

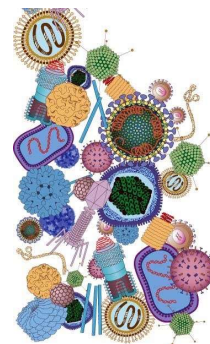


Problematika viru Epstein-Barrové a lidského cytomegaloviru

Petr Hubáček



Rovnováha u imunosuprimovaného pacienta



Imunitní systém
(imunosupresivní léčba, chemoterapie, ...)



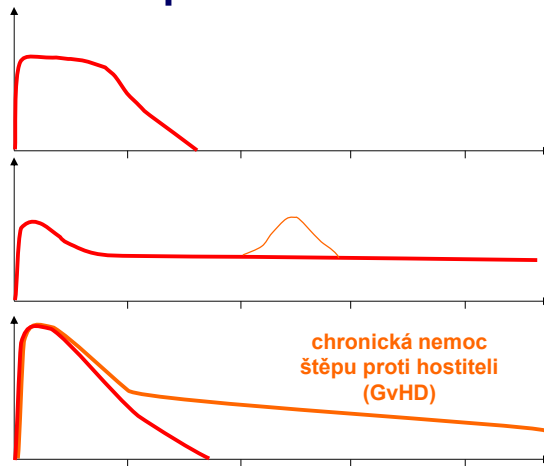
Patogeny
Regulované lymfocyty – viry, mykózy

V případně transplantace - imunosuprese

Maligní onemocnění

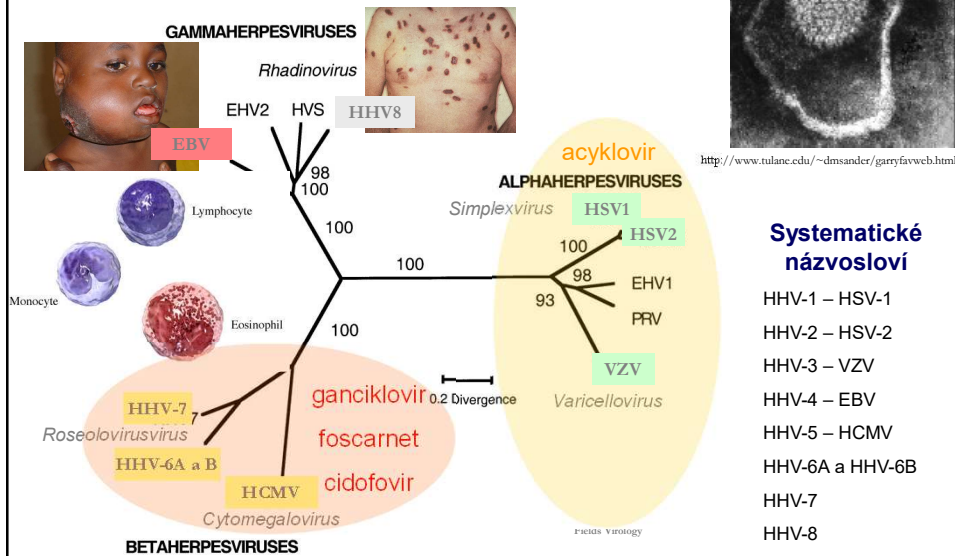
Solidní orgánové Tx.
příp. autoimunity

Transplantace
kmenových buněk
krvetořby



Zvláštní situace je u primárních imunodeficitů, HIV pozitivních, případně těhotných.

Taxonomie



Schopnost latence a reaktivace po primoinfekci

Objev EBV

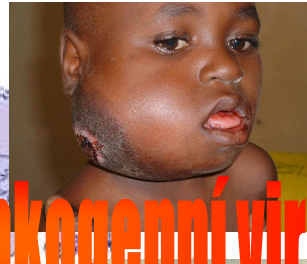


chirurg

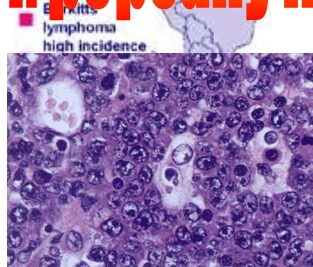
Denis Parsons Burkitt

1958

„A sarcoma involving the jaws of African children.“ *British Journal of Surgery*



1. popsaný lidský onkogenní virus



Burkitt's lymphoma high incidence

1961

„The Commonest Children's Cancer in Tropical Africa — A Hitherto Unrecognised Syndrome.“

1963 - 1. kultivace viru

1964 – Publikováno v Lancet: „Cultivation in vitro of human lymphoblasts from Burkitt's malignant Lymphoma“



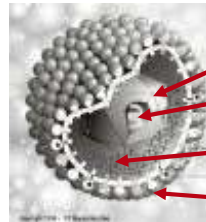
Michael Anthony Epstein (*1921) Patolog, specialista na elektronovou mikroskopii

Yvonne M. Barr (*1932)

Bert Geoffrey Achong (1928-1996)

Stavba EBV – HHV-4

- Obalený ds DNA virus
- Člen γ -herpesvirové rodiny
- Ikosahedrální kapsida (přibližně 100 nm \varnothing)
- Genom 172 Kbp
- Kóduje 94 virových proteinů
- Receptor CD21-CR2

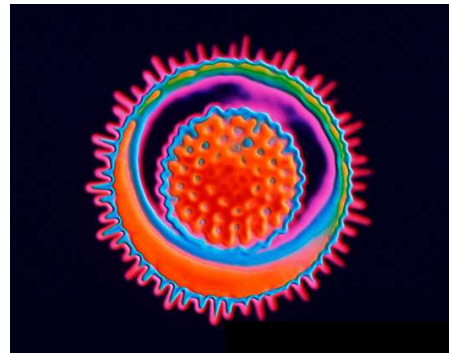
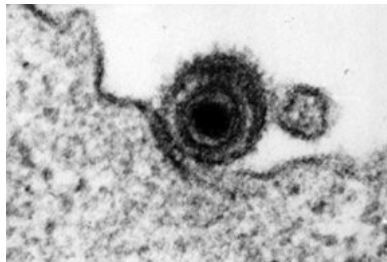


kapsida

DNA

tegument

glykoproteiny

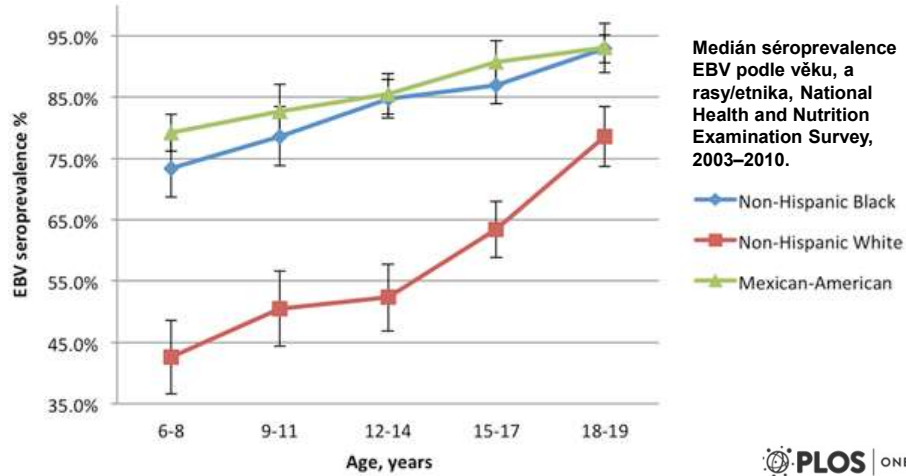


Přenos a epidemiologie

Přenos pomocí tělesných slin orální cestou

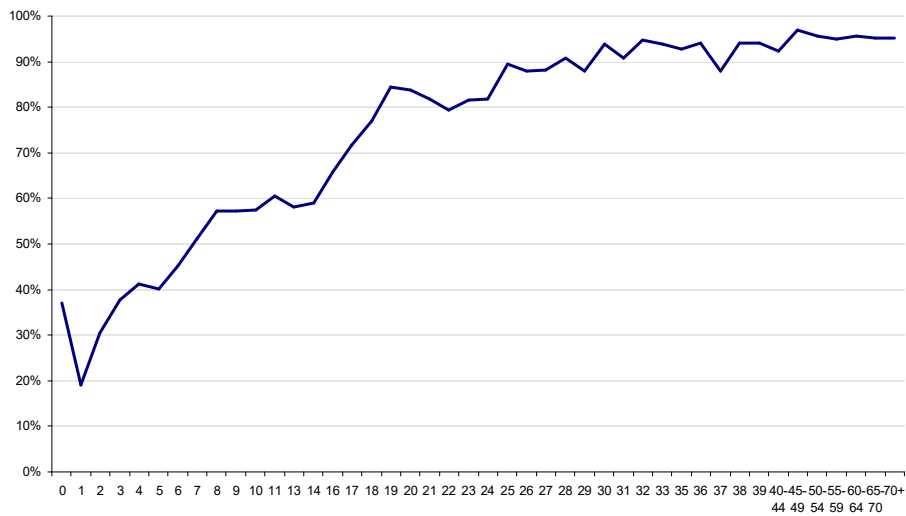
(permissivní buňky: B lymfocyty a epitelální buňky)

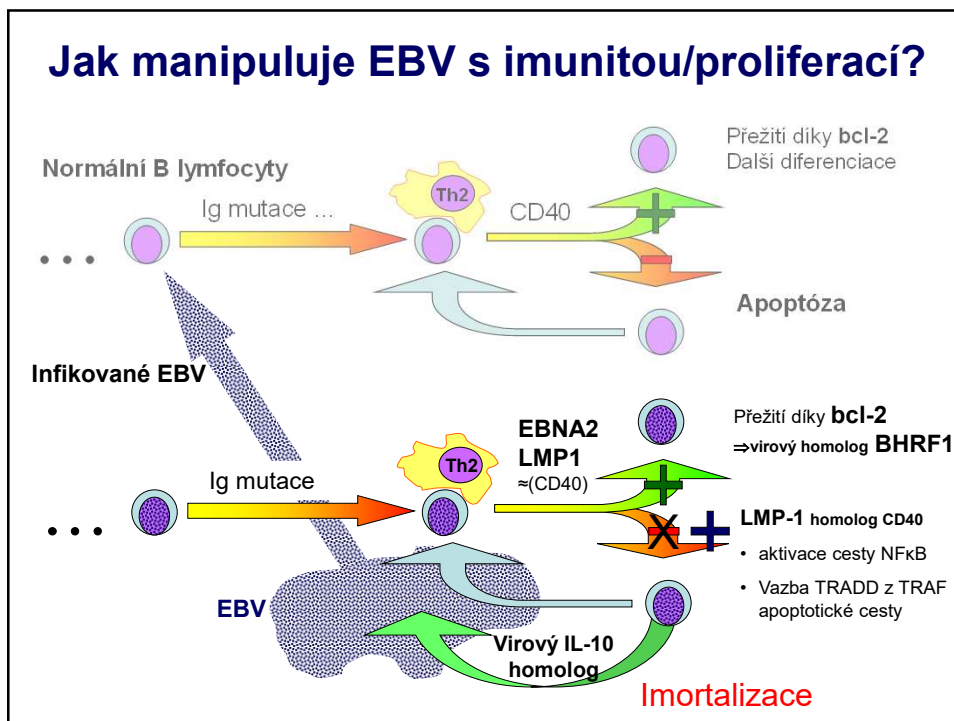
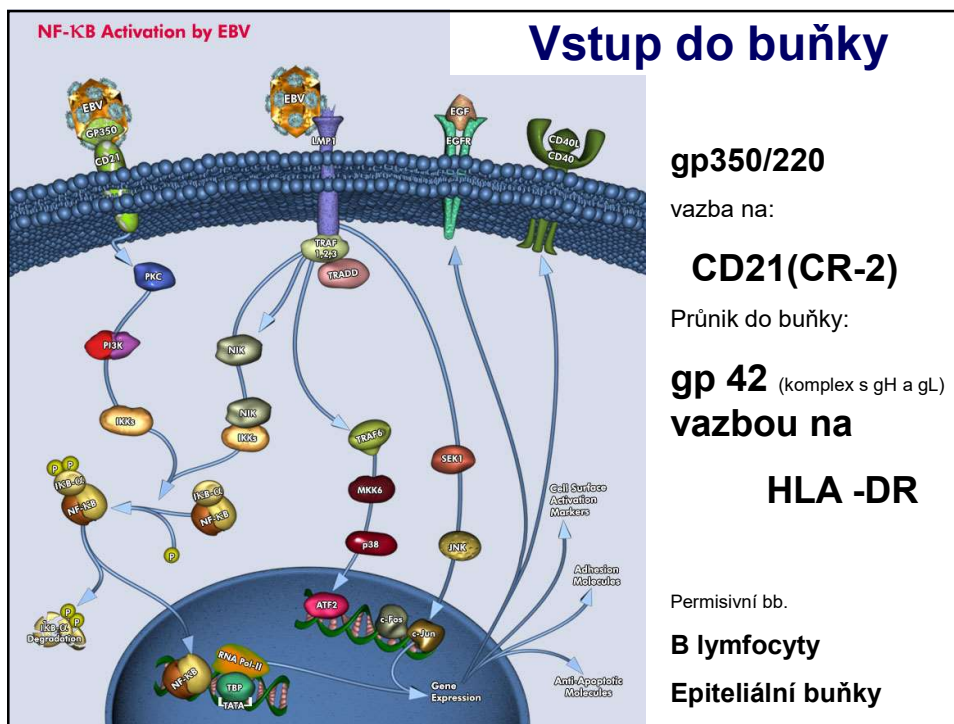
80 - 90% dospělé populace je seropozitivní (v rozvojových zemích pak 90% dětí starších 2 let)



Dowd JB, Palermo T, Brite J, McDade TW, et al. (2013) Seroprevalence of Epstein-Barr Virus Infection in U.S. Children Ages 6-19, 2003-2010. *PLoS ONE* 8(5): e64921. doi:10.1371/journal.pone.0064921

Přenos a epidemiologie ve FNM





Jak manipuluje EBV s imunitou/proliferací?

EBNA-1	Sequence-specific DNA-binding protein to EBV element; sequence-nonspecific chromosome association protein; transactivator of viral latent genes and host genes; responsible for episome replication, segregation and persistence of viral genome; <u>involved in p53 degradation and oncogenesis</u>
EBNA-LP	Transcriptional coactivator of EBNA-2-dependent viral and cellular gene transcription; primarily indirectly associates with host DNA sites located at or near the transcriptional start; associates with cellular transcriptional (co)factors and EBNA-2; <u>dismisses repressor complex from promoter or enhancer sites; is essential for EBV-mediated B-cell transformation</u>
EBNA-2	Together with EBNA-LP cooperatively activates viral and cellular gene transcription for transformation; primarily indirectly associates with host DNA sites located at the enhancer or intergenic region; associates with cellular transcriptional (co)factors and EBNA-LP; <u>is critical for EBV-mediated B-cell transformation</u>
EBNA-3A	A coactivator of EBNA-2, EBNA-3A and EBNA-3C associations with RBPJ inhibit RBPJ recruitments to DNA; downregulate cMyc transcription and block EBNA-2 activation effects; and <u>induce CDKN2 and chemokines. Induces G1 arrests, which is essential for EBV-mediated B-cell transformation</u>
EBNA-3B	A coactivator of EBNA-2; dispensable for B-cell transformation; viral tumor suppressor; and upregulates CXCL10. EBNA-3B-knockout induces DLBCL-like tumors
EBNA-3C	Coactivates with EBNA-2 host <u>CXCR4 and CXCL12</u> genes; induces CDKN2, chemokines and aurora kinase B; mediates RB degradation; attenuates H2AX expression and overcomes EBV-infection-mediated DNA damage response; promotes cell proliferation; <u>induces G1 arrests; essential for EBV-mediated B-cell transformation</u>
LMP-1	Mimics the constitutively active form of CD40, a major EBV-encoded oncogene; activates NF- κ B, JNK and p38 pathways; is critical for EBV-mediated B-cell transformation, a major EBV-encoded oncogene; activates NF- κ B, JNK and p38 pathways; and induces EMT of NPC and acquisition of CSC-like properties
LMP-2A	Mimics constitutively active, antigen-independent BCR signaling through constitutive activation of the ERK/MAPK pathway224; blocks antigen-dependent BCR signaling; induces B-cell lymphoma in transgenic condition; is important but not essential for <i>in vitro</i> primary B-lymphocyte growth transformation; rescues the LMP-1-generated impairment in germinal center in the response to antigen in animals; confers resting B cells sensitive to NF- κ B inhibition and apoptosis; suppresses differentiation and promotes epithelial cell spreading and motility in epithelial cells; and <u>enriches cancer stem cell-like population</u>
EBER	Most abundant EBV-encoded noncoding RNAs; augments colony formation and induces growth; confers cells resistance to PKR-mediated apoptosis; induces cytokines and modulates innate immune response; binds to La, PKR, L22, PRR and RIG-I; and EBER-mediated RIG-I activation likely contributes to EBV oncogenesis. EBER blockades of PKR-mediated phosphorylation of eIF2 α results in blockage of eIF2 α -mediated inhibition of protein synthesis and resistance to IFN α -induced apoptosis

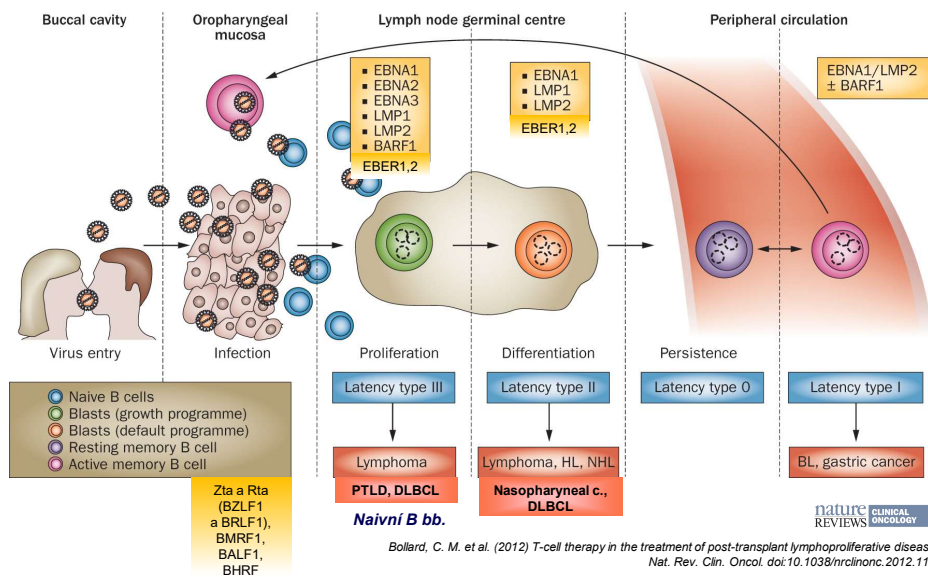
miRNAs

Transcribed from BART and BHRF1; validated targets include Bim, BRUCE, CXCL11, DICER1, PUMA; has a role in sustaining latently infected cells. BHRF1 miRNA and BART miRNAs interfere with apoptosis. The miR-BART15-3p promoted apoptosis 331

Experimental & Molecular Medicine (2015) 47,

Jak manipuluje EBV s imunitou/proliferací? (Antigeny a latence)

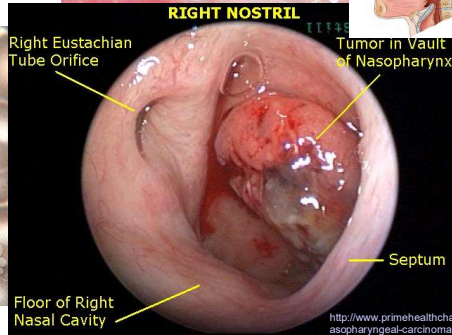
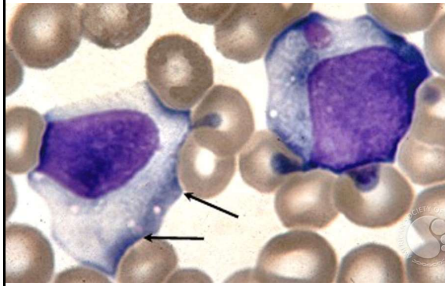
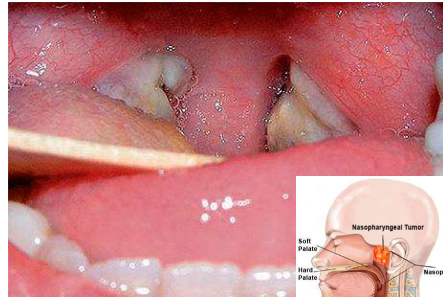
Latence v 1 z 10e6 bb.



Patologické působení EBV

•Imunokompetentní hostitel

- Infekční mononukleóza
- Chronická aktivní EBV infekce
- X-vázaná lymfoproliferativní nemoc
- Maligní onemocnění
 - Hodgkinova nemoc
 - Burkittův lymfom
 - non-Hodgkinský T/NK lymfom
 - Nasopharyngeální karcinom
 - Karcinom žaludku
 - Angioblastický T lymfom

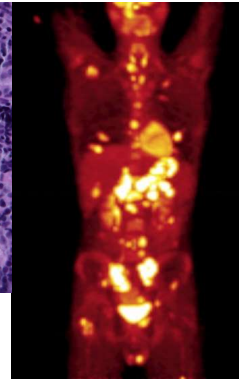
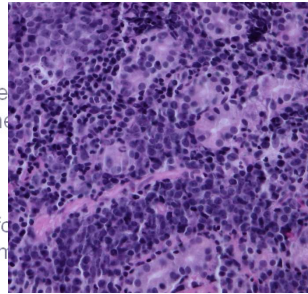


<http://www.primehealthcare.com/nasopharyngeal-carcinoma.html>

Patologické působení EBV

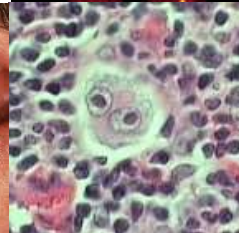
•Imunokompetentní hostitel

- Infekční mononukleóza
- Chronická aktivní EBV infekce
- X-vázaná lymfoproliferativní nemoc
- Maligní onemocnění
 - Hodgkinova nemoc
 - Burkittův lymfom
 - non-Hodgkinský T/NK lymfom
 - Nasopharyngeální karcinom
 - Karcinom žaludku
 - Angioblastický T lymfom



•Imunokompromitovaný hostitel

- Vlasatá leukoplakie
- Případně výše uvedené malignity
- Post-transplantační lymfoproliferativní nemoc (EBV-LPD)
- Encefalitida/myelitis, pneumonie, hepatitis



<http://www.keom.edu/faculty/chamberlain/Website/lectures/lecture/aids.htm>

www.med-ed.virginia.edu/courses/path/innes/wcd/hodgkin

Infekční mononukleóza

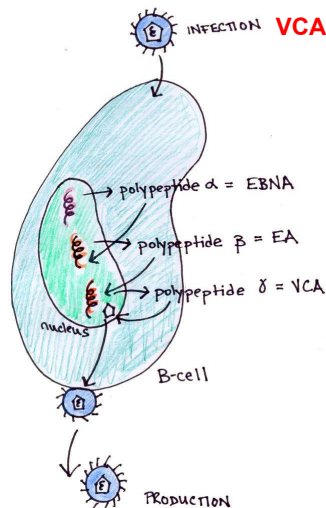
- „Kissing disease“
- proliferace postihuje slezinu a játra a uzliny
- celková únava, trvající až několik týdnů, zvýšená teplota až horečky (běžně kolem 39 °C), zánět nosohltanu a zvětšení uzlin (podčelistních a krčních); hepatosplenomegalie, hepatopatie, otoky víček a bličeje, nechutenství
- inkubační doba je 4-6 týdnů
- zpočátku vypadá „angína“
- přenos slinami
- léčba trvá přibližně 6 měsíců klid a dieta (2-3 měsíce); následně je nutno se fyzicky šetřit



<http://home.teleport.com/~bobh/InfectiousMononucleosis.htm>

EBV antigeny

SYNTHESIS OF VIRAL ANTIGENS



EBNA – EBV associated nuclear antigens (LP, 1, 2, 3A, 3B, 3C)

EBNA 1 – udržuje cirkulární formu EBV v buňce v době latence

EBNA 2 – hlavní spouštěč kaskády vedoucí k bb. transformaci

LMP1 – Latentní membránový protein 1

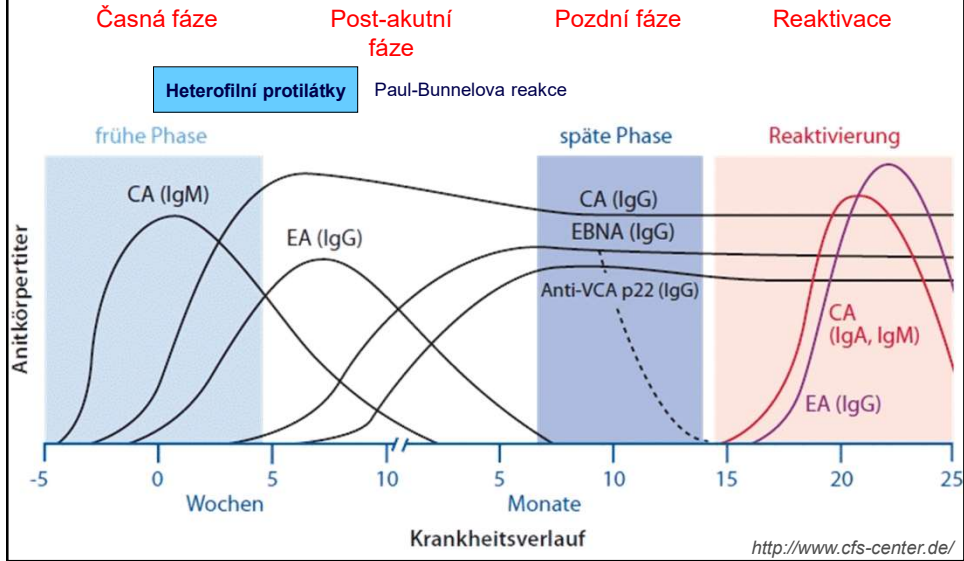
Early Antigen (EA) – objevuje se před virovou replikací

Viral Capsid antigen (VCA) – objevuje se po virové replikaci

http://www.brown.edu/Courses/Bio_160/Projects2000/Herpes/EBV/Virology.html

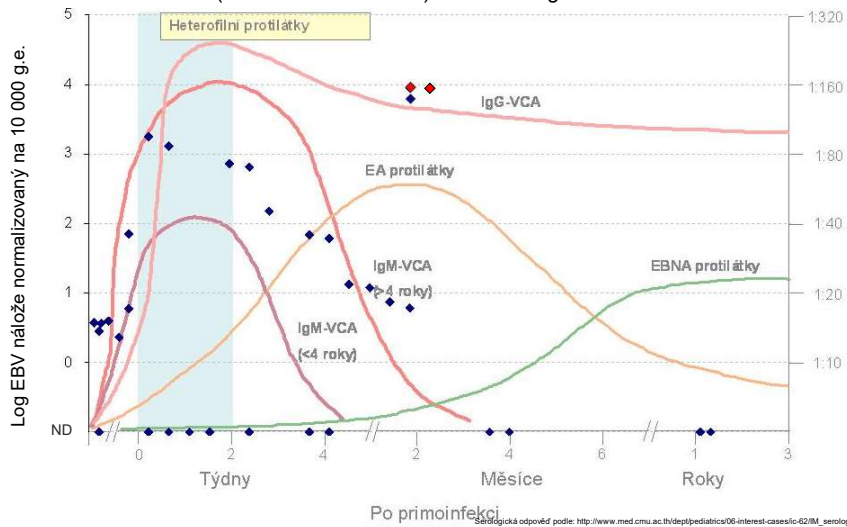
Diagnostika

Základní diagnóza EBV infekce je sérologická - nepřímá.



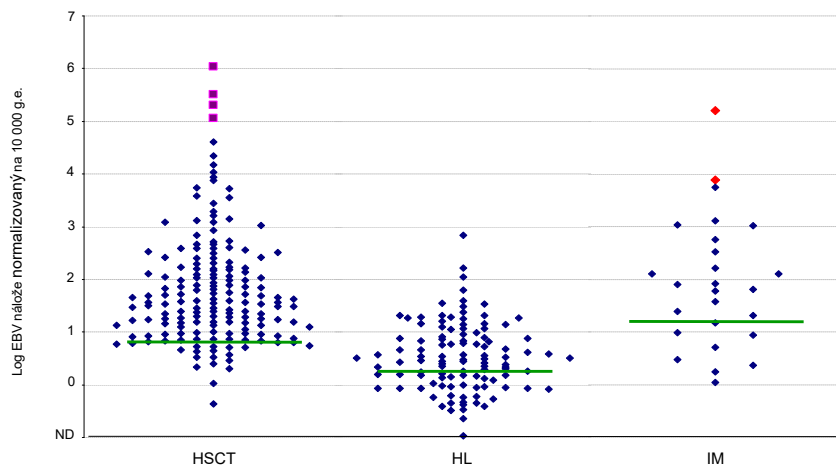
Pacienti s diagnózou B27 - IM

- Pozitivních – 26 pacientů (62%)
 - 50 vzorků pozitivních (65%); medián positivity 110 (rozmezí 11-157 6670) ve 100 000 g.e.



Přímá detekce - PCR

- Detekce v periferní krvi (plasma, plná krev), případně v tkáni
- U HL i IM se EBV vyskytuje v periferní krvi především v nízkých kvantitách.
- Mediány detekovaných kvantit v plné krvi stoupaly od HL → HSCT → IM



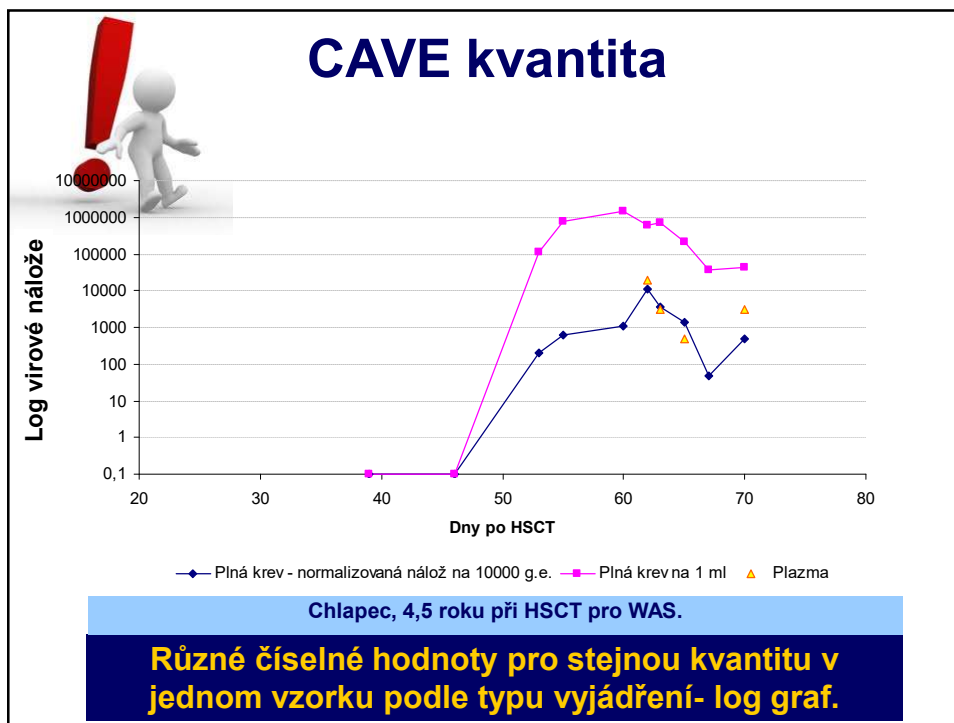
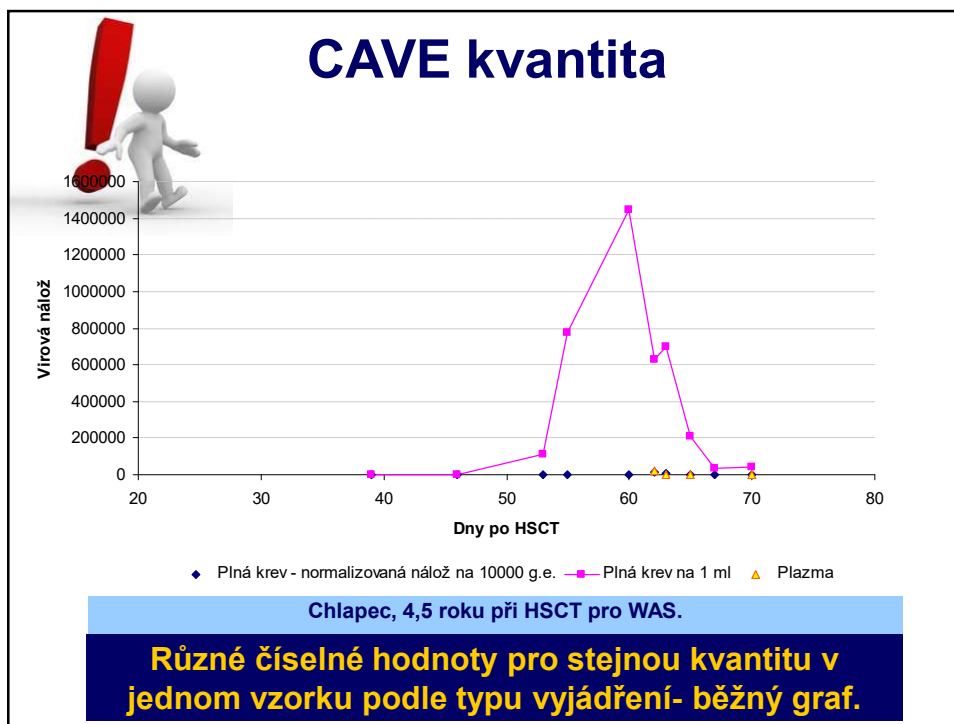
CAVE kvantita



Chlapec, 4,5 roku
při HSCT pro WAS.

Dny po HSCT	EBV na 10000 g.e.	EBV/ 1 ml plazmy	EBV na 1 ml plné krve
39	0		0
46	0		0
53	199		111600
55	635		774000
60	1092		1446000
62	10725	19200	630000
63	3506	3000	700200
65	1419	500	207600
67	49		36600
70	477	3000	42000

Různé číselné hodnoty pro stejnou kvantitu v jednom vzorku podle typu vyjádření.



Chronická aktivní EBV infekce

Infikované i T lymfocyty a NK buňky

Příznaky často spojené s prolongovanou přítomností interferonů v organismu.

Diagnostic criteria of a case definition for SCAEBV [15]

Category	Criteria
Clinical	Intermittent fever, lymphadenopathy, and hepatosplenomegaly.
Hematologic	Anemia, thrombocytopenia, lymphocytopenia or lymphocytosis, neutropenia, and polyclonal gammopathy.
Virological	Elevated antibody titers and positivity for antibodies to EBV-related antigens (VCA IgG, ≥ 5120 ; VCA IgA, positive; EA [D] IgG, ≥ 640 ; EA [D] IgA, positive; and EA [D] and EA [R] IgG, ≥ 640) and/or detection of EBV genomes in affected tissues.
Other	Chronic illness that cannot be explained by other known disease processes.

F. Sánchez et al. / Annals of Diagnostic Pathology 12 (2008) 368–371

Chronická aktivní EBV infekce

	T-cell type (n = 16)	NK-cell type (n = 12)	P
Symptoms			
Fever, > 1 d/wk (%)	67	25	.04
HMB (%)	13	75	.002
Splenomegaly (%)	73	100	.08
Large granular lymphocytosis (%)	13	83	.0004
Calcification in basal ganglia (%)	7	33	.10
Laboratory data			
IgG (mg/dL, mean \pm SD)	2213 \pm 1104	1682 \pm 464	.11
IgE (IU/mL, mean \pm SD)	282 \pm 298	2774 \pm 3774	.04
VCA IgG (geometric mean titer)	2405	446	.01
EA IgG (geometric mean titer)	831	119	.02
EBNA (geometric mean titer)	30	45	.24
Viral load			
PBMC (copies/ μ g DNA, mean \pm SD)	10 ^{4.1} \pm 0.5	10 ^{4.4} \pm 0.4	.09
Plasma (copies/mL, mean \pm SD)	10 ^{2.9} \pm 1.1	10 ^{2.4} \pm 2.1	.49

HMB indicates hypersensitivity to mosquito bites; VCA, viral capsid antigens; EA, early antigens; EBNA, EB nuclear antigens; PBMC, peripheral blood mononuclear cells. Fisher exact test was used to compare symptoms between groups. Student *t* test was used to compare the mean copy numbers of EBV-DNA or laboratory data. Bold letters indicate statistically significant results.

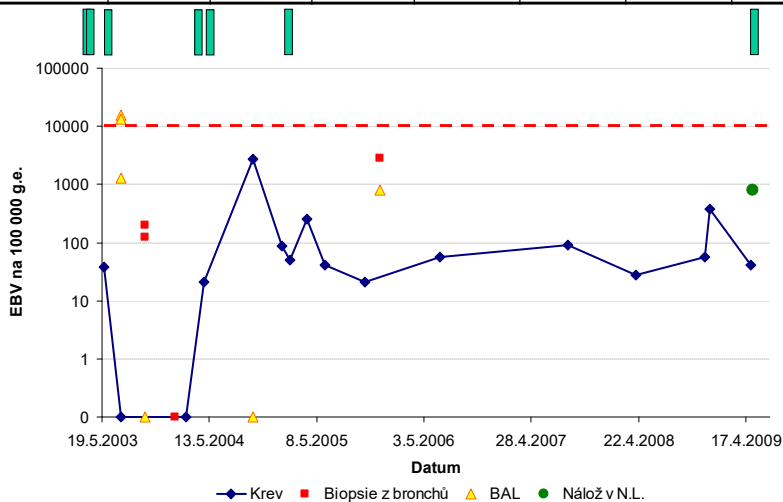
Table 2. Clinical features of 30 patients with chronic active Epstein-Barr virus infection

Symptoms and signs	(%)	Life-threatening complications	(%)
Fever	100	Hemophagocytic syndrome	21
Liver dysfunction	90	Coronary artery aneurysm	21
Splenomegaly	90	Hepatic failure	18
Lymphadenopathy	50	Malignant lymphoma	16
Thrombocytopenia	50	Interstitial pneumonia	12
Anemia	48	Central nervous system involvement	7
HMB	43	Sepsis	7
Skin rash	28	Pulmonary hypertension	4
Calcification in basal ganglia	18	Intestinal perforation	4
Oral ulcer	18	Myocarditis	4
Hydroa vacciniforme	14		

HMB indicates hypersensitivity to mosquito bites.

Kimura et al. Blood 15 July 2001, Vol. 98, No. 2

Datum	6.2.2003	17.2.2003	27.5.2003	23.2.2004	26.3.2004	4.4.2005	4.5.2009
VCA IgG	+	+++		+	++	147 U/ml	119 U/ml
VCA IgM	+	+	-	+	+	72,5 U/ml	45,5 U/ml
EA-D	++	++	+++ (vysoká exprese)	++	++	90 U/ml	<150 U/ml
EBNA 1 IgG	-	-	-	+	+	52,5 U/ml	14,3 U/ml



Maligní působení EBV

NHL - Burkittův lymfom

Velmi agresivní

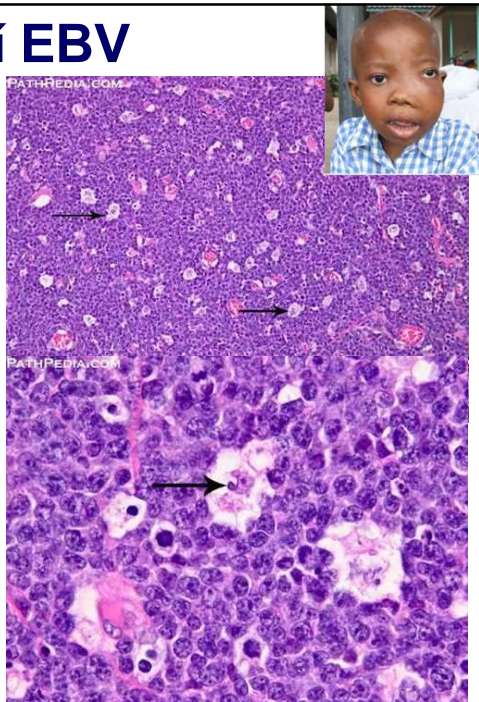
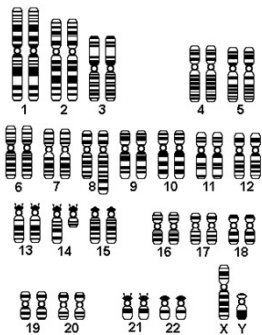
Obrázek „**Hvězdné oblohy**“ – „hvězdy“ jsou apoptotické nádorové buňky fagocytující makrofágy

„obloha“ – nádorové lymfocyty

Typická změna t(8:14) chromosome 8 s c-myc onkogenem

V rovníkové Africe incidence 5-15/100000 dětí

V Evropě a USA 0,2-0,3/100000 obyvatel



http://mynotes4usmle.tumblr.com/post/33262736354/burkitts-lymphoma#_VPgrFSx5vU4

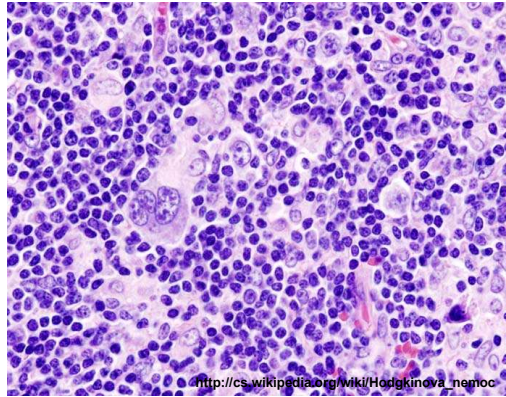
Maligní působení EBV

Hodgkinův lymfom

Vysoký počet pacientů v dlouhodobé remisi
Vyšší výskyt u mladších pacientů (kolem 20 let věku) a pak u starších 50-60 (medián věku při dg. 35 let)

Poměr maligních k nemaligním buňkám ~ 1:100

Incidence 2,4/100 000 u žen a 3,1/100 000 u mužů.



Histologicky se dělí dle počtu buněk **Reedové-Sternberga** (buňky vzniklé mutací z B-buněk) a dle stupně celulární reakce:

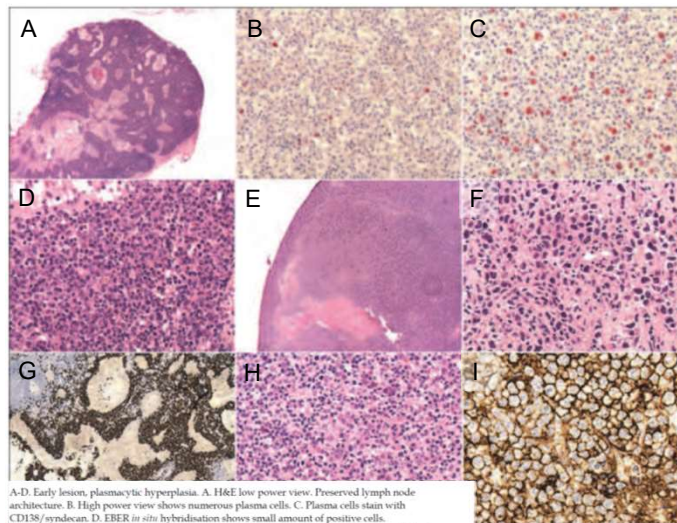
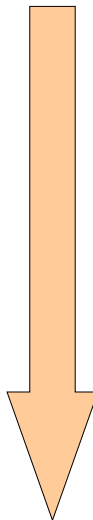
typ I s převahou lymfocytů (málo R-S buněk, hodně lymfocytů; nejlepší prognóza) (5 %);

typ II nodulárně-sklerotický (nodulární ložiska, buňky (retikulární, lymfocyty, histiocyty) v kolagenních vláknech) (70 %);

typ III smíšený (20–25 %);

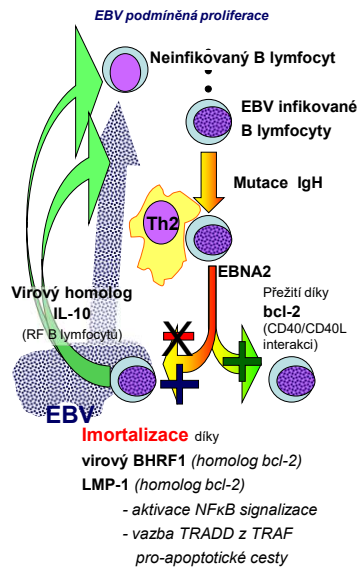
typ IV klasický, chudý na lymfocyty (Sternbergovy buňky zmnoženy; nejhorší prognóza) (1 %).

EBV asociovaná potransplantační proliferace (EBV-LPD)



A-D. Early lesion, plasmacytic hyperplasia. A. H&E low power view. Preserved lymph node architecture. B. High power view shows numerous plasma cells. C. Plasma cells stain with CD138/syndecan. D. EBV *in situ* hybridisation shows small amount of positive cells.
E-G. Polymorphic PTLD. E. Low power view shows disturbed lymph node architecture. F. Higher power shows a polymorphic infiltrate composed of plasma cells, lymphocytes (small, medium-sized, large and Reed-Sternberg-like). G. EBV ISH shows numerous positive cells.
H-I. Monomorphic PTLD. H. Diffuse proliferation of large atypical cells. I. CD20 staining shows their B-cell origin (Courtesy to Prof. Thomas Foussevri).

Etiopatogeneze a klasifikace EBV-LPD



World Health Organization Classification of Post-transplant Lymphoproliferative Disorder (PTLD)

Category	Subtype
Early lesions	Plasmacytic hyperplasia Infectious mononucleosis-like lesion
Polymorphic PTLD Monomorphic PTLD (classify according to lymphoma they resemble)	B-cell neoplasms - Diffuse large B-cell lymphoma - Burkitt lymphoma - Plasma cell myeloma - Plasmacytoma-like lesion - Other*
Classical Hodgkin lymphoma-type PTLD	T-cell neoplasms - Peripheral T-cell lymphoma NOS - Hepatosplenic T-cell lymphoma - Other
	cT1-2 gr 3 cT3-4

<http://www.cancernetwork.com/oncology-journal/lymphoma-risk-and-response-after-solid-organ-transplant>

EBV-LPD Incidence a rizikové faktory

Risk Factor	Degree of Risk	Study Reference(s)
EBV seronegativity pretransplant	24 × average risk	11–13
Younger age at transplantation	4–8 × adult risk	1,11
Type of immune suppression		
- Tacrolimus	2–5 × risk with cyclosporine	1,16,17
- OKT3 and/or ATG	3–4 × risk without these drugs	1
Type of organ transplant		9
Kidney	1%–3% of all transplant patients	
Liver	1%–3% of all transplant patients	
Heart	1%–6% of all transplant patients	
Heart-lung	2%–6% of all transplant patients	
Lung	4%–10% of all transplant patients	
Small bowel	20% of all transplant patients	
Time from transplant < 1 year	5–10 × risk at > 1 year	1
De novo CMV infection:		
CMV-positive recipient of a CMV-positive organ	4–6 × risk of CMV-negative recipient	21

ATG = anti-thymocyte globulin; CMV = cytomegalovirus; EBV = Epstein-Barr virus; OKT3 = muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3); PTLD = post-transplant lymphoproliferative disorder.

<http://www.cancernetwork.com/oncology-journal/lymphoma-risk-and-response-after-solid-organ-transplant>

Kumulativní intenzita imunosupresivní terapie

Použití anti-T lymfocytárních protilátek v přípravě a/nebo potransplantační péči

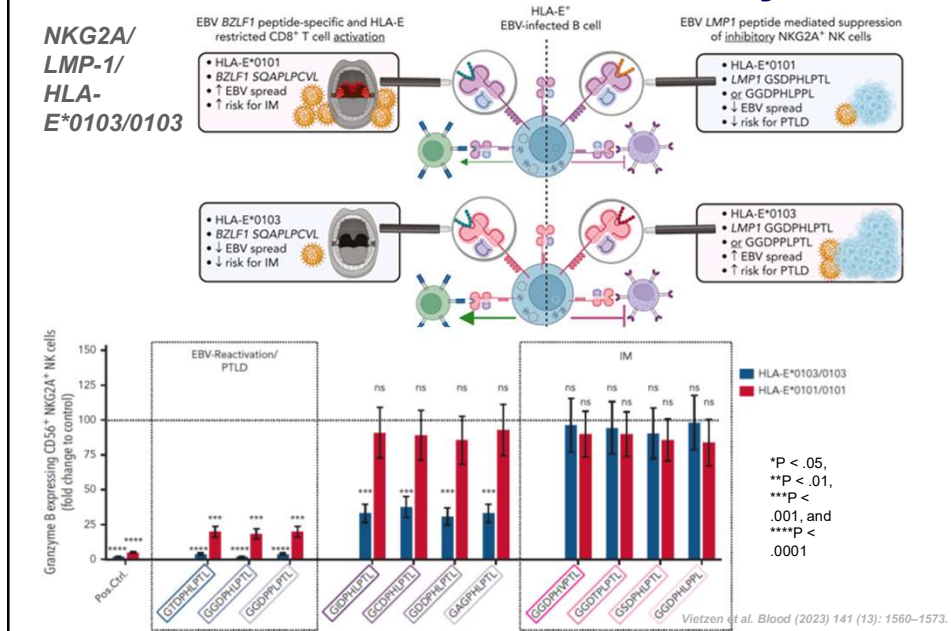
T-cell depletovaný štěp

Intenzivní terapie GvHD

Aktivace zpravidla kolem D+60

U alogenní HSCT udávaná incidence 2-25%.

EBV-LPD rizikové faktory



Klinické příznaky EBV-LPD

Příznaky různě závažné poly-, oligo- až monoklonální proliferace.

Mononukleosa-like syndrom

Horečka, bolest v krku, myalgie, tonzilární hypertrofie a krční lymfadenopatie, hepatopatie (bilirubinémie)

Tumorózní forma

Sekundární symptomy přítomnosti zvětšení lymfatické tkáně : bolest, obstrukce, perforace, GI krvácení, respiratory distress, etc.

Diseminovaná choroba

Proliferace B buněk v krvi a kostní dřeni, vysoké horečky a/nebo multiorgánové selhávání

Diagnóza EBV-LPD

Diagnóza neoplastických forem EBV-LPD by měla splňovat alespoň 2 z následujících kritérií:

- Změna či zničení buněčné struktury tkáně lymfoproliferativním procesem
- Přítomnost monoklonální, či oligoklonální proliferace prokázané buněčnými a/nebo virovými markery
- Průkaz EBV infekce v mnoha buňkách (např. DNA, RNA, protein...)

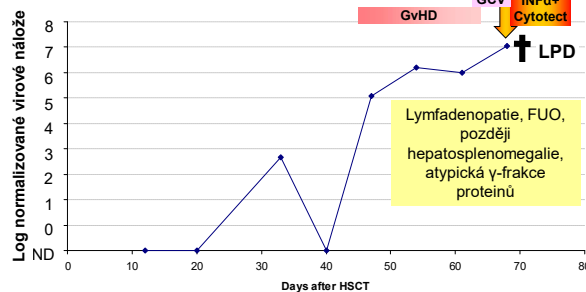
Pouhá detekce EBV DNA v krvi není dostačující.

Dle definice EBMT IDWP, 2007

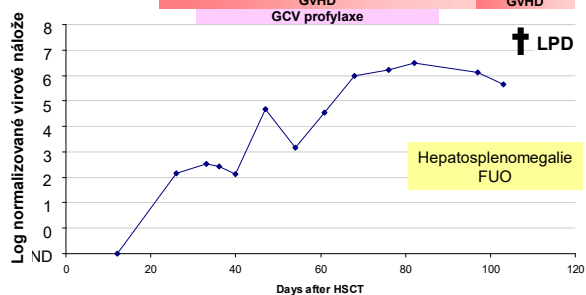
- Klinické příznaky
- Zobrazovací metody
- Imunologie (Flow cytometry, hladiny Ig, klonalita)
- Histologie N.L. (s detekcí přítomnosti EBV)
- Přímá detekce viru
 - EBV nálož (založená především na detekci NK)
 - Typ vzorku: plasma, plná krev, MNC
 - Různá metodika PCR – nejvíce kvantitativní real-time PCR



Retrospektivně testování pacientů

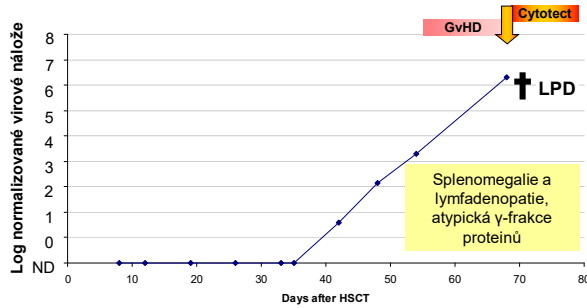


Dívka, 5.5 roku., HSCT pro ALL CR2.
Dárce: MMUD (8/10)
Štěp: BM
Příprava: TBI (12 Gy)
 cyklofosfamid (120 mg/kg)
 ATG (16 mg/kg)
GvHD profylaxe: CyA+MTX
GvHD: grade III (D+ 49; GIT)
Zemřela D+74 na MOF.

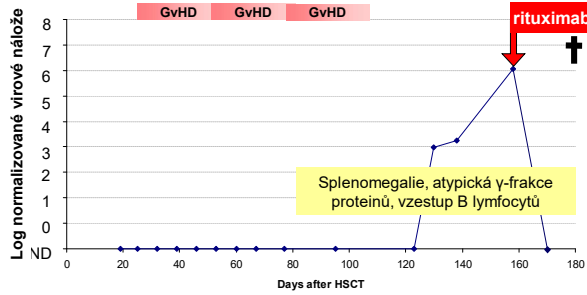


Dívka, 4 r., HSCT pro AML PR2
Dárce: MMUD (9/10)
Štěp: BM
Příprava: busulfan (16 mg/kg)
 cyklofosfamid (120 mg/kg)
 melfalan (140 mg/m²)
 ATG (40 mg/kg)
GvHD: grade III (D+ 25; GIT)
Zemřela D+117 na krvácení a respirační selhání.

Retrospektivně testování pacienti

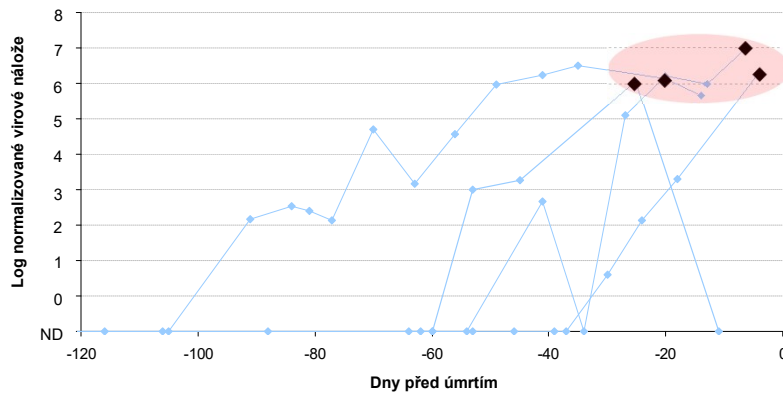


Chlapec, 5 r., HSCT pro JMML
 Dárce: MUD
 Štěp: BM
 Příprava: busulfan (18 mg/kg)
 cyklofosfamid (120 mg/kg)
 ATG (16 mg/kg)
 GvHD prophylaxe: CyA+MTX
 GvHD: grade II (D+ 56; GIT)
 Zemřel D+72 na MOF.



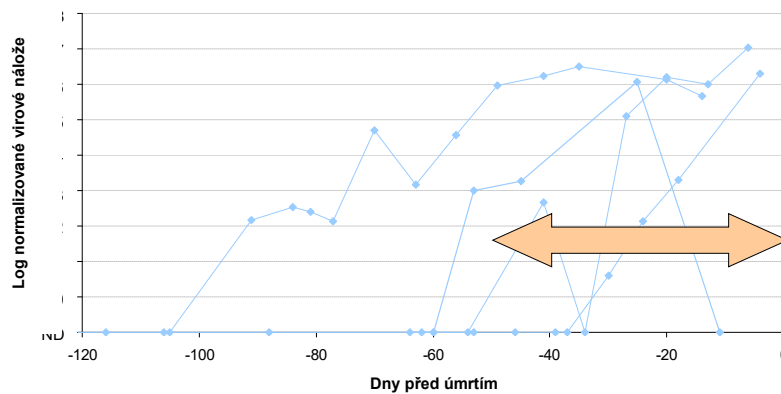
Chlapec, 11 r., HSCT pro AML CR2.
 Dárce: MUD
 Štěp: BM
 Příprava: busulfan (16 mg/kg)
 cyklofosfamid (120 mg/kg)
 melphalan (140 mg/m²)
 ATG (40 mg/kg)
 GvHD: grade III-IV (D+ 23; GIT)
 Zemřela D+182 na MOF.

Retrospektivně testování pacienti



Maximum detekované kvantity byl mezi
 1.16×10^6 and 1.17×10^7 NVCs.

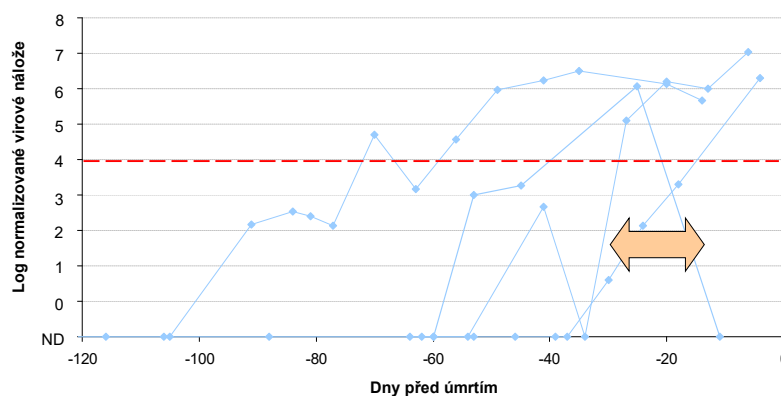
Retrospektivně testování pacienti



Detekce předcházela úmrtí s mediánem 47 dnů (-91 to -30)

Detekce předcházela klinické známky EBV-LPD s mediánem 35 dní (-77 to -24)

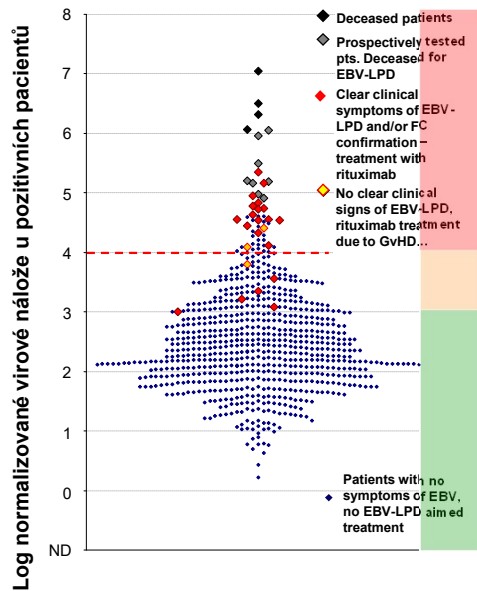
Retrospektivně testování pacienti



Jako hranice suspekce EBV-LPD byla stanovena kvantita 10^4 NVCs.

Kvantita $> 10^4$ NVCs předcházela klinické známky EBV-LPD s mediánem 14 dnů (- 56 až 2)

Prospektivně testování – maximální kvantity EBV



Hladina velmi vysokého rizika

> 10⁴ NVCs – ≈ 50 IU/ng

podezřelý a/nebo související s příznaky EBV-LPD - 102 vzorků od 26 dětí (7.1%) a 22 dospělých (3.2%)

EBV-LPD potvrzena u 22 (45%)

> Hladina rizika reaktivace

> 10³ and < 10⁴ NVCs – ≈ 5-50 IU/ng

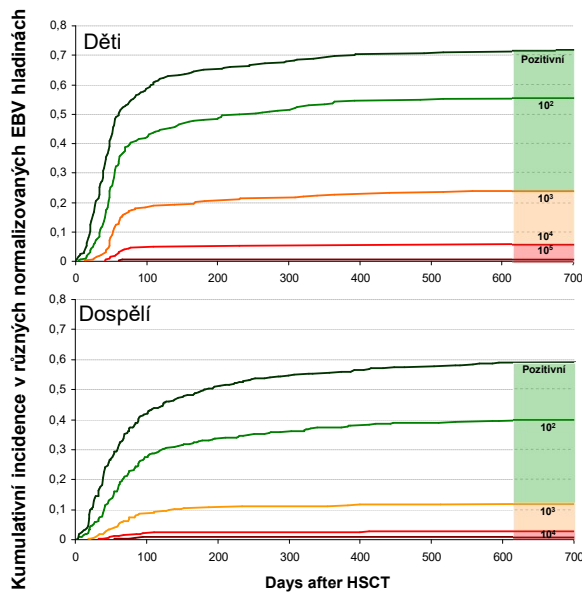
687 vzorků od 95 (26%) dětí a 104 dospělých (15%)

> Hladina benigní reaktivace

< 10³ NVCs ≈ 5 < IU/ng

nízké kvantity a žádné známky EBV jsme pozorovali u většiny vzorků 275 dětí a 481 dospělých.

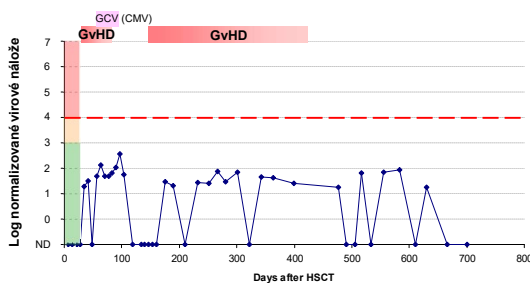
Incidence v čase po HSCT



Na každé hladině pozitivity je EBV detekováno častěji u dětských pacientů

p<0.007

Benigní hladina reaktivace



Chlapec, 13 let, HSCT pro MDS-RAEB

Dárce: MMUD (8/10)

Štěp: PBSC

Příprava: busulfan (16 mg/kg)

cyclofosamid (120 mg/kg)

melfalan (140 mg/m²)

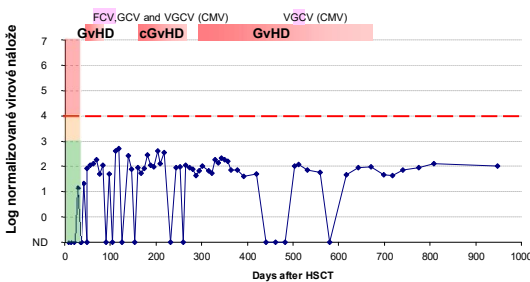
ATG (40 mg/kg)

GvHD profylaxe: CyA+MTX

GvHD: grade II (D+28;GIT)

Další: BKV-HC(D+40), CMV(D+55)

Výsledek: žije, žádné klin. problémy



Dívka, 13 let, HSCT pro SAA

Dárce: MMUD (9/10)

Štěp: BM

Příprava: TBI (5,4 Gy)

cyclofosamid (200 mg/kg)

ATG (40 mg/kg)

GvHD profylaxe: CyA+MTX

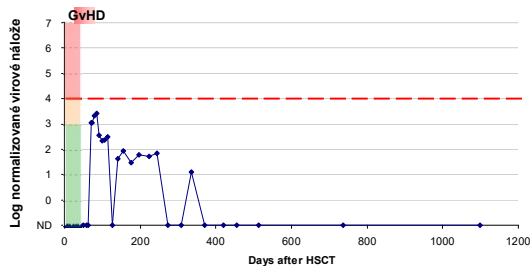
GvHD: grade II (D+40;GIT)

Další: CMV(D+46), plicní afekce neznámé

etiologie, steroidní DM

Výsledek: žije, žádné klin. problémy

Riziková hladina reaktivace



Chlapec, 6,5 r., HSCT pro ALL

Dárce: RD (10/10)

Štěp: BM

Příprava: TBI (12 Gy)

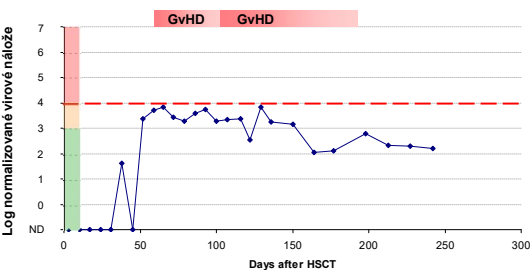
etoposide (60 mg/kg)

ATG (40 mg/kg)

GvHD profylaxe: CyA+MTX

GvHD: grade II (D+42;GIT+skin)

Výsledek: žije, žádné klin. problémy



Chlapec, 15 let, HSCT pro BAL

Dárce: MMUD (9/10)

Štěp: PBSC

Příprava: TBI (12 Gy)

etoposide (60 mg/kg)

ATG (40 mg/kg)

GvHD profylaxe: CyA+MTX

GvHD: grade I (D+66)

Další: plicní mykóza

Výsledek: žije, žádné klin. problémy

EBV-LPD

Detekována: 28 pacientů (2,65% tx., 3,3% EBV pozitivních)
15 dospělých (1,98%) a 13 dětí (3,5%)

Mononukleóza-like syndrom: 1 dospělý pacient
vrchol 54 dnů po HSCT (1,198 NVCs)

Lokalizovaná : 12 pacientů (9 dospělí, 3 děti)
medián maxima 68 dní po HSCT (rozmezí 54-647)
medián maximální hladiny 32 400 NVCs

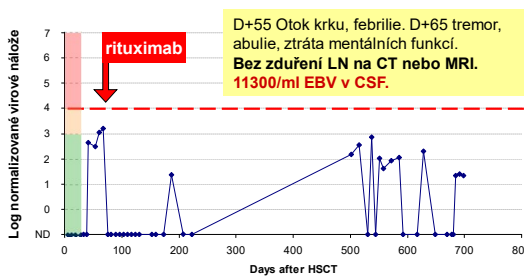
Generalizovaná: 15 pacientů (10 dětí, 5 dospělí)
medián maxima 71 dní po HSCT (rozmezí 41-230)
medián maximální hladiny 56 600 NVCs

Potvrzena průtokovou cytometrií.

S výjimkou 3 pacientů byla léčba rituximabem byla úspěšná (84,2%).

EBV 1 bylo detekováno u všech pacientů s výjimkou jednoho s EBV 2.

Lokalizovaná EBV-LPD



Žena, 58 let, HSCT pro MDS/AML

Dárce: SD (8/10)

Štěp: PBSC

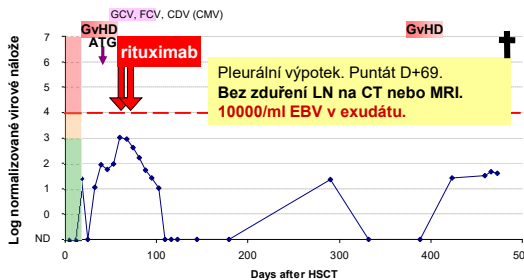
Příprava: idarubicine (21 mg/m²)
fludarabine (25 mg/m²)

TBI (12 Gy) ATG (40 mg/kg)

GvHD profylaxe: CyA, MMF

GvHD: grade II (D+22)

Výsledek: rychlé zlepšení, žije



Žena, 39 let, HSCT pro AML

Dárce: MMUD (9/10)

Štěp: PBSC

Příprava: idarubicine (21 mg/m²)
fludarabine (25 mg/m²)

TBI (12 Gy) ATG (40 mg/kg)

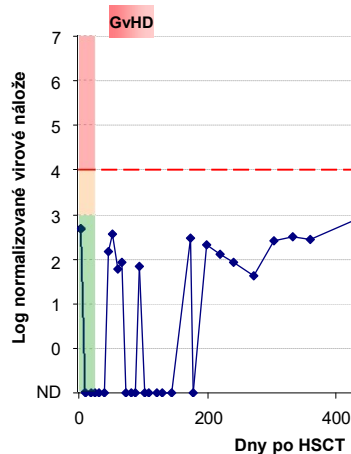
GvHD profylaxe: CyA+MMF

GvHD: grade III-IV (D+15)

Další: plicní proces neznámého původu

Výsledek: zemřela D+478
na MOF

Lokalizovaná EBV-LPD (NHL)



Chlavec, 15 let, HSCT pro ALL v 1. CR
CMV, EBV, HSV seronegativní

Dárce: MSD (bratr)

Štěp: PBSC

Příprava: TBI (12 Gy)

etoposid (60 mg/kg)

GvHD profylaxe: CyA

Přihojení: D+14

Chimérismus: CC D+28

D+95 – 20% autologní (negativní MRD)

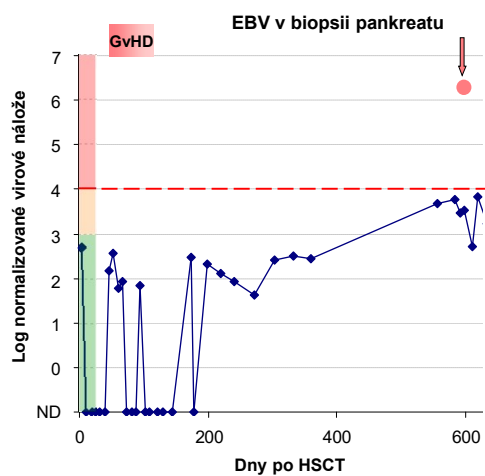
D+130 – 1% autologní (negativní MRD)

GvHD: grade II (D+28; GIT, kůže)

Th: MP (1 mg/kg; do D+74) + CsA (do D+102)

D+280 – Herpes zoster (ACV)

Lokalizovaná EBV-LPD (NHL)



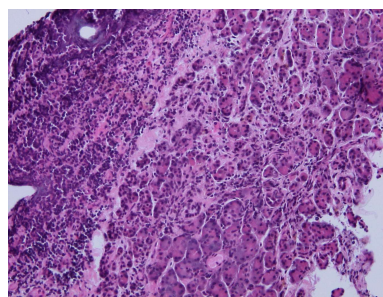
Pankreatopatie neznámého původu, potvrzeno CT a US. MRD negativní.

↑CRP, ↑IgG, bez autoprotilátek.

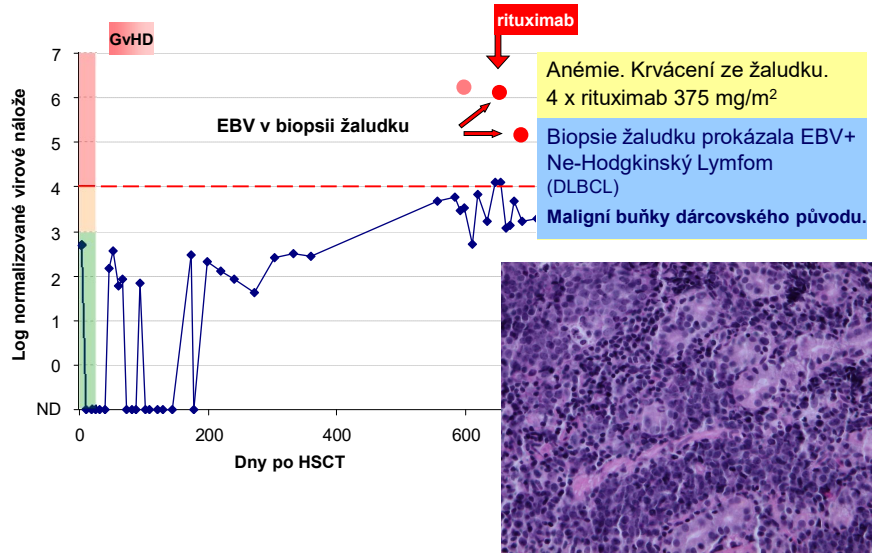
Laparotomie.

V biopsii jsme detekovali všechny typy lymfocytů. Žádné maligní buňky.

DR+ lymfocyty



Lokalizovaná EBV-LPD (NHL)



Léčba podle protokolu **BFM NHL 2004**

Během poslední chemoterapie sepse způsobená *Pseudomonas aeruginosa*.

Poslední PET CT potvrdilo remisi NHL.

T1WSE GC

T1WSE

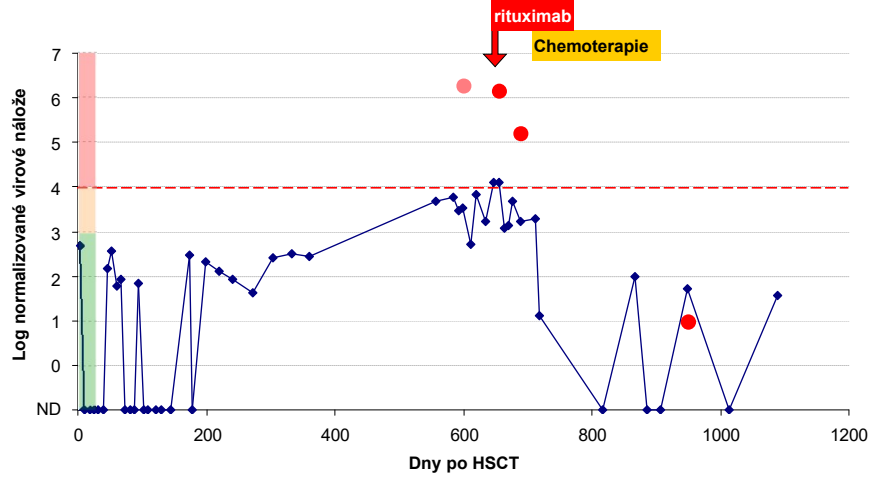
T2WSE

Ki-67

LMP-1

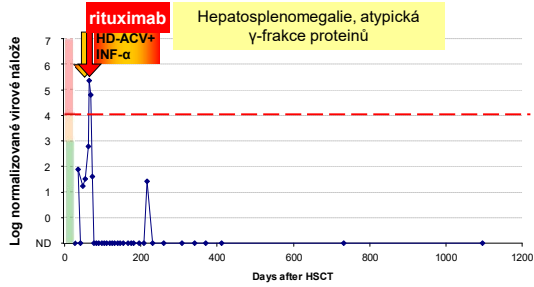
EBER

Lokalizovaná EBV-LPD (NHL)



Pacient zůstává v remisi ALL a NHL.

Generalizovaná EBV-LPD



Chapec, 3,3 r., HSCT pro MPS I

Dárce: MMUD (5/6)

Štěp: CB

Příprava: busulfan (24.5 mg/kg)

cyklofosfamid (200 mg/kg)

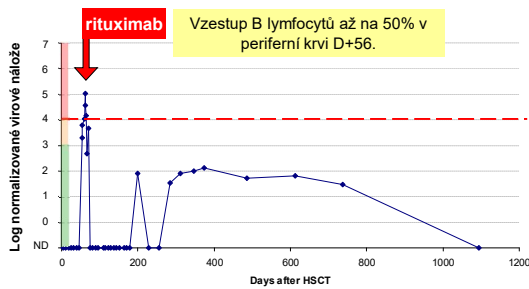
ATG (40 mg/kg)

GvHD profylaxe: CyA, MP

GvHD: grade II (D+49; GIT)

rituximab den D+69

Výsledek: žije, bez klin. problémů



Chlapec, 4,4 r., HSCT pro WAS

Dárce: MUD

Štěp: BM

Příprava: busulfan (15.3 mg/kg)

cyklofosfamid (200 mg/kg)

ATG (40 mg/kg)

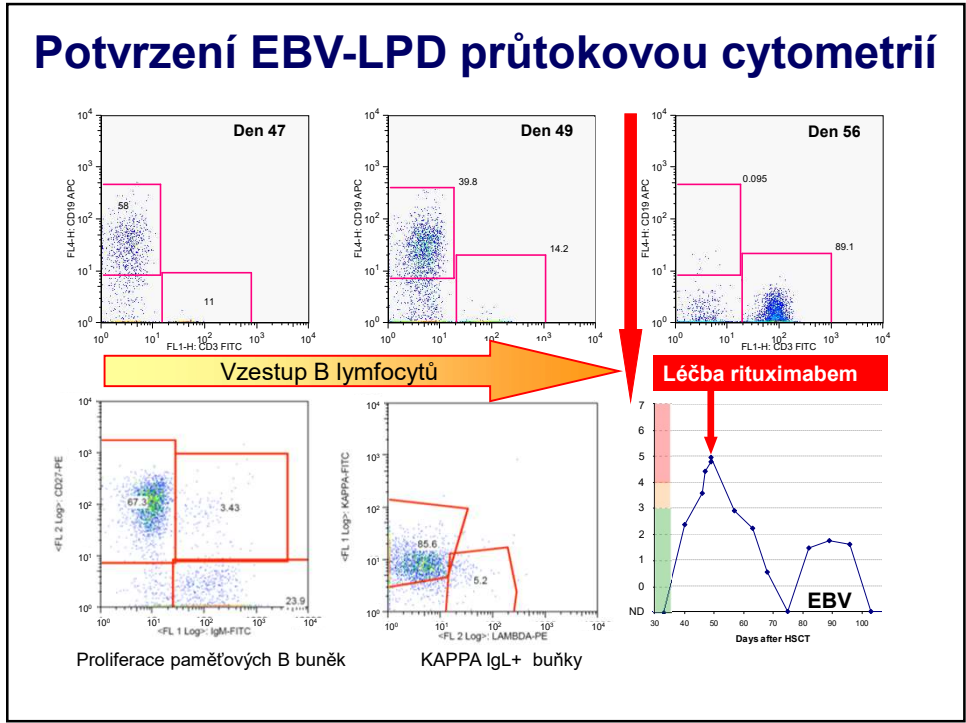
GvHD profylaxe: CyA, MTX

GvHD: grade II (D+54; GIT)

rituximab den D+56.

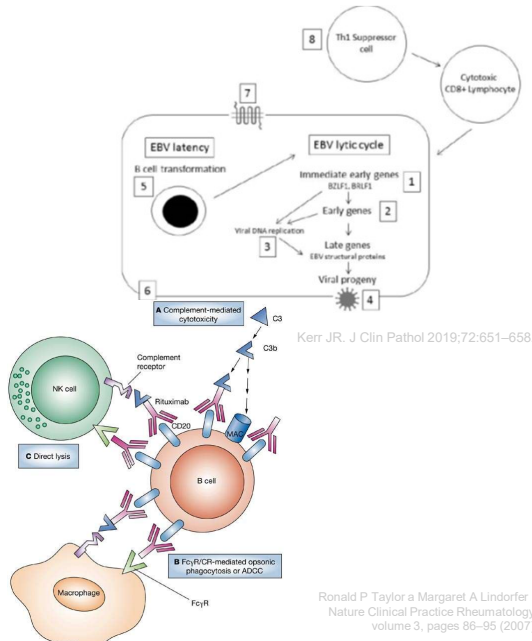
Výsledek: žije, bez klin. problémů

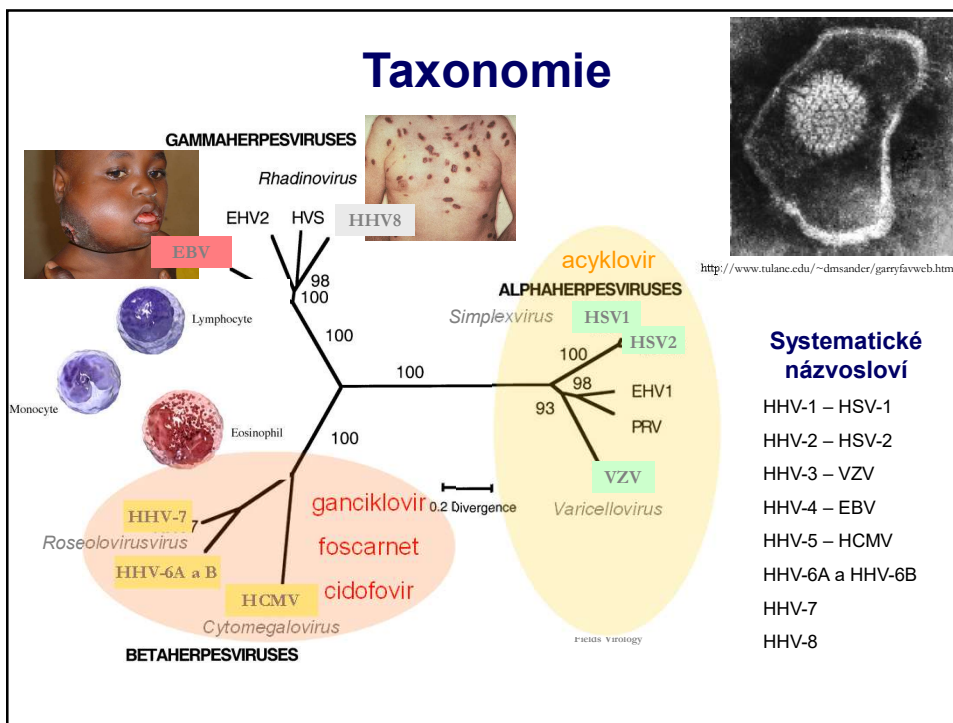
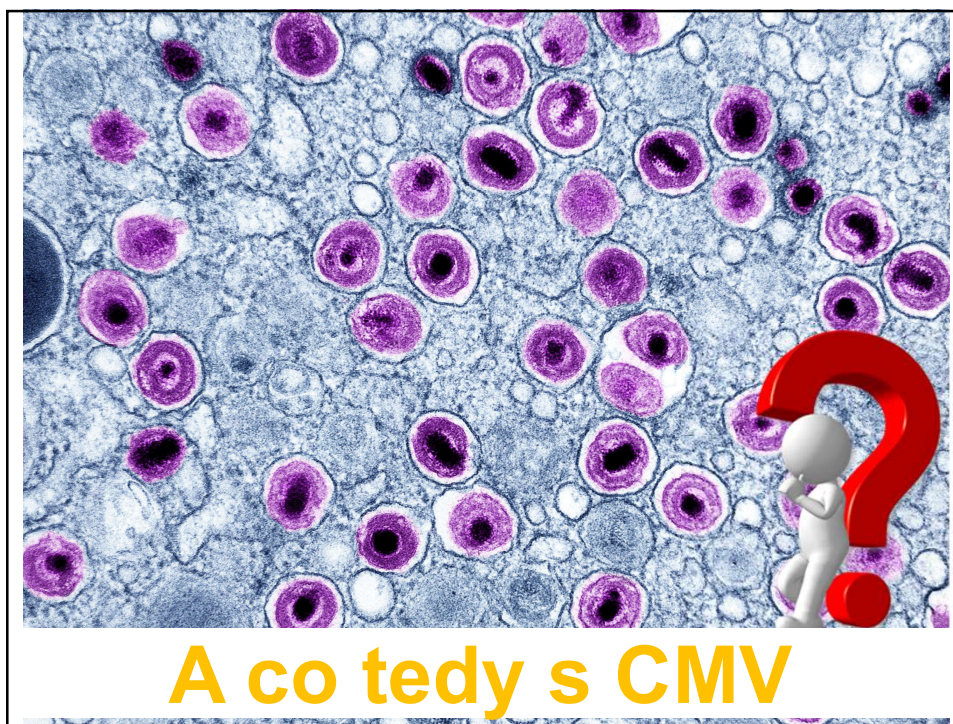
Potvrzení EBV-LPD průtokovou cytometrií



Terapie EBV (EBV lymfoproliferací)

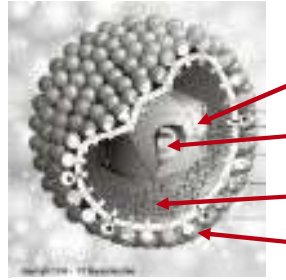
- Acyklovir/valacyklovir (3)
- Ganciklovir/valganciklovir (3)
- Cidofovir (3)
- Maribavir (4)
- (Omalociklovir/valomaciklovir)
- Vitamin C (1), vitamin D (4) a kyselina retinová (1,6)
- rituximab (anti CD-20) 375 mg/m²





Lidský cytomegalovirus

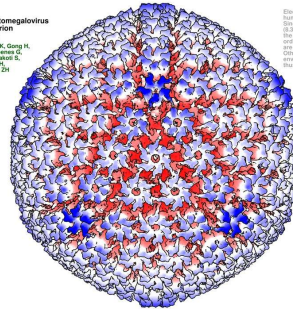
- Systematicky 5. lidský herpesvirus (Human Herpesvirus 5 -HHV-5)
- Obalený ds DNA virus
- Kapsida struktury dvacetistěnu přibližně 100 nm v průměru
- Genom délky přibližně 236 kb - přibližně 200 ORF
- Pomalá proliferace – doubling time přibližně 48-72 hodin in vivo



human cytomegalovirus (HCMV) virion
EMD-5566

DOI: 10.1016/j.jmb.2010.08.014
JMB, 2010, 298, 1-10
DOI: 10.1016/j.jmb.2010.08.014

Electron cryomicroscopy of human cytomegalovirus (HCMV) virions (PDB ID: 3J87) (Angewandte Chemie International Edition) (2010) 49, 1010-1014. Only the envelope is shown and the glycoprotein spikes are visible in the density map. Other important proteins and the nucleocapsid are unresolvable and are not visible.

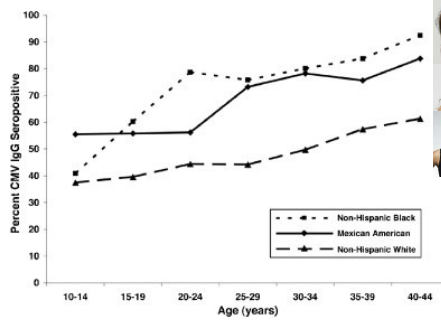


665
640
610
590
-500

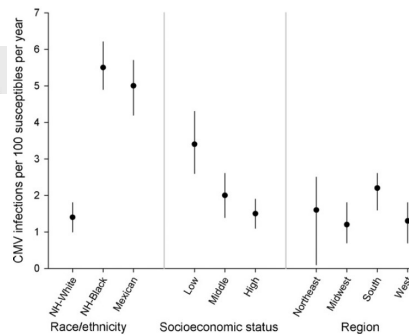
200 Å
made with Chimera
October 13, 2010
27 April 2016

Jaká je séroprevalence a primoinfekce CMV?

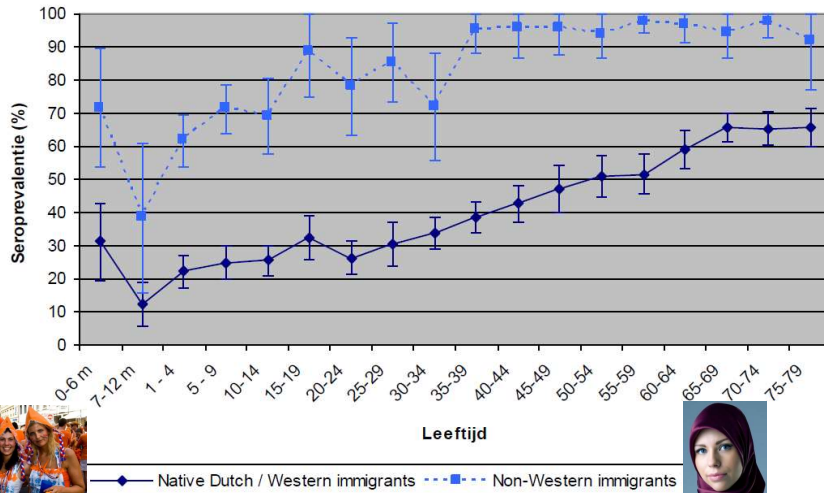
- 60-90% zdravé populace dospělých
- narůstá s věkem, klesá v ekonomicky vyspělých zemích



CMV Force of Infection by Race/Ethnicity, SES, and Region



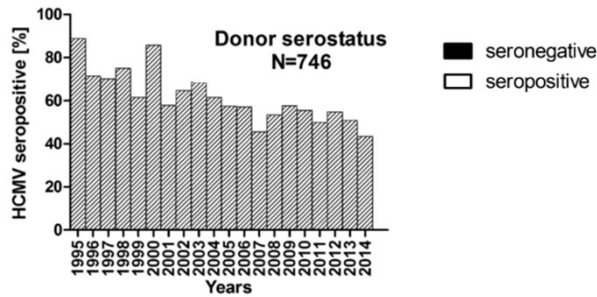
Jaká je séroprevalence a primoinfekce CMV?



Korndewal MJ, et al. *J Clin Virol.* 2015 Feb;63:53-8

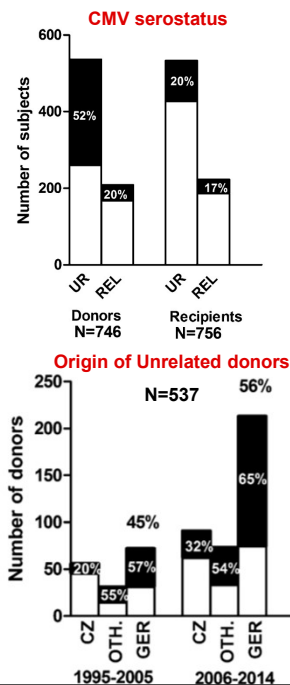
www.abstractserver.com/ESPID2012/pictures/p_435_00079.jpg

Jaká je séroprevalence CMV v ČR?

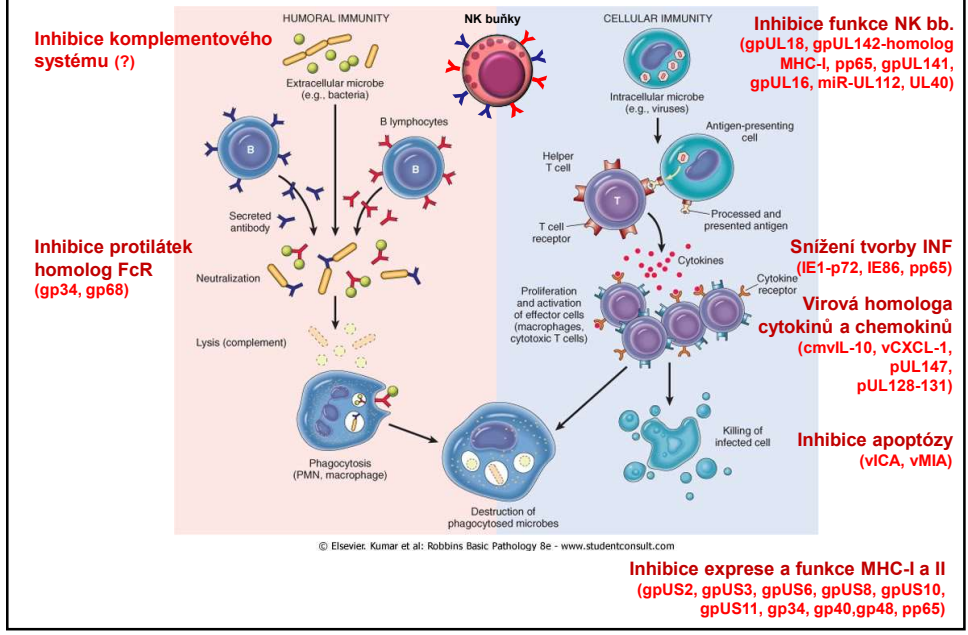


Evolution of human cytomegalovirus-seronegative donor/-seropositive recipient high-risk combination frequency in allogeneic hematopoietic stem cell transplantations at Institute of Hematology and Blood Transfusion during 1995-2014. Nemeckova S, Sroller V, Stastna-Markova M. *Transpl Infect Dis.* 2016 Apr;18(2):297-301.

Nemeckova TID 2017



Jak CMV manipuluje s imunitou?



Průnik CMV

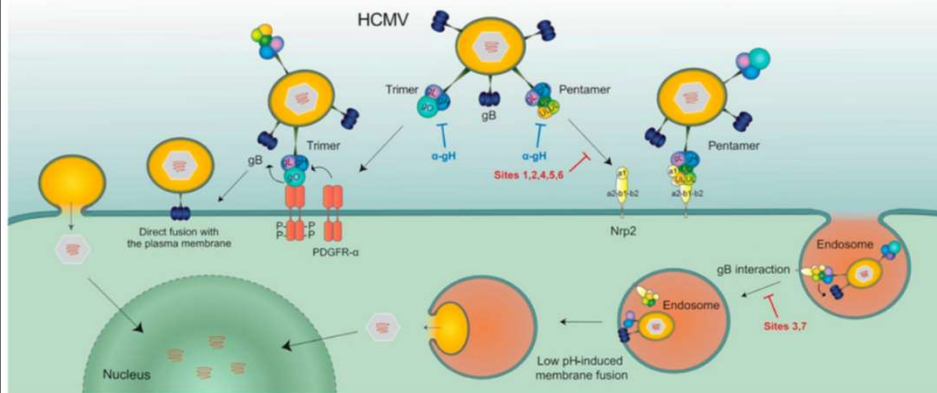


Figure 5. Models of HCMV entry into human cells using the trimer complex (TC) or PC complexes. The TC interacts with PDGFR α via gO, then gH/gL/gO activates the fusogenic activity of gB at the plasma membrane of human fibroblasts. Conversely, the PC first binds Nrp2, then the gH/gL/gO component of the PC (or gH/gL/gO) induces endocytosis of virus particles [71], which are released into cytoplasm from endosomal membranes, following low-pH-induced activation of the gB fusion machinery (from [72]).

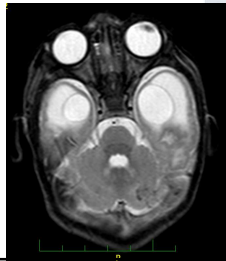
Patologické působení CMV

U imunokompetentních

asymptomatické u 95% dětí
mononukleosis like sy.
v případě gravidity
teratogenní účinky
asociace s maligními gliomy,
nádory prsu
možná asociace s
Alzheimerovou chorobou

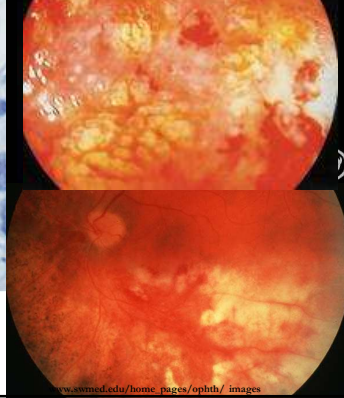
U imunokompromitovaných

především trombocytopenie,
pneumonitis, hepatitis,
encefalitis, retinitis, colitis,
esofagitis, pankreatitis,
vaskulitis, nevolnost, zvracení,
artralgie, myalgie



„soví oči“

Latence a doživotní
persistence převážně v
MΦ a v buňkách RES



Patologické působení CMV u imunokompetentního pacienta

Imunosenescence a ateroskleróza

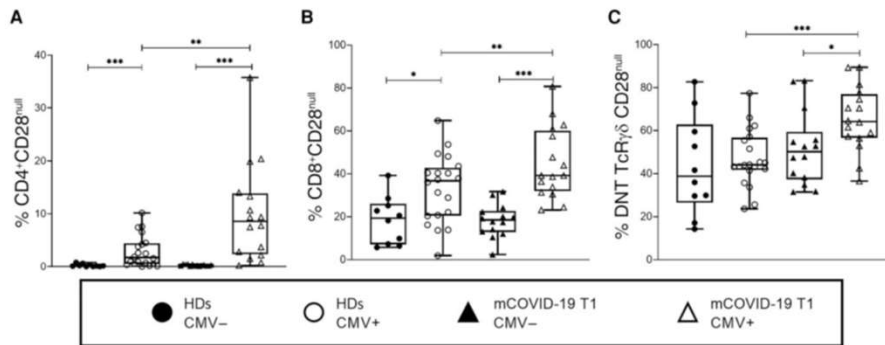


Figure 2. Effect of cytomegalovirus (CMV) on the percentages of CD28^{null} T cells, including CD4⁺ (A), CD8⁺ (B), and DN TcRγδ CD28^{null} (C) T cells in healthy donors (HDs) and unvaccinated individuals with mild or asymptomatic severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection (mCOVID-19), recruited 3–6 months after infection (time point 1 [T1]) and stratified by CMV serostatus (seronegative [CMV⁻] or seropositive [CMV⁺]). Horizontal bars represent medians; whiskers, maximum and minimum values. **P* < .05; ***P* < .01; ****P* < .001 (Mann-Whitney comparison test).

Definitions of Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Patients for Use in Clinical Trials

Per Ljungman,^{1,2} Michael Boeckh,^{3,4,5} Hans H. Hirsch,⁶ Filip Josephson,⁷ Jens Lundgren,⁸ Garrett Nichols,⁹ Andreas Pakis,⁹ Raymond R. Razonable,¹⁰ Veronica Miller,¹¹ and Paul D. Griffiths¹², for the Disease Definitions Working Group of the Cytomegalovirus Drug Development Forum*

Table 1. Cytomegalovirus Disease Categories and Required Quality of Evidence

Disease	Proven	Probable	Possible
Pneumonia	Yes	Yes	Yes
Gastrointestinal disease	Yes	Yes	Yes
Hepatitis	Yes	No	No
Retinitis	Yes	No	No
Encephalitis/ventriculitis	Yes	Yes	No
Nephritis	Yes	No	No
Cystitis	Yes	No	No
Myocarditis	Yes	No	No
Pancreatitis	Yes	No	No
Other end-organ diseases	Yes	No	No
Syndrome	No	Yes	No

All 3 categories require appropriate clinical symptoms and/or signs.

CID 2017:64 (1 January) • IMMUNOCOMPROMISED HOSTS

Pneumonia

Proven disease requires clinical symptoms and/or signs of pneumonia such as new infiltrates on imaging, hypoxia, tachypnea, and/or dyspnea combined with CMV documented in lung tissue by virus isolation, rapid culture, histopathology, immuno-histochemistry, or DNA hybridization techniques.

Probable CMV pneumonia is defined as the detection of CMV by viral isolation, rapid culture of BAL fluid, or the quantitation of CMV DNA in BAL fluid combined with clinical symptoms and/or signs of pneumonia. A definite cut-off for CMV DNA load cannot be established at the present time. The cut-off is likely to vary between different patients and according to how the BAL procedure and processing are performed and the assay used for CMV DNA quantitation. Furthermore, CMV DNA levels may vary considerably between patients with varying degrees of severity of CMV pneumonia, which may impact the predictive values of any cut-off. It should be recognized that CMV shedding in the lower respiratory tract does occur and therefore a low CMV DNA load might well represent asymptomatic infection [7]. ...

a negative
CMV DNA test in the BAL fluid has a negative predictive value close to 100% and therefore excludes the possibility of CMV pneumonia. The use of quantitative PCR on biopsies is an evolving field. Presently, these findings could be defined as possible CMV pneumonia.

Definitions of Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Patients for Use in Clinical Trials

Per Ljungman,^{1,2} Michael Boeckh,^{3,4,5} Hans H. Hirsch,⁶ Filip Josephson,⁷ Jens Lundgren,⁸ Garrett Nichols,⁹ Andreas Pakis,⁹ Raymond R. Razonable,¹⁰ Veronica Miller,¹¹ and Paul D. Griffiths¹², for the Disease Definitions Working Group of the Cytomegalovirus Drug Development Forum*

GIT disease

Proven disease

GI symptoms plus macroscopic mucosal lesions plus CMV documented in tissue by histopathology, virus isolation, rapid culture, immunohistochemistry, or DNA hybridization techniques. Studies should give information regarding the presence or absence of gut graft-vs-host disease (GVHD) in HSCT recipients.

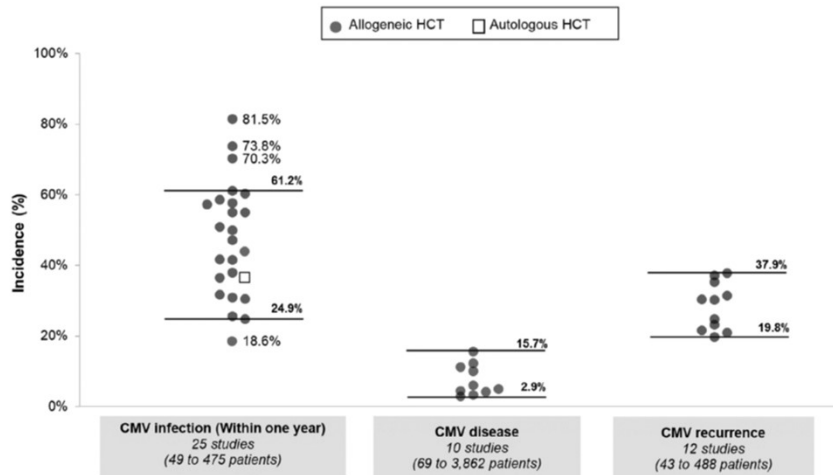
Probable

lower GI symptoms and CMV documented in tissue but without the requirement for macroscopic mucosal lesions. Studies should give information regarding the presence or absence of gut GVHD in HSCT recipients.

CMV documented in blood by NAT (e.g. PCR) or antigenemia or CMV documented by PCR from tissue biopsies is not sufficient for the diagnosis of CMV GI disease. The use of quantitative PCR on gut biopsies is an evolving field. Presently, these findings could be defined as possible GI disease.

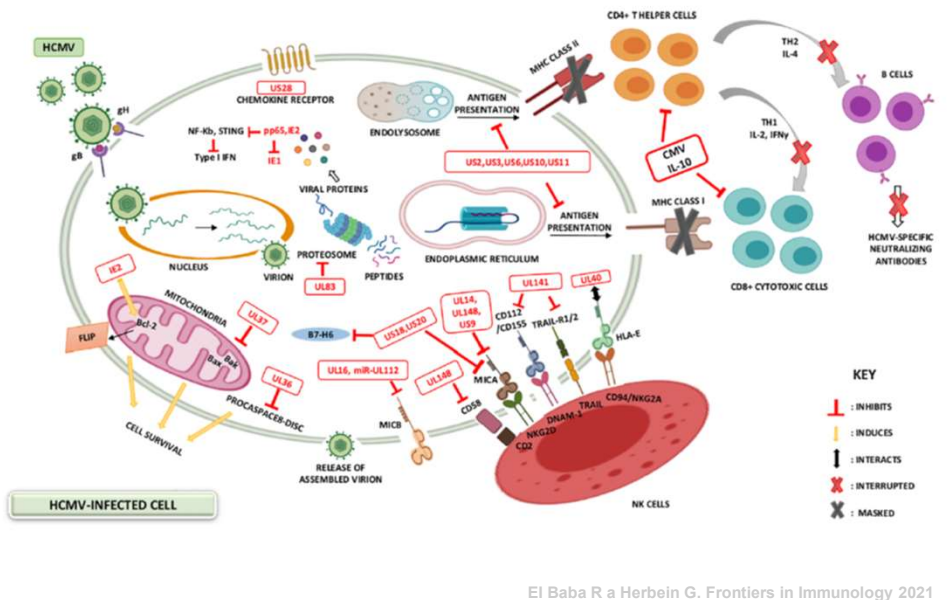
Patologické působení CMV u imunokompromitovaného pacienta

trombocytopenie, pneumonitis, hepatitis, encefalitis, retinitis, colitis, esofagitis, gastritis, pankreatitis, nefritis, myokarditis, pankreatitis,



Cho et al. J. Transpl Infect Dis. 2023

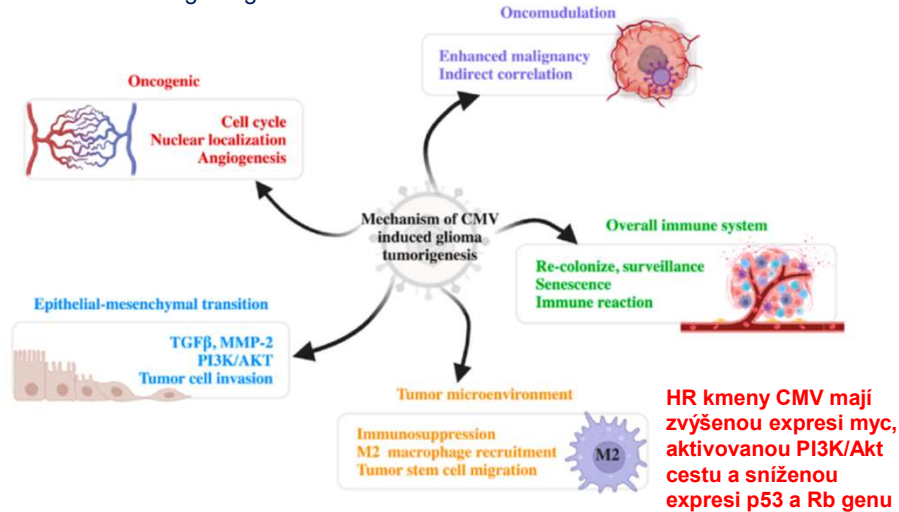
Manipulace CMV s imunitní odpovědí (onkomodulace)



EI Baba R a Herbein G. Frontiers in Immunology 2021

Patologické působení CMV u imunokompetentního pacienta

Asociace s maligním gliomem



Yang et al. J. Clin. Med. 2022 Herbein Viruses 2022

Manipulace CMV s buněčnými procesy miRNA

MicroRNAs (miRNA) jsou malé nekódující RNA (cca 22 nukleotidů dlouhé) podléjící se na regulaci eukaryotických buněk a virových infekcí. Mohou být signálem štěpení RNA a snížení translace díky homologii sekvence s mRNA. Lidský CMV kóduje 26 miRNA (dosud popsaných) regulujících transkripty, přičemž jejich přesné zapojení do regulačních procesů není ještě plně známo.

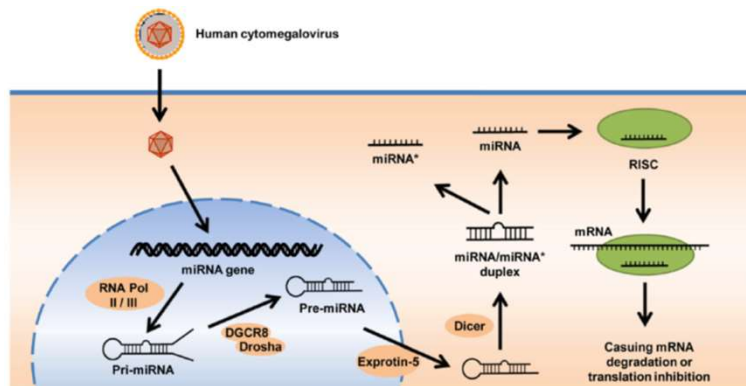


Fig. 2 Biogenesis of miRNA. First, the HCMV miRNA gene is transcribed to generate RNA transcript called primary (pri)-miRNA by RNA polymerase (Pol) II or III. Second, pri-miRNA is processed to precursor (pre)-miRNA by DGCR8 and RNase III Drosha. Third, pre-miRNA is exported to the cytoplasm by Exportin-5, then cropped to the miRNA/miRNA* duplex by the RNase III enzyme Dicer. Finally, one strand of the duplex, miRNA*, is unwound while the other strand is further processed, giving rise to a mature RISC (RNA-induced silencing complex) to bind mRNA, causing mRNA degradation or inhibiting translation

Zhang et al. Virology Journal 2020

Manipulace CMV s buněčnými procesy dlouhé nekódující RNA (lncRNA)

lncRNAs - RNA2.7, RNA4.9 a RNA5.0 (nejsou zatím s popsány funkcemi)

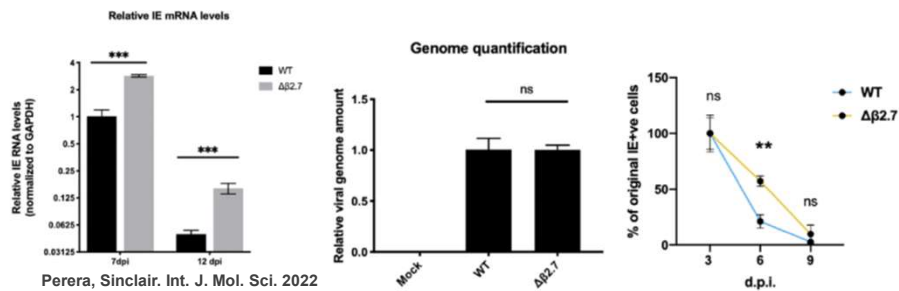
- delší než 200 nukleotidů
- lncRNAs tvoří přibližně 30% RNA a 50–60% poly(A)+virového transkriptomu během virového cyklu.
- RNA1.2, RNA2.7 a RNA4.9 jsou 3 nadbytečně exprimované

lncRNAs (nezbytné ve všech stádiích infekce) – pokles RNA2.7 a RNA4.9 vede k poklesu latentních proteinů a začátku lytické proliferace (u fibroblastů)

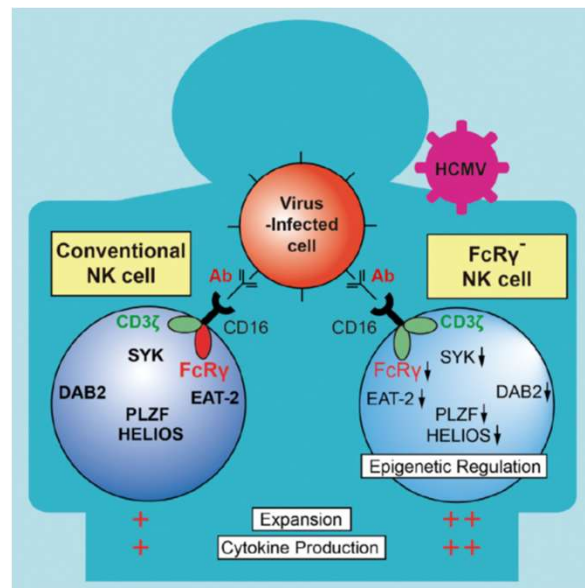
N. Marx et al. *Metabolic Engineering*, 2021

- RNA 1.2 – snižuje expresi NF- κ B a tím snižuje RPRG1L a následně expresi IL-6, zároveň snižuje hladiny MCP-1 a CXCL1 transkriptů.

Lau et al. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2020

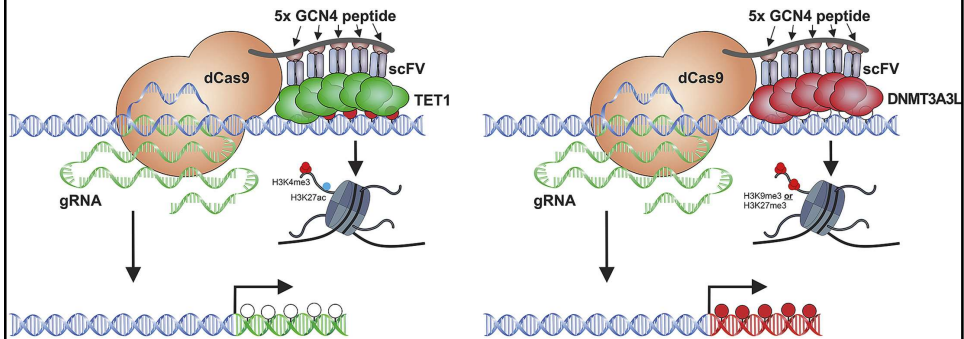


Manipulace CMV s buněčnými procesy Epigenetické změny



Lee et al. *Immunity* 2015

Manipulace CMV s buněčnými procesy DNA metylace



N. Marx et al. Metabolic Engineering, 2021

Manipulace CMV s buněčnými procesy Acetylce histonů

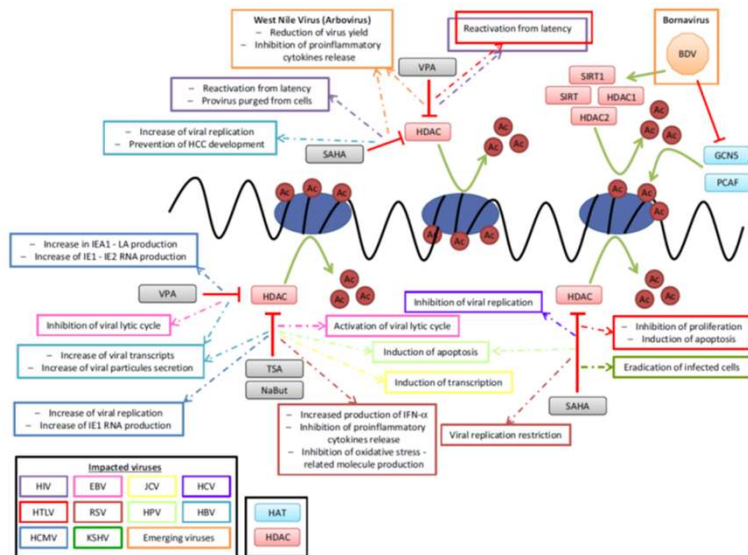


Fig. 10.1 Targeting histone acetylation in the management of chronic viral infections (HIV, HCMV, RSV), virus-induced cancers (EBV, HCV, HTLV, HPV, HBV, KSHV), and epidemic/emerging viruses (WNV, BDV).

Nehme et al. Histone Modifications in Therapy, 2020

Jedno CMV?

Curr Opin Virol. 2014 October ; 9: 109–115. doi:10.1016/j.coviro.2014.08.001.

Human Cytomegalovirus Intrahost Evolution – A New Avenue for Understanding and Controlling Herpesvirus Infections

Nicholas Renzette¹, Laura Gibson², Jeffrey D. Jensen^{3,4,5}, and Timothy F. Kowalik^{1,6,*}

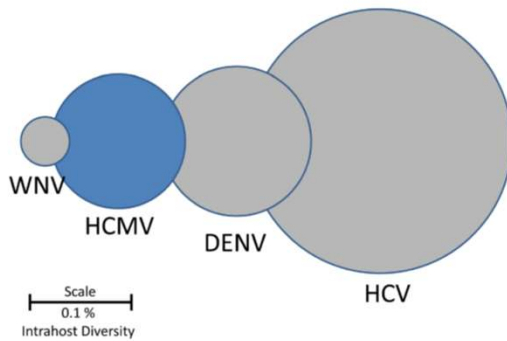
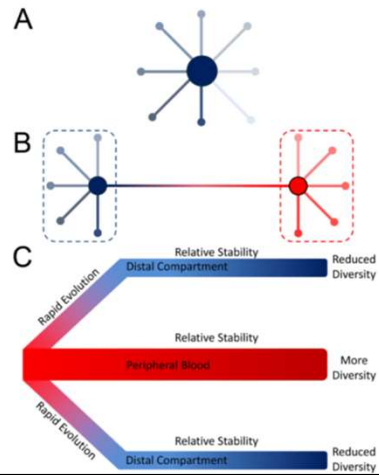


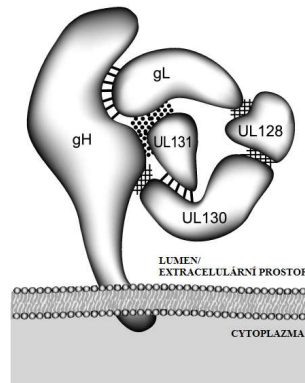
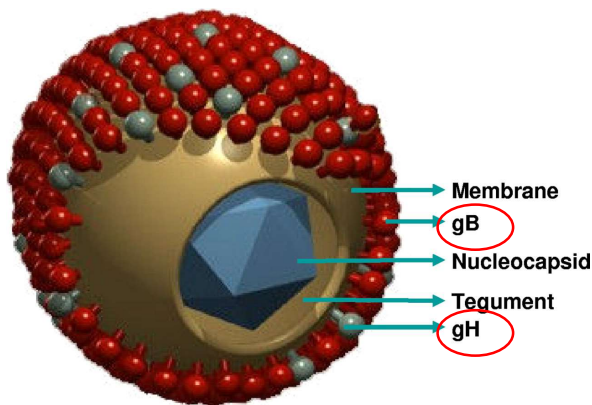
Figure 1. HCMV intrahost genetic diversity as compared to RNA viruses
Viral intrahost diversities are represented as circles with the diameters, drawn on a log scale, representing reported values of diversity. The genetic diversity of HCMV populations is comparable to those of RNA viruses, an unexpected result given that HCMV is a large dsDNA virus. Values were obtained from [16] and references therein. Abbreviations are as follows: WNV: West Nile Virus, HCMV: human cytomegalovirus, DENV: dengue virus, HCV: hepatitis C virus. Scale bar represents the diameter of a genetic diversity value of 0.1%.

Reinfekce asi u 10%

Predominantní sekvence asi u 90% virové populace.



Genotypizace CMV



Většinou podle povrchových proteinů – gB, gH, gO, gN,...

IMMUNOCOMPROMISED HOSTS: David R. Snyderman, Section Editor

Definitions of Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Patients for Use in Clinical Trials

Per Ljungman,^{1,2} Michael Boeckh,^{4,5} Hans H. Hirsch,⁶ Filip Josephson,³ Jens Lundgren,⁷ Garrett Nichols,⁸ Andreas Pkiss,⁹ Raymond R. Razonable,¹⁰ Veronica Miller,¹¹ and Paul D. Griffiths¹²; for the Disease Definitions Working Group of the Cytomegalovirus Drug Development Forum*

IMMUNOCOMPROMISED HOSTS • CID 2017:64 (1 January) • 87

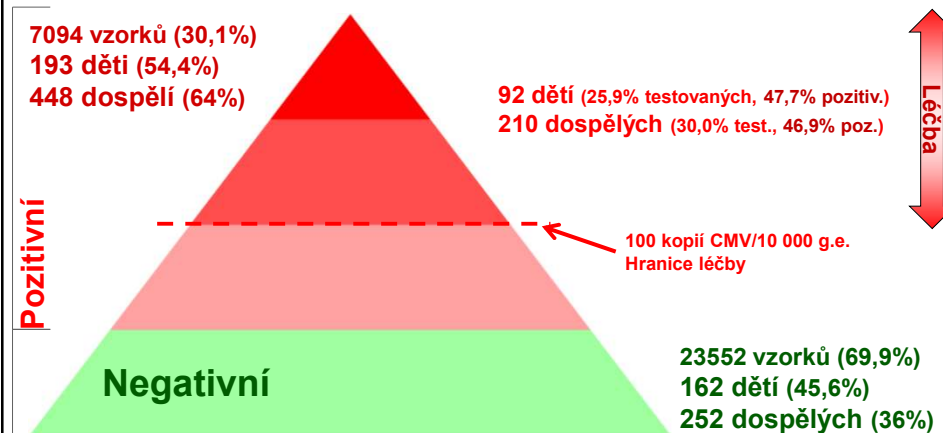
IMMUNOCOMPROMISED HOSTS: David R. Snyderman, Section Editor

Definitions of Resistant and Refractory Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Recipients for Use in Clinical Trials

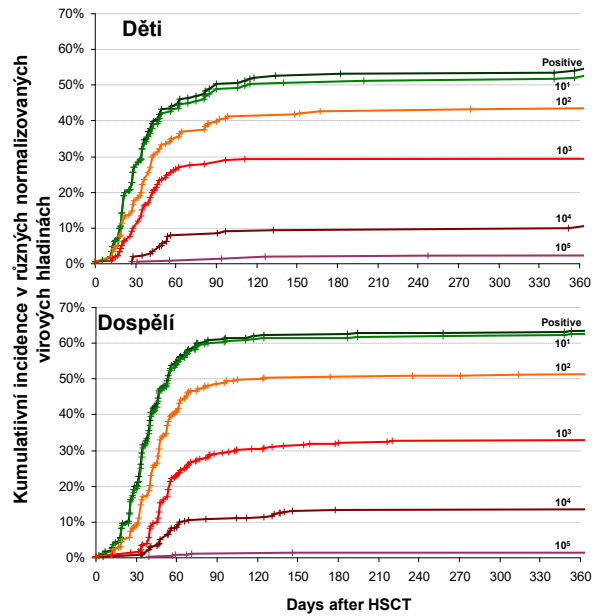
Roy F. Chemaly,¹ Sunwen Chou,² Hermann Einsele,³ Paul Griffiths,⁴ Robin Avery,⁵ Raymond R. Razonable,⁶ Kathleen M. Mullane,⁷ Camille Kotton,⁸ Jens Lundgren,⁹ Takashi E. Komatsu,¹⁰ Peter Lischka,¹¹ Filip Josephson,¹² Cameron M. Douglas,¹³ Obi Umeh,¹⁴ Veronica Miller,¹⁵ and Per Ljungman^{16,17}; for the Resistant Definitions Working Group of the Cytomegalovirus Drug Development Forum

1420 • CID 2019:68 (15 April) • IMMUNOCOMPROMISED HOSTS

CMV detekce u alo-HSCT



Incidence po HSCT

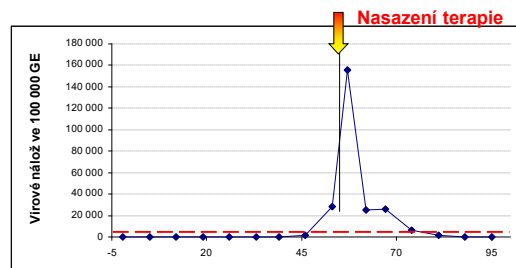


Hranice pro léčbu

1,000 NVCs

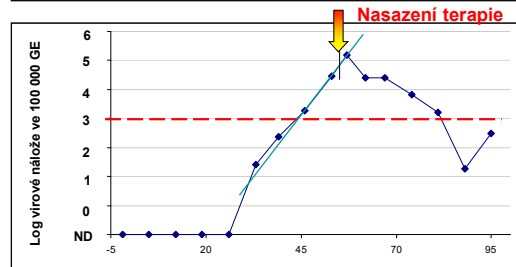
- Překročena 28% dětí a 34% dospělých 1 rok po HSCT
- **Není** signifikantní rozdíl ($p=0.08$)

Proliferace CMV



In vivo je popsán doubling time CMV mezi

48-72 hodinami

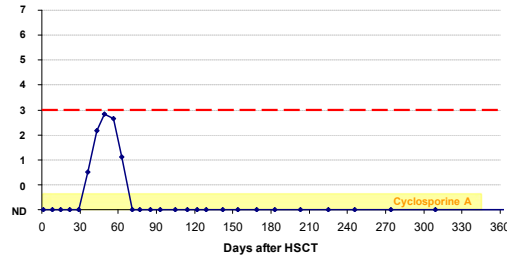


Jde o exponenciální proliferaci.

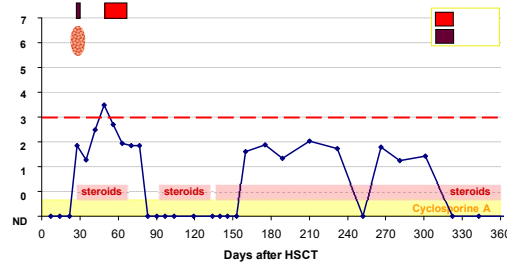
Větší virová nálož zvyšuje šanci vzniku rezistentního kmene

Pacientka s AML po alogenní HSCT

Nekomplikované reaktivace/infekce CMV

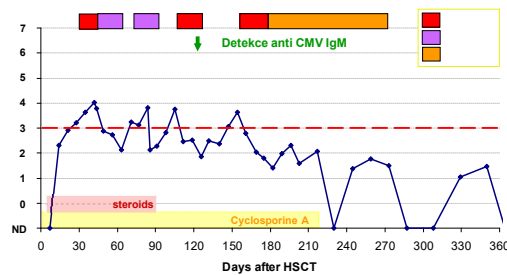


Dívka, 3,3 roku, HSCT pro SAA
 Dárce: MSD CMV ser.: D+/R+
 Štěp: kostní dřeň
 Přípravný r.: ALG (75 mg/kg)
 Cyklofosfamid (200 mg/kg)
 GvHD profylaxe: CyA, MTX
 GvHD: žádná
 Outcome: živa bez klinických obtíží.

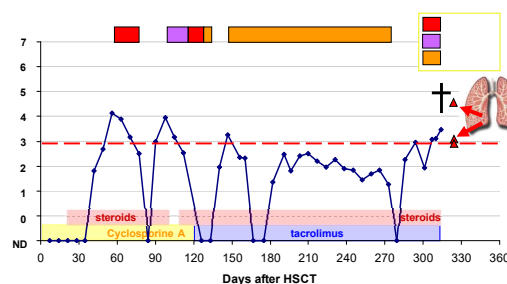


Chlapec, 13 let, HSCT pro MDS(RAEB)
 Dárce: MMUD (9/10) CMV ser.: D+/R+
 Štěp: PBSC
 Přípravný r.: Busulfan (16 mg/kg)
 Cyklofosfamid (120 mg/kg)
 Melfalan (140 mg/m²)
 ATG (40 mg/kg)
 GvHD profylaxe: CyA+MTX
 GvHD: grade II (D+28), cGvHD
 BKV+ HC (D+40; 1x CDV-zlepšení)
 Outcome: živý, hypofunkce štítné žlázy.

Komplikované infekce

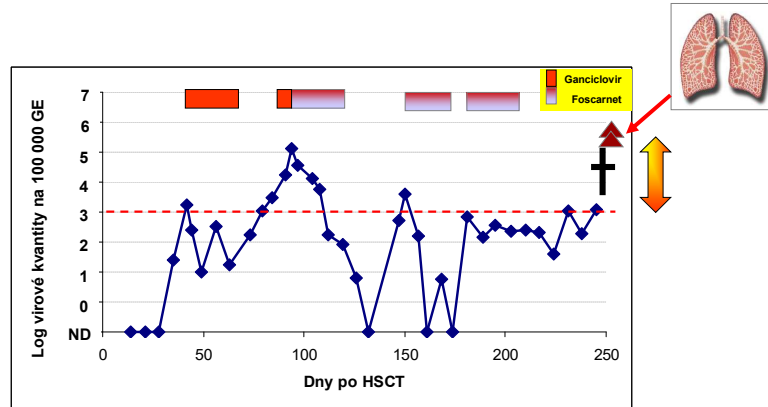


Dívka, 2,9 let, HSCT pro MDS-RC
 Dárce: MMUD (4/6) CMV ser.: D-/R+
 Štěp: CB
 Přípravný r.: Busulfan (18 mg/kg)
 Cyklofosfamid (120 mg/kg)
 Melfalan (140 mg/m²)
 ATG (40 mg/kg)
 GvHD profylaxe: CyA, MTX, steroidy
 GvHD: žádná
 Outcome: žije, STH deficeince.



Dívka, 14,3 let, HSCT pro AML/EWS
 Dárce: MUD CMV ser.: D+/R+
 Štěp: PBSC
 Přípravný r.: Busulfan (16 mg/kg)
 Cyklofosfamid (120 mg/kg)
 Melfalan (140 mg/m²)
 ATG (40 mg/kg)
 GvHD profylaxe: CyA+MTX
 GvHD: grade II (D+28, +41), cGvHD
 Outcome: zemřela D+317 na zygomykózu kombinovanou s CMV nemocí.

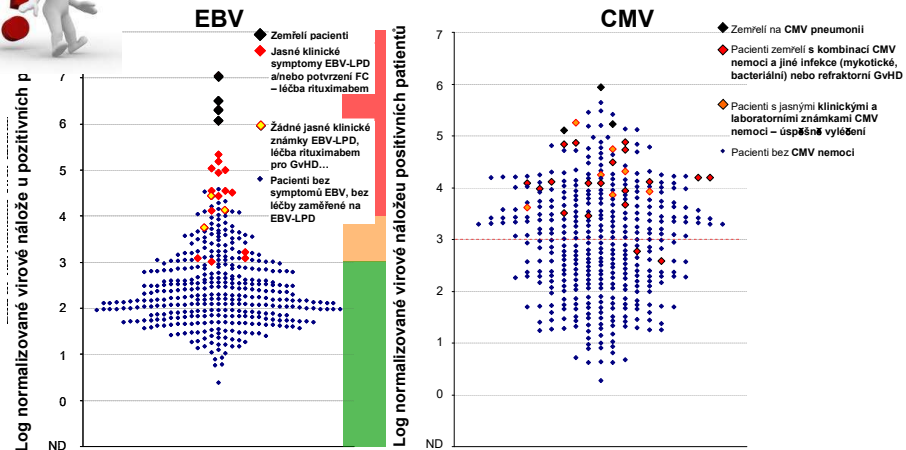
Vyšetřování klinicky relevantních míst



Pacient s ALL HSCT v 10,4 rocıch věku D-/R-

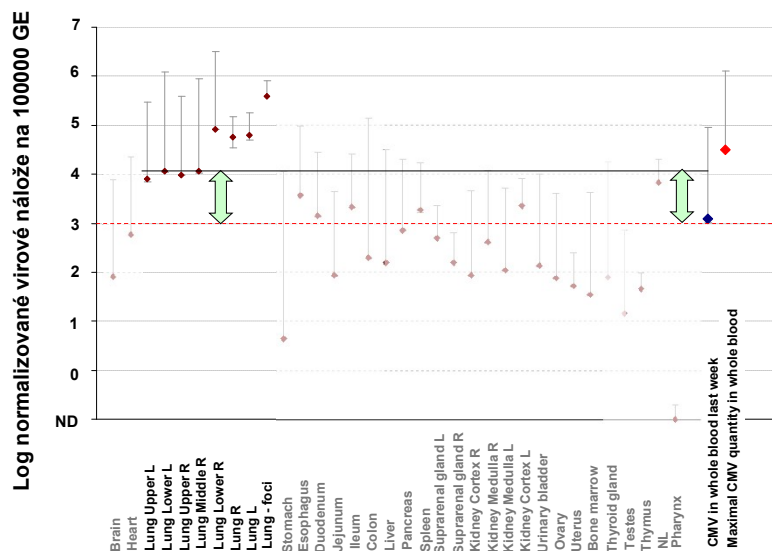
Detekce také ve stolici, BALu a dalších klinicky relevantních místch !!!

CAVE kvantita

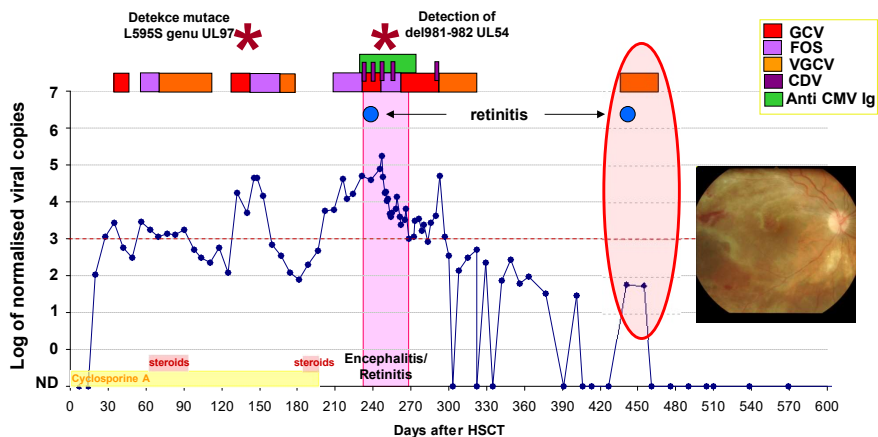


Neplatı jednoduchá závislost vyšší kvantıty a klinické významnosti – vždy je třeba přemýšlet i nad biologickém průběhem infekce!

Medián CMV kvantity ve tkáních (N=9 pts.)



CMV encefalitida/retinitida



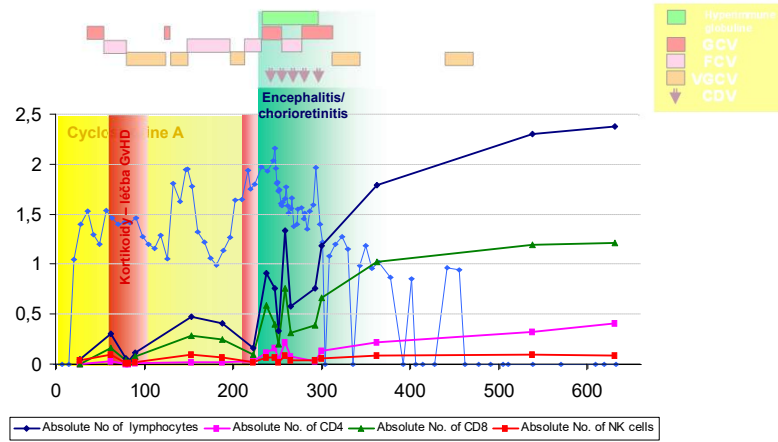
Dívka, 18.6 roku, HSCT pro AML M2 Dárce: MMUD^(8/10) CMV ser.: D-/R-
 Štěp: PBSC Conditioning: Busulfan (16 mg/kg), Cyclofosfamid (120 mg/kg),
 Melfalan (140 mg/m²) ATG (40 mg/kg)

GvHD profylaxe: CyA+MTX

GvHD: grade II (D+61) – kůže GIT Další: D+16 BKV+ HC, D+377 Herpes zoster

Outcome: živá, snížení zrakových schopností

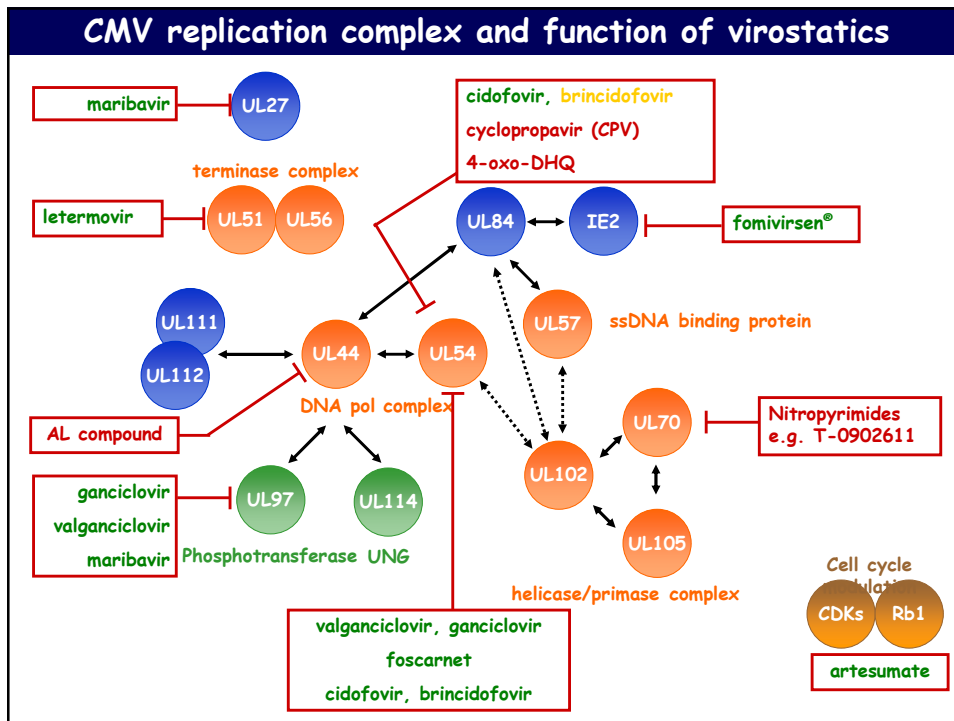
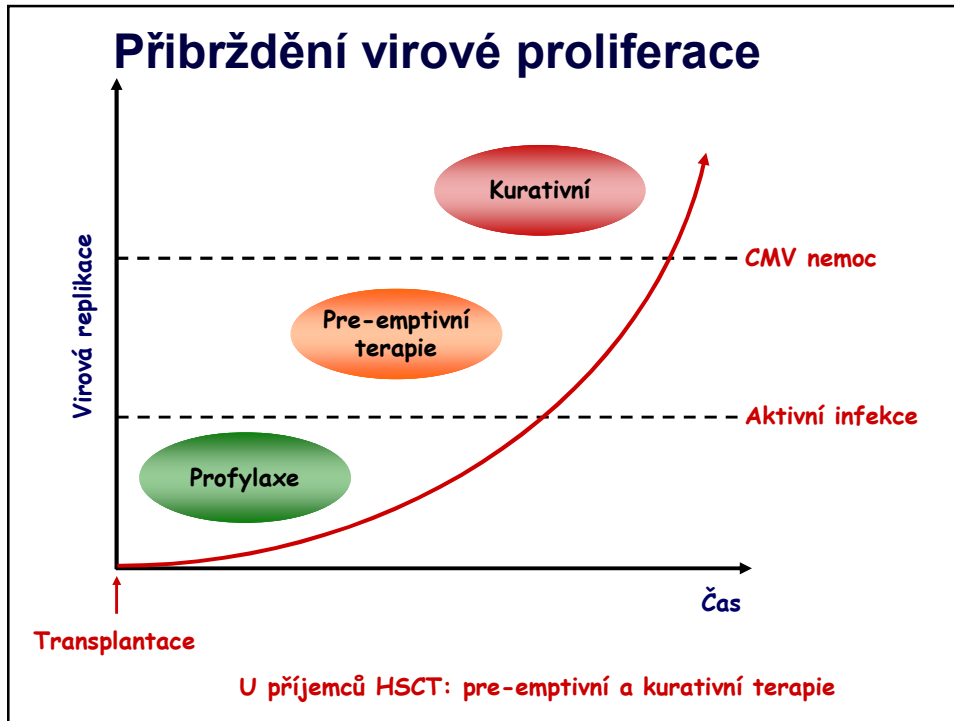
Počty lymfocytů



I krátkodobá terapie kortikoidy vede ke snížení počtu lymfocytů nutných pro kontrolu infekce.

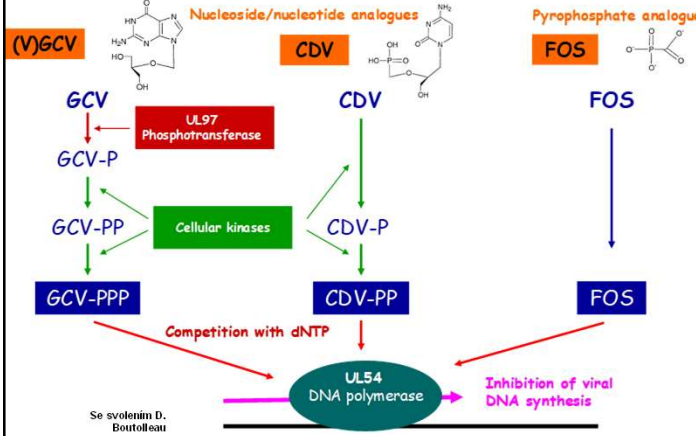


Jaké máme zkušenosti s rezistencí?

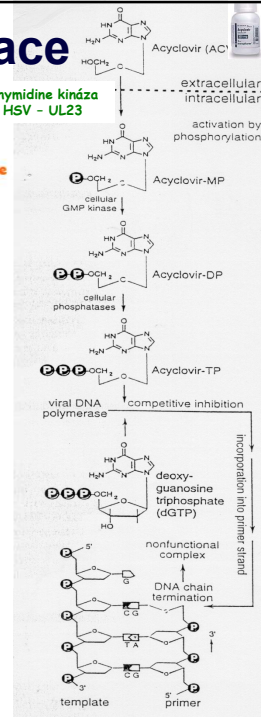


Přibrždění virové proliferace

→ Inhibitors of CMV DNA polymerase UL54



Thymidine kináza
HSV - UL23



Definice a rizikové faktory

Table 2. Summary of the Definitions of Refractory Cytomegalovirus Infection and Disease and Antiviral Drug Resistance for Use in Clinical Trials

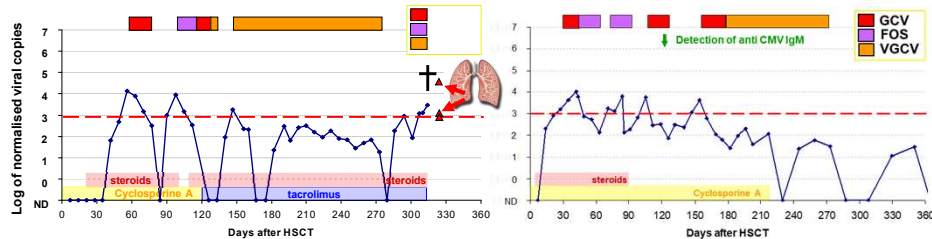
Term	Definition
Refractory CMV infection	CMV viremia that increases* after at least 2 wk of appropriately dosed antiviral therapy
Probable refractory CMV infection	Persistent viral load** after at least 2 wk of appropriately dosed antiviral therapy
Refractory CMV end-organ disease	Worsening in signs and symptoms or progression into end-organ disease after at least 2 wk of appropriately dosed antiviral therapy
Probable refractory CMV end-organ disease	Lack of improvement in signs and symptoms after at least 2 wk of appropriately dosed antiviral drugs
Antiviral drug resistance	Viral genetic alteration that decreases susceptibility to one or more antiviral drugs*

Abbreviation: CMV, cytomegalovirus.

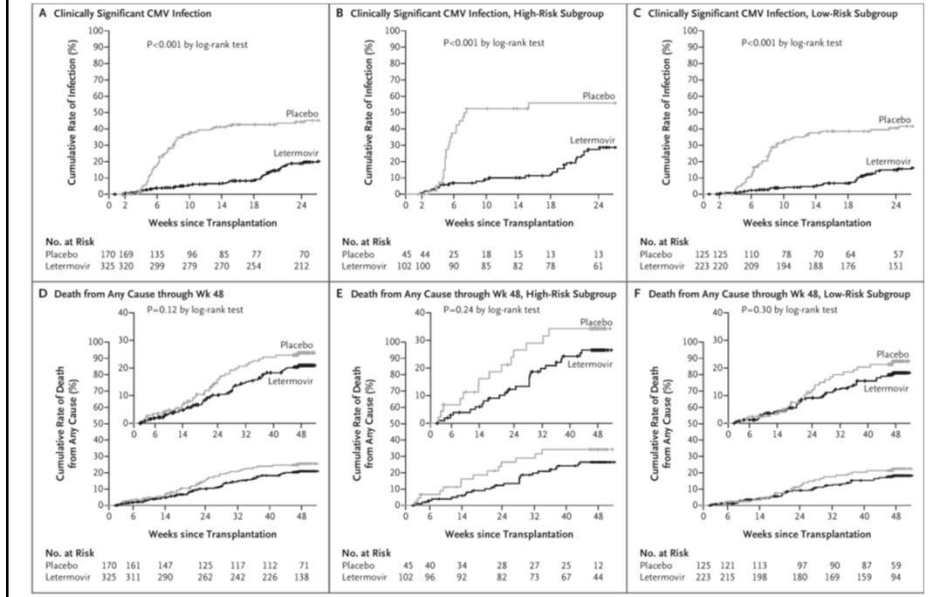
*More than 1 log₁₀ increase in CMV DNA levels in blood or serum and determined by log₁₀ change from the peak viral load within the first week to the peak viral load at ≥2 weeks as measured in the same laboratory with the same assay.

**CMV viral load at the same level or higher than the peak viral load within 1 week but <1 log₁₀ increase in CMV DNA titers done in the same laboratory and with the same assay.

*Known examples involve genes involved in antiviral drug anabolism (eg, UL97-mediated phosphorylation of ganciclovir), the antiviral drug target (eg, UL54, UL97, UL56/89/51), or compensation for antiviral inhibition of biological function (eg, UL27).



Letermovir Prophylaxis for Cytomegalovirus in Hematopoietic-Cell Transplantation



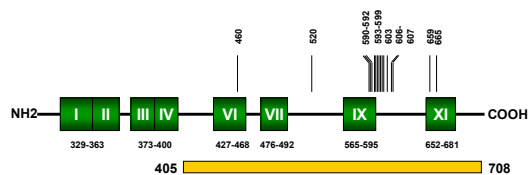
CMV rezistence

Klinická rezistence je suspektní po nepoklesu, či vzestupu CMV DNA v periferní krvi po 2 týdnech dobře vedené terapie.

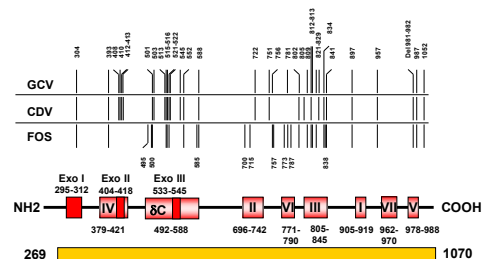
Potvrzení bylo provedeno pomocí sekvenování UL97 a UL54.

Získané sekvence byly porovnány s AD169 CMV kmenem.

UL97 phosphotransferase - GCV resistance



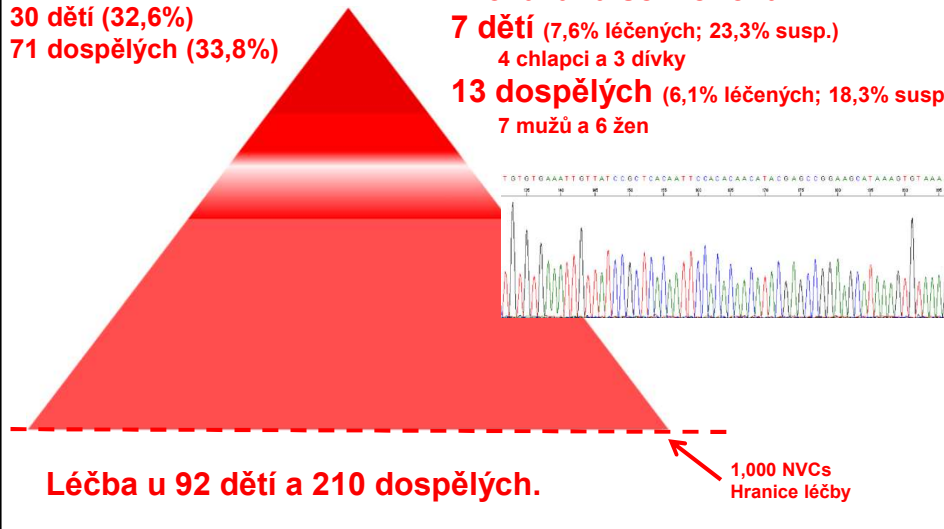
UL54 DNA polymerase - GCV, CDV and FOS resist.



Klinická a prokázaná CMV rezistence

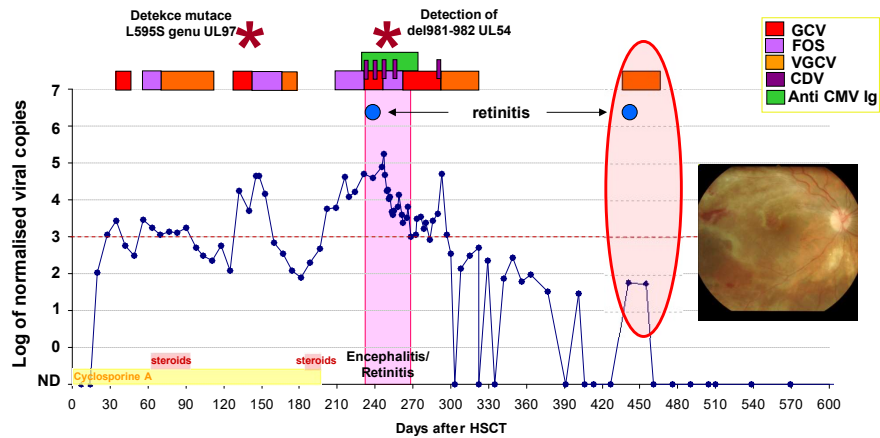
Suspektní
 30 dětí (32,6%)
 71 dospělých (33,8%)

Prokázaná sekvenováním
 7 dětí (7,6% léčených; 23,3% susp.)
 4 chlapci a 3 dívky
 13 dospělých (6,1% léčených; 18,3% susp.)
 7 mužů a 6 žen



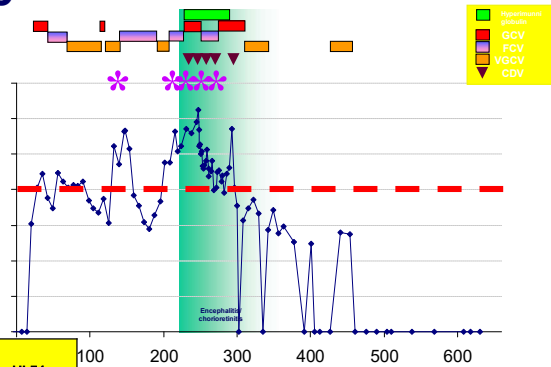
Léčba u 92 dětí a 210 dospělých.

CMV encefalitida/retinitida



Dívka, 18,6 roku, HSCT pro AML M2 Dárce: MMUD^(8/10) CMV ser.: D-/R-
 Štěp: PBSC Conditioning: Busulfan (16 mg/kg), Cyclofosfamid (120 mg/kg),
 Melfalan (140 mg/m²) ATG (40 mg/kg)
 GvHD profylaxe: CyA+MTX
 GvHD: grade II (D+61) – kůže GIT Další: D+16 BKV+ HC, D+377 Herpes zoster
 Outcome: živá, snížení zrakových schopností

GCV rezistence

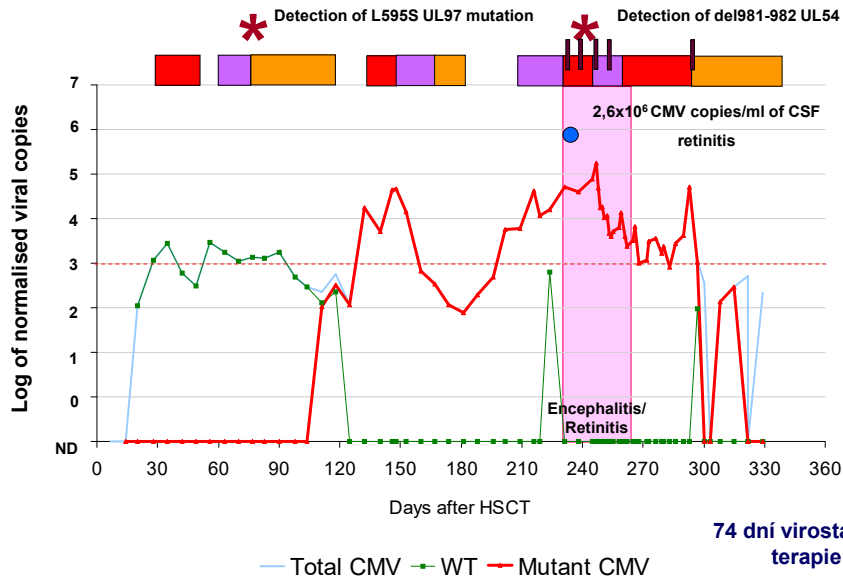


Den	Materiál	Gen UL97		UL54
		Mutace A594V	Mutace L595S	
146	Krev	WT+mutace	WT+mutace	Neděláno
209	Krev	WT	Mutace	Neděláno
231	Krev	WT	Mutace	Neděláno
234	CSF	WT+mutace	Mutace	Neděláno
238	Krev	Neděláno	Neděláno	Mutace
247	Krev	Neděláno	Neděláno	Mutace
248	Krev	WT+mutace	Mutace	Neděláno
276	Plazma	WT	Mutace	Neděláno

Možnost detekce rezistentní mutanty je u dlouhodobě léčených pacientů velkou výhodou.

*Hubacek et al. Pediatr Transplantation 2009

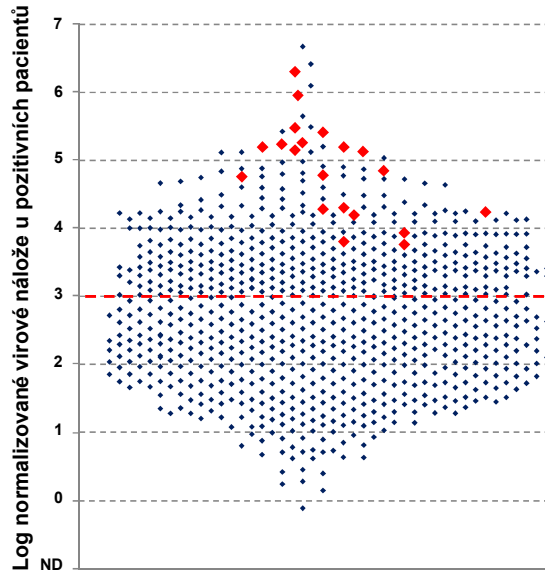
Poměr WT a L595S CMV mutanty



74 dní virostatické terapie

*Hubacek et al. Pediatr Transplantation 2009

CMV rezistence max. kvantita v plné krvi



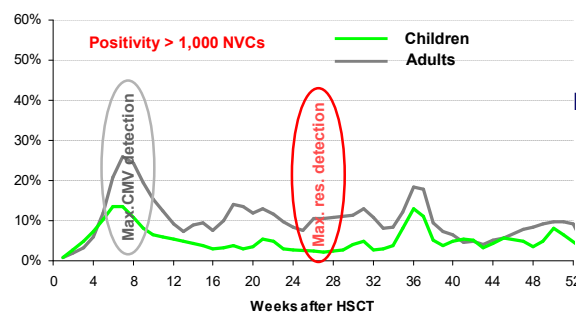
Vysoká virová nálož
koreluje s vývojem
rezistence

(Mann-Whitney $p < 0.0001$)

gB1gH1 – 5 pac.
gB3gH1 – 4 pac.
gB1gH2 – 4 pac.
gB4gH2 – 2 pac.
gB2gH1 – 1 pac.
gB2gH2 – 1 pac.
a smíšené infekce (gB1,gH1,2, gB2,
gH1,2 and gB1,3gH1,2)

75% pacientů s rezistencí
zemřeli.
Pouze jeden zemřel na
prokázanou CMV
pneumonii.

Čas rozvoje rezistence



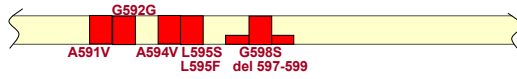
Rezistence byla detekována
s mediánem 190 dní po
HSCT (rozptyl 53-2105 dní);
virová nálož 4245 NVCs
(/100000 g.e.).

20 týdnů

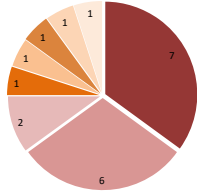
Rozdíl mezi nejvyšší měřenou kvantitou a
prokázanou rezistencí je 64 dní (rozptyl 0-299).

Čas selektivní léčby

UL97



- A594V
- L595S
- M460V
- A591V
- L595F
- G598S
- C592G
- Del 597-599



Medián selektivního tlaku

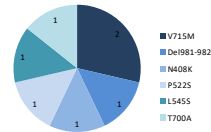
– 74 dní (rozptyl 2-359)

Medián u dospělých 64 dní; medián u dětí 105 dní. (NS.)

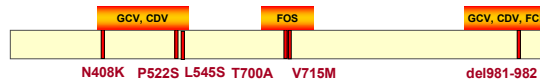
Medián selektivního tlaku

– 89 dní (rozptyl 62-116)

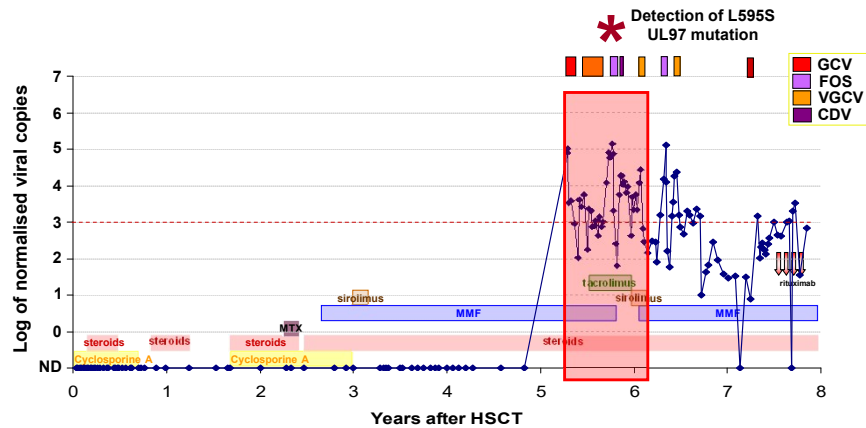
Medián u dospělých 103 dní; medián u dětí 90 dní.



UL54

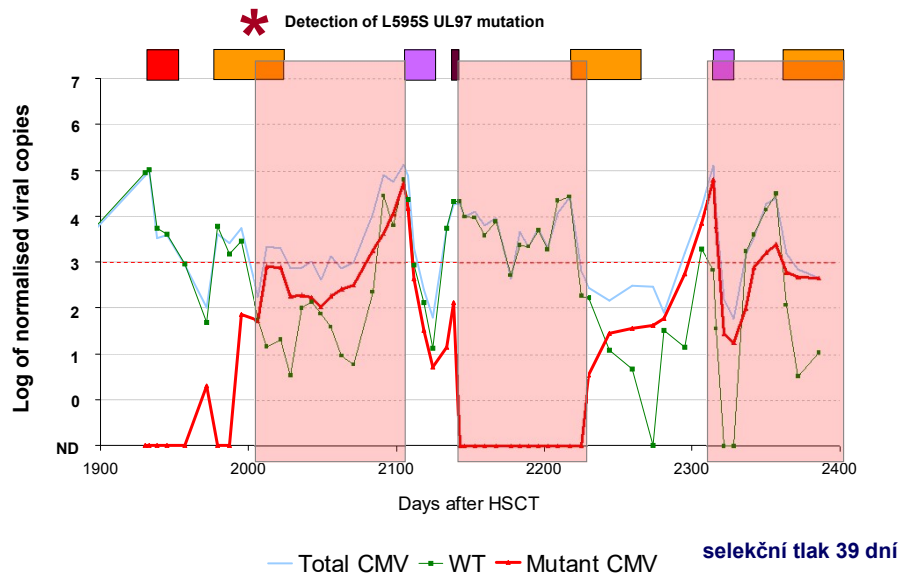


Pozdní CMV primoinfekce



Boy, 18.6 yrs., HSCT for AML M2 Donor: MMUD(8/10) CMV ser.: D-/R-
 Graft: PBSC Conditioning: TBI (14.4 Gy), Cyclophosphamide (120 mg/kg), ATG (30 mg/kg)
 GvHD prophylaxis: CyA+MTX
 GvHD: grade II (D+20), chronic extensive GvHD,
 Other: TTP/HUS, esophagic stenosis, Coomb+, aseptic necrosis of hip joints
 Outcome: alive, TEP of hip joints, esophageal stent.

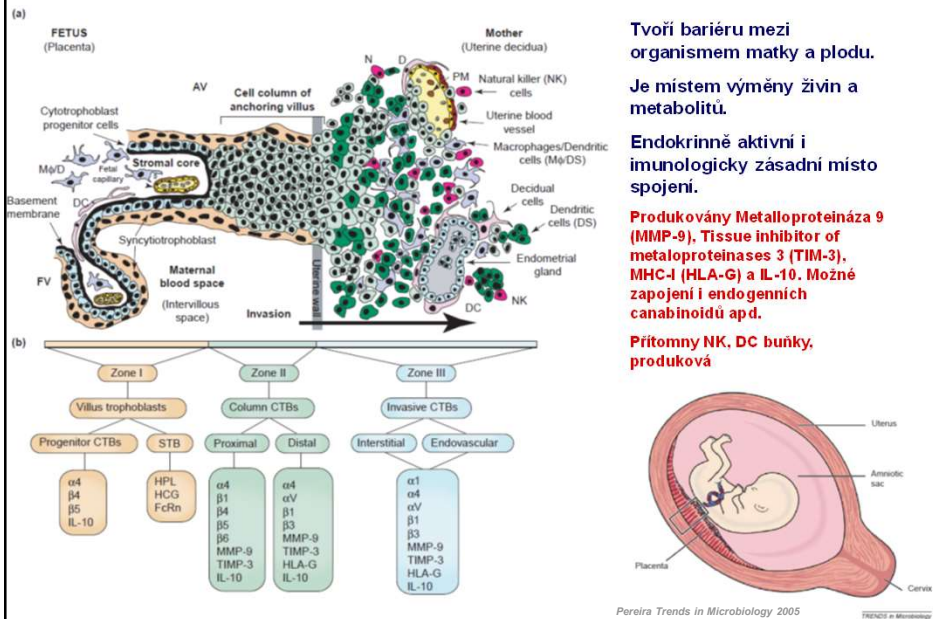
Poměr WT a L595S CMV mutanty



A co teratogenita?



Základem je placenta



Příznaky a následky cCMV



Infekce placenty

- prosáknutí stěny – horší difúzní vlastnosti
- menší tvorba kotyledonů – menší plocha placenty
- IUGR**

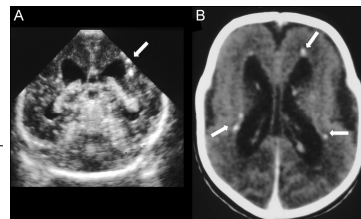
Infekce plodu

- suprese kostní dřeně **petechie**
- infekce „cílových orgánů CMV“
- vaskulitida – zejména oči a CNS
- Neurologické postižení/záchvaty**

Vylučování CMV do moči

Předčasný porod

Mozkové kalcifikace/ kavity



Asymptomatická infekce

Příznaky (kongenitální) CMV

Asymptomatické

90% dětí s cCMV



Symptomatické



<http://medicotrivia.files.wordpress.com/2010/07/blueberry-baby1.jpg>

Symptomy cCMV

Dle CDC

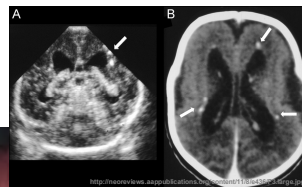
Příznaky kongenitální CMV infekce při narození

Předčasný porod
Hepatopatie (žloutenka)
Plicní příznaky (pneumonie)
Splenomegalie
IUGR
Neurologické záchvaty

Petechie, purpura

Trvalé zdravotní problémy spojené s kongenitální CMV infekcí

Senzoneurální ztráta sluchu
Ztráta zraku
Mentální postižení
Mikrocefalie
Motorické problémy (koordinace)
Neurologické záchvaty (epilepsie)
Vzácně smrt



Blueberry muffin baby (tedy „dítě borůvkového muffinu“) je charakterizován purpurou jako příznakem extramedullární hematopoézy.

Symptomy cCMV

Dle CDC

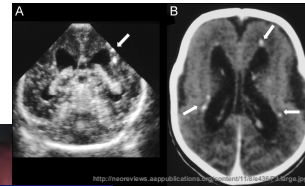
Příznaky kongenitální CMV infekce při narození

Předčasný porod
Hepatopatie (žloutenka)
Plicní příznaky (pneumonie)
Splenomegalie
IUGR
Neurologické záchvaty

Petechie, purpura

Trvalé zdravotní problémy spojené s kongenitální CMV infekcí

Senzoneurální ztráta sluchu
Ztráta zraku
Mentální postižení
Mikrocefalie
Motorické problémy (koordinace)
Neurologické záchvaty (epilepsie)
Vzácně smrt



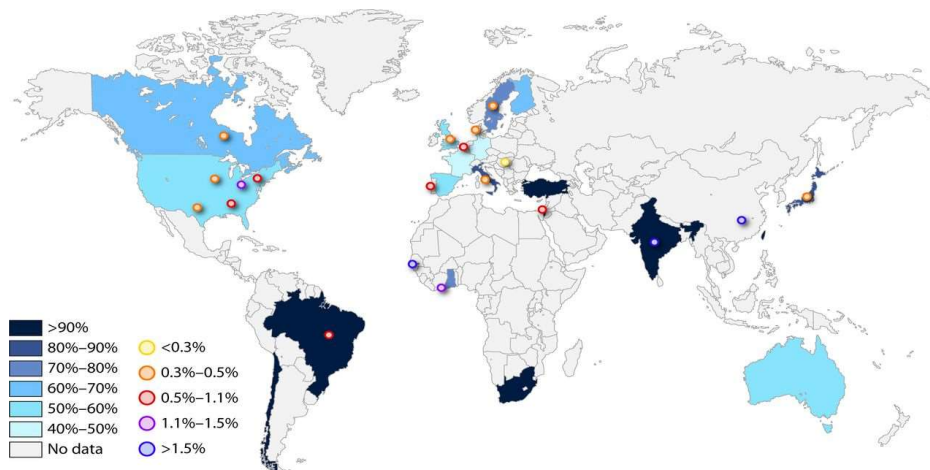
45 % Preterm
70 % Thrombocytopenia
45 % Petechiae
45 % Hepatomegaly
45 % Splenomegaly
40 % IUGR
50 % ↑ ALT, AST or Bili
65 % CNS involvement

Kimberlin trial 2015

Blueberry muffin baby (tedy „dítě borůvkového muffinu“) je charakterizován purpurou jako příznakem extramedullární hematopoézy.

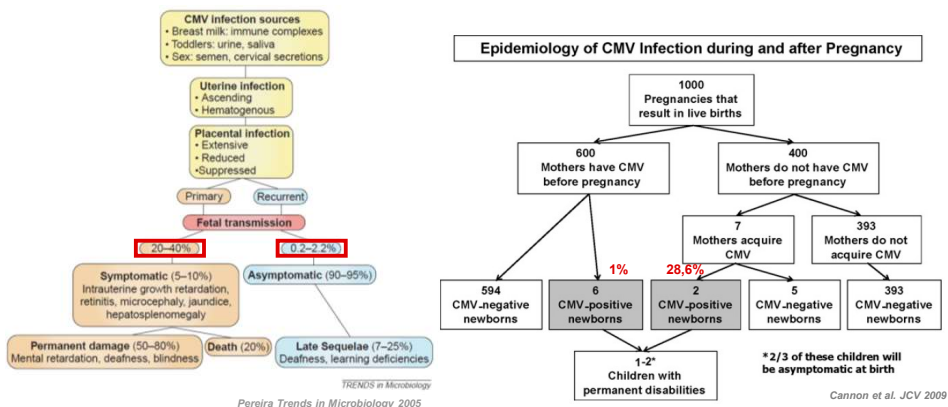
Jaký je výskyt cCMV?

Každý den se rodí 370 000 dětí na světě tj. 134 milionů/rok.
Průměrná frekvence výskytu je přibližně 1,5% tj. 2,01 milionů dětí s cCMV/rok.



Manickl et al. Clin Microbiol Rev. 2013
<http://cmr.asm.org/content/26/1/86/F7.large.jpg>

Frekvence přenosu CMV z matky na dítě



Asymptomatických dětí s cCMV je přibližně 85-90% (postižení CNS).

V absolutních číslech detekujeme cCMV s poměrem 3:1 častěji u matek seropozitivních k CMV před těhotenstvím.

Výskyt symptomů a riziko přenosu pak odpovídá množství neutralizačních protilátek.

Frekvence přenosu CMV z matky na dítě

Při primoinfekci: 32%

Při reaktivaci: 1,4%

(Kenneson et al., Rev Med Vir 2007)

	Prekoncepční období	Perikoncepční období
Enders et al. 2011	4/24 (16,7%)	10/26 (38,5%)
Feldman et al. 2011	0/97 (0%)	6/130 (4,6%)
Revello et al. 2002	1/11 (9,1%)	4/13 (30,8%)
Daiminger et al. 2005	0/3 (0%)	9/20 (45%)
Revello et al. 2006	1/12 (8,3%)	
Revello et al. 2011	6/106 (5,7%)	
Picone et al. (současná)	3/27 (11%)	14/73 (19,2%)
Celkové	15/180 (5,3%)	43/262 (16%)

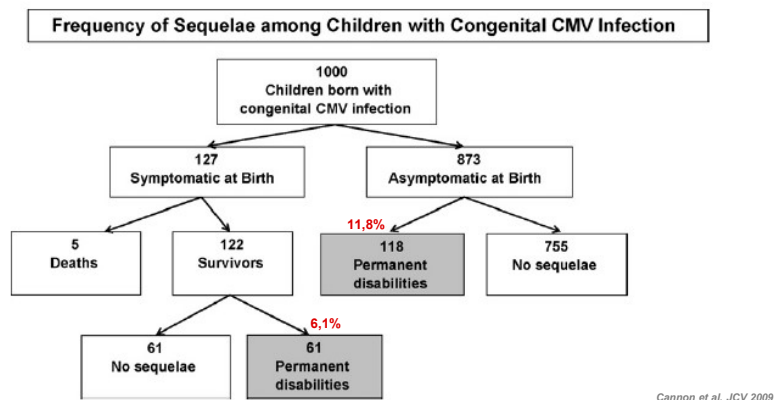
Frekvence přenosu CMV z matky na dítě

	První trimestr	Druhý trimestr	Třetí trimestr	Celkem
Bodeus et al. 1999	9/25 (36%)	22/49 (44,9%)	38/49 (77,6%)	69/123 (56,1%)
Bodeus et al. 2002	2/9 (22,2%)	11/34 (32,3%)	20/26 (76,9%)	33/69 (47,8%)
Bodeus et al. 2010	39/113 (34,5%)	60/136 (44,1%)	74/101 (63,3%)	173/350 (49,4%)
Enders et al. 2011	25/83 (30,1%)	29/76 (38,2%)	26/36 (72,2%)	80/195 (41%)
Feldman et al. 2011	53/152 (34,9%)	42/100 (42%)	17/29 (58,6%)	112/281 (39,9%)
Revello et al. 2011	111/263 (42,2%)	64/147 (43,5%)	25/39 (64,1%)	200/449 (44,5%)
Liesnard et al. 2000	5/14 (35,7%)	18/67 (26,9%)	16/52 (30,8%)	39/133 (29,3%)
Gindes et al. 2008			21/28 (75%)	21/28 (75%)
Picone et al. (současná)	19/68 (27,9%)	14/36 (38,9%)	6/13 (46,2%)	39/117 (33,3%)
Celkové	263/727 (36,2%)	260/645 (40,3%)	243/373 (65,1%)	766/1745 (43,9%)

Při infekci po 2. trimestru nejsou zpravidla přítomny symptomy.

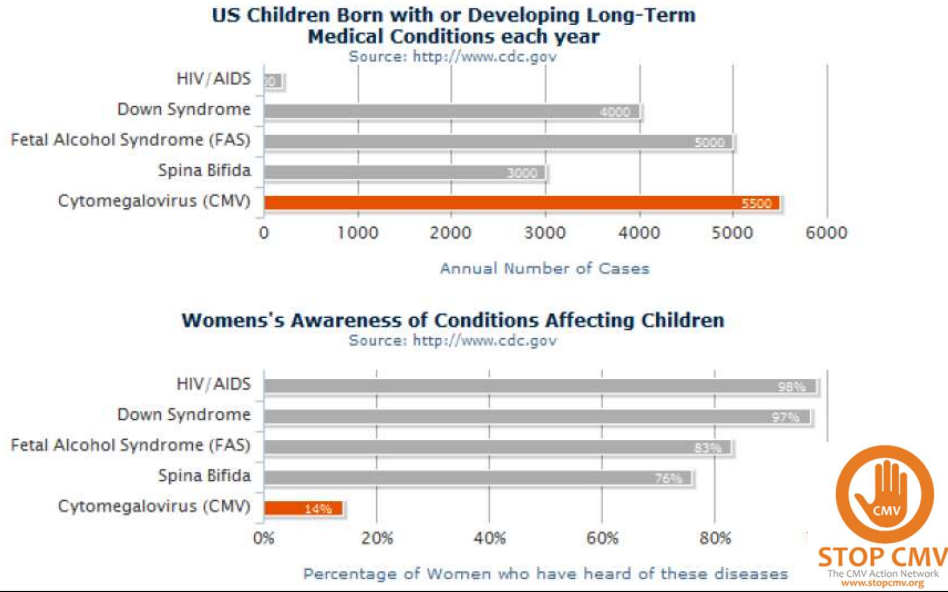
(Picone O. et al., Prenat Diagn. 2013 Aug; 33(8):751-8)

Stejně platí pro dlouhodobé následky



Většina dlouhodobých následků cCMV má tedy příčinu v asymptomatických infekcích.

Je povědomí o cCMV a následcích?



Detekce cCMV

Sérologická detekce

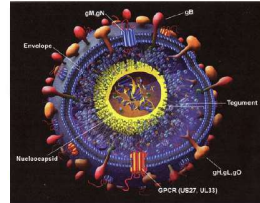
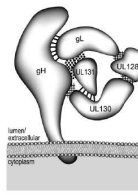
IgM (10% u reaktivací)
případně nízko avidních IgG

Nízce avidní IgG protilátky značí infekci před 18-20 týdny u imunokompetentního jedince.

Detekce těchto protilátek před 16.-18. WG identifikuje 100% žen, u kterých dojde k infekci plodu. (Po 20. týdnu senzitivita testu klesá na 62,5%).

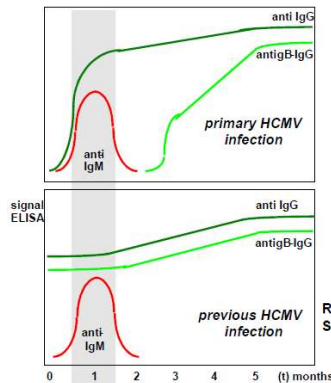
Vysoce avidní protilátky (12.-16.WG) jsou pak indikátorem v minulosti prodělané infekce.

Možnost rozlišení pak představují specifické protilátky proti gB.



Ryckman et al., J Virol, 2001

Streblov et al., 2006 in M. Reddehase



Rothe et al., 2000
Schoppel et al., JID 175, 1997

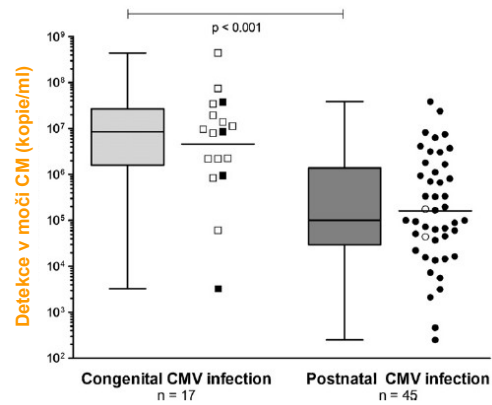
Detekce cCMV

Přímá detekce

kultivace z moči opouštěna

RQ-PCR se stává standardem
(možno detekovat v
amniocentéze, krvi matky,
dítěte a postnatálně i moči)

Lze využít i suchou kapku
(Guthrieho kartičku)



Detekovaná kvantita zpravidla odpovídá rozsahu infekce/ poškození/ symptomů plodu.

Do moči se v případě cCMV může uvolňovat řadu měsíců až let.

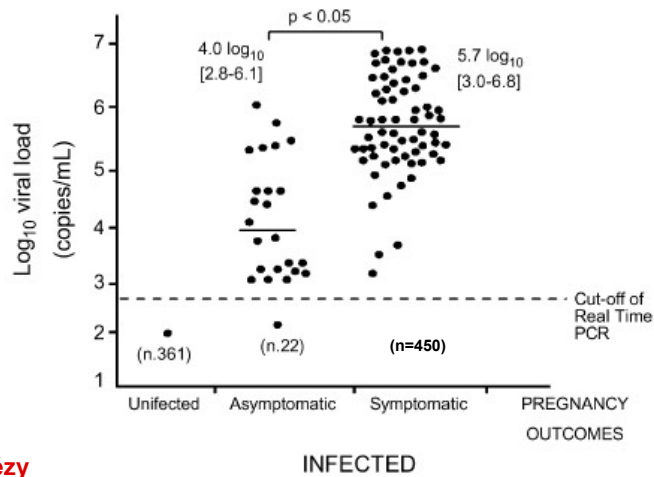
Amniocentéza

První moč je
tvořená přibližně
12 WG.

CMV je pomalu
proliferující virus a
než se tedy
dostane až do
plodové vody
počítá se interval
6-9 týdnů.

Amniocentéza po
21WG

**I výsledky amniocentézy
mohou být falešně negativní.**



Detekce CMV DNA v periferní krvi

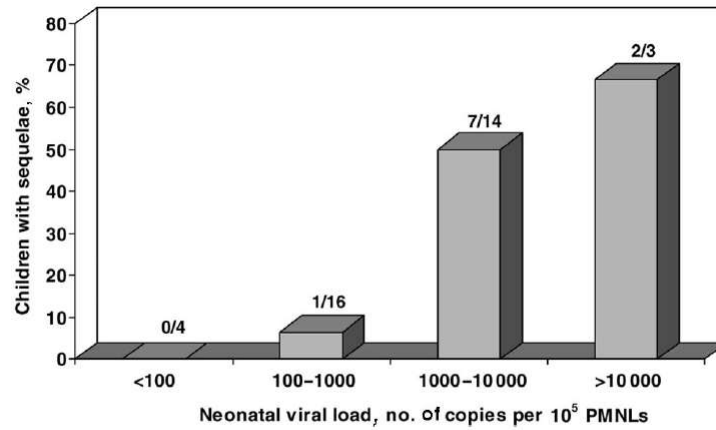
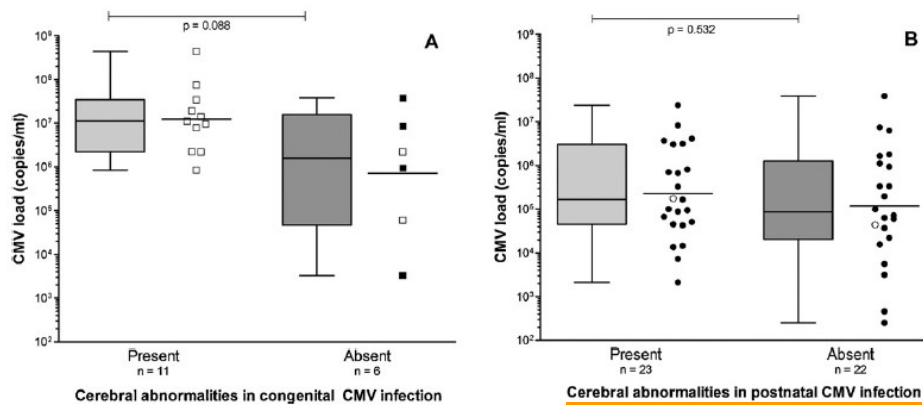


FIGURE 2

The proportion of children who developed sequelae at 12 months according to the neonatal CMV blood load.

PEDIATRICS Volume 117, Number 1, January 2006

Detekce CMV DNA v periferní krvi



V moči u se post-natálních infekcí objevuje CMV mezi 3. týdnem a 3 měsíci po porodu.

Pro post-partální infekce dochází k největší sekreci CMV do mléka mezi 2 týdnem a 2 měsícem.

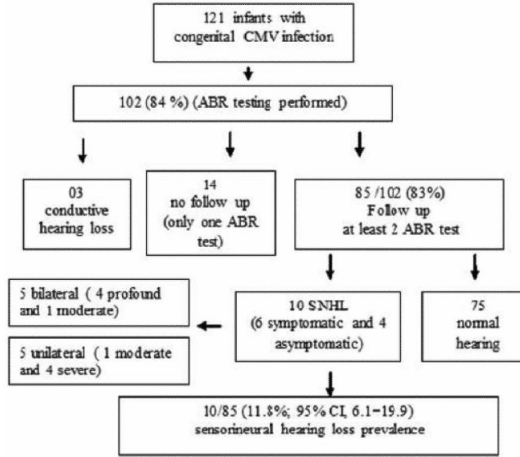
Pozdní efekty - SNHL

Celkem tvoří kumulativní incidence SNHL zapříčiněná CMV infekcí přibližně 30% všech případů.

Ztráta sluchu je pak popisovaná u 11% matek s ne-primární primoinfekcí a 13% s primární infekcí CMV.

Ztráta sluchu je pak popisována v době porodu u 4,7% asymptomatických a 36% symptomatických dětí.

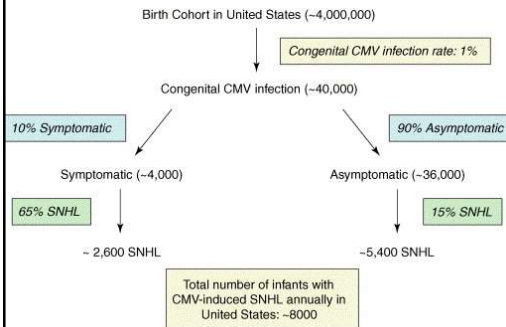
Symptomatické vychází při infekci před 14. týdnem gestace.



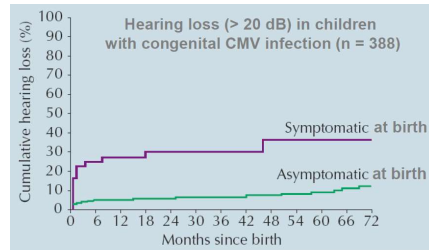
Medián progresse SNHL je 18 měsíců.

Yamamoto et. al. Ped Inf Dis 2012

Pozdní efekty - SNHL



Drug Discovery Today: Disease Mechanisms
<http://www.congenitalcmv.org/photos.htm>



Fowler et al. J Pediatr 1999

Drug Discovery Today: Disease Mechanisms | Hearing disorders Vol. 3, No. 1 2006

U dětí s bilaterální SNHL 10-25% je spojeno s cCMV

Celkem kolem 15% dětí s cCMV vyvine SNHL, která může být progresivní a s pozdním nástupem – infekce pokračuje i po porodu.

de Vries JJ, et al. J Clin Virol 2013 Feb;56(2):113-7

Terapií je kochleární implantát. (časté i poškození zraku)

Fahnehjelm, et al. Acta Paediatric 2015 Mar

Terapie cCMV

The National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group (CASG)

6 týdnů 6 mg/kg GCV a 12 hodin
(odpovídá 16 mg/kg VGCV a 12 h)

Hogea et. al. CMV workshop 2012

Hyperimunní globulin

- dávka 200U/kg Nigro NEJM 2005

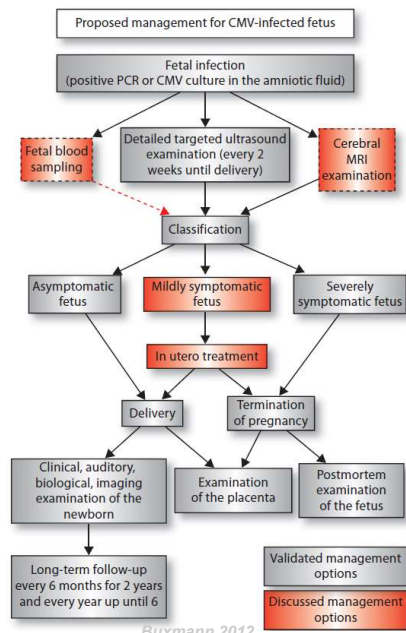
-dávka 180-220U/kg Buxmann 2012

- intraumbilikálně dávka 3x900U,
2x1000U, 2x500U Buxmann 2012

**Mateřské mléko – pasteurizace,
zamražení**

Umělá výživa

**Fungující vakcína proti CMV i přes roky vývoje
zatím stále není dostatečně spolehlivá a k
dispozici.**



Děkuji za pozornost



Petr.Hubacek@Lfmotol.cuni.cz