

造血干细胞移植后人巨细胞病毒感染的相关性研究

戴 艳¹, 方 芳², 冯 钢², 苏贵平¹, 黄来全¹, 蒋艺枝¹, 黄东平¹

(皖南医学院附属弋矶山医院 1. 血液内科; 2. 检验科 安徽 芜湖 241001)

【摘要】目的: 探讨分析造血干细胞移植(hematopoietic stem cell transplantation ,HSCT) 后人巨细胞病毒(HCMV) 感染与更昔洛韦(ganciclovir ,GCV) 耐药的发生及与移植类型、移植抗宿主病(GVHD) 等的相关性。方法: 2012 年3 月~2014 年4 月在我院接受 HSCT 的患者 18 例, 采用 FQ-PCR 法监测 HCMV-DNA 水平。HCMV-DNA 阳性患者给予 GCV 抢先治疗。结果: 8 例患者发生 HCMV 感染(44. 4%) , 其中 7 例为不全相合无关供体脐血造血干细胞移植(UCBT) 者。发生 HCMV 感染的 8 例患者中有 7 人出现 GVHD, 其中出现Ⅲ度及以上 GVHD 有 5 例(71. 4%) , 均为 UCBT 者。GCV 耐药 2 例, 均为 UCBT 后。结论: UCBT 患者 HCMV 感染及 GCV 耐药高, GVHD 与 HCMV 感染有关。

【关键词】造血干细胞移植; 人巨细胞病毒; 更昔洛韦

【中图分类号】R 457. 7 **【文献标识码】**A

【DOI】10. 3969/j. issn. 1002-0217. 2015. 01. 010

Human cytomegalovirus infection and hematogenic stem cell transplantation

DAI Yan ,FANG Fang ,FENG Gang ,SU Guiping ,HUANG Laiquan ,JIANG Yizhi ,HUANG Dongping

Department of Hematology ,Yijishan Hospital ,Wannan Medical College ,Wuhu 241001 ,China

【Abstract】Objective: To investigate the incidence of cytomegalovirus(CMV) infection and ganciclovir(GCV) resistance after hematopoietic stem cell transplantation(HSCT) and the correlation between CMV infection and graft-versus-host disease (GVHD) . **Methods:** Eighteen patients undergone HSCT in our hospital were included between March 2012 and April 2014. Real-time fluorescent quantitative PCR(FQ-PCR) was performed to test the CMV infection in total patients and patients with positive CMV-DNA were treated with GCV. **Results:** CMV infection occurred in 8 patients (44. 4%) in whom 7 were umbilical cord blood transplantation(UCBT) from unrelated donors(87. 5% 7/8) . Seven in 8 with CMV infection were complicated with GVHD in which 5 were infection of grade Ⅲ or over(71. 4% 5/7) . GCV resistance after UCBT occurred in 2. **Conclusion:** HCMV infection and GCV resistance appear higher in patients after UCBT and incidence of GVHD is associated with HCMV.

【Key words】 hematopoietic stem cell transplantation; cytomegalovirus; ganciclovir

造血干细胞移植(HSCT) 是治疗白血病、恶性肿瘤、遗传性疾病等的重要手段之一, 被誉为医学发展史上的一个里程碑。HSCT 成败的关键取决于移植相关并发症的发生。人类巨细胞病毒(HCMV) 感染是造血植入后最常见的病毒感染之一, 也是对 HSCT 患者威胁最大的一种病毒。HSCT 后约 60% ~ 70% 受者出现活动性人巨细胞病毒(HCMV) 感染, HCMV 相关病死率为 46% , 居移植病死率首位^[1-2]。本项目以 HSCT 患者为研究对象, 采用 FQ-PCR 方法监测 HSCT 患者血 HCMV-DNA, HCMV-DNA 阳性患者给予更昔洛韦(ganciclovir ,GCV) 抢先治疗, 综合分析移植类型、GVHD 等与 HCMV 感染的相关性, 为 HSCT 患者 HCMV 感染早期诊断和

早期治疗提供理论与实验基础, 为改进治疗方案, 创立新的防治措施提供新思路。

1 资料与方法

1.1 临床资料 18 例均为 2012 年 3 月~2014 年 4 月在我院接受 HSCT 患者, 男性 9 例, 女性 9 例, 中位年龄 38 岁(19 ~ 51 岁)。其中急性髓细胞白血病 5 例(包括 2 例难治复发性白血病), 急性淋巴细胞白血病 3 例, 慢性粒细胞白血病急性变 1 例, 非霍奇金淋巴瘤 5 例, 多发性骨髓瘤 1 例, 再生障碍性贫血 2 例, 阵发性睡眠性血红蛋白尿 1 例。移植类型: 接受同胞全合异基因外周血 HSCT 者 3 例, 接受同胞全合异基因骨髓 + 外周血 HSCT 者 1 例, 接受单份不全相合无关供体脐血 HSCT 者 7 例, 双份不全相

基金项目: 皖南医学院重点培育基金项目(WK2012ZF03)

收稿日期: 2014-07-06

作者简介: 戴 艳(1973-), 女, 副主任医师, 硕士, (电话) 15805530803, (电子信箱) usd591@ 163. com;

黄东平, 男, 副主任医师, (电子信箱) hdp-9713@ 163. com 通讯作者。

合无关供体 1 例,自体造血干细胞移植 6 例。所有 HSCT 移植治疗方案均经医院伦理委员会器官移植分会评审通过。所有患者均签署知情同意书。

1.2 HCMV-DNA 检测 FQ-PCR 方法检测外周血 HCMV-DNA: 抽取静脉血 2 mL,分离出 0.2 mL 血清;溶血标本重新取样。处理血清:血清 50 μ L,加入 50 μ L 核酸提取液,振荡 10 s,99 $^{\circ}$ C 干浴,13 000 r/min 离心 10 min,保留上清备用。阴性血清对照品及临界阳性对照品同上处理。试剂配制:取 $n \times 36$ μ L HCMV 核酸荧光 PCR 检测混合液与 $n \times 0.4$ μ L 酶(Taq + UNG) (n 为反应管数),振荡混匀数秒,3 000 r/min 离心数秒。加样:取上述混合液 36 μ L 置于 PCR 反应管中,然后将试剂盒内 HCMV-DNA 阴性血清对照品、血清样本、HCMV-DNA 临界阳性对照品处理上清液及 HCMV-DNA 标准品各 4 μ L 分别加入 PCR 反应管中,盖好反应管盖,立即进行 PCR 扩增反应。PCR 扩增:反应管置于定量荧光 PCR 上,设置循环参数:37 $^{\circ}$ C \times 2 min; 94 $^{\circ}$ C \times 2 min; 循环一次,再按 93 $^{\circ}$ C \times 15 s 至 60 $^{\circ}$ C \times 1 min,循环 40 次;单次荧光检测在 60 $^{\circ}$ C,反应体系为 40 μ L。选用 FAM 荧光通道,设定好基线和阈值。实验结束后将 HCMV-DNA 定量标准品浓度输入仪器软件中,数据分析,仪器生成标准曲线,之后自动显示待检样品定量值。

1.3 HCMV-DNA 的监测及治疗 异基因 HSCT 移植前供受者血 HCMV-DNA 移植后受者每周 1 次监测 HCMV-DNA, +60 d 每 2 周 1 次至移植后 +100 d。高危患者至移植后 +270 d。自体 HSCT 在 +20 d ~ +60 d 每周监测 HCMV-DNA。HCMV-DNA 阴性不预防用药;受者如果 HCMV-DNA 阳性立即给予 GCV 静脉注射,10 mg/(kg \cdot d)。如果连续 2 周 HCMV-DNA 持续上升,或 HCMV-DNA 拷贝数下降呈低水平,而后又反跳上升,临床症状没有改善或消除,均诊断为 HCMV 临床耐药。换用磷甲酸钠治疗,并且每周监测 2 次直至连续 2 次结果转为阴性后停药。

1.4 GVHD 的预防 环孢素/霉芬酸酯(CSA/MMF),CSA 3 mg/(kg \cdot d),持续静滴,-1 d 开始;MMF 25 ~ 30 mg/(kg \cdot d),口服,+1 d 开始。

1.5 统计学分析 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,率的相关性采用等级相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HCMV 感染发生情况 18 例 HSCT 患者中有

8 例发生 HCMV 感染(44.4%),其中不全相合无关供体脐血 HSCT 者 7 例,同胞全合异基因骨髓 + 外周血 HSCT 者 1 例。1 例无关供者脐血 HSCT 患者 HCMV 相关性出血性膀胱炎,患者出现肉眼血尿,伴有尿频、尿痛等刺激症状,血、尿 HCMV-DNA 检测值均为阳性,并且尿中拷贝数大于血液,结合临床诊断为 HCMV 相关出血性膀胱炎。本组患者首次 HCMV 感染发生的中位时间为 +42 d(+27 ~ +62 d),初始中位 HCMV-DNA 拷贝数为 $2.41E + 03$ ($1.21E + 03 \sim 4.91E + 06$)/mL。

2.2 HCMV 感染的治疗及转归 8 例 HCMV 感染患者给予 GCV 标准量抢先治疗,7 例患者 HCMV 感染治愈,1 例为双份无关供者脐血 HSCT 患者,于 +41 d 出现 III 度 GVHD, +62 d 测 HCMV-DNA 拷贝数高达 $4.91E + 06$ /mL, +75 d 患者血小板未植入, GVHD 未控制,放弃治疗死亡。

共有 2 例患者诊断为 GCV 耐药,其中 1 例为高危急性淋巴细胞白血病患者,行无关供者脐血 HSCT 移植过程中出现 III 度 GVHD,继之 HCMV 感染(图 1),给予 GCV 标准量治疗 2 周后, HCMV-DNA 拷贝数上升(图 2),考虑 HCMV 耐药,更换磷甲酸钠治疗后临床症状好转, HCMV-DNA 拷贝数下降至正常, HCMV 感染治愈,但患者 GVHD 反复加重, +251 d 死于慢性广泛性 GVHD,肺部感染。另 1 例难治性白血病的患者行地西他滨桥联无关供体脐血 HSCT 挽救性治疗,在脐血植入后出现 HCMV-DNA 拷贝数上升, GCV 标准量治疗 1 周后, HCMV-DNA 拷贝数下降呈低水平,继之又反跳上升,诊断 HCMV 耐药,更换磷甲酸钠治疗后治愈。

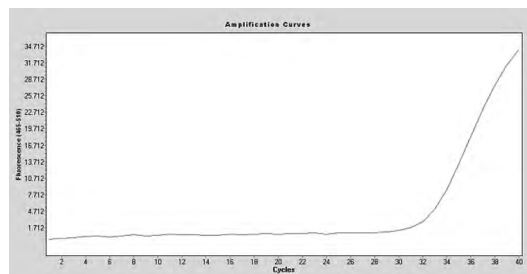


图 1 1 例无关供者脐血 HSCT 患者植入后 HCMV 感染
Fig 1 Positive HCMV-DNA in UCBT from unrelated donors

2.3 HCMV 感染与 HSCT 后 GVHD 发生的关系 发生 HCMV 感染的 8 例患者中有 7 人出现 GVHD,其中出现 III 度及以上 GVHD 有 5 例(71.4%),均为 UCBT 者。HCMV-DNA 阳性和阴性者发生 GVHD 差异有统计学意义(等级相关系数 $r_s = 0.892$, $P < 0.01$)。

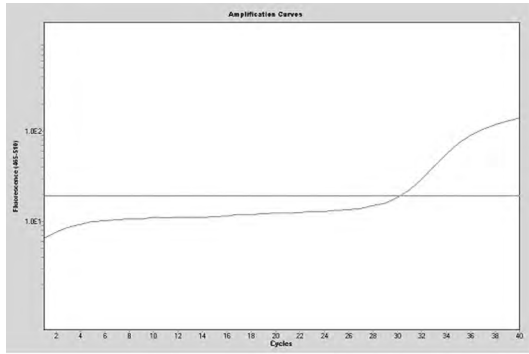


图2 GCV 治疗 2 周后的 HCMV-DNA
Fig 2 HCMV-DNA after 2-week of GCV treatment

表 1 HCMV 感染与 HSCT 后 GVHD 的发生
Tab 1 HCMV infection and GVHD incidence after HSCT

GVHD	HCMV		合计
	+	-	
+	7	0	7
-	1	10	11
合计	8	10	18

3 讨论

造血干细胞移植中,免疫重建延迟、移植物抗宿主病(GVHD)的发生或预防GVHD的免疫抑制剂等均可造成HCMV隐性感染激活,引起一系列HCMV感染性疾病,还可诱导GVHD的发生,影响造血干细胞的植入,降低移植成功率^[3-4]。HSCT患者发生CMV感染的可能因素有①预处理方案:有报道认为预处理接受TBI是CMV感染的危险因素^[5];②移植类型:非血缘及单倍体相合供者移植是CMV感染的危险因素,考虑可能与非血缘及单倍体相合供者移植预防GVHD方案中使用了大量免疫抑制剂尤其是ATG有关^[6];③HLA配型情况:HLA配型不全相合移植患者容易发生CMV活动性感染,由于HLA配型不全相合移植,患者预处理导致患者的细胞免疫功能低下,而细胞免疫是机体防御CMV感染过程的主要机制;④输血的次数可增加CMV感染的发生率;⑤aGVHD可明显损害患者的正常免疫功能,同时由于治疗aGVHD要应用大量的免疫抑制剂,进一步损害了患者的免疫力而造成CMV的激活^[7]。我们采用RQ-PCR技术监测外周血CMV-DNA并动态监测其拷贝数的变化。本组18例患者中,总体HCMV感染率44.4%,无关供者脐血HSCT患者HCMV感染率为87.5%。自体造血干细胞无1例出现HCMV感染。临床上在抗病毒治疗HCMV感染同时,多合并撤减免疫抑制剂的综合治疗方法,虽然提高了机体对HCMV的免疫力,但同时也增加了GVHD发生的危险。寻找防治GVHD的免疫抑制

剂的撤减与继发HCMV感染及耐药的平衡点是治疗造血干细胞移植后并发症的难点。

GCV是免疫抑制患者HCMV感染的一线治疗药物。GCV进入感染细胞即被病毒蛋白激酶(UL97的编码产物)磷酸化为一磷酸GCV,随后又被磷酸化为三磷酸GCV,后者可竞争性结合HCMV-DNA多聚酶的结合位点而掺入病毒DNA链,减慢和终止链的延长,是病毒DNA多聚酶的有效抑制剂。但仍有患者GCV治疗后出现HCMV感染恶化、移植物排斥。本组2例诊断为GCV耐药者均为UCBT后。有报道认为HSCT后HCMV耐药可能与UL97、UL54突变相关^[8-9]。我们将继续积累更多病例资料,通过对HSCT患者的HCMV感染及耐药性的相关性研究,为HSCT患者HCMV感染和耐药早期诊断和早期治疗提供理论与实验基础,以期及时改进治疗方案。

【参考文献】

- [1] Milano F, Pergam SA, XIE Hu, et al. Intensive strategy to prevent CMV disease in seropositive umbilical cord blood transplant recipients [J]. Blood, 2011, 118(20): 5689-5696.
- [2] Hatzimichael E, Tuthill M. Hematopoietic stem cell transplantation [J]. Stem Cells Cloning, 2010, 3: 105-117.
- [3] El-Cheikh J, Devillier R, Crocchiolo R, et al. Impact of Pretransplant Donor and Recipient Cytomegalovirus Serostatus on Outcome for Multiple Myeloma Patients Undergoing Reduced Intensity Conditioning Allogeneic Stem Cell Transplantation [J]. Mediterr J Hematol Infect Dis, 2013, 5(1): e2013026.
- [4] Zawilinska B, Kopec J, Szostek S, et al. Lymphotropic herpesvirus DNA detection in patients with active CMV infection - a possible role in the course of CMV infection after hematopoietic stem cell transplantation [J]. Med Sci Monit, 2011, 17(8): CR432-CR441.
- [5] Yi ES, Kim YJ. Cytomegalovirus Infection according to Cell Source after Hematopoietic Cell Transplantation in Pediatric Patients [J]. Yonsei Med J, 2012, 53(2): 393-400.
- [6] Nakamae H, Kirby KA, Sandmaier BM, et al. Effect of Conditioning Regimen Intensity on CMV Infection in Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2009, 15(6): 694-703.
- [7] 李欲航, 徐晨, 陈健琳, 等. 异基因造血干细胞移植后人CMV感染与GVHD相关性的临床研究 [J]. 中国器官移植杂志, 2013, 34(2): 84-86.
- [8] Chou S, Bowlin TL. Cytomegalovirus UL97 Mutations Affecting Cyclopropavir and Ganciclovir Susceptibility [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(1): 382-384.
- [9] Gilbert C, Azzi A, Goyette N, et al. Recombinant Phenotyping of Cytomegalovirus UL54 Mutations That Emerged during Cell Passages in the Presence of either Ganciclovir or Foscarnet [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(9): 4019-4027.