

Т. В. Амвросьева¹, З. Ф. Богуш¹, К. Л. Дедюля¹, Н. В. Поклонская¹,
Н. В. Минаковская², Н. П. Кирсанова², Ю. Е. Марейко²

ВЫЯВЛЕНИЕ ПОЛИОМАВИРУСОВ У ДЕТЕЙ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии
и микробиологии» Министерства здравоохранения Республики Беларусь,
лаборатория инфекций с природным резервуаром, г. Минск¹,

ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии
гематологии и иммунологии», отделение трансплантации костного мозга,
г. Минск²

Целью настоящих исследований была детекция ДНК ВК и JC вирусов в клиническом материале детей после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Опытную группу составили реципиенты ГСК в возрасте до 17 лет ($n = 32$). Объектом исследований была моча и кровь, которые анализировались методом ПЦР в режиме реального времени в динамике наблюдения за реципиентами с периодичностью 2 недели. Уровень выявления ВК вируса в моче (ВК вирурия) пациентов данной группы составил 53,1%. ВК виремия (наличие вируса в крови) была значительно ниже – 15,6%. При этом вирус начинал обнаруживаться уже в течение первого месяца после трансплантации ($18,12 \pm 12,65$). Наличие JC вируса не было зарегистрировано ни у одного из наблюдаемых детей. ВК ассоциированный геморрагический цистит отмечался у 15,6% педиатрических реципиентов ГСК.

Ключевые слова: гемопоэтические стволовые клетки, трансплантация, ВК и JC вирусная инфекция, виремия, вирурия, геморрагический цистит

**T. V. Amvrosieva, Z. F. Bogush, K. L. Dziadziulia, N. V. Paklonskaya,
N. V. Minakovskaya, N. P. Kirsanova, Y. E. Mareika**

POLYOMAVIRUS DETECTION IN CHILDREN AFTER HEMATOPOIETIC STEM CELLS TRANSPLANTATION

The aim of the presented study was to determine prevalence of BK and JC viral infections in children with hemorrhagic cystitis after hematopoietic stem cells (HSC) transplantation. Blood and urine samples were collected every 2 weeks from children under 17 years ($n = 32$) with clinical signs of hemorrhagic cystitis. Detection of BK and JC viruses was carried out by PCR. The results showed that 53,1% of patients had BK-viruria (BK-virus was detected in urine samples), whereas BK-viremia (virus detection in blood samples) was found only in 15,6% of patients. In all of the patients initial positive results were obtained as early as in the first month after transplantation ($18,12 \pm 12,65$). Unlike BK-virus, JC-virus was not detected in any patients. BK virus-associated hemorrhagic cystitis in recipients of hematopoietic stemcell transplant was observed in 15,6% of patients.

Key words: hematopoietic stem cell, transplantation, BKV and JCV infection, viraemia, viruria, hemorrhagic cystitis.

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) является одним из эффективных методов терапии целого ряда онкологических, гематологических, иммунологических и наследственных заболеваний. Однако до настоящего времени основной проблемой избирательного обращения к трансплантации ГСК является высокая частота посттрансплантационных осложнений, не ассоциированных с течением основного заболевания, а являющихся следствием миелоаблативной терапии и посттрансплантационной иммуносупрессивной терапии. К их числу относятся инфекционные осложнения вирусной этиологии. Среди них, наряду с хорошо известными

цитомегаловирусной, Эпштейн-Барр вирусной и аденовирусной инфекциями, особый интерес заслуживает полиомавирусная инфекция (ПВИ) [7] – как менее изученная вирусная патология, но достаточно актуальная для иммунодефицитных пациентов. На сегодняшний день среди 10 описанных в научной литературе возбудителей ПВИ наибольшую значимость имеют ВК и JC вирусы. Первичное заражение этими вирусами происходит в молодом возрасте и редко приводит к развитию заболевания. Обычно инфекция переходит в латентную фазу и сопровождается персистенцией вируса в эпителиальных клетках почек и мочевыводящих путей. В условиях раз-

Оригинальные научные публикации

вития иммунодефицитного состояния, которое испытывают реципиенты ГСК, может происходить реактивация возбудителя ПВИ, наиболее частым и серьезным клиническим проявлением которой является геморрагический цистит (развивается у 10–25% реципиентов) [2, 3]. В настоящее время известен целый ряд средств этиотропной антивирусной терапии, успешно применяемых для лечения полиомавирусных геморрагических циститов: цидофовир, видарабин, рибавирин, лефлунамид, респеридон, антибиотики из группы фторхинолонов [5,6]. Кроме того, одним из широко используемых подходов снижения полиомавирусной нагрузки у пациентов с иммунодефицитом является коррекция применяемой иммуносупрессивной терапии (уменьшение доз, изменение спектра препаратов и т. д.).

Целью настоящего исследования было динамическое выявление ДНК ВК и JC вирусов в клиническом материале детей, перенесших трансплантацию ГСК, и установление вклада этих возбудителей в развитие посттрансплантационных осложнений.

Материалы и методы. Исследовано 367 образцов клинического материала (183 образца сыворотки крови и 184 образца мочи) от 32 детей – реципиентов ГСК, которые были получены из РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии.

Образцы мочи перед выделением нуклеиновых кислот разводили транспортной средой для проб клинического материала в соотношении 1:1 («Амплисенс», Россия).

Образцы цельной крови инкубировали 1 ч при температуре 37 °С, затем центрифугировали при 1500 об/мин в течение 10 мин, после чего отбирали сыворотку.

Для выделения вирусных нуклеиновых кислот из образцов сывороток крови и мочи применяли коммерческие наборы «РИБОпреп» («Амплисенс», Россия).

Детекцию ДНК ВК и JC вирусов осуществляли с помощью ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов реакции в режиме реального времени. Использовали реакционную смесь, содержащую 10х буфер для Taq-полимеразы, 6 mM MgCl₂, смесь дезоксинуклеотидов 200 мкмоль, 2,5 ед. Taq-полимеразы («PrimeTech», Беларусь), по 15 pmol прямого (PM2+) и обратного (PM2-) праймеров, по 10 pmol гибридизационных зондов (VKVp – FAM и JCVp – ROX) [4], синтезированных фирмой Sintol (Россия). В качестве положительного контроля для ПЦР детекции ДНК ВК вируса использовали плазмиду pUC18/VK в концентрации 7,6510³ копий/мл, для ПЦР детекции ДНК JC вируса – плазмиду pUC18/JC в концентрации 1 × 10⁴ копий/мл. В качестве отрицательного контроля – TE-буфер.

Температурный и временной профиль реакции: 45 циклов денатурации (95 °С в течение 15 секунд) и объединенной стадии отжига-элонгации (55 °С в течение 40 секунд).

Постановку ПЦР в реальном времени осуществляли на амплификаторах RotorGene 3000 и 6000 (Corbett Life Sciences, Австралия) и CFX 96 Real-Time System (Bio-Rad, США).

Результаты и обсуждение. Из 32 обследованных реципиентов ГСК с клиническими диагнозами острый лимфоидный лейкоз (9 пациентов), острый миелоидный лейкоз (8), апластическая анемия (8), миелодиспластический синдром (3), тяжелая комбинированная иммунная недостаточность (2), лимфома Ходжкина (1), тромбоцитопения (1) доля пациентов, у которых была зарегистриро-

вана реактивация полиомавируса (определяемая по наличию полиомавирусной ДНК в сыворотке крови (виремия) и/или моче (вирурия) хотя бы однократно за весь период наблюдения), составила 53,1% (17/32). При этом у 12 позитивных реципиентов имела место только ВК вирурия (37,5%, 12/32), у 5 – ВК вирурия + ВК виремия (15,6%, 5/32). ДНК JC вируса не было выявлено ни в одном из всех исследованных образцов.

Изучение кинетики ВК вирусной инфекции у реципиентов ГСК в течение 1 года после трансплантации осуществляли по следующей схеме: до 3 месяцев – с интервалом в 2 недели (на 4-е, 14-е сутки, через 1, полтора, 2, два с половиной и 3 месяца), с 3 месяцев и до 1 года – с интервалом в 3 месяца (6, 9, 12 месяцев). До пересадки органа образцы крови и мочи отбирали однократно. По результатам проведенного обследования первичная реактивация ВК вирусной инфекции возникала в посттрансплантационном периоде в достаточно короткие сроки (рис. 1) – в подавляющем большинстве случаев в течение первого месяца после операции (на 14-е сутки – у 34,4% (12/32), спустя 1 месяц – 9,4% (3/32)). В среднем первичное выявление ВК вирурии регистрировалось на 18,12 ± 12,65 сутки после трансплантации. Выявление ВК виремии отмечалось с опозданием на 1–3 недели после регистрации ВК вирурии.

Первые случаи ВК вирурии и/или виремии были зарегистрированы уже на 4 день после пересадки ГСК (у 6,3% – 2/32) – рис. 2. При этом максимальная доля пациентов, у которых имела место активная ПВИ, регистрировалась в период с 2 недель (37,5% – 12/32) до 1 месяца (31,3% – 10/32) после трансплантации. Затем доля пациентов с активной ПВИ снижалась. В период 1,5–3 месяца инфекция выходила на плато и регистрировалась в пределах 12,5–18,8% с последующим постепенным снижением (до 3,1%) вплоть до 1 года с начала наблюдений. Из 17 позитивных детей у 11,8% (2/17) пациентов она была транзитной (вирурия при повторных исследованиях не выявлялась), у 64,7% (11/17) пациентов вирурия отмечалась больше месяца, у 17,6% (3/17) пациентов она

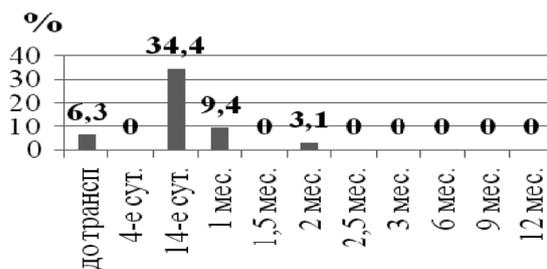


Рис. 1. Динамика первичной реактивации ПВИ у реципиентов педиатрической группы

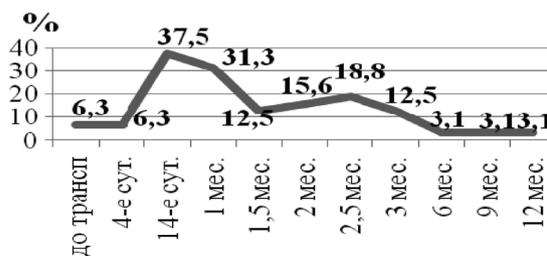


Рис. 2. Кинетика ПВИ у детей в течение 1 года после трансплантации

сохранялась до 3-х месяцев и более, у 5,9% (1/17) пациентов – в течение 1 года после пересадки.

У всех пациентов с выявленной ВК вирусией и вирусемией были установлены уровни вирусной нагрузки (определение количества ДНК вируса (копий/мл) методом количественной ПЦР). По современным представлениям диагностически значимой является вирусная нагрузка в моче, превышающая 10^7 копий/мл, а также в сыворотке крови, превышающая 10^4 копий/мл [1]. В наших исследованиях у большинства реципиентов с ВК вирусией (13/17, 72,5%) регистрировались подпороговые значения уровней вирусной нагрузки в моче и лишь у 4 пациентов (27,5%) степень репликации ВК вируса была выше и колебалась в пределах от $1,21 \times 10^7$ копий/мл до $3,71 \times 10^7$ копий/мл. Из 5 позитивных на ВК вирусемии пациентов в 20,0% случаев (1/5) значение вирусной нагрузки превышало пороговое и составило $1,92 \times 10^4$ копий/мл.

При анализе полученных результатов на предмет ассоциации активной ВК вирусной инфекции с развитием посттрансплантационных патологий мочевыводящей системы установлено, что из 10 реципиентов ГСК с клиническими диагнозами «геморрагический цистит» и «асимптоматическая гематурия» у 8 – регистрировалась ВК вирусемия и/или ВК вирусия. У 4 из 5 пациентов с геморрагическим циститом отмечалась ВК вирусия + ВК вирусемия, у одного пациента – только ВК вирусия. При этом у всех пациентов с установленными пороговыми значениями вирусной нагрузки в крови и моче имели место клинические проявления геморрагического цистита или гематурии. У 3 пациентов с гематурией регистрировалась ВК вирусия с подпороговыми значениями репликации ВК вируса.

В целом развитие ассоциированной с ВК вирусом посттрансплантационной патологии мочевыводящей системы в группе педиатрических реципиентов ГСК отмечалось у 25% обследованных (8/32), в том числе геморрагического цистита – у 15,6% (5/32).

Таким образом, полученные результаты указывают на участие ВК вируса в развитии геморрагического цис-

тита у детей – реципиентов ГСК и диктуют необходимость их обследования на предмет выявления возбудителей ПВИ инфекции, начиная с самых ранних этапов посттрансплантационного периода.

Литература

1. Горбатенко, Е. В., Момыналиев К. Т., Грибанов О. Г., Бабенко Н. Н., Каабак М. М. / Полиомавирус (BKV) у реципиентов с трансплантационной почкой // Нефропатия и диализ. – 2010. – Т. 12, № 3. – С. 164–173

2. Bedi, A., Miller C. B., Hanson J. L., Goodman S., Ambinder R., Charache P., Arthur R. R., Jones R. J. / Association of BK virus with failure of prophylaxis against hemorrhagic cystitis following bone marrow transplantation // J. Clin Oncol. – 1995. – Vol. 13. – P. 1103–1109.

3. Bogdanovic, G., Priftakis P., Giraud G., Kuzniar M., Ferral-deschi R., Kokhaei P. [et al.] / Association between a high BK virus load in urine samples of patients with graft-versus-host disease and development of hemorrhagic cystitis after hematopoietic stem cell transplantation // J. Clin Microbiol. – 2004. – Vol. 42. – P. 5394–5396.

4. Bárcena-Panero, A., Echevarría J. E., Romero-Gómez M. P., Royuela E., Castellanos A., González I., Fedele G. / Development and validation with clinical samples of internally controlled multiplex real-time PCR for diagnosis of BKV and JCV infection in associated pathologies // Comparative immunology, microbiology and infectious diseases. – 2012. – Vol. 35, № 2. – P. 173–179.

5. Jung, Y. H., Moon K. C., Ha J. W., Kim S. J., Ha I. S., Cheong H. I., Kang H. G. / Leflunomide therapy for BK virus allograft nephropathy after pediatric kidney transplantation // Pediatr Transplant. – 2013. – Vol. 17, № 2. – P.50–54.

6. Savona, M. R., Newton D., Frame D., Levine J. E., Mineishi S., Kaul D. R. / Low-dose cidofovir treatment of BK virus-associated hemorrhagic cystitis in recipients of hematopoietic stemcell transplant // Bone Marrow Transplant. – 2007. – Vol. 39. – P. 783–787.

7. Tomblyn, M., Chiller T., Einsele H., Gress R., Sepkowitz K., Storek J., Wingard J. R., Young J. A., Boeckh M. J. / Guidelines for Preventing Infectious Complications among Hematopoietic Cell Transplantation Recipients: Global Perspective // Biol. Blood Marrow Transplant. – 2009. – Vol. 15. – P. 1143–1238.