sau bolii CMV justifică monitorizarea strictă, săptămânal până în ziua 100 și lunar în perioada de tratament a GVHD și permite inițierea rapidă a tratamentului specific cu ganciclovir sau valganciclovir. Gravitatea și mortalitatea crescută a reactivării EBV justifică monitorizarea strictă, mai ales în condițiile demonstrării eficienței terapeutice a anticorpilor anti CD20 asupra EBV. Monitorizarea polyomavirusurilor în

urină este importantă pentru stabilirea diagnosticului etiologic al cistitei hemoragice posttransplant, dar abordarea terapeutică a acestei complicații rămâne neschimbată, atâta timp cât nu există medicamente cu acțiune specifică anti BKV sau JCV. Incidența redusă a celorlalte infecții virale nu justifică un program de monitorizare, doar diagnostic în momentul apariției febrei sau urmărirea simptomelor sugestive pentru infecție virală.

### Mulțumiri

*Această lucrare este elaborată în cadrul Programului Operațional Sectorial pentru Dezvoltarea Resurselor Umane (POS DRU), finanțat din Fondul Social European și Guvernul României prin contractul nr. POS DRU/89/1.5/S/64153.*

### BIBLIOGRAFIE

1. **Watzinger F., Suda M., Preuner S. et al.** – Real-Time quantitative PCR assay for detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients. *J Clin Microbiol.* 2004, 42(11):5189-5198
2. **Filipovitch A.H., Weisdorf D., Pavletic S. et al.** – National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005; 11:945-956)
3. **Englund J., Feuchtiger T., Ljungman P., et al.** – Viral infections in immunocompromised patients. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011; 17(1 Suppl):S2-5.
4. **Matthes-Martin S., Lion T., Lawitschka A. et al.** – PCR screening for viral infections during allogeneic stem cell transplantation: clinical benefit and economic consideration. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2004, 104: Abstract 2240
5. **Moins-Teisserenc H., Busson H., Scieux C. et al.** – Patterns of cytomegalovirus reactivation are associated with distinct evolutive profiles of immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *JID* 2008;198: 818-826
6. **Ljungman P., Perez-Bercoff L., Jonsson J., et al.** – Risk factors for the development of cytomegalovirus disease after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2006; 91(1):78-83.
7. **Boech M., Nichols W.G., Papanicolaou G. et al.** – Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: current status, known challenge and future strategies. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003; 9:543-558
8. **Locatelli F., Percivalle E., Comoli P. et al.** – Human cytomegalovirus infection in pediatric patients given allogeneic bone marrow transplantation: role of early antiviral treatment for HCMV antigenemia on patient's outcome. *Br J Haematol* 1994;88:64-71
9. **Schmidt-Hieber M., Schwender J., Heinz W.J. et al.** – Viral encephalitis after allogeneic stem cell transplantation: a rare complication with distinct characteristic of different causative agents. *Haematol.* 2011;96(11):142
10. **Lillieri D., Gerna G., Fornara C. et al.** – Prospective simultaneous quantification of human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T-cell reconstitution in young recipients of allogeneic stem cell transplants. *Blood* 2006; 108:1406-1412
11. **Funk G.A., Steiger J., Hirsch H.H. et al.** – Rapid dynamics of polyoma virus type BK in renal transplant patients. *J Infect Dis* 2006;193:80-87
12. **Egli A., Bingell S., Bodaghi S. et al.** – Cytomegalovirus and polyomavirus BK posttransplant. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22(8):viii72-viii82
13. **Leuenberger D., Andresen P.A., Gosert R. et al.** – Human polyomavirus type I (BK virus) agnoprotein is abundantly expressed but immunologically ignored. *Clinical and vaccine immunology* 2007; 14:959-968