

CYTOMEGALOVIROVÁ INFEKCE U DĚTÍ SE ZHOUBNÝM NÁDOROVÝM ONEMOCNĚNÍM: OD SÉROLOGIE K PRŮKAZU VIROVÉ DNA.

CYTOMEGALOVIRUS INFECTION IN CHILDREN WITH CANCER: FROM SEROLOGY TO VIRAL DNA DETECTION.

MICHÁLEK J.¹, HORVÁTH R.², BENEDÍK J.², HRSTKOVÁ H.¹

¹ Dětská interní a onkologická klinika, Fakultní nemocnice Brno;

² Genetická laboratoř, Centrum kardiovaskulární a transplantační chirurgie, Brno.

Souhrn: Cytomegalovirová infekce u dětí se zhoubným nádorovým onemocněním: od sérologie k průkazu virové DNA. **Východiska:** Cytomegalovirová infekce je jednou z příčin morbidity a mortality u dětí léčených pro zhoubné nádorové onemocnění. V poslední době se v diagnostice CMV vedle sérologického vyšetření stále častěji uplatňuje vysoce citlivá a rychlá metoda polymerázové řetězové reakce (PCR). **Typ studie a soubor:** Sérologickými metodami (IgG, IgM - proti CMV) bylo testováno 186 dětí s leukémií, solidními nádory, lymfomem nebo histiocytózou. Z toho 70 pacientů bylo vyšetřováno metodou PCR na přítomnost cytomegalovirové DNA v krvi. Výsledky sérologického i PCR vyšetření byly hodnoceny semikvantitativně. **Metody a výsledky:** Sérologickými metodami nebyly nalezeny významné rozdíly v promítnutosti CMV mezi onkologickými pacienty v době stanovení diagnózy a zdravou kontrolou. Promítnutost onkologických pacientů po léčbě byla ve srovnání s kontrolním souborem významně vyšší ($p < 0,01$). V průběhu protinádorové léčby byl zaznamenán signifikantní nárůst promítnutosti CMV. Výsledky detekce CMV DNA metodou PCR z plné krve se senzitivitou 98,4% velmi dobře rozlišují mezi symptomatickou infekcí a asymptomatickou perzistencí viru. PCR pozitivní byli všichni symptomatictí pacienti (18/18), ale pouze jeden z 62 zdravých kontrol. PCR pozitivita byla detekována v 1-5 týdenním předstihu před pozitivitou sérologickou. **Závěry:** Detekce CMV infekce metodou PCR zpřesňuje diagnostiku potíží neznámé etiologie u imunosuprimovaných dětských pacientů a zlepšuje možnosti jejich terapie.

Klíčová slova: Cytomegalovirus, PCR, onkologie, diagnostika

Summary: Human Cytomegalovirus Infection in Children with Cancer: From Serology to Viral DNA Detection. **Background:** Cytomegaloviral infection is an important cause of morbidity and mortality in children treated for cancer. Recently, rapid and highly sensitive polymerase chain reaction (PCR) has been used in the diagnostics of such infections. **Design and subjects:** A group of 186 children with leukemia, solid tumors, lymphoma or histiocytosis were tested serologically (CMV-IgG, IgM) and 70 of them were tested for CMV DNA in blood, both semiquantitatively. **Methods and results:** No significant difference in seropositivity was found between healthy controls and cancer patients at the beginning of treatment. At the end of anticancer treatment, the seropositivity of cancer patients was significantly higher than in healthy controls ($p < 0,01$), suggesting a high rate of CMV infection during anticancer treatment. The results of PCR detection of CMV (with 98.4% sensitivity) correlates with clinical symptoms of infection. All symptomatic patients (18/18) and only one of 62 healthy controls were PCR positive. Furthermore, the PCR positivity was detected 1-5 weeks before detection of seroconversion. **Conclusions:** Detection of CMV DNA by PCR improves the diagnosis of complications of unknown origin in children with cancer and offers the possibility of their treatment.

Key words: human cytomegalovirus, PCR, oncology, cancer, diagnostics

Úvod

Onkologický pacient je imunosuprimován samotným nádorovým procesem a následně pak ještě jeho léčbou, čímž je vystaven zvýšenému riziku oportunní infekce (1). Jednou z příčin morbidity a mortality pacientů léčených pro zhoubné nádorové onemocnění, zejména při použití intenzivních režimů protinádorové léčby je cytomegalovirus (CMV) (2-5). Promítnutost dospělé populace cytomegalovirem se pohybuje kolem 70%. Primární infekce probíhá většinou asymptomaticky v dětství a virus pak zřejmě perzistuje v hostiteli až do konce života (6). Méně často může CMV infekce probíhat pod obrazem syndromu infekční mononukleózy. Při CMV infekci v těhotenství může dojít k přenosu infekce na plod a ke vzniku kongenitální CMV infekce provázené mentální retardací, mikrocefálií, slepotou a hluchotou (6). U imunosuprimovaných pacientů bývá CMV infekce často provázena intersticiální pneumonií, hepatitidou, esofagitidou, gastroen-

terokolitidou, dřeňovou aplazií, encefalitidou a chorioretinitidou (3-7). Pacienti po transplantaci kostní dřeně nebo orgánové transplantaci jsou nejvíce ohroženi pneumonitidou, která ještě před 10 lety byla z 80% letální (8). Pacienti s rozvinutým AIDS trpí často CMV kolitidou, chorioretinitidou a postižením CNS (6,7).

Stanovení diagnózy CMV infekce u imunosuprimovaných pacientů je na základě samotného klinického pozorování prakticky nemožné, neboť klinické projevy jiné oportunní infekce mohou být velmi podobné (2,5). Proto je nutné potvrdit klinické podezření laboratorními vyšetřeními, která vedou ke spolehlivému určení příslušného infekčního agens. Laboratorní diagnostika virových infekcí, zejména u imunosuprimovaných jedinců je však velmi obtížná, což může být také jedním z důvodů malé znalosti úlohy virů při komplikacích u onkologických pacientů. Donedávna byla virologická diagnostika omezena na metody sérologické a kultivační. Sérologická

vyšetření jsou však zatížena vysokým rizikem falešně negativních výsledků v důsledku nedostatečné tvorby specifických protilátek při poškození imunitního systému hostitele během protinádorové léčby. Navíc, u malých dětí předškolního věku, je tvorba protilátek v průběhu akutní virové infekce ve třídě IgM nedostatečná nebo zcela chybí (6,7,9). Jindy naopak můžeme dostat falešně pozitivní výsledky na základě zkřížené reaktivity, zejména mezi různými herpetickými viry (6). Kultivační vyšetření je velmi pracné a zdlouhavé a nehodí se k diagnostice akutně probíhající infekce (10). Zavedení techniky "shell-vial assay" sice podstatně zkrátilo délku kultivace, senzitivita tohoto vyšetření je však stále nedostatečná (10,11).

Naštěstí s rozvojem molekulární biologie se od počátku 90. let rychle rozvíjí i diagnostika virů, používající metody polymerázové řetězové reakce (PCR), kterou lze prokázat přítomnost virové DNA v jakémkoliv biologickém materiálu (15, 22, 23). Poslední zkušenosti ukazují, že při srovnání detekce cytomegalovirové DNA v plasmě metodou PCR (PCR z plasmy), detekce cytomegalovirové DNA z plné krve nebo z leukocytů periferní krve (PCR z plné krve nebo leukoDNAemie) a detekce antigenemie (přítomnost virově specifických antigenů v krvi, např. časného antigenu CMV matrix pp65), nejlépe koreluje s klinickou symptomatickou CMV infekcí u imunosuprimovaných pacientů po transplantaci kostní dřeně, či po orgánové transplantaci nález virové DNA v plné krvi, nebo v leukocytech periferní krve (10,12,13). Další výhodou PCR detekce virové DNA je její rychlost a vysoká citlivost vyšetření, která v indikovaných případech umožňuje včasné zahájení protivirové léčby a tím dosažení její vyšší účinnosti.

Diagnostiky s využitím metody PCR bylo použito v kombinaci se sérologickým vyšetřením i ve zde předkládaném souboru dětských onkologických pacientů, kteří byli léčeni konvenční protinádorovou léčbou bez transplantace kostní dřeně, či periferních kmenových buněk, neboť dosud nebyla publikována práce, která by se v tomto rozsahu zabývala průběhem CMV infekce u těchto pacientů.

Cíl práce

Cílem práce je porovnat citlivost a specifitu stanovení CMV infekce u onkologických dětských pacientů metodami imunologické detekce protilátek a detekcí CMV DNA v krvi pacientů a ukázat přednosti druhé z uvedených metod pro včasnou detekci nebezpečí CMV nemoci.

Metody

Hodnocený soubor obsahoval 186 dětí ve věku od 4 měsíců do 18 let, z toho 101 chlapců a 85 dívek léčených na 1. Dětské interní a onkologické klinice Fakultní nemocnice Brno od června 1993 do září 1998 s diagnózami: leukemie, včetně myelodysplastického syndromu, 77 dětí (41,4%), solidní nádory 58 dětí (31,2%), lymfomy 42 dětí (22,6%) a histiocytózy 9 dětí (4,8%) podle aktuálních léčebných protokolů BFM (Berlin-Frankfurt-Münster), SIOP (International Society of Pediatric Oncology) a POG (Pediatric Oncology Group) používaných pediatricko-onkologickými pracovišti západní Evropy a U.S.A. Soubor 186 pacientů byl rozčleněn do 4 věkových kategorií: 0-2 roky (25 pacientů), 2-6 let (49 pacientů), 6-12 let (52 pacientů) a 12-18 let (60 pacientů). Soubor 116 pacientů léčených od roku 1993 do září 1996 byl vyšetřen retrospektivně sérologicky na přítomnost specifických protilátek proti CMV ve třídě IgM a IgG metodou ELISA (9). Soubor 70 pacientů léčených od října 1996 do září 1998 byl vyšetřen prospektivně sérologicky stejně jako v retrospektivním souboru a nově byla zavedena metoda PCR k diagnostice přítomnosti cytomegalovirové DNA v plné krvi.

Metoda PCR spočívala v detekci specifické cytomegalovirové DNA ve vzorku plné krve. V případě střední a silné positivity (nálezu minimálně 10^2 kopií CMV v $1\mu\text{g}$ izolované DNA z plné krve) bylo provedeno také vyšetření $100\mu\text{l}$ plasmy pro

průkaz volných virových částic v plasmě (14,15). Sérologické vyšetření CMV a vyšetření metodou PCR od svého zavedení bylo prováděno u všech sledovaných pacientů:

- v době stanovení onkologické diagnózy;
- při klinickém podezření na infekci CMV kdykoliv v průběhu protinádorové léčby;
- v době ukončení protinádorové léčby.

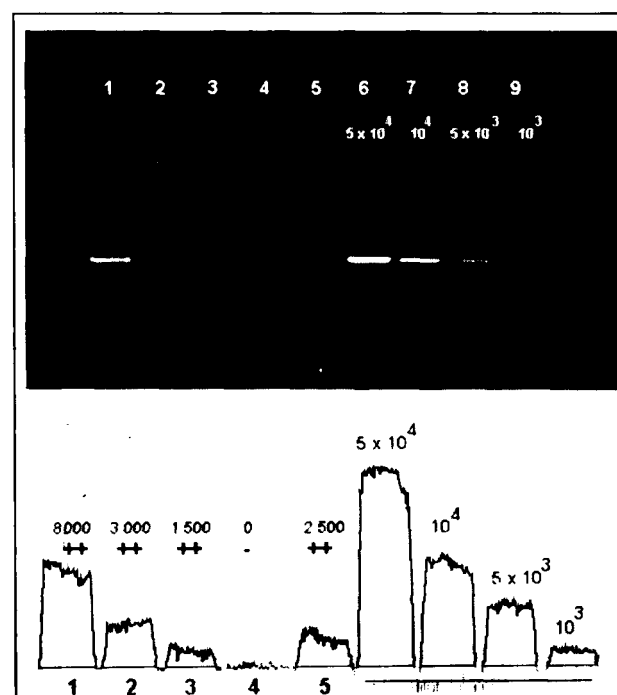
Do souboru vyšetřovaných pacientů nebyli zahrnuti pacienti, kteří podstoupili transplantaci kostní dřeně či periferních kmenových buněk.

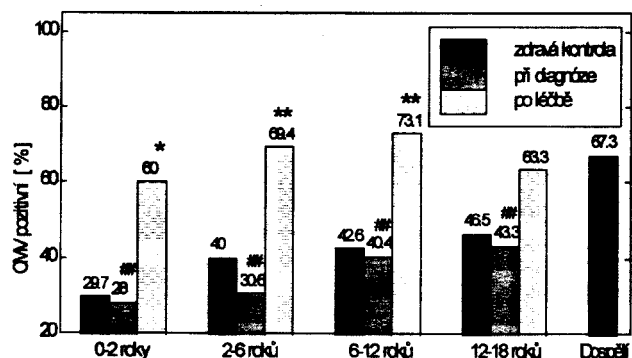
Klinické podezření na infekci virem CMV v průběhu protinádorové léčby bylo vzneseno na základě klinických či laboratorních známek vyskytujících se při CMV infekci: horečka bez známek bakteriální či mykotické infekce, protrahované subfebrilie, lymfadenopatie, hepatosplenomegalie, hepatopatie, protrahovaná aplazie kostní dřeně, lymfopenie, atypická lymfocytóza, atypická pneumonie a nebakteriální gastroenteritida, pokud nebyla nalezena jiná příčina těchto obtíží. Hodnocení sérologického i PCR vyšetření bylo prováděno semikvantitativně: + pozitivita odpovídala slabé sérologické pozitivitě a nálezu pod 10^2 kopií CMV (v $1\mu\text{g}$ DNA izolované z plné krve), ++ pozitivita odpovídala středně silné sérologické pozitivitě a nálezu $10^2 - 10^4$ kopií CMV v $1\mu\text{g}$ DNA izolované z plné krve), +++ pozitivita odpovídala silné sérologické pozitivitě a nálezu více než 10^4 kopií CMV (v $1\mu\text{g}$ DNA izolované z plné krve). Na obr. 1 je ukázka analýzy 5 pacientů pomocí digitální kamery Ultralum a softwaru Scion Image.

Jako kontrolní pro sérologické vyšetření sloužil soubor 318 dětí a adolescentů ve věku od 4 měsíců do 18 let a 165 dospělých ve věku od 19 do 78 let. Metodou PCR bylo vyšetřeno 62 dětí a adolescentů ve věku od 4 měsíců do 18 let. U všech těchto osob bylo hlavním důvodem odběru krve jiné vyšetření a tyto vyšetřované osoby nejevily v době odběru známky ani akutního horečnatého ani infekčního onemocnění.

Pro statistické zpracování bylo použito McNemarova testu a χ^2 testu (16).

Obr. 1. Ukázka semikvantifikace pozitivních výsledků PCR detekce CMV Dráhy 1 – 5 pacienti s vyznačenou intenzitou záchytu Dráhy 6 – 9 ředící řada kontrolního plazmidového konstrukt (hodnoty udávají počet kopií virové DNA v 1 (g lidské DNA izolované z plné krve, tedy asi 3×10^5 leukocytů)



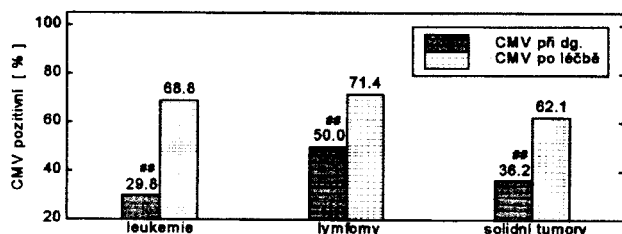


Obr. 2: Promoženost virem CMV podle věku.

* ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$): statisticky významný rozdíl na 5%, resp. 1% hladině významnosti mezi souborem pacientů v době ukončení protinádorové léčby (v legendě označeno „po léčbě“) a souborem zdravých, věkově odpovídajících kontrol („zdravá kontrola“).

* ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$): statisticky významný rozdíl na 5%, resp. 1% hladině významnosti mezi souborem pacientů v době stanovení onkologické diagnózy (v legendě označeno „při diagnóze“) a souborem pacientů v době ukončení protinádorové léčby.

Na ose x jsou znázorněny jednotlivé věkové skupiny (věk v letech) včetně kontrolní skupiny zdravých dospělých. Na ose y je procentuálně znázorněna sérologická pozitivita CMV ve třídě IgG.



Obr. 3: Promoženost virem CMV podle diagnózy.

** ($p < 0,01$): statisticky významný rozdíl na 1% hladině významnosti mezi souborem pacientů v době stanovení onkologické diagnózy (v legendě označeno „CMV při dg.“) a souborem pacientů v době ukončení protinádorové léčby (v legendě označeno „CMV po léčbě“). Na ose x jsou znázorněny jednotlivé skupiny pacientů podle diagnózy: leukémie (77 pacientů), lymfomy (42 pacientů) a solidní nádory (58 pacientů). Na ose y je procentuálně znázorněna sérologická pozitivita CMV ve třídě IgG.

Výsledky

Sérologické vyšetření

Nejprve byla srovnávána se zdravou kontrolou promoženost virem CMV na základě sérologické positivity ve třídě IgG u populace dětí se zhoubným nádorem v době stanovení onkologické diagnózy, tj. před jakoukoliv onkologickou léčbou, a poté v době ukončení komplexní protinádorové léčby. Výsledky tohoto sledování pro jednotlivé věkové kategorie ukazuje obr. 2. Z obrázku je zřejmé, že v době stanovení diagnózy zhoubného nádoru u dětí není statisticky významných rozdílů v promoženosti virem CMV ve srovnání se zdravou kontrolou v žádné věkové kategorii. Všechny věkové kategorie jsou však statisticky významně více promoženy virem CMV v době ukončení protinádorové léčby než před jejím zahájením v době stanovení onkologické diagnózy ($p < 0,01$). Kromě věkové kategorie 12-18 letých je také významný rozdíl v promoženosti CMV mezi kontrolním souborem a souborem 0-2letých ($p < 0,05$), 2-6letých a 6-12letých ($p < 0,01$) po skončení léčby. Promoženost dětské populace po léčbě zhoubného nádoru se tak ve všech věkových kategoriích blíží promoženosti dospělé populace.

Při rozdělení pacientů podle jednotlivých diagnóz (obr.3) je ve všech třech skupinách pacientů s leukémií, lymfomy i solidními nádory patrný signifikantní nárůst promoženosti CMV (charakterizovaný přítomností protilátek ve třídě IgG proti CMV) v průběhu protinádorové léčby ($p < 0,01$). Nejmarkantnější je tento nárůst u pacientů s leukémií. Skupi-

na histiocytóz nebyla pro malý počet pacientů statisticky hodnocena.

Hodnocena byla také pozitivní sérokonverze (pacient CMV IgG negativní v době stanovení onkologické diagnózy, u kterého došlo po léčbě k CMV IgG pozitivitě, aniž by proběhla infekce byla klinicky zaznamenána) a negativní sérokonverze (pacient CMV IgG pozitivní v době stanovení onkologické diagnózy, který je dále CMV IgG i IgM negativní). K pozitivní sérokonverzi došlo u 46 (27,4%) pacientů, k negativní sérokonverzi v průběhu léčby došlo u 11 (5,9%) pacientů a v době ukončení léčby u 3 (1,6%) pacientů. V době stanovení onkologické diagnózy byla sérologicky zjištěna recentní CMV infekce u 1 pacienta s leukémií. V průběhu protinádorové léčby pak bylo zachyceno 7 pacientů (2 s leukémií, 1 s histiocytózou I. třídy, 1 s nonhodgkinským lymfomem a 3 se solidním tumorem) se sérologicky potvrzenou recentní CMV infekcí. V laboratorním nálezu se poměrně často objevovala lymfopenie, nízký počet CD4 pozitivních lymfocytů a „převrácený“ poměr CD4/CD8, tj. menší než 1,0.

Vyšetření metodou PCR

Vyšetření na přítomnost specifické cytomegalovirové DNA z plné krve bylo provedeno opakovaně u všech 70 pacientů v prospektivním souboru a u 62 zdravých kontrol. Celkem bylo vyšetřeno 215 vzorků krve onkologických pacientů, tedy průměrně 3,07 vzorku na jednoho pacienta a jednorázově 62 vzorků kontrolního souboru. Výsledky shrnuje tab.1. Z tabulky je zřejmé, že nastavená senzitivita metody PCR, která činí 98,4%, velmi dobře odráží rozlišení mezi symptomatickou infekcí a asymptomatickou perzistencí CMV. Pouze v jednom případě z 62 zdravých kontrol byla nalezena přítomnost CMV DNA v krvi, zatímco jeho přítomnost byla potvrzena u všech 18 symptomatických onkologických pacientů. Z těchto 18 PCR pozitivních pacientů měl pouze jeden pacient s leukémií pozitivní na +++ zjištěnou akutní virémii (virová DNA i v plazmě), zatímco u 17 ostatních se jednalo o nález cytomegalovirové leukoDNAemie. PCR pozitivních bylo v době stanovení onkologické diagnózy 5 pacientů s leukémií a 1 pacient s histiocytózou II. třídy. V průběhu protinádorové léčby byla přítomnost CMV DNA v krvi zjištěna u 4 pacientů s leukémií, u 2 pacientů s non-hodgkinským lymfomem a u 7 pacientů se solidním tumorem, přičemž 1 pacient s leukémií měl reaktivaci CMV infekce v průběhu protinádorové léčby.

Srovnání sérologického a PCR vyšetření

Srovnání sérologického a PCR vyšetření na CMV je uvedeno v tab. 2, která ukazuje rozdíly mezi retrospektivním souborem pacientů vyšetřeným pouze sérologicky a prospektivním souborem vyšetřeným jak sérologicky, tak metodou PCR. Z tabulky jednoznačně vyplývá, že použití metody PCR k detekci CMV DNA v prospektivním souboru výrazně přispělo k objasnění příčin symptomatické CMV infekce. Při srovnání pro-

Tab. 1: Semikvantitativní hodnocení PCR pozitivních vyšetření na přítomnost cytomegalovirové DNA v plné krvi a plasmě onkologických pacientů a zdravých kontrol.

Stupeň positivity PCR*	Pacienti (n = 70)	Zdravá kontrola (n = 62)
+	16	1
++	7	0
+++	1	0
viremie (PCR pozitivita ve 100 µl plasmy)	1	0
Celkový počet PCR pozitivních vzorků	25	1
Počet PCR pozitivních jedinců	18 (25,7 %)	1 (1,6 %)

* Uváděn je stupeň positivity zachytu cytomegalovirové DNA v 3×10^5 leukocytech periferní krve. Číselné hodnoty v tabulce uvádějí počty pozitivních vzorků krve a plasmy kromě posledního řádku, kde je udán počet pacientů, resp. zdravých kontrol, s PCR pozitivním nálezem cytomegalovirové DNA.

Tab. 2: Srovnání retrospektivního a prospektivního vyšetření dětí se zhoubným nádorem

Sledovaná charakteristika s uvedením počtu pozitivních pacientů (v závorkách je uveden údaj v procentech)	Celkem 1993–1998 (n = 186)	Retrospektivně 1993–1996 (n = 116)	Prospektivně 1996–1998 (n = 70)
Pozitivní sérokonverze*	46 (24,7 %)	32 (27,6 %)	10 (14,2 %)
Negativní sérokonverze po léčbě	3 (1,6 %)	1	2
Negativní sérokonverze v průběhu léčby	11 (5,9 %)	6	5
Dokumentovaná symptomatická CMV infekce (sérologicky a/nebo PCR)	25 (13,4 %)	7 (6 %)	18 (25,7 %)
Celkový počet laboratorně zjištěných symptomatických a asymptomatických CMV infekcí**	71 (38,2 %)	39 (33,6 %)	28 (40 %)

* Ve skupině „pozitivní sérokonverze“ jsou zahrnuti pouze pacienti, kteří nejsou ve skupině „dokumentovaná symptomatická CMV infekce“

** Jedná se o součet „pozitivní sérokonverze“ a „dokumentované symptomatické CMV infekce“

spektivního a retrospektivního souboru se prokázalo výrazné zvýšení počtu pacientů s PCR a sérologicky dokumentovanou symptomatickou CMV infekcí. Naopak ubylo pacientů s pozitivní sérokonverzí, tedy těch, u kterých CMV infekce proběhla asymptomaticky a nebo nebyla v průběhu protinádorové léčby zachycena.

Potvrdila se i vysoká predikční schopnost PCR detekce, která umožňuje zachytit CMV infekci o několik týdnů dříve, než se projeví první klinické i sérologické příznaky. Všichni pacienti v prospektivním souboru, kteří měli sérologicky prokazatelnou CMV infekci byli již v době o 1 – 5 týdnů dříve PCR pozitivní na přítomnost CMV DNA v krvi.

Klinický průběh CMV infekce

Laboratorně byla CMV infekce zjištěna celkem u 71 (38,2%) pacientů, z toho dokumentovaná CMV infekce sérologicky, nebo PCR metodou byla celkem u 25 (13,4%) pacientů. U 6 pacientů v době stanovení onkologické diagnózy, u 18 pacientů v průběhu protinádorové léčby a u 1 pacienta v době stanovení onkologické diagnózy s reaktivací v průběhu léčby. Nejčastěji se CMV infekce objevovala bezprostředně po proběhlém bloku protinádorové chemoterapie. Manifestovala se protrahovanými febriliemi nebo subfebriliemi nereagujícími na podání antibiotik a antimykotik, negativními bakteriálními a mykotickými nálezy z hemokultur, nízkými hodnotami C-reaktivního proteinu (markeru bakteriální infekce), protrahovanou nezvykle dlouhou a těžkou bakteriální infekcí, protrahovanou růstových faktorů granulocytů, hepatopatií a gastroenteritidou. CMV pneumonie nebyla v našem souboru prokázána, i když u jednoho pacienta s leukémií, který prodělal oboustrannou bronchopneumonii v leukopenickém období v průběhu protinádorové léčby byla PCR zachycena CMV DNA v krvi. Diagnostická bronchoalveolární laváž však nebyla provedena, pacient měl tři dny poté pozitivní bakteriologický nález a po nasazení antibiotik došlo k ústupu bronchopneumonie.

Těžký průběh CMV infekce s protrahovanou aplazií kostní dřeně, hepatitidou a následnou bakteriální sepsí měli 3 pacienti s výrazným deficitem buněčné imunity s absolutním počtem CD4+ lymfocytů v periferní krvi nižším než $200 \times 10^6/l$. U pacientů s nálezem ++ nebo +++ PCR CMV pozitivní také často docházelo k těžkým bakteriálním a mykotickým infekcím, které probíhaly současně nebo následně po CMV infekci.

Rozhodování o léčbě CMV infekce ganciklovirem bylo prováděno v retrospektivním souboru na základě klinického průběhu infekce a sérologického vyšetření prokazujícího recentní CMV infekci. V prospektivním souboru byli ganciklovirem léčeni pouze symptomatictí pacienti s PCR pozitivitou na ++,

respektive +++ . U pacientů s pozitivitou na + byl průběh infekce průběžně monitorován opakovaným PCR vyšetřením jedenkrát týdně a v případě kvantitativně prokázaného nárůstu CMV DNA v krvi byla zahájena 14 denní protivirová léčba ganciklovirem v dávce $2 \times 5 \text{ mg/kg}$ denně. Průběh infekce byl sledován do ústupu klinických potíží a do vymizení PCR pozitivity 1 x týdně. Výsledky léčby ganciklovirem u dětských onkologických pacientů budou námětem samostatného sdělení.

Diskuze

Diagnostika cytomegalovirové infekce u imunosuprimovaných pacientů je značně obtížná. Klasické metody sérologické a kulturační jsou zatíženy značným rizikem falešně negativních výsledků (2-7). Zjištění nízké úspěšnosti zachytu CMV infekce sérologicky u imunosuprimovaných dětských onkologických pacientů potvrzuje také naše studie. V retrospektivním souboru, kdy laboratorní diagnostika byla založena pouze na sérologických testech, bylo zachyceno mnohem méně symptomatických infekcí než v prospektivně sledovaném souboru a zachytu CMV DNA pomocí PCR. Je však třeba zdůraznit, že sérologické vyšetření u dětských pacientů léčených standardní protinádorovou léčbou bez začlenění transplantace kostní dřeně má nadále zásadní význam v době stanovení onkologické diagnózy a v době ukončení protinádorové léčby, kdy tvorba protilátek není uměle ovlivněna. Ukazuje se, že více jak jedna třetina (38,2%) dětí prodělavá během protinádorové léčby CMV infekci, takže po jejím skončení se promítnutí vyléčených pacientů blíží promítnutí dospělé populace.

Tato skutečnost je nepochybně způsobena zvýšeným rizikem CMV infekce během imunosupresivní protinádorové léčby a také opakovanými převody krevních derivátů, které i přes čištění deleukozizačními filtry mohou obsahovat malé množství potenciálně infikovaných leukocytů. Stálo by za úvahu, zda tedy neprovádět rutinní kontrolu krevních derivátů na přítomnost herpetických virů pomocí PCR v případech, kdy jsou podávány imunosuprimovaným pacientům.

V průběhu protinádorové léčby, zejména v leukopenickém období, kdy dochází k nejvýraznějšímu oslabení imunitního systému, je tvorba specifických protilátek opožděná, nebo zcela chybí. Podobná situace je popisovaná u pacientů po transplantaci kostní dřeně nebo po orgánové transplantaci, kdy dochází k silné imunosupresi a protilátkovou odezvu nelze očekávat (3,7,8). Dalším faktorem, který se podílí na falešně negativních sérologických výsledcích je věk pacientů. Zejména u kojenců a batolat do 2 let věku je nedostatečná tvorba specifických IgM protilátek a odhalení akutní CMV infekce je u nich značně obtížné (9). Na základě těchto skutečností, které potvrzuje i námi vyšetřovaný retrospektivní soubor pacientů, jsme v prospektivním souboru zařadili vyšetřování CMV DNA z krve velmi citlivou metodou PCR. Hlavní výhodou této metody, která je úspěšně používána k detekci CMV infekce u pacientů po transplantaci kostní dřeně, orgánové transplantaci a pacientů s AIDS (10,12,13, 15), je vedle vysoké sensitivity a specifity také rychlost vyšetření, což umožňuje v případě potřeby zahájení protivirové léčby již za několik hodin po odběru biologického materiálu. Srovnání retrospektivního a prospektivního souboru ukazuje podstatně vyšší zachyt symptomatické CMV infekce s využitím PCR metody. Nárůst zachytu symptomatické CMV infekce jde na vrub sérologicky zjišťované pozitivní sérokonverze. Ve většině případů byl PCR pozitivní nález potvrzen se zpožděním 1 – 5 týdnů také sérologicky.

Klinický průběh CMV infekce u imunosuprimovaných pacientů lze velmi obtížně odlišit od jiných virových, bakteriálních nebo mykotických infekcí, které navíc mohou probíhat souběžně. O to větší význam má nález specifické DNA daného infekčního agens. Při testování korelace mezi klinickými příznaky CMV infekce a PCR nálezem CMV DNA v leukocy-

tech nebo plasmě, byla u pacientů po transplantaci kostní dřeviny či orgánů největší shoda při testování leukocytů (10,12). Tuto zkušenost můžeme potvrdit i v našem souboru, kdy všichni klinicky symptomatictí pacienti byli pozitivní ze vzorku z plné krve, zatímco pouze jeden měl současně zjištěnou CMV DNA v plasmě.

Závěr

Závěrem lze tedy shrnout, že PCR detekce cytomegalovirové DNA v krvi a ostatních vzorcích biologického materiálu u imunosuprimovaných pacientů může výrazně zpřesnit diagnostiku potíží neznámé etiologie s nejednoznačnou symptomatologií a zlepšit tak možnosti jejich terapie.

Literatura

- Pizzo P.A., Poplack D.G.: Principles and practice of pediatric oncology, ed 3, Philadelphia, JB Lippincott, 1997: 1069-71;
- Chanock S.J., Pizzo P.A.: Infectious complications of patients undergoing therapy for acute leukemia: Current status and future prospects. *Semin. Oncol.* 1997, 24: 132-40;
- Wang F.Z., Dahl H., et al.: Lymphotropic herpesviruses in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1996, 88: 3615-3620;
- Wingard J.R.: Viral infections in leukemia and bone marrow transplant patients. *Leuk. Lymphoma* 1993, 11, p. 115;
- Engelhard D., Marks M.I., Good R.A.: Infections in bone marrow transplant recipients. *J. Pediatr.* 1986, 108: 335-46;
- Alford C.A. Jr., Britt W.J.: Cytomegalovirus. In: Fields B.N., Knipe D.M., Chanock R.M., et al. (eds): *Virology*. New York, Raven Press 1985, 629-60;
- Drew W.L.: Nonpulmonary manifestations of cytomegalovirus infection in immunocompromised patients. *Clin. Microbiol. Rev.* 1992, p. 204-10;
- Reusser P.: Human cytomegalovirus infection and disease after bone marrow and solid organ transplantation. *Bailliere's Clin. Infect. Dis.* 1996, 3: 357-71;
- Stagno S., Tinker M.K., et al.: Immunoglobulin IgM antibodies detected by enzyme-linked immunosorbent assay and radioimmunoassay in the diagnosis of cytomegalovirus infection in pregnant women and newborn infants. *J. Clin. Microbiol.* 1985, 21: 930-5;
- Hebart H., Müller C., et al.: Monitoring of CMV infection: a comparison of PCR from whole blood, plasma-PCR, pp65-antigenemia and virus culture in patients after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1996, 17: 861-8;
- Paya C.V., Wold A.D., Smith T.F.: Detection of cytomegalovirus infections in specimens other than urine by the shell vial assay and conventional tube cell cultures. *J. Clin. Microbiol.* 1987, 25: 755-7;
- Gerna G., Zavattoni M., et al.: Human cytomegalovirus (HCMV) leukoDNAemia correlates more closely with clinical symptoms than antigenemia and viremia in heart and heart-lung transplant recipients with primary HCMV infection. *Transplantation* 1998, 65: 1378-85;
- Souza I.E., Nicholson D., Matthey S., et al.: Detection of human cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes by the polymerase chain reaction and a nonradioactive probe. 1994, 20: 13-19;
- Persing D.H., Smith T.F., Tenover F.C., White T.J., eds.: *Diagnostic molecular microbiology*. Washington. Am. Soc. Microbiol. 1993: 641-50;
- Dendis M., Horváth R., Černý J., Benedík J.: Využití genetických metod při detekci patogenů u komplikací po rozsáhlých chirurgických výkonech. *Ann. Hematol.* 1998, 77: 567-73;
- Anděl J.: Statistické metody. Matfyzpress, Praha 1994: 154-6;
- Einsele H., Ehninger G., et al.: Polymerase chain reaction monitoring reduces the incidence of cytomegalovirus disease and the duration and side effects of antiviral therapy after bone marrow transplantation. *Blood* 1995, 86: 2815-20;
- Jacobson J.A.: Treatment of cytomegalovirus retinitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* 1997, 337: 105-13;
- Reddehase M.J., Dreher-Stump L., et al.: Hematopoietic stem cell deficiency resulting from cytomegalovirus infection of bone marrow stroma. *Ann. Hematol.* 1992, 64: A127-7;
- Taylor-Wiedman J., Sissons J.G., Borysiewicz L.K., Sinclair J.: Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J. Gen. Virol.* 1991, 72: 2059-64;
- Zhuravskaya T., Maciejewski J.P., et al.: Spread of human cytomegalovirus (HCMV) after infection of human hematopoietic progenitor cells: Model of HCMV latency. *Blood* 1997, 90: 2482-91;
- Horváth R., Benedík J., Černý J.: Detection of cytomegalovirus DNA in the walls of blood vessels. *Scripta Med. (Brno)* 1998, 71: 6;
- Michálek J., Horváth R., Benedík J.: Infection of HHV-6 in pediatric cancer patients. *Scripta Med. (Brno)* 1998, 71: 6-7.

knihy

MOLECULAR BIOLOGY IN CANCER MEDICINE, SECOND EDITION

R. KURIRNCK, M. TAIPAZ (Eds.)

Martin Dunitz, London 1999

679 STR., 139 OBR., 97 TAB., ISBN 1-85317-676-1, CENA 65; GBP

Tvorby této aktuální knihy vycházející již ve druhém vydání se účastnilo 68 odborníků převážně z USA a Kanady, méně jsou zastoupeni autoři z Velké Británie, Švédska, Francie, Německa a Itálie. Editory jsou profesori z oddělení bioimunoterapie univerzity v Houstonu. 35 kapitol je uspořádaných do sedmi sekcí, je připojen slovníček použitých odborných výrazů a velmi podrobný rejstřík.

V první sekci je pouze jedna práce zabývající se nomenklaturou a klinickými aplikacemi nádorové cytogenetiky. Je pojednáno o chromosomálních abnormálních u hematologických malignit a maligních lymfoproliferativních onemocnění, o cytogenetice solidních nádorů a molekulární cytogenetice karcinomů. Cytogenetické změny poskytují informace užitečné v diagnostice, prognóze a péči o pacienta. Druhá část o klinických aplikacích laboratorních metod sestává ze dvou kapitol; první je věnována klinickému použití a limitacím běžných molekulárních metodologií, druhá je přehledem o hematopoetickém systému, jeho regulaci a interakcím s hematopoetickými růstovými faktory a elementy, jež se týkají stromat. Ve třetí části o molekulární patogenezi nádorů jsou kapitoly o virech, onkogenech, defektech apoptózy a transkripčních faktorech. Malignity spojené s virovou infekcí se vyznačují dlouhou inkubační dobou mezi infekcí a klinicky poznatelným nádorem, nádorovým postižením jen malé části infikovaných jedinců a známkami účasti jiných genetických nebo environmentálních faktorů. Přímá antivirová terapie může postihnout virové faktory v transformaci buněk a dovolit profylaktickou léčbu infikovaného pacienta za účelem zabránění potenciální malignitě. Kapitoly ve čtvrté části o molekulárních základech hematologických malignit se týkají chronické a akutní myeloidní leukemie, chronické a akutní lymfoidní leukemie a lymfomů řady T a B.

Nejrozsáhlejší je sekce s 12 pojednáními o molekulárních základech solidních nádorů zahrnujícími nádory mozku (se zaměřením hlavně na astrocytomy), nádory prsu, kolorektální tumory, endokrinní nádory, hepatocelulární karcinomy, nádory plic, melanomy, nádory pankreatu a prostaty, epitelální nádory vaječníků, nádory ledvin, sarkomy. Skladba kapitol není příliš jednotná; zatímco např. v kapitole o nádorech plic je text rozdělen do odstavců o klinickém projevu, molekulární patogenezi a klinických aplikacích, kapitola o sarkomech je členěna do těchto částí: epidemiologické a histopatologické úvahy, dědičné syndromy spojené se sarkomy, environmentální faktory a sarkomy s genetickými alteracemi řízení buněčného cyklu. Tematikou posledních dvou částí jsou dědičné nádory (neurofibromatóza typu 1, retinoblastom, Wilmsův tumor, ataxie - teleangiektázie aj.) a genová terapie (léčba akutní promyelocytární leukémie, terapeutický potenciál inhibitorů Ras a inhibice rakovinných genů). Konstatuje se, že o úspěšné genové terapii se dosud nedá hovořit. Pomocí současných technologií se zatím nedaří dosáhnout obnovení funkce tumor-supresorových genů v každé nádorové buňce. Úspěšnějším postupem se zdá být inhibice funkce onkogenů malými molekulami, jež blokují receptory pro růstové faktory. Klinický výzkum věnuje značnou pozornost zlepšování imunogenicity celobuněčných vakcín genetickým inženýrstvím.

Text doprovázený výstižnými ilustracemi a rozsáhlými tabulkami přináší výtečný přehled důležitých molekulárních objevů v oblasti tumorigeneze a celkového pokroku v úsilí o vývoj genových léčebných metod, jež by mohly být zařazeny do spektra rutinně prováděných protinádorových postupů. Jedná se o dílo velmi užitečné pro onkology a hematology ve výzkumu i klinické praxi, pro studenty a účastníky postgraduálního vzdělávání. Na knize lze obdivovat jak vysokou odbornou úroveň, tak i přehledné uspořádání - to je ovšem charakteristické i pro ostatní publikace vydávané nakladatelstvím Martin Dunitz. Pro uživatele prvního vydání z r. 1995 je důležitá informace, že druhé vydání bylo podstatně novelizováno a rozšířeno.

Adresa nakladatelství: Martin Dunitz Ltd, The Livery House, 7 - 9 Pratt Street, London NW 1 London NW1 OAE, UK. V. H.