

Univerzita Karlova Praha

Lékařská fakulta v Plzni

Česká republika

CYTOMEGALOVIROVÁ INFEKCE PO TRANSPLANTACI LEDVINY

MUDr. Tomáš Reischig

I. interní klinika FN a LFUK v Plzeň

Autoreferát disertační práce v oboru vnitřní lékařství

Disertace byla vypracována v rámci kombinované formy doktorského studijního programu na I. interní klinice a chirurgické klinice FN a LFUK Plzeň.

Doktorand: MUDr. Tomáš Reischig

Školitel: Prof. MUDr. Vladislav Třeška, DrSc.
Chirurgická klinika, FN a LFUK Plzeň

Oponenti Prof. MUDr. Ondřej Viklický, CSc.
Klinika nefrologie, IKEM Praha
Doc. MUDr. Josef Zadražil, CSc.
III. interní klinika, FN a Univerzita Palackého Olomouc

Stanovisko k disertaci vypracoval Prof. MUDr. Vladislav Třeška, DrSc.

Autoreferát byl rozeslán dne.....

Obhajoba disertace se koná dne.....v.....hod. před komisí pro obhajoby doktorských disertací
v oboru vnitřní lékařství

S obsahem disertační práce je možno se seznámit na děkanátě lékařské fakulty Univerzity Karlovy
v Plzni, Husova 13

Prof. MUDr. Ondřej Topolčan, CSc.
předseda komise pro obhajoby
ve vědním oboru vnitřní lékařství

1. ORIGINÁLNÍ STUDIE

Disertační práce je založena na třech níže uvedených originálních studiích (I-III), které byly provedeny a publikovány tiskem v době doktorandského studia (2006-2009). Vzhledem k provázanosti s dřívějším výzkumem se stejnou tematikou jsou uvedeny i předchozí publikace, na které je v disertaci odkazováno.

- I. Reischig T, Jindra P, Švecová M, Kormunda S, Opatrný K Jr, Třeška V. The impact of cytomegalovirus disease and asymptomatic infection on acute renal allograft rejection. **J Clin Virol 2006; 36: 146-151.**
- II. Reischig T, Jindra P, Hes O, Švecová M, Klaboč J, Třeška V. Valacyclovir Prophylaxis vs. Preemptive Valganciclovir Therapy to Prevent Cytomegalovirus Disease after Renal Transplantation. **Am J Transplant 2008; 8: 69-77.**
- III. Reischig T, Jindra P, Hes O, Bouda M, Kormunda S, Třeška V. Effect of cytomegalovirus viremia on subclinical rejection or interstitial fibrosis and tubular atrophy in protocol biopsy at 3 months in renal allograft recipients managed by preemptive therapy or antiviral prophylaxis. **Transplantation 2009; 87: 436-444.**
- IV. Reischig T, Opatrný K Jr, Bouda M, Třeška V, Jindra P, Švecová M. A randomized prospective controlled trial of oral ganciclovir versus oral valacyclovir for prophylaxis of cytomegalovirus (CMV) disease after renal transplantation. **Transpl Int 2002; 15: 615-622.**
- V. Reischig T, Jindra P, Mareš J, Čechura M, Švecová M, Hes O, Opatrný K Jr, Třeška V. Valacyclovir for cytomegalovirus prophylaxis reduces the risk of acute renal allograft rejection. **Transplantation 2005; 79: 317-324.**
- VI. Reischig T, Opatrný K Jr, Třeška V, Mareš J, Jindra P, Švecová M. Prospective comparison of valacyclovir and oral ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease in high-risk renal transplant recipients. **Kidney Blood Press Res 2005; 28: 218-225.**

2. SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

Cytomegalovirus je nejčastějším oportunním patogenem u pacientů po transplantaci solidního orgánu. Pokud pacienti nedostávají antivirovou profylaxi nebo preemptivní léčbu, dosahuje incidence aktivní CMV infekce (CMV virémie) až 90% a výskyt symptomatické CMV infekce (CMV nemoc) se pohybuje mezi 20 – 60% s typickým vznikem v období mezi 1. a 4. měsícem po transplantaci. Přestože profylaxe nebo preemptivní léčba významně snižuje výskyt CMV nemoci, výsledky stále nejsou optimální. Klinické problémy činí především vznik pozdní CMV nemoci a resistance ke gancicloviru. Preemptivní léčba nebrání vzniku asymptomatické aktivní infekce, ale i při užití profylaxe je incidence aktivní infekce vysoká (14 – 49%).

Riziko vzniku CMV nemoci je ovlivněno řadou faktorů. Mimořádný význam má CMV sérologie u dárce (D) a příjemce (R) před transplantací. V nejvyšším riziku jsou pacienti v D+/R- skupině. Riziko závisí také na typu transplantovaného orgánu. Role imunosuprese při vzniku CMV nemoci je nepochybná. Přestože je riziko určeno spíše celkovou úrovní imunosuprese než jednotlivými typy imunosupresivních léků, existují některé výjimky. Především se jedná o indukční nebo antirejekční podávání deplečních antilymfocytárních protilátek.

Aktivní CMV infekce je definována kultivačním záchytem CMV v krvi, moči, bronchoalveolární laváži nebo ve tkáni získané biopsií. K detekci CMV se v současné době s úspěchem používají moderní metody jako polymerázová řetězová reakce (PCR) CMV DNA, PCR CMV mRNA (NASBA) nebo CMV pp65 antigenémie, které navíc umožňují kvantitativní stanovení virové nálože. Aktivní CMV infekce může probíhat asymptoticky. CMV nemoc je definovaná jako symptomatická aktivní infekce. Symptomy mohou zahrnovat pouze chřipce či mononukleóze podobný syndrom spolu s hematologickými abnormalitami a elevací jaterních enzymů. Tato forma CMV nemoci se nazývá CMV syndrom. Běžná je však i klinicky mnohem závažnější tkáňově invazivní CMV nemoc s postižením řady orgánů (pneumonitis, gastrointestinální forma, hepatitis, retinitis a další). Přes nepochybné zvýšení morbidity a enormní nárůst finančních nákladů je CMV nemoc díky zavedení gancicloviru v současné době léčitelná a akutní mortalita je velmi nízká. Logicky se pozornost výzkumu zaměřuje na nepřímé dopady CMV. Mezi ně patří i role v patogenezi akutní rejekce a chronické dysfunkce štěpu.

Přestože klinická i experimentální data ukazují na významnou roli CMV při vzniku akutní rejekce štěpu, je vztah mezi CMV a rejekcí je komplikovanější. Akutní rejekce je totiž silný rizikový faktor pro vznik CMV nemoci. Důvodem je nejen posílení imunosuprese při antirejekční terapii, ale především uvolnění prozánětlivých cytokinů při rejekci. Inflamace představuje nejdůležitější způsob aktivace CMV ze stádia latence. Existuje řada studií, které dokumentují, že CMV nemoc a v některých případech i asymptomatická aktivní CMV infekce jsou nezávislé rizikové faktory pro vznik akutní rejekce. Někteří autoři, rovněž s užitím prospektivních dat, však negativní dopad asymptomatické CMV infekce neprokázali. V současné době zůstává nevyřešena především otázka vlivu asymptomatické aktivní CMV infekce. Z klinického pohledu je to velmi důležitý údaj. Pokud by asymptomatická infekce vedla k nárůstu akutní rejekce, znamenalo by to zásadní limitaci užití preemptivní léčby. Hypotéza, že vliv CMV nemoci a asymptomatické CMV infekce bude odlišný, má logický základ. Virová nálož je u CMV nemoci výrazně vyšší než u asymptomatické infekce. S virovou náloží korelují hladiny cytokinů a adhezivních molekul, které jsou významné v patogenezi rejekce.

Chronická rejekce nebo přesněji chronická dysfunkce štěpu má různé obrazy u transplantací jednotlivých orgánů. Po transplantaci ledviny je přítomen histologický nález intersticiální fibrózy

a atrofie tubulů (IFTA). Ve všech případech je základem akcelerovaná arterioskleróza. Nejlépe dokumentovaný vliv CMV je v patogenezi vaskulopatie štěpu po transplantaci srdce, která je charakterizovaná difúzním progresivním zesílením arteriální intimy v hlavních i malých koronárních tepnách transplantátu. V tomto případě se pravděpodobně významně uplatňuje i role CMV při progresi nativní aterosklerózy. Po transplantaci ledviny nejsou výsledky studií tak jednoznačné. Někteří sice prokazují asociaci mezi CMV nemocí a chronickou dysfunkcí štěpu, nicméně v řadě studií pouze současný výskyt akutní rejekce a CMV infekce nebo nemoci vedl k významnému zvýšení rizika IFTA. Přesto je role CMV v patogenezi IFTA pravděpodobná. Nejen pro asociaci přítomnosti virové DNA v biotických vzorcích se zvýšenou tíží IFTA, ale především pro zhoršené dlouhodobé přežívání štěpů u pacientů s předchozí CMV nemocí.

Bylo popsáno několik mechanismů, kterými může CMV indukovat poškození štěpu. Všechny souvisí s chronickou inflamací vyvolanou CMV na systémové úrovni nebo lokálně v tkáni a endotelu štěpu. Časné CMV proteiny mají silné transaktivační schopnosti a vedou ke zvýšené expresi adhezivních molekul a jejich ligand. Podobně bylo dokumentováno zvýšení prozánětlivých cytokinů a chemokinů jako jsou interleukiny 2 a 8, MIP-1 α (macrophage inflammatory protein 1 alpha) nebo MCP-1 (monocyte chemotactic protein 1). Zvýšená exprese adhezivních molekul byla nalezena nejen na infikovaných buňkách, ale i na sousedních neinfikovaných buňkách, což bylo způsobeno parakrinní aktivitou interleukinu 1 β . Molekuly hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) I. a II. třídy jsou nezbytné pro expresi aloantigenů a následný vznik akutní rejekce. CMV infekce u krys vedla k výraznému zvýšení exprese MHC II. třídy na endoteliálních a tubulárních buňkách v ledvině. Kromě toho časné CMV geny kódují protein, který je z velké části homologní s řetězcem HLA-DR β a vede k zkřížené imunologické reaktivitě. Jiný CMV kódovaný protein je homologem MHC I. třídy.

V patogenezi chronické rejekce a arteriosklerózy štěpu se CMV uplatňuje nepřímo ovlivněním výskytu akutní rejekce. Svou roli hraje také zvýšená exprese růstových faktorů jako je TGF- β (transforming growth factor beta), PDGF (platelet-derived growth factor) nebo CTGF (connective tissue growth factor). Nicméně zdá se, že zásadní význam má přímá CMV infekce buněk hladkého svalstva cév a endotelu, která vede k proliferaci hladkého svalstva a poškození produkce syntázy oxidu dusnatého (NO). Při infekci hladkého svalstva dochází k expresi CMV kódovaného chemokinového receptoru US28, který indukuje celulární migraci, což bylo prokázáno jak v in vitro tak v in vivo studiích.

Vzhledem k negativním dopadům CMV nemoci a dostupnosti účinných orálních antivirotik je v současné době univerzální profylaxe aplikovaná v mnoha transplantačních centrech. V profylaxi jsou nejčastěji užívány orální ganciclovir, valganciclovir, valacyclovir a acyclovir. Přestože profylaxe nedokáže zcela eliminovat CMV nemoc, je nutné ji obecně hodnotit jako úspěšnou léčbu s dobrou efektivitou, která vede k významnému snížení incidence CMV nemoci i aktivní CMV infekce u všech typů orgánových transplantací. Ve zvířecím modelu vedla profylaxe ganciclovirem k vymizení vaskulopatie aortálního alograftu a transplantovaného srdce. Bohužel výsledky humánních studií nejsou tak jednoznačné. V recentně publikované meta-analýze randomizovaných kontrolovaných studií hodnotících ganciclovir, valganciclovir, valacyclovir nebo acyclovir v porovnání s placebem či skupinou bez léčby nebyla profylaxe spojena s významnou redukcí akutní rejekce. Efekt profylaxe na akutní rejekce však může být odlišný u různých CMV sérologických kombinací mezi dárcem a příjemcem, rozdíly nelze vyloučit mezi jednotlivými antiviroty. Pacienti léčení valacyclovirem měli významně nižší výskyt akutní rejekce především díky redukcí rejekce u vysoce rizikových pacientů. O tom že příznivý efekt valacycloviru může být větší než u gancicloviru svědčí i naše studie (V). Data o vlivu profylaxe na chronickou rejekci jsou limitovaná. Již bylo zmíněno, že nejlépe je role CMV určena v patogenezi chronické vaskulopatie po transplantaci srdce. V post-hoc analýze randomizované placebem

kontrolované studie bylo zaznamenáno snížení vaskulopatie u pacientů, kteří dostávali ganciclovirovou profylaxi.

3. CÍLE STUDIÍ

- I. V prospektivní studii zjistit, zda CMV nemoc a asymptomatická infekce (virémie) představují nezávislé rizikové faktory pro vznik biopticky verifikované akutní rejekce štěpu u pacientů po transplantaci ledviny v éře moderní imunosuprese a CMV profylaxe.
- II. V randomizované studii porovnat účinnost univerzální profylaxe valacycloviem s preemptivní léčbou valganciclovirem v prevenci CMV nemoci po transplantaci ledviny. Dále byly zkoumány ekonomické aspekty obou preventivních postupů a testována hypotéza, že univerzální profylaxe má příznivý efekt také na nepřímé dopady CMV infekce, především na výskyt akutní rejekce.
- III. V prospektivní studii zkoumat efekt CMV virémie na výskyt subklinické akutní rejekce a časných známek intersticiální fibrózy a atrofie tubulů (IFTA) v protokolární biopsii štěpu 3 měsíce po transplantaci u nemocných, kde byly uplatněny moderní preventivní postupy k omezení výskytu CMV nemoci.

4. HLAVNÍ METODICKÉ ASPEKTY

Všechny klinické studie byly provedeny v rámci transplantačního centra FN v Plzni na I. interní klinice a chirurgické klinice. Pacienti podepsali před transplantací informovaný souhlas se zařazením do konkrétní studie. Studie byly schváleny lokální etickou komisí a byly prováděny v souladu s Helsinskou deklarácí. Detailní metodika prezentovaných studií je popsána v originálních publikacích. Shrnujeme pouze základní metodické aspekty.

V případě studií I a III se jednalo o prospektivní observační studie. Studie II byla designována jako randomizovaná studie se dvěma rameny. Ve všech studiích byli zahrnuti dospělí příjemci transplantované ledviny. Základní kritérium k zařazení byla přítomnost vysokého nebo středního rizika CMV nemoci. Do studie I bylo zahrnuto 106 po sobě jdoucích pacientů, kteří byli sledováni po dobu 1 roku. Část pacientů byla součástí dřívějších randomizovaných studií v našem centru (IV, V). Ve studii II bylo celkem 70 nemocných randomizováno v poměru k preemptivní léčbě valganciclovirem nebo k profylaxi valacycloviem. Do studie III bylo zařazeno 107 pacientů, kteří podstoupili protokolární biopsii štěpu ve 3. měsíci.

CMV infekce byla definována detekcí CMV DNAemie. CMV nemoc byla definována jako symptomatická CMV infekce a zahrnovala CMV syndrom nebo tkáňově invazivní nemoc. Podezření na akutní rejekci bylo vždy před léčbou potvrzeno biopsií. Biopsie byly hodnoceny podle Banffské klasifikace z roku 1997 (I, II) nebo z roku 2005 (III). Subklinické rejekce byly hodnoceny v protokolární biopsii ve 3. měsíci po transplantaci.

U iniciálně zařazených pacientů (I) byla užívána 3 měsíční profylaxe orálním ganciclovirem (Cymevene; Hoffman-La Roche, Basel, Švýcarsko) v dávce 3g/den nebo valacycloviem (Valtrex; Glaxo Wellcome, Velká Británie) v dávce 8g/den s úpravou podle renální funkce. Část pacientů nedostávala profylaxi a byla léčena pouze při vzniku CMV nemoci. V pozdějším období byli všichni pacienti léčeni profylaxí ganciclovirem nebo valacycloviem. V randomizované studii (II)

dostávali pacienti v preemptivní skupině valganciclovir (Valcyte; Hoffman-La Roche, Grenzach-Wyhlen, Německo) při virové náloži ≥ 2000 kopií/mL v plné krvi detekované kvantitativní real-time PCR v dávce 900 mg 2x denně až do dosažení negativního testu PCR CMV DNA. Ve skupině s profylaxí byl užit valacyclovir po dobu 3 měsíců. V poslední studii (III) byli pacienti v různých časových obdobích léčeni profylaxí (orální ganciclovir nebo valacyclovir) nebo preemptivní léčbou. Ve všech studiích byla CMV virémie detekována pomocí PCR z plné krve. Ve studii I bylo využíváno kvalitativní nested PCR, v dalších studiích (II, III) kvantitativní real-time PCR.

5. SOUHRN VÝSLEDKŮ

Vliv CMV nemoci a asymptomatické CMV infekce (CMV virémie) na akutní rejekci (I, IV, V)

V prospektivní studii u 106 po sobě jdoucích pacientů po transplantaci ledviny byl zkoumán dopad CMV nemoci a asymptomatické infekce na vznik biopticky verifikované akutní rejekce štěpu v prvních 12ti měsících. Ke zjištění vlivu CMV nemoci, asymptomatické infekce a dalších proměnných na riziko vzniku akutní rejekce byly provedeny univariální a multivariální analýzy (Kaplan-Meier, Cox proportional hazard model). Asymptomatická CMV infekce vznikla u 23% pacientů, dalších 10% mělo CMV nemoc. Incidence biopticky verifikované akutní rejekce byla 29%. Bylo zjištěno, že CMV nemoc je nezávislý rizikový faktor pro vznik akutní rejekce. Negativní dopad asymptomatické CMV infekce nebyl prokázán. Kromě CMV nemoci byly identifikovány další nezávislé rizikové faktory, které predikovaly vznik rejekce: marginální dárce a vysoký věk dárce. Naopak profylaxe valacyclovirem byla spojena se snížením rizika vzniku akutní rejekce v porovnání s pacienty bez profylaxe. Podobný trend byl i u gancicloviru, nicméně v multivariální analýze nebyl potvrzen. Z této studie vyplývá, že asymptomatická CMV infekce u pacientů s předchozí CMV profylaxí není na rozdíl od CMV nemoci spojena s vyšším rizikem akutní rejekce štěpu.

Preemptivní léčba versus univerzální profylaxe valacyclovirem v prevenci CMV nemoci (II)

V randomizované studii byly porovnány dvě hlavní strategie, které jsou v současnosti užívány ke snížení výskytu CMV nemoci. Pacienti v riziku vzniku CMV nemoci byli před transplantací randomizováni k profylaxi valacyclovirem ($n = 34$) nebo k preemptivní léčbě valganciclovirem ($n = 36$) při výskytu signifikantní CMV DNAémie. PCR CMV DNA bylo prováděno 1x týdně první 4 měsíce po transplantaci a následně v 5., 6., 9. a 12. měsíci. 12ti měsíční incidence CMV DNAémie byla vyšší v preemptivní skupině (92% vs. 59%, $P < 0,001$). Výskyt CMV nemoci byl však srovnatelný (6% vs. 9%, $P = 0,567$). Vznik CMV DNAémie byl u profylaxe oddálen až na období, kdy byla profylaxe ukončena (37 ± 22 vs. 187 ± 110 dní, $P < 0,001$). U pacientů v preemptivní skupině byl zaznamenán signifikantně vyšší výskyt biopticky verifikované akutní rejekce v prvním roce po transplantaci (36% vs. 15%, $P = 0,034$). Přežívání pacientů a štěpu bylo v obou skupinách srovnatelné. Bezpečnostní profil byl příznivý u obou metod s nesignifikantně zvýšeným výskytem halucinací a zmatenosti v časném období po transplantaci u valacycloviru. Ekonomická analýza, která hodnotila pouze náklady přímo spojené s prevencí, monitorací a léčbou CMV, ukázala, že profylaxe valacyclovirem je v našich podmínkách levnější metoda. Průměrné náklady na pacienta dosáhly 63 452 Kč, zatímco v preemptivní skupině 140 329 Kč ($P < 0,001$). V souhrnu studie dokumentovala srovnatelnou účinnost profylaxe a preemptivní léčby v prevenci CMV nemoci. Nicméně zvýšený výskyt rejekcí podporuje hypotézu, že preemptivní léčba může selhávat při prevenci nepřímých dopadů CMV infekce.

Vliv CMV virémie na subklinickou akutní rejekci a rozvoj intersticiální fibrózy a atrofie tubulů (IFTA) (II, III, V)

V prospektivní studii byl zkoumán vliv CMV virémie na incidenci subklinické rejekce a časných známek IFTA v protokolární biopsii 3 měsíce po transplantaci. Do studie bylo zahrnuto 118 po sobě jdoucích pacientů od zahájení programu protokolárních biopsií v našem transplantačním centru. Protokolární biopsii s dostatečným množstvím materiálu se podařilo získat u 102 pacientů. Celkem 60 pacientů dostávalo 3-měsíční profylaxi valacycloviem nebo ganciclovirem, zbylých 42 nemocných bylo vedeno metodou preemptivní léčby. K určení vlivu CMV virémie a dalších relevantních proměnných na výskyt subklinické rejekce a IFTA multivariantní logistická regrese. CMV virémie byla detekována u 41% pacientů. S výjimkou 3 pacientů, u kterých se rozvinul CMV syndrom, byly všechny epizody virémie asymptomatické. Incidence subklinické rejekce (včetně hraničních změn) a IFTA byla 29% a 28%. CMV virémie nezvyšovala riziko vzniku subklinické rejekce (OR = 0,77, P = 0,551), nicméně virémie s virovou náloží ≥ 2000 kopií/mL byla nezávislým rizikovým faktorem pro přítomnost histologického obrazu IFTA (OR = 3,83, P = 0,023). Multivariantní analýza dále identifikovala biopticky verifikovanou akutní rejekci a imunosupresi založenou na sirolimu jako faktory predikující subklinickou rejekci. Opožděná funkce štěpu a věk dárce byly spojeny s nálezem IFTA. Studie dokladuje, že CMV virémie není spojena s vyšší incidencí subklinické rejekce v protokolární biopsii ve 3. měsíci po transplantaci. Virémie se středně vysokou nebo vysokou virovou náloží je však nezávislým rizikem pro vznik IFTA.

6. DISKUZE

CMV nemoc a asymptomatická infekce (CMV virémie) – riziko akutní rejekce? (I)

Výsledky naší studie ukazují, že u pacientů po transplantaci ledviny léčených moderní imunosupresí a z velké většiny i CMV profylaxí nemá asymptomatická CMV infekce vliv na vznik biopticky verifikované akutní rejekce. Na druhou stranu, CMV nemoc byla spojena se zvýšenou incidencí rejekce a predikovala vznik následné rejekce. Podobně jako v naší studii, řada ostatních autorů prokázala, že CMV nemoc zvyšuje riziko akutní rejekce. Kromě toho bylo dokumentováno, že CMV nemoc negativně ovlivňuje přežívání štěpů a pacientů. Data týkající se asymptomatické CMV infekce jsou nekonzistentní. Rozdílný vliv asymptomatické CMV infekce a CMV nemoci na akutní rejekci může být vysvětlen tím, že u asymptomatické infekce je nižší virová nálož, jak bylo dokumentováno i v našem souboru. Zvýšené plasmatické hodnoty řady cytokinů a adhezivních molekul pozitivně korelují s intenzitou virémie.

Naše studie má limitace, které musí být zmíněny. Omezený počet zařazených pacientů mohl ovlivnit především některé negativní nálezy. Na druhé straně prospektivní charakter studie, monitorace CMV aktivity sensitivní metodou i u asymptomatických pacientů a důsledná bioptická diagnostika rejekce dávají k dispozici data vysoké kvality. Incidence biopticky verifikované akutní rejekce byla u pacientů s asymptomatickou CMV infekcí prakticky identická jako u skupiny bez CMV. Navíc žádná epizoda rejekce nevznikla po asymptomatické CMV infekci. Je proto nepravděpodobné, že negativní nálezy byly dány pouze nedostatečně rozsáhlým souborem. Na druhé straně vliv CMV nemoci byl natolik silný, že jsme ho byli schopni prokázat na vysoké hladině statistické významnosti i při poměrně nízké incidenci CMV nemoci v našem souboru. Při absenci protokolárních biopsií studie nedává odpověď na možný vliv CMV nemoci či asymptomatické infekce na subklinickou rejekci (studováno v III).

Vliv CMV profylaxe na výskyt akutní rejekce není vyřešen. V metaanalýze randomizovaných kontrolovaných studií nebyl patrný žádný benefit u profylaxe acyclovirem nebo ganciclovirem. Profylaxe valganciclovirem a ganciclovirem se ve výskytu akutní rejekce neliší, což bylo prokázáno v multicentrické randomizované studii. U valacycloviru jsou data konzistentnější. Snížení akutní rejekce bylo patrné v porovnání s placebem či odloženou léčbou, ale i v přímém srovnání s ganciclovirem. V naší studii byla profylaxe valacyclovirem spojena se signifikantním snížením rizika akutní rejekce. V univariální analýze byl obdobný nálezn zaznamenán i u gancicloviru, byť na hranici statistické významnosti. Neschopnost prokázat signifikantní vliv gancicloviru mohla být ovlivněna velikostí souboru.

Skutečnost, že asymptomatická CMV infekce u skupiny pacientů s profylaxí nemá negativní důsledky na akutní rejekci, je klinicky významná. Akutní rejekce je jedním z hlavních faktorů negativně ovlivňujících dlouhodobé přežívání štěpů. V současnosti široce používané profylaktické režimy s ganciclovirem, valganciclovirem nebo valacyclovirem jsou vysoce účinné v prevenci CMV nemoci, ale asymptomatická replikace CMV se po ukončení profylaxe vyskytuje poměrně často. Podle našich nálezů však minimálně v pohledu na výskyt akutní rejekce nehraje asymptomatická replikace významnou roli.

Profylaxe versus preemptivní léčba v prevenci CMV nemoci (II)

Studie ukazuje, že u neselektované populace po transplantaci ledviny je preemptivní léčba účinná strategie prevence CMV nemoci. Incidence CMV nemoci byla nízká a nelišila se proti univerzální profylaxi valacyclovirem. Nicméně vyšší ekonomické náklady spojené s preemptivní léčbou a především více než dvojnásobně zvýšené riziko biopticky verifikované akutní rejekce jsou znepokojující nálezy.

Optimální způsob prevence CMV infekce po transplantaci je předmětem řady debat se zastánci preemptivní léčby i profylaxe. Pokrok v diagnostice CMV a zavedení valgancicloviru zlepšuje možnost úspěšně aplikovat preemptivní léčbu s potencionálním snížením počtu pacientů exponovaných antivirovým lékům. Rovněž v naší studii jsme u profylaxe zaznamenali zvýšený výskyt halucinací a zmatenosti, leukopenie a neutropenie. Jde o nežádoucí účinky charakteristické pro vysoko dávkovaný valacyclovir. Kontrolovaná virémie s nízkou virovou náloží při preemptivní léčbě facilite rekonstituci CMV specifické imunity. Pozdní CMV nemoc je proto neobvyklá. Naopak po ukončení profylaxe se její incidence pohybuje v širokém rozmezí 3 – 30%. Pozdní CMV nemoc představuje nezávislý rizikový faktor pro mortalitu a selhání štěpu. V naší studii se pozdní CMV nemoc vyskytla u 3 (9%) pacientů. Ve 2 případech předcházela léčba rejekce antilymfocytárními protilátkami. Opětovné nasazení profylaxe po dobu několika týdnů u pacientů s pozdní akutní rejekcí by mohlo vést ke zlepšení výsledků.

Nevýhody preemptivní léčby a naopak výhody spojené s profylaxí jsou neméně významné. Preemptivní léčba je dependentní na spolupráci pacientů a monitoringu CMV aktivity. V našem souboru s dodržením protokolu u drtivé většiny pacientů bylo dosaženo redukce CMV nemoci na úrovni profylaxe. Ostatní však ukázali, že selhání monitoringu ať už z důvodu nespolečné práce pacienta či logistiky v centru vede k vysokému výskytu CMV nemoci. Hlavním problémem preemptivní léčby je nejistá účinnost v prevenci nepřímých dopadů CMV infekce. Naše studie jako první prokázala, že při přímém srovnání je profylaxe valacyclovirem spojena s nižším výskytem akutní rejekce. Lze předpokládat, že příznivý vliv na výskyt rejekce byl dán redukcí CMV DNAemia (tj. virémie) a jejího vlivu na celulární imunitu..

Zajímavé srovnání přináší recentně publikovaná studie Khoury a spol., která porovnávala preemptivní léčbu s profylaxí valganciclovirem. Při obdobné metodice neprokázala snížení akutní

rejekce ve skupině s profylaxí. Zdá se, že při užití velmi intenzivní imunoprese a lepší kvalitě dárců s nízkou celkovou incidencí akutní rejekce, již příznivý vliv profylaxe není prokazatelný. Přestože jde o provokativní hypotézu, stále není možné vyloučit rozdíly mezi (val)ganciclovirem a valacycloviem. Zatímco redukce akutní rejekce byla prokázána v několika randomizovaných studiích s užitím valacycloviru, studie s ganciclovirem stejný efekt nepopsaly.

Profylaxe valacycloviem vedla v porovnání s preemptivní léčbou ke zhruba 50% snížení nákladů přímo asociovaných s CMV managementem. Vzhledem ke snížení výskytu akutní rejekce je ekonomická výhodnost u valacycloviru ještě větší. Naše studie podporuje předchozí ekonomické kalkulace.

Naše studie má limitace. Jednalo se o studii monocentrickou. Při jiné imunopresivní léčbě nebo významných odlišnostech dárců nemusí být výsledky stejné. Léčba v naší studii nebyla zaslepená, což u preemptivní léčby dependentní na monitoraci CMV aktivity představuje technický problém. Na druhou stranu důsledná bioptická diagnostika akutní rejekce, aplikace protokolární biopsie, výborná adherence s protokolem a detailní prospektivní sledování pacientů jsou výhody naší práce. Počty pacientů v riziku primární CMV infekce jsou v naší populaci relativně nízké (~15%) a neumožňují vyvodit adekvátní závěry.

CMV virémie, subklinická rejekce a intersticiální fibróza a atrofie tubulů (IFTA) (III)

Studie jako první přinesla informace o vlivu CMV infekce na subklinickou rejekci a IFTA v souboru pacientů systematicky monitorovaných k detekci CMV virémie, kde navíc byla u všech nemocných podávána CMV profylaxe nebo užitá strategie preemptivní léčby. Hlavním zjištěním je fakt, že CMV virémie není rizikový faktor pro subklinickou rejekci v protokolární biopsii ve 3. měsíci po transplantaci. Na druhou stranu virémie s vyšší virovou náloží přes efektivní supresi preemptivní léčbou zvyšuje více než 3-násobně riziko vzniku IFTA.

Data zkoumající vztah CMV k subklinické rejekci nebo IFTA v protokolární biopsii jsou velmi limitovaná. Ve starší studii byla přítomnost CMV v biopsii štěpu asociována s následnou vaskulopatií v protokolární biopsii v 6. měsíci, ovšem pouze u pacientů s předchozí epizodou akutní rejekce. CMV pp65 antigenémie nebyla spojena se zvýšeným rizikem akutních či chronických histopatologických změn. V naší práci však byly biopsie prováděny ve 3. měsíci, kdy je incidence subklinické rejekce vysoká a rovněž IFTA je dokumentována ve 20 – 40%. Navíc bylo možné díky pravidelnému vyšetřování PCR CMV detekovat i asymptomatickou CMV virémii..

Vztahy mezi CMV a rejekcí mohou být modifikované užitím profylaxe nebo preemptivní léčby. Preemptivní léčba bývá kritizována pro umožnění časně CMV virémie s potenciálním rizikem nepřímých dopadů. Na druhou stranu kontrolovaná virémie facilituje obnovu adekvátní CMV specifické celulární imunity. Detekovatelné CMV specifické CD4 T-lymfocyty v prvním měsíci mají protektivní efekt na vývoj akutní rejekce a vaskulopatie štěpu po transplantaci srdce. Preemptivní léčba proto nemusí být spojena s rizikem akutní rejekce. Randomizované studie srovnávající profylaxi s preemptivní léčbou přinesly konfliktní výsledky.

V našem souboru měli pacienti s CMV virémií výrazně vyšší výskyt biopticky verifikované akutní rejekce (45% vs. 13%), přesto v incidenci ani tíži subklinické rejekce odlišnosti nebyly. Významným faktorem může být doba, kdy je protokolární biopsie prováděna. CMV virémie se objevila zhruba v 5. týdnu po transplantaci a byla efektivně potlačena preemptivní léčbou. V době protokolární biopsie byla virémie přítomna pouze u 15% pacientů. Efekt v biopsii na konci 3. měsíce proto může být zanedbatelný.

Přítomnost IFTA byla v našem souboru asociována s opožděnou funkcí štěpu a vyšším věkem dárce, proměnné reflektující horší kvalitu štěpu v době transplantace s větší vnímavostí k ischemicko-reperfučnímu poškození. IFTA sice nebyla ovlivněná CMV virémií s nízkou virovou náloží, ale předcházející epizoda virémie s vyšší náloží již riziko významně zvyšovala. Tento nález je v souladu s výsledky studie, kdy preemptivní léčba vedla ke srovnatelnému výskytu akutní rejekce jako profylaxe a přesto byla profylaxe spojena se zlepšeným přežíváním štěpů. Stejně tak asociace časně CMV infekce a nemoci se selháním štěpu dokladuje etiologickou úlohu CMV při rozvoji chronické dysfunkce štěpu. Nerozpoznaná transientní inflamace ve štěpu mediovaná CMV virémií může být vysvětlením pro rozvoj IFTA.

Výhodou naší studie je prospektivní sledování a monitorace CMV aktivity u všech pacientů. Je však třeba upozornit na limitace našich dat. Studie opět nemá dostatečnou statistickou sílu k hodnocení nemocných v riziku primární CMV infekce. Rovněž nehodnotila CMV virémii, která se objevuje až po ukončení profylaxe. Přestože pozdní asymptomatická virémie nezvyšovala riziko akutní rejekce, její význam v progresi IFTA zkoumán nebyl (I). Naše nálezy jsou důležité z klinického pohledu. Subklinická rejekce, IFTA a především kombinace obou je spojena se zhoršenou renální funkcí štěpu a redukováným přežíváním. Naše studie nastoluje otázku optimální hodnoty virové nálože pro zahájení intervence preemptivní léčbou. Hodnota 2000 kopií/mL plné krve užitá u našich nemocných byla sice postačující k zabránění vzniku CMV nemoci, ale nikoliv nepřímých dopadů CMV jako je IFTA.

7. ZÁVĚRY

Z výše uvedených klinických studií zkoumající význam CMV infekce a možnosti její prevence po transplantaci ledviny vyvozujeme následující závěry:

- CMV nemoc je nezávislý rizikový faktor pro vznik biopticky verifikované akutní rejekce i v éře moderní imunosuprese. Naopak asymptomatická CMV infekce (virémie) negativní dopad v tomto ohledu nemá.
- Profylaxe CMV nemoci valacyclovirem v porovnání s nemocnými bez profylaxe vede k nižší incidenci biopticky verifikované akutní rejekce. Podobný efekt není prokazatelný u gancicloviru.
- Preemptivní léčba valganciclovirem založená na monitoraci CMV aktivity pomocí kvantitativního real-time PCR je stejně efektivní v prevenci CMV nemoci jako 3-měsíční profylaxe valacyclovirem. Preemptivní léčba je však spojena s vyšším výskytem akutní rejekce.
- V našich ekonomických podmínkách je profylaxe valacyclovirem levnější léčebnou metodou než preemptivní léčba. Redukce nákladů představuje zhruba 50%.
- CMV virémie u pacientů léčených CMV profylaxí nebo preemptivní léčbou nepředstavuje riziko pro vznik subklinické rejekce v protokolární biopsii 3 měsíce po transplantaci.
- CMV virémie s virovou náloží ≥ 2000 kopií/mL je spojena se 4-násobně vyšším výskytem IFTA v protokolární biopsii..

8. VÝBĚR POUŽITÉ LITERATURY

- Radha R, Jordan S, Paliyanda D, et al. Cellular immune responses to cytomegalovirus in renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2005; 5: 110-117.
- Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 2004; 351: 2715-2729.
- Fishman JA. Infection in solid-organ transplant recipients. *N Engl J Med* 2007; 357: 2601-2614.
- Brennan DC, Garlock KA, Singer GG, et al. Prophylactic oral ganciclovir compared with deferred therapy for control of cytomegalovirus in renal transplant recipients. *Transplantation* 1997; 64: 1843-1846.
- Lowance D, Neumayer HH, Legendre CM, Squifflet JP, et al. Valacyclovir for the prevention of cytomegalovirus disease after renal transplantation. *N Engl J Med* 1999; 340: 1462-1470.
- Reischig T, Jindra P, Mares J, et al. Valacyclovir for cytomegalovirus prophylaxis reduces the risk of acute renal allograft rejection. *Transplantation* 2005; 79: 317-324.
- Preiksaitis JK, Brennan DC, Fishman J, Allen U. Canadian Society of Transplantation Consensus Workshop on cytomegalovirus management in solid organ transplantation final report. *Am J Transplant* 2005; 5: 216-227.
- Hodson EM, Jones CA, Webster AC, et al. Antiviral medication to prevent cytomegalovirus disease and early death in recipients of solid-organ transplants: a systemic review of randomised controlled trials. *Lancet* 2005; 365: 2105-2115.
- Paya C, Humar A, Dominguez E, et al. Efficacy and safety of valganciclovir vs. oral ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2004; 4: 611-620.
- Li H, Dummer S, Estes WR, Meng S, Wright PF, Tang YW. Measurement of human cytomegalovirus loads by quantitative real-time PCR for monitoring clinical intervention in transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 187-191.
- Razonable RR, Rivero A, Rodriguez A, et al. Allograft rejection predicts the occurrence of late-onset cytomegalovirus (CMV) disease among CMV-mismatched solid organ transplant patients receiving prophylaxis with oral ganciclovir. *J Infect Dis* 2001; 184: 1461-1464.
- Reinke P, Prosch S, Kern F, Volk HD. Mechanisms of human cytomegalovirus (HCMV) (re)activation and its impact on organ transplant patients. *Transplant Infect Dis* 1999; 1: 157-164.
- Sagedal S, Nordal KP, Hartmann A, et al. The impact of cytomegalovirus infection and disease on rejection episodes in renal allograft recipients. *Am J Transplant* 2002; 2: 850-856.
- Dickenmann MJ, Cathomas G, Steiger J, et al. Cytomegalovirus infection and graft rejection in renal transplantation. *Transplantation* 2001; 71: 764-767.

Koskinen PK, Tikkanen JM, Pulkkinen VP, Häyry PJ, Lemström KB. Cytomegalovirus-induced allograft vascular disease. *Curr Opin Organ Transplant* 2000; 5: 192-196.

Emery VC, Sabin CA, Cope AV, Gor D, Hassan-Walker AF, Griffiths PD. Application of viral-load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation. *Lancet* 2000; 355: 2032-2036.

Nordøy I, Müller F, Nordall KP, Rollag H, Aukrust P, Frøland SS. Chemokines and soluble adhesion molecules in renal transplant recipients with cytomegalovirus infection. *Clin Exp Immunol* 2000; 120: 333-337.

Valantine HA. The role of viruses in cardiac allograft vasculopathy. *Am J Transplant* 2003; 4: 169-177.

Smieja M, Gnarpe J, Lonn E, et al. Multiple infections and subsequent cardiovascular events in the Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Study. *Circulation* 2003; 107: 251-257.

Tong CYW, Bakran A, Peiris JSM, Muir P, Herrington CS. The association of viral infection and chronic allograft nephropathy with graft dysfunction after renal transplantation. *Transplantation* 2002; 74: 576-578.

Humar A, Gillingham KJ, Payne WD, Dunn DL, Sutherland DER, Matas AJ. Association between cytomegalovirus disease and chronic rejection in kidney transplant recipients. *Transplantation* 1999; 68: 1879-1883.

Helenterä I, Koskinen P, Törnroth T, Loginov R, Grönhagen-Riska C, Lautenschlager IT. The impact of cytomegalovirus infection and acute rejection episodes on the development of vascular changes in 6-month protocol biopsy specimens of cadaveric kidney allograft recipients. *Transplantation* 2003; 75: 1858-1864.

Sebekova K, Feber J, Carpenter B, et al. Tissue viral DNA is associated with chronic allograft nephropathy. *Pediatr Transplant* 2005; 9: 598-603.

Schnitzler MA, Lowell JA, Hmiel SP, et al. Cytomegalovirus disease after prophylaxis with oral ganciclovir in renal transplantation: the importance of HLA-DR matching. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 780-785.

Sagedal S, Hartmann A, Nordal KP, et al. Impact of early cytomegalovirus infection and disease on long-term recipient and kidney graft survival. *Kidney Int* 2004; 66: 329-337.

Borchers AT, Perez R, Kaysen G, Ansari AA, Gershwin ME. Role of cytomegalovirus infection in allograft rejection: a review of possible mechanisms. *Transplant Immunol* 1999; 7: 75-82.

46. Waldman WJ, LeClaire JD, Knight D. T-cell activation response to allogeneic CMV-infected endothelial cells is not prevented by ganciclovir or foscarnet: implications for transplant vascular sclerosis. *Transplantation* 2002; 73: 314-318.

Dengler TJ, Raftery MJ, Werle M, Zimmermann R, Schönrich G. Cytomegalovirus infection of vascular cells induces expression of pro-inflammatory adhesion molecules by paracrine action of secreted interleukin-1 β . *Transplantation* 2000; 69: 1160-1168.

Beck S, Barrell BG. Human cytomegalovirus encodes a glycoprotein homologous to MHC class-I antigens. *Nature* 1988; 331: 269-272.

Streblow DN, Soderberg-Nauclear C, Vieira J, et al. The human cytomegalovirus chemokine receptor US28 mediates vascular smooth muscle cell migration. *Cell* 1999; 99: 511-520.

Streblow DN, Kreklywich CN, Smith P, et al. Rat cytomegalovirus-accelerated transplant vascular sclerosis is reduced with mutation of chemokine-receptor R33. *Am J Transplant* 2005; 5: 436-442.

Opelz G, Döhler B, Ruhenstroth A. Cytomegalovirus prophylaxis and graft outcome in solid organ transplantation: a Collaborative Transplant Study report. *Am J Transplant* 2004; 4: 928-936.

Valantine HA, Gao SZ, Menon SG, et al. Impact of prophylactic immediate posttransplant ganciclovir on development of transplant atherosclerosis. *Circulation* 1999; 100: 61-66.

Nett PC, Heisey DM, Fernandez LA, Sollinger HW, Pirsch JD. Association of cytomegalovirus disease and acute rejection with graft loss in kidney transplantation. *Transplantation* 2004; 78: 1036-1041.

Piiparinen H, Hockerstedt K, Gronhagen-Riska C, Lautenschlager I. Comparison of two quantitative CMV PCR tests, Cobas Amplicor CMV Monitor and TaqMan assay, and pp65-antigenemia assay in the determination of viral loads from peripheral blood of organ transplant patients. *J Clin Virol* 2004; 30: 258-266.

Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am J Transplant* 2004; 4: 378-383.

Fishman JA, Emery V, Freeman R, et al. Cytomegalovirus in transplantation – challenging the status quo. *Clin Transplant* 2007; 21: 149-158.

Singh N. Antiviral drugs for cytomegalovirus in transplant recipients: advantages of preemptive therapy. *Rev Med Virol* 2006; 16: 281-287.

Arthurs SK, Eid AJ, Pedersen RA, et al. Delayed-onset primary cytomegalovirus disease and the risk of allograft failure and mortality after kidney transplantation. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 840-846.

Khoury JA, Storch GA, Bohl DL, et al. Prophylactic versus preemptive oral valganciclovir for the management of cytomegalovirus infection in adult renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2006; 6: 2134-2143.

Künzle N, Petignat C, Francioli, et al. Preemptive treatment approach to cytomegalovirus (CMV) infection in solid organ transplant patients: relationship between compliance with the guidelines and prevention of CMV morbidity. *Transplant Infect Dis* 2000; 2: 118-126.

Legendre CM, Norman DJ, Keating MR, Maclaine GDH, Grant DM. Valaciclovir prophylaxis of cytomegalovirus infection and disease in renal transplantation: an economic evaluation. *Transplantation* 2000; 70: 1463-1468.

Nankivell BJ, Chapman JR. The significance of subclinical rejection and the value of protocol biopsies. *Am J Transplant* 2006; 6: 2006-2012.

Tu W, Potena L, Stepick-Biek P, et al. T-cell immunity to subclinical cytomegalovirus infection reduces cardiac allograft disease. *Circulation* 2006; 114: 1608-1615.

Kliem V, Fricke L, Wollbrink T, Burg M, Rademacher J, Rohde F. Improvement in long-term renal graft survival due to CMV prophylaxis with oral ganciclovir: results of randomized clinical trial. *Am J Transplant* 2008; 8: 975-983.

Nankivell BJ, Borrows RJ, Chir B, et al. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003; 349: 2326-2333.

9. SUMMARY

Cytomegalovirus (CMV) disease is a common infectious complication in patients after solid organ transplantation. The last decade witnessed major advances in CMV disease prevention. Use of universal prophylaxis or preemptive therapy resulted in a decrease in the incidence of CMV disease from 20-60% to 5-20%. However, the efficacy of preventive approaches in terms of indirect effects of CMV occurrence is problematic. Association with allograft rejection belongs to well documented and clinically extremely important indirect effects of CMV with a prolonged adverse impact on graft survival. Potential mechanisms include overexpression of major histocompatibility complex molecules, growth factors and cytokines, and upregulation of adhesion molecules. A number of questions remain to be answered in evaluating CMV as a risk factor for acute rejection. While CMV disease is associated with an increased incidence of acute rejection, data regarding the role of asymptomatic CMV viremia are controversial. In our research we evaluated the role of CMV in pathogenesis of allograft rejection in the era of modern immunosuppression and CMV prophylaxis as well as optimal preventive strategy to minimize impact of CMV. In the first trial, renal transplant (RTx) recipients were followed prospectively for 12 months to determine the impact of CMV disease and asymptomatic viremia on biopsy-proven acute rejection. By multivariate Cox proportional hazard model CMV disease was an independent risk factor for acute rejection, while asymptomatic CMV infection was not. Moreover, valganciclovir prophylaxis decreased the risk of rejection. In the next study RTx recipients at risk for CMV were randomized to 3-month prophylaxis with high-dose valganciclovir or preemptive therapy with valganciclovir for significant CMV viremia. The 12-month incidence of CMV viremia was higher in the preemptive group while the incidence of CMV disease was not different. The onset of CMV viremia was delayed in the valganciclovir group. Significantly higher rate of biopsy-proven acute rejection was observed in the preemptive group. The average CMV-associated costs per patient were \$5525 and \$2629 in preemptive therapy and valganciclovir, respectively. The aim of the last prospective study was to determine the impact of CMV viremia on subclinical rejection and interstitial fibrosis and tubular atrophy (IFTA) in protocol biopsy at 3 months after transplantation in patients managed by three-month prophylaxis (valganciclovir or ganciclovir) or by preemptive therapy. Multivariate logistic stepwise regression was used to estimate the effect of CMV viremia and other covariates on subclinical rejection and/or IFTA. CMV viremia was not a risk factor for subclinical rejection; however, viremia of ≥ 2000 copies/mL increased the risk of IFTA. In conclusion, our studies showed that (1) CMV disease, but not asymptomatic infection, is an independent risk factor for biopsy proven acute rejection during the first 12 months post-RTx. in patients managed by prophylaxis; (2) preemptive valganciclovir therapy and valganciclovir prophylaxis are equally effective in the prevention of CMV disease after RTx, however, higher risk of acute rejection in preemptive therapy is of a concern; (3) CMV viremia is not an independent risk factor for subclinical rejection while CMV viremia with viral load of ≥ 2000 copies/mL is associated with increased risk of IFTA in protocol biopsy at 3 months after RTx.