

Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

**Infekce DNA viry u pacientů po alogenní  
transplantaci kostní dřeně.**

MUDr. Petr Hubáček

Disertační práce

2008

## Obsah:

|  |     |
|--|-----|
| Poděkování .....   | 3   |
| Seznam zkratk.....                                       | 4   |
| 1. Úvod .....  | 9   |
| 1.1. Transplantace hematopoetických kmenových buněk..... | 9   |
| 1.1.1. Autologní transplantace.....                      | 10  |
| 1.1.2. Alogenní transplantace .....                      | 10  |
| 2. Komplikace HSCT.....                                  | 12  |
| 2.1. Obecné .....  | 12  |
| 2.2. Relaps základního onemocnění.....                   | 13  |
| 2.3. Reakce štěpu proti hostiteli (GvHD).....            | 14  |
| 2.3.1. Akutní GvHD .....                                 | 14  |
| 2.3.2. Chronická GvHD.....                               | 15  |
| 2.4. Infekční komplikace.....                            | 17  |
| 2.4.1. Bakteriální a mykotické komplikace .....          | 18  |
| 3. Virové komplikace.....                                | 19  |
| 3.1. Detekce virových infekcí .....                      | 20  |
| 3.2. Terapie virových infekcí .....                      | 22  |
| 3.2.1. Acyklovir.....                                    | 22  |
| 3.2.2. Valacyklovir .....                                | 24  |
| 3.2.3. Ganciklovir.....                                  | 24  |
| 3.2.4. Valganciklovir.....                               | 25  |
| 3.2.5. Foscarnet .....                                   | 26  |
| 3.2.6. Cidofovir .....                                   | 27  |
| 3.2.7. Maribavir.....                                    | 27  |
| 4. DNA viry detekované po HSCT .....                     | 29  |
| 4.1. Herpesviridae .....                                 | 29  |
| 4.1.1. $\alpha$ - (alfa) - Herpesvirinae .....           | 31  |
| 4.1.2. $\beta$ - (Beta) - Herpesvirinae.....             | 33  |
| 4.1.3. $\gamma$ - (Gama) - Herpesvirinae.....            | 37  |
| 4.2. Adenoviry .....                                     | 40  |
| 4.3. Polyomaviry .....                                   | 42  |
| 5. Cíl práce.....  | 43  |
| 6. Metody.....   | 44  |
| 7. Výsledky.....   | 46  |
| 8. Reaktivace $\alpha$ -herpesvirů .....                 | 48  |
| 9. Detekce $\beta$ -herpesvirů.....                      | 50  |
| 9.1. CMV .....   | 50  |
| 9.2. HHV-6.....  | 73  |
| 9.3. HHV-7.....  | 106 |
| 10. Detekce $\gamma$ -herpesvirů – EBV .....             | 108 |
| 11. Adenoviry.....                                       | 123 |
| 12. Polyomaviry - BKV .....                              | 132 |
| 13. Závěr.....   | 134 |
| Reference:.....  | 135 |

## Poděkování

Chtěl bych poděkovat prof. MUDr. Petru Goetzovi, CSc. a MUDr. Ondřeji Cinkovi, Ph.D. za podporu a pomoc při řešení detekce DNA virových infekcí u pacientů po alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk. Dále laborantkám Bc. Aleně Hrdličkové, slečně Kateřině Hynčicové a slečně Soně Voslářové za pečlivost, se kterou tuto detekci prováděly a provádějí. Docentu MUDr. Petr Sedláčkovi, CSc., který byl mým konzultatem, stejně jako MUDr. Petře Keslové, MUDr. Renatě Formánkové, Ph.D. a všem dalším lékařům a sestřičkám transplantační jednotky Kliniky dětské hematologie a onkologie 2. lékařské fakulty a FN Motol za trpělivost a pomoc při náběrech a sledování klinického korelátu těchto infekcí. Zároveň bych chtěl poděkovat prof. MUDr. Janu Starému, DrSc. za podporu, bez níž bych zřejmě neměl dostatek času pro sledování těchto pacientů a tak bych se ke mnoha zajímavým a následně i publikovaným případům vůbec nedostal. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat své snoubence slečně Stanislavě Kolouchové za trpělivost, podporu a laskavost, se kterou přijímá mé pracovní vytížení a hodiny strávené při psaní u počítače.

## Seznam zkratek:

- ADA – adenosine deaminase deficienty, deficit adenosindeaminázy – jeden z druhů primárního imunodeficitu
- ALG – anti-lymfocytární globulin
- ALL – akutní lymfoblastická leukémie
- ALT – alanine aminotransferase, alanin aminotransferáza
- AML – akutní myeloidní leukémie
- ARDS – Acute Respiratory Distress Syndrome. Syndrom akutní dechové tísně
- AST – aspartate aminotransferase, aspartát aminotransferáza
- ATG – anti-thymocytární globulin
- Bcl-2 – B-cell CLL/lymphoma 2, protein zvyšující permeabilitu mitochondriální membrány a tak působící anti-apoptoticky
- BCR – B Cell Receptor, B buněčný receptor
- BHRF-1 – virový homolog bcl-2 EBV
- BKV – polyoma BK virus
- BM – Bone Marrow, kostní dřeň
- CB – Cord Blood, pupečnicková krev
- CCR-2 – 2. receptor  $\beta$ -chemokinů
- CD – Cluster of differentiation, diferenciační antigeny
- CD154 – CD40L, kostimulační protein B lymfocytů, aktivující B lymfocyty interakce s CD40 na antigen prezentujících buňkách
- CD21 – CR2, komplementový receptor 2
- CD4+ – buňky nesoucí CD4 znak, pomocné T lymfocyty
- CD40 – kostimulační protein antigen prezentujících buněk, aktivující B lymfocyty pomocí  
CD40L=CD154
- CD40L – kostimulační protein B lymfocytů, aktivující B lymfocyty interakce s CD40 na antigen prezentujících buňkách, CD154
- CD46 – buněčný vazebný protein HHV-6, inhibiční komplementový receptor



|         |  |
|---------|--|
| CD8+    | – buňky nesoucí CD8 znak, cytotoxické T lymfocyty  |
| CML     | – chronická myeloidní leukémie   |
| CMV     | – cytomegalovirus  |
| CNS     | – centrální nervový systém   |
| CR2     | – komplementový receptor 2, CD21   |
| CsA     | – cyklosporin A, imunosupresivum   |
| CXC     | – $\alpha$ -chemokiny  |
| CXCR    | – receptor $\alpha$ -chemokinů   |
| DIC     | – Disseminated Intravascular Coagulation, diseminovaná intravasculární koagulace                                 |
| DLI     | – Donor Lymphocyte Infusion, infúze rádcovských lymfocytů  |
| DNA     | – Deoxyribonucleic Acid, deoxyribonukleová kyselina  |
| ds      | – double strand, dvojitá DNA   |
| EBER    | – Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNAs, malé RNA kódované EBV   |
| EBMT    | – European group for Blood and Marrow Transplantation, Evropská společnost pro transplantace krve a kostní dřeně |
| EBV     | – Epstein-Barr Virus, virus Epsteina a Barrové   |
| EBV-LPD | – EBV associated lymphoproliferation, EBV asociovaná lymfoproliferace  |
| EHV-1   | – Equine herpesvirus, koňský herpesvirus 1   |
| EHV-2   | – Equine herpesvirus, koňský herpesvirus 2   |
| EKG     | – elektrokardiogram  |
| FD      | – Family Donor, rodinný dárce  |
| FISH    | – Fluorescent In Situ Hybridisation, fluorescenční hybridizace in situ   |
| FN      | – fakultní nemocnice   |
| G-      | – Gram negativní, bakterie nereagující na barvení podle Grama  |
| G+      | – Gram pozitivní, bakterie pozitivně reagující na barvení podle Grama  |
| GCV     | – ganciklovir  |
| GGT     | – Gamma Glutamyl Transferase, gamma glutamyl transferáza   |
| GIT     | – gastrointestinální trakt   |
| GvHD    | – Graft versus Host Disease, nemoc štěpu proti hostiteli   |

GvL – Graft versus Leukaemia, reakce štěpu proti leukémii

HCMV – Human Cytomegalovirus, lidský cytomegalovirus

HHV – Human Herpesvirus, lidský herpesvirus

HHV-6 – Human Herpesvirus – 6, šestý lidský herpesvirus

HHV-7 – Human Herpesvirus – 7, sedmý lidský herpesvirus

HHV-8 – Human Herpesvirus – 8, osmý lidský herpesvirus

HIV – Human Immunodeficiency Virus, virus lidského imunodeficitu

HLA – Human Leukocyte Antigen, antigen lidských leukocytů, imunologicky také MHC

HSCT – Haematopoietic stem cell transplantation, transplantace hematopoetických kmenových buněk

HSV – Herpes Simplex Virus

HSV-1 – Herpes Simplex Virus-1

HSV-2 – Herpes Simplex Virus-2

HVS – Herpes virus saimiri, opičí herpesvirus

IL – interleukin

IL-10 – interleukin 10, růstový faktor B lymfocytů

IL-12 – interleukin 12, prozánětlivý cytokin

IL-2 – interleukin 2, růstový faktor lymfocytů

INF- $\gamma$  – interferon gamma, prozánětlivý cytokin

IRF-3 – Interferon Regulatory Factor 3, regulační faktor interferonu 3

KDHO – Klinika dětské hematologie a onkologie

KI – polyoma KI virus

KSHV – Kaposhi Sarcoma Herpesvirus, virus Kaposiho sarkomu, HHV-8

LDH – Lactate dehydrogenase, laktát dehydrogenáza

LF – lékařská fakulta

LMP-1 – Latent Membrane Protein, latentní membránový protein 1 EBV, stimulační dráha  
CD40/CD40L

MDS – myelodysplastický syndrom

MHC – Major histocompatibility komplex, hlavní histokompatibilní komplex

MMF – mykofenolát mofetil, imunosupresivum

- MMUD – Mismatched Unrelated Donor, neshodný nepříbuzenský dárce
- MOF – Multiorgan Failure, multiorgánové selhání
- MSD – Matched Sibling Donor, shodný sourozenecký dárce
- MUD – Matched Unrelated Donor, shodný nepříbuzenský dárce
- NFκB – Nuclear Factor κB, jaderný faktor κB zapojený často do imunitních reakcí
- NK – Natural Killer, „přirození zabíječi“, cytotoxické lymfocyty ničící buňky s nízkou, či žádnou expresí MHC I. třídy
- PBSC – Peripheral Blood Stem Cells, periferní kmenové buňky
- PCR – Polymerase Chain Reaction, polymerázová řetězová reakce
- PET – pozitronová emisní tomografie
- PRV – Pseudorabies virus, suid herpesvirus-1 (SHV-1), Aujeszky's disease virus, prasečí herpesvirus, virus Aujeszkovy nemoci
- RNA – Ribonucleic Acid, ribonukleová kyselina
- RQ-PCR – Real time Quantitative PCR, kvantitativní PCR v reálném čase
- RT-PCR – Reverse transcription PCR, reverzně transkriptázové PCR
- SAA – severe aplastic anaemia, těžká aplastická anémie
- SCID – severe combined immunodeficiency, těžký kombinovaný imunodeficit
- SV40 – simian virus 40, opičí polyoma virus 40
- Th2 – směr imunitní odpovědi směrem k odpovědi protilátkové
- TK – thymidine dinase, tymidinkináza
- TLR-4 – Toll Like Receptor, receptor vážící lipopolysacharid G- bakterií a tím aktivující imunitní buňky
- TRADD – TNF Receptor Associated Death Domain, TNF receptor asociovaný se smrtící doménou spouštěcí apoptotickou kaskádu
- TRAF – TNF Receptor Associated Family, rodina proteinů asociovaných s TNF receptorem
- UD – Unrelated Donor, nepříbuzenský dárce
- ÚHKT – Ústav hematologie a krevní transfúze
- UK – Univerzita Karlova
- UL146 – CMV gen kódující virový homolog CXC chemokinů

- UL147 – CMV gen kódující virový homolog CXC chemokinů
- UL54 – gen kódující CMV polymerázu
- UL97 – gen kódující CMV tymidinkinázu
- vCXCL – virový ligand  $\alpha$ -chemokinů
- VGCV – valganciklovir
- VZV – Varicella-Zoster Virus
- WAS – Wiscott-Aldrichův syndrom
- WHO – World Health Organization, Světová zdravotnická organizace
- WU – polyoma WU virus

## 1. Úvod

Transplantace kostní dřeně, v současnosti spíše nazývaná transplantací hematopoetických kmenových buněk, je komplexní terapeutický proces se spoustou komplikací, které se vzájemně ať přímo, či nepřímo v rámci terapie a jejích účinků ovlivňují. Proto je k pochopení biologie virových komplikací nutné alespoň ve zkratce zmínit jak tyto komplikace, tak vztahy mezi nimi.

### 1.1. Transplantace hematopoetických kmenových buněk

Jedním z léčebných postupů používaných u refrakterních hematologických a metabolických onemocnění se od šedesátých let 20. století stala transplantace kostní dřeně. Zárodečné buňky hematopoetické tkáně poprvé rozpoznány ve slezině a posléze kostní dřeni<sup>1-3</sup>. Tyto buňky byly následně, s odstupem mnoha let, charakterizované přítomností CD34 molekuly<sup>4-6</sup>.

K první úspěšné transplantaci kostní dřeně došlo u dětí s imunodeficitem současně v Evropě i ve Spojených státech amerických v roce 1968<sup>7</sup>. S postupem doby se mimo kostní dřeně podařilo tyto buňky najít také v periferní krvi a v pupečnickové krvi a byly provedeny úspěšné HSCT<sup>8-11</sup>. Později se podařilo vyvinout postupy, které v periferní krvi zvýšily koncentraci CD34 pozitivních buněk<sup>12</sup>, což vedlo k častějšímu používání tohoto typu štěpů, zejména u dospělých pacientů, kterých je jinak obtížné dosáhnout dostatečné kvality štěpu<sup>10,13</sup>.

Proto došlo v pozdější době k přejmenování transplantace kostní dřeně na transplantaci hematopoetických kmenových buněk (HSCT). Při tom se člověk, který je pro transplantaci zdrojem CD34 pozitivních buněk, nazývá dárce (donor-D) a pacient, jemuž budou zárodečné buňky podány, se nazývá příjemce (recipient-R). Podle toho, zda je zdrojem CD34 pozitivních buněk pro HSCT organismus příjemce, nebo organismus jiného člověka, se HSCT v základě dělí na autologní a alogenní.

### 1.1.1. Autologní transplantace

Je indikovaná především v případě solidních nádorových onemocnění, kdy je pro léčbu velmi rezistentního či relabujícího onemocnění, použita vysoko dávkovaná chemoterapie (megaterapie)<sup>14,15</sup>, která vede k zničení zárodečných buněk v kostní dřeni pacienta. To by pro nemocného bez následného podání hematopoetických zárodečných buněk znamenalo trvalou aplázii kostní dřenež bez tvorby všech krevních řad – erytrocytární, granulocytární, lymfocytární i trombocytární a tak následnou nevyhnutelnou smrt z důvodu anémie, krvácení či infekčních komplikací. Proto je pacientovi ještě před podáním vysoko dávkované chemoterapie odebrán zpravidla z periferní krve štěp obsahující dostatečné množství hematopoetických zárodečných buněk. Po megaterapii je pacient tímto štěpem transplantován. Po přibližně dvou týdnech dojde k jejich přihojení zárodečných buněk ze štěpu (engraftment), jako první známce obnovení chemoterapií zničené hematopoézy. Přihojením pak většina komplikací při autologní transplantaci končí, neboť ty jsou dané především aplázií kostní dřenež. Typickými indikacemi k autologní HSCT jsou například Ewingův sarkom, refrakterní Hodgkinova choroba, či neuroblastomy<sup>16-19</sup>.

### 1.1.2. Alogenní transplantace

Je HSCT, kdy jsou dárce a příjemcem dvě různé osoby. Protože dárce je zdravá osoba, lze zpravidla těžce poškozenou krevetvorbu příjemce, nahradit zdravou krevetvorbou dárce a tak pacienta vyléčit.

Indikací k alogenní HSCT jsou zpravidla maligní nádorová onemocnění (např. ALL, AML, CML, MDS a další)<sup>20-22</sup>, nicméně transplantace je také využívána k léčbě nenádorových onemocnění ať již hematologických jako je např. refrakterní těžká plastická anémie (SAA)<sup>23</sup>, či metabolických onemocnění (např. mukopolysacharidózy či jiná střádavá onemocnění)<sup>24</sup>. Stejně tak je alogenní HSCT využívána při léčbě geneticky podmíněných imunodeficitů jako jsou např. těžký kombinovaný imunodeficit – Severe combined immunodeficiency - SCID, Wiskott-Aldrichův syndrom – WAS, deficit adenosindeaminázy – ADA a další<sup>25-27</sup>.

Dárci jsou vybíráni na základě shody HLA molekul dárce a příjemce<sup>28,29</sup>. V minulosti se tato shoda testovala především pomocí sérologických metod. V současnosti je však vždy shoda testována na úrovni DNA. Standardem je testovat haplotypy HLA u dárce a příjemce v lokusech A, B, Cw u HLA I. třídy a DRB1 a DQB1 u HLA II. třídy. Protože dopad neshody v jednotlivých lokusech není stejný, lze vybrat i neshodného dárce, který je stále vhodný k HSCT<sup>28</sup>. Podle shody se tedy dárci dělí na shodné (matched-M) a neshodné (mismatched-MM). V případě neshodného dárce, ale počet i tíže komplikací v souvislosti s HSCT rostou.

První hledání je vždy zahájeno mezi rodinnými příslušníky pacienta, zejména sourozenci. Transplantace od HLA shodného sourozence (matched sibling donor – MSD) je zatížena menším počtem komplikací a také dárce je znovu snadno k dispozici v případě nutnosti retransplantace. Pokud je hledání v rodině neúspěšné, pak se zahajuje hledání v mezinárodních registrech dárců podle HLA a umožňuje-li to shoda, je následně vybrán dárce nepříbuzný (unrelated donor - UD), který může být buď shodný (MUD) nebo neshodný (MMUD).

Hematopoetické zárodečné buňky v současnosti získáváme třemi způsoby. První možností získání je kostní dřeň (Bone marrow- BM) odebraná z kyčelních kostí dárce. Druhou je pak periferní krev, ve které se po stimulaci objevují z kostní dřeně vyplavené CD34 pozitivní buňky a lze jí tedy použít k následné separaci štěpu bohatého na tyto buňky, tedy periferní kmenové buňky (PBSC). Posledním zdrojem CD34 pozitivních buněk je pupečnicková krev (cord blood – CB). Samotný zdroj zárodečných buněk pak ovlivňuje vlastnosti štěpu jako je například počet dní do přihojení štěpu v jaderných buňkách (nejméně BM, pak PBSC a pak CB).

Další vlastností, která je ovlivněna typem štěpu, je rychlost rekonstituce imunity. Ta je ovlivněná přítomností plně maturovaných a již patogen specifických paměťových lymfocytů ve štěpu. Nejkratší je u PBSC, delší u BM a nejdelší u CB<sup>30</sup>. První známky rekonstituce specifické imunity u PBSC se objevují přibližně 3-4 měsíce po HSCT. V případě CB se pak rekonstituce specifické imunity objevuje 6-7 měsíců po HSCT. I to má samozřejmě vliv na komplikace po HSCT, včetně infekčních, virových<sup>31</sup>.

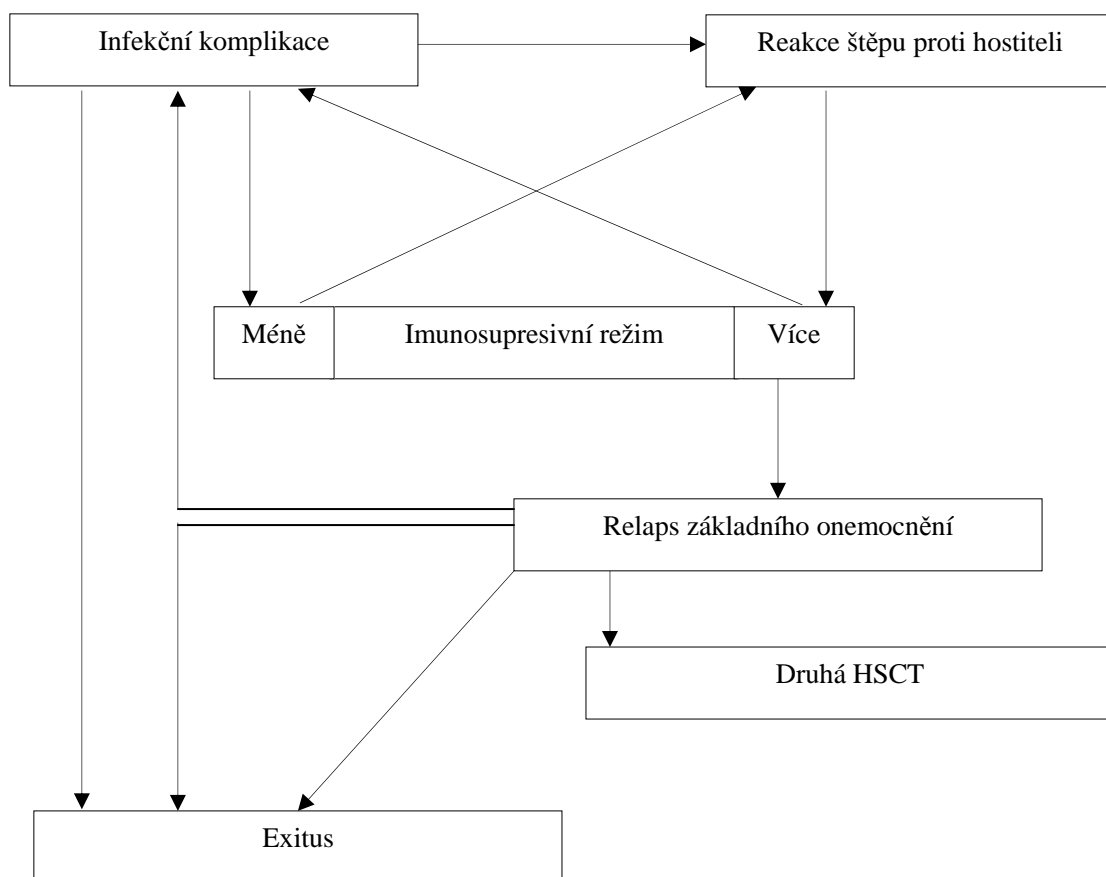
## 2. Komplikace HSCT

### 2.1. Obecné

Mezi základní komplikace alogenní transplantace patří infekční komplikace<sup>32</sup>, reakce štěpu proti hostiteli (GvHD)<sup>33,34</sup> a relaps základního onemocnění<sup>35</sup>. Tyto tři skupiny komplikací jsou pak navzájem spojeny prostřednictvím výše intenzity imunosupresivního režimu. Jejich vzájemné vztahy jsou pak shrnuty v obrázku 1.

Obrázek 1.

Vztah komplikací u alogenní HSCT.



Lze zkonstatovat, že přítomnost infekčních komplikací – ať již bakteriálních, virových, či mykotických je spojena s destrukcí tkáně příjemce a tedy odhalením neshodných antigenů dárce a příjemce. Rozpoznání antigenů, ve kterých se liší dárce a příjemce, pak vede k rozvoji reakce štěpu proti hostiteli s další destrukcí



tkání příjemce. To vede k terapeutického zvýšení imunopresivní terapie. V první fázi tedy k nasazení kortikoidních léků, které v krátkém čase přivedou pacienta do obrazu periferní lymfopenie. Tím dojde ke snížení reakce schopnosti imunitního systému a tak k potenciálnímu rozvoji dalších infekčních komplikací.

Na druhou stranu je ale jistá reakce štěpu proti hostiteli prokázána jako potenciálně prospěšná pro pacienta z hlediska nižších frekvencí relapsů základního onemocnění (zejména např. u AML)<sup>35-37</sup>. Proto se ve vztahu HSCT a jejích komplikací jedná o velmi delikátní rovnováhu, kterou je třeba co nejdéle držet vybalancovanou. V případě rozvoje pokročilých stádií těchto základních komplikací jsou pak kroky vedoucí k udržení pacienta naživu obrovským rizikem pro rozvoj komplikací z jiné skupiny. Navíc v kombinaci s limitem interakcí jednotlivých léků a jejich toxicity.

## 2.2. Relaps základního onemocnění

O relapsu základního onemocnění po HSCT hovoříme v souvislosti s maligními onemocněními. Obecně vzato můžeme u hematologických pacientů pozorovat relaps onemocnění hematologický a molekulárně biologický.

V případě molekulárně biologického relapsu se pak jedná o časnou detekci počínajícího relapsu pomocí molekulárně biologických metod<sup>38</sup>. Ke zvládnutí tohoto typu relapsu po HSCT lze využít reakci štěpu proti hostiteli (GvHD), která v sobě obsahuje také reakci štěpu proti leukémii (Graft versus Leukaemia – GvL). Proto jsou okamžitě vysazeny veškeré imunopresivní léky. Současně se pokoušíme pacientovi podat infuzi dárcovských lymfocytů (Donor Lymphocyte Infusion – DLI), které by měly vyvolat GvHD včetně požadované GvL reakce<sup>36,37,39</sup>. Většina v současnosti diagnostikovaných potransplantačních relapsů je detekována na úrovni molekulárně biologického relapsu.

O hematologický relaps se jedná při výskytu více jak 5% maligních buněk v nátěru získaném při punkci kostní dřeně. V tomto případě je pacient často indikován k chemoterapii pro zvládnutí tohoto znovu objeveného maligního bujení. Podle stavu a agresivity nemoci je pak potenciálně pacient indikován k druhé HSCT, případně k pouze k paliativní chemoterapii.

## 2.3. Reakce štěpu proti hostiteli (GvHD)

Reakce štěpu proti hostiteli je reakcí imunitního systému dárce na odlišné antigeny příjemce. Stimulace dárcovských lymfocytů antigeny příjemce pak vede k více či méně bouřlivé imunitní reakci, vedoucí k destrukci tkání, poškození funkce orgánů (např. jaterní GvHD), dehydrataci a zhoršení nutrice (střevní GvHD), krvácení (střevní GvHD) a tak může vést v rozvinutém stavu k úmrtí pacienta. Z pohledu výskytu po HSCT, závažnosti reakce a jejího trvání pak rozlišujeme reakci akutní<sup>40</sup> a chronickou<sup>41</sup>.

### 2.3.1. Akutní GvHD

Akutní GvHD je reakce, která se objeví v prvních sto dnech po HSCT. Podle poškození různých orgánových systémů, jejich závažnosti a tak ohrožení pacienta se dělí do čtyř stupňů (Grade) I-IV. Zatímco v případě Grade I se jedná výlučně o kožní GvHD a k terapii lze použít například i samotné lokální podávání kortikoidů ve formě masti, v případě GvHD Grade IV se pak jedná o velmi závažné život ohrožující onemocnění s postižením nejčastěji jater, střev a kůže. Postižení jater má závažný vliv na celkový stav pacienta ve smyslu špatné metabolizace léků, detoxifikace metabolitů, zhoršení koagulačních parametrů, postižení střevní sliznice je pak zdrojem úporných průjmů s dehydratací organismu, krvácením a zároveň možným místem vstupu bakteriální infekce do krevního oběhu. Proto je k terapii GvHD Grade IV používána velmi silná imunosupresivní terapie jako například antithymocytární globulin s následnou prolongovanou imunosupresí a následnou periferní lymfocytární deplecí<sup>42</sup>. Bohužel ani s použitím razantní terapie se takto rozvinutou GvHD často nedaří zvládnout a pacient umírá pod obrazem multiorgánového selhání ať již ve spojení pouze s GvHD či s možnou infekční komplikací např. ve smyslu sepse.

Základní rozdělení a příznaky GvHD jsou obsaženy v Tabulce 1. a 2 (podle EBMT Handbook – Haematopoietic Stem Cell Transplantation<sup>43</sup>).

Tabulka 1.

| Stage | Kůže (vyrážka)                              | Játra (hladina bilirubinu)  | GIT (průjem)                          |
|-------|---|-----------------------------|---------------------------------------|
| 1     | < 25% povrchu těla                          | 34-50 $\mu\text{mol/L}$     | > 500 mL                              |
| 2     | 25 – 50% povrchu těla                       | 51-102 $\mu\text{mol/L}$    | > 1000 mL                             |
| 3     | Generalizovaný erytém                       | 103 – 255 $\mu\text{mol/L}$ | > 1500 mL                             |
| 4     | Generalizovaný erytém s bulami a deskvamací | > 255 $\mu\text{mol/L}$     | Vážné abdominální bolesti bez/s ileem |

Tabulka 2.

| Grade akutní GvHD | Kůže                  | Játra                     | GIT         |
|-------------------|-----------------------|---------------------------|-------------|
| I                 | Stage 1 – 2           | 0                         | 0           |
| II                | Stage 3 <i>nebo</i>   | Stage 1 <i>nebo</i>       | Stage 1     |
| III               | Stage 3 <i>a/nebo</i> | Stage 2 – 3 <i>a/nebo</i> | Stage 2 – 4 |
| IV                | Stage 4 <i>a/nebo</i> | Stage 4 <i>a/nebo</i>     | Stage 2 – 4 |

### 2.3.2. Chronická GvHD

Chronickou GvHD se rozumí reakce štěpu proti hostiteli, která reaguje hůře na nasazené immunosupresivní léky a trvá, či se objeví se po dni 100. V současné době jde o nejčastější důvod komplikací spojených s pozdním úmrtím po HSCT v situaci bez relapsu základního onemocnění.

Historicky se dělila na limitovanou a extenzivní. V současnosti chronickou GvHD dělí klasifikace NIH (National Institute of Health, Bethesda, USA) podle poškození orgánů na lehkou, středně těžkou a těžkou formu<sup>44</sup>. Z pohledu immunosupresivní terapie, která má vliv na protiinfekční imunitu, se však lze přidržit starší klasifikace.

Limitovaná chronická GvHD je formou reakce proti hostiteli, která je na vyšší immunosupresi úspěšně kontrolována a s časem postupně vyhasíná. Extenzivní GvHD je závažná forma reakce štěpu proti hostiteli, která má závažné mutilující účinky na daného pacienta. Často dochází k poškození plic, jater, GIT, objevují se poškození kůže s fibrotizací, alopecie, fibrotizace svalů apod.<sup>45</sup>. Proto je zpravidla k její kontrole, byť alespoň částečné, potřeba dlouhodobé podávání immunosupresivní terapie ať již ve vyšších dávkách (kortikoidy), či v kombinacích jednotlivých immunosupresivních léků. Pacienti jsou pak ohroženi zejména nežádoucími účinky spojenými s podáváním léků a zároveň infekčními komplikacemi při dlouhodobé lymfopénii – tedy především s infekcemi virovými a mykotickými<sup>46</sup>. Terapie extenzivní GvHD je pak otázkou let. Jako příklad immunosupresivní terapie můžeme uvést například následující kombinace, které jsme použili u některých našich pacientů: cyclosporin A (CsA) + kortikoidy, mykofenolát mofetil

(MMF)+kortikoidy+CsA, sirolimus+MMF+kortikoidy, tacrolimus+MMF+kortikoidy. V případě těžké GvHD lze pak k těmto kombinacím vždy přidat terapii založenou na protilátkách ať již pomocí polyclonálního antithymocytárního či antilymfocytárního globulinu (ATG, ALG), alemtuzumabu (monoklonální protilátka anti-CD52), rituximabu (monoklonální protilátka anti-CD20) či dalších<sup>47,48</sup>.

V transplantační medicíně častěji používaná imunosupresiva a jejich nežádoucí účinky jsou pak shrnuty v tabulce 3.

Tabulka 3.

| Skupina  | Generický název léku                                      | Mechanismus účinku   | Nežádoucí účinky   |
|--|---|--|--|
| Kortikoidy                                     | Např.<br>prednison,<br>metylprednisolon,<br>hydrokortison | Mechanismem účinku je inhibice rozpoznání a prezentaci antigenu, zasahují do transkripce genů kódujících různé proteiny, redukuje transkripci genů pro prozánětlivé cytokiny a tak omezují účast buněk imunitního systému v místech zánětu (ovlivňují endotelie, snižují chemotaxi). | Obecně - cushingoidní habitus, zvýšená náchylnost k infekcím, zhoršení růstové dynamiky u dětí a vliv na psychiku. Topicky pak atrofie kůže, Katarakta, akné, hirsutismus, proximální myopatie, hypertenze, žaludeční vředy, diabetes mellitus, suprese nadledvinek, aseptická nekróza, velkých kloubů (zejména kyčlí), osteoporóza, horší hojení ran. |
| Látky vážící se na imunofiliny                 | cyklosporin A (CsA)                                       | Vazba na intracelulární receptory (kalcineurin) → inhibice translokace transkripčních faktorů do jádra → inhibice dějů závislých na kalcium  | Nefropatie, hepatopatie, hypertenze, hirsutismus, encefalopatie, osteoporóza, GIT obtíže a další... nefrotoxické, způsobují hypertenzi a hyperlipidémii (více cyklosporin), hyperplasií dásní.   |
|  | tacrolimus (FK506)  | Podobný jako u CsA; 10-100x potentnější, inhibice IL-2, 3, 4, IFN-gama   | Podobný jako u CsA; větší nefrotoxicita a také diabetogenní účinky   |
| Inhibitor mTOR (mammalian target of rapamycin) | Sirolimus   | inhibují transdukcí signálů navozených vazbou IL-2,4,7,15 na T lymfocyty, zabraňují tedy transkripci genu IL-2, čímž brání jeho produkci a tak následnou proliferaci T lymfocytů   | Myelotoxicita, hyperlipidémie, GIT toxicita, pomalé hojení ran-lymfokély, akne.  |
| Purinový analog                                | mykofenolát mofetil (MMF)                                 | inhibice inosin-monofosfát dehydrogenázy, klíčového enzymu de novo syntézy purinů T a B buněk  | Myelotoxicita a GIT toxicita.  |

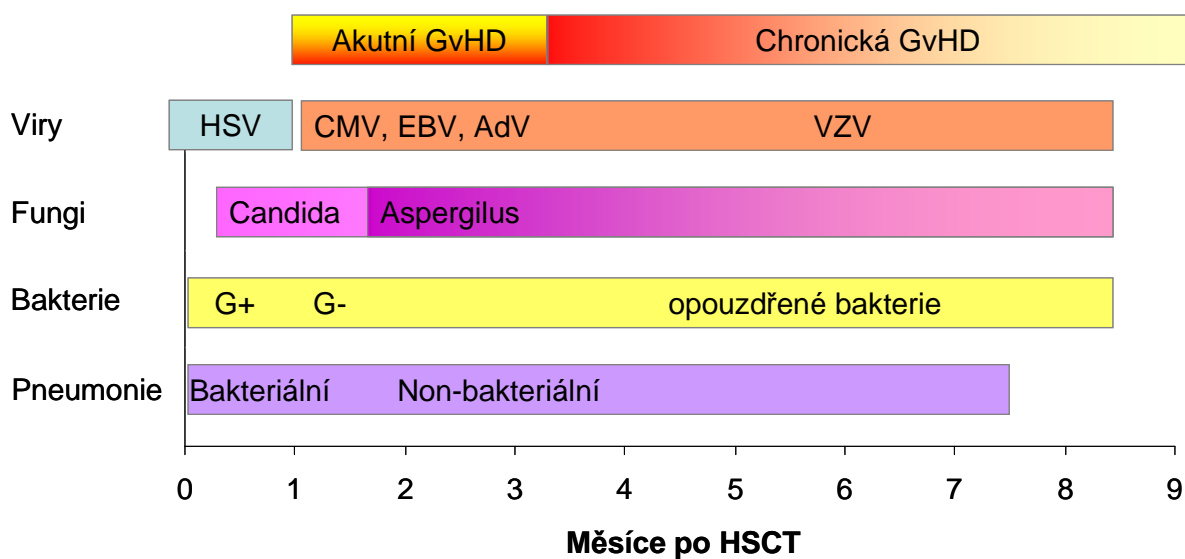
## 2.4. Infekční komplikace

Prevence a terapie infekčních komplikací je nedílnou částí péče o vysoce imunosuprimované pacienty. Jejich význam ještě stoupá u pacientů po alogenní HSCT<sup>49-53</sup>, kdy se k celku běžným bakteriálním a mykotickým infekcím pozorovaným u jakýchkoli pacientů léčených chemoterapií (spojených například s poškozením sliznic - mukositidou či s granulocytopenií) přidávají častěji také infekce virové.

Přítomnost nejčastějších infekčních komplikací a GvHD spojené s imunosupresivní terapií v čase po transplantaci je zobrazena na obrázku 2. Vedou-li infekční komplikace ke smrtelným komplikacím, jedná se zpravidla o rozvoj diseminované intravaskulární koagulace (DIC) a multiorgánového selhání (MOF – Multi Organ Failure) v případě septického stavu, či k vykrvácení při invazivní mykóze či DIC<sup>32</sup>. Často se také infekce s poškozením tkání podílejí na reaktivaci GvHD s možností letálních komplikací<sup>32</sup>. Virové infekce pak samostatně, či v kombinaci s jinými infekcemi, nebo GvHD, mohou způsobovat především letální respirační selhání při poškození plic, ale také encefalitidu, hepatitidu, poškození GIT, myokarditidu a tak vést k MOF<sup>52</sup>.

Obrázek 2.

Zobrazení nejčastějších infekčních komplikací a GvHD v čase po HSCT.



### 2.4.1. Bakteriální a mykotické komplikace

Rizikem pro objevení se bakteriálních a mykotických onemocnění je protrahovaná granulocytopenie<sup>49,50</sup>. Zatímco ke kontrole bakteriální infekce přítomnost granulocytů, tedy především neutrofilních leukocytů, zcela postačí, v případě mykotických infekcí je k dokonalé kontrole infekce nutná také součinnost se specifickou imunitou, ačkoli granulocyty jsou zpravidla schopny infekci držet alespoň z části pod kontrolou<sup>54</sup>.

Obě skupiny patogenů pak vedou k zánětlivým procesům, potenciálně život ohrožujícím. Objevují se tedy teploty, vzestup zánětlivých parametrů, možná koagulopatie rozvoj akutní dechové tísně (ARDS-acute respiratory distress syndrome) pod obrazem respiračního selhání.

Druhová specifikace je u těchto patogenů vždy otázkou lokální epidemiologické situace. Zpravidla se vyskytují např. *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*<sup>50</sup>. Na Klinice dětské hematologie a onkologie se mezi roky 2004-2007 vyskytovaly jako příčina septických stavů u 195 dětí nejčastěji G+ bakterie, zejména *Staphylococcus aureus* (44,04%) a *Streptococcus mitis* (4,08%), z G- bakterií pak *E. coli* (14,33%), *Pseudomonas aeruginosa* (8,71%), *Klebsiella spp.* (8,2%) a v malém procentu také *Acinetobacter spp.* a methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*. Toto rozložení se od skladby patogenů způsobujících sepse po HSCT nijak neliší.

Z mykotických agens se vyskytují zejména infekce *Aspergillus spp.* a *Candida spp.* (ať již *C. albicans*, či non-*albicans* druhy, ovšem s preferencí *C. albicans*). Méně se vyskytují infekce zygomykot jako např. *Rhizopus spp.*.

Terapie antibiotiky i antimykotiky je založena na kombinaci empirického přístupu v kombinaci s detekcí příslušného agens pomocí mikrobiologických metod. V poslední době se ve světě stále častěji používá také molekulárně-biologický přístup k identifikaci mikrobiologických agens – ať již detekcí antigenu (např. detekce galaktomannanu u infekcí *Aspergillus spp.*, či 1,3  $\beta$ -d-glukanu u infekcí *Candida spp.*) či používání real-time PCR (pro detekci nejčastějších bakteriálních agens např. pomocí systému SeptiFast firmy Roche), či PCR a následné sekvence 16S či 18S RNA.

### 3. Virové komplikace

Poslední a do jisté míry specifickou skupinou lidských patogenů zapojených do infekčních komplikací po HSCT jsou viry. U pacientů po HSCT se jedná jak o skupinu RNA (např. RS virus<sup>55</sup>) tak DNA virů<sup>51,53</sup>. Tématem práce jsou nicméně lidské DNA viry a proto se zaměřím na ně. U pacientů po alogenní HSCT častěji objevují DNA viry ze skupin lidských herpesvirů, adenovirů a polyomavirů<sup>51,56</sup>. Ve všech případech je pak ruku v ruce s objevením klinických příznaků nutná rychlá a přesná přímá detekce s následnou léčbou. Použitá virostatika pouze snižují replikační schopnost viru, což dává imunitnímu systému pacienta čas k vyvinutí specifické imunity.

Jak je patrné z výše uvedeného obrázku 2, objevují se virové infekce v různé době po HSCT, nejčastěji však v době po příhojení. Právě tou dobou se totiž v organismu objevují buňky ve kterých se viry, především  $\beta$ -herpesviry (CMV, HHV-6 a HHV-7) a  $\gamma$ -herpesviry (EBV) množí<sup>53,56-58</sup>, imunosupresivní terapie je stále velmi vysoká a doba po transplantaci, která je nutná k rekonstrukci virus specifických lymfocytů. Právě z toho důvodu je období mezi přibližně prvním měsícem a šestým měsícem po HSCT objevuje nejvíce virových komplikací. V pozdějším období se pak mimo pacientů na vyšší dlouhodobé imunosupresi jako terapii chronické GvHD<sup>46</sup> pak objevují virové komplikace až v období vysazení profylaxe acyklovirem.

### 3.1. Detekce virových infekcí

Z obecného ohledu je možno virové infekce detekovat přímo či nepřímo. Nepřímá virové detekce pomocí průkazu protilátek v séru pacienta však u pacientů s dlouhodobou imunosupresivní, či protinádorovou léčbou, případně krátce po HSCT, ztrácí na významu, neboť imunitní systém právě těchto nejohroženějších pacientů není protilátkové odpovědi schopen. Proto se testování virových agens u zmíněné skupiny pacientů provádí výhradně metodami přímé detekce.

Detekce virových infekcí byla v minulosti založena zejména na průkazu virových proteinů. Tento přístup je ve spojitosti s transplantacemi současné době používán např. k detekci adenovirů, či RSV<sup>59</sup>. V minulosti se pak využíval zejména u CMV (především protein - pp65) na periferních krevních buňkách – antigenémie<sup>60</sup>. Její nevýhoda z pohledu detekce CMV spočívá zejména v časové náročnosti, nutnosti jisté zkušenosti hodnotícího pracovníka a v souvislosti s HSCT pak hlavně v nutnosti dostatečného počtu leukocytů v periferní krvi pro získání relevantního výsledku.

V současnosti je v transplantačních centrech prováděna virová detekce především pomocí detekce nukleových kyselin – a to zejména DNA pomocí techniky polymerázové řetězové reakce (PCR) a to zejména kvantitativního PCR (RQ-PCR), či reverzně transkriptázového PCR (RT-PCR) v případě RNA virů. PCR přináší do problematiky detekce virových infekcí vysokou senzitivitu, kvantifikace pak umožňuje prospektivně monitorovat u pacienta vývoj virových infekcí v čase.

Bohužel však i tento přístup v sobě ukrývá mnoho problémů. Jedním z těch, ve kterém zatím nebyl nalezen konsenzus, je nejvhodnější materiál pro tuto molekulárně-biologickou detekci. Zvláště to platí u skupiny herpesvirů. V jejich případě jsou používány tři přístupy ve výběru materiálu z nichž každý má své výhody i nevýhody. Jde o detekci z plazmy, izolovaných buněk periferní krve<sup>61</sup>, či z plné krve<sup>62</sup>. Protože tyto přístupy se liší v jednotlivých světových centrech, je i porovnávání jednotlivých dosažených výsledků složitou záležitostí<sup>63</sup>. Zřejmě nejrozšířenějším přístupem je detekce virové DNA ve vzorku plazmy pacienta, která je v případě positivity braná za příkaz volné virové partikule - virémie, tedy za průkaz produktivní infekce. Klady a zápory těchto tří přístupů jsou shrnuty v tabulce 4.



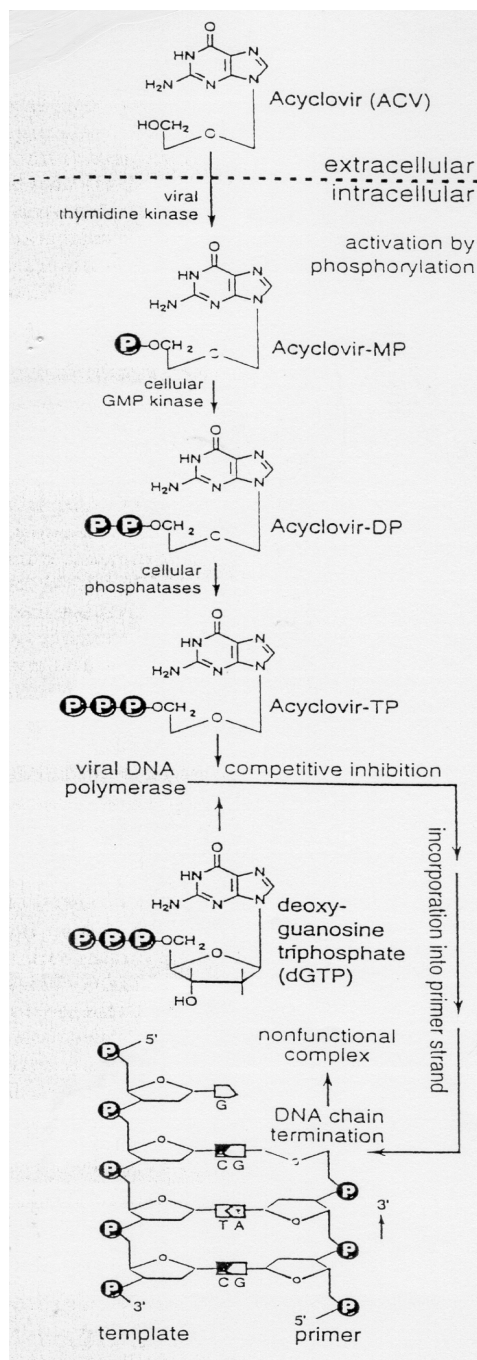
Tabulka 4.

| <b>Zdroj DNA</b>                                  | <b>Důvod</b>                              | <b>Klady</b>  | <b>Zápory</b>  |
|---|---|---|--|
| Plasma/sérum                                      | Detekce virémie                           | ↑ Publikovaná<br>specifita např. pro<br>EBV-LPD                             | Možnost falešné<br>negativity  |
| Periferní krevní<br>mononukleární buňky<br>(PBMC) | Detekce proliferujících<br>virů v buňkách | Lidský genom se dá<br>použít jako kontrola<br>izolace                       | Např. pro EBV-LPD je<br>publikovaná ↓<br>specifita; nutnost<br>prahu pro terapii |
| Plná krev   | Detekce kompletní<br>nálože virové DNA    | Jedna izolace pro<br>všechny viry, lidský<br>genom jako vnitřní<br>kontrola | Např. pro EBV-LPD je<br>publikovaná ↓<br>specifita; nutnost<br>prahu pro terapii |

### 3.2. Terapie virových infekcí

Mimo symptomatické terapie přichází v úvahu v současnosti u virových infekcí také terapie cílená. Tato terapie se opírá o preparáty, které více, či méně specificky zasahují do proliferačního procesu virů. Z pohledu použití při HSCT stojí za zmínění následující virostatika.

#### 3.2.1. Acyklovir



Acyklovir je syntetický analog purinového nukleosidu inhibující in vitro a in vivo lidské herpesviry. Účinný je proti HSV 1 a 2, VZV a v menší míře také proti EBV, CMV a HHV-6<sup>64</sup>. Inhibiční účinek acikloviru proti je vysoce selektivní. Enzym tymidinkináza (TK) ve zdravých, neinfikovaných buňkách nevyužívá aciklovir jako svůj substrát a proto je toxicita vůči savčím hostitelským buňkám nízká. TK zakódovaná virem HSV, VZV a EBV přeměňuje aciklovir na aciklovir monofosfát, který se dále mění na difosfát a nakonec na trifosfát. Aciklovir trifosfát interferuje s DNA polymerázou viru a inhibuje tak replikaci DNA viru s výsledným ukončením řetězce.

Acyklovir se vylučuje v nezměněné formě do moči.

Obrázek 4.

Schéma aktivace acykloviru na jeho účinnou formu acyklovir trifosfát.

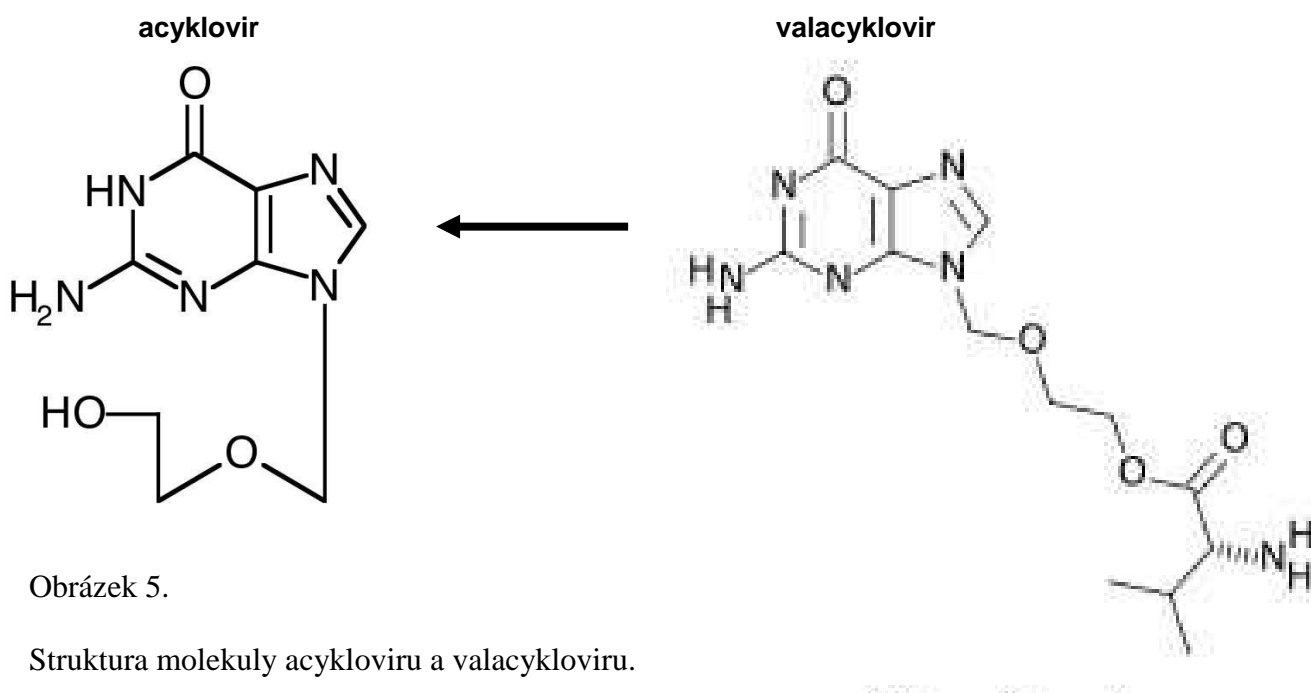
Zdroj:

[http://biology.kenyon.edu/slonc/bio38/stancikl\\_02/What\\_Antiviral\\_Therapies\\_are\\_Used.html&h=489&w=936&sz=275&hl=cs&start=1&usq=hkcSCd7KcXzh0TI9WL0zgDHNoQg=&tbnid=7f8Xjx7lx14hGM:&tbnh=77&tbnw=148&prev=/images%3Fq%3Dvalacyclovir%26gbv%3D2%26ndsp%3D18%26hl%3Dcs%26sa%3DN:25.9.2008](http://biology.kenyon.edu/slonc/bio38/stancikl_02/What_Antiviral_Therapies_are_Used.html&h=489&w=936&sz=275&hl=cs&start=1&usq=hkcSCd7KcXzh0TI9WL0zgDHNoQg=&tbnid=7f8Xjx7lx14hGM:&tbnh=77&tbnw=148&prev=/images%3Fq%3Dvalacyclovir%26gbv%3D2%26ndsp%3D18%26hl%3Dcs%26sa%3DN:25.9.2008)

Všechny nežádoucí účinky jsou zpravidla reverzibilní a obvykle jsou hlášeny u pacientů s poruchou jaterních funkcí, nebo s jinými predisponujícími faktory. Jako velmi vzácné nežádoucí účinky (méně než 1/10 000) se projevují poruchy krvetvorby a lymfatického systému, jako jsou anémie, leukopenie a trombocytopenie, hepatitida a žloutenka, akutní renální insuficience. Vzácně (méně než 1/10 000 a více než 1/1 000) se objevuje anafylaxe, dyspnoe, přechodné zvýšení hladin bilirubinu a jaterních enzymů, angioedém, zvýšení hladiny močoviny v krvi a kreatininu. Méně často (méně než 1/100 a více než 1/1 000) jsou pozorovány kopřivka, zrychlené vypadávání vlasů. Často jsou pozorovány nevolnost, zvracení, průjem, bolesti břicha, svědění, kopřivka (včetně reakce fotosenzibility), únava, horečka. Velmi často (více než 1/10) jsou pak pozorovány bolest hlavy, závrať, agitovanost, zmatenost, třes, ataxie, dysartrie, halucinace, psychotické příznaky, křeče, ospalost a encefalopatie.

Aciklovir se pouze částečně absorbuje v gastrointestinálním traktu. Při opakovaném perorálním podání vysokých dávek acicloviru po dobu několika dnů došlo k vývoji gastrointestinálních projevů jako nevolnosti a zvracení, nebo neurologických příznaků jako bolesti hlavy a zmatenosti.

Lék se vyrábí ve více léčkových formách – suspenze pro i.v. podání, tablety případně krém pro zevní použití s firemními názvy Aciclovir, Herpesin, Provirsan, Ranvir a Zovirax.



Zdroj: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/52/Acyclovir.jpg>; 30. 9. 2008  
<http://stanford.wellsphere.com/detailedSearch.s?keyword=Valacyclovir>; 30.9.2008

### 3.2.2. Valacyklovir

Je odvozen od acykloviru. Ve formě pro-látky (pro-drug) je obsažen v tabletách. Po vstřebání pak v organismu dojde ke změně valacykloviru na účinný acyklovir.

Nežádoucí účinky jsou proto v principu shodné s acyklovirem, jako jsou náhlé potíže s dechem, mluvením nebo polykáním, otok rtů, obličeje nebo krku, silné závratě nebo mdloby, svědění kůže nebo vystupující kožní vyrážka, gastrointestinální obtíže jako je nevolnost, zvracení, průjem a bolest žaludku a dále bolesti hlavy. Velmi vzácně se pak objevují poruchy krvetvorby (lymfopenie, granulocytopenie, trombocytopenie).

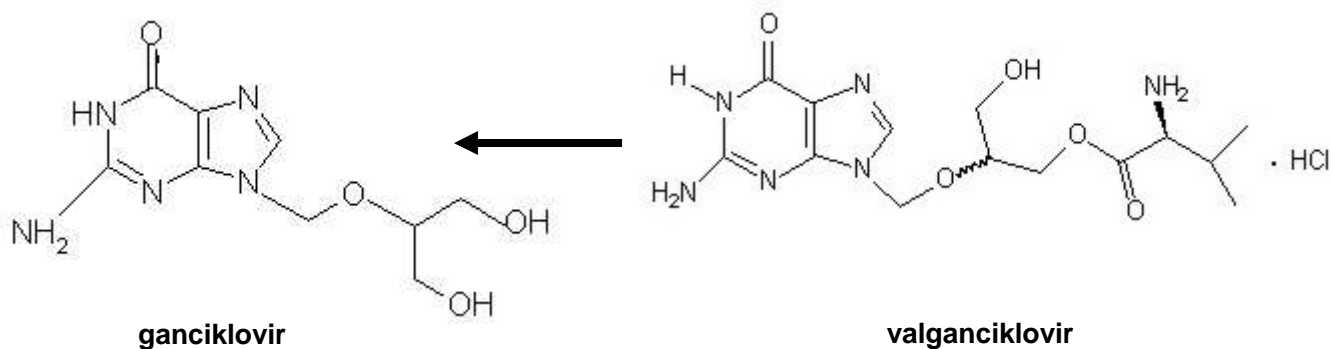
Přípravek je na českém trhu dostupný ve formě tablet jako Vatrex.

### 3.2.3. Ganciklovir

Ganciklovir je také nukleosidový analog<sup>65</sup>. Na rozdíl od acikloviru však účinkuje především na viry ze skupiny  $\beta$ -herpesvirů, tedy CMV, HHV-6 a HHV-7 (viz níže). Do účinné formy ho transformuje protein genu UL97 (thymidinkináza) a následně funguje při syntéze virové DNA pomocí virové polymerázy (produkt genu UL54)<sup>65</sup> obdobně jako aciklovir v případě  $\alpha$ -herpesvirů.

Mezi hlavní vedlejší nežádoucí účinky gancikloviru patří myelosupresivní účinky (zejména neutropenie (25–40 %), méně pak trombocytopenie (20 % u pacientů po transplantaci a 9 % u pacientů s AIDS). Ke gastrointestinálním obtížím patří nauzea, zvracení a průjem, může však mít vliv i na jaterní funkce (vzestup transamináz). Mezi neurologické příznaky podávání gancikloviru patří zmatenost a křeče, nefrologické komplikace podávání pak spočívají v renální insuficienci (vzácně u pacientů po transplantaci srdce). Zcela vzácně se pak v průběhu podávání projeví exantém či eosinofilie.

Lék se vyrábí pouze ve formě pro i.v. podání (firemní název Cymevene) a ve formě gelu do očí (firemní název Virgan).



Obrázek 6.

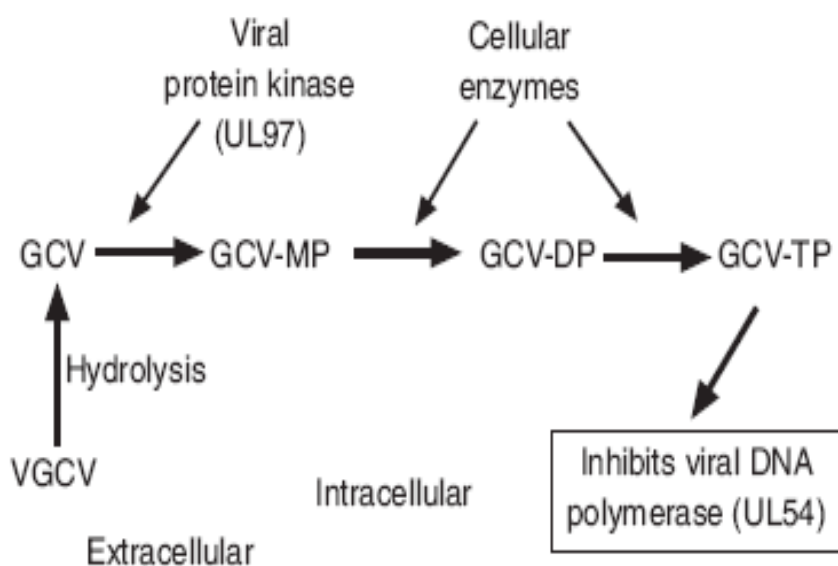
Struktura molekuly gancikloviru a valgancikloviru.

Zdroj: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/b/b6/Ganciclovir.svg/120px-Ganciclovir.svg.png>; 30. 9..2008  
<http://www.thedrugmonitor.com/valganciclovir-molecule.gif>; 30.9.2008

### 3.2.4. Valganciklovir

Je obdobou gancikloviru. Stejně jako valaciclovir je pro-drug pro aciklovir, tak valganciklovir je pro-drug, který se hydrolyzou mění na účinný ganciklovir. I v tomto případě jsou tedy nežádoucí účinky u obou léků obdobné. Jeho nespornou výhodou však je dobré perorální vstřebávání, které se u samotného účinného gancikloviru nikdy uspokojivě nepodařilo vyřešit. Narozdíl od gancikloviru může tedy lék být podáván ambulantně.

Lék je dostupný ve formě tableť pod jménem Valcyte .



Obrázek 7.

Mechanismus aktivace valgancikloviru (VGCV) a následně gancikloviru (GCV) virovou thymidinkinázou (UL97) na GCV-monofosfát (GCV-MP), poté na difosfát (GCV-DP) a následně na účinnou formu trifosfátu (GCV-TP), která inhibuje syntézu nové virové DNA inhibicí virové polymerázy (UL54).

Zdroj: [http://www.medscape.com/content/2003/00/46/61/466160/466160\\_fig.html](http://www.medscape.com/content/2003/00/46/61/466160/466160_fig.html); 30.9.2008

### 3.2.5. Foscarnet

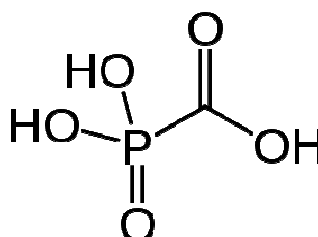
Foscarnet je malá molekula odvozená od kyseliny mravenčí. Inhibuje DNA polymerázu téměř všech známých lidských herpesvirů, včetně aciklovir rezistentních mutant HSV. Nejvíce se však používá k léčbě CMV infekcí (inhibice polymerázy – UL54)<sup>66</sup>.

Mechanismus účinku spočívá ve vazbě foscaviru na virovou polymerázu, čímž dojde k její inhibici a tak k inhibici virové proliferace. Inhibice probíhá jinak než vazbou na elongační místo jako v případě acikloviru, či gancikloviru, a tak je možné používat foscarnet s uvedenými léky také v kombinaci se synergistickým účinkem. Proto je kombinaci s jinými virostatiky zpravidla vyšší účinnost při nižším riziku možných nežádoucích účinků takové terapie.

Nežádoucí účinky podávání jsou akcentovány zejména u renálních poruch, protože se z organismu vylučuje nezměněn ledvinami. Vzácně může dojít k akutnímu selhání ledvin, projevům urémie a polyurie, může se objevit metabolická acidóza a diabetes insipidus. Občas je hlášeno zvýšení plazmatických koncentrací jaterních enzymů (ALT, AST, GGT), stejně jako zvýšení plazmatických koncentrací LDH, alkalické fosfatázy a amylázy. Často se může objevit nauzea, zvracení a průjem. Ojedinele pak abdominální bolest, nechutenství, zácpa a pankreatitida. V průběhu léčby a po jejím ukončení se může často snížit hemoglobinémie. Občas se objevuje trombocytopenie, hypokalémie, hypomagnezémie a hypo-nebo hyperfosfátémie. U některých pacientů je nutná léčba hypokalcémie. Kalcémii je nutné kontrolovat každé dva dny v průběhu indukční léčby a jednou za týden v průběhu udržovací léčby. Objevují se také bolesti hlavy, únava, parestézie, třes, ztráta chuti k jídlu, ataxie, neuropatie a hypoestézie, stejně jako excitace, stavy zmatenosti nebo úzkost, deprese, psychóza, hyperaktivita a agresivní reakce a křeče. Občas se mohou objevit změny na EKG, hypertenze a pokles TK. Velmi vzácně komorové arytmie. Často je pozorován rash (exantém), třes, svalová slabost a vzestup tělesné teploty. Při podání koncentrovaných roztoků Foscaviru (nad 12 mg/ml) do periferní žíly se často objevuje flebitida (tromboflebitida). U přecitlivělých jedinců může vyvolat ulcerace genitálu.

Obrázek 8.

Struktura molekuly foscarnetu.



Zdroj:  
<http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Foscarnet.svg>;  
30. 9..2008

### 3.2.6. Cidofovir

Je nukleosidový analog, který inhibuje ve své účinné formě, tedy ve formě cidofovir-bis-fosfátu syntézu nové virové DNA. K aktivaci molekuly cidofoviru je použita v případě CMV především virová thymidinkináza (UL97) a lék je používán zejména při léčbě CMV nemoci (např. CMV retinitidy u HIV pozitivních pacientů). Nicméně účinnost tohoto léku je prokázána také v případě dalších virových skupin jako jsou například adenoviry, či polyomaviry<sup>67,68</sup>.

Mezi nejběžnější nežádoucí účinky (zaznamenané u více než 1 pacienta z 10) patří neutropenie, bolesti hlavy, nauzea, zvracení, alopecie, vyrážka, slabost a horečka. Mezi nejobávanější účinky však patří jeho nefrotoxicita projevující se zejména proteinurií a zvýšenou hladinu kreatininu v krvi. Nefrotoxicita se může projevit jak akutně, tak s odstupem od podání. Pro snížení těchto účinků jsou jednak pacienti dobře hydratováni, jednak je v případě podání také použito nefroprotektivního léku probenecid.

Mimo systémového podání jako v případě terapie CMV nemoci lze cidofovir použít také lokálně pro terapii BK virus pozitivní hemorhagické cystitidy.

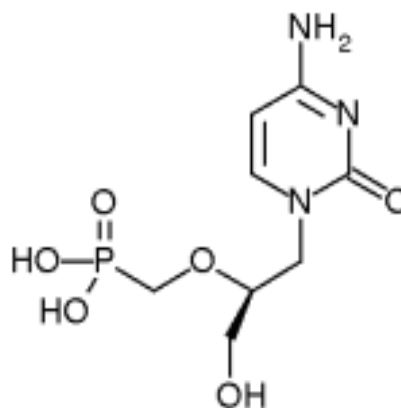
Dávkování pro případ CMV nemoci, či symptomatické adenovirové pneumonie je 5 mg/kg/týden.

V případě hemorhagické cystitidy je pak dávkování 1 mg/kg třikrát týdně.

Obrázek 9.

Struktura cidofoviru.

Zdroj: <http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Cidofovir.png>; 30.9.2008



### 3.2.7. Maribavir

Je v klinice relativně nové a velmi potentní virostatikum založené na benzimidazol L-ribosidu. Jeho mechanismus účinku spočívá ve vazbě a inhibici cytomegalovirové thymidinkinázy (UL97) a také inhibici virové enkapsidace<sup>69</sup>. Protože až dosud není in vivo popsán vznik CMV rezistentní mutanty proti tomuto

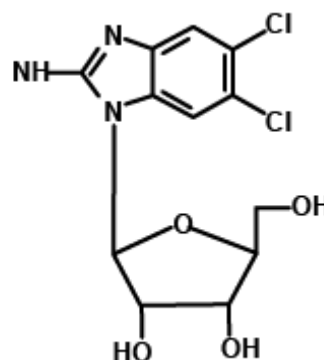
léku a profil nežádoucích účinků je velmi příznivý, plánuje se zejména profylaktické použití maribaviru u vysoce rizikových pacientů po HSCT a to jak v primární, tak sekundární profylaxi. Pravdou ovšem je, že inhibiční účinek maribaviru je popsán také pro jiné viry, například pro EBV<sup>69</sup>.

Zajímavé je také jeho potenciálně velmi slibné synergistické použití s foscarnetem.

Nežádoucí účinky jsou spojené především se změnami chuti a pocitem kovové chuti na jazyku, který s prodlužující se dobou podávání odeznívá. Byly popsány také gastrointestinální obtíže jako průjem a zvracení a bolesti břicha stejně jako neurologické účinky a dalších. Nicméně s výjimkou již zmíněných změn chuti vyšly všechny další nežádoucí účinky ve dvojitě slepé studii s placebem jako statisticky nesignifikantní.

Lék je zájím v posledním stádiu klinických testů ve formě tablet a jeho uvolnění pro standardní dodávání pacientům je plánováno na první polovinu roku 2009. Intravenózní formule se v současné době připravuje.

Dosavadní podávání ve studii bylo s dávkováním jednou, či dvakrát 400 mg denně.



Obrázek 10.

Struktura maribaviru.

Zdroj: New Concepts of Antiviral Therapy<sup>70</sup>



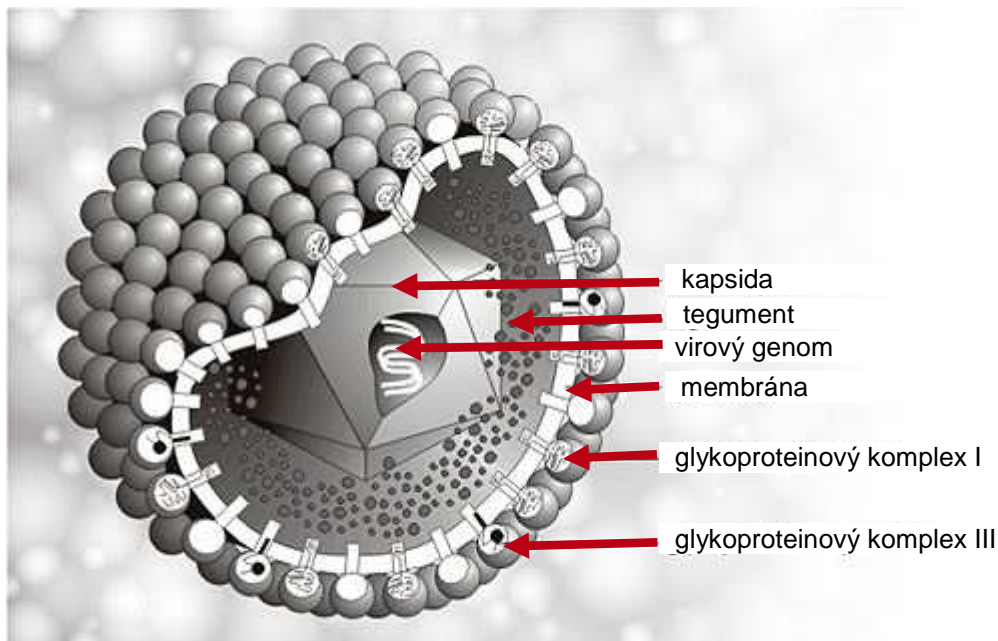
## 4. DNA viry detekované po HSCT

### 4.1. Herpesviridae

Je početná skupina lidských virů. Všichni členové mají dvouvláknovou DNA a genomem velikosti přibližně 125-240 kb, která kóduje přibližně 100 genů. Kapsida má ikosahedrální strukturu a je obalena lipidovou membránou. Celková velikost virionu se pohybuje kolem 100 nm. Obecná struktura lidských herpesvirů s popisem je zobrazena na obrázku 11. Jejich specifickým znakem je latentní setrvávání v organismu po primoinfekci a následná možnost reaktivace v čase těžké imunosuprese.

Obrázek 11.

Obecná struktura herpesviru.



Zdroj: [http://web.njit.edu/~pkb3/herpesvirus\\_biographix.jpg](http://web.njit.edu/~pkb3/herpesvirus_biographix.jpg); 31.9.2008

Příznaky primoinfekce či reaktivací jsou uvedeny níže. U všech těchto virů je ale nutno zmínit, že nemalé procento primoinfekcí probíhá s minimem příznaků, či zcela inaparentně, zvláště v časném dětském věku. Horší průběh primoinfekce se pak popisuje zpravidla u starších pacientů.

Viry se množí pomocí rotujícího kruhu cirkulární episomické DNA. Tím způsobem dojde ke vzniku dlouhého vlákna opakujících se virových genomů, které se následně sestřihují do délky jednotlivých genomů.

Herpesviry mají ve svém geonomu celou řadu proteinů, pomocí kterých jsou schopny ovlivnit chování buněk imunitního systému a tak uniknout jeho pozornosti. Dobře je tato schopnost dokumentována například u EBV (viz níže).

Používaná virostatika pak de facto odpovídají jednotlivým skupinám virů.  $\alpha$ -herpesviry dobře reagují na acyklovir,  $\beta$ -herpesviry jsou pak léčitelné pomocí gancikloviru, foscarnetu či cidofoviru,  $\gamma$ -herpesviry jsou pak farmakologicky nejhůře ovlivnitelnou skupinou s mírným ovlivněním acyklovirem či cidofovirem. V poslední době jsou vyvíjeny další potenciálně účinné léky jako například maribavir.



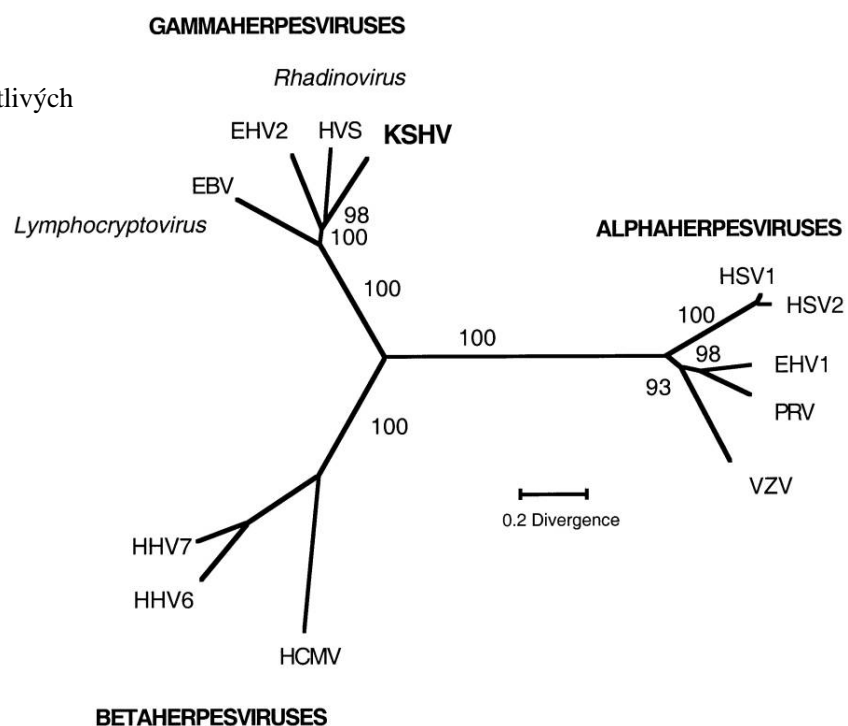
Obrázek 12.

Elektronová mikroskopie zachycující kapsidu a membránová obal herpesviru

zdroj: [http://virologia.ua.es/dmsander/Big\\_Virology/EM/hsv2.gif](http://virologia.ua.es/dmsander/Big_Virology/EM/hsv2.gif)

Obrázek 13.

Genetická příbuznost jednotlivých skupin herpesvirů.



Zdroj: Fields Virology

#### 4.1.1. $\alpha$ - (alfa) - Herpesvirinae

Do této skupiny lidských herpesvirů patří dva rody. Jde o rod Simplexvirus, do kterého patří Herpes simplex 1 a 2 (HSV-1, HSV-2), a o rod Varicellovirus kam z lidských virů patří Varicella-Zoster Virus (VZV). Taxonomicky se jedná o lidský herpesvirus 1, 2 a 3 (Human herpesvirus – HHV- 1, 2 a 3). Všechny tři viry jsou především neurotropní a v latentní formě zůstávají po primoinfekci v nervové tkáni.

Bez jakékoli prevence se  $\alpha$ -herpesviry reaktivují velmi často. Například HSV-1 a 2 se reaktivují až u 80% pacientů (Zdroj: [http://www.ebmt.org/5WorkingParties/IDWP/IDdocs\\_unprotected/ECIL%202007/ECIL2%202007%20HSV%20recommendations.PPT#4](http://www.ebmt.org/5WorkingParties/IDWP/IDdocs_unprotected/ECIL%202007/ECIL2%202007%20HSV%20recommendations.PPT#4); 10.10.2008; EBMT – European Group for Blood and Marrow Transplantation; IDWP – Infectious diseases working party při EBMT) . Z toho důvodu, stejně jako relativně zanedbatelných nežádoucích účinků acykloviru je již roky ve světě, včetně České republiky, používána profylaxe acyklovirem. Profylaxe začíná přibližně týden před HSCT a pokračuje různě dlouhou dobu podle imunologického stavu pacienta, průměrně však přibližně do půl roku po HSCT. Profylaktické podávání v době okolo HSCT je v dávce 500 mg/m<sup>2</sup> /dávku v kapací infuzi na 60min a 12 hodin s maximem 750 mg/dávku a pokračuje p.o. formou v dávkách: 9 mg/kg/dávku po 8 hodinách (0-2 roky), resp. 10 mg/kg/dávku sirup, 200 mg po 8 hodinách (2-10 let) a nad 10 let 400 mg po 8 hodinách. Po propuštění z transplantační jednotky v rámci ambulantního sledování pokračuje prevence v dávkách 9 mg/kg/dávku po 8 hodinách (0-2 roky), resp. 10 mg/kg/dávku sirup, 200 mg po 12 hodinách (2-10 let) a nad 10 let 400 mg po 12 hodinách. Tato profylaxe je účinná i proti reaktivaci VZV.

##### 4.1.1.1.Lidský herpesvirus 1 a 2 (HHV-1 a 2) – Herpes simplex 1 a 2 (HSV-1 a 2)

U pacientů imunokompromitovaných pacientů bez profylaxe je popisován jako příčina časných těžkých neurologických komplikací např. ve smyslu hemorhagických encefalitid, ale je příčinou také stejně jako benigní cerebelární ataxie, gingivostomatitid, faryngotonzilitid a pneumonií<sup>71</sup>. Mimo to je samozřejmě příčinou oparů a kožních erupcí jako v běžné populaci<sup>72</sup>, které mohou být nicméně závažnou komplikací například ve spojitosti s bakteriální superinfekcí.

Dojde-li k objevení příznaků onemocnění, je použit acyklovir intravenózně v dávce 250 mg/m<sup>2</sup>/dávku v kapací infuzi na 60min po 8 hodinách s maximem 500 mg/dávku po dobu 7-10 dnů, nebo p.o. formou v dávce 9 mg/kg/dávku po 6 hodinách (0-10 let), respektive 10 mg/kg/dávku sirup, nebo 400 mg po 4 hodinách (mimo noční dávky; nad 10 let). Případně terapie valacyklovirem v dávce 250 mg 2x denně po dobu 2-3 týdnů (ve věku 0-10 let s případnou redukcí dávky podle váhy), či ve dvojnásobné dávce pro pacienty starší deseti let.

#### 4.1.1.2.Lidský herpesvirus 3 (HHV-3) - Varicella-Zoster Virus

U pacientů po HSCT bez profylaxe se reaktivuje až v 50% případů. V případě reaktivací je popisován jako příčina herpes zoster (pásového oparu), planých neštovic a pneumonií (Zdroj: <http://www.ebmt.org/5WorkingParties/IDWP/wparties-id.html>; 10.10.2008).

Pro terapii symptomatické infekce se používá intravenózní dávkování 500 mg/m<sup>2</sup>/dávku v kapací infúzi na 60min po 8 hodinách (maximum 750 mg/dávku) po dobu 7 - 10 dní, nebo v p.o. formě tablet 8 mg/kg/dávku po 4 hodinách (mimo noční dávky; 0-10 let), resp. 20 mg/kg/dávku sirup, respektive

800 mg po 4 hodinách (mimo noční dávky; nad 10 let). Další možností je terapie valacyklovirem v dávce 1000 mg 3x denně po dobu 2-3 týdnů (ve věku 0-10 let s případnou redukcí dávky podle váhy), nebo ve dvojnásobné dávce pro pacienty starší deseti let.

#### 4.1.2. $\beta$ - (Beta) - Herpesvirinae

Skupina  $\beta$ -herpesvirů patří v souvislosti s imunosuprimovanými pacienty po transplantacích obecně k nejzajímavějším. Tato skupina virů se dělí opět na dva rody. Do rodu Cytomegalovirus patří z lidských virů pouze cytomegalovirus – CMV (taxonomicky HHV-4 Human Herpesvirus 4) . Do rodu Roseolovirus pak patří HHV-6 (Human herpesvirus 6; šestý lidský herpesvirus) a HHV-7 (Human herpesvirus 7; sedmý lidský herpesvirus).

Jde o skupinu relativně blízce příbuzných virů, které však jsou patogenicitou, zejména ve spojitosti v CMV dalece překročí patogenní význam dalších virových skupin včetně virů patřících mezi RNA (jako např. RSV či lidský metapneumovirus). I z toho důvodu je této skupině věnována značná pozornost jak ve smyslu detekce, tak ve smyslu terapie.

Zvlášť v poslední době se pak terapie nesoustředí pouze na používání ověřených či nových virostatik, ale v některých centrech se pracuje také na in vitro kultivaci antigen specifických lymfocytů z buněk dárce, které jsou posléze podány pacientovi<sup>73</sup>. V případě nemožnosti dosáhnout na tuto technologii se pak relativně často používá alespoň pasivní sledování přítomnosti CMV specifických buněk v periferní krvi po HSCT. Podle dosud publikovaných prací je potřeba ke kontrole CMV infekce, či reaktivace přibližně 400 CD4+ a CD8+ specifických buněk / ml periferní krve.

##### 4.1.2.1. Lidský cytomegalovirus

Je jedním z nejnebezpečnějších virů po transplantacích obecně a patří do samostatného rodu Cytomegalovirus (viz obrázek 13). Jeho reaktivace je pozorována v přibližně 30 % pacientů po alogenních HSCT<sup>53</sup>. Zatímco u orgánových transplantací, jako jsou např. transplantace jater, je profylaktické podávání valgancikloviru zcela běžné<sup>74</sup>, je v současné době u HSCT uplatňován přístup pečlivé monitorace virové reaktivace/infekce po transplantaci a následná cílená terapie<sup>75</sup>. Ze zapojení proteinů UL97 a UL54 pak vyplývá v případě prodloužené terapie možnost pro vznik rezistentních mutant virů, které následně mohou vést k rozvinutí plně symptomatické CMV nemoci.

I v případě CMV je imunitní systém hostitele virovou infekcí ovlivňován. Virové proteiny UL146 and UL147 jsou virovými chemokiny CXC (vCXCL1), které fungují přes chemokinový CXCR2 receptor, se

stejnou účinností jako lidský IL-8<sup>76</sup>. Potentním virovým chemokinem je pak také protein UL131, který ovlivňuje endotelie, dendritické buňky i leukocyty<sup>77,78</sup>. Tak se v rámci infekce k sobě dostávají nakažené a dosud nenakažené buňky, čímž se infekce nadále rozšiřuje. Další strategií CMV jak uniknout pozornosti imunitního systému je pak downregulace prezentace proteinů na MHC-I<sup>79</sup>.

U pacientů po alogenní HSCT je rozvinutá CMV infekce asociována s horečkou nejasné etiologie, poklesem v krevním obrazu, pneumonitidou, kolitidou, encefalitidou, retinitidou, hepatitidou a některými dalšími orgánovými postiženími<sup>75</sup>. Mimo přímého patogenního působení viru jako takového, se pak na poškození organismu pacienta může podílet jak podávání virostatik (viz výše), tak poškození tkání při rekonstrukci imunity pacienta po transplantaci zánětlivou reakcí zaměřenou proti CMV<sup>75</sup>. Rozsáhlé poškození tkáně v případě CMV nemoci, je pak asociováno s vysokou mortalitou, která např. v případě rozvinuté CMV pneumonie dosahuje přes veškerou terapii a podpůrnou péči až 90%<sup>80</sup>.

První linie léčby je zpravidla založena na podávání gancikloviru (v dávce 5 mg/kg/den po 12 hodinách po dobu dvou týdnů, následováno 5 mg/kg a den po dobu dalšího týdne), či valgancikloviru (v dávce 900 mg/m<sup>2</sup> dvakrát denně). V druhé linii pak zůstává podání foscarnetu (v dávce 120 mg/kg/den po dobu 1-2 týdnů následováno dávkou 90 mg/kg/den po dobu 2 či 1 týdne). Jako poslední linie léčby pak v současné době zbývá velmi potentní, však velmi toxický cidofovir (v dávce 5 mg/kg/týden, nebo 1 mg/kg třikrát týdně). Zvláště u pacientů s chronickou extenzivní GvHD a tedy protražovanou poruhou specifické imunity, kteří trpívají opakovanými reaktivacemi s léčbou<sup>46</sup> se stává v současné době velkým problémem vznik a selekce rezistentních mutant viru – především na první linii léčby (viz výše).

#### 4.1.2.2. Šestý lidský herpesvirus (Human herpesvirus 6 – HHV-6)

Je blíže příbuzný CMV (viz obrázek 9). Patří spolu s HHV-7 do rodu Roseolovirus a dělí se na dvě varianty – A a B.

Varianta A zůstává až dosud virem s neznámým patogenním působením na člověka (orphan virus). Byla prokázána častěji u pacientů s demyelinizačními neurologickými onemocněními (jako je např. roztroušená skleróza)<sup>81,82</sup>, nicméně i zde zůstává jeho patogenní účinek otazníkem.

Varianta B je v případě primoinfekce známou příčinou benigního exantémového onemocnění dětského věku – známého jako roseola infantum, či šestá exantémová nemoc<sup>83</sup>. Nemoc se projevuje horečkami

trvajícíchmi zpravidla dva dny, které následně rychle odezní spolu s výsevem zcela diskretního prchavého exantému. Také je popisován jako příčina mononukleóza-like syndromu<sup>83</sup>. U pacientů po HSCT je nicméně HHV-6 popisován jako příčina horeček nejasné etiologie, pozdějšího přihojování krevních destiček, ale také hepatitid, pneumonií, encefalitid (obdobně jako CMV)<sup>84</sup>.

HHV-6 se váže na buňku pomocí buněčného receptoru CD46<sup>85</sup>, který fyziologicky působí v regulaci komplementové kaskády. To však není, stejně jako u dalších herpesvirů jedinou interakcí HHV-6 s imunitním systémem. HHV-6 kóduje mimo jiné proteiny, které ovlivňují jak imunitní systém, tak samotné šíření viru v organismu. Jako příklad lze uvést protein U83, který funguje jako agonista chemokinů působících přes CCR2. Navíc i v nakažené buňce dochází k syntéze chemkinových receptorů. Tím jsou tedy virovými analogy chemokinů do oblasti nakažených buněk další, dosud nenakažené buňky a na druhou stranu, je-li někde zánět, nakažená buňka je silněji přitahována do oblasti zánětu, tedy do oblasti, s vyšším výskytem neinfikovaných buněk. Navíc HHV-6 úspěšně inhibuje syntézu INF- $\gamma$ , stejně jako IL-2 a naopak zvyšuje syntézu IL-10 a IL-12<sup>86</sup>. Tím tedy jednak zmenší proliferační aktivitu lymfocytů a navíc posune imunitní reakci směrem k Th2, tedy protilátkové odpovědi, která je v kontrole probíhající infekce neúčinná<sup>86</sup>.

Možností, která je schopna molekulárně biologickou diagnostiku HHV-6 značně zavést, je chromozomální integrace DNA HHV-6. Dědičnost tohoto integrovaného viru z rodičů na děti byla popsána prvně v roce 1993<sup>87</sup>. Díky dědičnosti je pak HHV-6 DNA prokazatelná ve všech tkáních nositele<sup>88</sup>. Proto se jako důkaz chromozomální integrace HHV-6 používá detekce virové DNA v bezkrevné tkáni (vlasy, nehty). Integrují se obě varianty viru<sup>83</sup>. Zajímavé také je, že se zatím ani in vitro, ani in vivo nepodařilo prokázat reaktivaci chromozomálně integrovaného HHV-6 do produktivní infekce s tvorbou infekčních virových partikulí. Chromozomální integraci virové DNA se zatím nepodařilo prokázat u žádného dalšího herpesviru.

Terapie produktivní primoinfekce HHV-6 zpravidla není nutná. V případě reaktive u imunokompromitovaných pacientů se pak dají použít k terapii stejný postup i dávkování jako v případě terapie CMV<sup>83</sup>.

#### 4.1.2.3. Sedmý lidský herpesvirus (Human herpesvirus 7 – HHV-7)

Je spolu s HHV-6 členem rodu Roseolovirus. Jeho patogenita je velmi nízká<sup>83</sup>. U imunokompetentních pacientů je popsán také jako příčina roseola infantum a mononukleóza-like syndromu. U imunokompromitovaných pacientů se pak popisuje např. jako příčina pneumonitid, encefalitid a hepatitid<sup>84</sup>. Zapojení HHV-7 do patogenních procesů po HSCT však stále není zcela objasněnou kapitolou detekce virových agens.

Terapie, je-li nutná, pak je spektrum léků i dávkování shodné s CMV infekcí.



#### 4.1.3. $\gamma$ - (Gama) - Herpesvirinae

Do této skupiny virů patří z lidských patogenních virů dva – virus Epstein-Baarové (EBV) a osmý lidský herpesvirus (Human herpesvirus 8 – HHV-8) (viz obrázek 9). Jejich obecné chování v organismu včetně latence v organismu odpovídá obecnému chování herpesvirů (viz výše). V souvislosti s HSCT je v zapojení do patogenních procesů zatím popisován pouze EBV, člen rodu Lymphocryptovirus.

##### 4.1.3.1. Virus Epstein-Baarové (EBV)

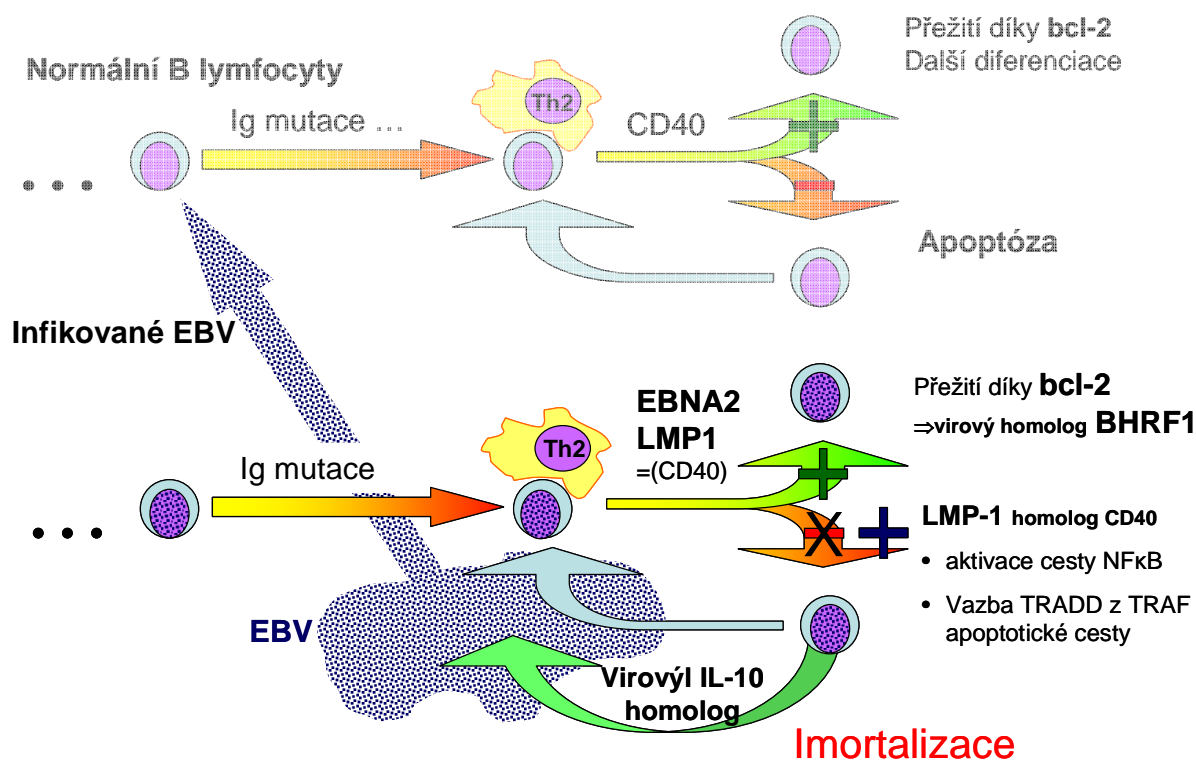
Je lymfotropní virus. Jeho buněčným receptorem je komplementový receptor 2 (CR2 – CD21), který je přítomen zejména na B lymfocytech<sup>89,90</sup>. Primoinfekce probíhá opět s různou obtížností od zcela inaparentní infekce po plně rozvinutou infekční mononukleózu. Při tomto stavu dochází k proliferaci B lymfocytů a jejich objevení pod obrazem patologických buněk v periferním krevním obraze<sup>91</sup>. U imunokompetentního pacienta se pak jedná o proliferaci alespoň částečně kontrolovanou imunitou pacienta. V případě imunokompromitovaného pacienta však tato kontrola zcela chybí. Podobným způsobem je zřejmě virus zapojen také do proliferace B lymfocytů v případě Burkittova lymfomu, či Hodgkinovy choroby<sup>91,92</sup>.

Pro pochopení jeho působení je třeba alespoň ve zkratce zmínit normální vývoj B lymfocytu, protože virové proteiny působí na více stupních. Po vzniku B lymfocytu dochází k vývoji BCR (B-cell receptor), který je vlastně membránovou formou imunoglobulinu, která váže antigen. Signál pro přežití po úspěšné přestavbě BCR dostává buňka pomocí signální kaskády s anti-apoptickým proteinem bcl-2. Protein EBV BHRF-1 je pak virovým analogem bcl-2<sup>93</sup>. Po vytvoření BCR a stimulaci pomocí antigen prezentující buňky pak dostává B lymfocyt kostimulační signál pomocí vazby CD40 a CD40L (CD40 ligand – CD154), který je nutný pro další množení B lymfocytu. LMP-1 (Latent Membrane Protein – 1) EBV je pak virovým proteinem zasahujícím do této kaskády vazbou na vyvazuje TRADD (TNF Receptor Associated Death Domain) TRAF faktorů z pro-apoptické cesty (TNF Receptor Associated Family), čímž spouští kaskádu vedoucí až NF $\kappa$ B a následně další množení B lymfocytu<sup>94,95</sup>. Pro dokončení proliferační podpory B lymfocytu virem je pak třeba zmínit, že EBV obsahuje a produkuje virový homolog interleukinu 10 (IL-10)<sup>96</sup>, který je růstovým faktorem B lymfocytů. Malé RNA kódované EBV (EBER) pak navíc cestou IRF-3

(Interferon Regulatory Factor) signalizační cesty, vedou k podpoře produkce i samotného buněčného IL- $10^{97}$ . Cesta IRF-3 je běžně aktivována přes TLR-4 (Toll-Like Receptor) po vazbě lipopolysacharidu Gram negativních bakterií. Schéma podpory proliferace B lymfocytu je pak na obrázku 14.

Obrázek 14.

Vliv infekce EBV na vývoj B lymfocytů vedoucí k proliferaci buněk a v případě imunokompromitovaného pacienta až k B lymfocytární imortalizaci a rozvoji EBV-LPD.



Z výše uvedeného vyplývá, že není-li B lymfocytární proliferace regulována, jako v případě pacientů po HSCT, může vést působení viru k EBV asociované lymfoproliferaci (EBV-LPD). EBV-LPD může mít projevy od příznaků infekční mononukleózy, před příznaky proliferace B lymfocytů v lymfatických uzlinách (obdoba lymfomu) až ke stavu, který připomíná akutní leukémii včetně jejích komplikací a tak může vést ke smrti pacienta<sup>98,99</sup>.

EBV-LPD může být různě rozvinutá a podle toho se rozlišují tři formy. První formou je mononukleosa-like syndrom s příznaky jako jsou horečka, bolest v krku, myalgie, tonzilární hypertrofie, krční lymfadenopatie, hepatopatie (bilirubinémie). Pokročilejším stádiem je forma tumorózní forma, kde se

k výše uvedeným příznakům přidávají ještě sekundární symptomy přítomnosti zvětšení lymfatické tkáně - bolest, obstrukce (např. GIT, či dýchacích cest) s možností následné perforace, gastrointestinálním krvácení, respirační tísní a podobně. Poslední, plně rozvinutou formou je pak diseminovaná EBV-LPD s proliferací B lymfocytů nejen v uzlinách, ale také v periferní krvi a kostní dřeni. Objevují se také vysoké horečky a/nebo multi-orgánové selhávání<sup>99</sup>.

Terapie EBV-LPD je založena v první řadě na snížení imunosuprese pacienta. Je-li třeba razantně zasáhnout, pak se podává monoklonální protilátka proti CD-20 antigenu B lymfocytů (rituximab=MabThera<sup>®</sup>)<sup>98</sup>.

## 4.2. Adenoviry

Jsou početnou skupinou DNA virů s ds DNA genomem velikosti přibližně 35 kb. Všech jejích téměř šedesát známých sérotypů má ikosahedrální kapsidu bez obalu membránou<sup>100</sup>. I v geneticky konzervovaných oblastech jako je například hexonový gen se ale jednotlivé sérotypy velmi liší a činí tak přímou detekci rozsáhlejší skupiny adenovirů jedním testem nesnadnou.

Podle podobnosti a patogenních účinků se pak dělí do šesti skupin A-F<sup>100</sup> (viz tabulka 5.).

Tabulka 5.

Rozdělení adenovirů a jejich patogenního působení mezi pacienty po alogenní HSCT<sup>101</sup>.

| Skupina | Sérotypy  | Lokalizace infekce   |
|---------|---|--|
| A       | 12, 18, 31  | Respirační, močové a GIT infekce; u pacientů po HSCT vzácné. |
| B1      | 3, 7, 16, 21  | Respirační, oční, močové a GIT infekce.                      |
| B2      | 11, 14, 34, 35  | Respirační, močové a GIT infekce.                            |
| C       | 1, 2, 5, 6  | Respirační, močové a GIT infekce – také hepatitidy.          |
| D       | 8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49 | Oční a GIT infekce; u pacientů po HSCT vzácné.               |
| E       | 4   | Oční a respirační infekce; u pacientů po HSCT vzácné.        |
| F       | 41  | GIT infekce; u pacientů po HSCT vzácné.                      |

Adenoviry jsou viry primárně se množící ve tkáních pacienta. Je-li tedy virus, či jeho DNA prokázána v periferní krvi, pak se jedná vždy o virémii z primárního místa pomnožení, především z GIT.

Jde o jedny z nejčastějších agens lidských virových infekcí vůbec. U imunokompetentních jsou příčinou mnoha onemocnění od stavu popisovaného jako „common cold“ - tedy běžné nachlazení, infekce respiračního traktu (jako jsou např. bronchitidy), přes průjemová onemocnění GIT až po oční infekce jako jsou konjunktivitidy (viz tabulka 5)<sup>100</sup>.

U imunokompromitovaných pacientů jsou pak popsány jako příčina těžkých a často fatálních pneumonií, colitid, hepatitid či hemorhagických cystitid. V těchto případech je zpravidla průběh infekcí mnohem rychlejší, než v případě herpesvirů<sup>102</sup>.

Terapie rozvinuté adenovirové nemoci, především pneumonie, je v současnosti založená na podávání cidofoviru (v dávce 5 mg/kg/týden)<sup>100,103</sup>.

### 4.3. Polyomaviry

Jedná se o malé neobalené viry s cirkulární ds DNA o velikosti přibližně 4,7-5,4 kb stočené do podoby šroubovice (supercoil). Opět se jedná o neobalené viry. Z obecného pohledu je tato skupina známá onkogenním potenciálem popsáným zejména na SV40 díky působení svých antigenů, například vazbou na p53 buněčný antionkogen<sup>104</sup>, nebo například výskytem viru JCV z mozkových lézích progresivní multifokální leukoencefalopatie u HIV pozitivních pacientů<sup>105</sup>.

V souvislosti s HSCT je pak popisován zejména v souvislosti s BKV asociovanou hemorrhagickou cystitidou<sup>106</sup>. Otázkou je také výskyt a patogenní působení respiračních polyomavirů WU a KI popsáných v roce 2007<sup>104</sup>.

Terapií BKV hemorrhagické cystitidy je mimo hyperhydratace, či výplachů močového měchýře, které brání alespoň mírně vzniku koagul také cidofovir<sup>107</sup>. V jeho případě zůstává otázkou dávkování. Mimo systémového podávání v dávkách 5 mg/kg/týden a 1 mg/kg třikrát týdně bylo publikováno také lokální podávání cidofoviru ve formě výplachů, případně některých další experimentálních postupů<sup>108</sup>.

## **5. Cíl práce**

Cílem práce bylo zavést podle publikovaných metodik kvantitativní detekci DNA virů u pacientů po alogenní HSCT a následně určit frekvenci jednotlivých virů mezi dětskými a dospělými pacienty. Zároveň bylo cílem u často se vyskytujících virů určit hranici významné a potenciálně nebezpečné reaktivace pro zahájení léčby.

## 6. Metody

Veškerá detekce virových reaktivací byla prováděna přímou detekcí pomocí kvantitativní real-time PCR (RQ-PCR).

Izolace DNA z plné krve a likvoru byla prováděna pomocí QIAmp Blood MIDI a MINI Kitů (Qiagen, Hilden, SRN), DNA ze vzorků tkání pak byla izolována pomocí QIAmp DNA kit (Qiagen, Hilden, SRN), moč pak byla izolována pomocí UltraClean Tissue DNA Isolation Kit firmy MoBio.

K testování byly použity primery a sondy z již publikovaných esejí pro detekci HSV<sup>109</sup>, VZV<sup>110</sup>, CMV<sup>111</sup>, HHV-6<sup>112</sup>, HHV-7<sup>113</sup>, EBV<sup>114</sup>, adenovirů<sup>115</sup> a BKV<sup>116</sup>. Ve všech vzorcích jsme také kvantifikovali albuminový gen<sup>117</sup>.

S výjimkou kalibrační křivky pro albumin, která byla konstruována po spektrofotometrickém změření koncentrace smíšeného roztoku lidských DNA, byly všechny ostatní křivky konstruovány pomocí dekadického ředění plasmidu se zaklonovanou cílovou sekvencí, pomocí TOPO cloning KIT od firmy Invitrogen do dodávaného kmene *E. coli*.

V případě detekce adenovirů jsme se podíleli ve spolupráci s kolegy z Leiden University Medical Centre a kterou jsme po té jako skupina řešící evropský grant zabývající se adenoviry u pacientů po HSCT publikovali na návrhu MGB (Minor Groove Binder) sondy<sup>115</sup> (článek č. 11). Výhodou MGB sondy je možnost použití krátkého řetězce DNA, který by u běžné TaqMan sondy byl nedostatečný. V případě adenovirů, jejichž obrovské množství sérotypů a jejich variability velmi znesnadňovalo jak navržení primerů, byl tento přístup jedním z možných řešení. Primery byly navrženy pro detekci sérotypů skupin A-C, přičemž sérotypy skupin B a C jsou po HSCT detekovány častěji (viz tabulka 5). I tak jsou pro detekci použity tři primery k zajištění dostatečné senzitivity eseje.

Pro detekci variant HHV-6 jsme kvůli zvýšení senzitivity eseje u detekce velmi nízkých kvantit viru navrhovali vnější primery k primerům již publikovaným (viz článek č. 6).

K detekci jsme používali především PCR chemikálie dodávané s polymerázou HotStar firmy Qiagen (Hilden, SRN). Testování pak bylo provedeno na strojích Applied Biosystems ABI 7700, 7300, 7500 a také na strojích BioRad IQcycler.



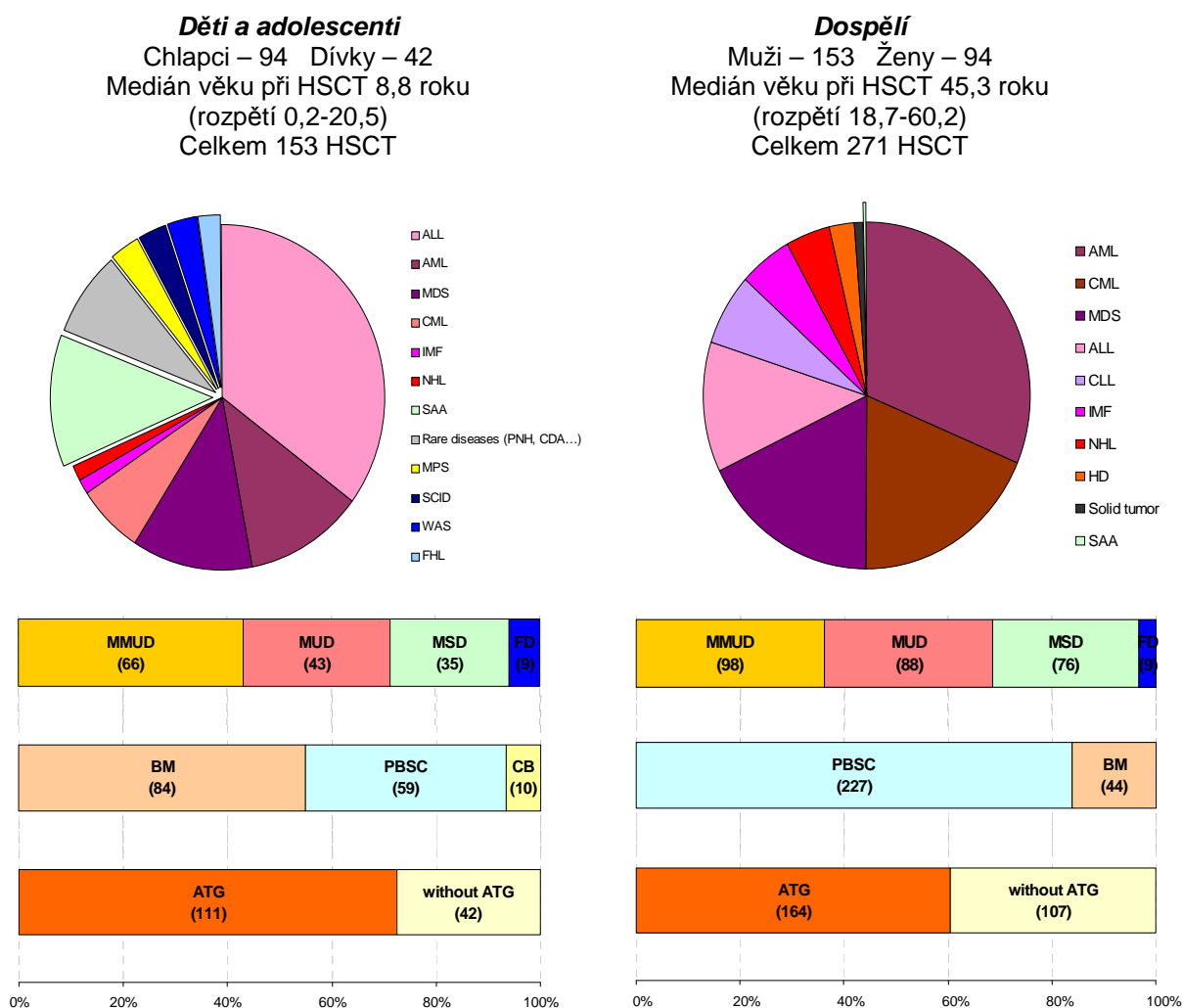
Výsledky jsme v případě herpesvirů vyjadřovali normalizované na 10 000 lidských genomických ekvivalentů (g.e.), u zbylých virů pak na 1 ml vstupního biologického materiálu.

## 7. Výsledky

V od ledna 2001 do října 2008 jsme vyšetřili vzorky od 217 dětských a 382 dospělých pacientů po alogenní HSCT. Medián věku pacientů při HSCT byl 8,9 (rozmezí 0,2-18,5 roku ) u dětí a 45,6 roku (rozmezí 18,7-75,1 roku ) u dospělých. Vyšetřili jsme celkem 7 520 vzorků od dětských pacientů (medián 31 vzorků na pacienta), kteří byli transplantováni na jednotce transplantace kostní dřeně Kliniky dětské hematologie a onkologie (KDHO) 2. LF UK a FN Motol a 8 237 vzorků od dospělých pacientů transplantovaných v Ústavu hematologie a krevní transfúze (ÚHKT) (medián 20 vzorků na pacienta). Celkem se jednalo o 14 867 vzorků krve (6 964 vzorků od pacientů z KDHO a 7 903 vzorků od pacientů z ÚHKT). Mimo to jsme testovali také 890 vzorků moči, stolic, likvorů, bronchoalveolární laváže, výplachů z endotracheální kanyly, či vzorků získaných při pitvách zemřelých pacientů (560 od pacientů z KDHO a 330 od pacientů z ÚHKT).

Analýza provedená v lednu 2008 a zobrazená na obrázku 15 charakterizuje vyšetřované skupiny dětských a dospělých pacientů, stejně jako rizikové faktory pro virové reaktivace v průběhu transplantační přípravy (viz také článek 1 a 2), typy štěpů i počet a typ letálních komplikací vyskytujících se po HSCT v této skupině pacientů.

Obrázek 15.



31 pacientů zemřelo na relaps/progresi primárního onemocnění (10), MOF a sepsii (5), těžkou GvHD (5), invazivní mykotickou infekci (6), difúzní alveolární krvácení (1), CNS krvácení (1), CMV pneumonitis (2) a encefalopatii (1).

106 pacientů zemřelo na relaps/progresi primárního onemocnění (32), MOF a sepsi (5), těžkou GvHD (21), plicní a CNS toxicitu (12), infekční komplikace (29), rejekci štěpu (3), mozkovou mrtvici (2), GIT krvácení (1) a plicní embolii (1).

## 8. Reaktivace $\alpha$ -herpesvirů

Reaktivace HSV a VZV jsme testovali v 3 057 vzorcích od 147 dětských pacientů a v 2 649 vzorcích od 302 dospělých pacientů.

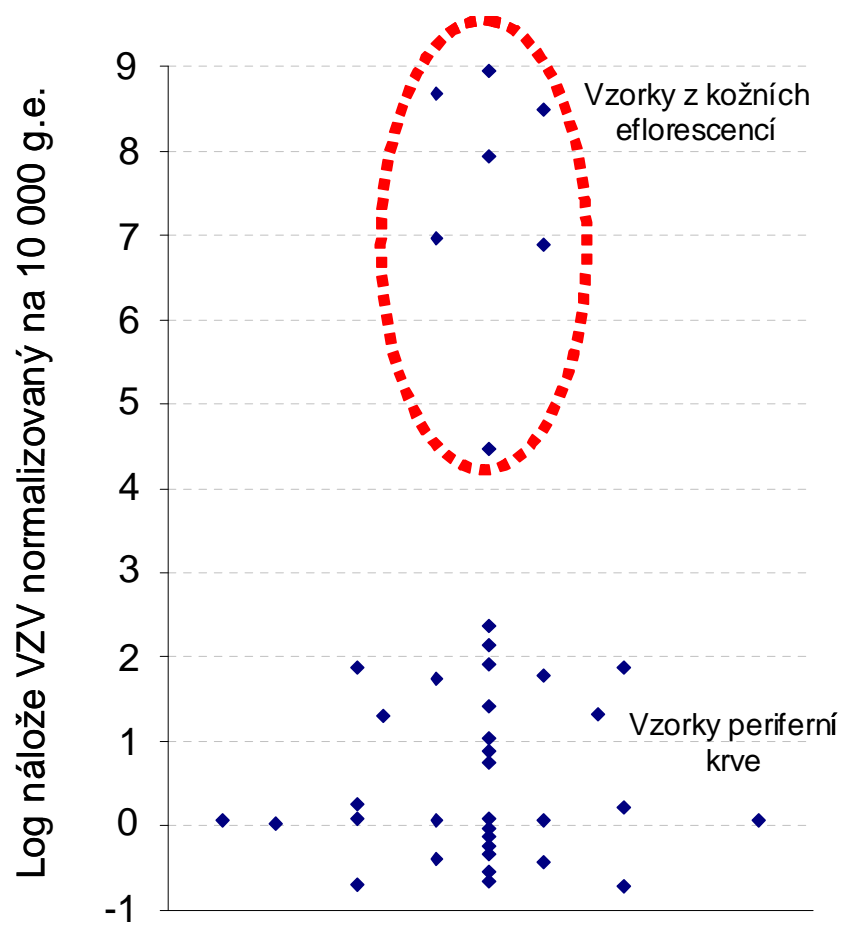
HSV jsme detekovali ve 48 vzorcích periferní krve (1,5%) od 24 dětských pacientů (medián pozitivních 11,3 kopie HSV na 10 000 g.e.) a v 5 vzorcích periferní krve (0,1%) od pěti dospělých pacientů po HSCT (medián pozitivních 5,01 kopie HSV na 10 000 g.e.). Mimo to jsme detekovali HSV v celkem 7 vzorcích získaných z dýchacích cest a kožních eflorescencí od 3 dětských a 3 dospělých pacientů (medián 821,4 kopie HSV na 10 000 g.e.).

Přítomnost VZV jsme testovali celkem v 3 046 vzorcích od 136 dětských pacientů a v 2 496 vzorcích od 267 dospělých pacientů.

VZV jsme detekovali v 18 vzorcích periferní krve (0,6%) od 8 dětských pacientů (medián pozitivních 1,2 kopie VZV na 10 000 g.e.) a v 13 vzorcích periferní krve (0,5%) od pěti dospělých pacientů po HSCT (medián pozitivních 1,2 kopie VZV na 10 000 g.e.). Mimo to jsme detekovali VZV v celkem 6 vzorcích získaných z kožních eflorescencí a jednom vzorku likvoru od 1 dětského a 5 dospělých pacientů (medián pozitivity ve vzorku z kožních eflorescencí 888 749 902 kopie VZV na 10 000 g.e.). Na obrázku 16 je dokumentován obrovský rozdíl ve kvantitě detekované v periferní krvi a obsahu puchýřků pásového oparu, či planých neštovic po HSCT.

I u našich pacientů jsou tedy reaktivace HSV a VZV velmi vzácné. Žádný s pozitivních pacientů v době reaktivace již nebyl profylakticky léčen acyklovirem. U všech pacientů došlo po nasazení terapeutické dávky acykloviru k významnému zlepšení a následně odeznění příznaků infekce.

Obrázek 16.



## 9. Detekce $\beta$ -herpesvirů

### 9.1. CMV

Celkem jsme přítomnost CMV testovali v 6 863 vzorcích krve od 217 dětských pacientů a 7 849 vzorcích od 382 dospělých pacientů. Navíc jsme přítomnost CMV testovali také v 879 vzorcích tkání a tělních tekutin jako jsou likvor, bronchoalveolární laváže, stolice, výplachy z endotracheální kanyly, biopsie či vzorky tkání zemřelých pacientů.

Od roku 2003 jsme začali pre-emptivní terapii virostatiky nasazovat při překročení hladiny 100 normalizovaných kopií v periferní krvi. Celkem tuto hranici překročilo 55 dětských (25,3%) a 123 dospělých (32,1%) pacientů. Symptomatická CMV infekce se pak objevila u 22 dětských a 46 dospělých pacientů a objevení se příznaků zpravidla odpovídalo naměřené kvantitě kolem 1 000 kopií CMV na 10 000 g.e.. Nejčastěji se jednalo o pokles v krevním obraze. U několika z nich však i přes terapii došlo k rozvoji plně symptomatické CMV nemoci a to jako CMV pneumonie (5 dospělých, 6 dětí), CMV kolitida (7 dospělých, 1 dětský pacient) a encefalitidu (1). Fatální průběh pak měla CMV infekce u 9 dospělých a 7 dětí; z nich u 2 dospělých a 2 dětí se na fatálním průběhu podepsala kombinace CMV a invazivní mykózy, s výjimkou jednoho pacienta pak byla u všech dalších pacientů podávána vyšší imunosupresivní terapie, hlavně jako terapie GvHD. Obrázek 17 pak znázorňuje kumulativní incidenci CMV v jednotlivých hladinách normalizované positivity u dětských pacientů. Obrázek dokumentuje častou přítomnost benigních reaktivací, bez nutnosti terapie, jak jsou prezentovány například na obrázku 18. Příklad opakované léčené reaktive, stejně jako dokumentovaný pokles CMV v reakci na léčbu je prezentován v příloženém publikovaném článku č. 1 a také v článku č.7. CMV reaktivaci jsme tedy celkem úspěšně léčili u 159 pacientů po HSCT (89%), kteří překročili naši hranici pro terapii.

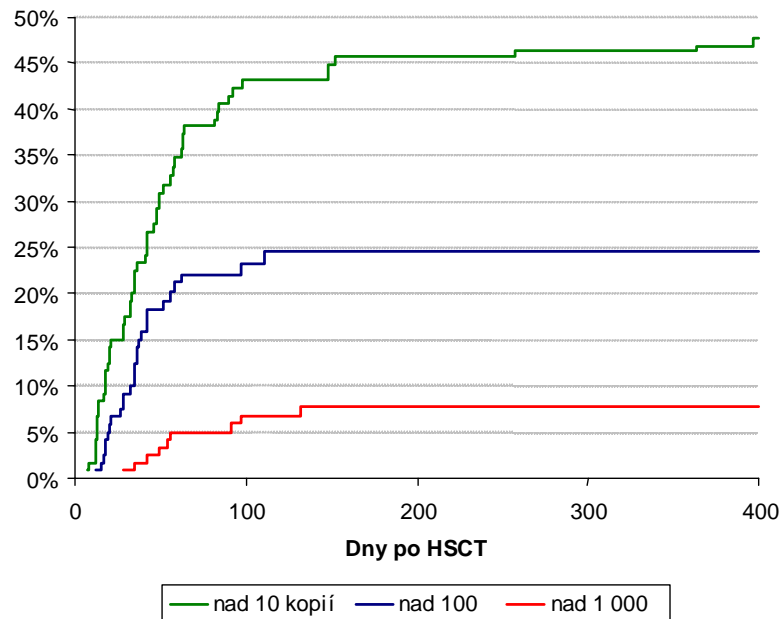
Lékem první volby byl zpravidla ganciklovir, v případě dospělých pacientů pak často valganciklovir. Pokud terapie nebyla úspěšná byla nasazena terapie foscarnetem a několikrát byl použit také cidofovir, případně kombinace uvedených léků. V terapii plně rozvinuté CMV pneumonie byl také použit v deseti případech hyperimunní globulin (Cytotect).

Z důvodů popsaných v úvodu jsme výsledky jsme hodnotili i s ohledem na séroreaktivitu proti CMV dárce a příjemce. Na obrázku 19 je znázorněna kumulativní incidence CMV positivity vyjádřená

v kombinaci dárce a příjemce. I v naší analýze je jasný dopad sérologického vyšetřování před HSCT velmi sporný, zejména s ohledem na to, že jeden z pacientů, kteří byli transplantováni jako neriziková (D-/R-kombinace) vyvinul následně fatální CMV pneumonii. I na základě tohoto pozorování lze tedy o validitě sérologických testů u pacientů dlouhodobě léčených chemoterapií pochybovat a nelze je vždy brát za zcela spolehlivé.

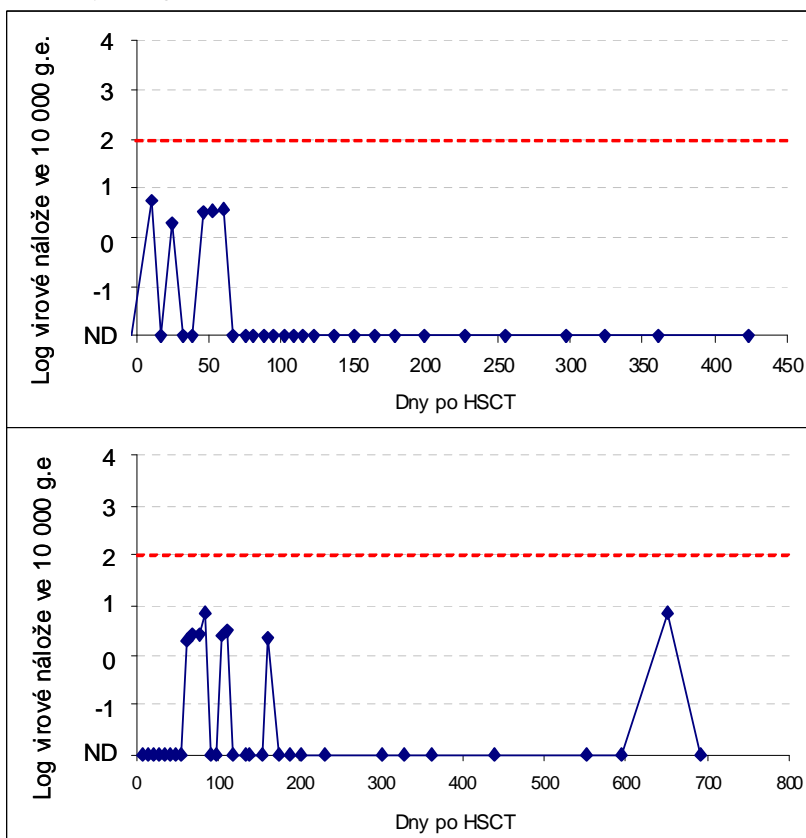
Obrázek 17.

Kumulativní incidence CMV v jednotlivých hladinách positivity.



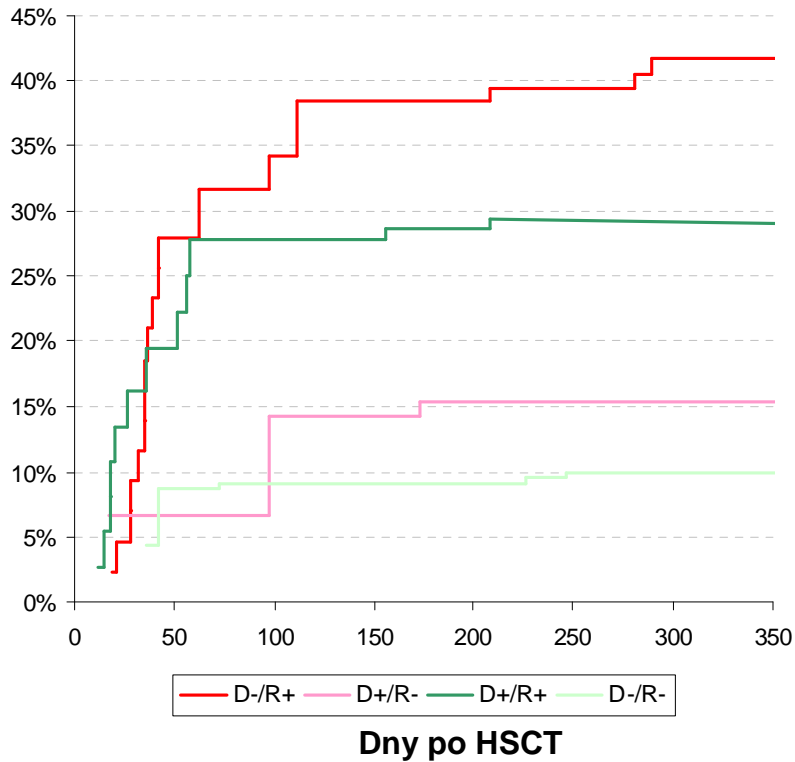
Obrázek 18.

Příklady benigní, neléčené reaktivace CMV.



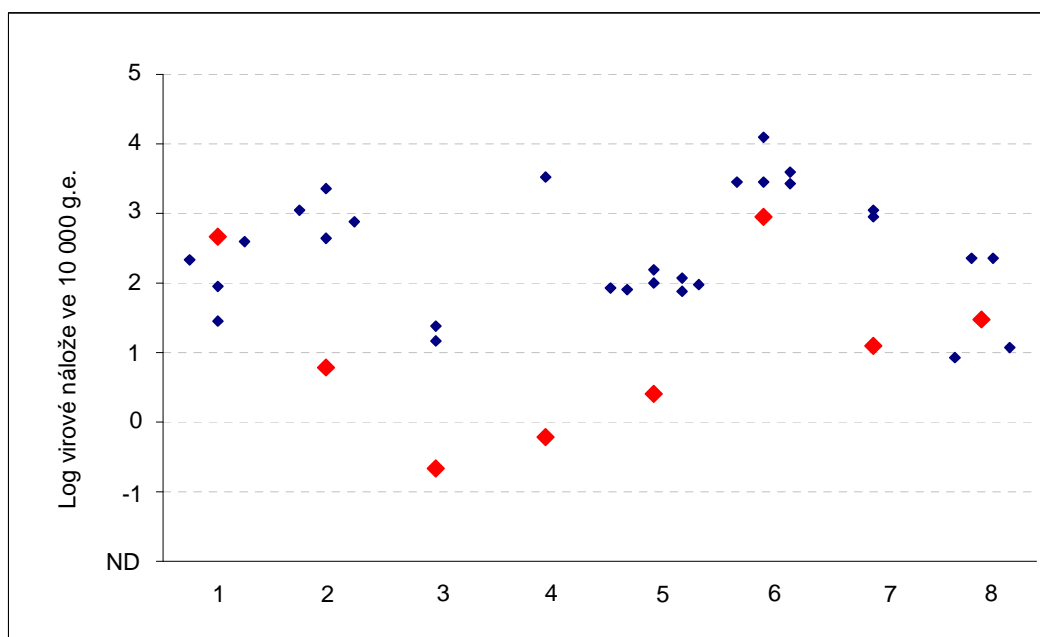
Obrázek 19.

Na obrázku je dokumentována kumulativní incidence CMV detekce do jednoho roku po HSCT podle sérologické odpovědi D/R před HSCT mezi dětskými pacienty.



Obrázek 20.

Ukázky rozdílů normalizované kvantity CMV v plicní tkáni (modře) a periferní krvi (červeně) před úmrtím u osmi pacientů. Pacienti č. 1 a 8 zemřeli na kombinaci CMV, mykózy a GvHD, pacient č. 6 pak na floridní CMV pneumonii s GCV-rezistentní mutantou.





Dalším problémem, ke kterému nás tento případ úmrtí na CMV pneumonitidu u D-/R- pacienta přivedl, je rozdíl kvantitativní CMV DNA v postižené tkáni a periferní krvi, odkud se běžně CMV detekuje (viz obrázek 20). Za šest let detekce CMV u pacientů po HSCT jsme vypracovali postup, při kterém se při pitvě pacienta snažíme odebrat nefixované vzorky z téměř všech tkání zemřelého pacienta. Z grafu na obrázku 20 je pak jasné vidět dvou- až tří-řádkový rozdíl v detekované normalizované kvantitě v postižené tkáni (zejména plicní) a detekcí těsně před úmrtím v periferní krvi. S výjimkou pacienta č. 6 z obrázku se u všech jednalo o infekci, kterou se dařilo alespoň částečně kontrolovat virostatickou terapií. U pacienta č. 6 se infekci nepodařilo kvůli typu HSCT, času od HSCT a také vyvinutí GCV-rezistentní mutanty viru zvládnout (podrobněji viz níže v článku č. 7).

Protože terapie plně rozvinuté CMV nemoci je stále velmi svízelná, zvláště v případě vývoje rezistentních mutant viru, rozhodli jsme se naše úspěšné použití původně velmi zavrhané kombinace cidofoviru a foscarnetu při léčbě symptomatické CMV encefalitidy s retinitidou publikovat v časopise *Pediatric Transplantation* (článek č.1). Na tomto případě jsme pak mimo možnosti vcelku bezpečného použití kombinace neurotoxických léků demonstrovali také důležitost přítomnosti specifické imunity, v našem případě zcela bazálně reprezentovanou počtem CD4+, CD8+ a NK buněk, pro kontrolu CMV infekce. Mimo to jsme se díky této zkušenosti zaměřili také na detekování rezistentních mutant viru. Mimo zavedení metodiky restriktivního stěpení na pracovišti lékařské virologie 2. LF UK a FN Motol detekujících tyto GCV rezistentní mutanty<sup>118</sup>, jsme také navázali spolupráci s dr. Davidem Boutolleau z Paříže a nechali vytypované vzorky 22 dětských pacientů suspektních z přítomnosti rezistentních mutant CMV osekvenovat. Výsledky těchto sekvenací s detekcí mutant v UL97 i UL54 jsou prezentovány v tabulce 6. U čtyř z nich (žlutá pole v tabulce) jsme mutace v testovaných genech prokázali.

Ve článkách č. 2 a 3 jsme pak do analýzy pacientů transplantovaných vysoce neshodným dárcem MMUD po přípravě ATG, stejně jako u pacientů po MMUD HSCT transplantovaných pro leukémie zavzali do hodnocení také výskyt virových komplikací, coby známých faktorů ovlivňujících přežití po HSCT. V obou článkách jsme se věnovali prognóze pacientů ve vysokém riziku potransplantačních komplikací jako jsou pacienti transplantovaní s velkou HLA neshodou a s velkým rizikem reaktivací virových infekcí po HSCT jako jsou pacienti s použitým ATG v průběhu přípravného režimu.

Tabulka 6.

| Číslo vzorku | Pacient č. | Iniciály pacienta | CMV normalizo vany na 10000 g.e. | Prokázaná rezistence | Polymorfismus | Meznámý   | Prokázaná rezistence | Polymorfismus                               | Meznámý              |
|--------------|------------|-------------------|----------------------------------|----------------------|---------------|-----------|----------------------|---|----------------------|
| 1            | 2801       | LE                | 1025                             | -                    | -             | -         | -                    | A885T S897L                                 | -                    |
| 2            | 16899      | K.T.              | 35192                            | -                    | Netestováno   | -         | -                    | P628L S655L N685S A885T                     | Ins S885             |
| 3            | 17332      | K.T.              | 3123                             | -                    | -             | -         | -                    | Netestováno                                 | -                    |
| 4            | 18663      | K.T.              | 421                              | -                    | -             | -         | -                    | Netestováno                                 | -                    |
| 5            | 18010      | MŘ                | 2237                             | -                    | -             | -         | -                    | G629S S655L N685S A885T N898D               | -                    |
| 6            | 22641      | T.K               | 2624                             | -                    | -             | -         | -                    | -   | K316R                |
| 7            | 22737      | T.K               | 384                              | -                    | Netestováno   | -         | -                    | -   | K316R                |
| 8            | 8643       | D.H.              | 295                              | -                    | Netestováno   | -         | -                    | M640R A885T P887S S897L N898D               | -                    |
| 9            | 20273      | L.K.              | 183                              | -                    | Netestováno   | -         | -                    | Netestováno                                 | -                    |
| 10           | 23709      | K.V               | 728                              | -                    | -             | -         | -                    | S655L N685S G874[R,G] A885T L890[F,L] N898D | V1051[A,V]           |
| 11           | 20037      | L.C               | 1147                             | -                    | Netestováno   | -         | -                    | A885T S897L                                 | -                    |
| 12           | 20272      | L.C               | 13734                            | L595[S,I]            | -             | -         | -                    | A885T S897L                                 | -                    |
| 13           | 20817      | L.C               | 1846                             | -                    | -             | -         | -                    | A885T S897L                                 | -                    |
| 14           | 21895      | L.C               | 2625                             | -                    | -             | -         | -                    | Netestováno                                 | -                    |
| 15           | 23724      | L.C               | 13266                            | L595S                | -             | -         | -                    | A885T S897L                                 | T700[R,T]            |
| 16           | 6634       | J.G.H.            | 819                              | -                    | -             | -         | -                    | A885T S897L                                 | -                    |
| 17           | 1083       | P.Š.              | 1057                             | -                    | Netestováno   | -         | -                    | Netestováno                                 | -                    |
| 18           | 10809      | K.H.              | 4433                             | L595S                | -             | -         | -                    | S655L F669L N685S A885T N898D               | -                    |
| 19           | 10870      | K.H.              | 4561                             | L595S                | -             | -         | -                    | S655L F669L N685S A885T N898D               | -                    |
| 20           | 11698      | K.H.              | 4240                             | L595S                | -             | -         | Del991.982           | S655L F669L N685S A885T N898D               | R348[O,R] V1057[E,V] |
| 21           | 21485      | T.F.              | 5261                             | -                    | -             | -         | -                    | A885T S897L N898D                           | -                    |
| 22           | 20556      | V.Ř.              | 1240                             | -                    | -             | -         | -                    | S655L N685S V759M A885T N898D               | -                    |
| 23           | 20353      | K.C.              | 1032                             | -                    | -             | -         | -                    | S655L N685S V759M A885T N898D               | -                    |
| 24           | 20888      | K.C.              | 6819                             | A591V                | -             | G579S     | H408K V715M          | S655L F669L N685S A885T N898D               | -                    |
| 25           | 20924      | K.C.              | 6577                             | A591V                | -             | G579S     | H408K V715M          | S655L F669L N685S A885T N898D               | -                    |
| 26           | 1909       | N.N.H.            | 12978                            | -                    | -             | -         | -                    | Netestováno                                 | -                    |
| 27           | 2764       | N.N.H.            | 125                              | -                    | -             | L426[M,L] | -                    | S655L G678[S,G] N685S G874R A885T N898D     | -                    |
| 28           | 15666      | R.W.              | 550                              | -                    | -             | -         | -                    | S655L F669L N685S A885T N898D               | -                    |
| 29           | 16917      | R.W.              | 3920                             | -                    | -             | -         | -                    | S655L F669L N685S A885T N898D               | -                    |
| 30           | 8708       | D.R.              | 2612                             | -                    | -             | -         | -                    | M640R A885T P887S S897L N898D               | -                    |
| 31           | 10822      | K.O.              | 517                              | -                    | -             | -         | -                    | Netestováno                                 | -                    |
| 32           | 21371      | P.K.              | 1073                             | -                    | -             | -         | -                    | A885T S897L                                 | -                    |
| 33           | 22586      | P.K.              | 85896                            | L595S                | -             | H411[M,H] | P522[S,P]            | A885T S897L                                 | -                    |
| 34           | 22587      | P.K.              | 100000                           | L595S                | -             | -         | -                    | A885T S897L                                 | -                    |
| 35           | 4922       | P.Č.              | 542                              | -                    | -             | -         | -                    | S655L N685S A885T                           | Ins S885             |
| 36           | 6073       | M.A.              | 183                              | -                    | -             | -         | -                    | Netestováno                                 | -                    |
| 37           | 8707       | D.P.              | 617                              | -                    | -             | R67C      | -                    | Netestováno                                 | -                    |

# Cytomegalovirus encephalitis/retinitis in allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipient treated successfully with combination of cidofovir and foscarnet

Hubacek P, Keslova P, Formankova R, Pochop P, Cinek O, Zajac M, Lochmanova J, Stary J, Sedlacek P. Cytomegalovirus encephalitis/retinitis in allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipient treated successfully with combination of cidofovir and foscarnet. *Pediatr Transplantation* 2008. © 2008 Wiley Periodicals, Inc.

**Abstract:** We report an 18-yr-old female patient with repeated CMV reactivations after HSCT treated by several pre-emptive courses of virostatic therapy. Seven months after HSCT, she developed CMV encephalitis/retinitis. Initial therapy with GCV and hyperimmune globulin failed, later on GCV-resistant strain was detected. Continual increase of CMV DNA in peripheral blood led us to combined therapy with CDV and FCV which was successful and free of severe renal toxicity. To our best knowledge, this is the first reported case of successful CMV treatment with a combination of CDV and FCV.

**Petr Hubacek<sup>1</sup>, Petra Keslova<sup>1</sup>, Renata Formankova<sup>1</sup>, Pavel Pochop<sup>2</sup>, Ondrej Cinek<sup>3</sup>, Miroslav Zajac<sup>4</sup>, Jana Lochmanova<sup>5</sup>, Jan Stary<sup>1</sup> and Petr Sedlacek<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Department of Paediatric Haematology and Oncology, Second Medical School, Charles University in Prague, Motol University Hospital, Prague, Czech Republic, <sup>2</sup>Department of Ophthalmology for Children and Adults, Second Medical School, Charles University in Prague, Motol University Hospital, Prague, Czech Republic, <sup>3</sup>Department of Paediatrics, Second Medical School, Charles University in Prague, Motol University Hospital, Prague, Czech Republic, <sup>4</sup>Department of Microbiology, Second Medical School, Charles University in Prague, Motol University Hospital, Prague, Czech Republic, <sup>5</sup>Center of Molecular Biology and Gene Therapy, Department of Internal Medicine, Hematooncology, University Hospital Brno and Masaryk University, Brno, Czech Republic

**Key words:** cytomegalovirus – transplantation – ganciclovir resistance – cidofovir – foscarnet

Petr Hubacek, MD, Department of Paediatric Haematology and Oncology, Second Medical School, Charles University in Prague, Motol University Hospital, V Uvalu 84, Prague 5 – CZ 150 06, Czech Republic  
Tel.: +420 224 432 026  
Fax: +420 224 432 020  
E-mail: petr.hubacek@lfmotol.cuni.cz

The study was performed in the Motol University Hospital, Prague, Czech Republic

Accepted for publication 5 September 2008

**Abbreviations:** AML, acute myeloid leukaemia; ATG, anti-thymocyte globulin; CDV, cidofovir; CMV, cytomegalovirus; CSF, cerebrospinal fluid; FCV, foscarnet; GCV, ganciclovir; GvHD, graft versus host disease; HSCT, haematopoietic stem cell transplantation; PCR, polymerase chain reaction; SCT, stem cell transplantation.

CMV disease remains serious complication following allogeneic HSCT. Recent approach to prevent CMV disease is based on regular PCR monitoring and initiation of pre-emptive therapy with virostatics in positive but still asymptomatic patients. Unfortunately, treatment possibilities in HSCT recipients are seriously limited by bone



Hubacek et al.

marrow suppression during GCV treatment (1, 2) and nephrotoxicity in FCV (3, 4) and CDV (5). Especially, combination of FCV and CDV together is considered highly toxic.

### Case report

We report a girl diagnosed with AML in February 2003 at the age of 16 yr. Following therapy according to protocol BFM AML 98, she achieved complete remission. However, in January 2005, relapse of leukaemia was diagnosed. She was then successfully treated according to protocol AML REZ 2004 and was indicated to allogeneic HSCT from an unrelated donor in a second haematological remission of AML.

In June 2005, she underwent peripheral blood SCT using human leukocyte antigen allele mismatched 7/10 (B, Cw, Cw), CMV seronegative unmanipulated graft from a male donor. Cellularity of the graft was as follows:  $12.9 \times 10^8$  nucleated cells/kg body wt,  $11.12 \times 10^6$  CD34+ cells/kg body wt and  $302.1 \times 10^6$  CD3+ cells/kg body wt. The conditioning regimen consisted of oral busulphan 16 mg/kg bw, cyclophosphamide 120 mg/kg body wt and melphalan 140 mg per square metre. GvHD prophylaxis consisted of ATG (rabbit ATG Fresenius), standard short term methotrexate and cyclosporine A. She engrafted with granulocytes  $> 500 \times 10^6/L$  on day (D)+16 and platelets  $> 20 \times 10^9/L$  on D+26 with last transfusion of platelets being performed on D+19. Acute GvHD grade II was presented on D+61 (skin and gut involvement) and was successfully treated with methylprednisolone 1 mg/kg/day. As a good response was observed, the steroids were gradually tapered off and finally discontinued on D+105 with no signs of GvHD reactivation. On D+150, she developed skin rash and because of suspected skin GvHD, we initiated therapy with methylprednisolone in the dose of 1 mg/kg/day. Skin biopsy was performed but was inconsistent with GvHD, therefore steroids were discontinued three wk later. Till, the D+210 cyclosporine was gradually tapered and discontinued with no signs of GvHD reactivation since.

We considered this patient to be at a high risk of CMV reactivation as the donor was CMV seronegative and patient was seropositive pre-SCT. Monitoring of viral loads from the whole blood was performed using the quantitative real-time PCR technique on weekly basis starting at D+7 following HSCT. The obtained viral loads were normalized to 100 000 human genomic equivalents obtained by quantification of

albumin gene. During the clinically apparent CMV disease, we started to monitor the viral load two or three times a week and we tested both blood and plasma. CMV DNA was detected for the first time on D+20, and on D+27, the viral load crossed our threshold for treatment (1000 normalized viral copies). We started the pre-emptive therapy with GCV (5 mg/kg twice daily) and since that time she was treated with different virostatics almost continuously until D+311 (see Fig. 1a). Six months later during the ongoing treatment with FCV (maintenance dose of 90 mg/kg/day), we detected further increase of CMV DNA load in peripheral blood. At that time, she suffered from a headache and visual acuity decreased bilateral to 0.6. Therefore, we performed the lumbar puncture with positive detection of CMV in CSF about 2 600 000 viral copies/mL. Clinical suspicion of FCV-resistant viral strain and presence of symptomatic CMV disease led us to change the therapy to combination of GCV, CDV (5 mg/kg/wk) and hyperimmune globulin instead of combination of GCV, FCV and hyperimmune globulin. Ophthalmological examination confirmed retinitis of both eyes related most probably to CMV (Fig. 2). Thirteen days later, the viral load increased despite this therapy (see Fig. 1a). We suspected the presence of GCV-resistant CMV strain because of which we changed the therapy to combination of FCV (120 mg/kg/day) with CDV (5 mg/kg/wk with probenecid) and closely monitored renal function parameters as both drugs are known to be nephrotoxic (3, 4). Beside virostatics, we continued with administration of CMV hyperimmune globulin (Cytotect). Clinical status slightly improved. Being aware of potential kidney toxicity, two wk later, we switched the therapy back to GCV, CDV and hyperimmune globulin. Shortly afterwards, we observed another peak in the CMV load which decreased below our threshold one wk later and stayed there since that time (see Fig. 1a). In total, we administered four doses of CDV. The concomitant treatment of FCV and CDV lasted nine days.

The patient currently has no signs of CMV infection. Her blood counts are completely normal and she started to produce CMV-specific antibodies. Repeated ophthalmological examination revealed irreversible changes in retina because of CMV infection. Final visual acuity dropped to 0.1 in the right eye and to 0.5 in the left eye.

We retrospectively documented the presence of GCV-resistant CMV strain in the stored DNA samples with the method described by Chou



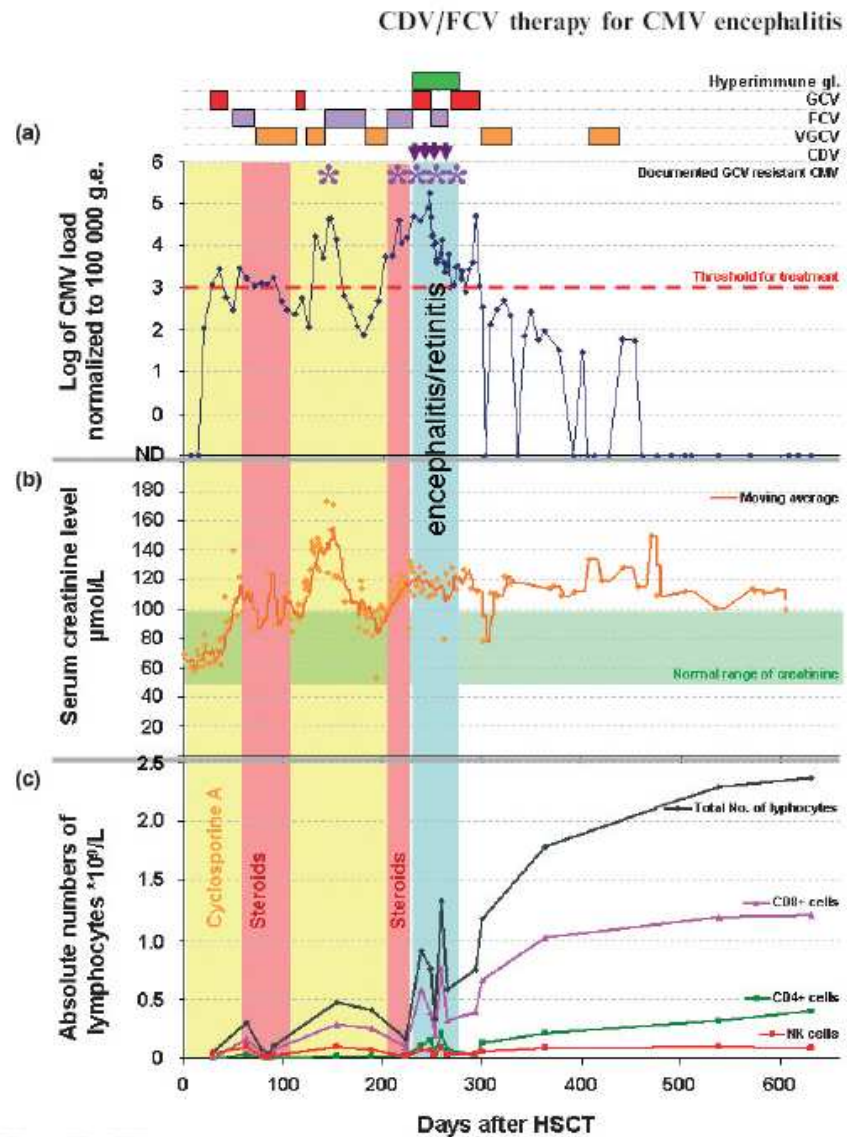


Fig. 1. (a) The virostatic treatment. (b) The serum creatinine levels. (c) The reconstitution of lymphocytes after HSCT.

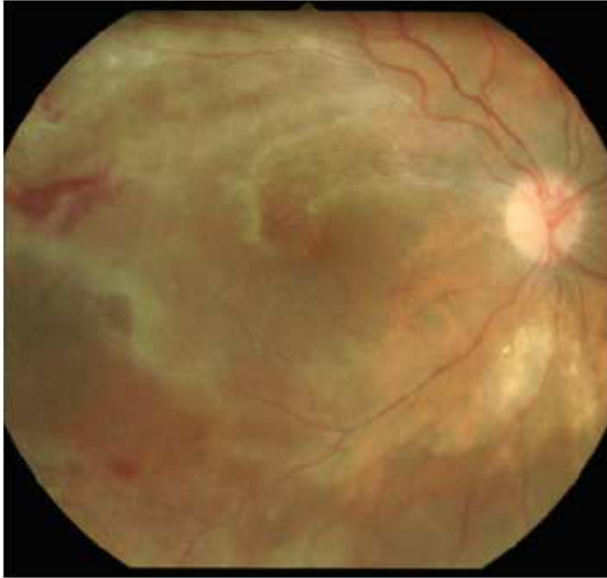
et al. (6) which is based on the analysis of gene for viral phosphotransferase (UL97). We proved the presence of GCV-resistant strain in the samples obtained from peripheral blood and CSF during the episode of encephalitis/retinitis (Fig. 1a). It explains the insufficiency of therapy with GCV at that time.

We also analyzed the renal parameters before, during, and after the treatment with CDV. We did not observe any proteinuria but only mild increase of serum creatinine above our reference range during the treatment with FCV and CDV (Fig. 1b). Later on, creatinine levels returned to virtually normal values.

Reconstitution of cellular immunity and of specific T lymphocytes in particular plays a key role in the resolution of CMV reactivation. Therefore, we analyzed the kinetics of lymphocytes detected in peripheral blood in connection to immunosuppressive treatment and CMV

reactivation. During the therapy with steroids, the lymphocyte count decreased to almost undetectable counts. After short lasting steroid therapy was discontinued, lymphocyte counts again started to increase (see Fig. 1c). Retrospectively, we consider the skin rash to be potentially related to the administration of FCV as was already published elsewhere (7). The final resolution of clinical problems was observed only after recovery of lymphocyte counts (see Fig. 1c).

Concomitant administration of CDV and FCV proved to be safe and successful in the management of life-threatening CMV disease in our patient. Since the resolution of clinical problems in the immunocompromised patients is related to reconstitution of cellular immunity, a significant contribution of cellular immunity acting synergically with the virostatic therapy on the improvement of encephalitis in our patient can not be ruled out. Nevertheless, the reconstitution



*Fig. 2.* The figure documents retinal necrosis, retinal haemorrhages, perivascular infiltration and focal vascular irregularity caused by CMV retinitis in the posterior pole of the right eye.

of lymphocyte count was truly apparent only after the decrease of CMV load during the virostatic treatment followed by final resolution of the infection (see Fig. 1c). Therefore, not only ongoing reconstitution of lymphocyte count, but also combined virostatic therapy was probably involved in controlling of the infection and favourable outcome.

This case made us introduce the detection of GCV-resistant strains in similar cases because of which we are now able to prospectively modify the virostatic therapy. Moreover, recently we have also started to monitor reconstitution of CMV-specific lymphocytes.

To our knowledge, this is the first published successful use of combined therapy with CDV

and FCV. We did not observe signs of severe nephrotoxicity either during or after the therapy. We are aware that most patients with CMV disease following HSCT are – unlike our patient – on immunosuppressive therapy which includes nephrotoxic drugs such as cyclosporine A or tacrolimus but our experience may vindicate concomitant using of CDV and FCV in particular patients.

#### Acknowledgments

This study was supported by grants from Ministry of Health of the Czech Republic No. FNM 00064203 and No. 6502 and grant from Ministry of Education of the Czech Republic No. 0021620813.

#### References

1. MCGAVIN JK, GOA KL. Ganciclovir. An update of its use in the prevention of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Drugs* 2001; 61: 1153–1183.
2. BATTIWALLA M, WU Y, BAJWA RP, et al. Ganciclovir inhibits lymphocyte proliferation by impairing DNA synthesis. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007; 13: 765–770.
3. WAGSTAFF AJ, BRYSON HM. Foscarnet. A reappraisal of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in immunocompromised patients with viral infections. *Drugs* 1994; 48: 199–226.
4. CHRISP P, CLISSOLD SP. Foscarnet. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in immunocompromised patients with cytomegalovirus retinitis. *Drugs* 1991; 41: 104–129.
5. CESARO S, ZHOU X, MANZARDO C, et al. Cidofovir for cytomegalovirus reactivation in pediatric patients after hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Virol* 2005; 34: 129–132.
6. CHOU S, ERICE A, JORDAN MC, et al. Analysis of the UL97 phosphotransferase coding sequence in clinical cytomegalovirus isolates and identification of mutations conferring ganciclovir resistance. *J Infect Dis* 1995; 171: 576–583.
7. NARIMATSU H, KAMI M, KATO D, et al. Reduced dose of foscarnet as preemptive therapy for cytomegalovirus infection following reduced-intensity cord blood transplantation. *Transpl Infect Dis* 2007; 9: 11–15.



# Allogeneic stem cell transplantation in children with leukemia using human leukocyte antigen-mismatched unrelated donors

Sedlacek P, Formankova R, Mejstrikova E, Keslova P, Hubacek P, Dobrovolna M, Vrana M, Kupkova L, Pittrova H, Stary J. Allogeneic stem cell transplantation in children with leukemia using human leukocyte antigen-mismatched unrelated donors  
Pediatr Transplantation 2007. © 2007 Blackwell Munksgaard

**Abstract:** Allogeneic HSCT is a curative treatment, when chemotherapy fails, for certain malignant diseases. In Europe, only 15% of the indicated children have an HLA-matched sibling available; in 65–70% of others, HLA allele-matched (9–10/10) UD can be identified. For the rest, it is necessary to identify other alternative donors (HLA-mismatched family or unrelated cord blood). We present our data of HSCT using HLA partially allele-mismatched (7–8/10) UD in 24 children with leukemia. Uniform GvHD prophylaxis was used (rATG, CsA and MTX). Acute GvHD grade II was diagnosed in 70.8% of the patients and grade III–IV in 12.5%. Overall incidence of chronic GvHD was 38.7% (extensive in 30%). The probability of EFS was 60.3% (95% CI 35.5–78.1) and OS was 74.9 (95% CI 49.1–88.9). No difference in survival between PBSC and BM recipients was observed. TRM at day +100 was 4%, and overall was 12.5%. We conclude that used combination of drugs for GvHD prophylaxis is efficient even for patients transplanted with grafts from a HLA-mismatched UD. It enables stable engraftment, good control of GvHD, full reconstitution of immunity, and is not connected with unacceptable transplant-related mortality.

**Petr Sedlacek<sup>1</sup>, Renata Formankova<sup>1</sup>, Ester Mejstrikova<sup>1</sup>, Petra Keslova<sup>1</sup>, Petr Hubacek<sup>1</sup>, Marie Dobrovolna<sup>2</sup>, Milena Vrana<sup>2</sup>, Libuse Kupkova<sup>3</sup>, Helena Pittrova<sup>4</sup> and Jan Stary<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Department of Pediatric Hematology and Oncology, University Hospital Motol, 2nd Medical School, Charles University, Prague, Czech Republic, <sup>2</sup>Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic, <sup>3</sup>Czech Stem Cell Registry, Prague, Czech Republic, <sup>4</sup>Czech National Marrow Donors Registry, Pilsen, Czech Republic

**Key words:** allogeneic hematopoietic stem cell transplantation – human leukocyte antigen-mismatched – leukemia – unrelated donor – children

Petr Sedlacek, MD, PhD, Hematopoietic Stem Cell Transplant Unit, Department of Pediatric Hematology and Oncology, University Hospital Motol and 2nd Medical School, Charles University, V Uvalu 84, 150 06, Prague, Czech Republic  
Tel.: + 420 22443 6552  
Fax: + 420 22443 6519  
E-mail: petr.sedlacek@lfmotol.cuni.cz

Accepted for publication 11 May 2007

Allogeneic HSCT is a potentially curative treatment for certain malignant diseases. It is often indicated in patients with leukemia where response to chemotherapy is inadequate. Unfor-

tunately, in about 15–20% of the patients, we are not able to find a HLA-matched RD or UD. Infusion of a graft from a HLA partially mismatched donor, unrelated cord blood, or

**Abbreviations:** \*, with 12 men and 12 women;  $\frac{1}{24}$  pair, one pair out of 24 pairs (donor-recipient); ABiL, acute biphenotypic leukemia; ABLC, amphotericin B lipid complex injections; AdV, adenovirus; AML, acute myelogenous leukemia; ANC, absolute neutrophil count; ATG, antithymocyte globulin; BKV, BK virus; BM, bone marrow; cGvHD, chronic graft vs. host disease; CML, chronic myelogenous leukemia; CMV, cytomegalovirus; CsA, cyclosporine A; DLI, donor lymphocyte infusion; EBV, Epstein-Barr virus; EFS, event-free survival; ESG-MRD-ALL, European study group on detection of MRD in acute lymphoblastic leukemia; FPIA, fluorescence polarization immunoassay; GvHD, graft vs. host disease; HHV6, human herpesvirus 6; HHV7, human herpesvirus 7; HLA, human

leukocyte antigen; HLA-A,B,DR, human leukocyte antigens-A,B,DR; HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; HSV, herpes simplex virus; IFI, invasive fungal infection; IgH/TCR, immunoglobulin heavy chain rearrangement/T cell receptor; IST, immunosuppressive therapy; MRD, minimal residual disease; MTX, methotrexate; OS, overall survival; PBSC, peripheral blood stem cells; PCR, polymerase chain reaction; PCR-SSP, polymerase chain reaction-sequence specific primer; QoL, quality of life; STR, short tandem repeats; rATG, rabbit antithymocyte globulin; RD, related donor; TRM, transplant-related mortality; UD, unrelated donor; VNTR, variable number tandem repeats; VZV, Varicella zoster virus.

Sedlacek et al.

haploidentical family donor with graft manipulation is then considered with preference mostly based on local experience and/or availability (1). However, all these alternatives have an increased risk of post-transplant morbidity/mortality because of an increased risk of GvHD, graft failure, and slow immune reconstitution (2, 3). Furthermore, in patients with malignancies, manipulation of the graft may adversely affect a favorable alloreactive effect directed against residual disease (4). Since the beginning of 1999, HLA typing using PCR methods was routinely available at our institution enabling high-resolution (allele) typing of class I (A\*, B\*, Cw\*) and class II HLA antigens (DRB1\*, DQB1\*) in all patient–donor pairs. Based on level of HLA allele match between donor and recipient, we were able to identify an acceptable HLA partially mismatched donor (7–8/10) for a majority of patients lacking a fully matched (9–10 out of 10 alleles) donor. Here, we report our clinical experience with uniform GvHD prophylaxis using a combination of CsA, MTX, and rATG prior to unmanipulated graft administration in children with leukemia (5, 6).

### Patients and methods

Between January 1999 and December 2006, in our unit, 24 consecutive children with leukemia (detailed diagnoses are shown in Table 1) underwent 26 allogeneic HSCT using an HLA-mismatched UD because we failed to identify a suitable HLA-matched donor in the time frame available. The interval between search and day of HSCT ranged from 98 to 492 days, median 147 days.

These 24 patients (age range 2.2–18.1 yr; median 11.3) were transplanted with unmanipulated grafts from UD mismatched in two (13 patients) or three (11 patients) HLA alleles. The locations of the various allele mismatches prospectively identified by PCR-SSP were as follows (A\* -2x, B\* -13x, Cw\* -27x, DRB1\* -4x, DQB1\* -13x). Six out of 24 donor–recipient pairs were matched in six out of six alleles in loci A\*, B\*, or DRB1\*. Another 17/24 (71%) pairs were mismatched in five out of six alleles, 1/24 pair was mismatched in B\*, DRB1\* (and Cw\*) alleles (four out of six alleles); details in Table 1. The median age of UD was 34 yr (age range 22–49) with 12 males and 12 females. Conditioning regimens used for first HSCT were fully myeloablative in 23/24 patients (Table 2).

Uniform GvHD prophylaxis consisted of combination of CsA, MTX, and rATG. CsA starting at day 1 before infusion of the graft was given in two to three daily infusions (over two h) to maintain the trough serum levels of 200–250 µg/L (method of detection – FPIA). MTX was given on day + 1 (15 mg/m<sup>2</sup> or only 10 mg/m<sup>2</sup> in more advanced disease), day + 3 (10 mg/m<sup>2</sup>), and day + 6 (10 mg/m<sup>2</sup>) with leucovorine rescue (15 mg/m<sup>2</sup>) in a single dose 24 h following every dose of MTX. Thymoglobuline was used in four patients in a daily dose 3.75–4 mg/kg for days –4 through –1 (total 15–16 mg/kg). Later on, within further 20 patients, ATG Fresenius S was used in a daily dose 10 mg/kg for days –4 through –1 (total 40 mg/kg).

Primary grafts were PBSC (n = 13) and BM (n = 11). The final decision about type of graft was made by the donor and/or local harvest center based on transplant center preference. Characteristics of grafts are shown in Table 3. Two patients later received a second graft (PBSC) from the same donor, both for leukemia relapse.

Acute and chronic GvHD were diagnosed and graded using established criteria (7, 8) and were primarily treated with prednisone, CsA, tacrolimus, sirolimus, or MMF in standard doses (9–11).

Day of neutrophil engraftment was defined as the first out of three consecutive days when the ANC reached  $0.5 \times 10^9/L$  or more. Platelet engraftment was defined as platelet count  $20(50) \times 10^9/L$  or more for seven consecutive days without transfusion. Chimerism was assessed by using PCR-based analyses of polymorphic VNTR/STR on recipient from unseparated peripheral blood frequently starting on day + 14 and then once weekly until day + 100, later less frequently in patients with stable full donor chimerism, to confirm efficient engraftment and to rule out risk of late graft failure/rejection or relapse (12). PCR assay of specific fusion genes and IgH/TCR receptors according to the type of leukemia was used for MRD monitoring pre and after HSCT. The testing was proceeded and evaluated according to the criteria of the ESG-MRD-ALL (13, 14). A marrow sample was taken routinely in patients with any defined leukemia target two to three wk before HSCT, at days + 28, + 60, + 100, 6 and 12 months after transplantation, or in case of decreasing overall chimerism or positive MRD in previous samples. A complete hematological remission was defined as less than 5% blasts in the marrow aspirate and functional hematopoiesis.

Surveillance of viral infections as a common cause of transplant-related morbidity and mortality was based on quantitative real-time PCR technique on DNA from whole blood. EBV and CMV were screened routinely as part of weekly testing. Other viruses, HSV, VZV, HHV6, HHV7, adenoviruses group A–C, and BK virus (15–17), were tested only in case of clinical suspicion. Results for leukotrophic viruses (CMV, HHV6, HHV7, and EBV) were normalized to 100 000 human genomic equivalents assessed by quantification of the albumin gene.

All these studies were approved by local ethical committee and all parents signed informed consents.

### Results

#### Hematopoietic engraftment and chimerism

Full trilineage-stable primary engraftment was achieved in all 24 children (100%). Engraftment characteristics are listed in Table 3. Complete donor chimerism was observed in all 24 patients, and could be documented after a median of 21 days (range 14–98) with no difference between PBSC and BM. Reappearance of mixed chimerism was detected only in patients with emerging leukemia relapse.

#### GvHD incidence and severity

Acute GvHD grade II was diagnosed in 17 (70.8%) patients; grade III–IV in three (12.5%). Overall incidence of chronic GvHD in 23 evalu-



HSCT in leukemia using HLA-mismatched donors

Table 1.

| UPN | Dg at SCT           | Stage     | Date of SCT | 1st MM | 2nd MM | 3rd MM | rATG brand         | Graft | (DU) CO3 + (kg) bw                 | AGVHD Grade | cGVHD grade | Event         | Outcome          | IST in survivors |
|-----|---------------------|-----------|-------------|--------|--------|--------|--------------------|-------|------------------------------------|-------------|-------------|---------------|------------------|------------------|
| 114 | CML                 | AP        | X-99        | Cw     | Cw     | DOB1   | Thymo 16 mg/kg     | BM    | (1) 10/6                           | III         | Extensive   | Cytog.relapse | Alive/well       | None             |
| 116 | MDS                 | RAEBt/AML | XI-89       | Cw     | Cw     | DOB1   | Thymo 16 mg/kg     | BM    |                                    | 0           | None        |               | Alive/well       | None             |
| 122 | ALL                 | CR2       | III-00      | DOB1   | DOB1   |        | Thymo 16 mg/kg     | BM    |                                    | III         | Not eval    | EBV PTLD      | Died             | ***              |
| 142 | CML                 | CPI       | III-01      | B      | Cw     |        | Fresenius          | BM    |                                    | II          | Extensive   |               | Alive/well       | None             |
| 143 | CML                 | CPI       | IV-01       | B      | Cw     | DOB1   | Fresenius          | PBSC  |                                    | II          | Extensive   |               | Alive/well       | None             |
| 148 | CML                 | CPI       | VI-01       | Cw     | DOB1   | DOB1   | Fresenius          | BM    |                                    | II          | Limited     |               | Alive/well       | None             |
| 153 | MDS                 | RC        | IX-01       | Cw     | Cw     |        | Fresenius          | BM    |                                    | 0           | None        |               | Alive/well       | None             |
| 159 | NHL                 | CR3       | XII-01      | B      | Cw     | DOB1   | Fresenius          | BM    |                                    | II          | None        |               | Alive/well       | None             |
| 173 | ALL                 | CR2       | X-02        | A      | Cw     | Cw     | Fresenius          | BM    |                                    | II          | None        | CMV pneumonia | Died             | ***              |
| 183 | CML                 | CPI       | III-03      | B      | Cw     | DOB1   | Fresenius          | PBSC  |                                    | II          | Limited     |               | Alive/well       | None             |
| 200 | AML                 | PR1       | IX-03       | DRB1   | Cw     | Cw     | Fresenius          | PBSC  | (1) 10/6                           | II          | None        | Relapse       | ***              | ***              |
| 200 | ***                 | CR2       | I-05        |        |        |        | Fresenius 50 mg/kg | PBSC  |                                    | II          | None        |               | Alive/well       | None             |
| 211 | Ph+ALL              | CR1       | III-04      | B      | Cw     |        | Fresenius          | PBSC  |                                    | II          | Extensive   |               | Alive/well       | None             |
| 216 | AML                 | CR3       | IV-04       | DRB1   | Cw     |        | Fresenius          | PBSC  |                                    | 0           | None        | MRD positive  | Alive in relapse | None             |
| 223 | Ph+ALL              | CR1       | VII-04      | B      | Cw     | DOB1   | Fresenius          | PBSC  | (4) 10/5; 5 × 10/6; 10/7; 5 × 10/6 | II          | None        |               | Alive/well       | None             |
| 233 | MDS                 | RAEBt     | XI-04       | B      | Cw     |        | Fresenius          | PBSC  |                                    | IV          | Extensive   | Ext. cGVHD    | Died             | ***              |
| 244 | Ph+ALL              | CR1       | II-05       | A      | DOB1   |        | Fresenius          | BM    |                                    | II          | None        | Relapse       | ***              | ***              |
| 245 | ABtL                | CR1       | VI-05       | B      | Cw     |        | Fresenius          | PBSC  | (2) 10/6; 5 × 10/6                 | II          | None        | Relapse       | ***              | ***              |
| 245 | ***                 | CR2       | VII-06      |        |        |        | Fresenius          | PBSC  |                                    | III-IV      | ***         | MDF           | Died             | ***              |
| 251 | AML                 | CR2       | VI-05       | B      | Cw     | Cw     | Fresenius          | PBSC  |                                    | II          | None        |               | Alive/well       | None             |
| 253 | ALL                 | CR3       | VI-05       | DRB1   | B      | Cw     | Thymo 16 mg/kg     | PBSC  |                                    | II          | Extensive   | Relapse       | Alive in relapse | None             |
| 258 | Ph+ALL              | CR2       | IX-05       | B      | Cw     |        | Fresenius          | PBSC  |                                    | II          | None        |               | Alive/well       | None             |
| 266 | sMDS                | RAEB      | I-06        | B      | Cw     |        | Fresenius          | PBSC  |                                    | 0           | None        |               | Alive/well       | None             |
| 268 | ALL switched to AML | CR1       | I-06        | DRB1   | DOB1   |        | Fresenius          | PBSC  |                                    | II          | Extensive   |               | Alive/well       | CsA taper        |
| 282 | sAML                | CR1       | VII-06      | Cw     | DOB1   |        | Fresenius          | BM    |                                    | II          | None        |               | Alive/well       | None             |
| 285 | MDS                 | RC/mon. 7 | IX-06       | B      | Cw     |        | Fresenius          | BM    |                                    | II          | none        |               | Alive/well       | MMF              |

Not eval., not evaluable.

Sedlacek et al.

Table 2.

Characteristics of conditioning regimens used prior first HSCT (n = 24 patients)

|         |  |                                 |   |
|---------|--|---------------------------------|---|
|         | Fractionated total body irradiation (fTBI) |                                 |   |
|         | fTBI 14.4 Gy                               | Cyclophosphamide 120 mg/kg      | 7 |
|         | fTBI 12 Gy                                 | Etoposide 60 mg/kg              | 7 |
|         | Oral busulphan (Bu)                        |                                 |   |
|         | Bu 16 mg/kg                                | Cyclophosphamide 120 mg/kg      |   |
|         |  | Melphalan 140 mg/m <sup>2</sup> | 9 |
| UPN 153 | Fludarabine (Flu)                          |                                 |   |
|         | Flu 160 mg/m <sup>2</sup>                  | Thiotepa 15 mg/kg               | 1 |

Characteristics of conditioning regimens used prior first HSCT (n = 2 patients)

|         |                |                       |               |
|---------|----------------|-----------------------|---------------|
| UPN 200 | Fludarabine    | 150 mg/m <sup>2</sup> | (D-7...D-3)   |
|         | Melphalan      | 140 mg/m <sup>2</sup> | (D-2)         |
|         | Cyclosporine A | 3 mg/kg i.v.          | (start D-1)   |
|         | Methotrexate   | 10 mg/m <sup>2</sup>  | (D+1, +3, +6) |
|         | rATG Fresenius | 50 mg/kg              | (D-2...D+2)   |
| UPN 245 | fTBI           | 12 Gy                 | (D-4...D-2)   |
|         | Etoposide      | 60 mg/kg              | (D-1)         |
|         | Cyclosporine A | 3 mg/kg i.v.          | (start D-1)   |
|         | Methotrexate   | 10 mg/m <sup>2</sup>  | (D+1, +3, +6) |
|         | rATG Fresenius | 40 mg/kg              | (D-4...D-1)   |

Table 3. Characteristics of primary grafts, engraftment and graft versus host disease

|  | PBSC<br>(n = 13) | BM<br>(n = 11) | Total<br>(n = 24) |
|--|------------------|----------------|-------------------|
| NC/kg bw × 10 <sup>8</sup> median/range                        | 12 (5.7–29)      | 4.3 (2.6–6.6)  | 6.3               |
| CD34+ cells/kg bw × 10 <sup>6</sup> median/range               | 8 (5–16)         | 5 (2.4–11.8)   | 6                 |
| CD3+ cells/kg bw × 10 <sup>8</sup> median/range                | 3.7 (0.6–15.8)   | 0.3 (0.2–0.7)  | 1.15              |
| engraftment of ANC >0.5 × 10 <sup>9</sup> /l median/range      | 16 (12–22)       | 22 (19–27)     | 19.5              |
| engraftment of platelets >20 × 10 <sup>9</sup> /l median/range | 23 (16–94)       | 28 (19–41)     | 24                |
| engraftment of platelets >50 × 10 <sup>9</sup> /l median/range | 23 (16–166)      | 28 (19–100)    | 24                |
| aGVHD none or I aGVHD II/IV                                    | 2 (11)           | 2 (9)          | 4                 |
| aGVHD none or limited  | 9 (5)            | 8 (2)          | 17                |
| aGVHD extensive  |                  |                | 7/23 (30%)        |
| alive/well   | 11               | 8              | 19                |
| alive without event  | 9                | 7              | 16                |

able patients was 38.7%; 8.7% experienced limited and 30% extensive, respectively (Tables 2 and 3).

Relapse rate, prevention, and treatment

Leukemia relapse occurred in five (hematological in 4, cytogenetic in 1) out of 24 (20.8%) patients 309–544 days after HSCT (median 410 days). Until now, two patients died as a consequence of leukemia relapse at a median 134 days after relapse confirmation. Eight donor lymphocyte infusions directed according to the level of MRD post-transplant or mixed and increasing chimerism were given to four patients (CML, AML,

AML, ABiL) 120–505 days after HSCT (median 246 days) in doses of 1 × 10<sup>5</sup> to 5 × 10<sup>7</sup>/kg CD3 + cells (median 2.5 × 10<sup>6</sup>). In two patients (AML, ABiL), it failed to prevent hematological relapse (18–20). These two patients, subsequently, underwent high-dose chemotherapy, achieved CR, and were retransplanted with PBSC from the same donors as before (111 and 155 days following 1st HSCT) (Table 2). One patient remains in remission; the other died of regimen and early GvHD-related toxicity. Two other (AML and CML) continue in complete remission 26 and 72 months following the last dose of DLI.

Infectious complications

In 16 out of 24 patients (67%), reactivation of CMV, EBV, BKV, or AdV was detected. The common pathogens include CMV in 11 patients (46%) with one patient who died due to CMV pneumonia; EBV in eight patients (33%) with one patient who died as a consequence of EBV lymphoproliferative disease; hemorrhagic cystitis in four patients where BKV was detected in urine in all four, and three patients, where AdV (serotype 31) was detected in blood, but none of them developed clinical symptoms despite no therapy was given.

Fungal infections were not frequent in this cohort with very high risk of developing IFI. Mycotic pneumonia was proved (*Aspergillus* species) in one and probable in second patient, in both only pretransplant. Both were treated during early post-transplant period with ABLC,

HSCT in leukemia using HLA-mismatched donors

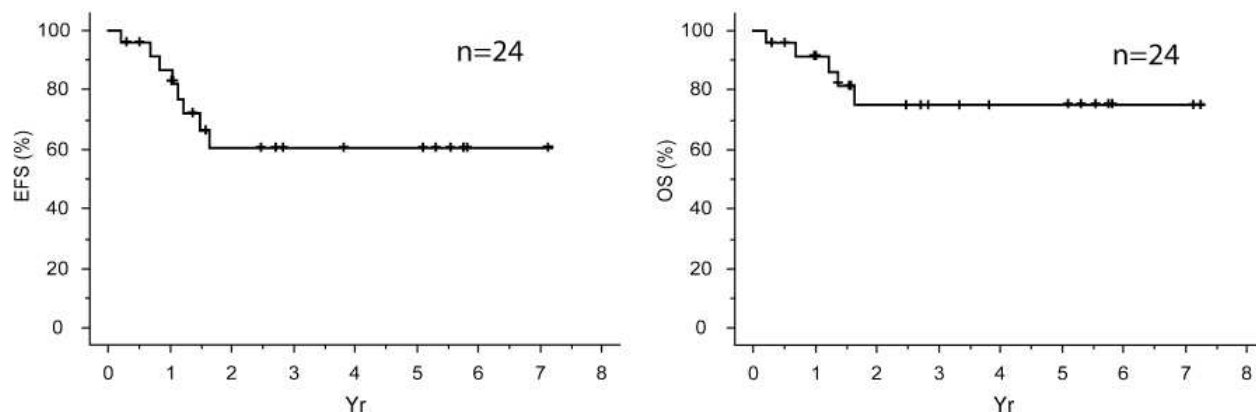


Fig. 1. Probability of overall survival and event-free survival in entire cohort of patients.

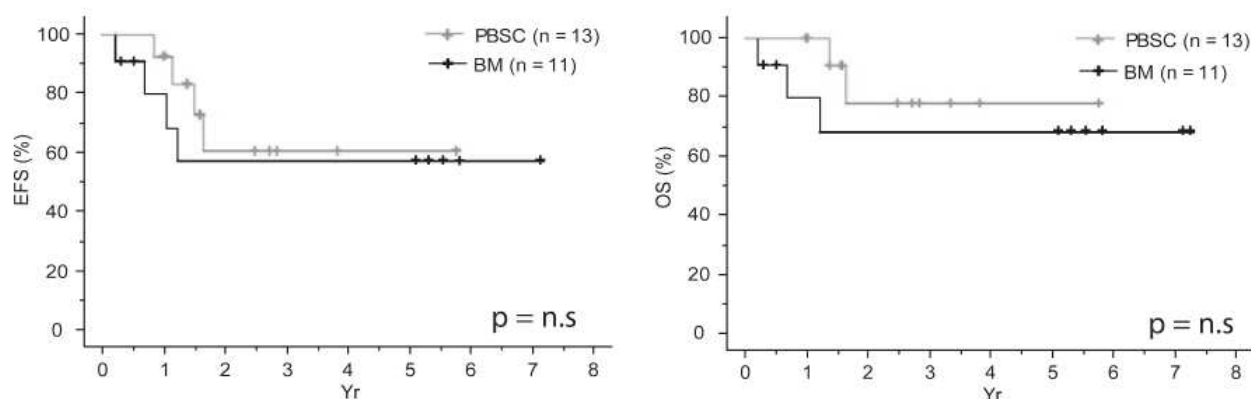


Fig. 2. Event-free survival and overall survival in patients transplanted using bone marrow and peripheral blood stem cells.

which was later switched to oral voriconazole. None of them suffered from reactivation of IFI. All other patients received prophylactic oral suspension of itraconazole. In patients with extensive chronic GvHD, we usually used prophylaxis with oral voriconazole. No patient in this cohort died as a consequence of fungal infection and that was also confirmed on autopsies.

QoL following HSCT

Patients on no continuous IST are usually fully active, have no limitations, and continue with normal life. Out of seven patients who did suffer from chronic extensive GvHD, one died with active extensive cGvHD, one is on CsA tapering with no signs of cGvHD and five are off any IST (Table 1). So far, it appears that there is no difference in QoL when comparing this group with the other patients transplanted at our institution using 9–10/10 HLA-matched UDs.

Overall outcome

EFS is calculated from the date of transplantation to the last follow-up or first event (death or

relapse of the primary disease whatever occurred first). Probabilities of EFS and OS are estimated using the Kaplan–Meier method. Median follow-up till first event or last follow-up of total cohort is 1.57 yr (range 0.2–7.2 yr). According to the type of graft, median follow-up is 1.65 for PBMC (range 0.85–5.8 yr) and 1.24 for BM (range 0.2–7.2 yr). The probability of EFS was 60.3% (95% CI 35.5–78.1) and OS was 74.9 (95% CI 49.1–88.9) (Fig. 1). EFS of BM group was 56.8 (95% CI 21.3–81.3) and OS was 68.2% (95% CI 29.7–88.6). EFS of PBMC group was 60.6 (95% CI 24.7–83.5) and OS was 77% (95% CI 31.2–94.3). Difference between PBMC and BM groups in EFS and OS is not statistically significant (Cox–Mantel test) (Fig. 2).

TRM at day + 100 was 4% with overall TRM 12.5%. Altogether, five patients died at a median of 1.54 yr post-transplant (range 0.2–1.65), two (8.4%) died as a consequence of leukemia relapse, one of CMV pneumonia (0.68 yrs), one of EBV lymphoproliferative disease (0.2 yrs), and one of gastrointestinal bleeding because of extensive GvHD (1.65 yr).

## Discussion

Improvements in HLA typing at the allele level, wider spectrum of efficient drugs for GvHD prophylaxis and therapy, and prospective PCR quantitative monitoring of viral load have led to decrease in TRM in patients transplanted from HLA-matched UDs. Which alternative donor is better in the case of no available HLA-matched donor remains to be resolved. Different centers have different preferences mostly based on local experience.

Many centers successfully use unrelated cord blood where the naïve immune system permits reduced stringency of HLA and, therefore, within the acceptable level of mismatch, it is possible to find a suitable donor for the majority of children. Its wide use although is limited by the efficient cell dose available for older children and adults (21, 22). This can be overcome by using double cord transplants (23). Other disadvantages include naivete of immunity against viruses and unavailability of cord blood for potential adoptive immunotherapy or re-transplantation.

Use of haploidentical family donors is possible, but large and frequent experience of cooperating laboratories for preparation of T-cell-depleted graft is essential to limit the risks of non-engraftment and GvHD. High incidence of viral infections in the early post-transplant period increases the risk of TRM. Therefore, this method is more restricted to several centers with large experience. New techniques of depletion may improve the immune reconstitution and graft vs. leukemia effect without the enormous risk of serious GvHD (24).

We present our experience with another alternative. HLA-mismatched UDs were prospectively selected based on level of allele match. We and others speculate that allele or antigen mismatch is equally adverse to survival. In our clinical experience, UD with up to three allele mismatches (no more than one in loci A\*, B\*, or DRB1\*) could be used for a patient with malignant disease with acceptable risk for toxicity if adequate serotherapy is given together with a myeloablative conditioning regimen. On the contrary, we speculate that the practice still used in many centers to select donors based on HLA match in A\*, B\*, or DRB1\* loci, with no respect to numbers of potential mismatches in Cw\* and/or DQB1\* loci, is not efficient. Such attitude may explain inferior outcome results compared with those achieved in our cohort. It is not rare to have many Cw\* and/or DQB1\* mismatches even in donor–recipient pairs, other vice allele matched in 5–6/6 in standard A\*, B\*, and DRB1\* loci.

In our series we did not observe engraftment problems. All patients experienced primary and stable engraftment with full donor chimerism. Reappearance of mixed chimerism was detected only as a consequence of emerging relapse of leukemia.

Highly incident acute GvHD mostly of grade II was manageable by standard corticosteroids. Rate of leukemia relapse as well as the incidence of fatal viral infections was low. We speculate that the dose of rATG given in our cohort of patients is safe in preserving the graft vs. leukemia effect (high incidence of acute GvHD, low incidence of relapses), and is efficient in protecting the patient against moderate to severe GvHD without increasing the risk of post-transplant fatal infections (very low TRM).

There is consensus that matching of UDs and patients for HLA class II alleles improves the outcome of HSCT. However, the significance of HLA class I allelic mismatches for transplant outcome is under ongoing discussion, and reports on long-term effects like chronic GvHD are rare. Some studies, especially published earlier, are biased by the fact that HLA typing was not performed by PCR methods at high-resolution level (four digits) in all typed alleles. Other studies are biased by different proportion of minorities relevant to the different incidence of certain HLA alleles among patients and/or recipients (25). Serologically undisclosed HLA disparities account for the increased rate of post-transplant complications. Whereas, a HLA-ABDR-serologically identical donor can be identified in the International Registry for >90% of the patients, only up to half of them can benefit of a highly compatible donor if donor selection is based on allele level matching for HLA-A/B/Cw/DRB1/B3/B5/DQB1 loci among the Caucasian population. Most of the incompatibilities are clustered in a limited number of serotypes that can be targeted first during the searches. Because of linkage disequilibrium (e.g., B-Cw or DRB1-DQB1), incompatibilities at a given locus are often associated with disparities at adjacent loci (26).

Schaffer et al. have published an analysis of outcome in 104 donor–recipient pairs, transplanted in between 1988 and 1999, retrospectively typed for HLA class I and class II by PCR-SSP. They concluded that genomic HLA class I and class II typing may improve the outcome after unrelated HSCT and also that the awareness of HLA class I and II mismatches, not detected by older methods, in a recipient–donor pair makes it possible to give appropriate pre- and post-transplantation treatment (27). In addition, others investigated the association of HLA class I allele



mismatches and outcome. In cohort of 144 patients given a HSCT from an UD who were matched for HLA-DRB1, DRB3/4/5, and DQB1 alleles the risk of chronic GvHD was significantly increased in patients with class I-mismatched donors (mismatch either detected by low- or high-resolution typing). A single HLA class I allele mismatch significantly increased the risk of chronic GvHD in multivariate analysis. OS was significantly reduced in patient–donor pairs with more than one allele class I mismatch (28).

On the contrary, Duggan et al. reported 57 patients receiving UD HSCT and matched for the disease and stage with other 57 recipients of genotypically matched RD HSCT. All UD recipients were matched serologically for A and B and by high resolution for DR and DQ antigens. All patients received CsA and short-term MTX. UD HSCT recipients also received rATG (Thymoglobulin) over three days pretransplant. They concluded that UD HSCT recipients matched as above, and given pretransplant ATG have similar outcomes to recipients of matched RD HSCT using conventional drug prophylaxis (5).

Based on our results and together with information published so far (29), we also conclude that high resolution of HLA alleles, both class I and class II plays an important role in the selection of a suitable UD. However, when a fully matched donor is not available, we show that GvHD prophylaxis with use of rATG enables the use of an unmanipulated, partially mismatched donor without excessive risk of poor outcome because of severe acute GvHD.

Several different brands of ATG are available, and therefore, when using ATG in conditioning regimen, one needs to consider the ATG brand, the adequate dose and the proper timing. Exact correlation between different brands is not clear yet as they have different activity against different populations of cells. Also the dose may vary based on the type of donor and conditioning regimen. Lower doses (Thymoglobulin 6–10 mg/kg total; rATG Fresenius 20–25 mg/kg total) are currently used in reduced intensity conditioning regimen when fully matched donor is used (30) or in patients who underwent SCT using T cell highly depleted graft from haploidentical donor (31). Much higher doses (Thymoglobulin 15 mg/kg total; rATG Fresenius 60 mg/kg total and more) are used in transplants using mismatched donors and unmanipulated graft (32, 33).

### Conclusions

Our study shows that combination of CsA, short-term MTX and rATG in GvHD prophylaxis

prior to HSCT using unmanipulated grafts of HLA-mismatched UDs is efficient to prevent occurrence of very severe acute GvHD grade III–IV. Serotherapy (rATG Fresenius; Fresenius-Biotech) was well tolerated and in doses given (40 mg/kg total) did not increase post-transplant mortality by long-lasting depression of immunity or increase risk of leukemia relapse. Incidence of chronic GvHD was not increased compared with series where fully matched UDs were used, more over in majority of patients it disappeared within the time without serious consequences (Table 1). Overall outcome is satisfactory, and therefore, it is possible to use such alternative donors in patients with advanced leukemia lacking a HLA-matched donor as a reasonable alternative to unrelated cord blood or haploidentical family donor. We strongly recommend to extend HLA typing for clinically relevant Cw\* and DQB1\* loci in centers still using only A\*, B\* and DRB1\* for selection of suitable donor.

### Acknowledgments

We wish to thank our collaborators from CPH (Czech Pediatric Hematology Working Group) for referring patients, national registries of donors in Pilsen and Prague, HLA laboratories namely in Institute of Hematology and Blood Transfusion and CLIP (Childhood Leukemia Investigation Prague) in Prague. We thank David Jacobsohn for editorial help.

This work was partly supported by grants CEZ 237360001 and VZ 00064203.

### References

1. MIANO M, LABOPIN M, HARTMANN O, et al. Haematopoietic stem cell transplantation trends in children over the last three decades: A survey by the paediatric diseases working party of the European group for blood and marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2007; 39: 89–99.
2. KLINGEBIEL T, HANDGRETINGER R, LANG P, BADER P, NIETHAMMER D. Haploidentical transplantation for acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Blood Rev* 2004; 18: 181–192.
3. LANG P, GREIL J, BADER P, et al. Long-term outcome after haploidentical stem cell transplantation in children. *Blood Cells Mol Dis* 2004; 33: 281–287.
4. DEY BR, SPITZER TR. Current status of haploidentical stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2006; 135: 423–437.
5. DUGGAN P, BOOTH K, CHAUDHRY A, et al. Unrelated donor BMT recipients given pretransplant low-dose antithymocyte globulin have outcomes equivalent to matched sibling BMT: A matched pair analysis. *Bone Marrow Transplant* 2002; 30: 681–686.
6. FINKE J, SCHMOOR C, LANG H, POTTHOFF K, BERTZ H. Matched and mismatched allogeneic stem-cell transplantation from unrelated donors using combined graft-versus-host disease prophylaxis including rabbit anti-T lymphocyte globulin. *J Clin Oncol* 2003; 21: 506–513.
7. PRZEPIORKA D, WEISDORF D, MARTIN P, et al. 1994 Consensus conference on acute GVHD grading. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15: 825–828.

Sedlacek et al.

8. SHULMAN HM, SULLIVAN KM, WEIDEN PL, et al. Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *Am J Med* 1980; 69: 204–217.
9. CARPENTER PA, SANDERS JE. Steroid-refractory graft-vs.-host disease: Past, present and future. *Pediatr Transplant* 2003; 7(Suppl. 3): 19–31.
10. SIMPSON D. New developments in the prophylaxis and treatment of graft versus host disease. *Expert Opin Pharmacother* 2001; 2: 1109–1117.
11. VOGELSANG GB, ARAI S. Mycophenolate mofetil for the prevention and treatment of graft-versus-host disease following stem cell transplantation: preliminary findings. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27: 1255–1262.
12. BADER P, BECK J, FREY A, et al. Serial and quantitative analysis of mixed hematopoietic chimerism by PCR in patients with acute leukemias allows the prediction of relapse after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21: 487–495.
13. KREJCI O, VAN DER VELDEN VH, BADER P, et al. Level of minimal residual disease prior to haematopoietic stem cell transplantation predicts prognosis in paediatric patients with acute lymphoblastic leukaemia: A report of the Pre-BMT MRD study group. *Bone Marrow Transplant* 2003; 32: 849–851.
14. ECKERT C, SCRIDELI CA, TAUBE T, et al. Comparison between TaqMan and LightCycler technologies for quantification of minimal residual disease by using immunoglobulin and T-cell receptor genes consensus probes. *Leukemia* 2003; 17: 2517–2524.
15. KIMURA H, MORITA M, YABUTA Y, et al. Quantitative analysis of Epstein-Barr virus load by using a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 132–136.
16. TANAKA N, KIMURA H, IIDA K, et al. Quantitative analysis of cytomegalovirus load using a real-time PCR assay. *J Med Virol* 2000; 60: 455–462.
17. PRIFTAKIS P, BOGDANOVIC G, KOKHAEI P, MELLSTEDT H, DALIANIS T. BK virus (BKV) quantification in urine samples of bone marrow transplanted patients is helpful for diagnosis of hemorrhagic cystitis, although wide individual variations exist. *J Clin Virol* 2003; 26: 71–77.
18. BECK JF, KLINGEBIEL T, KREYENBERG H, et al. [Relapse of childhood ALL, AML and MDS after allogeneic stem cell transplantation can be prevented by donor lymphocyte infusion in a critical stage of increasing mixed chimerism]. *Klin Padiatr* 2002; 214: 201–205.
19. SANCHEZ J, SERRANO J, GOMEZ P, et al. Clinical value of immunological monitoring of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia after allogeneic transplantation. *Br J Haematol* 2002; 116: 686–694.
20. YOSHIMI A, BADER P, MATTHES-MARTIN S, et al. Donor leukocyte infusion after hematopoietic stem cell transplantation in patients with juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia* 2005; 19: 971–977.
21. WALL DA, CARTER SL, KERNAN NA, et al. Busulfan/melphalan/antithymocyte globulin followed by unrelated donor cord blood transplantation for treatment of infant leukemia and leukemia in young children: The cord blood transplantation study (COBLT) experience. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11: 637–646.
22. PARKMAN R, COHEN G, CARTER SL, et al. Successful immune reconstitution decreases leukemic relapse and improves survival in recipients of unrelated cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12: 919–927.
23. BARKER JN. Who should get cord blood transplants? *Biol Blood Marrow Transplant* 2007; 13(Suppl. 1): 78–82.
24. LANG P, SCHUMM M, GREIL J, et al. A comparison between three graft manipulation methods for haploidentical stem cell transplantation in pediatric patients: Preliminary results of a pilot study. *Klin Padiatr* 2005; 217: 334–338.
25. OKAMOTO S. Current status of Japan marrow donor program (JMDP) and its roles in international cooperation. *Int J Hematol* 2002; 76(Suppl. 1): 310–311.
26. TIERCY JM, VILLARD J, ROOSNEK E. Selection of unrelated bone marrow donors by serology, molecular typing and cellular assays. *Transpl Immunol* 2002; 10: 215–221.
27. SCHAFFER M, ALDENER-CANNAYA A, REMBERGER M, RINGDEN O, OLERUP O. Roles of HLA-B, HLA-C and HLA-DPA1 incompatibilities in the outcome of unrelated stem-cell transplantation. *Tissue Antigens* 2003; 62: 243–250.
28. GREINIX HT, FAE I, SCHNEIDER B, et al. Impact of HLA class I high-resolution mismatches on chronic graft-versus-host disease and survival of patients given hematopoietic stem cell grafts from unrelated donors. *Bone Marrow Transplant* 2005; 35: 57–62.
29. TESHIMA T, MATSUI K, MATSUE K, et al. Impact of human leucocyte antigen mismatch on graft-versus-host disease and graft failure after reduced intensity conditioning allogeneic haematopoietic stem cell transplantation from related donors. *Br J Haematol* 2005; 130: 575–587.
30. OKAMURA J, UTSUNOMIYA A, TANOSAKI R, et al. Allogeneic stem-cell transplantation with reduced conditioning intensity as a novel immunotherapy and antiviral therapy for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* 2005; 105: 4143–4145.
31. AVERSA F, TARENZI A, TABILIO A, et al. Full haplotype-mismatched hematopoietic stem-cell transplantation: A phase II study in patients with acute leukemia at high risk of relapse. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3447–3454.
32. SCHLEUNING M, GUNTHER W, TISCHER J, LEDDEROSE G, KOLB HJ. Dose-dependent effects of in vivo antithymocyte globulin during conditioning for allogeneic bone marrow transplantation from unrelated donors in patients with chronic phase CML. *Bone Marrow Transplant* 2003; 32: 243–250.
33. BASARA N, BAURMANN H, KOLBE K, et al. Antithymocyte globulin for the prevention of graft-versus-host disease after unrelated hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: Results from the multicenter German cooperative study group. *Bone Marrow Transplant* 2005; 35: 1011–1018.



## ORIGINAL ARTICLE

## Low mortality of children undergoing hematopoietic stem cell transplantation from 7 to 8/10 human leukocyte antigen allele-matched unrelated donors with the use of antithymocyte globulin

P Sedláček<sup>1</sup>, R Formánková<sup>1</sup>, P Keslová<sup>1</sup>, L Šrámková<sup>1</sup>, P Hubáček<sup>1</sup>, L Król<sup>1</sup>, M Kulich<sup>2</sup> and J Starý<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatric Hematology and Oncology, University Hospital Motol, Charles University Prague, Prague, Czech Republic

and <sup>2</sup>Department of Probability and Mathematical Statistics, Faculty of Mathematics and Physics, Charles University Prague, Prague, Czech Republic

Human leukocyte antigen (HLA)-matched sibling donor hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is available for only approximately 30% patients needing HSCT. Use of alternative donors is associated with a high incidence and severity of graft-versus-host disease (GVHD). Here we report our experience with GVHD prophylaxis using pre-transplant rabbit antithymocyte globulin (rATG), in addition to post transplant cyclosporin A and methotrexate. Seventy-five children received unmanipulated grafts from 7 to 10/10 HLA allele-matched unrelated donors. Median follow-up was 25 months (range, 6–65 months). Only 2/75 patients (2.5%) developed acute GVHD grades III–IV, and 17/75 (25%) developed extensive chronic GVHD. Overall survival was 79%. It was similar in patients receiving grafts from 7 or 8/10 to 9 or 10/10 allele-matched donors, and similar in patients receiving peripheral blood stem cells and marrow. Six (11%) patients died owing to relapse, and 10 (13%) due to transplant-related complications. The addition of rATG appears to result in a low incidence of severe GVHD and overall mortality.

*Bone Marrow Transplantation* (2006) 38, 745–750. doi:10.1038/sj.bmt.1705524; published online 16 October 2006

**Keywords:** HLA-mismatched donors; children; rabbit ATG; allogeneic HSCT; GVHD

### Introduction

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is a potentially curative treatment for certain malignant and non-malignant diseases. Unfortunately, in the Czech Republic, only approximately 15% of the children needing

HSCT have a human leukocyte antigen (HLA) matched sibling donor (MSD) available. For the remaining 85%, unrelated donors (UDs) are searched for. For patients with rare HLA haplotypes, it is difficult to identify fully matched UD. Mismatched UD transplantation is associated with a high risk of graft-versus-host disease (GVHD) and transplant-related mortality. Cord blood or a haploidentical related donor graft can also be used, but this is associated with an increased risk of post transplant morbidity/mortality due to increased risk of GVHD, graft failure or infections.<sup>1,2</sup> Here we report our experience with GVHD prophylaxis using pre-transplant rabbit antithymocyte globulin (rATG) added to standard post transplant cyclosporin A (CsA) and methotrexate (MTX) in children.<sup>3,4</sup>

### Methods

#### *Patients and donors*

Between January 2001 and December 2005, 88 children underwent allogeneic HSCT at our center using an UD. Rabbit ATG (Fresenius, dose and schedule below) for GVHD prophylaxis was used in 75 children (48 boys and 27 girls). Thymoglobuline once and Campath twice were used in three other patients, T-cell depletion in two including one with rATG and no serotherapy in four patients with advanced leukemia. Furthermore, patients receiving cord blood units were excluded from this cohort even though same rATG was used in them. These 75 patients (median age at transplant 12.8 years, range 0.3–20.5 years) received HSCT for malignant ( $n=54$ ) or non-malignant disease ( $n=21$ ) (Table 1). The grafts were obtained from HLA allele matched or partially mismatched UD (age 21–57 years, median 32 years). HLA typing was performed at the high-resolution level (four digits) in A, B, Cw, DRB1 and DQB1 alleles. Most (72%) pairs were matched in 9 or 10/10, 17% in 8/10 and 11% in 7/10 alleles. Only one allele mismatch was accepted in A, B or DRB1 loci. Donors and patients were sex mismatched in 42 cases, with a female donor for a male recipient in 20 cases. Cytomegalovirus (CMV) immunoglobulin (Ig) G was detected pre-transplant in 28 (37%) donors and 44 (59%)

Correspondence: Dr P Sedláček, Department of Pediatric Hematology and Oncology, University Hospital Motol, Charles University Prague, V Uvalu 84, Prague 15006, Czech Republic.

E-mail: petr.sedlacek@lfmotol.cuni.cz

Received 30 May 2006; revised 15 September 2006; accepted 18 September 2006; published online 16 October 2006

**Table 1** Primary diagnosis (*n* = 75 patients)

| Malignant |    | Non-malignant |    |
|-----------|----|---------------|----|
| ALL       | 22 | SAA           | 5  |
| CML       | 9  | SCID          | 4  |
| MDS       | 9  | WAS           | 3  |
| AML       | 9  | FA-AA         | 2  |
| sAML      | 2  | MPS I.type    | 2  |
| ABiL      | 1  | OP            | 1  |
| IMF       | 1  | PNH           | 1  |
| NHL       | 1  | mal.IM        | 1  |
|           |    | CDA           | 1  |
|           |    | FHL           | 1  |
| Total     | 54 | Total         | 21 |

Abbreviations: ABiL = acute biphenotypic leukemia; ALL = acute lymphoblastic leukemia; AML = acute myelogenous leukemia; CDA = congenital dyserythropoietic anemia; CML = chronic myelogenous leukemia; FHL = familial hemophagocytic lymphohistiocytosis; FA-AA = Fanconi anemia - aplastic anemia; IMF = idiopathic myelofibrosis; mal.IM = malignant infectious mononucleosis; MDS = myelodysplastic syndrome; MPS = mucopolysaccharidosis; NHL = non-Hodgkin's lymphoma; OP = osteopetrosis; PNH = paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; s = secondary; SAA = severe aplastic anemia; SCID = severe combined immunodeficiency syndrome; WAS = Wiskott-Aldrich syndrome.

recipients. The interval between the start of the UD search and the day of HSCT ranged from 49 to 944 days, median 132 days.

The study was approved by the local Ethics Committee and all parents signed informed consents.

**Grafts**

Filgrastim-mobilized peripheral blood stem cells (PBSCs) were used for 35 patients and bone marrow (BM) for 40 patients. The decision about the type of graft was made by the donor and/or local harvest center, and was based in part on transplant center preference. Characteristics of grafts are shown in Table 2. No graft manipulation other than plasma or erythrocyte depletion was carried out.

**Conditioning regimens, GVHD prophylaxis**

Primary conditioning regimens varied according to primary disease (see Table 3). Rabbit ATG (Fresenius) was infused to all 75 patients over 1 h<sup>5</sup> on days -4 to -1. The daily dose was 10 or 15 mg/kg (total 40 mg/kg in 70 patients; range 30-60 mg/kg). Combination of methylprednisolone (1-3 mg/kg), antihistamines and antipyretics was used as pre-medication before each infusion. CsA (used in 74/75 patients) was given two to three times daily in a 2-h infusion, initially 1.5 mg/kg/dose in malignant and 2.5 mg/kg/dose in non-malignant disease. The prophylactic dose of CsA was adjusted to maintain targeted blood levels, lower (80-150 ng/ml) for malignant and higher (200-250 ng/ml) for non-malignant diseases. MTX was given to 68/74 evaluable patients on days +1, +3 and +6. The first dose was 10 or 15 mg/m<sup>2</sup>, and other doses were 10 mg/m<sup>2</sup>. Leucovorine (15 mg/m<sup>2</sup>) was given as a single dose 24 h after each MTX dose. In one patient, CsA was substituted by mycophenolate mofetil (MMF) for elevated creatinine during conditioning regimen, and in six patients MTX was not used; it was substituted in four patients with steroids, in

**Table 2** Characteristics of primary grafts and engraftment

|   | PBSC<br>( <i>n</i> = 35) | BM<br>( <i>n</i> = 40) | P-value |
|---|--------------------------|------------------------|---------|
| NC/kg bw × 10 <sup>8</sup> median/<br>range                       | 12 (3.3-44)              | 4.4 (1.9-12)           | <0.0001 |
| CD34+ cells/kg bw × 10 <sup>6</sup><br>median/range               | 8 (3.7-27)               | 6.7 (1.0-25)           | 0.047   |
| CD3+ cells/kg bw × 10 <sup>8</sup><br>median/range                | 3.3 (0.3-15.8)           | 0.4 (0.1-3.9)          | <0.0001 |
| Malignant   | 27 (77%)                 | 27 (68%)               | 0.44    |
| Non-malignant   | 8 (23%)                  | 13 (32%)               |         |
| Engraftment of ANC >0.5<br>median/range × 10 <sup>9</sup> /l      | 16 (11-23)               | 20 (13-82)             | <0.0001 |
| Engraftment of platelets<br>>20 median/range × 10 <sup>9</sup> /l | 23 (14-94)               | 27 (18-133)            | 0.01    |
| Day of last platelet<br>transfusion (median/range)                | 15 (9-80)                | 20 (11-103)            | 0.055   |
| HLA match 7-8/10  | 12 (34%)                 | 9 (22%)                | 0.31    |
| HLA match 9-10/10   | 23 (66%)                 | 31 (78%)               |         |
| aGVHD none or I   | 16 (29%)                 | 10 (41%)               | 0.33    |
| aGVHD II/IV   | 25 (71%)                 | 23 (58%)               |         |
| cGVHD none or limited   | 24 (73%)                 | 29 (78%)               | 0.78    |
| cGVHD extensive   | 9 (27%)                  | 8 (22%)                |         |
| Overall survival  | 83%                      | 75%                    | 0.49    |
| EFS   | 72%                      | 65%                    | 0.68    |

Abbreviations: aGVHD = acute graft-versus-host disease; ANC = absolute neutrophil count; BM = bone marrow; bw = body weight; cGVHD = chronic graft-versus-host disease; EFS = event-free survival; HLA = human leukocyte antigen; PBSC = peripheral blood stem cell.

**Table 3** Characteristics of conditioning regimens used before first HSCT (*n* = 75 patients)

| Fractionated TBI          |                                 | 35 patients    |      |
|---------------------------|---------------------------------|----------------|------|
| TBI 12 Gy                 | Cyclophosphamide 120 mg/kg      |                | 3    |
| TBI 14.4 Gy               | Cyclophosphamide 200 mg/kg      |                | 11   |
| TBI 12 Gy                 | Etoposide 60 mg/kg              |                | 20   |
| TBI 6 Gy                  | Cyclophosphamide 200 mg/kg      |                | 1    |
| Oral Bu                   |                                 | 31 patients    |      |
| Bu 16-20 mg/kg            | Cyclophosphamide 200 mg/kg      |                | 9    |
| Bu 16-20 mg/kg            | Cyclophosphamide 120 mg/kg      |                |      |
|                           | Etoposide 40 mg/kg              |                | 3    |
| Bu 8 mg/kg                | Cyclophosphamide 200 mg/kg      |                | 1    |
| Bu 16-20 mg/kg            | Cyclophosphamide 120 mg/kg      |                |      |
|                           | Melphalan 140 mg/m <sup>2</sup> |                | 18   |
| Flu                       |                                 | Seven patients |      |
| Flu 120 mg/m <sup>2</sup> | Cyclophosphamide 40 mg/kg       |                | 2+1* |
| Flu 150 mg/m <sup>2</sup> | Melphalan 140 mg/m <sup>2</sup> |                | 2    |
| Flu 160 mg/m <sup>2</sup> | Thiotepa 15 mg/kg               |                | 2    |
| Other conditioning        |                                 | Two patients   |      |
| Treosulfan 30 mg/kg       | Cyclophosphamide 120 mg/kg      |                | 1    |
| None (ATG only)           |                                 |                | 1    |

Abbreviations: ATG = antithymocyte globulin; BU = busulfan; Flu = fludarabine; HSCT = hematopoietic stem cell transplantation; TBI = total body irradiation.

\*Single TBI 2 Gy in one patient.

one with MMF, and no substitution in one patient. Acute and chronic GVHD were primarily treated with prednisone, CsA, tacrolimus, sirolimus or MMF.<sup>6-8</sup> Acute

**Bone Marrow Transplantation**



**Table 1** Primary diagnosis (*n* = 75 patients)

| <i>Malignant</i> |    | <i>Non-malignant</i> |    |
|------------------|----|----------------------|----|
| ALL              | 22 | SAA                  | 5  |
| CML              | 9  | SCID                 | 4  |
| MDS              | 9  | WAS                  | 3  |
| AML              | 9  | FA-AA                | 2  |
| sAML             | 2  | MPS I.type           | 2  |
| ABiL             | 1  | OP                   | 1  |
| IMF              | 1  | PNH                  | 1  |
| NHL              | 1  | mal.IM               | 1  |
|                  |    | CDA                  | 1  |
|                  |    | FHL                  | 1  |
| Total            | 54 | Total                | 21 |

Abbreviations: ABiL = acute biphenotypic leukemia; ALL = acute lymphoblastic leukemia; AML = acute myelogenous leukemia; CDA = congenital dyserythropoietic anemia; CML = chronic myelogenous leukemia; FHL = familial hemophagocytic lymphohistiocytosis; FA-AA = Fanconi anemia - aplastic anemia; IMF = idiopathic myelofibrosis; mal.IM = malignant infectious mononucleosis; MDS = myelodysplastic syndrome; MPS = mucopolysaccharidosis; NHL = non-Hodgkin's lymphoma; OP = osteopetrosis; PNH = paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; s = secondary; SAA = severe aplastic anemia; SCID = severe combined immunodeficiency syndrome; WAS = Wiskott-Aldrich syndrome.

recipients. The interval between the start of the UD search and the day of HSCT ranged from 49 to 944 days, median 132 days.

The study was approved by the local Ethics Committee and all parents signed informed consents.

**Grafts**

Filgrastim-mobilized peripheral blood stem cells (PBSCs) were used for 35 patients and bone marrow (BM) for 40 patients. The decision about the type of graft was made by the donor and/or local harvest center, and was based in part on transplant center preference. Characteristics of grafts are shown in Table 2. No graft manipulation other than plasma or erythrocyte depletion was carried out.

**Conditioning regimens, GVHD prophylaxis**

Primary conditioning regimens varied according to primary disease (see Table 3). Rabbit ATG (Fresenius) was infused to all 75 patients over 1 h<sup>5</sup> on days -4 to -1. The daily dose was 10 or 15 mg/kg (total 40 mg/kg in 70 patients; range 30-60 mg/kg). Combination of methylprednisolone (1-3 mg/kg), antihistamines and antipyretics was used as pre-medication before each infusion. CsA (used in 74/75 patients) was given two to three times daily in a 2-h infusion, initially 1.5 mg/kg/dose in malignant and 2.5 mg/kg/dose in non-malignant disease. The prophylactic dose of CsA was adjusted to maintain targeted blood levels, lower (80-150 ng/ml) for malignant and higher (200-250 ng/ml) for non-malignant diseases. MTX was given to 68/74 evaluable patients on days +1, +3 and +6. The first dose was 10 or 15 mg/m<sup>2</sup>, and other doses were 10 mg/m<sup>2</sup>. Leucovorine (15 mg/m<sup>2</sup>) was given as a single dose 24 h after each MTX dose. In one patient, CsA was substituted by mycophenolate mofetil (MMF) for elevated creatinine during conditioning regimen, and in six patients MTX was not used; it was substituted in four patients with steroids, in

**Table 2** Characteristics of primary grafts and engraftment

|   | <i>PBSC</i><br>( <i>n</i> = 35) | <i>BM</i><br>( <i>n</i> = 40) | <i>P-value</i> |
|---|---------------------------------|-------------------------------|----------------|
| NC/kg bw × 10 <sup>8</sup> median/<br>range                       | 12 (3.3-44)                     | 4.4 (1.9-12)                  | <0.0001        |
| CD34+ cells/kg bw × 10 <sup>6</sup><br>median/range               | 8 (3.7-27)                      | 6.7 (1.0-25)                  | 0.047          |
| CD3+ cells/kg bw × 10 <sup>8</sup><br>median/range                | 3.3 (0.3-15.8)                  | 0.4 (0.1-3.9)                 | <0.0001        |
| Malignant   | 27 (77%)                        | 27 (68%)                      | 0.44           |
| Non-malignant   | 8 (23%)                         | 13 (32%)                      |                |
| Engraftment of ANC >0.5<br>median/range × 10 <sup>9</sup> /l      | 16 (11-23)                      | 20 (13-82)                    | <0.0001        |
| Engraftment of platelets<br>>20 median/range × 10 <sup>9</sup> /l | 23 (14-94)                      | 27 (18-133)                   | 0.01           |
| Day of last platelet<br>transfusion (median/range)                | 15 (9-80)                       | 20 (11-103)                   | 0.055          |
| HLA match 7-8/10  | 12 (34%)                        | 9 (22%)                       | 0.31           |
| HLA match 9-10/10   | 23 (66%)                        | 31 (78%)                      |                |
| aGVHD none or I   | 16 (29%)                        | 10 (41%)                      | 0.33           |
| aGVHD II/IV   | 25 (71%)                        | 23 (58%)                      |                |
| cGVHD none or limited   | 24 (73%)                        | 29 (78%)                      | 0.78           |
| cGVHD extensive   | 9 (27%)                         | 8 (22%)                       |                |
| Overall survival  | 83%                             | 75%                           | 0.49           |
| EFS   | 72%                             | 65%                           | 0.68           |

Abbreviations: aGVHD = acute graft-versus-host disease; ANC = absolute neutrophil count; BM = bone marrow; bw = body weight; cGVHD = chronic graft-versus-host disease; EFS = event-free survival; HLA = human leukocyte antigen; PBSC = peripheral blood stem cell.

**Table 3** Characteristics of conditioning regimens used before first HSCT (*n* = 75 patients)

| <i>Fractionated TBI</i>   |                                 | <i>35 patients</i>    |
|---------------------------|---------------------------------|-----------------------|
| TBI 12 Gy                 | Cyclophosphamide 120 mg/kg      | 3                     |
| TBI 14.4 Gy               | Cyclophosphamide 200 mg/kg      | 11                    |
| TBI 12 Gy                 | Etoposide 60 mg/kg              | 20                    |
| TBI 6 Gy                  | Cyclophosphamide 200 mg/kg      | 1                     |
| <i>Oral Bu</i>            |                                 | <i>31 patients</i>    |
| Bu 16-20 mg/kg            | Cyclophosphamide 200 mg/kg      | 9                     |
| Bu 16-20 mg/kg            | Cyclophosphamide 120 mg/kg      |                       |
|                           | Etoposide 40 mg/kg              | 3                     |
| Bu 8 mg/kg                | Cyclophosphamide 200 mg/kg      | 1                     |
| Bu 16-20 mg/kg            | Cyclophosphamide 120 mg/kg      |                       |
|                           | Melphalan 140 mg/m <sup>2</sup> | 18                    |
| <i>Flu</i>                |                                 | <i>Seven patients</i> |
| Flu 120 mg/m <sup>2</sup> | Cyclophosphamide 40 mg/kg       | 2+1*                  |
| Flu 150 mg/m <sup>2</sup> | Melphalan 140 mg/m <sup>2</sup> | 2                     |
| Flu 160 mg/m <sup>2</sup> | Thiotepa 15 mg/kg               | 2                     |
| <i>Other conditioning</i> |                                 | <i>Two patients</i>   |
| Treosulfan 30 mg/kg       | Cyclophosphamide 120 mg/kg      | 1                     |
| None (ATG only)           |                                 | 1                     |

Abbreviations: ATG = antithymocyte globulin; BU = busulfan; Flu = fludarabine; HSCT = hematopoietic stem cell transplantation; TBI = total body irradiation.

\*Single TBI 2 Gy in one patient.

one with MMF, and no substitution in one patient. Acute and chronic GVHD were primarily treated with prednisone, CsA, tacrolimus, sirolimus or MMF.<sup>6-8</sup> Acute

**Bone Marrow Transplantation**

**Table 5** Outcome of patients with ALL according to leukemia status before HSCT (22 patients, 23 HSCT)

| ALL      | Relapse | TRM | a/w in CCR |    |
|----------|---------|-----|------------|----|
| CR1      | 8       | 4   | 0          | 4  |
| CR2      | 13      | 2   | 3          | 8  |
| CR3      | 2       | 0   | 1          | 1  |
| Ph +     | 12      | 5   | 0          | 7  |
| MRD neg  | 12      | 2   | 0          | 10 |
| MRD low  | 3       | 1   | 0          | 2  |
| MRD high | 4       | 3   | 1          | 0  |
| MRD NA   | 4       | 0   | 3          | 1  |

Abbreviations: a/w in CCR=alive and well in continuous CR; ALL=acute lymphoblastic leukemia; CR=complete remission; HSCT=hematopoietic stem cell transplantation; MRD=minimal residual disease (IgH/TCR rearrangements); Ph=Philadelphia; NA=not available; TRM=transplant-related mortality.

subsequently died, retransplantation was performed in three patients (all surviving without leukemia), two patients are currently scheduled for retransplantation and one at the time of analysis lives in untreated extramedullary relapse. There is clear trend that even in our group of patients with ALL, the incidence of relapse was dependent on the level of pre-transplant MRD (see Table 5).<sup>12,14</sup> Donor lymphocyte infusion (DLI) directed according to the level of post transplant MRD (IgH/TCR  $>1 \times 10^{-4}$ ) or increasing mixed chimerism was given to 10 patients with malignancy. Initial dose of CD3+ cells was  $1 \times 10^6/\text{kg}$ . In nine of them, there was no or only transient response. In none of those patients, DLI was used at the time of frank leukemia relapse.

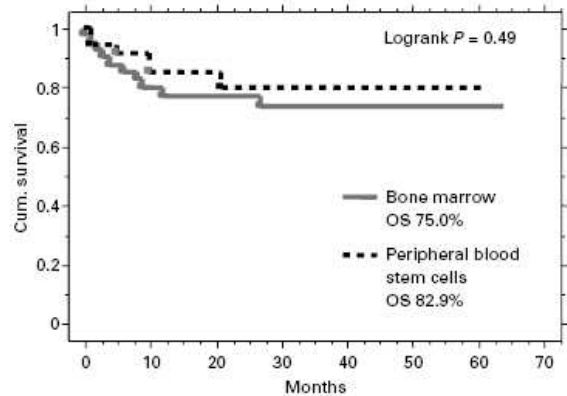
**Survival**

Overall survival was not statistically different ( $P=0.49$ ) between patients transplanted using PBSC (82.9%) and BM (75.0%) (Figure 1). Overall survival was also not statistically different ( $P=0.76$ ) between patients receiving grafts from donors HLA matched in 9–10/10 alleles (77.8%) and 7–8/10 alleles (80.9%) as shown in Figure 2. There was no significant difference ( $P=0.66$ ) in overall survival and event-free survival ( $P=0.65$ ) between patients undergoing HSCT for malignant and non-malignant disease (Figures 3 and 4).

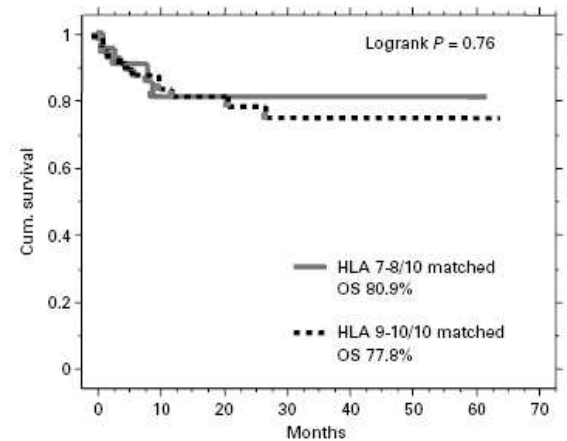
Sixteen patients died, 6/54 (11%) due to relapse and 10/75 (13%) due to transplant-related complications (7% before day 100). Six patients received a second graft from the same donor (median 155 days post transplant, range 22–502 days), three for graft failure/rejection and three for relapse. Four of the six patients are alive and well with median follow-up of 26 months (range, 16–49 months) following the second HSCT and two died with GVHD.

**Discussion**

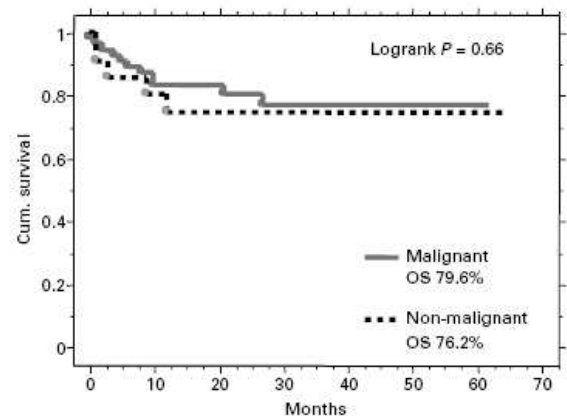
The first important finding of this study is the similar outcome of transplantation using 7–8/10 and 9–10/10 allele-matched donors. This is contrary to previous studies in which HLA typing was not performed at the high-resolution level (four digits) in all typed loci. Serologically



**Figure 1** Overall survival (OS) in patients following HSCT using PBSC ( $n=40$ ) or BM ( $n=35$ ).



**Figure 2** Overall survival (OS) in patients following HSCT from HLA-matched (9–10/10;  $n=54$ ) or -mismatched UD (7–8/10;  $n=21$ ).



**Figure 3** Overall survival (OS) in patients with malignant disease ( $n=54$ ) and non-malignant disease ( $n=21$ ).

undisclosed HLA disparities account for the increased rate of post transplant complications. With more than 1300 alleles (A, B, Cw, DRB1) currently identified,

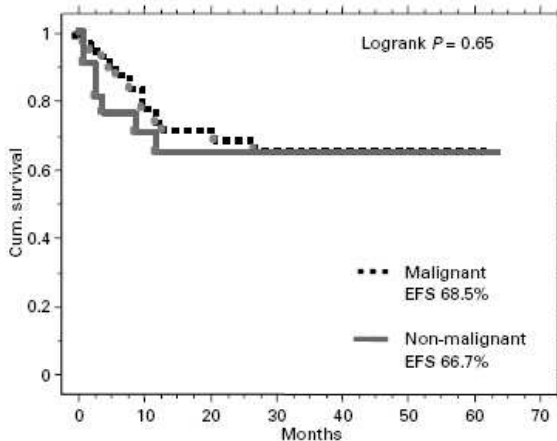


Figure 4 EFS in patients with malignant disease ( $n=54$ ) and non-malignant disease ( $n=21$ ).

high-resolution molecular typing techniques have to be applied to distinguish the extensive degree of allelic polymorphism of the HLA system. Whereas an HLA-ABDR serologically identical donor can be identified in the International Registry for >90% of the patients, only up to half of them can have a highly compatible donor if donor selection is based on allele level matching for HLA-A/B/Cw/DRB1/B3/B5/DQB1 loci among the Caucasian population. Our results suggest that a higher percent of pediatric patients could have an UD available, as even a 7/10 allele-matched donor (with limitation of maximum one allele mismatch in A, B or DRB1 loci) appears acceptable when ATG is used.

The second important finding of this study is the similar outcome of PBSC vs BM transplantation. After years of using PBSC for allogeneic HSCT, there is still ongoing discussion on whether PBSC or BM is the superior graft source. Perhaps, the reason for ongoing discussion is that studies comparing PBSC vs BM enrolled various patient populations in terms of primary disease, GVHD prophylaxis, donor type and level of HLA matching, etc.<sup>15,16</sup> These studies mostly confirm faster engraftment and higher incidence of chronic GVHD in recipients of PBSC from MSD. There are no published randomized studies comparing PBSC and BM in the UD settings. Two retrospective studies found significantly higher risk of chronic GVHD after PBSC transplantation and no survival advantage of PBSC transplantation over BM transplantation.<sup>17,18</sup> Compared to our cohort, only one-third of patients in the published retrospective studies received ATG or OKT3 pre-transplant. In our cohort (uniformly treated with ATG), we have observed similar incidence of extensive chronic GVHD and similar survival in PBSC and BM recipients. Thus, the use of ATG appears to eliminate the difference in the incidence of chronic GVHD. This may be important, as chronic GVHD is the major determinant of the quality of life of transplant recipients.<sup>17</sup>

Viral diseases remain a significant problem after unrelated HSCT.<sup>18</sup> Theoretically the use of ATG might be associated with an increased incidence of viral disease, as

ATG (persisting beyond day 0) could kill anti-viral T cells contained in the graft. However, the incidence of viral complications in our cohort was not unusually high. Incidence of CMV disease or EBV-LPD in our cohort was not higher compared to published data.<sup>19-22</sup>

Relapse is another significant problem of transplant recipients, which could be theoretically worsened by the use of ATG (through the killing of T cells mediating graft-versus-leukemia effect). However, the incidence of relapse in our cohort was not high. Moreover, the level of MRD before HSCT has been shown to be crucial for outcome. This fully correlates with published data where level of MRD proved to be the only significant risk factor in multivariate analysis and independent on the use of ATG.<sup>12,13</sup>

If our results are confirmed in prospective randomized studies, the use of ATG will possibly widen the choice of donors and grafts for children needing HSCT.

#### Acknowledgements

We thank our collaborators from CPH (Czech Pediatric Hematology Working Group) for referring patients, national registries of donors in Pilsen and Prague, HLA laboratories namely in Institute of Hematology and Blood Transfusion and CLIP (Childhood Leukemia Investigation Prague) in Prague. We thank Jan Storek for editorial help. This work was partly supported by Grant IGA CR NR 8223/3.

#### References

- Klingebl T, Handgretinger R, Lang P, Bader P, Niethammer D. Haploidentical transplantation for acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Blood Rev* 2004; 18: 181-192.
- Lang P, Greil J, Bader P, Handgretinger R, Klingebiel T, Schumm M et al. Long-term outcome after haploidentical stem cell transplantation in children. *Blood Cells Mol Dis* 2004; 33: 281-287.
- Duggan P, Booth K, Chaudhry A, Stewart D, Ruether JD, Gluck S et al. Unrelated donor BMT recipients given pretransplant low-dose antithymocyte globulin have outcomes equivalent to matched sibling BMT: a matched pair analysis. *Bone Marrow Transplant* 2002; 30: 681-686.
- Finke J, Schmoor C, Lang H, Potthoff K, Bertz H. Matched and mismatched allogeneic stem-cell transplantation from unrelated donors using combined graft-versus-host disease prophylaxis including rabbit anti-T lymphocyte globulin. *J Clin Oncol* 2003; 21: 506-513.
- Seidel MG, Fritsch G, Matthes-Martin S, Lawitschka A, Lion T, Potschger U et al. Antithymocyte globulin pharmacokinetics in pediatric patients after hematopoietic stem cell transplantation. *J Pediatr Hematol Oncol* 2005; 27: 532-536.
- Carpenter PA, Sanders JE. Steroid-refractory graft-vs host disease: past, present and future. *Pediatr Transplant* 2003; 7 (Suppl 3): 19-31.
- Simpson D. New developments in the prophylaxis and treatment of graft versus host disease. *Expert Opin Pharmacother* 2001; 2: 1109-1117.
- Vogelsang GB, Arai S. Mycophenolate mofetil for the prevention and treatment of graft-versus-host disease following stem cell transplantation: preliminary findings. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27: 1255-1262.



- 9 Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hows J *et al*. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15: 825–828.
- 10 Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL, McDonald GB, Striker GE, Sale GE *et al*. Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *Am J Med* 1980; 69: 204–217.
- 11 Bader P, Beck J, Frey A, Schlegel PG, Hebarth H, Handgretinger R *et al*. Serial and quantitative analysis of mixed hematopoietic chimerism by PCR in patients with acute leukemias allows the prediction of relapse after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21: 487–495.
- 12 Krejci O, van der Velden VH, Bader P, Kreymborg H, Goulden N, Hancock J *et al*. Level of minimal residual disease prior to haematopoietic stem cell transplantation predicts prognosis in paediatric patients with acute lymphoblastic leukaemia: a report of the Pre-BMT MRD Study Group. *Bone Marrow Transplant* 2003; 32: 849–851.
- 13 Eckert C, Scrideli CA, Taube T, Songia S, Wellmann S, Manenti M *et al*. Comparison between TaqMan and Light-Cycler technologies for quantification of minimal residual disease by using immunoglobulin and T-cell receptor genes consensus probes. *Leukemia* 2003; 17: 2517–2524.
- 14 Sramkova L, Muzikova K, Fronkova E, Krejci O, Sedlacek P, Formankova R *et al*. Detectable minimal residual disease before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation predicts extremely poor prognosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2006 (in press).
- 15 Champlin RE, Schmitz N, Horowitz MM, Chapuis B, Chopra R, Cornelissen JJ *et al*. Blood stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation. IBMTR Histocompatibility and Stem Cell Sources Working Committee and the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Blood* 2000; 95: 3702–3709.
- 16 Ringden O, Labopin M, Bacigalupo A, Arcese W, Schaefer UW, Willemze R *et al*. Transplantation of peripheral blood stem cells as compared with bone marrow from HLA-identical siblings in adult patients with acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2002; 20: 4655–4664.
- 17 Forinder U, Lof C, Winiarski J. Quality of life and health in children following allogeneic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2005; 36: 171–176.
- 18 Patel SR, Ridwan RU, Ortin M. Cytomegalovirus reactivation in pediatric hemopoietic progenitors transplant: a retrospective study on the risk factors and the efficacy of treatment. *J Pediatr Hematol Oncol* 2005; 27: 411–415.
- 19 Morfin F, Boucher A, Najioullah F, Bertrand Y, Bleyzac N, Poitevin-Later F *et al*. Cytomegalovirus and adenovirus infections and diseases among 75 paediatric unrelated allogeneic bone marrow transplant recipients. *J Med Virol* 2004; 72: 257–262.
- 20 Qamruddin AO, Oppenheim BA, Guiver M, Mutton KJ, Chopra R. Screening for cytomegalovirus (CMV) infection in allogeneic bone marrow transplantation using a quantitative whole blood polymerase chain reaction (PCR) method: analysis of potential risk factors for CMV infection. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27: 301–306.
- 21 Faye A, Quartier P, Reguerre Y, Lutz P, Carret AS, Dehee A *et al*. Chimaeric anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) in post-transplant B-lymphoproliferative disorder following stem cell transplantation in children. *Br J Haematol* 2001; 115: 112–118.
- 22 van Esser JW, van der Holt B, Meijer E, Niesters HG, Trensche R, Thijsen SF *et al*. 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.

## 9.2. HHV-6

Celkem jsme HHV-6 detekovali v 6 792 vzorcích krve od 217 dětských pacientů a 7 822 vzorcích od 382 dospělých pacientů. HHV-6 DNA jsme detekovali u 96 pacientů dětských (44,2%) a 54 pacientů dospělých (14,1%). U žádného z našich pacientů jsme nepozorovali symptomy HHV-6 reaktivace, které bychom léčili virostatiky.

Variantu viru jsme určovali v 69 případech a pouze u tří pacientů jsme určili variantu A viru. Ve všech třech případech jsme následně také prokázali chromozomální integraci HHV-6. Tato detekce byla provedena pomocí nested PCR (viz metody a článek č. 6).

Již v roce 2003 jsme u jednoho pacienta pozorovali vysokou nálož HHV-6 DNA ve vzorku před transplantací, kdy byl pacient zcela bez symptomů HHV-6 infekce. Rozhodli jsme se vyčkat a případnou virostatickou terapii nasadit až v případě dalšího vzestupu kvantity HHV-6 DNA po transplantaci. Po HSCT však u něj kvantita virové DNA klesla na nízkou hladinu a neprojevil se jakékoli komplikace, které bychom mohli asociovat s HHV-6. Pacient nás zaujal také detekcí varianty A viru. S odtupem tří let jsme pak u tohoto pacienta prokázali chromozomálně integrovaný HHV-6 (CI-HHV-6) (viz HHV-6 v úvodu). Zároveň jsme otestovali archivované vzorky DNA určené původně pro detekci minimální reziduální nemoci (MRN) v kostní dřeni a periferní krvi před HSCT (článek č. 4). V grafu ve článku je jasně vidět obdobná nálož HHV-6 DNA detekovaná více jak tři roky před HSCT, stejně jako obdobná kvantita více jak tři roky po HSCT ve vzorcích vlasů.

Protože se až dosud o nositelích i možném patogenním působení integrovaného HHV-6 genomu mnoho neví, rozhodli jsme se publikovat několik našich pacientů s CI-HHV-6. V prvním případě se jedná o dospělou pacientku, která nebyla transplantována, ale byla léčená s příznaky těžké aplastické anémie (SAA) v roce 2005. Protože jsme v té době na CI-HHV-6 ihned nepomysleli, pacientka byla nejprve léčena virostatiky a po dvou měsících neúspěšné terapie pak teprve vysokodávkovanou imunosupresivní terapií (ATG, CsA a kortikoidy) opět bez jakéhokoli vlivu na kvantitu HHV-6 DNA v periferní krvi (článek č. 5). Tento výsledek je v souladu s integrací HHV-6 DNA do chromozomu a s tím, že nedochází k jeho reaktivaci do stádia produktivní infekce s tvorbou virových partikulí. Pokud by totiž k produktivní infekci docházelo, a u pacienta s těžkou aplastickou anémií charakterizované také snížením specifické imunity, se

taková reaktivace dá předpokládat, pak by nasazená virostatické terapie vedla ke snížení normalizované virové nálože v periferní krvi.

Protože jsme také chtěli získat přehled o frekvenci CI-HHV-6 v populaci České republiky, otestovali jsme také vzorky dětských pacientů s leukémiemi z již zmíněných vzorků DNA původně určených pro detekci MRN. V naší studii jsme prokázali přítomnost CI-HHV-6 u pěti pacientů z 339 (1,47%), což zcela odpovídá dosud publikovaným datům (viz úvod). U žádného jsme také neprokázali spojitost přítomnosti HHV-6 DNA s komplikacemi pozorovanými při terapii cytostatiky u ALL (článek č. 6).

Poslední článek popisující naše zkušenosti s CI-HHV-6, který je v současné době v recenzním řízení, je článek věnující se náloži HHV-6 DNA a CMV DNA u dvou pacientů po alogenní HSCT, kteří zemřeli na komplikace spojené s CMV pneumonií. U obou pacientů jsme získali pro detekci také vzorky tkání. Na normalizovaných výsledcích HHV-6 DNA je dobře dokumentována obdobná kvantita nálože ve tkáních a v periferní krvi před HSCT. Mírně nižší kvantita pak mohou být přisouzeny prokrvení tkání hematopoézou dárce, který nebyl, jak je vidět na grafem longitudinálního sledování, nositelem CI-HHV-6. Řádově nižší kvantita jsou pak ve vzorcích s větším zastoupením hematopoetické tkáně jako jsou slezina a kostní dřeň. Současně je na vzorcích tkání vidět také obrovský rozdíl ve kvantitě CMV DNA ve tkáních, kde je detekovatelná kvantita nejvyšší v poškozeném orgánu, v těchto případech tedy plicní tkáni. Zároveň se nám u jednoho z prezentovaných pacientů podařilo ve spolupráci s University Colledge London popsat nové místo chromozomální integrace na krátkých raménkách chromozómu 18. Příklady FISH jsou prezentovány v článku (článek č. 7).



## LETTER TO THE EDITOR

**Disappearance of pre-existing high HHV-6 DNA load in blood after allogeneic SCT**

*Bone Marrow Transplantation* advance online publication, 20 August 2007; doi:10.1038/sj.bmt.1705813

Human herpesvirus 6 (HHV-6) persists after primary infection at low level in blood and may reactivate in immunosuppressed patients, especially recipients of haematopoietic stem cell transplant (HSCT) causing encephalitis, engraftment failure, hepatitis and fever.<sup>1,2</sup> In contrast to this situation some individuals have persistent, very high levels of HHV-6 DNA in blood due to chromosomal integration.<sup>3</sup> Chromosomal integration of HHV-6 (CHHV-6) was first described by Luppi *et al.*<sup>4</sup> in patients without any of the clinical manifestations of HHV-6 disease. Later, Daibata *et al.*<sup>5</sup> showed the inheritance of integrated HHV-6 DNA through two generations. Indeed, it seems that HHV-6 may be found in every cell of the body since it has been found not only in blood but also in the hair follicles of individuals with CHHV-6, and in both cases there is at least one copy of HHV-6 DNA per cell.<sup>3</sup>

CHHV-6 is a relatively common phenomenon being found in 0.2 to 2.9% of the human population.<sup>6,7</sup> It is to be predicted therefore that occasionally an allogeneic HSCT recipient or donor will have CHHV-6. Clark *et al.*<sup>8</sup> have reported such a situation with a graft from a donor with CHHV-6 to a patient originally without viral integration; there was consequent transmission of CHHV-6 via haematopoietic stem cells to the donor and an enormous increase in the amount of HHV-6 DNA in blood. Here, we report the opposite donor–recipient combination: a recipient with CHHV-6 who received a graft from a donor without integrated HHV-6.

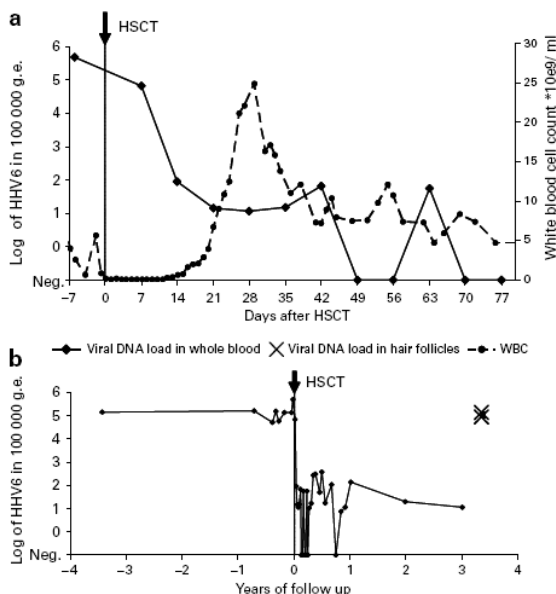
In July 2003, in his second complete remission 2.5 years after the primary diagnosis, a 7-year-old boy underwent allogeneic HSCT for a relapse of ALL. After conditioning therapy (fractionated total body irradiation–12 Gy, etoposide and antithymocyte globulin), he received peripheral blood stem cells from an unrelated donor HLA matched in nine out of ten alleles. Aciclovir prophylaxis against herpes simplex virus infection was started during the conditioning. A full tri-lineage engraftment was confirmed with granulocytes engrafted on day +5 (ANC  $>0.5 \times 10^9/l$ ) and platelets on day +17 (untransfused platelet count  $>20 \times 10^9/l$ ). Acute GvHD grade II manifested on day +19 and was successfully treated with corticosteroids. One month after HSCT, BK virus-positive haemorrhagic cystitis occurred for which he received hyperhydration. No further severe complications were detected in the later post transplant period. The patient is currently at three years after HSCT without any clinical problems, has stable

complete donor chimaerism in his blood and is in continuous remission of his leukaemia.

Viral loads in peripheral blood were regularly monitored for CMV, EBV and HHV-6<sup>9</sup> as part of standard post transplant surveillance. The viral loads were quantified using real-time PCR for viral DNA and normalized to 100 000 human genome equivalents in comparison with the quantity of albumin gene DNA in the sample.<sup>10</sup> CMV and EBV DNA loads were repeatedly negative or very low. However, the situation with HHV-6 was strikingly different; during conditioning therapy the first test for the presence of HHV-6 DNA detected an extremely high load of 490 000 normalized copies in peripheral blood, although there was no sign of HHV-6 related clinical complications. The subtype of the virus was determined as HHV-6 A by nested PCR and sequencing. In view of the apparent absence of HHV-6 disease, it was decided to continue with the HSCT but without antiviral therapy against the virus and with frequent monitoring of HHV-6 during the post transplant period. The level of HHV-6 DNA decreased rapidly after the transplant coincided with engraftment of the donor blood cells (Figure 1), and no clinical or laboratory signs of HHV-6-related complications were present during the post transplant period. The median of normalized viral DNA load in blood post transplant was 16, that is a 1000-fold lower compared to that pre-transplant, and remained at this level throughout three years of surveillance.

Following the report by Ward *et al.*<sup>3</sup> we tested for the presence of HHV-6 DNA in the sample of allogeneic graft and found none. We also tested several archived pre-transplant blood samples and the patient's hair follicles taken three years after HSCT. The HHV-6 DNA load in blood had been persistently very high including the first sample available for testing more than three years before transplantation and was also present at high level in hair follicles (Figure 1). Notably the level of HHV-6 DNA per genome equivalent was about 1.

Thus, we demonstrate a decrease of HHV-6 DNA in our patient's blood within two weeks of transplantation, which is the converse of the increase described by Clark *et al.*,<sup>8</sup> in the case of an integration-negative patient receiving an HSCT from a donor with CHHV-6. In our case, the high levels of HHV-6 DNA in the recipient's blood before transplantation, and also in hair follicles confirm the presence of CHHV-6 and the precipitous decrease in HHV-6 DNA level after transplantation is due to the replacement of the recipient's haematopoietic system with that of the CHHV-6 negative donor. However, since HHV-6 DNA was found in the recipient's hair follicles after transplantation, it is clear



**Figure 1** Monitoring of HHV-6 DNA load pre- and post-HSCT in a patient with chromosomal integration of HHV-6. (a) The relationship of HHV-6 DNA in blood to white blood count in the early period after transplantation. (b) The level of HHV-6 DNA in blood during four years before and three years after transplantation. g.e., genome equivalents.

that other non-haematopoietic cells in the recipient's body still had CHHV-6, thus accounting for the persistent but low level of DNA in blood after transplantation, which is most likely due to the release of chromosomal DNA from non-haematopoietic cells during inflammation, GvHD and so on. Unfortunately, pre-transplant samples were not available to test retrospectively by FISH for HHV-6 DNA chromosomal sequences using the method described by Clark *et al.*<sup>8</sup> However, we recently encountered another similar case of a recipient with CHHV-6, and in this instance were able to confirm CHHV-6 by FISH (data not shown). Finally, our case also confirms that an extremely high HHV-6 viral load by itself without relevant symptoms of disease should not be an indication for antiviral drug treatment until the possibility of CHHV-6 has been ruled out.

#### Acknowledgements

Supported by the Czech Republic Ministry of Education grant no. 0021620813 and Ministry of Health no. 00064203.

P Hubacek<sup>1</sup>, K Hyncicova<sup>2</sup>, K Muzikova<sup>1</sup>, O Cinek<sup>2</sup>,  
M Zajac<sup>3</sup> and P Sedlacek<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Paediatric Haematology and Oncology,  
Charles University in Prague, Teaching Hospital Motol,  
Prague, Czech Republic;

<sup>2</sup>Department of Paediatrics, Charles University in Prague,  
Teaching Hospital Motol, Prague, Czech Republic and

<sup>3</sup>Department of Microbiology, Charles University in Prague,  
Teaching Hospital Motol, Prague, Czech Republic

E-mail: petr.hubacek@lfmotol.cuni.cz

#### References

- 1 Yoshikawa T. Human herpesvirus 6 infection in hematopoietic stem cell transplant patients. *Br J Haematol* 2004; **124**: 421–432.
- 2 Zerr DM, Corey L, Kim HW, Huang ML, Ngyu L, Boeckh M. Clinical outcomes of human herpesvirus 6 reactivation after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 2005; **40**: 932–940.
- 3 Ward KN, Leong HN, Nacheva EP, Howard J, Atkinson CE, Davies NW *et al.* Human herpesvirus 6 chromosomal integration in immunocompetent patients results in high levels of viral DNA in blood, sera, and hair follicles. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 1571–1574.
- 4 Luppi M, Marasca R, Barozzi P, Ferrari S, Ceccherini-Nelli L, Batoni G *et al.* Three cases of human herpesvirus-6 latent infection: integration of viral genome in peripheral blood mononuclear cell DNA. *J Med Virol* 1993; **40**: 44–52.
- 5 Daibata M, Taguchi T, Nemoto Y, Taguchi H, Miyoshi I. Inheritance of chromosomally integrated human herpesvirus 6 DNA. *Blood* 1999; **94**: 1545–1549.
- 6 Leong HN, Tuke PW, Tedder RS, Khanom AB, Eglin RP, Atkinson CE *et al.* The prevalence of chromosomally integrated human herpesvirus 6 genomes in the blood of UK blood donors. *J Med Virol* 2007; **79**: 45–51.
- 7 Tanaka-Taya K, Sashihara J, Kurahashi H, Amo K, Miyagawa H, Kondo K *et al.* Human herpesvirus 6 (HHV-6) is transmitted from parent to child in an integrated form and characterization of cases with chromosomally integrated HHV-6 DNA. *J Med Virol* 2004; **73**: 465–473.
- 8 Clark DA, Nacheva EP, Leong HN, Brazma D, Li YT, Tsao EH *et al.* Transmission of integrated human herpesvirus 6 through stem cell transplantation: implications for laboratory diagnosis. *J Infect Dis* 2006; **193**: 912–916.
- 9 Gautheret-Dejean A, Manichanh C, Thien-Ah-Koon F, Fillet AM, Mangeney N, Vidaud M *et al.* Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of human herpesvirus-6 infection and application to bone marrow transplant patients. *J Virol Methods* 2002; **100**: 27–35.
- 10 Pongers-Willems MJ, Verhagen OJ, Tibbe GJ, Wijkhuijs AJ, de Haas V, Roovers E *et al.* Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes. *Leukemia* 1998; **12**: 2006–2014.



### Failure of multiple antivirals to affect high HHV-6 DNAemia resulting from viral chromosomal integration in case of severe aplastic anaemia

**We report a fifty-year-old woman presenting with severe aplastic anaemia (SAA) and prolonged high Human Herpesvirus 6 (HHV6) variant A DNAemia detected by quantitative PCR. Multiple antiviral treatments failed to affect the HHV6 DNAemia and subsequent immunosuppressive treatment reached only partial improvement as judged by bone marrow examinations. The patient remained dependent on thrombocyte transfusions and G-CSF treatment. After one year of steady high HHV6 DNA load in blood, viral chromosomal integration was proved by demonstrating the viral DNA in hair follicles. This condition appeared to be unconnected with, and to have no effect, on the original SAA**

Haematologica 2007; 92:(9)e98-e100 DOI: 10.3324/haematol.11592

We report a fifty-year-old woman who was admitted to hospital after one month of fatigue, easy bruising and loss of weight with fever and acute tonsillitis at the end of August 2005. Her blood counts showed pancytopenia - 1,600 leucocytes/microL (89% of lymphocytes), 55,000 thrombocytes/microL, 94 g/L haemoglobin.

Bone marrow aspiration and trephine biopsy showed hypocellular bone marrow with 14.4% of granulopoiesis, almost no megakaryocyte precursors detectable, low counts of erythropoiesis cell precursors, lipophages, erythrophagocytosis and 78% of lymphoid cells. Most of the lymphoid cells were T lymphocytes, of which 16.3% were HLA DR positive. Based on the above findings, severe aplastic anaemia (SAA) was diagnosed. An immediate treatment was commenced with antibiotics and granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), however no reaction to G-CSF was observed in the peripheral blood.

There was nothing remarkable in the family, pharmacological or social history and no evidence of exposure to harmful chemical substances, drugs or radiation and no signs of autoimmunity or paroxysmal nocturnal haemoglobinuria.

On testing whole blood for viral infections by quantitative real-time PCR, there was no evidence of *Human Cytomegalovirus* and *Parvovirus B19*, while *Epstein-Barr virus* was detected at a minute viral load. However, we detected high *Human Herpesvirus 6 (HHV6)* DNA load of 150,000 copies normalized to 100,000 human genome equivalents which were obtained by quantification of albumin gene.<sup>1,2</sup> We also detected 4,200 viral copies of HHV6 per mL of plasma. The virus was subsequently identified to be the variant A using a nested PCR system.

Because of high *HHV6* DNA load (Figure 1) and the reported suppressive effect of *HHV6* on haematopoiesis,<sup>3,5</sup> we considered that the *HHV6* infection was a possible explanation of the patient's low blood count. Antiviral treatment (Figure 1) was started with foscarnet 120 mg/kg per day. After two weeks of

treatment without any decrease in the level of *HHV6* DNA, we changed the therapy to cidofovir 5 mg/kg once a week. Four weeks later because the *HHV6* DNA level remained high, we altered the therapy to ganciclovir 2.5 mg/kg every 12 hours. Virostatic treatment failed to reduce viral load documented by the mean of 150,000 normalized copies of *HHV6* (range 89,000–200,000) during the treatment. During these two months, the patient was kept on an antibiotic and antimycotic prophylaxis and immunoglobulin supplementation.

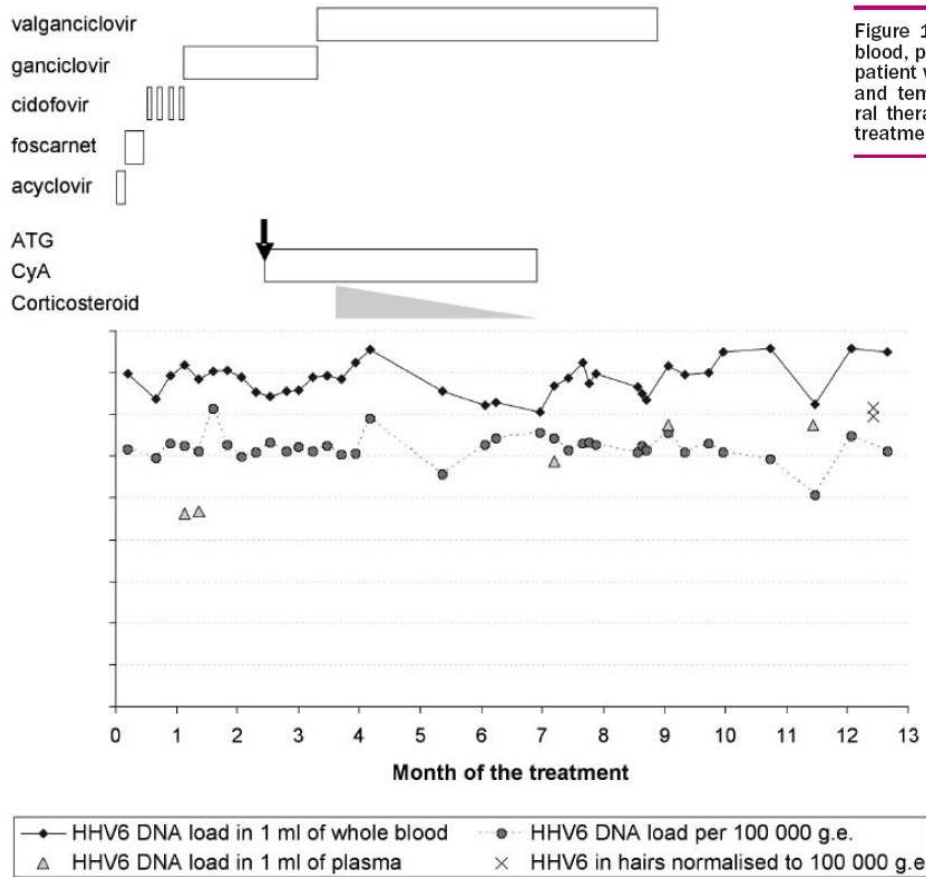
Since the antiviral treatment did not result in any decrease in viral load and no improvement in the patient's clinical status had been observed two months later, we started immunosuppressive treatment for SAA. The treatment consisted of four doses of rabbit antithymocyte globulin (ATG Fresenius) at a dose of 40 mg/kg, 1.5 mg/kg per day of corticosteroids and cyclosporine A adjusted to maintain a serum level of 100 to 200 ng/mL and complemented by G-CSF. During the immunosuppressive treatment, the *HHV6* levels remained constantly high with a mean of 160,000 normalized copies (range 37,000–1 300,000) (Figure 1).

After two months of immunosuppressive treatment, there were no signs of improvement in haematopoiesis in control trephine biopsy of bone marrow and because there was no sibling donor available, we searched for unrelated haematopoietic stem cell donor but without success. However, after four months of treatment (January 2006), there was a temporary improvement in peripheral blood and the white blood cell count reached 4,000 leucocytes/microL with granulocytes above 1,500/microL, although patient remained dependent on thrombocyte transfusions.

Two months later, the blood count worsened again. Therefore we started administration of pegfilgrastim 6 mg every three weeks, keeping the granulocytes above 3,000 leucocytes/microL. In June 2006, thrice weekly haemodialysis was required for progressively worsening renal function. The patient did not suffer from severe anemia although she was remaining dependent on thrombocyte transfusions and random G-CSF treatment. She died due to peracute sepsis caused by *Staphylococcus aureus* in January 2007.

Considering the contribution of *HHV6* infection to our patient's illness, extensive antiviral therapy failed to induce any improvement in stem cell activity or a fall in viral DNA levels and lengthy immunosuppressive treatment did not cause a rise in viral DNA levels both of which findings indicate that active viral infection was not responsible for the primary disease in our patient. Moreover the patient's virus was variant A, which is not connected with any known disease but is commonly found in chromosomal integration of *HHV6* (CHHV6); indeed we have recently reported a case of CHHV6 with variant A (Hubacek *et al.*, in press).

CHHV6 is relatively common phenomenon being



found between 0.2 and 2.9% of the human population<sup>6,7</sup> and was first described by Luppi et al. in 1993<sup>8</sup> in patients without any clinical manifestation of *HHV6* disease. Daibata *et al.*<sup>9</sup> demonstrated the inheritance of *HHV6* DNA through two generations. Indeed it seems that *HHV6* may be found in any cell in the body since it has been found not only in the blood but also in the hair follicles of individuals with CHHV6 and in both these sites there is at least one copy of *HHV6* DNA per cell.<sup>10</sup> Thus, very high, persistent levels of *HHV6* DNAemia at about one copy/cell in our patient were highly suggestive of CHHV6 rather than active infection. We therefore tested for *HHV6* DNA in the hair follicles of our patient and found it at a high level comparable with that in the patient's blood (Figure 1) thus confirming chromosomal integration.

This case reminded us the necessity of critical review of the results obtained by molecular biological techniques. We were initially misled by the detection of high level of *HHV6* DNA in both whole blood and plasma and concluded that this implied active virus infection whereas in fact the *HHV6* DNA found in plasma was derived from cellular chromosomal DNA containing *HHV6*.<sup>10</sup> Detection of *HHV6* DNA in the hair roots proved the genome integration into the cells. Testing for the presence of *HHV6* DNA in the hair follicles proved to be an easy way to discriminate between active infec-

tion and integration of *HHV6* DNA into human genome among the suspected patients according to the published data.<sup>10</sup> In agreement with our experience, there was not published evidence of viral reactivation from chromosomally integrated *HHV6* genome. Therefore in similar case we would not lose any precious time with the virostatic drugs and treat the primary disease as soon as *HHV6* chromosomal integration is confirmed.

Hubacek P,<sup>1</sup> Maalouf J,<sup>2</sup> Zajickova M,<sup>2</sup> Kouba M,<sup>2</sup> Cinek O,<sup>3</sup> Hyncicova K,<sup>3</sup> Fales I,<sup>2</sup> Cetkovsky P.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Paediatric Haematology and Oncology, Motol University Hospital, Prague, The Czech Republic; <sup>2</sup>Institute of Haematology and Blood Transfusion, Prague, The Czech Republic; <sup>3</sup>Department of Paediatrics, Motol University Hospital, Prague, The Czech Republic

Correspondence: Petr Hubacek, M.D. Department of Paediatric Haematology and Oncology, Motol University Hospital, V Uvalu 84 CZ-150 06, Prague 5 – Motol, The Czech Republic.

Phone: +420 224 432 026, Fax: +420 224 432 020.

E-mail: Petr.Hubacek@Lfmotol.cuni.cz

Key words: human herpesvirus 6, severe aplastic anaemia, chromosomal integration

The work is supported by Ministry of Education of the Czech Republic grant No. 0021620813 and Ministry of Health of the Czech Republic No. 00064203

---

**References**

1. Gautheret-Dejean A, Manichanh C, Thien-Ah-Koon F, Fillet AM, Mangeney N, Vidaud M, et al. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of human herpesvirus-6 infection and application to bone marrow transplant patients. *J Virol Methods*. 2002;100:27-35.
2. Pongers-Willems MJ, Verhagen OJ, Tibbe GJ, Wijkhuijs AJ, de Haas V, Roovers E, et al. Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes. *Leukemia*. 1998;12:2006-14.
3. Isomura H, Yoshida M, Namba H, Fujiwara N, Ohuchi R, Uno F, et al. Suppressive effects of human herpesvirus-6 on thrombopoietin-inducible megakaryocytic colony formation in vitro. *J Gen Virol*. 2000;81:663-73.
4. Ljungman P, Wang FZ, Clark DA, Emery VC, Remberger M, Ringden O, et al. High levels of human herpesvirus 6 DNA in peripheral blood leucocytes are correlated to platelet engraftment and disease in allogeneic stem cell transplant patients. *Br J Haematol*. 2000;111:774-81.
5. Knox KK, Carrigan DR. In vitro suppression of bone marrow progenitor cell differentiation by human herpesvirus 6 infection. *J Infect Dis*. 1992;165:925-9.
6. Tanaka-Taya K, Sashihara J, Kurahashi H, Amo K, Miyagawa H, Kondo K, et al. Human herpesvirus 6 (HHV-6) is transmitted from parent to child in an integrated form and characterization of cases with chromosomally integrated HHV-6 DNA. *J Med Virol*. 2004;73:465-73.
7. Leong HN, Tuke PW, Tedder RS, Khanom AB, Eglin RP, Atkinson CE, et al. The prevalence of chromosomally integrated human herpesvirus 6 genomes in the blood of UK blood donors. *J Med Virol*. 2007;79:45-51.
8. Luppi M, Marasca R, Barozzi P, Ferrari S, Ceccherini-Nelli L, Batoni G, et al. Three cases of human herpesvirus-6 latent infection: integration of viral genome in peripheral blood mononuclear cell DNA. *J Med Virol*. 1993;40:44-52.
9. Daibata M, Taguchi T, Nemoto Y, Taguchi H, Miyoshi I. Inheritance of chromosomally integrated human herpesvirus 6 DNA. *Blood*. 1999 ;94:1545-9.
10. Ward KN, Leong HN, Nacheva EP, Howard J, Atkinson CE, Davies NW, et al. Human herpesvirus 6 chromosomal integration in immunocompetent patients results in high levels of viral DNA in blood, sera, and hair follicles. *J Clin Microbiol*. 2006;44:1571-4.



## Prevalence of HHV-6 Integrated Chromosomally Among Children Treated for Acute Lymphoblastic or Myeloid Leukemia in the Czech Republic

Petr Hubacek,<sup>1\*</sup> Katerina Muzikova,<sup>1</sup> Alena Hrdlickova,<sup>2</sup> Ondrej Cinek,<sup>2</sup> Katerina Hyncicova,<sup>2</sup> Hana Hrstkova,<sup>3</sup> Petr Sedlacek,<sup>1</sup> and Jan Stary<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Paediatric Haematology and Oncology, Motol University Hospital, Prague, Czech Republic

<sup>2</sup>Department of Paediatrics, Motol University Hospital, Prague, Czech Republic

<sup>3</sup>1st Department of Paediatrics, Brno University Hospital, Brno, Czech Republic

Chromosomal integration of *human herpesvirus 6* (HHV-6) is a novel situation found in a small percentage of individuals. While active HHV-6 infection is treatable using antivirals, the abnormally high level of HHV-6 DNA found in chromosomal integration of HHV-6 (CI-HHV-6) is not affected by such drugs. Stored DNA samples taken originally for detection of fusion genes and minimal residual disease from 339 pediatric patients treated for leukemia in the Czech Republic between the years 1995–2007 were tested retrospectively. Using real-time quantitative PCR technology, the quantity of HHV-6 DNA detected was normalized to 100,000 human genome equivalents as assessed by quantitation of the albumin gene. HHV-6 DNA was detected in 107 samples from 91 patients (26.8%). In the majority of samples (99) only a minute level of normalized viral copies (NVCs) (median 1.84 NVCs) was detected. A high viral load of approximately 100,000 NVCs was detected in 5 patients (1.5%; median 140,150 NVCs), in all of whom were confirmed subsequently CI-HHV-6 by a detection of HHV-6 DNA in hair follicles or in the nails. In all but one patient with HHV-6 variant B, variant A of the virus was detected. None of the patients with CI-HHV-6 had complications attributable to HHV-6 infection. The prevalence of CI-HHV-6 in childhood leukemia does not differ from that published for other patients or healthy populations. Where high levels of HHV-6 DNA are present, CI-HHV-6 should be confirmed as soon as possible so that potentially toxic but ineffective antiviral treatment can be stopped. *J. Med. Virol.* 00:1–6, 2008. © 2008 Wiley-Liss, Inc.

**KEY WORDS:** human herpesvirus 6; leukemia; chromosomal integration

### INTRODUCTION

*Human herpesvirus 6* (HHV-6) is a common beta-herpesvirus known to cause exanthem subitum (sixth disease), a benign illness of childhood [Yoshikawa, 2004; Ward, 2005]. It has also been associated with encephalitis and febrile illness [Asano et al., 1992; Jones et al., 1994; Oki et al., 1995; Caserta et al., 2001], hepatitis [Ishikawa et al., 2002], myocarditis [Yoshikawa et al., 2001], and thrombocytopaenia [Yoshikawa et al., 1993]. In the immunocompromised host, HHV-6 has been implicated in a number of different diseases such as fever and rash [Sashihara et al., 2002], hepatitis [Ljungman et al., 2000], encephalitis [Bethge et al., 1999; Yoshihara et al., 2004], thrombocytopaenia [Yoshikawa et al., 1993] and delayed platelet and granulocyte engraftment [Ljungman et al., 2000; Zerr et al., 2005]. There are two variants of the virus: A and B, and it is noteworthy that in most of the pathological conditions, only variant B has been detected [Suga et al., 1993; Caserta et al., 2001; Yoshikawa, 2004; Ward, 2005]. Due to improved laboratory tests based on nucleic acid assays, HHV-6 has been detected in clinical samples more frequently during the last few years and is an emerging opportunistic pathogen [De Bolle et al., 2005].

An interesting feature of the virus is chromosomal integration of HHV-6 DNA (CI-HHV-6) which is found in some individuals and is characterized by abnormally

Grant sponsor: Czech Ministry of Health; Grant number: FNM00064203; Grant sponsor: Czech Ministry of Education; Grant number: MSMT0021620813.

\*Correspondence to: Petr Hubacek, MD, Department of Paediatric Haematology and Oncology, Motol University Hospital, V Uvalu 84, CZ-150 06, Prague 5, Motol, Czech Republic. E-mail: petr.hubacek@lfmotol.cuni.cz

DOI 10.1002/jmv.00000

Published online in Wiley InterScience  
(www.interscience.wiley.com)

high levels of HHV-6 DNA. This situation was first described by Luppi et al. [1993] in patients without any symptoms of HHV-6 infection. Later Daibata et al. [1999] showed inheritance of CI-HHV-6 through two generations and HHV-6 DNA has been located precisely on chromosomes 1, 11, 17, and 22, respectively [Daibata et al., 1998; Daibata et al., 1999; Clark et al., 2006a]. Since CI-HHV-6 can be inherited, it seems clear that this viral DNA must be in every cell in the body [Clark et al., 2006b]. Indeed in patients with CI-HHV-6, HHV-6 DNA can be detected in hair follicles [Ward et al., 2006], skin fibroblasts [Daibata et al., 2000], leukocytes [Clark et al., 2006a] and in CSF [Ward et al., 2007], but it should also be detectable in every sample which contains human DNA, for example, in the nails, bronchoalveolar lavage.

CI-HHV-6 is a relatively common phenomenon being present in 0.2–2.9% of the human population [Tanaka-Taya et al., 2004; Leong et al., 2007; Ward et al., 2007] but no study on the incidence of CI-HHV-6 has been carried out on patients with hematological malignancies or individuals in Central Europe. The aim of the present study was to determine retrospectively the prevalence of CI-HHV-6 among children treated for acute lymphoblastic leukemia or acute myeloid leukemia in the Czech Republic and to investigate whether in this cohort of immunosuppressed patients there were any symptoms or signs attributable to the CI-HHV-6.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

This retrospective study was carried out on stored DNA samples obtained from 339 children and adolescents diagnosed and treated for acute lymphoblastic leukemia (ALL) (no. of patients = 318; median age at diagnosis 5.3 years, range 2 days–18.3 years) or acute myeloid leukemia (AML) (no of patients = 21; median age at diagnosis 7.5 year., range 3 days–17.7 years) during the years 1995–2007. The samples were taken for the molecular biological detection of fusion genes in these leukemias (e.g., BCR/ABL, TEL/AML1 and any others which might have had implications for prognosis) and for quantitation of minimal residual disease during treatment. Patients were treated according to the following protocols: ALL-BFM 95, AML-BFM 98, International collaborative treatment protocol for infants under 1 year with acute lymphoblastic leukemia (Interfant 99 , ALL-BFM REZ 2002, ALL IC-BFM 2002, AML-BFM REZ 2003, AML-BFM 2004. Chemotherapy treatment according to the above protocols is usually between 6 and 12 months long. The patients or their guardians gave informed consent for use of the samples for further scientific investigation. The study was approved by the local ethics committee.

### Samples

Samples were taken at diagnosis or during treatment of the leukemia. DNA was extracted from nucleated

blood cells using QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions and was then stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

For the present study, a sample that contained enough DNA was chosen randomly from each patient. If the patient underwent an allogeneic hematopoietic stem cell transplant only the pre-transplant samples were tested. In the patients suspected of CI-HHV-6 because of an abnormally high level of viral DNA of about one copy/cell [Hubacek et al., 2007b], DNA from hair follicles and nails was extracted using the QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. In those hematopoietic stem cell transplant recipients with suspected CI-HHV-6, we tested for HHV-6 DNA in samples obtained during posttransplant viral surveillance.

### Quantitative PCR

The amount of human DNA was determined by quantitation of the human albumin gene using the method published by Pongers-Willemsse et al. [1998] and detection simultaneously of fusion genes as a control to identify false negative results.

In those samples chosen for study, the quantity of HHV-6 DNA was also measured using the primers and probe as described by Gautheret-Dejean et al. [2002]. The results were adjusted to 100,000 human genome equivalents by relating them to the quantity of human albumin gene DNA. Real-time quantitative PCR (RQ-PCR) testing was performed on an ABI 7300 machine (Applied Biosystems, Foster City, CA) or BioRad iQCyler (BioRad, Hercules, CA). The PCR reactions quantifying HHV-6 were carried out in 25  $\mu\text{l}$  containing 1 $\times$  PCR buffer, 3.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5% glycerol, 100  $\mu\text{M}$  each dNTP (Sigma–Aldrich, Prague, Czech Republic), 500 nM primers, 200 nM FAM-labeled probe and 0.5 U HotStar Taq Polymerase (Qiagen). After 15 min at  $95^{\circ}\text{C}$ , the samples were amplified by 45 times for 15 sec at  $94^{\circ}\text{C}$  and 1 min at  $60^{\circ}\text{C}$  at which point in each cycle the fluorescence was measured.

Samples with low levels of HHV-6 DNA were considered a result of benign viral reactivation during severe immunosuppression. In patients suspected of having CI-HHV-6, whose sample contained approximately 100,000 normalized viral copies (NVCs) of HHV-6 DNA, all other stored samples acquired during the treatment were tested. In addition, the hair follicles or nails of these patients were tested for HHV-6 DNA and expressed the results as NVCs.

### Distinguishing Variant A and B of the Virus

To distinguish between A and B variants of HHV-6 in patients with CI-HHV-6, a set of variant-specific nested PCR assays targeted to the immediate early antigen was used; the sequences of the primers and lengths of amplicons are listed in Table I. Both rounds of nested PCR were performed in 15  $\mu\text{l}$  containing of 1 $\times$  PCR buffer, 3.0 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100  $\mu\text{M}$  each dNTP (Sigma–Aldrich), 600 nM primers and 1 unit of Promega



TABLE I. Sequences of Primers Used for Discrimination Between HHV-6 A and B Variants

| Designation     | Sequence                       | Source                | Length of the amplicon (bp) |
|-----------------|--------------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| HHV-6-A variant |                                |                       |                             |
| First round     |                                |                       |                             |
| Forward         | 5'-CTGATATTTAAAGTGTTGCCA-3'    | Our design            | 321                         |
| Reverse         | 5'-AGGAATCTTCTATCGAATCT-3'     |                       |                             |
| Second round    |                                |                       |                             |
| Forward         | 5'-GGAACCATCTTGTTCGTGCC-3'     | Nitsche et al. [2001] | 276                         |
| Reverse         | 5'-CATGAAGATGATGACAATAAAATG-3' |                       |                             |
| HHV-6-B variant |                                |                       |                             |
| First round     |                                |                       |                             |
| Forward         | 5'-AACTACTTGAAACTCAAC-3'       | Our design            | 223                         |
| Reverse         | 5'-CTTTCTGGATTTAGAGTATC-3'     |                       |                             |
| Second round    |                                |                       |                             |
| Forward         | 5'-GAGTTGCTGAGTTGGTAAAGG-3'    | Nitsche et al. [2001] | 142                         |
| Reverse         | 5'-GAGACCGGGTCTGGACAACA-3'     |                       |                             |

Taq polymerase (Promega, [Madison](#)<sup>Q3</sup>). The template volume was 2 µl of DNA in both rounds. The PCR reactions were performed on an ABI 9700 machine with the thermal profile consisting of 2 min denaturation at 94°C, followed by 30 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 55°C and 30 sec at 72°C, and a final extension for 1 min at 72°C. After the first PCR round, the products were diluted 1:100 with distilled water, before being subjected to the second round of amplification. The touchdown principle was used: the thermal profile consisted of denaturation for 2 min at 94°C, followed by 30 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec of annealing and 20 sec at 72°C. The annealing temperature was 70°C in the first five cycles, 67°C in the following five cycles, 65°C in the next five cycles, and 60°C in the remaining 20 cycles. The final synthesis lasted 1 min at 72°C. All samples were tested in duplicate. Amplicons were detected on a 2% agarose gel run at approximately 10 V/cm for 30 min. With each run, a negative no-template control, and positive controls of the A variant (DNA obtained from viral culture supernatant, confirmed by sequencing), and the B variant (from a HHV-6-B positive sample, confirmed by sequencing) were included.

**RESULTS**

Three hundred sixty-seven samples of peripheral blood or bone marrow obtained from the patients were screened. HHV-6 DNA was detected in 107 samples (28.3%) from 91 patients (26.8%). In only five of the patients, was an abnormally high level of HHV-6 DNA detected (approximately 100,000 NVCs; median of 140,150 NVCs), while in the rest of the positive patients the median HHV-6 DNA load was only 1.83 NVCs ( $P < 0.003$  by Student's *t*-test; see Fig. 1).

In the five patients with a very high HHV-6 DNA load and hence suspected CI-HHV-6, the presence of HHV-6 DNA were confirmed in hair follicles and in nails as well as in blood samples (see Fig. 2). The levels detected in all five patients were very similar both in the blood and the nails/hair and remained at the same level throughout treatment with chemotherapy. In four out of the five

patients HHV-6 A, and in the fifth variant B were detected. Two of these patients underwent allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and there was a rapid decline of detectable HHV-6 DNA after the hematopoietic stem cell transplant in both of patients [see Fig. 2 and Hubacek et al., 2007a]. The medical histories of the CI-HHV-6 positive patients were examined carefully for complications attributable to

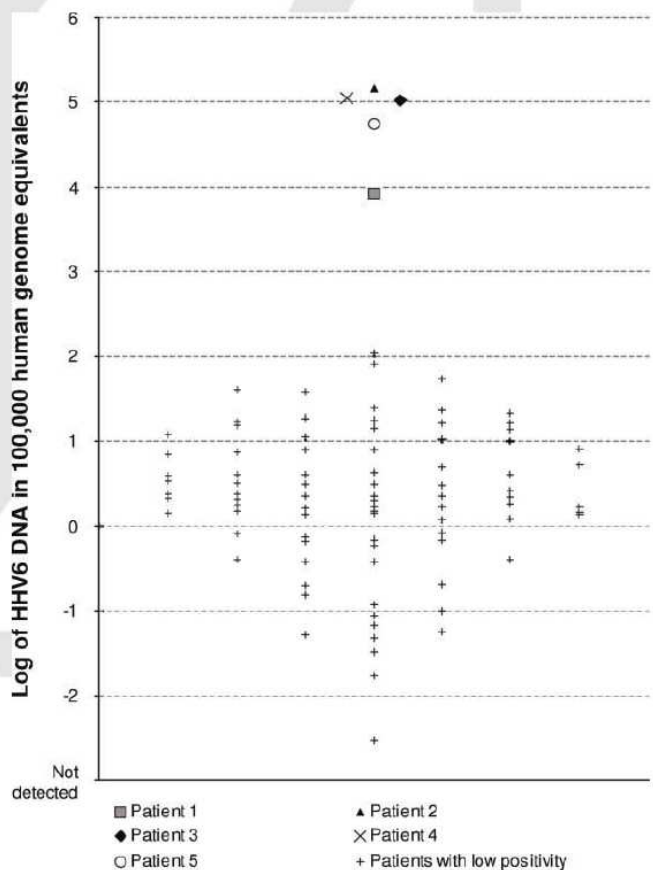


Fig. 1. Amount of HHV-6 DNA detected on screening of samples of peripheral blood or bone marrow from 91 HHV-6 positive of leukemic patients.

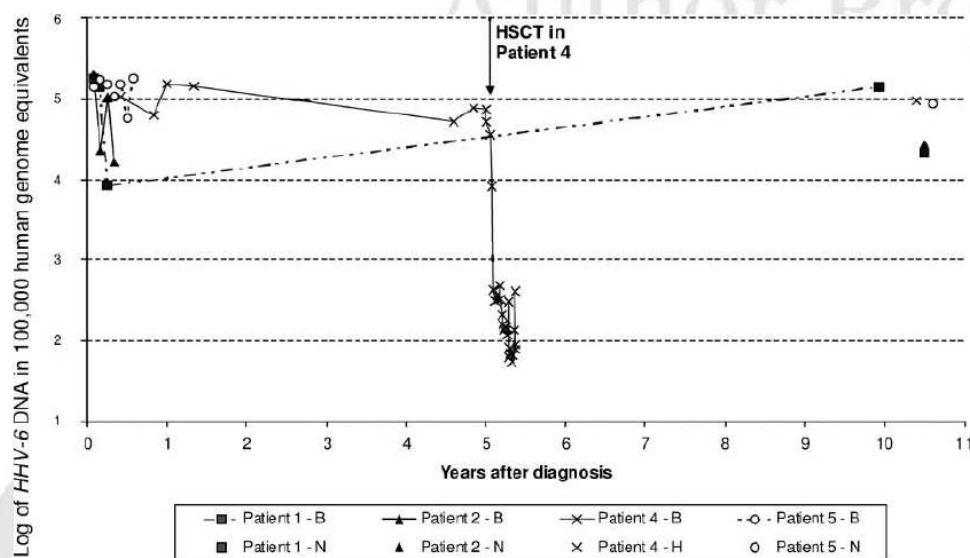


Fig. 2. Amount of HHV-6 DNA normalized to 100,000 human genome equivalents detected in blood samples (B), in hair (H) and nails (N) of the patients with CI-HHV-6.

HHV-6 infection, but none were found. However, in four patients toxic adverse effects of chemotherapy such as hepatitis and rash (see Table II) were identified clearly.

### DISCUSSION

The overall prevalence of HHV-6 DNA in the pediatric patients with leukemias was 28.3% which is very similar to the 37.5% and 30% of HHV-6 positive reported in hematological patients (both adults and children) [Ma et al., 2000; Chemaly et al., 2008]. The prevalence of HHV-6 DNA in the group of pediatric patients studied is similar to adult data [Ma et al., 2000; Chemaly et al., 2008] and slightly lower prevalence in comparison with pediatric patients from China with a prevalence of 40% [Ma et al., 2000].

After normalizing the HHV-6 DNA load to the quantity of human genome equivalents, two distinct levels emerged: one abnormally high level from five

patients with suspected CI-HHV-6 whereas the lower level observed in the majority was consistent with virus reactivation. To confirm that low level positivity represents only viral reactivation, an additional small prospective study among 22 children treated at Motol University Hospital was carried out. HHV-6 DNA was detected in nine children with low positivity (median load of 20.4 NVCs). HHV-6 DNA was not detected in control samples from whole blood and nails in any of these positive children. Therefore, adjustment is advantageous in patients whose white blood cell count vary greatly such as leukemic and hematopoietic stem cell transplant patients during neutropenia, bone marrow regeneration after chemotherapy or transplantation, and after use of granulocyte-colony stimulating factor. Thus, despite the differences in the absolute amount of viral DNA in blood in these patients, the adjusted ratio to normal makes it easy to distinguish between abnormally high and lower levels.

TABLE II. Clinical Features of the Patients With CI-HHV-6

| Number of patient | Type of leukemia (age at diagnosis/relapse/HSCT) | Treatment protocols                    | Complications during the treatment  |
|-------------------|--|--|---|
| 1                 | ALL (13.9 years)                                 | ALL-BFM 95                             | Hyperkalcemia, bronchopneumonia, enterocolitis, febrile neutropenia   |
| 2                 | ALL (15.0 years)                                 | ALL-BFM 95                             | Acute renal failure at diagnosis, hepatopathy, 1× allergic reaction after platelets substitution  |
| 3                 | ALL (3.0 years)<br>(6.4 years)<br>(6.7 years)    | ALL-BFM 95<br>ALL-BFM REZ 2002<br>HSCT | No significant complication<br>Dermatitis after Mtx, infection of central venous catheter, febrile neutropenia<br>Acute GvHD grade II, hemorrhagic cystitis, polyneuropathy |
| 4                 | ALL (2.9 years)<br>(5.4 years)<br>(8.3 years)    | ALL-BFM 95<br>ALL-BFM REZ 2002<br>HSCT | No significant complication<br>No significant complication  |
| 5                 | ALL (4.3 years)                                  | ALL-IC BFM 2002                        | Deceased due to CMV pneumonia 137 days after HSCT<br>Enteritis, febrile neutropenia, asparaginase allergy   |

ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; Mtx, methotrexate; GvHD, graft versus host disease; CMV, human cytomegalovirus.



The five patients were suspected to have CI-HHV-6 on the basis of an HHV-6 DNA load of about one copy/cell (about 100,000 NVCs), that is, at the abnormally high level already demonstrated in CI-HHV-6 [Ward et al., 2006; Hubacek et al., 2007b]. Two were confirmed with CI-HHV-6 based on the detection of HHV-6 DNA in hair follicles at a level of about one copy/cell and the other three had viral DNA in the nails at a level of about one copy/cell. DNA extracted from the nails can therefore be also used for confirmation of CI-HHV-6 as is used for studies of chimaerism after hematopoietic stem cell transplant [Uchida et al., 1996].

The prevalence of 1.4% CI-HHV-6 among the patients studied is in agreement with published observations on Japanese patients referred to Osaka University Hospital (0.2%) [Tanaka-Taya et al., 2004], UK blood donors (0.8%) [Leong et al., 2007], CSF samples from UK children younger than 2 years of age (2.0%) or older (1.3%) [Ward et al., 2007] and in patients referred to the Royal Free Hospital, London (2.9%) [Leong et al., 2007].

Importantly, clinical problems attributable to CI-HHV-6 have not been observed in the present study. Hepatitis, neuropathy, skin rash and other complications which occurred in the patients with CI-HHV-6 were those also present commonly in the rest of our patients treated for leukemia. All are well known side effects of chemotherapy or allergic reactions following the repeated administration of blood derivatives and in all the CI-HHV-6 cases there was always a clear relationship between such symptoms and therapeutic procedures. Furthermore, without any complications related to HHV-6, Patients 3 and 4 had a rapid decline of detectable HHV-6 DNA in whole blood after allogeneic hematopoietic stem cell transplant which correlated inversely with replacement of their hematopoietic system with that of the donor who did not have CI-HHV-6 [Hubacek et al., 2007a].

In conclusion, the data strongly suggests that CI-HHV-6 is not able to reactivate from its chromosomal site to give rise to active infection even under immunosuppression induced by chemotherapy. Therefore, the highest risk for patients with CI-HHV-6, in whom high levels of HHV-6 DNA are detected, remains an unnecessary and ineffectual use of toxic antivirals [Hubacek et al., 2007b] and the failure to search further for the true cause of unexplained clinical problems.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the clinical teams of the Working Group for Paediatric Haematology of the Czech Republic for access to samples and clinical records and, Dr. Pavel Timr, Hospital of Ceske Budejovice, and Dr. Tomas Kuhn, Ostrava Teaching Hospital for providing us with nails or hair follicles from patients suspected during screening of having CI-HHV-6.

#### REFERENCES

Asano Y, Yoshikawa T, Kajita Y, Ogura R, Suga S, Yazaki T, Nakashima T, Yamada A, Kurata T. 1992. Fatal encephalitis/encephalopathy in primary human herpesvirus-6 infection. *Arch Dis Child* 67:1484–1485.

- Bethge W, Beck R, Jahn G, Mundinger P, Kanz L, Einsele H. 1999. Successful treatment of human herpesvirus-6 encephalitis after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 24:1245–1248.
- Caserta MT, Mock DJ, Dewhurst S. 2001. Human herpesvirus 6. *Clin Infect Dis* 33:829–833.
- Chemaly RF, Torres HA, Hachem R, Kontoyiannis DP, Safdar A, Raad II. 2008. Human herpesvirus-6 DNAemia in immunosuppressed adult patients with leukemia at risk for mold infection. *Haematologica* 93:157–158.
- Clark DA, Nacheva EP, Leong HN, Brazma D, Li YT, Tsao EH, Buyek HC, Atkinson CE, Lawson HM, Potter MN, Griffiths PD. 2006a. Transmission of integrated human herpesvirus 6 through stem cell transplantation: Implications for laboratory diagnosis. *J Infect Dis* 193:912–916.
- Clark DA, Tsao EH, Leong HN, Ward KN, Nacheva EP, Griffiths PD. 2006b. Reply to Boutolleau et al. and Luppi et al. *J Infect Dis* 194:1021–1023.
- Daibata M, Taguchi T, Taguchi H, Miyoshi I. 1998. Integration of human herpesvirus 6 in a Burkitt's lymphoma cell line. *Br J Haematol* 102:1307–1313.
- Daibata M, Taguchi T, Nemoto Y, Taguchi H, Miyoshi I. 1999. Inheritance of chromosomally integrated human herpesvirus 6 DNA. *Blood* 94:1545–1549.
- Daibata M, Taguchi T, Miyoshi K, Taguchi H, Miyoshi I. 2000. Presence of human herpesvirus 6 DNA in somatic cells. *Blood* 95:1108–1109.
- De Bolle L, Naesens L, De Clercq E. 2005. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. *Clin Microbiol Rev* 18:217–245.
- Gautheret-Dejean A, Manichanh C, Thien-Ah-Koon F, Fillet AM, Mangeney N, Vidaud M, Dhedin N, Vernant JP, Agut H. 2002. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of human herpesvirus-6 infection and application to bone marrow transplant patients. *J Virol Methods* 100:27–35.
- Hubacek P, Hyncicova K, Muzikova K, Cinek O, Zajac M, Sedlacek P. 2007a. Disappearance of pre-existing high HHV-6 DNA load in blood after allogeneic SCT. *Bone Marrow Transplant* 40:805–806.
- Hubacek P, Maalouf J, Zajickova M, Kouba M, Cinek O, Hyncicova K, Fales I, Cetkovsky P. 2007b. Failure of multiple antivirals to affect high HHV-6 DNAemia resulting from viral chromosomal integration in case of severe aplastic anaemia. *Haematologica* 92:e98–e100.
- Ishikawa K, Hasegawa K, Naritomi T, Kanai N, Ogawa M, Kato Y, Kobayashi M, Torii N, Hayashi N. 2002. Prevalence of herpesviridae and hepatitis virus sequences in the livers of patients with fulminant hepatitis of unknown etiology in Japan. *J Gastroenterol* 37:523–530.
- Jones CM, Dunn HG, Thomas EE, Cone RW, Weber JM. 1994. Acute encephalopathy and status epilepticus associated with human herpes virus 6 infection. *Dev Med Child Neurol* 36:646–650.
- Leong HN, Tuke PW, Tedder RS, Khanom AB, Eglin RP, Atkinson CE, Ward KN, Griffiths PD, Clark DA. 2007. The prevalence of chromosomally integrated human herpesvirus 6 genomes in the blood of UK blood donors. *J Med Virol* 79:45–51.
- Ljungman P, Wang FZ, Clark DA, Emery VC, Remberger M, Ringden O, Linde A. 2000. High levels of human herpesvirus 6 DNA in peripheral blood leucocytes are correlated to platelet engraftment and disease in allogeneic stem cell transplant patients. *Br J Haematol* 111:774–781.
- Luppi M, Marasca R, Barozzi P, Ferrari S, Ceccherini-Nelli L, Batoni G, Merelli E, Torelli G. 1993. Three cases of human herpesvirus-6 latent infection: Integration of viral genome in peripheral blood mononuclear cell DNA. *J Med Virol* 40:44–52.
- Ma XT, Song YH, Lu DM, Mu GF, Li G, Ji LX, Yang RC, Wu KF. 2000. Human herpesvirus 6 in hematologic diseases in China. *Haematologica* 85:458–463.
- Nitsche A, Muller CW, Radonic A, Landt O, Ellerbrok H, Pauli G, Siegfert W. 2001. Human herpesvirus 6A DNA is detected frequently in plasma but rarely in peripheral blood leukocytes of patients after bone marrow transplantation. *J Infect Dis* 183:130–133.
- Oki J, Yoshida H, Tokumitsu A, Takahashi S, Miyamoto A, Yoda M, Miura J. 1995. Serial neuroimages of acute necrotizing encephalopathy associated with human herpesvirus 6 infection. *Brain Dev* 17:356–359.
- Pongers-Willems MJ, Verhagen OJ, Tibbe GJ, Wijkhuijs AJ, de Haas V, Roovers E, van der Schoot CE, van Dongen JJ. 1998. Real-time



- quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes. *Leukemia* 12:2006–2014.
- Sashihara J, Tanaka-Taya K, Tanaka S, Amo K, Miyagawa H, Hosoi G, Taniguchi T, Fukui T, Kasuga N, Aono T, Sako M, Hara J, Yamanishi K, Okada S. 2002. High incidence of human herpesvirus 6 infection with a high viral load in cord blood stem cell transplant recipients. *Blood* 100:2005–2011.
- Suga S, Yoshikawa T, Asano Y, Kozawa T, Nakashima T, Kobayashi I, Yazaki T, Yamamoto H, Kajita Y, Ozaki T, [et al.](#)<sup>Q4</sup> 1993. Clinical and virological analyses of 21 infants with exanthem subitum (roseola infantum) and central nervous system complications. *Ann Neurol* 33:597–603.
- Tanaka-Taya K, Sashihara J, Kurahashi H, Amo K, Miyagawa H, Kondo K, Okada S, Yamanishi K. 2004. Human herpesvirus 6 (HHV-6) is transmitted from parent to child in an integrated form and characterization of cases with chromosomally integrated HHV-6 DNA. *J Med Virol* 73:465–473.
- Uchida S, Wang L, Yahagi Y, Tokunaga K, Tadokoro K, Juji T. 1996. Utility of fingernail DNA for evaluation of chimerism after bone marrow transplantation and for diagnostic testing for transfusion-associated graft-versus-host disease. *Blood* 87:4015–4016.
- Ward KN. 2005. The natural history and laboratory diagnosis of human herpesviruses-6 and -7 infections in the immunocompetent. *J Clin Virol* 32:183–193.
- Ward KN, Leong HN, Nacheva EP, Howard J, Atkinson CE, Davies NW, Griffiths PD, Clark DA. 2006. Human herpesvirus 6 chromosomal integration in immunocompetent patients results in high levels of viral DNA in blood, sera, and hair follicles. *J Clin Microbiol* 44:1571–1574.
- Ward KN, Leong HN, Thiruchelvam AD, Atkinson CE, Clark DA. 2007. HHV-6 DNA level in CSF due to primary infection differs from that in chromosomal viral integration and has implications for the diagnosis of encephalitis. *J Clin Microbiol* 45:1298–1304.
- Yoshihara S, Kato R, Inoue T, Miyagawa H, Sashihara J, Kawakami M, Ikegame K, Oka Y, Sugiyama H, Kawase I, Ogawa H. 2004. Successful treatment of life-threatening human herpesvirus-6 encephalitis with donor lymphocyte infusion in a patient who had undergone human leukocyte antigen-haploidentical nonmyeloablative stem cell transplantation. *Transplantation* 77:835–838.
- Yoshikawa T. 2004. Human herpesvirus 6 infection in hematopoietic stem cell transplant patients. *Br J Haematol* 124:421–432.
- Yoshikawa T, Asano Y, Kobayashi I, Nakashima T, Yazaki T. 1993. Exacerbation of idiopathic thrombocytopenic purpura by primary human herpesvirus 6 infection. *Pediatr Infect Dis J* 12:409–410.
- Yoshikawa T, Ihira M, Suzuki K, Suga S, Kito H, Iwasaki T, Kurata T, Tanaka T, Saito Y, Asano Y. 2001. Fatal acute myocarditis in an infant with human herpesvirus 6 infection. *J Clin Pathol* 54:792–795.
- Zerr DM, Corey L, Kim HW, Huang ML, Nguy L, Boeckh M. 2005. Clinical outcomes of human herpesvirus 6 reactivation after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 40:932–940.

**HHV-6 DNA throughout the tissues of two stem cell transplant patients with chromosomally integrated HHV-6 and fatal CMV pneumonitis**

Hubacek P.<sup>1</sup>, Virgili A.<sup>2</sup>, Ward K. N.<sup>3</sup>, Pohlreich D.<sup>4</sup>, Keslova P.<sup>1</sup>, Goldova B.<sup>5</sup>, Markova M.<sup>4</sup>, Zajac M.<sup>6</sup>, Cinek O.<sup>7</sup>, Nacheva E. P.<sup>2</sup>, Sedlacek P.<sup>1</sup>, Cetkovsky P.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatric Hematology and Oncology, <sup>2</sup><sup>nd</sup> Faculty of Medicine and Motol University Hospital, Charles University, Prague, The Czech Republic, Prague, The Czech Republic; <sup>2</sup>Department of Academic Haematology, Royal Free & University College London Medical School, London, UK; <sup>3</sup>Department of Infection, Royal Free & University College London Medical School, London, UK <sup>4</sup>Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, The Czech Republic; <sup>5</sup>Institute of Pathology, <sup>1</sup><sup>st</sup> Faculty of Medicine, Charles University, Prague, The Czech Republic; <sup>6</sup>Department of Medical Microbiology, <sup>2</sup><sup>nd</sup> Faculty of Medicine and Motol University Hospital, Prague, The Czech Republic; <sup>7</sup>Department of Pediatrics, <sup>2</sup><sup>nd</sup> Faculty of Medicine and Motol University Hospital, Prague, The Czech Republic

Brief report

Running head: HUBACEK et al. – HHV-6 TISSUE DNA IN VIRAL CHROMOSOMAL INTEGRATION

Word Count: 2167

Key words: Human herpesvirus 6, cytomegalovirus, tissue, chromosomal integration, infectious disorders

Correspondence: Petr Hubacek, M.D., Dept. of Paediatric Haematology and Oncology, Motol University Hospital, V Uvalu 84, CZ-150 06, Prague 5 – Motol, The Czech Republic, Tel.: +420 224 432 026, Fax: +420 224 432 020,

[Petr.Hubacek@Lfmotol.cuni.cz](mailto:Petr.Hubacek@Lfmotol.cuni.cz)

Abstract:

We report two patients with a high human herpesvirus 6 (HHV-6) DNA load in peripheral blood that is characteristic of chromosomally integrated (CI) HHV-6. CI was confirmed by FISH in both cases. Both patients received a haematopoietic stem cell transplant (HSCT) from a donor without CI HHV-6. After HSCT we observed a marked decrease of the HHV-6 DNA load in blood which correlated inversely with engraftment of donor haematopoietic cells. Both patients died due to cytomegalovirus (CMV) complication. At autopsy high amounts of CMV DNA were detected in lung tissue in both patients but this was at lower levels in the other organs tested. In contrast HHV-6 DNA was detected at a similar high level throughout the bodies of both patients with the exception of donor-derived haematopoietic tissue. Our observations confirm that in individuals with CI, HHV-6 DNA is found in every tissue of recipient origin indicating inheritance through the germ line.

## INTRODUCTION

Human herpesvirus 6 (HHV-6) is a member of the  $\beta$ -herpesvirus family. It has two variants A and B (HHV-6A & B), but so far only active infection with HHV-6 B has been associated with distinct clinical symptoms (1). In the general population primary infection with variant B sometimes causes sixth disease (exanthem subitum), a benign exanthematous illness of early childhood. HHV-6 stays latent lifelong in form of episomic DNA (1). In the setting of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation, detection of HHV-6B has been associated with delayed engraftment of platelets and monocytes (2, 3), encephalitis (4, 5), hepatitis (2) or fever and rash (6).

In some individuals, the HHV-6 genome has the ability to integrate in a persistent latent state into the chromosomes (7). Either variant of the virus can be integrated and several different loci have been identified using fluorescent in situ hybridization (FISH) (8-10).

So far, no evidence of pathological consequences of such integrated viral DNA or its proteins has been reported. Persons with chromosomally integrated HHV-6 DNA have at least one copy of HHV-6 DNA per cell in their leukocytes and also in hair follicles (11) suggesting transmission in the germ line. Indeed there is evidence that chromosomally integrated HHV-6 is inherited vertically and passes from parent to child (8). It can therefore be presumed that chromosomally integrated HHV-6 viral DNA is present in every cell type in the body although direct evidence for this is lacking.

In the present study we investigated the HHV-6 DNA load in many different tissues of two haematopoietic stem cell transplant (HSCT) recipients with chromosomal integration, both of whom died of CMV pneumonitis, and compared the levels with those due to the CMV infection.

## VIROLOGICAL TESTING

Weekly surveillance for CMV and HHV-6 DNA was started before the beginning of the conditioning regimen and continued after HSCT. DNA was extracted from whole blood samples according to manufacturer's instruction using the QIAamp Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), and from hair follicles and autopsy samples using the QIAamp Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Quantitative PCR for CMV and HHV-6 DNA was based on published assays (12, 13). In addition the amount of albumin gene DNA was measured in each sample (14) so as to relate the viral findings to the amount of human genomic DNA. As described previously (15), the results were expressed as normalised viral copies (NVCs) by dividing the number of viral copies per sample by the number of albumin gene copies multiplied by 100,000. HHV-6 variants A and B were identified by nested PCR as previously described (16).

## FLUORESCENT IN SITU HYBRIDISATION (FISH) FOR HHV-6

Blood samples for FISH were taken before HSCT. Using established protocols (17), chromosome preparations were made from the patient's phytohaemagglutinin (PHA)-stimulated peripheral blood leucocytes (72 hour cultures). Dividing cells were captured and karyotyped using SmartCapture/SmartType FISH stations (Digital Scientific Ltd, Cambridge, UK) equipped with a Zeiss Axiophot microscope. The site of HHV-6 genome integration was assessed by FISH and results described according to ISCN 2005 (18). Between 44 and 50 metaphase cells from every cell culture were analysed in order to exclude chromosomal mosaicism of HHV-6 integration at the 99% confidence limit (19).

*HHV-6-specific probes:* As described by Clark and colleagues (20), a cocktail of 8 plasmids – containing between 9kb and 16kb inserts of the HHV-6 genome and covering about 60% of the viral genome but not overlapping – was used as a FISH probe (7 plasmids kindly provided by Dr Scott Schmid, Centers for Disease Control, Atlanta, USA, and plasmid pZHV14 kindly provided by Professor Ruth Jarrett, University of Glasgow, UK). The pool of HHV-6 plasmids was labelled with SpectrumGreen dUTP [Vysis, Maidenhead, UK] using nick translation and 100ng of HHV-6 probe was added to each chromosome preparation prior to incubation overnight at 37<sup>0</sup>C. After post-hybridization steps, chromosomes were counterstained with diamino-2-phenylindole for identification of the target chromosome.

*Control probes:* These comprised locus-specific probes for 9q34.13-2 (genome address 132.88-133.08) and 18q21.33 (genome address 58,986,452 – 59, 152, 195) i.e. bacterial artificial chromosomes (BAC) clones RP11-326L24 and RP11-111L3, respectively (BACPAC Resources Center, Children's Hospital Oakland Research Institute, Oakland, CA, USA, <http://bacpac.chori.org> ). BAC clones were grown in LB medium with chloramphenicol (12.5 µg/ml), extracted with a QIAGEN Large-Construct Kit (Qiagen, West Sussex, UK) and labelled with Spectrum Orange dUTPs by nick translation (Vysis).

## CASE REPORTS

### **Patient 1**

A woman diagnosed at 33 years of age with acute myeloid leukaemia (AML) with Auer rods (M2) was treated with idarubicin and cytarabine, FLAG-IDA and consolidation with high dose cytosine arabinoside. During chemotherapy she

experienced phlegmon around her central venous catheter which was treated with antibiotics. Interstitial pneumonia was treated with a combination of antibiotics, antivirals and antifungals. A repeatedly high level of HHV-6 variant A DNA in blood led us to test for viral chromosomal integration.

At 34.3 yrs. of age in the patient's first complete remission she received an allogeneic HSCT from a mismatched unrelated donor. The patient was cytomegalovirus (CMV) seropositive before transplant. Conditioning consisted of fludarabine 175 mg/m<sup>2</sup>, cytarabine 10g/m<sup>2</sup>, idarubicin 30g/m<sup>2</sup>, antithymocyte globulin (ATG) in a total dose of 40mg/kg and 12 Gy of total body irradiation. The patient received 13.1x10<sup>8</sup> nucleated cells /kg which included 6.76x10<sup>6</sup> CD34+ cells/kg. Graft versus host disease (GvHD) prevention consisted of cyclosporin A and mycophenolate mofetil. Acyclovir prophylaxis against herpes simplex virus was initiated nine days before transplantation and continued for 2 months.

On the 22<sup>nd</sup> day after transplant (D+22) the absolute neutrophil count (ANC) was more than 0.5 x 10<sup>9</sup> / L. Valganciclovir (VGCV) therapy was started on D+54 because of high level CMV DNA in blood. CMV DNAemia persisted despite continued therapy with VGCV, ganciclovir (GCV), foscarnet and cidofovir (Figure 1A). Treatment was complicated by development of GCV-resistant CMV identified by restriction enzyme analysis as the mutation A594V in UL97 gene (21). The patient developed GvHD grade II (gut involvement) on D+115 and was treated with steroids. On D+260, the patient developed CMV pneumonia. From D+320 the respiratory function was worsening and she died of respiratory failure on D+325. At autopsy samples of many different organs were taken for virological analysis.



**Patient 2**

A boy diagnosed at 6 yrs. of age with acute lymphoblastic leukaemia (ALL) was treated according to the BFM ALL 95 protocol. He subsequently relapsed twice (first with disease restricted to bone marrow and secondly with it in both bone marrow and testes). At 11.5 yrs of age he received an allogeneic HSCT. The patient was CMV seropositive before transplant. A high level of HHV-6 variant B DNA in pre-transplant samples led us to test for viral chromosomal integration (see below). The conditioning regimen consisted of fludarabine (total 160 mg/m<sup>2</sup>), etoposide 40 mg/kg, total body irradiation (12 Gy) and ATG (total dose 40 mg/kg). Two different cord blood grafts (one male, one female) were used together, respectively 4.02x10<sup>7</sup> nucleated cells/kg and 5.82x10<sup>7</sup> nucleated cells/kg. GvHD prevention consisted of cyclosporin A and mycophenolate mofetil. Acyclovir prophylaxis against herpes simplex virus was initiated shortly before transplantation and continued for about 1 month.

On D+27 the ANC was more than 0.5 and eleven days later the patient developed GvHD grade II (gut involvement) which was treated with steroids. Foscarnet therapy was started on D+39 because of CMV reactivation and GCV was added later (Figure 1B). BK virus positive haemorrhagic cystitis developed on D+65. On D+94, severe GvHD presented with vomiting, diarrhoea, deterioration of liver function and pancytopenia, and immunosuppression was therefore increased. On D+116, CMV DNAemia increased despite continuing antiviral therapy (Figure 1B) and we proved the presence of GCV-resistant virus (mutation L595S of the UL97 gene) by restriction enzyme analysis (21). Shortly afterwards the patient developed hypoxia and fever and chest X-ray confirmed interstitial pneumonitis. Simultaneously, there was an increase in liver enzymes (ALT 19.4 µkat/L, AST 23.0 µkat/L) and bilirubin therefore 3

doses of rituximab (375 mg/m<sup>2</sup>) were administered in an attempt to modulate possible GvHD. On D+124 cidofovir and CMV hyperimmune globulin were added to the antiviral therapy (Figure 1B). Chest X-ray showed worsening of the pneumonitis and the patient was transferred to the Intensive Care Unit where CMV DNA was detected in an endotracheal aspirate. The patient's clinical status deteriorated and he died on D+135 from respiratory failure. At autopsy samples of many different organs were taken for virological analysis.

## RESULTS AND DISCUSSION

For both patients high levels of HHV-6 DNA of about  $5 \log_{10}$  NVCs (i.e. about 1 copy of HHV-6 DNA per cell) were detected repeatedly in whole blood before HSCT and chromosomally integrated HHV-6 was confirmed by the detection of HHV-6 DNA in both patients' hair follicles (Figure 2). In addition, both patients had chromosomally integrated HHV-6 at a telomeric site confirmed by FISH before HSCT (Figure 3); in patient 1 HHV-6 was integrated on a marker chromosome of unknown origin and in patient 2 at 18p11.3. The finding of integration on 18p adds a new site to the 7 others already identified (9).

Both patients had a high HHV-6 DNA load in blood before transplant (median loads of  $5.14 \log_{10}$  NVCs and  $4.89 \log_{10}$  NVCs, respectively) that dropped markedly after transplant to a low level (median load of  $1.68 \log_{10}$  NVCs and  $2.20 \log_{10}$  NVCs, respectively) (Figure 1A and 1B) and correlated inversely with engraftment of the donor haematopoietic cells which lacked chromosomally integrated HHV-6. These findings confirm and extend our earlier report on an HSCT recipient with chromosomally integrated HHV-6 who received stem cells from a donor not so affected (15).

In contrast, the many non-haematopoietic tissues tested (Figures 2A and 2B) showed a high level of HHV-6 DNA (median loads of  $4.46 \log_{10}$  NVCs and  $4.52 \log_{10}$  NVCs, respectively) equivalent to about 1 copy/cell that was very similar to that found in the blood and hair follicles before HSCT confirming chromosomally integrated HHV-6 in every cell of recipient origin. Finally, it should be noted that tissues consisting predominantly of lymphohaematopoietic cells, namely spleen and bone marrow, gave

somewhat lower median loads (3.31 log<sub>10</sub> NVCs and 3.25 log<sub>10</sub> NVCs, respectively) than the other tissues presumably reflecting large numbers of cells of donor origin lacking chromosomally integrated HHV-6.

As regards final proof of HHV-6 in the germ line of patients 1 and 2, it should be noted that ovarian tissue was not sampled in patient 1 and in the case of patient 2 although testis tissue was tested it cannot be determined whether or not the sample contained spermatocytes, spermatids and spermatozoa. In fact it seems that they were most probably destroyed before HSCT by the conditioning which included total body irradiation. Thus the high levels of HHV-6 DNA recorded in the testis might have been only in interstitial and Sertoli cells. However, the finding of characteristic high levels of HHV-6 DNA in so many disparate tissues despite prolonged therapy for CMV infection with multiple antivirals all of which also have activity against replicating HHV-6 provides compelling support for integration of the virus into the germ line without significant reactivation. In this connection a similar lack of response to antivirals of high levels of viral DNA in the peripheral blood of a patient with severe aplastic anaemia and chromosomally integrated HHV-6 has already been reported (22).

On the other hand, CMV (which is closely related to HHV-6) is well known to cause severe complications and mortality as a consequence of reactivation after HSCT (23-25). Indeed, both of the present patients died in consequence of CMV pneumonitis.

In contrast to the finding of high level HHV-6 DNA in blood before HSCT, CMV DNA was not detected until it reactivated post-transplant (Figures 1A and 1B).

Furthermore, the level of CMV DNA in blood responded to antiviral therapy although

ultimately unsuccessful because of ganciclovir resistance and continuing immunosuppression. Interestingly, in the present situation where active CMV replication caused lung disease with severe organ destruction extremely high levels of viral DNA (medians  $5.27 \log_{10}$  NVCs and  $5.46 \log_{10}$  NVCs, respectively in patients 1 and 2) were found only in affected tissue rather than throughout the body as was the case for chromosomally integrated HHV-6 (Figures 2A and 2B).

The present finding of HHV-6 DNA in all tissues sampled clearly points to inheritance of viral integration via the germ line. Because of this HHV-6 DNA levels were unaffected by antiviral therapy in contrast to the active CMV infection. Once again therefore, it is evident that interpreting high HHV-6 DNA levels as active infection and attempting to treat this with potentially toxic antivirals is unacceptable in the absence of relevant clinical signs and symptoms. In all such cases the presence or absence of chromosomal integration should be established before embarking on therapy. Further studies on the natural history of the intriguing phenomenon of HHV-6 chromosomal integration are needed to help in clinical practice.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The work was supported by MZ 000064203 and MSM 0021620813. K. N. Ward acknowledges funding from the National Institute for Health Research through the University College London/University College London Hospitals Comprehensive Biomedical Research Centre and E. P. Nacheva acknowledges Leukaemia Research Fund grants 05079 and 05098.

## Reference:

1. Ward KN. The natural history and laboratory diagnosis of human herpesviruses-6 and -7 infections in the immunocompetent. *J Clin Virol.* 2005 Mar;32(3):183-93.
2. Ljungman P, Wang FZ, Clark DA, Emery VC, Remberger M, Ringden O, et al. High levels of human herpesvirus 6 DNA in peripheral blood leucocytes are correlated to platelet engraftment and disease in allogeneic stem cell transplant patients. *Br J Haematol.* 2000;111(3):774-81.
3. Zerr DM, Corey L, Kim HW, Huang ML, Nguy L, Boeckh M. Clinical outcomes of human herpesvirus 6 reactivation after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis.* 2005 Apr 1;40(7):932-40.
4. Bethge W, Beck R, Jahn G, Mundinger P, Kanz L, Einsele H. Successful treatment of human herpesvirus-6 encephalitis after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1999 Dec;24(11):1245-8.
5. Yoshihara S, Kato R, Inoue T, Miyagawa H, Sashihara J, Kawakami M, et al. Successful treatment of life-threatening human herpesvirus-6 encephalitis with donor lymphocyte infusion in a patient who had undergone human leukocyte antigen-haploidentical nonmyeloablative stem cell transplantation. *Transplantation.* 2004 Mar 27;77(6):835-8.
6. Sashihara J, Tanaka-Taya K, Tanaka S, Amo K, Miyagawa H, Hosoi G, et al. High incidence of human herpesvirus 6 infection with a high viral load in cord blood stem cell transplant recipients. *Blood.* 2002;100(6):2005-11.
7. Luppi M, Marasca R, Barozzi P, Ferrari S, Ceccherini-Nelli L, Batoni G, et al. Three cases of human herpesvirus-6 latent infection: integration of viral genome in peripheral blood mononuclear cell DNA. *J Med Virol.* 1993 May;40(1):44-52.

8. Daibata M, Taguchi T, Nemoto Y, Taguchi H, Miyoshi I. Inheritance of chromosomally integrated human herpesvirus 6 DNA. *Blood*. 1999 Sep 1;94(5):1545-9.
9. Nacheva EP, Ward KN, Brazma D, Virgili A, Howard J, Leong HN, et al. Human herpesvirus 6 integrates within telomeric regions as evidenced by five different chromosomal Sites. *J Med Virol*. 2008 Sep 23;80(11):1952-8.
10. Torelli G, Barozzi P, Marasca R, Cocconcelli P, Merelli E, Ceccherini-Nelli L, et al. Targeted integration of human herpesvirus 6 in the p arm of chromosome 17 of human peripheral blood mononuclear cells in vivo. *J Med Virol*. 1995 Jul;46(3):178-88.
11. Ward KN, Leong HN, Thiruchelvam AD, Atkinson CE, Clark DA. HHV-6 DNA level in CSF due to primary infection differs from that in chromosomal viral integration and has implications for the diagnosis of encephalitis. *J Clin Microbiol*. 2007 Jan 17;45(4):1298-304.
12. Tanaka N, Kimura H, Iida K, Saito Y, Tsuge I, Yoshimi A, et al. Quantitative analysis of cytomegalovirus load using a real-time PCR assay. *J Med Virol*. 2000;60(4):455-62.
13. Gautheret-Dejean A, Manichanh C, Thien-Ah-Koon F, Fillet AM, Mangeney N, Vidaud M, et al. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of human herpesvirus-6 infection and application to bone marrow transplant patients. *J Virol Methods*. 2002 Feb;100(1-2):27-35.
14. Pongers-Willems MJ, Verhagen OJ, Tibbe GJ, Wijkhuijs AJ, de Haas V, Roovers E, et al. Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes. *Leukemia*. 1998 Dec;12(12):2006-14.

15. Hubacek P, Hyncicova K, Muzikova K, Cinek O, Zajac M, Sedlacek P.  
Disappearance of pre-existing high HHV-6 DNA load in blood after allogeneic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2007 Oct;40(8):805-6.
16. Hubacek P, MK, Hrdlickova A., Cinek O., Hyncicova K., Hrstkova H., Sedlacek P., Stary J. Prevalence of HHV-6 integrated chromosomally among children treated for acute lymphoblastic or myeloid leukaemia in the Czech Republic. *Journal of Medical Virology* (in press).
17. Gribble SM, Reid AG, Roberts I, Grace C, Green AR, Nacheva EP. Genomic imbalances in CML blast crisis: 8q24.12-q24.13 segment identified as a common region of over-representation. *Genes Chromosomes Cancer.* 2003 Aug;37(4):346-58.
18. Shaffer LG, Tommerup N editors ISCN 2005: An international system for human cytogenetic nomenclature. Basel: S. Karger, Switzerland; 2005.
19. Hook EB. Exclusion of chromosomal mosaicism: tables of 90%, 95% and 99% confidence limits and comments on use. *Am J Hum Genet.* 1977 Jan;29(1):94-7.
20. Clark DA, Nacheva EP, Leong HN, Brazma D, Li YT, Tsao EH, et al.  
Transmission of integrated human herpesvirus 6 through stem cell transplantation: implications for laboratory diagnosis. *J Infect Dis.* 2006 Apr 1;193(7):912-6.
21. Chou S, Erice A, Jordan MC, Vercellotti GM, Michels KR, Talarico CL, et al.  
Analysis of the UL97 phosphotransferase coding sequence in clinical cytomegalovirus isolates and identification of mutations conferring ganciclovir resistance. *J Infect Dis.* 1995 Mar;171(3):576-83.
22. Hubacek P, Maalouf J, Zajickova M, Kouba M, Cinek O, Hyncicova K, et al.  
Failure of multiple antivirals to affect high HHV-6 DNAemia resulting from viral



chromosomal integration in case of severe aplastic anaemia. *Haematologica*. 2007 Oct;92(10):e98-e100.

23. Ozdemir E, Saliba RM, Champlin RE, Couriel DR, Giralt SA, de Lima M, et al. Risk factors associated with late cytomegalovirus reactivation after allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant*. 2007 May 28.

24. Griffiths PD, Cope AV, Hassan-Walker AF, Emery VC. Diagnostic approaches to cytomegalovirus infection in bone marrow and organ transplantation. *Transpl Infect Dis*. 1999 Sep;1(3):179-86.

25. Leruez-Ville M, Ouachee M, Delarue R, Sauget AS, Blanche S, Buzyn A, et al. Monitoring cytomegalovirus infection in adult and pediatric bone marrow transplant recipients by a real-time PCR assay performed with blood plasma. *J Clin Microbiol*. 2003 May;41(5):2040-6.

Figure 1. Monitoring of HHV-6 and CMV DNA loads together with course of antiviral therapy in peripheral blood pre- and post-HSCT (haematopoietic stem cell transplant) in patient 1 (A) and patient 2 (B).

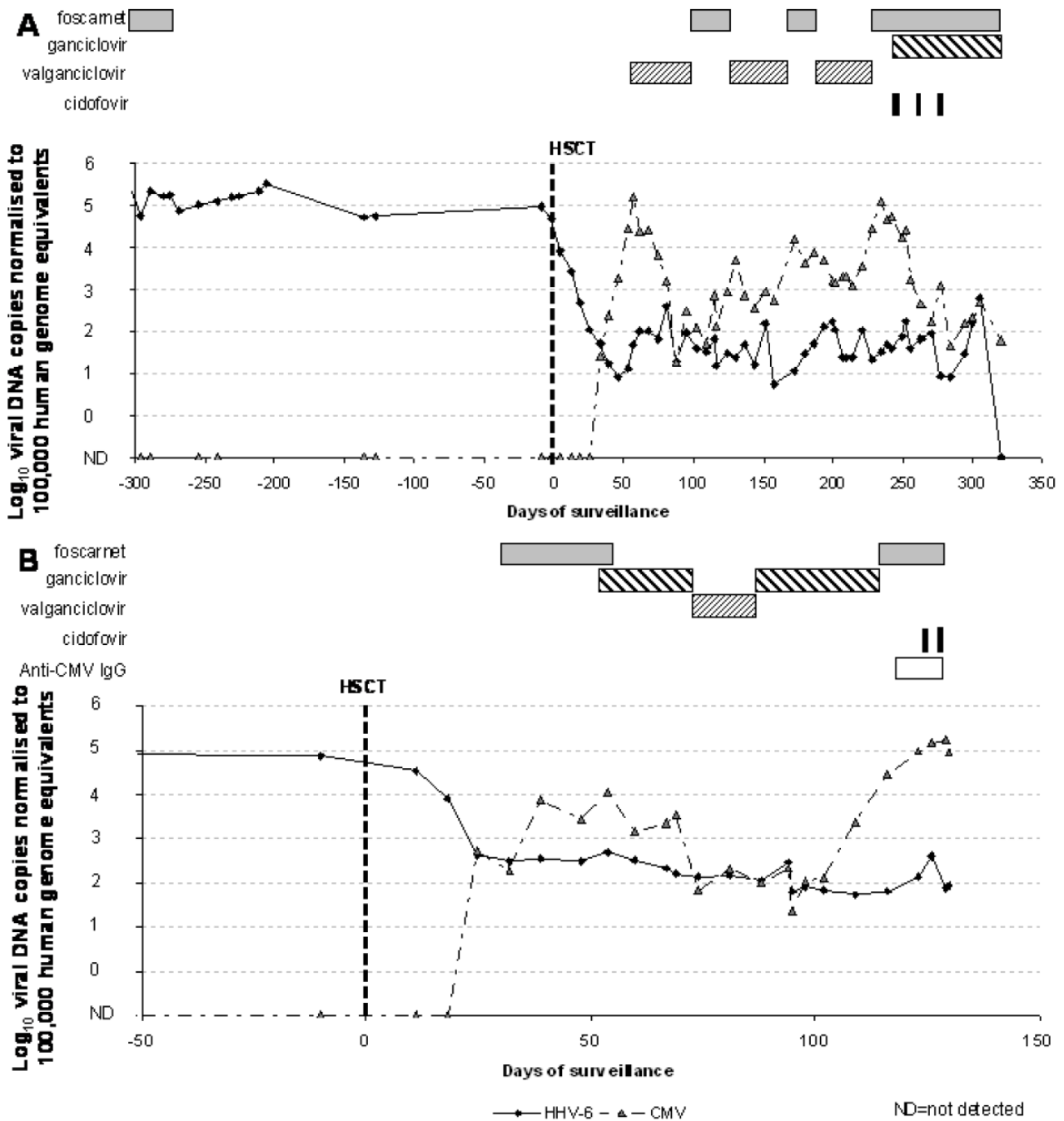


Figure 2. Comparison of HHV-6 and CMV DNA loads in hair follicles, peripheral blood pre- and post-HSCT (haematopoietic stem cell transplant) and various autopsy samples in patient 1 (A) and patient 2 (B). Abbreviations: medul.-medulla, l.-lobe.

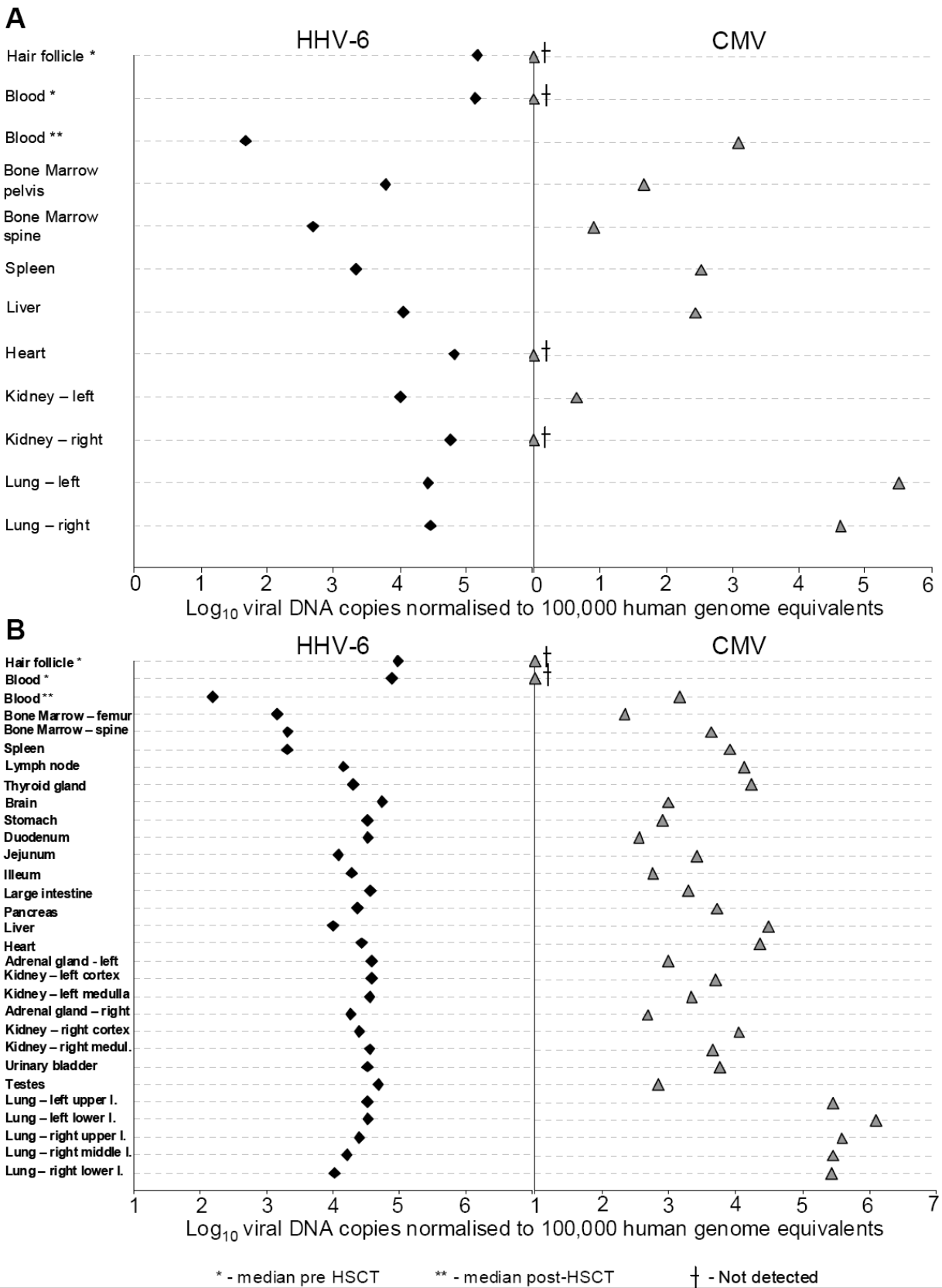
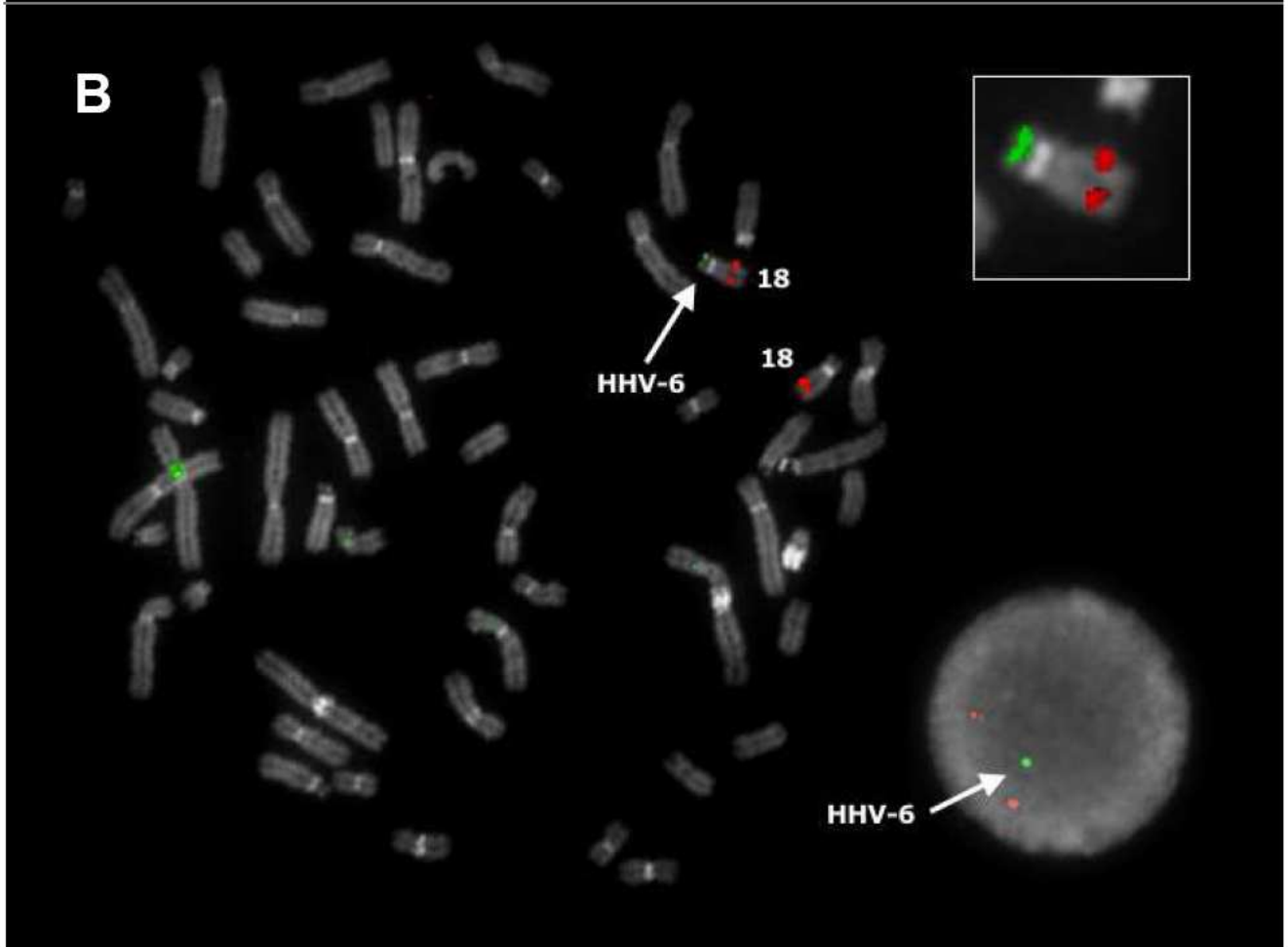
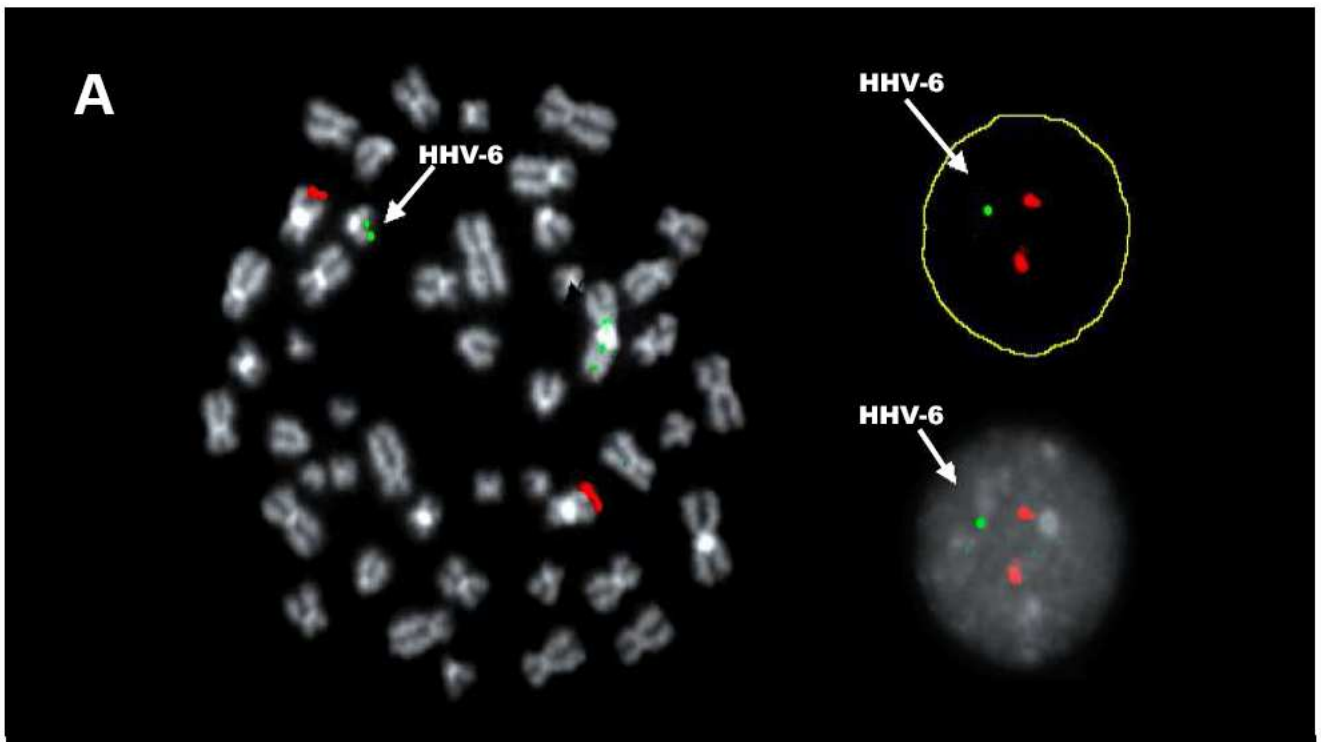


Figure 3.

**FISH mapping of HHV-6 chromosomal integration (CI) sites in patients 1(A) and 2(B).** FISH images of representative dividing cells and interphase cells showing the signals from the HHV-6-specific probe in green (indicated by an arrow) and control probes in red: (A) Chromosomal integration on a marker chromosome. Dividing cell (on the left) shows HHV-6 signal on a marker chromosome while the control probe (BAC RP11-326L34) gives two signals on both homologues at 9q34.4. Right top shows DAPI (diamino-2-phenylindole) counterstained interphase cell and right bottom with stain removed to enhance the FISH signals and the boundary marked in yellow appearance. (B) Chromosomal integration at 18p11.3. Dividing cell on the left shows HHV-6 signal from one homologue of chromosome 18 while the control probe (RP11-111L3) gives two signals on both homologues at 18q21.33. Right top shows enlarged image of the homologue of chromosome 18 with CI HHV-6 and right bottom interphase cell with DAPI counterstain removed to enhance FISH signals.



### 9.3. HHV-7

Přítomnost HHV-7 jsme testovali v celkem 6 792 vzorcích od 217 dětských pacientů 7 822 vzorcích od 382 pacientů dospělých. HHV-7 DNA jsme detekovali v 319 vzorcích od 62 dětských pacientů (28,6%) a 141 vzorcích od 51 pacientů dospělých (13,4%). Medián positivity byl 3,45 kopie HHV-7 na 10 000 g.e. (rozmezí 0,17 – 7 689 kopi) u dětí a 1,69 kopie HHV-7 na 10 000 g.e. (rozmezí 0,19 - 645 kopie) u dospělých. U žádného z našich pacientů jsme nepozorovali symptomy HHV-7 reaktivace.

Protože jsme mezi dětskými pacienty detekovali HHV-7 relativně často, zaujal nás článek publikovaný kanadskými kolegy o výskytu HHV-7 mezi dětmi, které také prodělaly alogenní HSCT. U kanadských dětí byl však HHV-7 detekován pouze v 5,5% pacientů. Proto jsme v reakci na tento článek ve formě dopisu editorovi publikovali naše zkušenosti s tímto virem. Zajímavostí, která až dosud nebyla nikde publikována, je průkaz HHV-7 DNA také ve vzorcích štěpu a vzorcích periferní krve dárců (článek č. 8).

## Incidence of HHV7 in Donors and Recipients of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation

To the Editor: We read with the great interest the article of by Khanani et al. [1] and were surprised with the extremely low incidence of detected Human Herpesvirus 7 (HHV7) in paediatric hematopoietic stem cell transplant (HSCT) recipients, which is not in agreement with our experience. The incidence in the allogeneic setting was 5.5% (9/163) with the median of detection 21 days after HSCT. It would have been interesting to see the total number of tested samples in different categories (blood, plasma, other body fluids, tissue) and the separation of that cohort concerning patients on ganciclovir (GCV) prophylaxis as possible explanation for the low HHV7 incidence. In the article and in the reference about the PCR methods [2] we were not able to find the sensitivity of the HHV7 assay. The lower incidence may be then also explained by the lower sensitivity of assay.

In our institution, we have tested HHV7 in similar clinical setting with the exception of GCV prophylaxis. All patients received acyclovir prophylaxis, while GCV was used to treat CMV preemptively based on the results of weekly PCR monitoring. Viral detection is based on DNA extraction from whole blood. The results are normalized to 10,000 human genome equivalents quantified using the albumin gene. The sensitivity of both the HHV7 and albumin gene detection are down to 5 copies per reaction.

Up to May 2007, we tested for HHV7 2,546 blood samples obtained from 125 patients transplanted between February 2000 and May 2006 (median age at HSCT 9.13 years). Two hundred seventy-eight samples from 56 patients (44.8%) contained more than 1 normalized viral copy (NVC), more than 10 NVCs contained samples from 26 patients (20.8%) and more than 100 NVCs were detected in only 5 patients (0.04%). In 72 patients from our cohort, we found no impact of viral reactivation on clinical features (e.g., presence of fever, pneumonia, thrombocytopenia). With regard to the predictors of the reactivation of HHV7 at level 10 NVCs, we have found that a higher dose of CD34+ cells in the graft and use of busulfan increased the probability for HHV7 detection during post-transplant surveillance. HSCT with related donor compared to unrelated resulted in a 4.5-fold increase in risk of HHV7 reactivation. Compared to Khanani et al. [1], we found a positive association of HHV7 and HHV6 detection while there was no relation between HHV7 and CMV and EBV.

Interestingly, we were able to detect HHV7 DNA in 9 unrelated and 5 related donors out of 30 donors tested (21 unrelated and 9 related donors) and observed no clinical consequence for the recipient. The quantity of HHV7 DNA in these cases was below 100 NVCs (median 7.5, range 0.6–88). Because the graft for HSCT is obtained in donors without any clinical sign of infection, we

suggest this level as a non-clinically important in term of latent HHV7, at least for immunocompetent host. Compared to Khanani et al., higher incidence observed in our cohort is similar to other published works [3,4] and may be caused by the higher sensitivity of our PCR assay.

### ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by grants FNM00064203 and MSMT 002162081.

Petr Hubacek, MD\*

Petr Sedlacek, MD, PhD

Petra Keslova, MD

Renata Formankova, MD, PhD

Jan Stary, MD, PhD

Department of Paediatric Haematology and Oncology  
2nd Medical School of Charles University  
Prague, The Czech Republic

Michal Kulich, PhD

Department of Probability and Mathematical Statistics  
School of Mathematics and Physics of Charles University  
Prague, The Czech Republic

Ondrej Cinek, MD, PhD

Department of Paediatrics  
2nd Medical School of Charles University  
Prague, The Czech Republic

### REFERENCES

1. Khanani M, Al-Ahmari A, Tellier R, et al. Human herpesvirus 7 in pediatric hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer* 2007;48:567–570.
2. Johnson G, Nelson S, Petric M, et al. Comprehensive PCR-based assay for detection and species identification of human herpesviruses. *J Clin Microbiol* 2000;38:3274–3279.
3. Savolainen H, Lautenschlager I, Piiparinen H, et al. Human herpesvirus-6 and -7 in pediatric stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer* 2005;45:820–825.
4. Volin L, Lautenschlager I, Juvonen E, et al. Human herpesvirus 6 antigenaemia in allogeneic stem cell transplant recipients: Impact on clinical course and association with other beta-herpesviruses. *Br J Haematol* 2004;126:690–696.

\*Correspondence to: Petr Hubacek, Department of Paediatric Haematology and Oncology, 2nd Medical School of Charles University, V uvalu 84, Prague CZ-150 06, The Czech Republic.  
E-mail: petr.hubacek@lfmotol.cuni.cz

Received 20 August 2007; Accepted 9 October 2007

© 2007 Wiley-Liss, Inc.  
DOI 10.1002/pbc.21436  
Published online 19 December 2007 in Wiley InterScience  
(www.interscience.wiley.com)

## 10. Detekce $\gamma$ -herpesvirů – EBV

Přítomnost EBV jsme testovali v celkem 7 334 vzorcích od 217 dětských a 8 133 vzorcích od 382 dospělých pacientů. EBV DNA byla detekována celkem v 2 304 vzorcích (31,4%) od 175 dětských (80,6%) a 1 032 vzorcích (12,7%) od 222 dospělých (58,1 %) pacientů po HSCT.

Vyšší normalizovaná kvantita kolem 1 000 kopií na 10 000 g.e., která se podle našich dosavadních zkušeností s detekcí a klinickými projevy EBV-LPD zdá jako vhodná hranice pro vysoce suspektní EBV-LPD, byla překročena pouze u 25 dětských pacientů a 9 pacientů dospělých. Mezi dětskými pacienty po HSCT jsme kvantifikovali EBV také u 4 pacientů zemřelých před zavedením pravidelné detekce na EBV-LPD. U dalších 6 dětských pacientů jsme pak pozorovali klinické známky EBV-LPD ve smyslu proliferace B lymfocytů v periferní krvi a u všech se nám podařilo dalšímu rozvoji nemoci zabránit podáním anti-CD 20 protilátky (rituximab/MabThera). U jednoho dětského pacienta došlo v rámci postransplantační proliferace až k rozvoji mnohočetného EBV pozitivního lymfomu především v oblasti žaludku dokumentovaném také na scanu pozitronové emisní tomografie (PET) (viz obrázek 21). Tento pacient byl následně přeléčen podle standardního protokolu léčby lymfomů. U jednoho dospělého pacienta jsme EBV-LPD v lokalizované formě detekovali a úspěšně přeléčili také.

Na základě retrospektivních vyšetřování pacientů s prokázanou EBV-LPD i prospektivních pacientů, u kterých se podařilo lymfoproliferaci detekovat v periferní krvi pomocí průtokové cytometrie, jsme hranici 1 000 kopií na 10 000 g.e. určili jako vysoce suspektní z EBV-LPD a v současném diagnosticko-terapeutickém postupu je dosažení této hranice indikací k vyšetření průtokovou cytometrií, pro potvrzení diagnózy EBV-LPD. Potvrdí-li toto vyšetření proliferaci B lymfocytů, pak je pacient indikován k podání monoklonální protilátky rituximab.

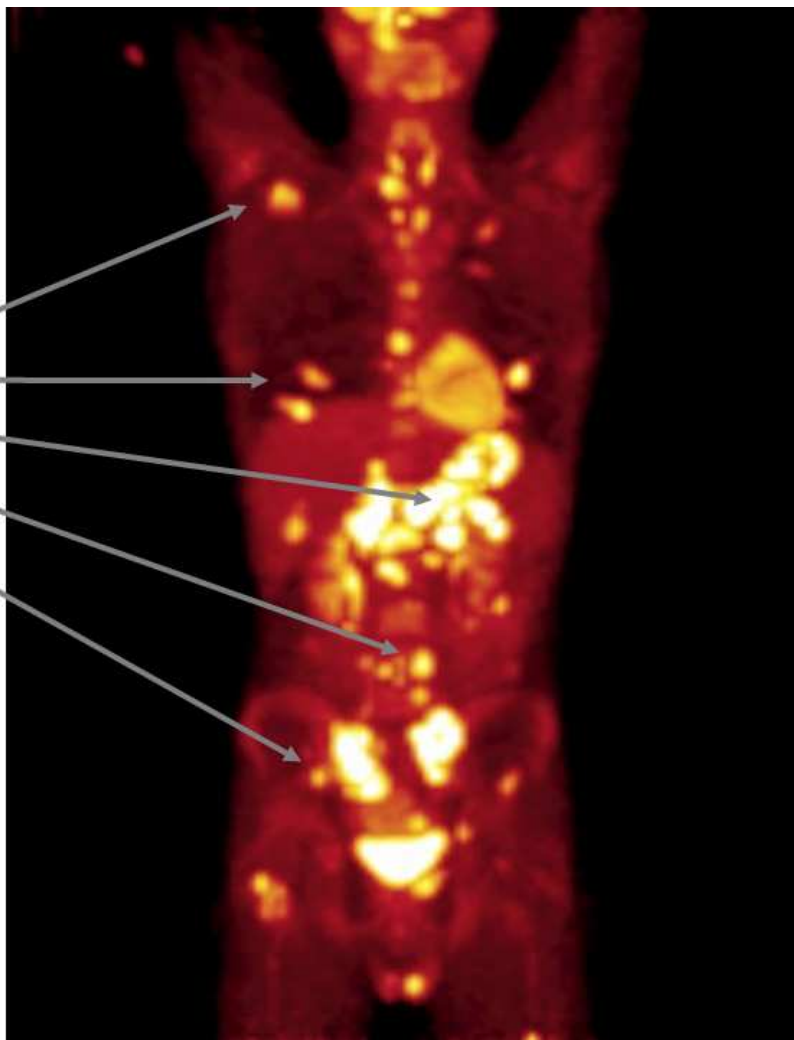
Naše zkušenosti s EBV-LPD včetně dokumentování proliferace B lymfocytů a účinku rituximabu na tuto proliferaci jsme publikovali v Časopise lékařů českých (článek č. 9). U jednoho z dětských pacientů transplantovaných pro vzácný imunodeficit (DiGeorgův syndrom) jsme také pozorovali EBV-LPD a úspěšně jí rituximabem zaléčili. Tuto transplantaci jsme podrobně popsali v článku přijatém do Pediatric transplantation (článek č. 10).



Obrázek 21.

PET scan pacienta s lymfomem vyvinutým na základě potransplantační EBV-LPD. Žluto-oranžová místa zachycují místa akumulace podané látky – tedy především lymfom.

**Nehodgkinovský  
lymfom**



## Kvantifikace EBV u dětí po alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk

<sup>1, 2</sup>Hubáček P., <sup>2</sup>Cinek O., <sup>3</sup>Kulich M., <sup>4</sup>Zajac M., <sup>1</sup>Keslová P., <sup>1</sup>Formánková R., <sup>1</sup>Starý J., <sup>1</sup>Sedláček P.

<sup>1</sup>Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FNM, Praha

<sup>2</sup>Pediatrická klinika 2. LF UK a FNM, Praha

<sup>3</sup>Katedra pravděpodobnosti a matematické statistiky, Matematicko-fyzikální fakulta UK, Praha

<sup>4</sup>Ústav lékařské mikrobiologie 2. LF UK a FNM, Praha

### ABSTRAKT

**Východisko.** Cílem bylo zavést kvantifikaci virové nálože viru Epstein a Baarové (EBV) u dětských pacientů po alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk (HSCT), charakterizace průběhu virové nálože u čtyř fatálních případů lymfoproliferativní nemoci (EBV-LPD) a testování rizikových faktorů pro reaktivaci EBV.

**Metody a výsledky.** Retrospektivně jsme kvantifikovali EBV v sérii vzorků od čtyř dětí zemřelých na potransplantační EBV-LPD v roce 2000. Následně jsme v letech 2001–2004 prospektivně sledovali 72 dětí po alogenní HSCT. Virus jsme vyšetřovali pomocí kvantitativní real-time PCR z krve odebrané v týdenních intervalech první tři měsíce po HSCT, později při ambulantních kontrolách. Retrospektivní vyšetření vzorků zemřelých pacientů ukázalo, že všichni překročili hladinu 1 milionu kopií EBV (normalizováno na 100 000 lidských genomových ekvivalentů) a že první detekce reaktivovaného EBV předcházela úmrtí o 24–91 dní. Z prospektivně sledovaných pacientů byla překročena hladina 100 normalizovaných kopií EBV u 48 (67 %) dětí, 1000 u 13 (18 %) pacientů. Hladinu 10 000 kopií překročili 4 pacienti, u tří z nich byla prokázána EBV-LPD, a byli úspěšně léčeni monoklonální protilátkou proti CD20. Výskyt EBV po HSCT nelze spolehlivě predikovat ze žádných parametrů primárního onemocnění nebo transplantace.

**Závěry.** Kvantifikace EBV v pravidelných časových intervalech po alogenní HSCT je vhodnou metodou pro časné odhalení růstu nálože viru. Hladina 10 000 virových kopií/100 000 lidských genomových ekvivalentů dobře predikuje EBV-LPD, avšak je stále bezpečná pro časnou specifickou terapii.

**Klíčová slova:** EBV, lymfoproliferativní nemoc, transplantace hematopoetických kmenových buněk, PCR.

### ABSTRACT

*Hubáček P., Cinek O., Kulich M. et al.: EBV Quantification in Children Undergoing Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation*

**Background.** Patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (AHSCT) are endangered by developing Epstein-Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disease (EBV-LPD). The aims of the study were to retrospectively characterise the viral loads in four patients who died of this complication, and to test possible risk factors for EBV reactivation in a prospectively observed cohort of children after AHSCT.

**Methods and Results.** Serial DNA samples extracted from whole blood from four patients who died of post-transplant EBV-LPD in year 2000 were retrospectively analysed for EBV load using quantitative real-time PCR. First detection of EBV activation preceded death by 24–91 days. All four patients exceeded a viral load of one million EBV copies per 100,000 human genome equivalents. A cohort of 72 children undergoing AHSCT between 2001–2004 was prospectively followed-on using the same quantification method from regularly obtained samples of whole blood, and clinical and laboratory data were recorded on a weekly basis, totalling at 3,896 person-weeks of observation. Approximately one half of the cohort experienced at least one episode of EBV reactivation during the first 100 days after AHSCT, four of the episodes being accompanied with viral loads higher than our provisional threshold of 10,000 copies per 100,000 human genome equivalents. Three of the four patients developed EBV-LPD and were successfully treated by intravenous administration of anti-CD20 antibody. Testing of possible clinical and laboratory predictors of EBV reactivation did not reveal any clinically useful association.

**Conclusions.** The cornerstone of predicting EBV-LPD in AHSCT is a regular monitoring of EBV viral load using quantitative methods. Using this strategy with a threshold of 10,000 EBV copies per 100,000 human genome equivalents was proved to be effective, as shown by no death of EBV for the study period, compared to four cases in the year before the quantitative monitoring.

**Key words:** EBV, lymphoproliferative disease, allogeneic haematopoietic stem cell transplantation, PCR.

*Hu.*

*Čas. Lék. čes., 2006, 145, pp. 301–306.*

MUDr. Petr Hubáček  
150 06 Praha 5, V Úvalu 84  
fax: +420 224 432 020, e-mail: petr.hubacek@lfmotol.cuni.cz



Virus Epstein a Barrové (EBV), čtvrtý lidský herpesvirus (HHV4) z podčeledi gama-herpesvirů, je asi 100 nm velký obalený virus s dvojitou DNA délkou okolo 170 kpb. Povrchovým receptorem pro EBV je molekula CD21 přítomná na povrchu B lymfocytů (1), které jsou jeho hlavními cílovými buňkami. U běžné populace je EBV hlavně příčinou infekční mononukleózy, ale může způsobovat i chronické aktivní infekce (2). Byl také asociován s některými maligními onemocněními, ať už s Hodgkinovými lymfomy (3) či s nazofaryngeálním karcinomem (4).

U pacientů v imunosupresi po transplantacích může EBV způsobit lymfoproliferativní nemoc (LPD) (5). Většina z potransplantačních lymfoproliferací pochází z B lymfocytů a obsahuje EBV; takové LPD se proto označují jako EBV-asociované LPD (EBV-LPD). Onemocnění je způsobené expanzí EBV infikovaných imortalizovaných B lymfocytů v organizmu vnímavého jedince. Může se jednat o proliferaci monoklonální, oligoklonální i polyklonální. U pacientů v imunosupresi, jaká je přítomna po transplantacích, chybí nebo jsou potlačeny mechanismy imunity, které se jinak u zdravých s takovou lymfoproliferací vypořádají již v zárodku. Virus navíc využívá četných mechanismů, jak se oslabené imunitě vyhnout.

Podle klinických příznaků je EBV-LPD možno dělit na lokalizovanou a generalizovanou formu. U lokalizované formy jsou příznaky podobné jako u infekční mononukleózy: teploty, bolesti v krku, myalgie, lymfadenopatie, hepatosplenomegalie, popř. u rozvinutějších forem se mohou přidávat lokální příznaky dané zvětšením lymfatických uzlin (např. obturace dolních dýchacích cest). U generalizované formy je v periferní krvi detekovatelná oligoklonální či monoklonální proliferace B lymfocytů (1) podobná akutní leukémii. Zdá se, že typ onemocnění je závislý na stupni imunosuprese. Zatímco lokalizovaná forma je popisována více u pacientů po transplantacích solidních orgánů, generalizovaná forma je popisována častěji u pacientů po alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk (HSCT). Je pravděpodobné, že alespoň u některých podskupin pacientů je riziko vzniku EBV-LPD asociované s použitím anti-tymocytárního imunoglobulinu (ATG) v průběhu přípravy k transplantaci či s použitím T depletovaného štěpu, s větší neshodou mezi HLA dárce a příjemce, s přítomností nemoci štěpu proti hostiteli (graft versus host disease – GvHD) a s vyšší intenzitou imunosupresivní léčby (6). Některé důkazy svědčí také pro potenciální zapojení lidského cytomegaloviru (CMV) do vzniku EBV-LPD (7).

Terapie je závislá na klinickém stavu a obtížích pacienta (1). EBV není citlivý na běžně používaná virostatika (acyklovir, ganciklovir), a tak je terapie lymfoproliferativní nemoci zaměřena na podporu pacientovy imunitní reakce či na zastavení proliferace EBV. U počínajících stadií nemoci spočívá možná terapie ve snížení intenzity imunosupresivní léčby. Pro léčbu EBV-LPD byly použity také cytostatika, interferon 1- $\alpha$  a protilátka proti růstovému faktoru B lymfocytů, interleukinu-6. V posledních letech se jako velmi účinná léčba k zastavení proliferace používá monoklonální protilátka proti povrchové molekule B lymfocytů CD20 (rituximab). Tato protilátka lyzuje B lymfocyty a zastaví další proliferaci jak buněk, tak EBV. Lokalizovanou formu lze léčit také radioterapií. Zřejmě největší potenciál se do budoucna skrývá v infuzi imunokompetentních lymfocytů zaměřených proti EBV (8).

Cílem práce bylo: 1) zavést kvantifikaci virové nálože EBV u dětských pacientů po alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk (HSCT); 2) retrospektivně charakterizovat průběh virové nálože u čtyř fatálních případů lymfoproliferativní nemoci (EBV-LPD) včetně délky positivity EBV před úmrtím pacienta a změn virémie; 3) testovat možné prediktory aktivace EBV a vyjádřit se k tomu, zda některý z nich může ukázat na podskupinu pacientů obzvláště ohrožených EBV.

## SOUBOR NEMOCNÝCH A POUŽITÉ METODY

### Pacienti

Práce sledovala virovou nálož EBV u dvou skupin dětských pacientů po alogenní HSCT provedené na transplantaci jednotce Kliniky dětské hematologie a onkologie Fakultní nemocnice v Praze – Motole. Retrospektivně jsme vyšetřili sérii vzorků od čtyř pacientů, kteří v roce 2000 zemřeli na EBV-LPD. Prospektivně jsme pak sledovali všechny dětské pacienty po alogenních HSCT provedených v letech 2001–2004. Studie byla schválena etickou komisí FN Motol a rodiče dětí vyjádřili se studií informovaný souhlas.

### Retrospektivně vyšetřeni zemřelí pacienti

Z pacientů, kteří podstoupili v roce 2000 alogenní HSCT, se u čtyř v potransplantačním období rozvinula generalizovaná forma EBV-LPD. Nedostupnost spolehlivé diagnostické metody vedla k jejich úmrtí na tuto komplikaci, jak bylo potvrzeno pitevním nálezem. Nálož EBV jsme vyšetřili ze sérii archivovaných vzorků DNA zbylých po stanovení potransplantačního chimérismu.

### Prospektivně vyšetřená kohorta

Po zavedení kvantifikace EBV metodou real-time polymerázové řetězové reakce (RQ-PCR) jsme prospektivně sledovali virovou nálož u všech dětských pacientů po alogenní HSCT. Tato zpráva popisuje výsledky získané od prosince 2001 do prosince 2004. Vzorky byly odebrány týdně v průběhu prvních tří měsíců po transplantaci a později v delších intervalech při ambulancních kontrolách.

### Kvantifikace virové nálože

K izolaci DNA z plně krve s EDTA byly použity QIAamp Blood Mini Kit a Midi Kit (Qiagen, Hilden, SRN) dle instrukcí výrobce. Virovou nálož EBV jsme kvantifikovali pomocí real-time PCR (9) s použitím primerů 5'-CGGAAGCCCTCTGGACTTC-3' a 5'-CCCTGTTT-ATCCGATGGAATG-3' a sondy FAM-5'-TGTACACGCACGAGAAA-TGCGCC-3'-TAMRA. Počet kopií genomu EBV jsme normalizovali na 100 000 kopií lidského genomu. Ke kvantifikaci lidských genomických ekvivalentů (g.e.) jsme použili gen pro albumin, primery 5'-TGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTC-3' a 5'-CTCTCTCTCA-GAAAGTGTGCATAT-3' a sondu VIC-5'-TGCTGAAACATTCACCTCCATGCAGAT-3'-TAMRA (10). Všechny PCR reakce byly prováděny v duplikátech v celkovém objemu 25  $\mu$ l. Reakce, ve kterých byl detekován EBV, obsahovaly 1x PCR pufr, 3,5 mM MgCl<sub>2</sub> (oboje Qiagen, Hilden, SRN), 5% glycerol, 100  $\mu$ M každého dNTP (Sigma, St. Louis, USA), 500 nM primerů, 200 nM sondy, 0,5 jednotky HotstarTaq Polymerázy (Qiagen, Hilden, SRN) a 2  $\mu$ l vzorku DNA. Reakce pro kvantifikaci albuminového genu se lišily pouze vynecháním glycerolu a použitím 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>. Teplotní profil byl 15 minut při 95 °C, po kterých následovalo 45 cyklů 15 sekund při 94 °C a 1 minutu při 60 °C. Fluorescence byla měřena v průběhu fáze nasedání a syntézy. Detekce probíhala na přístrojích ABI 7700 Taqman se softwarem Sequence Detecting System 1.9 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a IQCycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Plasmid s cílovou sekvencí pro konstrukci standardní křivky EBV jsme získali díky laskavosti Dr. Hiroshi Kimury, Nagoya, Japonsko. Standardní křivku kvantifikovanou v každém běhu PCR jsme konstruovali dekadickým ředěním plazmidu od 10<sup>5</sup> po 10<sup>1</sup> kopií na  $\mu$ l. Standardní křivku pro kvantifikaci albuminového genu, jako zástupce lidských genomických ekvivalentů, jsme získali spektrofotometrickým měřením koncentrace lidské DNA a jejím následným ředěním.

Vzorky s hladinou EBV pod 100 kopií/100 000 g.e. jsme hodnotili jako negativní; tyto hladiny odpovídaly jednotlivým kopiím EBV v reakci. Hladinu EBV nad 10 000 kopií/100 000 g.e. jsme na základě publikovaných údajů a zkušeností s vyšetřováním vzorků od pacientů s EBV-LPD označili jako varovnou a pacienty, kteří ji překročili, jsme podrobili vyšetřování s cílem odhalit případnou EBV-LPD.

### Současné testování dalších virů

Ze vzorků odebraných k testování EBV byly současně kvantitativně analyzovány virové nálože lidského cytomegaloviru (CMV), herpesviru 6 (HHV6), varicella-zoster viru (VZV), lidského herpes simplex viru 1 a 2 (HSV) a adenovirů skupin A až C. Metody a výsledky jsou předmětem jiné zprávy.



**Sběr klinických dat**

Abychom mohli zkoumat faktory potenciálně modifikující riziko EBV-LPD, u prospektivně sledované skupiny jsme sbírali a do připravených strukturovaných formulářů zaznamenávali charakteristiky pacienta, jeho choroby a transplantace: pohlaví, věk při transplantaci, základní diagnózu, stupeň shody HLA dárce a příjemce, věk a pohlaví dárce, dávku použitých CD34+ buněk, použití chemoterapie, antitumocytárního globulinu (ATG), či celotělového ozáření v přípravném režimu, dobu přijetí jednotlivých krevních elementů.

Potransplantační průběh jsme poté charakterizovali pomocí sběru dat v týdenních intervalech: GvHD (přítomnost, grade a klinický projev), imunosupresivní terapie (dávky či hladiny), přítomnost orgánových komplikací (hepatopatie a nefropatie definované jako stupeň 2 a vyšší dle kritérií National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA; encefalopatie, enterokolitida, pneumonitida dle klinických projevů), přítomnost teploty vyšší než 38 °C dvakrát v jednom týdnu, pozitivita bakteriální hemokultury, CRP vyšší než 100 mg/l, podávání substituce imunoglobulinů, podávání destiček, G-CSF (granulocyte colony stimulating factor), podávání antivirové terapie. Z klinického informačního systému byla přenesena všechna vyšetření krevního obrazu a pro každý týden po transplantaci byla vypočítána nejvyšší, nejnižší a průměrná hodnota pro každý z parametrů.

**Statistické metody**

Kumulativní incidence EBV byla odhadnuta Kaplan-Meierovými křivkami. Rizikové faktory pro aktivaci EBV a vliv EBV na reakci štěpu proti hostiteli byly analyzovány Coxovým modelem proporcionálního rizika, ve druhém případě s použitím robustního odhadu rozptylu pro korelované události. Vliv EBV na parametry krevního obrazu a vliv reakce štěpu proti hostiteli na EBV byly analyzovány lineárním a logistickým modelem pro korelovaná data.

**VÝSLEDKY**

**Retrospektivně vyšetření zemřelí pacienti**

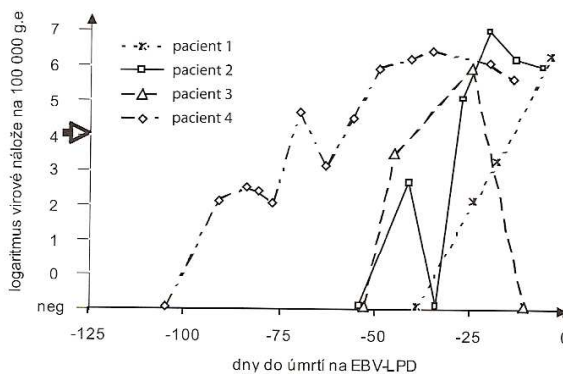
Data retrospektivně vyšetřovaných pacientů jsou shrnuta v tabulce 1 a v grafu 1. Na EBV-LPD zemřeli čtyři pacienti. U všech jsme v archivních vzorcích DNA z periferní krve prokázali kontinuální pozitivitu EBV, zpravidla s rostoucí kvantitou viru. Odstup první detekce aktivovaného EBV od úmrtí se liší: Zatímco u pacienta 4 jsme přítomnost EBV prokázali již 91 dní před úmrtím, u pacienta 1 byl vzestup hladiny EBV strmě log-lineární a k úmrtí došlo již 24 dní po první detekci viru v krvi. V krvi pacienta 3 byl EBV detekován pomocí kvalitativní PCR diagnostiky prováděné v laboratoři

Státního zdravotního ústavu několik týdnů před úmrtím, avšak podání rituximabu vedlo pouze k vymizení virové nálože v periferní krvi, ale nikoli k vyléčení – pacient zemřel s příznaky multiorgánového selhání.

**Prospektivně sledovaní pacienti**

Prospektivně sledováno bylo celkem 72 dětí (55 chlapců a 17 dívek) s mediánem věku při první alogenní HSCT 8,4 roku (0,2–20,5 roku). Celkem jsme získali data ze 77 transplantací – pět pacientů bylo transplantováno dvakrát. Celková doba sledování v potransplantačním období je 3896 osobo-týdnů. Základní data o pacientech a jejich transplantacích jsou obsažena v tabulce 2.

Kumulativní incidence EBV ve sledované skupině je dokumentována v grafu 2. Do dne 100 po transplantaci se EBV objevilo (v hladině alespoň 100 kopií/100 000 g.e.) u více než poloviny pacientů. Do roka od transplantace jsme zaznamenali aktivaci EBV u cca 70 % pacientů. Přibližně u pětiny pacientů se ukázal do jednoho roku po transplantaci vzestup EBV nad hladinu 1000 kopií/100 000 g.e.

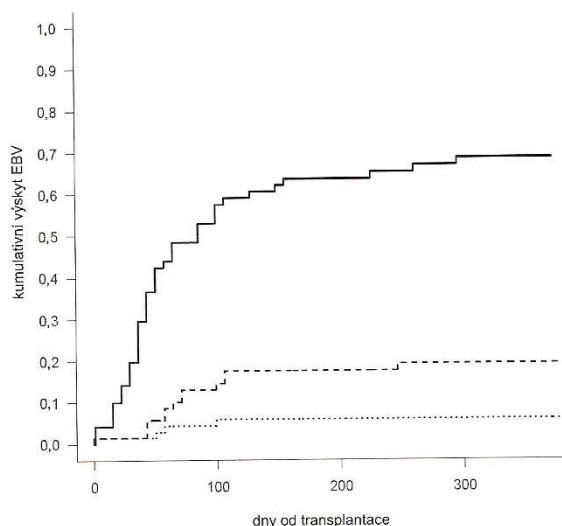


**Graf 1.** Kvantita EBV v období před úmrtím na EBV-LPD – data získaná retrospektivní kvantifikací archivovaných vzorků. Vodorovná osa zobrazuje dny před úmrtím na EBV-LPD, svislá pak kvantitu EBV. Šipkou je zvýrazněna hladina 10 000 EBV/100 000 g.e., která nás nyní vede k terapeutickému zákroku. Pro přehlednost v grafu zobrazujeme jen poslední negativní výsledek předcházející aktivaci EBV. Číslování pacientů odpovídá tabulce 1.

**Tab. 1.** Charakteristika pacientů zemřelých na EBV-LPD v roce 2000 před zavedením kvantitativní detekce

| Pacient                                   | 1                          | 2                              | 3                         | 4                         |
|---|----------------------------|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| věk při transplantaci (roky)              | 4,7                        | 5,3                            | 11,5                      | 4,3                       |
| pohlaví                                   | chlapec                    | dívka                          | chlapec                   | dívka                     |
| základní diagnóza                         | myelo-dysplastický syndrom | akutní lymfoblastická leukémie | akutní myeloidní leukémie | akutní myeloidní leukémie |
| log maximální virové nálože               | 6,31                       | 7,04                           | 6,07                      | 6,5                       |
| den první detekce EBV                     | 48                         | 33                             | 130                       | 26                        |
| den úmrtí                                 | 72                         | 74                             | 183                       | 117                       |
| odstup detekce EBV od úmrtí <sup>1)</sup> | 24                         | 41                             | 53                        | 91                        |

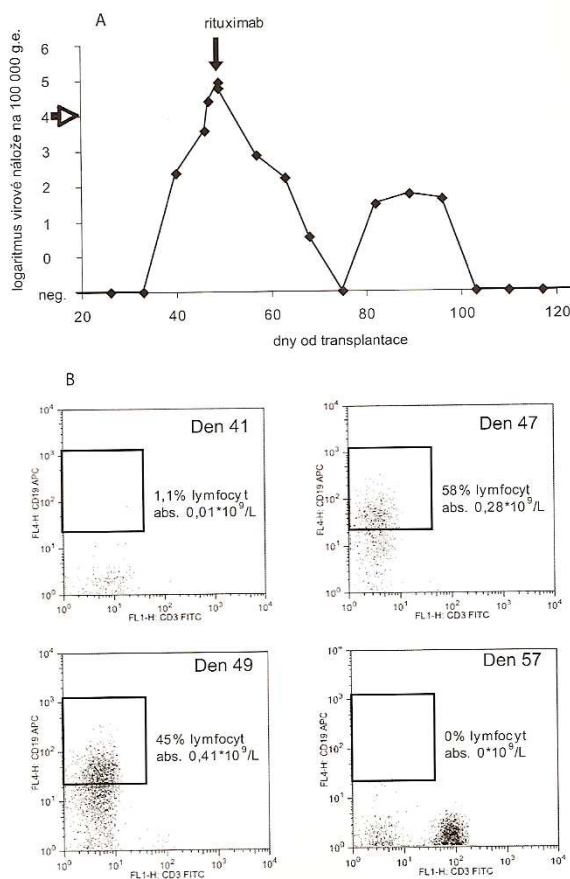
<sup>1)</sup> odstup první detekce EBV od pacientova úmrtí (ve dnech)



**Graf 2.** Kumulativní incidence EBV u prospektivně sledovaných pacientů. Tři křivky odpovídají třem hladinám positivity EBV: 100 kopií (plná čára), 1000 kopií (přerušovaná čára) a 10 000 kopií (tečkovaná čára) na 100 000 g.e.. Na horizontální ose je doba od transplantace v dnech, na vertikální je proporce pacientů, kteří měli alespoň jednu hladinu EBV nad danou hranici.

**Tab. 2.** Charakteristika pacientů prospektivně sledovaných po alogenní HSCT

|   | počet a % z celku celkem 72 (100 %) |
|---|-------------------------------------|
| <b>Pacienti</b>                             |                                     |
| pohlaví                                     |                                     |
| mužské                                      | 55 (76 %)                           |
| ženské                                      | 17 (24 %)                           |
| primární onemocnění                         |                                     |
| maligní                                     | 50 (69 %)                           |
| akutní lymfoblastická leukémie              | 28 (39 %)                           |
| myelodysplastický syndrom                   | 8 (11 %)                            |
| akutní myeloidní leukémie                   | 7 (9,7 %)                           |
| chronická myeloidní leukémie                | 5 (6,9 %)                           |
| non-hodgkinský lymfom                       | 2 (2,7 %)                           |
| nemaligní                                   | 22 (31 %)                           |
| různé imunodeficiencie                      | 10 (14 %)                           |
| těžká aplastická anémie                     | 8 (11 %)                            |
| jiné  | 4 (5,6 %)                           |
| <b>transplantace</b>                        | celkem 77 (100 %)                   |
| typ dárce                                   |                                     |
| neidentický nepříbuzenský                   | 29 (38 %)                           |
| identický nepříbuzenský                     | 23 (30 %)                           |
| HLA identický sourozenec                    | 21 (27 %)                           |
| neidentický příbuzenský                     | 3 (3,8 %)                           |
| identický příbuzenský                       | 1 (1,3 %)                           |
| zdroj kmenových buněk                       |                                     |
| kostní dřeň                                 | 47 (61 %)                           |
| periferní kmenové buňky                     | 26 (34 %)                           |
| pupečnicková krev                           | 3 (3,8 %)                           |
| pupečnicková krev a kostní dřeň             | 1 (1,3 %)                           |
| GvHD profylaxe                              |                                     |
| ATG v přípravě + metotrexát + cyklosporin A | 51 (66 %)                           |
| pouze cyklosporin A                         | 26 (34 %)                           |



**Graf 3.** Příklad odpovědi pacienta s EBV-LPD na včas zavedenou léčbu. **A)** Výrazný vzestup virové nálože EBV po dni 40. Je zvláštní hladina 10 000 kopií/100 000 g.e., kterou jsme určili jako hranici pro další vyšetřování. U pacienta byla potvrzena LPD, a proto byl podán rituximab (anti-CD20). Pacient promptně reaguje poklesem virové nálože. **B)** Vyšetření téhož pacienta průtokovou cytometrií. Každý z grafů ukazuje jedno vyšetření. Na vodorovné ose je vynesen signál CD3, na svislé signál CD19, populace B lymfocytů je orámována a její kvantita uvedena vpravo od rámečku. Lymfoproliferace je dobře viditelná v den 47 a 49; po podání rituximabu nejsou v den 57 B-lymfocyty detekovány.

Vysoké hladiny EBV však nebyly časté: Hladinu 10 000 kopií/100 000 g.e. překročili jen čtyři pacienti – všichni do dne 100 po transplantaci. Tuto hladinu jsme považovali za varovnou pro možnost rozvoje EBV-LPD a pacienty jsme vyšetřovali pomocí průtokové cytometrie. K odhalení LPD byly kvantifikovány lymfocytární subpopulace se zaměřením na B lymfocyty (CD19). U všech čtyř pacientů jsme po detekci vysoké hladiny EBV reagovali snížením imunosupresivní terapie. U jednoho z nich stačil tento postup k zamezení dalšího vzestupu virové nálože EBV, zatímco u zbylých tří vzestup pokračoval a v krvi byla proliferace B lymfocytů prokázána pomocí průtokové cytometrie. Takto diagnostikovaná EBV-LPD byla indikací k podání monoklonální protilátky proti CD-20 (rituximab) v dávce 375 mg/m<sup>2</sup> tělesného povrchu. U všech tří pacientů hladina EBV okamžitě poklesla a k rozvoji EBV-LPD nedošlo. Příklad proliferace B lymfocytů, vzestupu virové nálože a účinku podání rituximabu u jednoho z pacientů je zachycen v grafu 3.

**Rizikové faktory pro aktivaci EBV – výchozí charakteristiky pacienta a transplantace, EBV a přihojení štěpu**

Pomocí analýz přežití jsme testovali, zda čas od první aktivace



EBV na hladině 100 kopií/100 000 g.e. závisí na některé z výchozích charakteristik pacienta, choroby nebo transplantace. Riziko aktivace EBV má slabou souvislost s věkem při transplantaci s tím, že efekt není s věkem proporcionální. Děti v prvním kvartilu rozložení věku v našem souboru (do 4,3 roku při transplantaci) mají signifikantně vyšší riziko reaktivace EBV než děti starší,  $RR=2,1$ , 95%CI 1,1–3,9. S jinými charakteristikami pacienta nebo transplantace riziko nesouviselo: pohlaví, maligní versus nemaligní základní diagnóza, celkový stav při transplantaci vyjádřený pomocí Karnofsky-Lansky skóre, typ štěpu, dárcé příbuzný versus nepříbuzný, míra shody štěpu v HLA antigenech, shoda dárcé a příjemce v pohlaví, ABO a Rh skupině, zdroj buněk štěpu, dávka CD34-pozitivních buněk, použitá chemoterapie v conditioningu, použití antithymocytárního globulinu, torakoabdominálního nebo celotělového ozaření.

Analýza asociace výchozí charakteristiky pacienta s dobou do první aktivace EBV nad 1000 kopií/100 000 g.e. potvrdila rizikovost nižšího věku s tím, že vzestup o rok věku byl asociovan s poklesem rizika aktivace EBV,  $RR=0,87$ , 95%CI 0,77–0,98.

K vlivu aktivace EBV na přijímání štěpu se lze z našich dat obtížně vyjádřit: Jen pět dětí má aktivaci EBV před přijímáním leukocytů či neutrofilů a jen osm dětí má aktivaci EBV před přijímáním destiček. Ačkoli použitý model naznačuje signifikantní vztah mezi aktivací EBV a přijímáním, jen velmi těžko lze považovat takový vztah za kauzální a prokazatelný.

#### *Vztah mezi aktivací jednotlivých testovaných herpesvirů*

Z dalších testovaných virů se jen CMV a HHV6 vyskytovaly dostatečně často na to, aby bylo možné hodnotit jejich vztah k aktivaci EBV. Vztah mezi aktivací HHV6 a EBV ani CMV a EBV nebyl pozorován.

#### *Orgánové komplikace, teploty, reakce štěpu proti hostiteli: vztah k EBV v potransplantačním průběhu*

Orgánové komplikace ani zvýšené teploty neasociovaly s výskytem EBV. Testovali jsme též vliv průměrné hladiny EBV za tři uplynulé týdny na riziko GvHD v týdnu následujícím. Proměnná GvHD byla dichotomizována, jako pozitivní byla brána GvHD stupně 2 nebo vyššího. Vzhledem k časovému rozložení GvHD jsme testování provedli jen v prvních 20 týdnech po alogenní HSCT. Zatímco nízké hladiny EBV nemodifikují riziko GvHD, průměrná třítýdenní hladina EBV nad 500 kopií/100 000 g.e. zvyšuje signifikantně riziko následné GvHD,  $RR=6,3$ , 95%CI 1,9–21. Virová nálož EBV brána jako kontinuální proměnná však nevykazuje žádnou jasnou asociaci s GvHD. Nebyla detekována ani asociace opačného směru: GvHD stupně 2 nebo více v kterémkoli ze tří předcházejících týdnů nepredikuje reaktivaci EBV v týdnu následujícím.

#### *Parametry krevního obrazu a EBV v potransplantačním průběhu*

Testovali jsme vliv průměrné hladiny EBV za tři uplynulé týdny na vyšší parametry krevního obrazu. Pro každý z parametrů (erytrocyty, leukocyty, neutrofilů, lymfocytů a trombocytů) byla nalezena signifikantní pozitivní asociace, kde vzestup EBV o řád odpovídal vzestupu o 15–50 % v daném parametru krevního obrazu (data u autorů).

Asociace opačného směru nebyla v prvním půl roce po transplantaci detekována: Žádná z hodnot krevního obrazu průměrovaná za uplynulé tři týdny nepredikovala výskyt EBV v týdnu následujícím. Pokud jsme analýzu rozšířili na celý rok, ukazuje se slabě protektivní vliv vyšší průměrné třítýdenní hladiny lymfocytů proti výskytu EBV v následujícím týdnu: vzestup lymfocytů o  $10^9/l$  snižuje riziko EBV o přibližně třetinu ( $OR=0,63$ , 95%CI 0,41–0,97 na změnu o  $10^9/l$  lymfocytů).

#### *Imunosuprese a EBV*

Testovali jsme též vliv hloubky imunosuprese na riziko EBV: Prednison ani cyklosporin podávaný v kterémkoli z tří uplynulých týdnů nepredikoval výskyt EBV v týdnu následujícím.

### DISKUZE

Aktivace EBV u pacientů po alogenní HSCT je častá a běžná – za prvních sto dnů po transplantaci ji zažije asi polovina transplantovaných dětí (graf 2). Vzácněji se pak první reaktivace EBV objevuje u dětí, které mají od transplantace delší časový odstup. Prvních sto dní po transplantaci je období, kdy je imunosuprese nejhlubší. První aktivace EBV se objevila před dnem 100 u tří ze čtyř pacientů zemřelých na EBV-LPD i u všech čtyř prospektivně sledovaných pacientů s virémií nad prahem 10 000 kopií/100 000 g.e. Je tomu tak proto, že čas, kdy je pacient ohrožen infekcí EBV, souvisí s obnovou hematopoézy: EBV musí mít vnímavé buňky, aby se měl kde pomnožovat (5, 11). Většina reaktivací se projevuje nízkou a přechodnou virémií EBV. U relativně malé části transplantovaných se však reaktivace rozvine v potenciálně velmi nebezpečnou EBV-LPD. U nás se tak stalo u čtyř ze 72 dětí (5,6 %), což zhruba odpovídá podílu pacientů z jiných prací o EBV po alogenní HSCT (5, 12, 13). Jiné detekovatelné obtíže virémie EBV v našem souboru nezpůsobovala: Sama o sobě není asociovaná ani s orgánovými komplikacemi, ani s pozdějším přijímáním štěpu. Je pravděpodobné, že středně vysoké hladiny EBV zvyšují riziko následné GvHD – asociace vykazuje zjevnou časovou posloupnost a odhad rizika je vysoký; sám odhad tohoto rizika je však nepřesný, jak ukazuje široký interval spolehlivosti, a navíc biologická vysvětlitelnost nalezeného fenoménu není dobrá, protože chybí gradient rizika s výší virové nálože EBV a protože je těžké oddělit potenciální vliv např. aktivace CMV, která může být s aktivací EBV také asociovaná. Klinické využití tohoto poznatku není tedy příliš pravděpodobné.

Přestože se EBV u pacientů vyskytuje často, nelze z dostupných proměnných predikovat, u kterých z pacientů EBV zase zmizí a u kterých se naopak nízká benigní virémie změní ve virémií vysokou, provázející EBV-LPD. Jako prediktory reaktivace EBV jsme nepotvrdili ani některé předtím publikované faktory: sílu imunosuprese (14, 15), stupeň neshody v HLA mezi dárcem a příjemcem, vliv typu štěpu použitého k transplantaci (12, 13) nebo přítomnost GvHD (13). Stejně tak slabá asociace s věkem při transplantaci je těžko jakkoli využitelná pro diferenciaci intenzity sledování virové nálože EBV.

Jediné samy rozdíly ve virové náloži umožňují u pacientů vydělit ty, kdo jsou skutečně ohroženi rozvojem EBV-LPD. Zatímco tři ze čtyř pacientů, kteří při prospektivním sledování překročili hranici 10 000 kopií/100 000 g.e., opravdu EBV-LPD rozvinuli (a osud čtvrtého by pravděpodobně bez snížení imunosuprese byl podobný), tato komplikace se neobjevila u žádného z pacientů, kteří této hladiny nedosáhli. Hladiny okolo 10 000 kopií/100 000 g.e. se tedy zdají predikovat EBV-LPD s rozumnou specificitou, aniž by byl pacient ohrožen pozdním zahájením příslušné terapie. Jakkoli jsou zkušenosti získané retrospektivní kvantifikací EBV od pacientů zemřelých na EBV-LPD omezené, je zřejmé, že alespoň někteří z nich mají dostatečně dlouhý odstup mezi okamžikem první detekce EBV, okamžikem, kdy hladina EBV překročila zvolený práh 10 000 kopií/100 000 g.e., a úmrtím. Jejich maximální virové nálože jsou pak alespoň o dva řády vyšší, než je námi zvolený práh (graf 1), což dokládá existenci časového okna, kdy lze nyní zasáhnout účinnou terapií.

Velmi uspokojivá účinnost rituximabu a rychlý nástup jeho efektu proti EBV-LPD jsou známy (5). Typicky rychlý pokles virové nálože spolu s rychlým poklesem počtu B lymfocytů jsou demonstrovány v grafu 3B. Ačkoli jsme u žádného z rituximabem léče-



ných dětí nepozorovali jiné nežádoucí účinky než asi půl roku trvající sníženou hladinu protilátek, je nutno mít na paměti, že nežádoucí účinky existují. S ohledem na ně i na vysokou cenu preparátu je správné léčit nikoli virémií, ale pouze pacienta s řádně diagnostikovaným EBV-LPD (16).

### ZÁVĚR

Data z našeho souboru ukazují, že jedinou efektivní možností jak hrozící EBV-LPD u pacientů po alogenní HSCT včas predikovat je v pravidelných intervalech kvantifikovat virovou nálož EBV. Studium jiných možných prediktorů v našem poměrně velmi těsně sledovaném souboru pacientů po alogenní HSCT přitom neukázalo žádnou možnost, jak pacienty spolehlivě stratifikovat podle rizika reaktivace EBV, a tak diferencovat frekvenci nutných vyšetření virové nálože EBV. Virová nálož 10 000 kopií/100 000 g.e. se jeví jako dobře zvolená hranice pro další vyšetřovací a léčebné kroky, protože po zavedení kvantitativního monitorování hladin EBV nedošlo ani k jednomu úmrtí na EBV-LPD, na rozdíl od čtyř úmrtí v roce bezprostředně předcházejícím.

### Zkratky

|         |  |
|---------|--|
| ATG     | – antitymocytární globulin                                 |
| CMV     | – cytomegalovirus  |
| CRP     | – C-reaktivní protein                                      |
| EBV     | – virus Epstein a Baarové                                  |
| EBV-LPD | – s EBV asociovaná lymfoproliferativní nemoc               |
| EDTA    | – ethylen diamin tetra acetát                              |
| G-CSF   | – granulocyte colony stimulating factor                    |
| g.e.    | – genomický ekvivalent                                     |
| GvHD    | – reakce štěpu proti hostiteli (graft versus host disease) |
| HHV6    | – herpesvirus 6  |
| HLA     | – lidské leukocytární antigeny                             |
| HSCT    | – alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk  |
| HSV     | – herpes simplex virus                                     |
| LPD     | – lymfoproliferativní nemoc                                |
| PCR     | – polymerázová řetězová reakce                             |
| RR      | – relativní riziko   |
| VZV     | – varicella-zoster virus                                   |

### LITERATURA

1. Burns, D. M., Crawford, D. H.: Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T-lymphocytes for adoptive immunotherapy of post-transplant lymphoproliferative disease. *Blood Rev.*, 2004, 18, s. 193-209.
2. Kimura, H., Hoshino, Y., Kanegane, H. et al.: Clinical and virologic characteristics of chronic active Epstein-Barr virus infection. *Blood*, 2001, 98, s. 280-286.
3. Mancao, C., Altmann, M., Jungnickel, B. et al.: Rescue of 'crippled' germinal center B cells from apoptosis by Epstein-Barr virus. *Blood*, 2005, 106, s. 4339-4344.
4. Brengel-Pesce, K., Morand, P., Schmuck, A. et al.: Routine use of real-time quantitative PCR for laboratory diagnosis of Epstein-Barr virus infections. *J. Med. Virol.*, 2002, 66, s. 360-369.
5. Faye, A., Quartier, P., Reguerre, Y. et al.: Chimaeric anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) in post-transplant B-lymphoproliferative disorder following stem cell transplantation in children. *Br. J. Haematol.*, 2001, 115, s. 112-118.
6. Curtis, R. E., Travis, L. B., Rowlings, P. A. et al.: Risk of lymphoproliferative disorders after bone marrow transplantation, a multi-institutional study. *Blood*, 1999, 94, s. 2208-16.
7. Aalto, S. M., Linnavuori, K., Peltola, H. et al.: Immunoreactivation of Epstein-Barr virus due to cytomegalovirus primary infection. *J. Med. Virol.*, 1998, 56, s. 186-191.
8. Bollard, C. M., Aguilar, L., Straathof, K. C. et al.: Cytotoxic T lymphocyte therapy for Epstein-Barr virus+ Hodgkin's disease. *J. Exp. Med.*, 2004, 200, s. 1623-1633.
9. Kimura, H., Morita, M., Yabuta, Y. et al.: Quantitative analysis of Epstein-Barr virus load by using a real-time PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, 37, s. 132-136.
10. Pongers-Willemsse, M. J., Verhagen, O. J., Tibbe, G. J. et al.: Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes. *Leukemia*, 1998, 12, s. 2006-2014.
11. Powell, J. L., Bunin, N. J., Callahan, C. et al.: An unexpectedly high incidence of Epstein-Barr virus lymphoproliferative disease after CD34+ selected autologous peripheral blood stem cell transplant in neuroblastoma. *Bone Marrow Transplant.*, 2004, 33, s. 651-657.
12. van Esser, J. W., Niesters, H. G., Thijsen, S. F. et al.: Molecular quantification of viral load in plasma allows for fast and accurate prediction of response to therapy of Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disease after allogeneic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.*, 2001, 113, s. 814-821.
13. Sirvent-Von Bueltzingsloewen, A., Morand, P., Buisson, M. et al.: A prospective study of Epstein-Barr virus load in 85 hematopoietic stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant.*, 2002, 29, s. 21-28.
14. Castellano-Sanchez, A. A., Li, S., Qian, J. et al.: Primary central nervous system posttransplant lymphoproliferative disorders. *Am. J. Clin. Pathol.*, 2004, 121, s. 246-253.
15. Kogan-Liberman, D., Burroughs, M., Emre, S. et al.: The role of quantitative Epstein-Barr virus polymerase chain reaction and preemptive immunosuppression reduction in pediatric liver transplantation, a preliminary experience. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 2001, 33, s. 445-449.
16. Allen, U. D.: The ABC of Epstein-Barr virus infections. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2005, 568, s. 25-39.

*Autoři děkují za spolupráci MUDr. Ester Mejstříkové a doc. MUDr. Ondřeji Hrušákoví, Ph.D. z Ústavu imunologie 2. LF UK a Mgr. Haně Žižkové a RNDr. Zuzaně Siegllové, CSc. z laboratoře ÚHKT za poskytnutí DNA z vyšetřování potransplantačního chiméřizmu.*

*Studie byla financována grantem IGA MZ ČR 7459.*



# Unrelated partially matched lymphocyte infusions in a patient with complete DiGeorge/CHARGE syndrome

Janda A, Sedlacek P, Mejstrikova E, Zdrahalova K, Hrusak O, Kalina T, Sieglova Z, Zizkova H, Formankova R, Keslova P, Hubacek P, Sediva A, Bartunkova J, Dlask K, Stary J. Unrelated partially matched lymphocyte infusions in a patient with complete DiGeorge/CHARGE syndrome.

Pediatr Transplantation 2007; 11: 441–447. © 2007 Blackwell Munksgaard

**Abstract:** We present an infant with cDGS overlapping with CHARGE syndrome, who suffered from T-cell deficiency treated with screened healthy DLI from an unrelated donor (8/10 match). The first dose of DLI ( $1.1 \times 10^6$  CD3+/kg) was administered at the age of six months, the second one ( $0.9 \times 10^6$  CD3+/kg) 36 days later. No conditioning was employed, GvHD prophylaxis consisting of CsA was used only during the second infusion. Since day +10 after the first DLI, split chimerism showing T-cell engraftment has been documented. Proliferative response to PHA was detected on day +145. The treatment was complicated by severe acute GvHD (grade II-III) after the first DLI and prolonged chronic liver cholestatic GvHD developing after the second DLI. Vigorous EBV proliferation four wk after the second DLI was accompanied by peripheral expansion of CD8+ donor cells. The patient, 26-months old, is clinically well and has slowly started to gain his developmental milestones. We believe that infusions of small doses of DLI from an unrelated donor represent a potentially helpful therapeutic option in patients with cDGS/CHARGE phenotype.

**Ales Janda<sup>1</sup>, Petr Sedlacek<sup>2</sup>, Ester Mejstrikova<sup>1</sup>, Katerina Zdrahalova<sup>2</sup>, Ondrej Hrusak<sup>1</sup>, Tomas Kalina<sup>1</sup>, Zuzana Sieglova<sup>4</sup>, Hana Zizkova<sup>4</sup>, Renata Formankova<sup>2</sup>, Petra Keslova<sup>2</sup>, Petr Hubacek<sup>2</sup>, Anna Sediva<sup>1</sup>, Jirina Bartunkova<sup>1</sup>, Karel Dlask<sup>3</sup> and Jan Stary<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Department of Immunology, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic, <sup>2</sup>Department of Pediatric Hematology and Oncology University Hospital Motol, Prague, Czech Republic,

<sup>3</sup>Department of Anesthesiology, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic, <sup>4</sup>Institute of Hematology and Blood Transfusion, UHKT, Prague, Czech Republic

**Key words:** donor lymphocyte infusion – complete DiGeorge syndrome – CHARGE syndrome – thymus aplasia – immunodeficiency – allogeneic stem cell transplantation

Ales Janda, Department of Immunology, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic  
Tel.: +42 0224 435 978  
Fax: +42 0224 435 962  
E-mail: ales.janda@lfmotol.cuni.cz

Accepted for publication 24 January 2007

DiGeorge syndrome is a relatively common (1:4000 live births) congenital disorder caused by developmental defects of the structures mainly derived from the third pharyngeal pouch and the fourth pharyngeal arch. It is characterized by

Abbreviations: ANC, absolute neutrophil count; cDGS, complete DiGeorge syndrome; CMV, cytomegalovirus; CsA, cyclosporin-A; DGS, DiGeorge syndrome; DLI, donor lymphocyte infusions; EBV, Epstein-Barr virus; FACS, fluorescent-activated cell sorting; GvHD, graft vs. host disease; HLA, human leukocyte antigen; HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; IVIg, intravenous immunoglobulin; MP, methylprednisolone; MRI, magnetic resonance imaging; NK, natural killer; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; PHA, phytohemagglutinin; PRBC, packed red blood cells; rATG, antithymocyte globulin; TCR, T-cell receptor; VCFS, velo-cardio facial syndrome.

facial anomalies, conotruncal heart defects, hypocalcemia, and T-cell dysfunction due to abnormal development of thymus (1). Most of the patients are hemizygous for 22q11.2, some have defects in various loci on chromosome 10, about 10% of cases are familial (2, 3). Rarely (in 1–5% of patients with DGS), aplasia of thymus results in a severe immunodeficiency with low response to mitogens and no or very low number of detectable T-cells ( $< 50$  CD3+ cells/ $\mu$ L). This severely immunodeficient variant is clinically classified as a cDGS and is largely fatal if left untreated (4). Interestingly, less than half of the patients with the complete form have the 22q11.2 microdeletion (1, 5). DGS can be found in conjunction with phenotypically similar condition called CHARGE syndrome (4, 6, 7). It is a sporadic multiple congenital malformation

Janda et al.

attributed to an abnormal development of structures derived from the first pharyngeal pouch and arch. The acronym reflects the associated defects: Coloboma, Heart anomaly, Atresia (choanal), Retardation (mental and growth), Genital anomaly, and Ear anomaly. It is a very heterogeneous condition and other abnormalities, including facial asymmetry, unilateral facial nerve paralysis, renal abnormality, orofacial clefts, and esophageal atresia, frequently accompany the main features (8, 9). The chief phenotypical signs of CHARGE syndrome distinguishing it from DGS are coloboma and choanal atresia as these are uncommon findings in DGS or 22q11.2 deletion phenotypes. A new syndrome encompassing traits of both conditions has been discussed (7). Prognosis of patients with this overlapping phenotype is generally worse than in patients with isolated cDGS (10). Deletion of 22q11.2 locus is rarely found in these cases (7).

Several therapeutic approaches have been tried to treat the immunodeficiency associated with thymic aplasia in cDGS as these are prone to life-threatening infections and their survival rate without treatment is approximately 27% by the end of the first year of life and 0% by the end of the third year (10). The use of fetal thymus grafts resulted in an immune reconstitution in a few cases (11–13). Allogeneic transplantation of post-natal thymus showed promising results in studies published by a team lead by Professor Markert (4, 14, 15). Although thymus transplantation is an auspicious treatment modality, it is not currently performed in any European center and thus availability for European patients is limited (Markert ML, personal communication, August 25, 2004). Therapeutic use of thymic humoral factors (thymosin, thymopoietin and thymulin) in athymic patients has been tried, however, it showed ambiguous results and presently it is not widely accepted (16, 17). Successful application of HSCT in cDGS has been reported in four patients with the use of HLA-identical grafts (three matched siblings and one fully matched unrelated donor) (18–21). It was hypothesized that only post-thymic lymphocytes and not the stem cells were responsible for immune reconstitution after HSCT and adoptive transfer of mature lymphocytes has been suggested as an adequate form of therapy (22). Four favorable cases of administration of PBMC as a treatment of T-cell deficiency in cDGS has been described so far (22–24).

We present a severely immunodeficient infant with cDGS/CHARGE syndrome treated with allogeneic DLI. He had no siblings and no fully

matched unrelated donor, therefore graft from an unrelated, partially mismatched donor was used. We suggest this approach to be a possible and potentially helpful alternative in absence of other treatment modalities in T-cell deficient athymic patient.

### Case report

A Caucasian boy was born at term from the first pregnancy of healthy unrelated parents. During an otherwise uncomplicated pregnancy, a polyhydramnion was detected; normal karyotype was found on amniocentesis. Intensive supportive therapy including intubation and artificial ventilation ensued immediately after Caesarean section performed due to fetal distress. The patient presented with multiple congenital malformations: hypertelorism, malformed low-set ears, micrognathia, bilateral choanal atresia, esophageal atresia with tracheobronchial fistula, heart defects (hemodynamically significant ductus arteriosus, right-sided aortal arch, and foramen ovale patent), bilateral retinal coloboma, tracheobronchomalacia, severe gastroesophageal reflux, undescended testicles, and micropenis.

Analysis made by flow cytometry at two months of age revealed extremely low number of T-cells (2 cells/ $\mu$ L; Fig. 1, Table 1) and no proliferative response to PHA was observed. Due to the extremely low number of T-cells, no further detailed analysis of T-cells was possible at that time. Maternal cells engraftment was ruled out. Absence of thymus was confirmed by MRI and by direct observation during cardiac surgery. Microdeletion of 22q11.2 was not found with fluorescence *in situ* hybridization on interphase lymphocytes with a DGS/VCFS region dual color probe, locus TUPLE1 (Cytocell). The patient was diagnosed with cDGS overlapping with CHARGE syndrome.

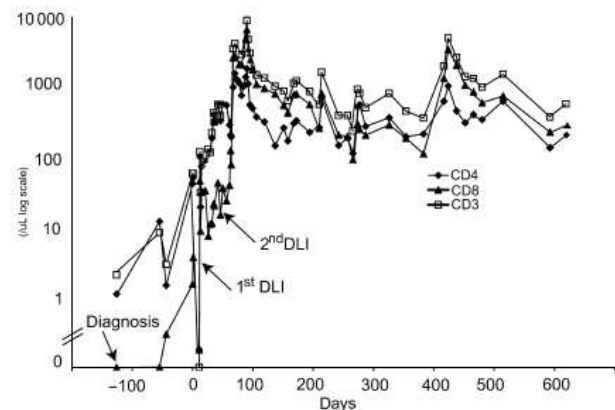


Fig. 1. Number of T-cell subsets related to the day of the first DLI (day 0).

Donor lymphocyte infusions in DiGeorge syndrome

Table 1. Selected values of lymphocyte subsets related to the day of the first DLI (day 0); values are rounded up. Diagnosis of complete DGS/CHARGE was made in two months of age, 127 days prior to the first DLI

|                              | Day  |      |      |      |      |     |      |
|------------------------------|------|------|------|------|------|-----|------|
|                              | -127 | 0    | 35   | 67   | 88   | 383 | 620  |
| Lymphocytes (cells/ $\mu$ L) | 1890 | 1770 | 2460 | 3960 | 6730 | 928 | 1600 |
| Lymphocyte subsets (%) CD3+  | <1   | 3    | 17   | 89   | 96   | 39  | 35   |
| CD4+                         | <1   | 2    | 17   | 66   | 21   | 23  | 13   |
| CD8+                         | <1   | <1   | <1   | 25   | 74   | 12  | 18   |
| CD19+                        | 59   | 66   | 67   | 0    | 0    | 21  | 36   |
| CD3-16+56+                   | 39   | 26   | 10   | 10   | 2    | 27  | 21   |

DLI, donor lymphocyte infusions; DGS, DiGeorge syndrome.

The patient underwent a number of corrective surgical interventions. Esophageal atresia and tracheobronchial fistula were corrected within a few hours after the delivery, later followed by resection of patent ductus arteriosus, bilateral choanal dilatation, and gastric fundoplication.

Despite repeatedly low total calcium levels (1.78 mmol/L as the lowest detected value), no clinical symptoms of hypocalcemia were observed; levels of parathormone and calcitonin were always within the normal range corresponding with findings in partial hypoparathyroidism (25). No other endocrine abnormalities were documented. Laboratory markers or clinically relevant signs of autoimmunity were not present as well.

He suffered from recurrent severe infections and septic shocks prior to the transplantation of lymphocytes. He has been transiently colonized with multiresistent species of *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, and *Acinetobacter*. Local, mainly oral, candidiasis has been a frequent problem. No systemic fungal or yeast infections have been detected. The repeated surgical interventions, infectious episodes, and severe tracheobronchomalacia-induced patient's dependence on mechanical ventilation was observed for first seven months of his life.

Due to hypogammaglobulinemia (Table 2), IVIg has been administered on a regular basis

Table 2. Immunoglobulin levels (g/L) related to the day of the first DLI measured before IVIg infusions

|     | Day  |     |     |     |     |     |
|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|
|     | -127 | -6  | 35  | 88  | 410 | 620 |
| IgG | 5.4  | 9.5 | 7.1 | 4.6 | 4.5 | 3.2 |
| IgA | 0.4  | 0.6 | 0.3 | 0.1 | 1.7 | 1.4 |
| IgM | 0.6  | 0.4 | 0.3 | 0.8 | 0.3 | 0.4 |

DLI, donor lymphocyte infusions; IVIg, intravenous immunoglobulin.

(0.4 g/kg in a three wk interval). Prior to the transplantation, several units of non-irradiated blood products (PRBC) were applied inadvertently (nine in total and one without a leukofilter).

At the age of six months (he weighed 4300 g), small amounts of unmanipulated bone marrow graft were applied to the patient. He had no siblings and no fully matched unrelated donor, thus a graft from 8/10 HLA allele-matched unrelated screened and healthy (CMV negative and EBV positive) 40 yr-old-male donor was used after acquirement of a full informed consent from the donor and the patient's parents. The graft was mismatched in HLA-B allele (\*3501/08 in host vs. \*2705 in donor). In HLA-C locus, the donor had one extra allelic group (\*1602/06). The first dose of the graft ( $1.1 \times 10^6$  CD3 + /kg,  $2 \times 10^5$  CD34 + /kg,  $2 \times 10^7$  nuclear cells/kg, CFU-GM  $4.4 \times 10^6$ /kg, and BFU-E  $3.4 \times 10^6$ /kg) was administered without prior conditioning and with no GvHD prophylaxis. The graft was used as a source of T-lymphocytes, rather than of CD34 + cells, which were present in substantially lower quantity and thus is labeled as DLI. The patient continued to require mechanical ventilation at the time of infusion.

The quantitative measurement of chimerism was performed by fluorescence multiplex PCR of short tandem repeats polymorphisms in patient/donor informative loci D5S818, D7S820, and D16S539 using DNA obtained from whole blood and FACS-sorted cells. The split chimerism, with T-cells of only donor phenotype, has been repeatedly documented since day +10 after the first DLI. The B cell, NK cell and monocyte fractions were solely of host origin. Although the patient had been transfused with several units of non-irradiated PRBC prior to the first DLI, no other signals than of donor and/or host origin were detected in all cell lines.

On day +10 after the DLI, the patient developed a severe hyperacute GvHD (overall grade II–III with skin and gut involvement) complicated with sepsis, cardiopulmonary instability, capillary leak syndrome, and ileus. The patient was immediately treated with rATG Fresenius, 25 mg/kg/dose, administered on day +10, +12, and +14), CsA (target level 200–300  $\mu$ g/L), and corticosteroids (MP 2 mg/kg), with complete resolution of GvHD on day +14.

On day +36 after the first DLI, he was given the second DLI ( $0.9 \times 10^6$ /kg CD3 +,  $2 \times 10^5$  CD34 + /kg; a thawed aliquot of lymphocytes from the previous donation) with no conditioning but with GvHD prophylaxis consisting of continuous CsA therapy.



Janda et al.

On day +60 significant EBV copy increase in peripheral blood lymphocytes was detected by quantitative real-time PCR accompanied with significant increase of B cell count and elevated production of IgM; there were no clinical symptoms of EBV infection. Peripheral expansion of activated CD8+ donor cells commenced simultaneously (day +67, 3600 CD3+ cells/ $\mu$ L, CD8+ 66%, out of which 96% had activated phenotype as shown by increased expression of HLA-DR). The management consisted of transient CsA withdrawal and application of anti-CD20 antibody, Rituximab (Mabthera, Hoffmann-La Roche AG, in two doses on day +63 and +71; in doses corresponding to 375 mg/m<sup>2</sup>). The B cell subset was then completely ablated, with a subsequent slow reconstitution (B cells detected on day +210). The current (day +620) B cell count is 580 cells/ $\mu$ L. The immunoglobulin levels have not normalized since the administration of rituximab and are still under the age-matched reference values despite regular IVIg administration (Table 2).

One month after the second DLI isolated cholestatic liver GvHD developed (stage four). It was successfully treated with corticosteroids (MP 1 mg/kg), CsA and rATG (Fresenius, 25 mg/kg in a single dose). ANC gradually decreased; from day +81 to +85, the patient suffered from agranulocytosis (ANC 0 cells/ $\mu$ L), presumably of immune etiology. The dose of corticosteroids was increased (MP 2 mg/kg), granulocyte-colony stimulating factor (Neupogen, Amgen, Europe BV; 5  $\mu$ g daily) was administered for five days, and on day +88 ANC was 3000 cells/ $\mu$ L.

T-cell numbers continued to increase as the second DLI with maximum on day +88 and with successive decrease and stabilization at the current values (Fig. 1; Table 1). The CD4/CD8 ratio normalized six months after the EBV infection. T-cells are mainly TCR $\alpha\beta$ +, the relative representation of TCR $\gamma\delta$ + cells have been within the normal range (26), currently 10% of CD3+ cells (data not shown). Proliferation response to PHA has been detected since day +145 after the first DLI and is now comparable with the results in patients who are immunosuppressed after HSCT. Later, antigen-specific proliferation response was documented after administration of tetanus vaccine as well. Naive cells expressing CD45RA, CD45RA/CCR7, and CD45RA/CD27 were not detected (day +383) in CD4 subset, thus, memory phenotype has predominated (27). The proportion of CD45RA+ in CD8 population was less affected (Fig. 2, not all data are shown).

Presently, the patient aged 26 months (20 months after the first DLI) is treated as an

outpatient. He is off any immunosuppressive therapy. Long-term administration of prednisone was finished on D+400 and CsA on D+480. Besides regular immunoglobulin substitution (approximately 0.3 g/kg every three wk) continual antibiotic prophylaxis (co-trimoxazole and azithromycin) and oral calcium and magnesium supplements, vitamin D, and physical therapy are applied.

The signs of chronic GvHD manifested after the second DLI have gradually diminished, as demonstrated by his liver function tests that are within normal limits. He is fed via gastric tube in view of lasting velopharyngeal insufficiency. He intermittently suffers from common mild viral infections; there is marked improvement in comparison with the period before DLI. No infection with intracellular pathogens has occurred since the transplantation. No complicated viral infections other than EBV early after DLI were detected either.

He has suffered from persistent failure to thrive, although there has been marked catch-up growth since 14 months of age (gastric tube was placed at that time) and he is slowly gaining his developmental milestones.

## Discussion

We report a therapeutic use of unmanipulated bone marrow transplant used in a form of DLI in an infant with cDGS overlapping with CHARGE syndrome. This condition calls for immediate action and as no other treatment option of this patient's immunodeficient status was available, we decided to use DLIs from an unrelated donor. The consideration of full HSCT after a myeloablative conditioning was abandoned due to the clinical status of the patient as well as previous encouraging experience with administration of PBMC or bone marrow grafts without conditioning in other transplantation centers (18–24).

We planned to transfer cells in consecutive doses, with escalating numbers of CD3+ cells (starting at  $1 \times 10^6$  CD3+ cells/kg) in four to six wk intervals, together with close monitoring of T-cell counts until proliferation and activation of T-cells occurred. In comparison, the doses of transfused T-cells applied in the previously reported trials using HLA-identical grafts either from the bone marrow or from the periphery ranged from  $4 \times 10^6$  to  $1 \times 10^8$  CD3+ cells/kg (18–24). The main reason to start the therapy with lower doses of CD3+ cells than formerly reported was the mismatch between the donor and the recipient in two HLA class I alleles. The

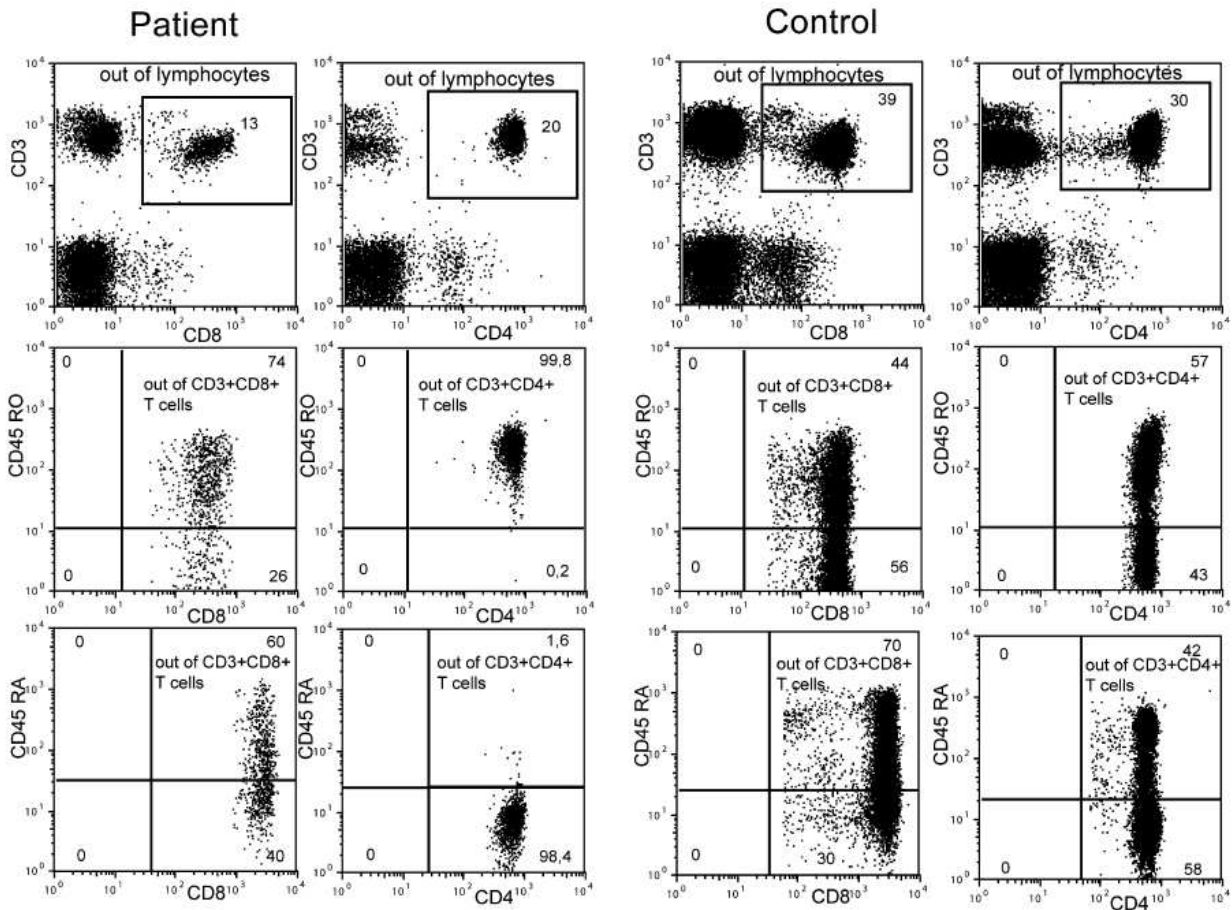


Fig. 2. Naive vs. memory phenotype of the CD4+ and CD8+ subsets of T-cells was measured using combinations CD45RA/CD3/CD27/CD4/CD8 at day 383, CD45RA/CD11a/CD27/CD4/CD3/CD8, and CD45RA/CD45RO/CD8/CD4/CD3. Expression of CD45 RA correlates very well with naive phenotype and CD45 RO with memory phenotype (27). In these flow plots, a lack of naive CD4+ cells is demonstrated (1.6% of CD4+CD45RA+ and 99.8% of CD4+CD45RO+ cells out of CD4+ subpopulation). Currently, 1.9% of CD4+ cells express CD45 RA and 97% CD45 RO (data not shown).

rationale to use this graft was the fact that only the disparity in HLA-B locus could play a role in GvHD induction, thus posing an acceptable risk equal to 9/10 HLA-allele match (28). Bone marrow graft was characterized as DLI according to its predominant content of lymphocytes, however, due to the graft origin, small number of CD34+ was also transferred.

No conditioning and no GvHD prophylaxis were applied. This approach was consistent with previously reported protocols (18–24); however, it did not forestall severe GvHD that occurred shortly afterwards.

Thus, in the second DLI, the dose of infused CD3+ cells was not increased and continuous CsA was used as GvHD prophylaxis. After the administration of the second DLI, EBV proliferation resulted in vigorous expansion of activated CD8+ cells; CD4+ were less affected (Fig. 1). Subsequently, the number of T-cells

was significantly high, thus no other DLI was applied.

Age of the patient at the transplantation (6/7 months) was congruent with the data in published cases (5–19 months) (18–22). Similarly to the earlier trials (18, 19, 21–24), the engraftment of donor cells was documented only in the T-cell subset and the split chimerism has remained stable since its first detection. Restoration of proliferation response to mitogen stimulation occurred within similar time period after transplantation as in the other reported trials (1 wk–10 months) (19, 22, 23).

The phenotype of T-cells with respect to naive vs. memory features found in our patient after DLI corresponds well with the previously published results (23), showing no thymic output and documenting the adoptive character of the therapy (Fig. 2). The TCR excision circles analysis (4) was not available. However, the combination of

Janda et al.

the used cell surface markers of naive cells should provide similarly reliable information (27).

The patient is still dependent on IVIg as his own immunoglobulin production has not fully recovered yet. The reason for this insufficiency may lie in the split chimerism resulting in imperfect cooperation among these lymphocyte subsets. This situation is frequently seen in patients with severe combined immunodeficiency syndrome with split chimerism in lymphocyte subpopulations following allogeneic HSCT when no or reduced intensity conditioning regimen is applied (29). Transient ablation of B cells caused by rituximab administration probably might have contributed to the low immunoglobulin levels as well.

Several therapeutic management issues require attention and rise questions on possible alternative procedures. The first one is the starting dose of CD3+ cells that proved to be too high in this HLA-mismatched setting, and/or it should have been accompanied with a GvHD prophylaxis. Starting with a dose of  $10^5$  CD3+/kg and slow increase of CD3+ number in the subsequent infusions administered in four to six wk intervals may prevent the intensive anti-GvHD treatment that was inevitable in this case. Another remark relates to the source of CD3+ cells as we used a bone marrow graft, however, we believe that the best option is to employ unmobilized PBMC if available. The EBV proliferation that complicated the situation after the second DLI occurred most probably as a consequence of rATG administration and EBV seropositivity of the donor. The need for rATG usage has been discussed above. The donor was 40 yr-old and thus we expected that he has encountered EBV with 90% probability (30). We proved this fact retrospectively by detection of anamnestic antibodies in a frozen sample of the graft. As a means to prevent development of post-transplant lymphoproliferative disease, we carefully monitor the load of EBV copies present in peripheral blood of all the transplanted patients in danger. Our approach enables us to treat EBV-driven lymphoproliferation before clinical symptoms fully develop (31, 32). However, certainly, it would be more suitable to use EBV negative donor or a matched cord blood sample if available.

The long-term prognosis and immune status of athymic patients undergoing HSCT or DLI remains unclear. In the absence of thymic output, exhaustion of the graft may be one of the unfavorable events to expect. The continuous thymic function in healthy individuals also ensures that self-reactive T-cells are maintained

at low frequencies in the periphery. The patient with exclusively peripherally expanded T-cells without thymic selection may be thus endangered by increased susceptibility to autoimmune disease. The infused recipient-reactive clones may induce chronic GvHD as well (23). The encouraging finding is that the cDGS patients reported by Bensoussan et al. (23) and Goldsobel et al. (19) are both well after 7 and 23 yr after administration of PBMC or HSCT, respectively (Bensoussan D, personal communication, December 2, 2005).

Thus, apart from the above-described difficulties, we believe that infusions of small doses of DLI from an unrelated donor without previous HSCT may represent a possible alternative therapy for patients with cDGS in the absence of other therapeutic modalities. However, overall prognosis of this patient depends on severity of other congenital abnormalities, particularly related to his respiratory system and feeding, as well.

#### Acknowledgments

We wish to thank Dr. Danielle Bensoussan for willingness to share data on her patient and Dr. Helen Chapel and Dr. Daniela Rozkova for helpful remarks on the text. We are grateful to the reviewers for inspiring comments as well. None of the authors have any conflict of interest. The publication was partially supported by grants IGA NI 7410-3, VZ MSM 0021620812, and VZ 00064203.

#### References

- OSKARSDOTTIR S, PERSSON C, ERIKSSON BO, FASTH A. Presenting phenotype in 100 children with the 22q11 deletion syndrome. *Eur J Pediatr* 2005; 164: 146–153.
- DRISCOLL DA, SALVIN J, SELLINGER B, et al. Prevalence of 22q11 microdeletions in DiGeorge and velocardiofacial syndromes: Implications for genetic counselling and prenatal diagnosis. *J Med Genet* 1993; 30: 813–817.
- SEDIVA A, BARTUNKOVA J, ZACHOVA R, et al. Early development of immunity in DiGeorge syndrome. *Med Sci Monit* 2005; 11: 182–187.
- MARKERT ML, SARZOTTI M, OZAKI DA, et al. Thymus transplantation in complete DiGeorge syndrome: Immunologic and safety evaluations in 12 patients. *Blood* 2003; 102: 1121–1130.
- RYAN AK, GOODSHIP JA, WILSON DI, et al. Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: A European collaborative study. *J Med Genet* 1997; 34: 798–804.
- MARKERT ML, MAJURE M, HARVILLE TO, HULKA G, OLDFHAM K. Severe laryngomalacia and bronchomalacia in DiGeorge syndrome and CHARGE association. *Pediatr Pulmonol* 1997; 24: 364–369.
- DE LONLAY-DEBENEY P, CORMIER-DAIRE V, AMIEL J, et al. Features of DiGeorge syndrome and CHARGE association in five patients. *J Med Genet* 1997; 34: 986–989.
- VERLOES A. Updated diagnostic criteria for CHARGE syndrome: A proposal. *Am J Med Genet A* 2005; 133: 306–308.
- CAREY JC. CHARGE syndrome: 2005. *Am J Med Genet A* 2005; 133: 227.



10. MARKERT ML, HUMMELL DS, ROSENBLATT HM, et al. Complete DiGeorge syndrome: Persistence of profound immunodeficiency. *J Pediatr* 1998; 132: 15–21.
11. CLEVELAND WW, FOGEL BJ, BROWN WT, KAY HE. Foetal thymic transplant in a case of DiGeorge's syndrome. *Lancet* 1968; 2: 1211–1214.
12. AUGUST CS, BERKEL AI, LEVEY RH, ROSEN FS, KAY HE. Establishment of immunological competence in a child with congenital thymic aplasia by a graft of fetal thymus. *Lancet* 1970; 1: 1080–1083.
13. MAYUMI M, KIMATA H, SUEHIRO Y, et al. DiGeorge syndrome with hypogammaglobulinaemia: A patient with excess suppressor T cell activity treated with fetal thymus transplantation. *Eur J Pediatr* 1989; 178: 518–522.
14. MARKERT ML, ALEXIEFF MJ, LI J, et al. Postnatal thymus transplantation with immunosuppression as treatment for DiGeorge syndrome. *Blood* 2004; 104: 2574–2581.
15. RICE HE, SKINNER MA, MAHAFFEY SM, et al. Thymic transplantation for complete DiGeorge syndrome: Medical and surgical considerations. *J Pediatr Surg* 2004; 39: 1607–1615.
16. BARRETT D, WARA D, AMMANN A, COWAN M. Thymosin therapy in the DiGeorge syndrome. *J Pediatr* 1980; 97: 66–71.
17. HONG R. The DiGeorge anomaly. *Clin Rev Allergy Immunol* 2001; 20: 43–60.
18. BORZY MS, RIDGWAY D, NOYA FJ, SHEARER WT. Successful bone marrow transplantation with split lymphoid chimerism in DiGeorge syndrome. *J Clin Immunol* 1989; 9: 386–392.
19. GOLDSOBEL AB, HAAS A, STIEHM ER. Bone marrow transplantation in DiGeorge syndrome. *J Pediatr* 1987; 111: 40–44.
20. MATSUMOTO T, AMAMOTO N, KONDOH T, et al. Complete-type DiGeorge syndrome treated by bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22: 927–930.
21. AL-TAMEMI S, MAZER B, MITCHELL D, et al. Complete DiGeorge anomaly in the absence of neonatal hypocalcemia and velofacial and cardiac defects. *Pediatrics* 2005; 116: E457–E460.
22. BOWERS DC, LEDERMAN HM, SICHERER SH, WINKELSTEIN JA, CHEN AR. Immune constitution of complete DiGeorge anomaly by transplantation of unmobilised blood mononuclear cells. *Lancet* 1998; 352: 1983–1984.
23. BENSOUSSAN D, LE DEIST F, LATGER-CANNARD V, et al. T-cell immune constitution after peripheral blood mononuclear cell transplantation in complete DiGeorge syndrome. *Br J Haematol* 2002; 117: 899–906.
24. HOENIG M, SCHULZ A, SCHUETZ C, DEBATIN K-M, FRIEDRICH W. Treatment of complete DiGeorge syndrome by repeat transfusions of blood lymphocytes from an HLA-identical sibling donor. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2004; 104: 1332.
25. TAYLOR SC, MORRIS G, WILSON D, DAVIES SJ, GREGORY JW. Hypoparathyroidism and 22q11 deletion syndrome. *Arch Dis Child* 2003; 88: 520–522.
26. DE VRIES E, DE BRUIN-VERSTEEG S, COMANS-BITTER WM, et al. Longitudinal survey of lymphocyte subpopulations in the first year of life. *Pediatr Res* 2000; 47: 528–537.
27. DE ROSA SC, HERZENBERG LA, HERZENBERG LA, ROEDERER M. 11-color, 13-parameter flow cytometry: Identification of human naive T cells by phenotype, function, and T-cell receptor diversity. *Nat Med* 2001; 7: 245–248.
28. MIANO M, CANCEDDA R, HARTMANN O, et al. Survey on haematopoietic stem cell transplantation for children in Europe. *Bone Marrow Transplant* 2005; 35: S3–S8.
29. LIU A, VOSSHENRICH CA, LAGRESLE-PEYROU C, et al. Competition within the early B-cell compartment conditions B-cell reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation in nonirradiated recipients. *Blood* 2006; 108: 1123–1128.
30. SHROFF R, REES L. The post-transplant lymphoproliferative disorder—a literature review. *Pediatr Nephrol* 2004; 19: 369–377.
31. MILPIED N, VASSEUR B, PARQUET N, et al. Humanized anti-CD20 monoclonal antibody (Rituximab) in post transplant B-lymphoproliferative disorder: A retrospective analysis on 32 patients. *Ann Oncol* 2000; 11(Suppl. 1): 113–116.
32. WAGNER HJ, CHENG YC, HULS MH, et al. Prompt versus preemptive intervention for EBV lymphoproliferative disease. *Blood* 2004; 103: 3979–3981.

## 11. Adenoviry

Jak bylo popsáno v úvodu, je detekce adenovirů pomocí PCR obtížná především díky velkému počtu sérotypů. V naší laboratoři detekujeme adenovirovou DNA od roku 2003 pomocí eseje, na jejímž designu jsme se podíleli (viz Metody a článek č. 11). V případě adenoviru, jako viru, který se primárně neváže na leukocyty jsme také výsledky vyjadřovali v počtu kopií na 1 ml plné krve.

Od roku 2003 jsme provedli detekci adenoviru v celkem 5 098 vzorcích od 165 dětských a 295 dospělých pacientů. Z toho bylo 2 349 vzorků periferní krve dětských pacientů a 2 309 vzorků periferní krve dospělých pacientů. Zbýlých 440 vzorků tvořili další biologické vzorky jako např. vzorky stolice či výplachy z endotracheální kanyly apod. Pozitivitu jsme detekovali v 56 vzorcích periferní kve (2,4%) od 17 (10%) dětských pacientů a v 39 vzorcích periferní krve (1,7 %) od 18 (6,1%) pacientů dospělých. Zároveň jsme však pozorovali jistou epidemicitu adenovirových infekcí, kdy jsme ve třech letech podrobného sledování všech našich alogenně transplantovaných pacientů detekovali pozitivitu ve třiceti vzorcích periferní krve od 4 dětských a 8 dospělých pacientů s mediánem positivity 3 300 kopií / ml (rozmezí 600 – 4 554 000) a většinu zbylých pozitivních vzorků (46) jsme získali od května do listopadu 2006, kdy jsme detekovali celkem 14 pozitivních pacientů (10 dětských a 4 dospělých pacientů) s mediánem positivity 5 400 kopií / ml (rozmezí 600 – 17 028 600). Sekvenací jsme u několika pozitivních pacientů určili adenovirové sérotypy 2 (skupina C) a 31 (skupina A).

Na základě zkušeností našich a center spolupracujících na řešení evropského grantu sledujícího adenovirové infekce u pacientů po HSCT, byla jako hranice pro razantní terapii adenovirové infekce určena kvantita  $10^5$ / ml periferní krve.

Naše zkušenosti s detekcí adenovirů u pacientů po HSCT jsme publikovali v podobě posteru (viz níže) na 33. kongresu Evropské společnosti pro transplantace krve a kostní dřeně (European Blood and Marrow Transplantation). Abstrakt byl pak publikován ve sborníku abstrakt tohoto kongresu, který je vydáván jako příloha časopisu Bone Marrow Transplantation.

## Internally Controlled Real-Time PCR Monitoring of Adenovirus DNA Load in Serum or Plasma of Transplant Recipients

Eric C. J. Claas,<sup>1\*</sup> Marco W. Schilham,<sup>2</sup> Caroline S. de Brouwer,<sup>1</sup> Petr Hubacek,<sup>3</sup>  
Marcela Echavarría,<sup>4</sup> Arjan C. Lankester,<sup>2</sup> Maarten J. D. van Tol,<sup>2</sup>  
and Aloys C. M. Kroes<sup>1</sup>

*Department of Medical Microbiology<sup>1</sup> and Department of Pediatrics,<sup>2</sup> Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands; Department of Pediatrics, Motol University Hospital, Prague, Czech Republic<sup>3</sup>; and Centro de Educacion Medica e Investigaciones Clinicas, Buenos Aires, Argentina<sup>4</sup>*

Received 21 July 2004/Returned for modification 25 August 2004/Accepted 17 December 2004

Adenoviruses have been recognized as important pathogens in immunocompromised hosts. Particularly in pediatric allogeneic stem cell transplant recipients, the morbidity of the patients and mortality in those patients with disseminated infections have been found to increase over the last few years. Severe infections are predominantly but not exclusively caused by subgroup C adenoviruses. A multiplex real-time PCR assay using molecular beacons as probes was developed to enable monitoring of adenovirus DNA in those patients with simultaneous identification of subgroups. An internal control was coamplified in the multiplex PCR to check for the DNA isolation procedure as well as the presence of inhibitors in the clinical samples. The assay has been applied retrospectively in patient groups with different clinical outcomes of infection. In fatal cases, significantly higher adenovirus loads developed, exceeding even  $10^{11}$  copies/ml of serum or plasma. Patients with viral loads over  $10^6$  copies/ml appear to have an increased risk for fatal complications. This quantitative real-time PCR assay has been prospectively used clinically since 2002 to study the course of adenovirus infection. In addition, the assay provides objective start and end points of therapeutic interventions, including the clinically important evaluation of antiviral drugs.

Human adenoviruses (HAdV) are a group of nonenveloped, double-stranded DNA viruses which are endemic in the pediatric population in particular. Most infections occur in children before the age of 5, but older age groups are affected as well. At present, 51 serotypes have been identified. In the immunocompetent individual, adenoviruses can cause infections of the conjunctiva, respiratory tract, and gastrointestinal tract with a variety of clinical manifestations. Although the infections are usually self-limiting, in immunocompromised patients dissemination may occur, potentially resulting in severe complications and even death (38). This occurrence of viral infections or reactivations causing posttransplant complications is reminiscent of cytomegalovirus (CMV) and Epstein Barr virus (EBV) infections (8, 11, 25, 36). Adenoviruses are now also recognized as important pathogens causing severe morbidity and mortality, especially in patients receiving allogeneic bone marrow transplants (3, 4, 6, 13, 15, 17, 18, 38). Infections have been reported in 5 to 30% of these patients, with higher morbidities in children, where mortality can be as high as 50% (1, 9, 31, 38). Most likely, this results from reactivation of latent adenoviruses, but primary infections cannot always be excluded (38). Species C viruses comprising subtypes 1, 2, 5, and 6 have been predominantly found in disseminated adenovirus infections in children. However, subgroup A and B viruses have been detected as well, mainly in solid organ and adult bone marrow transplant patients (15, 18).

Several quantitative real-time PCR assays for monitoring herpesvirus DNA load have been used in the follow-up for patients posttransplantation, resulting in successful implementation of preemptive therapy for CMV and EBV infections (2, 26, 32). Our preliminary studies have shown that adenovirus DNA in serum from immunocompromised patients may be predictive for the outcome of disease (7). Application of a semiquantitative PCR assay for the detection of adenovirus DNA in the plasma of transplant patients suggested an association of the viral load and fatal outcome of the disease (29).

Recently, real-time PCR applications for the detection and quantification of adenovirus have been described for species C viruses in transplant patients (10, 34) and adenovirus type 4 for respiratory diagnosis (16) and also for broadly reactive adenovirus multiplex assays on a variety of clinical samples (12, 14, 23, 24).

In this study, an internally controlled, multiplex real-time PCR that enabled efficient quantification of species A, B, and C adenoviruses was developed. An internal control is coamplified to monitor the integrity of the DNA extracted from clinical samples as well as the presence of PCR inhibitors. The heterogeneity of the adenovirus family complicates the design of an adenovirus real-time PCR. Mismatches in primer and probe sequences can significantly affect the kinetics of a real-time PCR and thus quantification. Our approach has focused on a PCR that amplified DNA of all relevant adenovirus serotypes by using primers selected from the 3' end of the hexon gene (5, 6) and the detection of the amplified products by using molecular beacons as probes (35). By using molecular beacons carrying different fluorophores, species of adenoviruses could be differentiated in the assay (37). Laboratories lacking multicolor

\* Corresponding author. Mailing address: Leiden University Medical Center, Department of Medical Microbiology, PO Box 9600, 2300 RC Leiden, The Netherlands. Phone: 31 (71) 5263650. Fax: 31 (71) 5248148. E-mail: e.claas@lumc.nl.

TABLE 1. Primers and probes for real-time PCR detection and amplification of adenoviruses

| Primer or probe | Sequence 5'-3'                                       |
|-----------------|--|
| <b>Primer</b>   |  |
| ADVs            | CATGACTTTTGAGGTGGATC                                 |
| ADVas           | CCGGCCGAGAAGGGTGTGCGCAGGTA                           |
| ADV31s          | TATGACATTTGAAGTTGACC                                 |
| <b>Probe</b>    |  |
| ADV-MB-AC-FAM   | <u>GCTGCG</u> GAGCCYACCCCTTCTTTATGT<br><u>CGCAGC</u> |
| ADV-MB-B-HEX    | <u>CGTGCG</u> GAGCCACCCCTGCTTTATCT<br><u>CGCAGC</u>  |
| ADV-MB-F-TXR    | <u>CGTGCG</u> GAGCCACACTTCTYATGT<br><u>CGCAGC</u>    |
| ADV-MGB         | AGCCACCCCTKCTTTAT                                    |

\* Underlined nucleotides indicate the stem structure of the molecular beacon. MB, molecular beacon; TXR, Texas red. The oligos are located at the 3' end of the hexon gene.

real-time PCR detection can apply the assay with the same primers but using a minor groove binder (MGB) probe (19). This new assay has been applied retrospectively on a series of pediatric allogeneic stem cell transplant (SCT) patients previously tested by semiquantitative analysis (29). Since 2002, this assay has also been prospectively applied to monitor adenovirus DNA in allogeneic SCT patients (20) and to evaluate the efficacy of ribavirin treatment of this condition (21). This assay contributes to better management of adenovirus infections in transplant patients.

MATERIALS AND METHODS

**Viruses and plasmids.** Recombinant adenovirus strains of all species, which were purified with cesium chloride and titrated by high-performance liquid chromatography (HPLC) (30), were a kind gift from M. Havenga, Crucell, The Netherlands, who also provided DNA from 51 adenovirus serotypes for specificity testing. The virus stocks were diluted in Basematrix (BBI Diagnostics, Boston, Mass.) and stored in aliquots of 10<sup>8</sup> virus particles (VP)/ml at -80°C.

An adenovirus type 5 stock of 2.34 × 10<sup>11</sup> particles/ml as counted by electron microscopy was purchased from Advanced Biotechnologies Inc, Columbia, Md.

Two DNA plasmids containing an insert of the 3' end region of the hexon gene of adenoviruses type 5 (IQL 103) and type 35 (IQL 104) were constructed (IQ Products, Groningen, The Netherlands). The concentration was 10<sup>8</sup> copies of DNA/ml.

**Primers and probes.** The primers previously published by Echavarria et al. (5) were adjusted to better suit real-time PCR kinetics. These primers are selected from the 3' end of the adenovirus hexon gene and resulted in a PCR product of 137 bp. Species-specific molecular beacons carrying different fluorophores were designed for detection and quantification of the different species of adenoviruses. Primers and probes are shown in Table 1.

The primers and the Cy5 (indodicarbocyanine)-labeled molecular beacon for the amplification and detection of the Phocine herpesvirus (PhHV) internal control have been described previously (33). This target is complicated in the adenovirus PCR as an internal control. Oligonucleotide primers were synthesized by Eurogentec, Seraing, Belgium. The molecular beacons were synthesized by Biologio, Malden, The Netherlands.

In addition, a minor groove binder (MGB) probe was designed. This probe can be used instead of the molecular beacons for general detection and quantification of the same adenovirus PCR products, without differentiation of the species. The MGB probe was synthesized by Applied Biosystems Inc, Nieuwerkerk aan den IJssel, The Netherlands.

**Patients.** Allogeneic SCT recipients at the Department of Pediatrics in the Leiden University Medical Center were included in the study, and a unique patient number (UPN) identified the patients. The original diseases necessitating the transplantation included acute myeloblastic leukemia, acute lymphoblastic leukemia, myelodysplastic syndrome, severe combined immunodeficiency disorder,

severe aplastic anemia, Fanconi aplastic anemia, and chronic myelomonocytic leukemia. Occurrence of adenovirus infections was not related to the original disease.

In a retrospective study of 328 allogeneic SCT patients, 36 patients had a positive adenovirus culture from stool, urine, or a throat swab and were selected for further analysis as described previously (29). These patients were divided into three groups based on their clinical presentation. Group I had positive adenovirus cultures but no clinical symptoms (n = 17). Group II had adenovirus-related diseases but survived (n = 12). Ten of these patients had enteritis, one patient had hemorrhagic cystitis, and one patient had enteritis and hemorrhagic cystitis. Group III comprised patients with a fatal outcome that clinically was attributed to a disseminated adenovirus infection (n = 7). All patients but one had enteritis in combination with hepatitis or hemorrhagic cystitis. The remaining patient had pneumonia.

Subsequently, in 2001 and 2002, 48 allogeneic transplant recipients were monitored prospectively for 6 months after SCT.

**Extraction of DNA.** DNA was isolated from sera, plasma samples, and controls by using spin columns of the QiaAmp blood kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions.

For the prospective study, DNA was isolated from clinical samples, usually plasma, by the Total Nucleic Acid isolation kit and the automated MagNAPure LC DNA extraction system (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). No significant differences were observed between the results obtained by column isolation and those obtained by automated extraction in the MagNAPure system (data not shown).

**Real-time PCR assay.** Real-time PCR was performed using the iCycler IQ multicolor real-time PCR detection apparatus (Bio-Rad, Veenendaal, The Netherlands), which enables simultaneous detection of four different fluorophores. Binding of the specific probes to the PCR products generates fluorescence, which is detected by the iCycler IQ. The amplification cycle at which this fluorescence crosses the threshold line is called the threshold cycle or C<sub>T</sub> value.

The PCR is performed in a 50-µl reaction volume containing 2× HotStar Taq Master mix (QIAGEN GmbH) as a multiplex assay with three primers (0.3 µM concentrations of each primer [ADVs, ADV31s, and ADVas]), two probes (a 3 µM concentration of 6-carboxyfluorescein [FAM]-labeled ADV-MB-AC for species A and C virus detection and a 3 µM concentration of hexachlorofluorescein [HEX]-labeled ADV-MB-B for species B virus detection), and a final concentration of 4 mM MgCl<sub>2</sub>. Addition of 10 µl of extracted DNA completed the reaction mixture. The amplification protocol consisted of an enzyme activation step of 95°C for 15 min followed by 50 cycles of amplification (95°C for 30 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 30 s). A fixed amount of PhHV was added to the lysis buffer prior to extraction and was complicated in the reaction to check DNA isolation and inhibition as described previously (33).

**Quantification of the adenovirus load.** The extraction of adenovirus control of 10<sup>8</sup> VP/ml was identical to that of the patient samples, and dilution series of 10<sup>2</sup> to 10<sup>7</sup> VP/ml were applied to real-time PCR. The obtained C<sub>T</sub> values were used to establish a standard curve, and subsequently the viral load of the clinical samples was determined by entering the C<sub>T</sub> value of the sample in the standard curve. The software of the iCycler IQ multicolor real-time PCR detection system performed the calculations.

**Sequence analysis.** Two additional primers (sense, GAAACTCCAGCCCA TGAG; antisense, TTATGTGGTAGCGTTRC) were used for nucleotide sequence analysis of an approximately 450-bp fragment of the 3' end hexon gene. In this way, the primer and probe regions of adenovirus serotypes were analyzed to define the appropriate primers, and in addition, this method was used for genotyping the viruses. The PCR products were subjected to sequence analysis with the Big Dye-Terminator Cycle Sequencing ready reactions kit containing Ampli-Taq DNA polymerase FS (Applied Biosystems, Inc., Foster City, Calif.). Samples were analyzed on an ABI model 310 DNA sequencer (Applied Biosystems, Inc.), and genotyping was performed by BLAST analysis on the NCBI website (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

RESULTS

**Multiplex real-time PCR.** The primers targeting the 3' end of the hexon gene that were used in previous studies (5, 6, 29) successfully amplified 100 pg of DNA of all 51 adenovirus serotypes in a conventional PCR assay with an annealing temperature of 52°C. However, testing dilution series showed that a subpicogram-level sensitivity could not be obtained for all serotypes. For the selection of appropriate primers that enable

Downloaded from jcm.asm.org by on May 21, 2007



TABLE 2. Nucleotide sequences of the primer and probe regions at the 3' end of the hexon gene of the subgroup A, B, and C serotypes of adenovirus

| Subgroup | Serotype | ADV <sub>s</sub> <sup>a</sup> | ADV <sub>as</sub>          | Probe                |
|----------|----------|-------------------------------|----------------------------|----------------------|
|          |          | CATGACTTTTGGAGGTGGATC         | CCGGCCGAGAAGGGTGTGCGCAGGTA | GAGCCACCCCTTCTTTATGT |
| A        | 12       | -----A-----                   | --C-----C-----             | -----T-----          |
| A        | 18       | -----A-----                   | -----C-----                | -----                |
| A        | 31       | T-----A-----A--T--C-          | -----A--                   | -----                |
| B        | 7        | -----                         | -----C-----                | -----G-----C-        |
| B        | 11       | -----C-----                   | -----C--A-----             | -----G-----C-        |
| B        | 34       | -----C-----                   | -----C--A-----             | -----G-----C-        |
| B        | 35       | -----C-----                   | -----C--A-----             | -----G-----C-        |
| C        | 1        | T-----                        | -----C-----                | -----                |
| C        | 2        | -----                         | -----C-----                | -----                |
| C        | 5        | -----                         | -----C-----                | -----                |
| C        | 6        | -----                         | -----C-----                | -----                |

<sup>a</sup> Primer sequences are given under primer names.

an accurate quantification of the serotypes that are known to cause complications in transplant patients (15, 38), sequence analysis was performed (Table 2). This resulted in the primers ADVs and ADVas, which amplified all serotypes of the subgroup A, B, and C viruses (Table 1).

The five mismatches of the ADVs primer with the HAdV 31 serotype sequence (Table 2) result in inefficient amplification and quantification of this serotype. This is shown in Table 3, where dilution series of HAdV 31 DNA were clearly underquantified after amplification using HAdV 5 or HAdV 18 as standards. On the other hand, when using HAdV 31 as a standard (Table 3), only the first two dilutions of this serotype used as experimental samples were amplified. In addition, the HAdV 5 and HAdV 18 dilutions were overquantified. Therefore, an additional primer, ADV31s (Table 1), was added so

that HAdV 31 DNA was also effectively quantified. Two different probes (Table 1) were used for the quantification of species A and C viruses (FAM-labeled probe ADV-MB-AC) and species B viruses (HEX-labeled probe ADV-MB-B). The assay was optimized according to standard procedures to reach the highest efficiency.

As in some cases subgroup F viruses are suggested to be involved in fatal cases of adenovirus dissemination (24, 29), a Texas red-labeled ADV-MB-F probe was designed as well (Table 1). This probe was not added to the multiplex reaction but was used to quantify the DNA from a patient that previously was shown to be HAdV 41 positive (29).

An internal control reaction was coamplified in the assay to check the procedure for efficient DNA isolation and for inhibition. A fixed amount of PhHV was added to the clinical samples prior to DNA isolation and coamplified in the real-time PCR using a Cy5-labeled probe for detection. Only if the *C<sub>T</sub>* value for this spike was within two cycles of the average of uninhibited samples was the result of the specimen considered a valid result.

**Quantification and species.** The heterogeneity in the adenovirus family complicates standardized quantification, as shown in Table 3, due to primer mismatches. When analyzing dilution series, differences were observed in the *C<sub>T</sub>* values of similar concentrations of HAdV 5 (species C) and HAdV 35 (species B) HPLC-titrated virus standards. This result most likely relates to the fact that in HPLC titration, the quantity is based on particles rather than DNA copies. For that reason, plasmid DNA standards were prepared and it was shown that the amount of DNA of this plasmid stock of HAdV 5 was comparable to the values for the HAdV 5 virus standards. This was further confirmed by obtaining a commercial batch of HAdV 5, which consisted of purified virus, that was quantified by electron microscopy (Advanced Biotechnologies). Therefore, the subgroup C standard was used routinely in the assay and allowed for accurate quantification of all serotypes of the A and C subgroup viruses, which are predominantly associated with adenovirus complications.

When a subgroup B virus was detected in the multiplex PCR, the sample was retested with the specific, less well standardized standard curve of that subgroup.

The MGB probe can be used for quantification of adenovi-

Downloaded from jcm.asm.org by on May 21, 2007

TABLE 3. Inefficient amplification of HAdV 31 shown by heterogeneity of viral DNA loads of experimental dilution series of adenovirus and heterologous serotypes as standard<sup>a</sup>

| Standard             | No. of copies/ml (10 log) |             |             |
|----------------------|---------------------------|-------------|-------------|
|                      | HAdV 5 (C)                | HAdV 18 (A) | HAdV 31 (A) |
| <b>HAdV 5 (log)</b>  |                           |             |             |
| 7                    | 7.2                       | 6.9         | 5           |
| 6                    | 6                         | 5.7         | 4           |
| 5                    | 5                         | 4.6         | 0           |
| 4                    | 4.2                       | 3.6         | 0           |
| 3                    | 3.1                       | 2.7         | 0           |
| <b>HAdV 18 (log)</b> |                           |             |             |
| 7                    | 7.3                       | 7           | 5.1         |
| 6                    | 6.1                       | 5.9         | 4.2         |
| 5                    | 5.1                       | 4.8         | 0           |
| 4                    | 4.4                       | 3.8         | 0           |
| 3                    | 3.2                       | 3           | 0           |
| <b>HAdV 31 (log)</b> |                           |             |             |
| 7                    | 10.4                      | 9.9         | 7.2         |
| 6                    | 8.6                       | 8.3         | 5.8         |
| 5                    | 7.2                       | 6.7         | 0           |
| 4                    | 6.2                       | 5.2         | 0           |
| 3                    | 4.8                       | 4           | 0           |

<sup>a</sup> The standard DNA load values are dilution series from 10<sup>7</sup> (log 7) to 10<sup>3</sup> (log 3) copies/ml from titrated stocks. Subsequently, the same dilution series are quantified by extrapolating the experimental *C<sub>T</sub>* values into the standard curves.

TABLE 4. Retrospective monitoring of adenovirus DNA in serum samples of SCT recipients pre and posttransplantation

| Group and UPN | Serotype | Viral load (10 log no. of copies/ml) in week <sup>a</sup> : |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|---------------|----------|---|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|               |          | -4  | -3 | -2  | -1  | 0   | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 |
| Group I       |          |   |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 168           | 31       |   |    | 7.2 |     | 6.6 | 6.6 | 7.3 | 6.3 | 4.2 | 2.9 |     | 2.0 |     |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 286           | 2        |   |    |     |     |     |     |     | 6.4 |     | 4.1 | 4.9 |     |     |     | -  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 295           | 2        |   |    |     |     |     |     | 3.2 | 3.1 | 3   |     | 3.9 | 5.7 | 2.1 | 3.2 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 311           | 2        |   |    | 3.9 |     |     |     | 4.2 |     |     |     | 3.7 | 4   |     |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 384           | 5        |   |    | -   | 4.6 |     |     | 4.6 | 3   |     |     |     |     |     | 4.3 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|               |          |   |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Group II      |          |   |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 338           | 5        |   |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 3.8 |     | -   | -  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 361           | 31       |   |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|               |          |   |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Group III     |          |   |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 246           | 1        |   |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 277           | 5        |   |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 316           | 2        |   |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 321           | 5        |   |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 369           | 31       |   |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 376           | 31       |   |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |

<sup>a</sup> The SCT was performed at week 0. Weeks before transplantation are indicated with a - (i.e., -4). Group I was asymptomatic, group II was symptomatic and survived, and group III was fatal cases, where the week of death is noted with a D. - indicates a negative PCR result.

ruses as well. No significant difference in viral loads was obtained when using this probe instead of the molecular beacons, provided that the probe was also used for the standard curve amplification.

**Sensitivity and specificity.** The sensitivity of the assay was determined by using the titrated HAdV 5 and HAdV 35 stocks and the two plasmids containing the 3' end of the hexon genes of these subtypes. Dilution series of these standards were subjected to real-time PCR amplification. The  $C_T$  value was plotted against the dilution to generate a standard line that can be used for the quantification of unknown samples by  $C_T$  value. The sensitivity of the assay was shown to be between 50 and 250 copies/ml, which correlates to 1 to 5 copies in the reaction tube (data not shown).

The amplification was also shown to be specific for adenoviruses. No amplification signal was obtained when nucleic acids from CMV, EBV, human herpesvirus 6, parvovirus, hepatitis B virus, hepatitis C virus, human immunodeficiency virus, and BK virus were used as targets.

**Retrospective analysis of patients.** Pediatric stem cell transplant recipients from a retrospectively analyzed cohort with documented adenovirus infections had been divided into groups I, II, and III based on increasing severity of infection by clinical interpretation (29). DNA was extracted from serum samples and subjected to real-time PCR. Results of the DNA load in the samples from the adenovirus-positive patients are shown in Table 4. In four out of six patients with fatal disseminated infection (group III), a steep increase of the adenovirus DNA load in serum could be observed in the month preceding their death, with a maximum of  $10^{12}$  copies/ml in UPN 321. Of these four patients, two suffered from combined enteritis and hepatitis, one had enteritis and hemorrhagic cystitis, and one had encephalitis. Unfortunately, no serum samples were available from UPN 369 (pneumonia) and UPN 376 (enteritis and hepatitis) from the weeks preceding their deaths.

One patient (UPN 114) from group III, not included in Table 4, had a period of species F (HAdV 41) viremia, which

started 50 weeks posttransplantation and lasted for 3 months. The load never exceeded 1,000 copies/ml, and the patient died in week 66. A plasma sample taken 1 day before his death was negative, and therefore the clinical significance (enteritis only) of the adenovirus viremia with respect to his death remains unclear.

In 2 out of 12 nonfatal cases (group II) and even in 5 out of 17 asymptomatic patients (group I), adenovirus DNA could be occasionally detected in serum as well, sometimes even before transplantation. Usually the load did not exceed  $10^5$  copies/ml, but in the asymptomatic patients UPN 168 and UPN 286, DNA loads of  $10^6$  to  $10^7$  copies/ml were observed.

Apart from one case of HAdV 41 viremia, only adenovirus species A (comprising serotypes 12, 18, and 31) and species C (serotypes 1, 2, 5, and 6) have been detected in this patient group, with the latter being more prevalent (Table 4).

**Prospective study of adenovirus DNA loads.** Using the real-time PCR protocol, 48 pediatric patients receiving transplants from January 2001 until December 2002 were monitored prospectively. The available plasma samples were checked for adenovirus DNA for at least 6 months after transplantation. In less than 0.5% ( $n = 4$ ) of over 800 specimens, inhibition of the PCR was observed, as shown by reduced PhHV internal control amplification.

In 12 of these 48 patients, a positive PCR result was found at least once. Six of these patients developed a disseminated infection, defined as at least two consecutive positive samples, and three of these patients died (Table 5). One patient (UPN 497) died because of multifactorial complications not specifically caused by adenovirus. UPN 484 and UPN 510 had adenovirus-related complications as causes of death. Species C adenoviruses were detected in five of the six patients, and in one of the fatal cases HAdV 18 was the cause (Table 5). Patients with a viral load over  $10^6$  to  $10^7$  copies/ml may be considered at risk for severe complications.

This method provides clear data on the kinetics of the HAdV DNA load in these SCT patients (Fig. 1). The effect of



TABLE 5. Prospective monitoring of adenovirus DNA in plasma samples of SCT patients in the first weeks after transplantation

| UPN | Sero-type | Viral load (10 log no. of DNA copies/ml) at week <sup>a</sup> : |     |     |     |     |     |     |      |      |     |     |                |  |
|-----|-----------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|-----|-----|----------------|--|
|     |           | 0   | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7    | 8    | 9   | 10  | 11             |  |
| 468 | 1         |   | 3.9 | 6.3 | 6.7 | 3.7 |     |     |      |      |     |     |                |  |
| 484 | 18        | 3   | 5.1 | 4.5 | 5.7 | 6.5 | 8.1 | 8.3 | 10.8 | 10.3 | 11  |     | D              |  |
| 485 | 6         |   |     | 5.9 | 7.7 | 7.9 |     | 7.7 | 4.6  |      |     |     |                |  |
| 490 | 5         |   |     |     |     |     |     |     | 5.3  | 5    | 3.9 |     |                |  |
| 497 | 2         |   |     |     |     |     |     |     | 3.5  | 4.2  | 4.3 | 2.9 | D <sup>b</sup> |  |
| 510 | 5         |   |     |     |     | 2.4 | 4.6 | 4.4 | 7    | 7.6  | D   |     |                |  |

<sup>a</sup> SCT took place at week 0. The six patients with disseminated infections are shown. Two patients died from adenovirus complications, and one died from multifactorial causes. -, negative PCR results; D, week of patient's death.

<sup>b</sup> Patient died of multifactorial causes.

therapeutic interventions in patients receiving cidofovir, ribavirin, or donor lymphocyte infusions can be objectively assessed by quantitative viral DNA detection.

DISCUSSION

Adenovirus infections can result in major complications and even death in the immunocompromised host. Enteritis, hemorrhagic cystitis, and hepatitis occur in these patients, and mortality in allogeneic SCT recipients with a disseminated adenovirus infection is high (1, 3, 4, 9, 13, 18, 31). Adenoviruses can be easily detected in throat swabs and stool and urine specimens by isolation in cell culture. In 5 to 20% of allogeneic SCT patients, adenovirus infections have been detected by conventional assays (22, 38). Recently, our group has shown

that detection of HAdV DNA in serum or plasma can specifically identify and differentiate SCT patients with a disseminated infection who carry an increased risk for clinical complications (7, 20, 29).

In the present work, the development of a single-tube, internally controlled multiplex real-time PCR assay for monitoring the adenovirus DNA load in SCT patients is described. The heterogeneity of the adenovirus family substantially complicated the design of a quantitative PCR assay, as the possibilities for selecting general primers and probes are limited. Lion et al. (24) and Gu et al. (12) recently described a real-time PCR procedure using six different primer sets and probes for individual detection of all species. Heim et al. (14) described a broadly reactive adenovirus assay using a multiplex PCR.

Our assay has been designed to detect and quantify the serotypes involved in disseminated adenovirus disease. The HAdV DNA load measurement in the patients from a retrospective study generally confirmed the initial, semiquantitative PCR results (29). In one case, adenovirus type 41, which previously had been implicated in the fatal course of the disease, was found. However, the low viral loads observed in this patient make this conclusion questionable. In retrospect, Lion et al. (24) also detected a species F virus in a fatal case, and thus the role of species F adenoviruses will require further investigation.

The assay with the MGB probe enabled general detection and quantification of HAdV by using the same primers but without differentiation of species. The *C<sub>T</sub>* values with this probe are in general a little lower than when molecular beacons are used, but when the standard curve is also generated

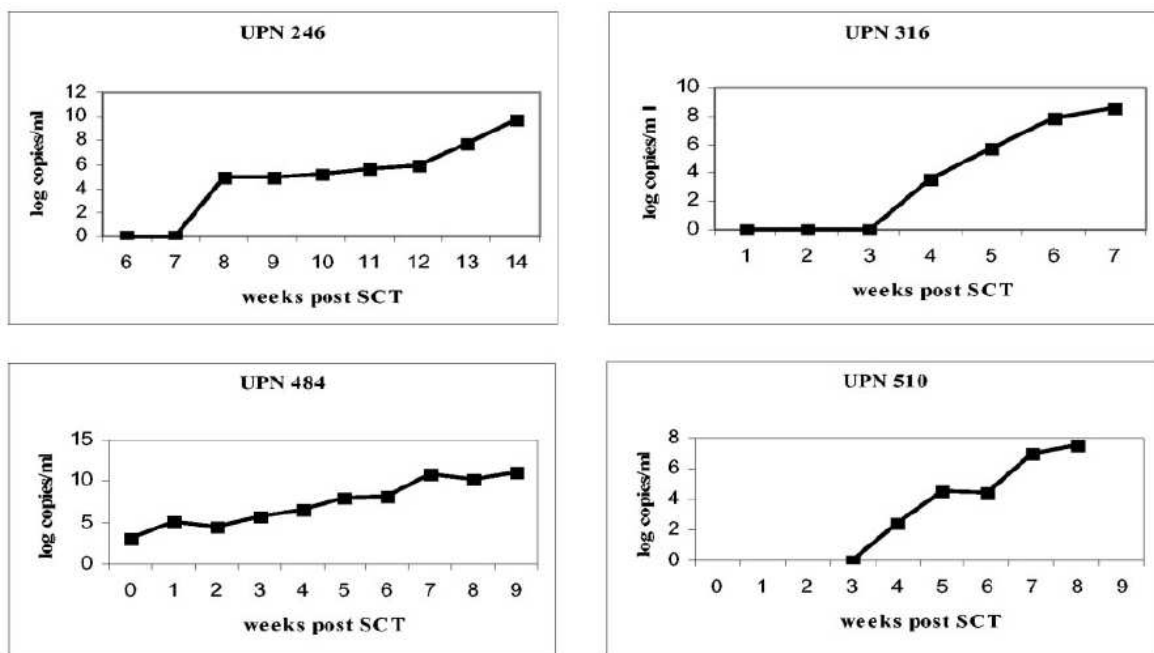


FIG. 1. Course of the adenovirus DNA load in four fatal cases of disseminated adenovirus infection. UPN 246 and 316 were from the retrospective study; UPN 484 and 510 were prospectively monitored. UPN 484 was treated with ribavirin starting in week 3, without a significant effect. The others were not treated.

Downloaded from jcm.asm.org by on May 21, 2007

with the MGB probe, no significant differences in viral loads are obtained (data not shown). Therefore, this procedure can be used in laboratories where no multicolor real-time PCR detection system is available.

An internal control reaction is included in the multiplex PCR assay to monitor appropriate DNA isolation and check for inhibition. Although few samples were inhibitory (less than 0.5%), this control is important for the application of PCR to clinical samples, especially as the effect of drugs in the blood of these patients on the PCR is unknown.

In our and other pediatric patient populations, species C adenoviruses have been most frequently detected after transplantation. Interestingly, species C viruses have also been detected in the majority of tissue samples taken after tonsillectomy or adenoidectomy (10). Whether the increase in infections can be correlated with abandoning the practice of tonsillectomies is not clear yet. Species B adenoviruses, especially subtype 7, 11, 34, and 35 infections, have been described for transplant recipients as well and are the predominant species in solid organ transplant recipients (15, 18).

Clinical application of the assay for pediatric SCT recipients with fatal disseminated adenovirus infections showed adenovirus DNA loads of up to  $10^{12}$  DNA copies/ml of plasma. In the nonfatal cases, the DNA load never exceeded  $10^7$  copies/ml except in a single case (UPN 485). These data suggest that patients with HAdV DNA loads of over  $10^6$  to  $10^7$  copies/ml in plasma or serum may be considered at risk for severe complications. Further studies applying preemptive treatment based on DNA loads should lead to a well-defined threshold for the start of therapeutic interventions. The potential role of the preemptive treatment strategy in these cases is one of the main issues in a multicenter study that has been recently initiated.

An important point of concern in defining thresholds for the initiation of treatment is the standardization of the HAdV DNA load results. The exact number of complete DNA copies in the HPLC-titrated standards used is unclear. Without standardized adenovirus stocks, the thresholds for preemptive therapy have to be defined locally. For general recommendations to identify patients at risk, true standardization by international reference materials has to become available, as recently has been established for nucleic acid testing of several viral targets in blood products (27, 28).

Ribavirin and cidofovir have been reported to be effective against adenovirus infections. However, in cases in which improvement of patients after treatment has been reported, no data on the viral load were available. Moreover, without any intervention, adenovirus viremia can be controlled as a result of immunological recovery of the patient. With quantitative HAdV DNA PCR, tools have become available to enable timely preemptive treatment initiation. Recently, our group has shown that ribavirin did not have convincing antiviral effects in SCT patients (21), and currently the efficacy of cidofovir is being evaluated in the aforementioned multicenter study.

The quantification of adenovirus DNA as described here will be used for the early detection of disseminated infections and as an objective instrument to evaluate therapeutic interventions. This approach should eventually lead to the definition of optimal treatment protocols for this serious complication of immunocompromised children.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grant QLK2-CT-2002-01432 of the European Commission.

We thank Sitha Scheltinga and Joyphi Thijssen for excellent technical assistance.

REFERENCES

1. Blanke, C., C. Clark, R. Bronn, G. Tricot, I. Cunningham, K. Cornetta, A. Hedderman, and R. Hromas. 1995. Evolving pathogens in allogeneic bone marrow transplantation: increased fatal adenoviral infections. *Am. J. Med.* 99:326-328.
2. Boom, R., C. Sol, J. Weel, Y. Gerrits, M. De Boer, and P. Wertheim-van Dillen. 1999. A highly sensitive assay for detection and quantitation of human cytomegalovirus DNA in serum and plasma by PCR and electrochemiluminescence. *J. Clin. Microbiol.* 37:1489-1497.
3. Carrigan, D. R. 1997. Adenovirus infections in immunocompromised patients. *Am. J. Med.* 102:71-77.
4. Childs, R., C. Sanchez, H. Engler, J. Preuss, S. Rosenfeld, C. Dunbar, F. Van Rhee, M. Plante, S. Phang, and A. J. Barrett. 1998. High incidence of adenovirus and polyomavirus-induced hemorrhagic cystitis in bone marrow allotransplantation for hematological malignancy following T cell depletion and cyclosporine. *Bone Marrow Transplant.* 22:889-893.
5. Echavarría, M., M. Forman, J. Ticehurst, J. S. Dumler, and P. Charache. 1998. PCR method for detection of adenovirus in urine of healthy and human immunodeficiency virus-infected individuals. *J. Clin. Microbiol.* 36:3323-3326.
6. Echavarría, M., S. C. Ray, R. Ambinder, J. S. Dumler, and P. Charache. 1999. PCR detection of adenovirus in a bone marrow transplant recipient: hemorrhagic cystitis as a presenting manifestation of disseminated disease. *J. Clin. Microbiol.* 37:686-689.
7. Echavarría, M., M. Forman, M. J. D. Van Tol, J. M. Vossen, P. Charache, and A. C. M. Kroes. 2001. Prediction of severe disseminated adenovirus infection by serum PCR. *Lancet* 358:384-385.
8. Emery, V. C., C. A. Sabin, A. V. Cope, D. Hor, A. F. Hassan-Walker, and P. D. Griffiths. 2000. Application of viral-load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation. *Lancet* 355:2032-2036.
9. Flomenberg, P., J. Babbitt, W. R. Drobyski, R. C. Cash, D. R. Carrigan, G. V. Sedmak, T. McAuliffe, B. Camitta, M. M. Horowitz, N. Bunin, and J. T. Casper. 1994. Increasing incidence of adenovirus disease in bone marrow transplant recipients. *J. Infect. Dis.* 169:775-781.
10. Garnett, C., D. Erdman, W. Xu, and L. Gooding. 2002. Prevalence and quantification of species C adenovirus DNA in human mucosal lymphocytes. *J. Virol.* 76:10608-10616.
11. Griffiths, P. D. 1995. Viral complications after transplantation. *J. Antimicrob. Chemother.* 36(Suppl. B):91-106.
12. Gu, Z., C. S. Gibson, M. J. Bankowski, and R. T. Hayden. 2003. Multiplexed, real-time PCR for quantitative detection of human adenoviruses. *J. Clin. Microbiol.* 41:4636-4641.
13. Hale, G. A., H. E. Heslop, R. A. Krance, D. A. Brenner, D. Jayawardene, D. K. Srivastava, and C. C. Patrick. 1999. Adenovirus infection after pediatric bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 23:277-282.
14. Heim, A., C. Ebnet, G. Harste, and P. Pring-Åkerblom. 2003. Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. *J. Med. Virol.* 70:228-239.
15. Hierholzer, J. C. 1992. Adenoviruses in the immunocompromised host. *Clin. Microbiol. Rev.* 5:262-274.
16. Houg, H. H., S. Liang, C. M. Chen, J. Keith, M. Echavarría, J. L. Sanchez, S. A. Kolavic, D. W. Vaughn, and L. N. Binn. 2002. Rapid type-specific diagnosis of adenovirus type 4 infection using a hexon-based quantitative fluorogenic PCR. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 42:227-236.
17. Howard, D. S., G. L. Phillips II, D. E. Reec, R. K. Munn, J. Henslee-Downey, M. Pittard, M. Barker, and C. Pomeroy. 1999. Adenovirus infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin. Infect. Dis.* 29:1494-1501.
18. Kojaoghlanian, T., P. Flomenberg, and M. S. Horwitz. 2003. The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host. *Rev. Med. Virol.* 13:155-171.
19. Kutuyavin, I. V., I. A. Afonina, A. Mills, V. V. Gorn, E. A. Lukhtanov, E. S. Belousov, M. J. Singer, D. K. Walburger, S. G. Lokhov, A. A. Gall, R. Dempcy, M. W. Reed, R. B. Meyer, and J. Hedgpeth. 2000. 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res.* 28:655-661.
20. Lankester, A. C., M. J. D. Van Tol, E. C. J. Claas, J. M. Vossen, and A. C. M. Kroes. 2002. Quantification of adenovirus DNA in plasma: a role in management of stem cell graft recipients. *Clin. Infect. Dis.* 34:864-867.
21. Lankester, A. C., B. Heemskerk, E. C. J. Claas, M. W. Schilham, M. F. C. Beersma, R. G. M. Bredius, M. J. D. van Tol, and A. C. M. Kroes. 2004. Effect of ribavirin on the plasma viral DNA load in patients with disseminating adenovirus infection. *Clin. Infect. Dis.* 38:1521-1525.
22. La Rosa, A. M., R. E. Champlin, N. Mirza, J. Gajewski, S. Giral, K. V.

Downloaded from jcm.asm.org by on May 21, 2007

- Rolston, I. Raad, K. Jacobson, D. Kontoyiannis, L. Elting, and E. Whimbey. 2001. Adenovirus infections in adult recipients of blood and marrow transplants. *Clin. Infect. Dis.* 32:871–876.
23. Lerneux-Ville, M., V. Minard, F. Lacaillle, A. Buzyn, E. Abachin, S. Blanche, F. Freymuth, and C. Rouzioux. 2004. Real-time blood plasma PCR for management of disseminated adenovirus infection. *Clin. Infect. Dis.* 38:45–52.
  24. Lion, T., R. Baumgartinger, F. Watzinger, S. Matthes-Martin, M. Suda, S. Preuner, B. Futterknecht, A. Lawitschka, C. Peters, U. Potschger, and H. Gadner. 2003. Molecular monitoring of adenovirus in peripheral blood after allogeneic bone marrow transplantation permits early diagnosis of disseminated disease. *Blood* 102:1114–1120.
  25. Mori, T., S. Okamoto, S. Matsunaka, T. Yajima, M. Wakui, R. Watanabe, A. Ishida, Y. Iwao, M. Mukai, T. Hibi, and Y. Ikeda. 2000. Risk-adapted preemptive therapy for cytomegalovirus disease in patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 25:765–769.
  26. Niesters, H. G. M., J. Van Esser, E. Fries, K. C. Wolthers, J. J. Cornelissen, and A. D. M. E. Osterhaus. 2000. Development of a real-time quantitative assay for detection of Epstein-Barr virus. *J. Clin. Microbiol.* 38:712–715.
  27. Saldanha, J., N. Lelie, A. Heath, and the WHO Collaborative Study Group. 1999. Establishment of the first international standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assays for HCV RNA. *Vox Sang.* 76:149–158.
  28. Saldanha, J., W. Gerlich, N. Lelie, P. Dawson, K. Heermann, A. Heath, and the WHO Collaborative Study Group. 2001. An international collaborative study to establish a World Health Organization international standard for hepatitis B virus DNA nucleic acid amplification techniques. *Vox Sang.* 80:63–71.
  29. Schilham, M. W., E. C. Claas, W. Van Zaane, B. Heemskerk, J. M. Vossen, A. C. Lankester, R. E. Toes, M. Echavarría, A. C. Kroes, and M. J. D. Van Tol. 2002. High levels of adenovirus DNA in serum correlate with fatal outcome of adenovirus infection in children after allogeneic stem-cell transplantation. *Clin. Infect. Dis.* 35:526–532.
  30. Shabram, P. W., D. D. Giroux, A. M. Goudreau, R. J. Gregory, M. T. Horn, B. G. Huyghe, X. Liu, B. J. Sugarman, and S. Sutjipto. 1997. Analytical anion exchange HPLC of recombinant type-5 adenoviral particles. *Hum. Gene Ther.* 8:453–465.
  31. Shields, A. F., R. C. Hackman, K. H. Fife, L. Corey, and M. D. Meyers. 1985. Adenovirus infections in patients undergoing bone-marrow transplantation. *N. Engl. J. Med.* 312:529–533.
  32. Sia, I. G., J. A. Wilson, M. J. Espy, C. V. Paya, and T. F. Smith. 2000. Evaluation of the Cobas Amplicor CMV Monitor test for detection of viral DNA in specimens taken from patients after liver transplantation. *J. Clin. Microbiol.* 38:600–606.
  33. Templeton, K. E., S. A. Scheltinga, P. Sillekens, J. W. Crielaard, A. P. van Dam, H. Goossens, and E. C. J. Claas. 2003. Development and clinical evaluation of an internally controlled, single-tube multiplex real-time PCR assay for detection of *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species. *J. Clin. Microbiol.* 41:4016–4021.
  34. Teramura, T., M. Naya, T. Yoshihara, A. Morimoto, and S. Imashuku. 2002. Quantitative detection of serum adenovirus in a transplant recipient. *Lancet* 359:1945.
  35. Tyagi, S., D. P. Bratu, and F. R. Kramer. 1998. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nat. Biotechnol.* 16:49–53.
  36. Van Esser, J. W., H. G. Niesters, S. F. Thijsen, E. Meijer, A. D. Osterhaus, K. C. Wolthers, C. A. Boucher, J. W. Gratama, L. M. Budel, B. Van der Holt, A. M. Van Loon, B. Lowenberg, L. F. Verdonck, and J. J. Cornelissen. 2001. Molecular quantification of viral load in plasma allows for fast and accurate prediction of response to therapy of Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disease after allogeneic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* 113:814–821.
  37. Vet, J. A., A. R. Majithia, S. A. Marras, S. Tyagi, S. Dube, B. J. Poiesz, and F. R. Kramer. 1999. Multiplex detection of four pathogenic retroviruses using molecular beacons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:6394–6399.
  38. Walls, T., A. G. Shankar, and D. Shingadia. 2003. Adenovirus: an increasingly important pathogen in paediatric bone marrow transplant patients. *Lancet Infect. Dis.* 3:79–86.

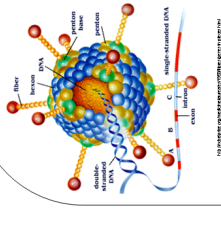
# Outbreak of adenovirus in paediatric transplant unit coincided with increased incidence in general population.

P. Hubacek<sup>1</sup>, P. Sedláček<sup>1</sup>, L. Homolová<sup>2</sup>, D. Brynchová<sup>3</sup>, K. Hryncivová<sup>4</sup>, M. Zajáč<sup>5</sup>, K. Nagayová<sup>1</sup>, P. Kestlová<sup>1</sup>, R. Fomanková<sup>1</sup>, J. Stary<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Paediatric Haematology and Oncology, <sup>2</sup> Department of Pathology, <sup>3</sup> Department of Paediatrics, <sup>4</sup> Department of Medical Microbiology, <sup>5</sup> 2nd Medical School of Charles University and Masaryk Memorial Cancer Institute, Prague, The Czech Republic

## Introduction:

Adenovirus (AdV) infections can cause life-threatening complications after allogeneic HSCT. Structures are more than 50 different serotypes, the viruses are subsequently large number of different serotypes also suggest the wide range of diseases from mild conjunctivitis and pharyngitis in immunocompetent patient to life-threatening pneumonitis and hepatitis in immunocompromised host.



| Sample No. | Age | Sex | Transplant type | AdV serotype | AdV detection |
|------------|-----|-----|-----------------|--------------|---------------|
| 1          | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 2          | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 3          | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 4          | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 5          | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 6          | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 7          | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 8          | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 9          | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 10         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 11         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 12         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 13         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 14         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 15         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 16         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 17         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 18         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 19         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 20         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 21         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 22         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 23         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 24         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 25         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 26         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 27         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 28         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 29         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 30         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 31         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 32         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 33         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 34         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 35         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 36         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 37         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 38         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 39         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 40         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 41         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 42         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 43         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 44         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 45         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 46         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 47         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 48         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 49         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |
| 50         | 11  | M   | HSCT            | AdV-1        | +             |

## Methods:

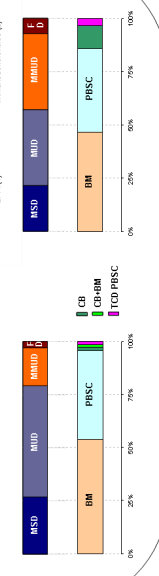
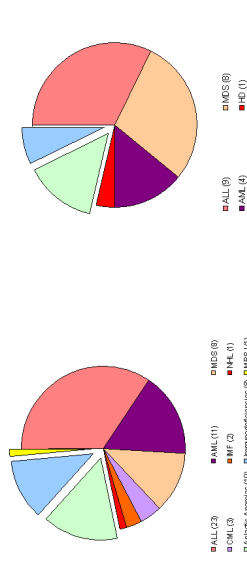
The samples of whole blood were collected weekly during the first three months after allogeneic HSCT and later less frequently during the outpatient controls up to 6 months after HSCT. Stool samples were collected when AdV in peripheral blood was detected. DNA was isolated using Qiamp Blood Mini kit and stool was isolated by MoBio UltraClean Spin kit according to the manufacturer instructions in both cases. Large number of different serotypes also suggest the wide range of diseases from mild conjunctivitis and pharyngitis in immunocompetent patient to life-threatening pneumonitis and hepatitis in immunocompromised host.

## Patients:

From the January 2003 to September 2005 45 boys and 22 girls (mean age 8.4 yrs at HSCT, range 0.2 - 16.9 yrs.) undergoing the allogeneic HSCT were tested. We have obtained 1536 samples of whole blood and 7 obtained from BAL, stool and urine during the 2003-2005 period. In total 1536 samples of whole blood and 7 samples of stool and 7 samples of urine during the 2003-2005 period. In total 1536 samples of whole blood and 7 samples of stool and 7 samples of urine during the 2003-2005 period.

## Patients transplanted in 2005

Adenovirus study 2003 and 2005



## Conclusions:

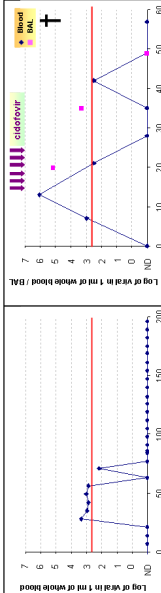
There were no difference in type of the patients, transplant setting or post-transplant management during the described years. Therefore we can assume that higher incidence of AdV infection in our unit is due to increase of AdV infections in general population. Restriction of hygiene-epidemiological regime showed to be efficient way for prevention of further viral spreading in the BMT unit because we have not detected AdV infection in another patients. Cidofovir may be effective to control the adenovirus at least in some patients.

## Results obtained in Mono BMT Unit during the years 2003-2005:

The adenovirus DNA was detected in 12 blood samples (0.8%) from 4 (6.0%) patients. We have detected adenovirus in BAL of one patient too. There were only single sample positivity in two patients. Two patients with prolonged detection of adenovirus are presented lower. Viral quantity in all positive samples is presented in graph. We have observed lower viral quantity in all positive samples in 2005. The viral quantity in all positive samples in 2003 and 2004 was higher. Patients with disease were defined according to the viral load (log 2.7 (red line on the graphs)) or with cultivation positivity from 2 different sites.

Completion of adenovirus positive patients in center participating in European Adenovirus study group

| Center                              | Enrolled patients | Positive patients | Patients with adenovirus | Patients with adenovirus in BAL |
|-------------------------------------|-------------------|-------------------|--------------------------|---------------------------------|
| Charles University Hospital, Prague | 60                | 17                | 18                       | 22                              |
| University Hospital, Olomouc        | 114               | 0                 | 33                       | 33                              |
| University Hospital, Brno           | 106               | 6                 | 6                        | 11                              |
| University Hospital, Hradec Králové | 77                | 2                 | 0                        | 2                               |
| University Hospital, Jihlava        | 18                | 1                 | 2                        | 3                               |
| University Hospital, Plzeň          | 41                | 6                 | 3                        | 15                              |
| University Hospital, Třebíč         | 40                | 39                | 40                       | 37                              |
| <b>Total</b>                        | <b>652</b>        | <b>39</b>         | <b>60</b>                | <b>121</b>                      |



**Patient 1**  
Girl transplanted at 3 yrs of age for MDS. As first cord blood sample was used (HLA match 5/6 from unrelated donor). Conditioning regimen consisted of cyclophosphamide, busulfan, and ATG. She was transplanted with marrow from matched cord blood graft (CB). She was treated with steroids. During post-transplant period, we detected adenovirus in BAL. She died of sepsis. She was treated with cidofovir. She died on D-28. Viral load was maintained, but we have not used the arterial line. Adenovirus was determined by sequencing as a member of C subgroup, most probably serotype 2 or 3.

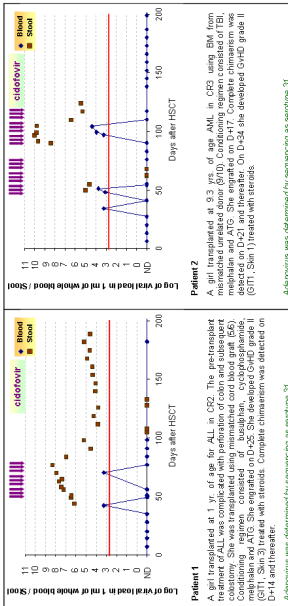
**Patient 2**  
Boy transplanted at 16.5 yrs of age in partial remission of ALL. He was transplanted with PBSC from matched unrelated donor. Conditioning regimen consisted of cyclophosphamide, busulfan, and ATG. She was transplanted with marrow from matched cord blood graft (CB). She was treated with steroids. During post-transplant period, we detected adenovirus in BAL. She died of sepsis. She was treated with cidofovir. She died on D-28. Viral load was maintained, but we have not used the arterial line. Adenovirus was determined by sequencing as a member of C subgroup, most probably serotype 2 or 3.

## Results in year 2006:

The adenovirus DNA was detected in 35 blood samples (13.1%) from 6 (21.4%) patients. In most cases, we have detected adenovirus for the first time during one week in July. We have detected adenovirus in BAL of one patient too. In two patients, there were only single sample positivity. In the rest of the patient we have detected AdV repeatedly. Two patients were tested only once after HSCT (before GVHD in one and disseminated AdV infection in combination with intercalary leptomeningeal in one).

In three patients with higher viral load we have started cidofovir administration (1 mg/kg/dose three times a week), while one had cidofovir prophylaxis after HSCT. Moreover, due to detected adenovirus DNA in environmental swabs and well known spreading of adenovirus by touch, we have even more considered a hygiene-epidemiological regime in BMT Unit. Rooms for every patient with detectable adenovirus were considered as "contaminated" and strict using of non-sterile examination gloves was ordered. We have not detected any AdV in other patient afterwards.

Since we have proved AdV 31 in all but one patient (AdV2), we can assume the same source in the patients with AdV 31.



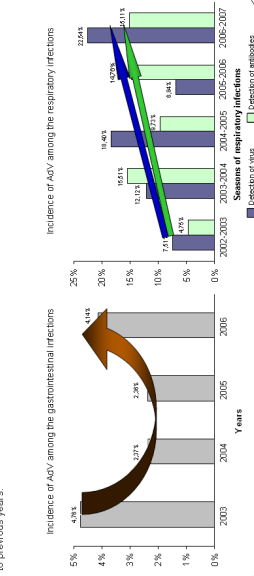
**Patient 1**  
Girl transplanted at 15.5 yrs of age in ALL. She was transplanted with BM graft from matched unrelated donor (MUD). Conditioning regimen consisted of cyclophosphamide, busulfan, and ATG. She was transplanted with marrow from matched cord blood graft (CB). She was treated with steroids. During post-transplant period, we detected adenovirus in BAL. She died of sepsis. She was treated with cidofovir. She died on D-28. Viral load was maintained, but we have not used the arterial line. Adenovirus was determined by sequencing as serotype 2.

**Patient 2**  
Girl transplanted at 16.5 yrs of age in ALL. She was transplanted with BM graft from matched unrelated donor (MUD). Conditioning regimen consisted of cyclophosphamide, busulfan, and ATG. She was transplanted with marrow from matched cord blood graft (CB). She was treated with steroids. During post-transplant period, we detected adenovirus in BAL. She died of sepsis. She was treated with cidofovir. She died on D-28. Viral load was maintained, but we have not used the arterial line. Adenovirus was determined by sequencing as serotype 2.

**Patient 3**  
Girl transplanted at 15.5 yrs of age in ALL. She was transplanted with BM graft from matched unrelated donor (MUD). Conditioning regimen consisted of cyclophosphamide, busulfan, and ATG. She was transplanted with marrow from matched cord blood graft (CB). She was treated with steroids. During post-transplant period, we detected adenovirus in BAL. She died of sepsis. She was treated with cidofovir. She died on D-28. Viral load was maintained, but we have not used the arterial line. Adenovirus was determined by sequencing as serotype 2.

## Incidence of adenovirus detected in respiratory and gastrointestinal infections in general population of the Czech Republic

These presented data were collected in the Institute of Public Health. During the years 2003-2004 over 35 000 of gastrointestinal infections (total 2003 - 5966, 2004 - 6962, 2005 - 8 840, 2006 - 10 000) and over 100 000 of respiratory infections (total 2003 - 10 000, 2004 - 10 000, 2005 - 10 000, 2006 - 10 000) were there are data only from 28 weeks). The direct detection was performed by antigen detection, or culture assays. Serological positivity was defined as 2 times increase in antibody titer observed in two consecutive samples. On both graphs is shown the increase of adenovirus infections during last three years and increase in 2006 in comparison to previous years.



## Conclusions:

There were no difference in type of the patients, transplant setting or post-transplant management during the described years. Therefore we can assume that higher incidence of AdV infection in our unit is due to increase of AdV infections in general population. Restriction of hygiene-epidemiological regime showed to be efficient way for prevention of further viral spreading in the BMT unit because we have not detected AdV infection in another patients. Cidofovir may be effective to control the adenovirus at least in some patients.

## References:

- Wells, Shankar, Shrivastava Adenovirus: an increasingly important pathogen in paediatric bone marrow transplant patients. Lancet Infect Dis 2003; 3:78-86
- Chass et al. Internally controlled real-time PCR monitoring of adenovirus DNA load in serum or plasma of transplant recipients. J Clin Microbiol 43, 4, 739-44, 2005
- Morin et al. Cytomegalovirus and Adenovirus infections and diseases among 76 paediatric ureteral allogeneic bone marrow transplant recipients. J Med Virol 72:257-262, 2004

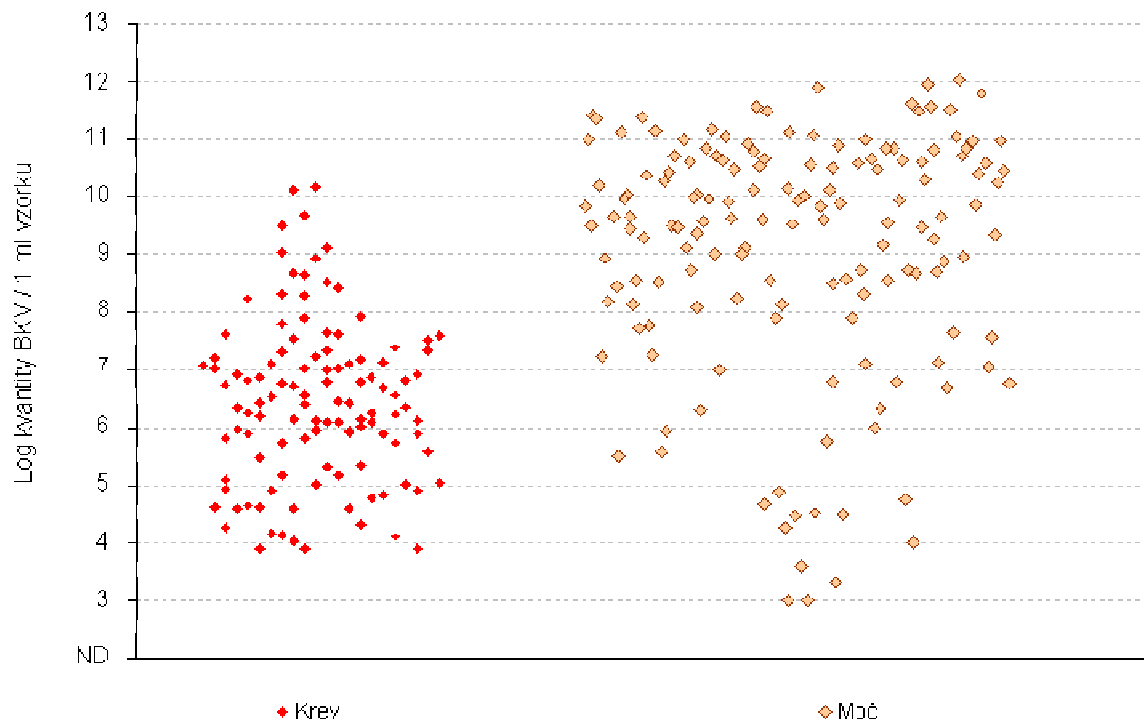
Work is supported by Grant of Ministry of Education of the Czech Republic No. 002/0608/9 and Grant of the European Union No. QLRT-2007-042320

## 12. Polyomaviry - BKV

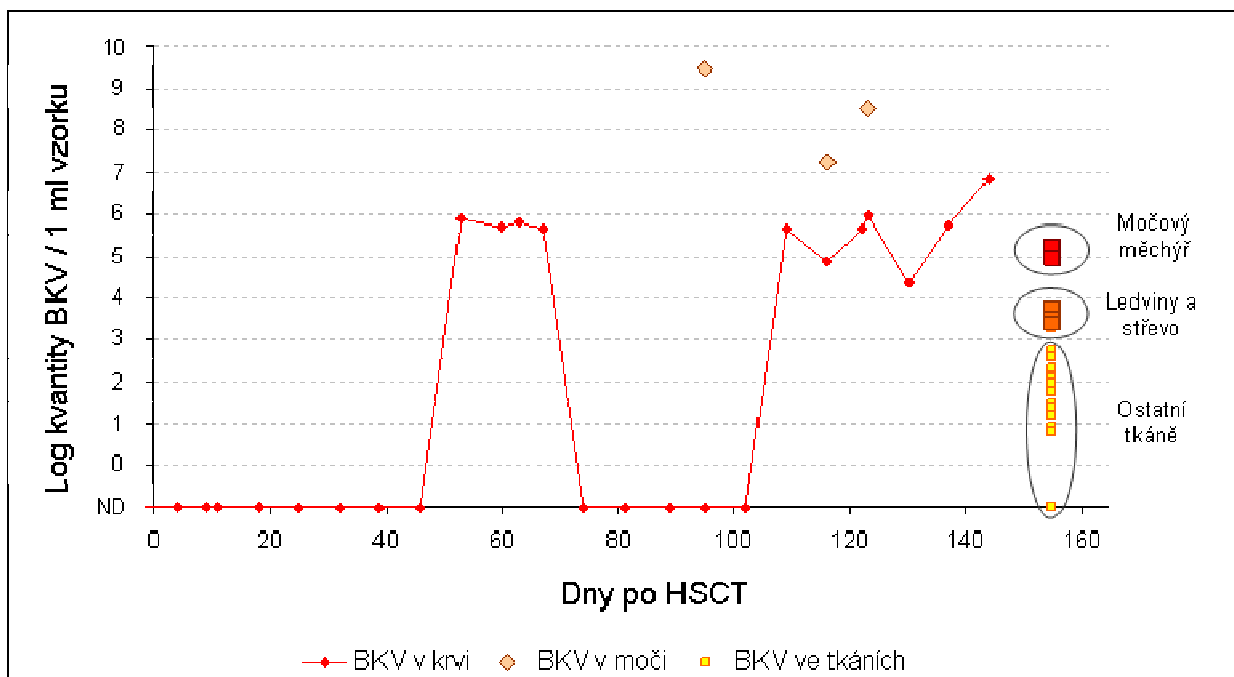
Detekce BKV byla prováděna především u pacientů s makroskopickou hemorrhagickou cystitidou, tedy cystitidou podle klasifikace Světové zdravotnické organizace (WHO) grade 2 a 3. BKV DNA jsme detekovali ve vzorcích krve a ve vzorcích moči, byly-li dostupné. Moč jsme testovali po izolaci DNA kitem firmy MoBio určeným pro izolaci DNA z moči a stolice. Výsledky jsme i v tomto případě vyjadřovali na 1 ml biologického vzorku.

Celkem jsme na přítomnost BKV testovali u 741 vzorků (168 vzorků moči, 454 vzorků plné periferní krve) od 31 dětských a 41 dospělých pacientů v převážné většině s hemorrhagickou cystitidou. BKV jsme detekovali v 152 vzorcích moči s mediánem pozitivivity  $4,28 \times 10^9$  / ml (rozmezí 1000 –  $1,02 \times 10^{12}$  / ml) od 49 pacientů a v 115 vzorcích periferní krve s mediánem pozitivivity  $2,31 \times 10^6$  / ml (rozmezí 8000 -  $1,02 \times 10^{10}$  / ml) od 15 pacientů. Mimo to jsme u dvou pacientů získali a testovali také vzorky tkáně močového měchýře získané při patologicko-anatomickém vyšetření po smrti pacienta. Kvantity detekované v pozitivních vzorcích jsou prezentované na obrázku č. 22, porovnání kvanty v moči, krvi a tkáních u jednoho z pacientů je pak na obrázku č. 23. Nálož ve tkáních jsou normalizované na 10 000 g.e. protože poměr v tomto případě může proliferační aktivitu viru lépe zachytit. Na obou obrázcích je vidět opět o jeden až dva řády vyšší nálož v moči oproti kvantitě v krvi, na obrázku 19, je pak vidět jasný rozdíl ve kvantitě poškozeného močového měchýře, ve tkáních ledvin a střeva, kde je BKV detekován a pak ve zbytku organismu.

Obrázek 22.



Obrázek 23.





### **13. Závěr**

Infekce DNA viry tvoří u pacientů po HSCT nezanedbatelnou skupinu komplikací. I u našich pacientů jsou pak získaná data v souladu s obecným pohledem na nebezpečnost virových infekcí v pořadí CMV, EBV, dále adenovirus a pak zbylé viry. Vývoj nových virostatik, imunosupresiv, či buněčné terapie, stejně jako kvantitativní virová detekce pak na toto pole přináší řadu dalších otázek ať již ve vztahu k vlastnímu průběhu virových infekcí, třeba ve formě a průběhu CMV orgánových poškození při cílené virostatické terapii, či ve smyslu detekce jednotlivých virů v dalších biologických vzorcích a jejich dopadu na úpravu terapie (např. vzorky bronchoalveolární laváže, či stolice).

Námi dosud získané výsledky umožnily standardizovat monitoraci těchto infekcí a jejich úspěšnou léčbu u mnoha pacientů.

**Reference:**

1. Becker AJ, Mc CE, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*. 1963;197:452-454.
2. Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. The Distribution of Colony-Forming Cells among Spleen Colonies. *J Cell Physiol*. 1963;62:327-336.
3. Till JE, Mc CE. Early repair processes in marrow cells irradiated and proliferating in vivo. *Radiat Res*. 1963;18:96-105.
4. Andrews RG, Bryant EM, Bartelmez SH, et al. CD34+ marrow cells, devoid of T and B lymphocytes, reconstitute stable lymphopoiesis and myelopoiesis in lethally irradiated allogeneic baboons. *Blood*. 1992;80:1693-1701.
5. Berenson RJ, Bensinger WI, Hill RS, et al. Engraftment after infusion of CD34+ marrow cells in patients with breast cancer or neuroblastoma. *Blood*. 1991;77:1717-1722.
6. Berenson RJ, Andrews RG, Bensinger WI, et al. Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiated baboons. *J Clin Invest*. 1988;81:951-955.
7. Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD, Hong R, Good RA. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet*. 1968;2:1366-1369.
8. Barr RD, Whang-Peng J, Perry S. Hemopoietic stem cells in human peripheral blood. *Science*. 1975;190:284-285.
9. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med*. 1989;321:1174-1178.
10. Fliedner TM, Calvo W, Korbling M, Nothdurft W, Pflieger H, Ross W. Collection, storage and transfusion of blood stem cells for the treatment of hemopoietic failure. *Blood Cells*. 1979;5:313-328.

11. Goldman JM. Autografting cryopreserved buffy coat cells for chronic granulocytic leukaemia in transformation. *Exp Hematol.* 1979;7 Suppl 5:389-397.
12. Haas R, Hohaus S, Goldschmidt H, Witt B, Hunstein W. Hematopoietic growth factors for the mobilization of peripheral blood stem cells. *J Hematother.* 1993;2:357-359.
13. Bender JG, To LB, Williams S, Schwartzberg LS. Defining a therapeutic dose of peripheral blood stem cells. *J Hematother.* 1992;1:329-341.
14. Banna GL, Simonelli M, Santoro A. High-dose chemotherapy followed by autologous hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of solid tumors in adults: a critical review. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2007;2:65-82.
15. Tan SS, Uyl-de Groot CA, Huijgens PC, Fibbe WE. Stem cell transplantation in Europe: trends and prospects. *Eur J Cancer.* 2007;43:2359-2365.
16. Fish JD, Grupp SA. Stem cell transplantation for neuroblastoma. *Bone Marrow Transplant.* 2008;41:159-165.
17. Dallorso S, Manzitti C, Morreale G, Faraci M. High dose therapy and autologous hematopoietic stem cell transplantation in poor risk solid tumors of childhood. *Haematologica.* 2000;85:66-70.
18. Chan LL, Lin HP, Ariffin WA, Ariffin H, Saw MH. Treating high risk childhood solid tumours with autologous peripheral blood stem cell transplantation--early experience in University Hospital, Kuala Lumpur. *Med J Malaysia.* 1999;54:175-179.
19. Bradley MB, Cairo MS. Stem cell transplantation for pediatric lymphoma: past, present and future. *Bone Marrow Transplant.* 2008;41:149-158.
20. Hamadani M, Awan FT, Copelan EA. Hematopoietic stem cell transplantation in adults with acute myeloid leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008;14:556-567.

21. Terwey TH, Massenkeil G, Tamm I, et al. Allogeneic SCT in refractory or relapsed adult ALL is effective without prior reinduction chemotherapy. *Bone Marrow Transplant.* 2008.
22. Bierings M, Nachman JB, Zwaan CM. Stem cell transplantation in pediatric leukemia and myelodysplasia: state of the art and current challenges. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2007;2:53-63.
23. McCann S, Passweg J, Bacigalupo A, et al. The influence of cyclosporin alone, or cyclosporin and methotrexate, on the incidence of mixed haematopoietic chimaerism following allogeneic sibling bone marrow transplantation for severe aplastic anaemia. *Bone Marrow Transplant.* 2007;39:109-114.
24. Prasad VK, Kurtzberg J. Emerging trends in transplantation of inherited metabolic diseases. *Bone Marrow Transplant.* 2008;41:99-108.
25. Dvorak CC, Cowan MJ. Hematopoietic stem cell transplantation for primary immunodeficiency disease. *Bone Marrow Transplant.* 2008;41:119-126.
26. Fischer A, Le Deist F, Hacein-Bey-Abina S, et al. Severe combined immunodeficiency. A model disease for molecular immunology and therapy. *Immunol Rev.* 2005;203:98-109.
27. Jacobsohn DA, Duerst R, Tse W, Kletzel M. Reduced intensity haemopoietic stem-cell transplantation for treatment of non-malignant diseases in children. *Lancet.* 2004;364:156-162.
28. Afzali B, Lechler RI, Hernandez-Fuentes MP. Allorecognition and the alloresponse: clinical implications. *Tissue Antigens.* 2007;69:545-556.
29. Smyth LA, Afzali B, Tsang J, Lombardi G, Lechler RI. Intercellular transfer of MHC and immunological molecules: molecular mechanisms and biological significance. *Am J Transplant.* 2007;7:1442-1449.

30. Nagatoshi Y, Kawano Y, Watanabe T, et al. Hematopoietic and immune recovery after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation and bone marrow transplantation in a pediatric population. *Pediatr Transplant*. 2002;6:319-326.
31. Gress RE, Komanduri KV, Einsele H, Cooper LJ. Lymphoid reconstruction and vaccines. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007;13:17-22.
32. Bjorklund A, Aschan J, Labopin M, et al. Risk factors for fatal infectious complications developing late after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2007;40:1055-1062.
33. Ball LM, Egeler RM. Acute GvHD: pathogenesis and classification. *Bone Marrow Transplant*. 2008;41 Suppl 2:S58-64.
34. da Fonseca MA, Hong C. An overview of chronic oral graft-vs-host disease following pediatric hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Dent*. 2008;30:98-104.
35. Levine JE, Barrett AJ, Zhang MJ, et al. Donor leukocyte infusions to treat hematologic malignancy relapse following allo-SCT in a pediatric population. *Bone Marrow Transplant*. 2008;42:201-205.
36. Schmid C, Labopin M, Nagler A, et al. Donor lymphocyte infusion in the treatment of first hematological relapse after allogeneic stem-cell transplantation in adults with acute myeloid leukemia: a retrospective risk factors analysis and comparison with other strategies by the EBMT Acute Leukemia Working Party. *J Clin Oncol*. 2007;25:4938-4945.
37. Cooley S, Trachtenberg E, Bergemann TL, et al. Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2008.

38. Sramkova L, Muzikova K, Fronkova E, et al. Detectable minimal residual disease before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation predicts extremely poor prognosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2007;48:93-100.
39. Tomblyn M, Lazarus HM. Donor lymphocyte infusions: the long and winding road: how should it be traveled? *Bone Marrow Transplant*. 2008.
40. Messina C, Faraci M, de Fazio V, Dini G, Calo MP, Calore E. Prevention and treatment of acute GvHD. *Bone Marrow Transplant*. 2008;41 Suppl 2:S65-70.
41. Soiffer R. Immune modulation and chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*. 2008;42 Suppl 1:S66-S69.
42. Kim SS. Treatment options in steroid-refractory acute graft-versus-host disease following hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Pharmacother*. 2007;41:1436-1444.
43. Apperley J, Carreras E, Gluckman E, Gratwohl A, Masszi T. Chapter 11 - Graft versus host disease. *The EBMT Handbook - Haematopetic Stem cell Transplantation (ed 5th)*. Genoa, Italy: Forum service editore; 2008:224.
44. Filipovich AH, 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.
45. Filipovich AH. Diagnosis and manifestations of chronic graft-versus-host disease. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2008;21:251-257.
46. Young JA. Infectious complications of acute and chronic GVHD. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2008;21:343-356.
47. Holler E. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: GvHD prevention and treatment. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007;20:281-294.



48. Mohty M, Marchetti N, El-Cheikh J, Faucher C, Furst S, Blaise D. Rituximab as salvage therapy for refractory chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 2008;41:909-911.
49. Castagnola E, Faraci M, Moroni C, et al. Invasive mycoses in children receiving hemopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2008;41 Suppl 2:S107-111.
50. Castagnola E, Faraci M, Moroni C, et al. Bacteremias in children receiving hemopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2008;41 Suppl 2:S104-106.
51. Castagnola E, Faraci M, Moroni C, et al. Rare viral infections in children receiving hemopoietic stem cell transplant. *Bone Marrow Transplant.* 2008;41 Suppl 2:S100-103.
52. Robin M, Porcher R, De Castro Araujo R, et al. Risk factors for late infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from a matched related donor. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007;13:1304-1312.
53. Walker CM, van Burik JA, De For TE, Weisdorf DJ. Cytomegalovirus infection after allogeneic transplantation: comparison of cord blood with peripheral blood and marrow graft sources. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007;13:1106-1115.
54. Garcia-Vidal C, Upton A, Kirby KA, Marr KA. Epidemiology of invasive mold infections in allogeneic stem cell transplant recipients: biological risk factors for infection according to time after transplantation. *Clin Infect Dis.* 2008;47:1041-1050.
55. Small TN, Casson A, Malak SF, et al. Respiratory syncytial virus infection following hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2002;29:321-327.
56. Boeckh M, Erard V, Zerr D, Englund J. Emerging viral infections after hematopoietic cell transplantation. *Pediatr Transplant.* 2005;9 Suppl 7:48-54.
57. Aalto SM, Juvonen E, Tarkkanen J, et al. 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.

58. Juvonen E, Aalto SM, Tarkkanen J, et al. High incidence of PTLD after non-T-cell-depleted allogeneic haematopoietic stem cell transplantation as a consequence of intensive immunosuppressive treatment. *Bone Marrow Transplant.* 2003;32:97-102.
59. Khanna N, Widmer AF, Decker M, et al. Respiratory syncytial virus infection in patients with hematological diseases: single-center study and review of the literature. *Clin Infect Dis.* 2008;46:402-412.
60. Tanaka Y, Kanda Y, Kami M, et al. Monitoring cytomegalovirus infection by antigenemia assay and two distinct plasma real-time PCR methods after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2002;30:315-319.
61. Boeckh M, Leisenring W, Riddell SR, et al. Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: importance of viral load and T-cell immunity. *Blood.* 2003;101:407-414.
62. Bordon V, Bravo S, Van Renterghem L, et al. Surveillance of cytomegalovirus (CMV) DNAemia in pediatric allogeneic stem cell transplantation: incidence and outcome of CMV infection and disease. *Transpl Infect Dis.* 2008;10:19-23.
63. Kimura H, Ito Y, Suzuki R, Nishiyama Y. Measuring Epstein-Barr virus (EBV) load: the significance and application for each EBV-associated disease. *Rev Med Virol.* 2008;18:305-319.
64. Wagstaff AJ, Faulds D, Goa KL. Aciclovir. A reappraisal of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs.* 1994;47:153-205.
65. McGavin JK, Goa KL. Ganciclovir: an update of its use in the prevention of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Drugs.* 2001;61:1153-1183.

66. Wagstaff AJ, Bryson HM. Foscarnet. A reappraisal of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in immunocompromised patients with viral infections. *Drugs*. 1994;48:199-226.
67. Snoeck R, De Clercq E. Role of cidofovir in the treatment of DNA virus infections, other than CMV infections, in immunocompromised patients. *Curr Opin Investig Drugs*. 2002;3:1561-1566.
68. Cesaro S, Zhou X, Manzardo C, et al. Cidofovir for cytomegalovirus reactivation in pediatric patients after hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Virol*. 2005;34:129-132.
69. Trofe J, Pote L, Wade E, Blumberg E, Bloom RD. Maribavir: a novel antiviral agent with activity against cytomegalovirus. *Ann Pharmacother*. 2008;42:1447-1457.
70. Biron KK. Maribavir: A promising new antiherpes therapeutic agent *New Concepts of Antiviral Therapy*: Springer US; 2006:309-336.
71. Miller GG, Dummer JS. Herpes simplex and varicella zoster viruses: forgotten but not gone. *Am J Transplant*. 2007;7:741-747.
72. Burnett JW, Laing JM, Aurelian L. Acute skin eruptions that are positive for herpes simplex virus DNA polymerase in patients with stem cell transplantation: a new manifestation within the erythema multiforme reactive dermatoses. *Arch Dermatol*. 2008;144:902-907.
73. Kapp M, Tan SM, Einsele H, Grigoleit G. Adoptive immunotherapy of HCMV infection. *Cytotherapy*. 2007;9:699-711.
74. Razonable RR. Cytomegalovirus infection after liver transplantation: current concepts and challenges. *World J Gastroenterol*. 2008;14:4849-4860.
75. Ljungman P. CMV infections after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2008;42 Suppl 1:S70-S72.

76. Saederup N, Mocarski ES, Jr. Fatal attraction: cytomegalovirus-encoded chemokine homologs. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2002;269:235-256.
77. Beisser PS, Lavreysen H, Bruggeman CA, Vink C. Chemokines and chemokine receptors encoded by cytomegaloviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008;325:221-242.
78. Varani S, Cederarv M, Feld S, et al. Human cytomegalovirus differentially controls B cell and T cell responses through effects on plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol.* 2007;179:7767-7776.
79. Basta S, Binnik JR. A survival game of hide and seek: cytomegaloviruses and MHC class I antigen presentation pathways. *Viral Immunol.* 2003;16:231-242.
80. Torres HA, Aguilera E, Safdar A, et al. Fatal cytomegalovirus pneumonia in patients with haematological malignancies: an autopsy-based case-control study. *Clin Microbiol Infect.* 2008.
81. Virtanen JO, Farkkila M, Multanen J, et al. Evidence for human herpesvirus 6 variant A antibodies in multiple sclerosis: diagnostic and therapeutic implications. *J Neurovirol.* 2007;13:347-352.
82. Yao K, Gagnon S, Akhyani N, et al. Reactivation of human herpesvirus-6 in natalizumab treated multiple sclerosis patients. *PLoS ONE.* 2008;3:e2028.
83. Ward KN. The natural history and laboratory diagnosis of human herpesviruses-6 and -7 infections in the immunocompetent. *J Clin Virol.* 2005;32:183-193.
84. Ward KN. Human herpesviruses-6 and -7 infections. *Curr Opin Infect Dis.* 2005;18:247-252.
85. Tang H, Kawabata A, Takemoto M, Yamanishi K, Mori Y. Human herpesvirus-6 infection induces the reorganization of membrane microdomains in target cells, which are required for virus entry. *Virology.* 2008;378:265-271.

86. De Bolle L, Naesens L, De Clercq E. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18:217-245.
87. Luppi M, Marasca R, Barozzi P, et al. Three cases of human herpesvirus-6 latent infection: integration of viral genome in peripheral blood mononuclear cell DNA. *J Med Virol.* 1993;40:44-52.
88. Daibata M, Taguchi T, Nemoto Y, Taguchi H, Miyoshi I. Inheritance of chromosomally integrated human herpesvirus 6 DNA. *Blood.* 1999;94:1545-1549.
89. Weinstock DM, Ambrossi GG, Brennan C, Kiehn TE, Jakubowski A. Preemptive diagnosis and treatment of Epstein-Barr virus-associated post transplant lymphoproliferative disorder after hematopoietic stem cell transplant: an approach in development. *Bone Marrow Transplant.* 2006;37:539-546.
90. Young KA, Chen XS, Holers VM, Hannan JP. Isolating the Epstein-Barr virus gp350/220 binding site on complement receptor type 2 (CR2/CD21). *J Biol Chem.* 2007;282:36614-36625.
91. Kutok JL, Wang F. Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Pathol.* 2006;1:375-404.
92. Brady G, Macarthur GJ, Farrell PJ. Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma. *Postgrad Med J.* 2008;84:372-377.
93. Khanim F, Dawson C, Meseda CA, Dawson J, Mackett M, Young LS. BHRF1, a viral homologue of the Bcl-2 oncogene, is conserved at both the sequence and functional level in different Epstein-Barr virus isolates. *J Gen Virol.* 1997;78 ( Pt 11):2987-2999.
94. Lam N, Sandberg ML, Sugden B. High physiological levels of LMP1 result in phosphorylation of eIF2 alpha in Epstein-Barr virus-infected cells. *J Virol.* 2004;78:1657-1664.

95. Kilger E, Kieser A, Baumann M, Hammerschmidt W. Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *Embo J.* 1998;17:1700-1709.
96. Niiro H, Otsuka T, Abe M, et al. Epstein-Barr virus BCRF1 gene product (viral interleukin 10) inhibits superoxide anion production by human monocytes. *Lymphokine Cytokine Res.* 1992;11:209-214.
97. Samanta M, Iwakiri D, Takada K. Epstein-Barr virus-encoded small RNA induces IL-10 through RIG-I-mediated IRF-3 signaling. *Oncogene.* 2008;27:4150-4160.
98. Meijer E, Cornelissen JJ. Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disease after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: molecular monitoring and early treatment of high-risk patients. *Curr Opin Hematol.* 2008;15:576-585.
99. van Esser JW, Niesters HG, van der Holt B, et al. Prevention of Epstein-Barr virus-lymphoproliferative disease by molecular monitoring and preemptive rituximab in high-risk patients after allogeneic stem cell transplantation. *Blood.* 2002;99:4364-4369.
100. Lenaerts L, De Clercq E, Naesens L. Clinical features and treatment of adenovirus infections. *Rev Med Virol.* 2008;18:357-374.
101. Walls T, Shankar AG, Shingadia D. Adenovirus: an increasingly important pathogen in paediatric bone marrow transplant patients. *Lancet Infect Dis.* 2003;3:79-86.
102. Robin M, Marque-Juillet S, Scieux C, et al. Disseminated adenovirus infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: incidence, risk factors and outcome. *Haematologica.* 2007;92:1254-1257.
103. Echavarria M. Adenoviruses in immunocompromised hosts. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21:704-715.
104. zur Hausen H. Novel human polyomaviruses--re-emergence of a well known virus family as possible human carcinogens. *Int J Cancer.* 2008;123:247-250.



105. Delbue S, Branchetti E, Boldorini R, et al. Presence and expression of JCV early gene large T Antigen in the brains of immunocompromised and immunocompetent individuals. *J Med Virol.* 2008;80:2147-2152.
106. Leung AY, Yuen KY, Kwong YL. Polyoma BK virus and haemorrhagic cystitis in haematopoietic stem cell transplantation: a changing paradigm. *Bone Marrow Transplant.* 2005;36:929-937.
107. Savona MR, Newton D, Frame D, Levine JE, Mineishi S, Kaul DR. Low-dose cidofovir treatment of BK virus-associated hemorrhagic cystitis in recipients of hematopoietic stem cell transplant. *Bone Marrow Transplant.* 2007;39:783-787.
108. Focosi D, Maggi F, Pistolesi D, et al. Hyperbaric oxygen therapy in BKV-associated hemorrhagic cystitis refractory to intravenous and intravesical cidofovir: Case report and review of literature. *Leuk Res.* 2008.
109. Kessler HH, Muhlbauer G, Rinner B, et al. Detection of Herpes simplex virus DNA by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2000;38:2638-2642.
110. van Doornum GJ, Guldemeester J, Osterhaus AD, Niesters HG. Diagnosing herpesvirus infections by real-time amplification and rapid culture. *J Clin Microbiol.* 2003;41:576-580.
111. Tanaka N, Kimura H, Iida K, et al. Quantitative analysis of cytomegalovirus load using a real-time PCR assay. *J Med Virol.* 2000;60:455-462.
112. Gautheret-Dejean A, Manichanh C, Thien-Ah-Koon F, et al. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of human herpesvirus-6 infection and application to bone marrow transplant patients. *J Virol Methods.* 2002;100:27-35.
113. Fernandez C, Boutolleau D, Manichanh C, Mangeney N, Agut H, Gautheret-Dejean A. Quantitation of HHV-7 genome by real-time polymerase chain reaction assay using MGB probe technology. *J Virol Methods.* 2002;106:11-16.

114. Kimura H, Morita M, Yabuta Y, et al. Quantitative analysis of Epstein-Barr virus load by using a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol.* 1999;37:132-136.
115. Claas EC, Schilham MW, de Brouwer CS, et al. Internally controlled real-time PCR monitoring of adenovirus DNA load in serum or plasma of transplant recipients. *J Clin Microbiol.* 2005;43:1738-1744.
116. Priftakis P, Bogdanovic G, Kokhaei P, Mellstedt H, Dalianis T. BK virus (BKV) quantification in urine samples of bone marrow transplanted patients is helpful for diagnosis of hemorrhagic cystitis, although wide individual variations exist. *J Clin Virol.* 2003;26:71-77.
117. Pongers-Willemsse MJ, Verhagen OJ, Tibbe GJ, et al. Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes. *Leukemia.* 1998;12:2006-2014.
118. Chou S, Marousek G, Guentzel S, et al. Evolution of mutations conferring multidrug resistance during prophylaxis and therapy for cytomegalovirus disease. *J Infect Dis.* 1997;176:786-789.