

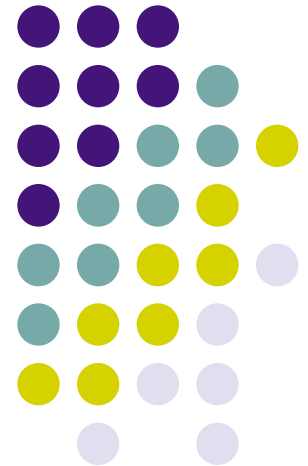
Význam a virologie lidského cytomegaloviru

Vlasta Štěpánová

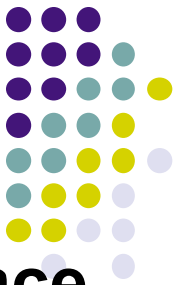
NRL pro CMV

Ústav klinické mikrobiologie

Fakultní nemocnice Hradec Králové

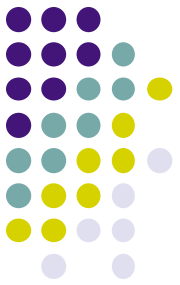


Úvod



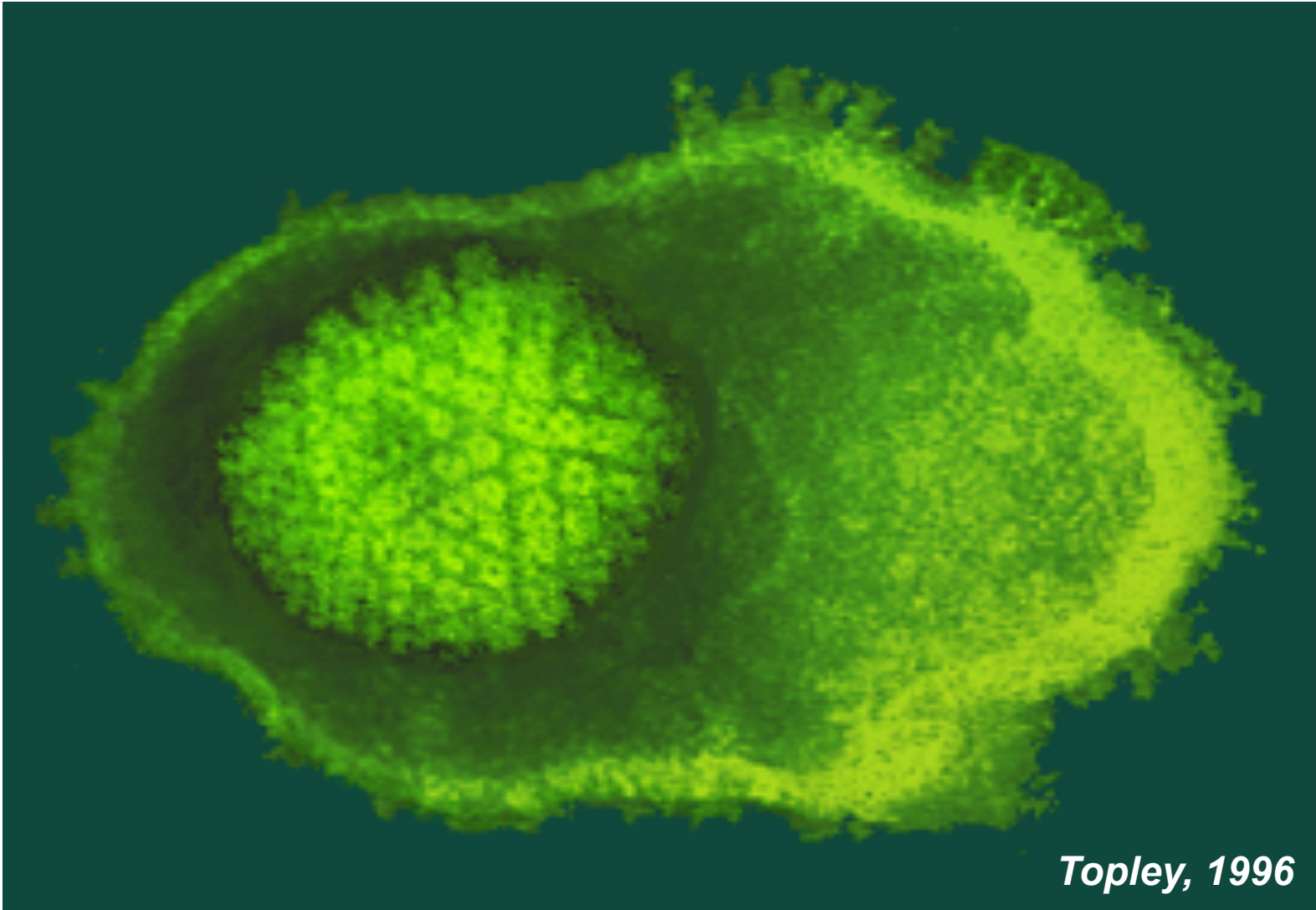
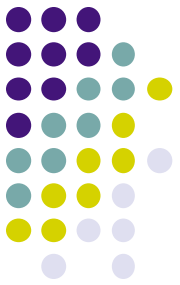
- **Běžný beta-herpesvirus - 50–80% dospělé populace**
- **Celoživotní asymptomatická latentní infekce s intermitentními subklinickými reaktivacemi kontrolovanými imunitním systémem**
- **Hlavní patogen immunoalterovaných jedinců - primoinfekce i reaktivace CMV latentní infekce u imunosuprimovaných pacientů – závažná morbidita a mortalita, zvláště u pacientů po transplantacích solidních orgánů a kmenových bb.**
- **Před zavedením terapie anti-CMV léky (90.léta 20.stol.) CMV nemoc (často jako CMV pneumonitis) hlavní příčinou komplikací a smrti u CMV séropozitivních příjemců krvetvorných bb. i solidních orgánů**

Úvod



- 1882 pat. nález u novorozenců s LU
- bb. nesoucí inkluze, „soví oko“
- 50. léta 20. stol. - izolace myšího CMV
- 1957 Smith - izolace lidského CMV, intrauterinní infekce
- 1960 Weller „cytomegalovirus“
- 1966 v Hradci Králové jako první v Evropě (prof. Dr. J. Horáček a kol.) izolace CMV na bb. LEP
- 1985 - NRL pro HCMV založena v ÚKM, FN Hradec Králové, prof. MUDr. J. Horáček, CSc.

CMV - virologie



Topley, 1996

CMV - virologie



- Čeleď – Herpesviridae, podčeleď betaherpesvirinae
- obalený, $\varnothing$ 100 – 110 nm, inaktivován tukovými rozpouštědly, éterem, UV, pH 3, přežívá několik hodin na kůži a površích
- kubická symetrie **kapsidy** (162 kapsomér)
- **Genom - dsDNA** (genom největší z herpes virů – 230 kb), 2 nestejně velké oblasti – UL (long) a US (short)
- Genová exprese - 3 fáze – „immediate-early“ (IE), „early“ (E), „late“ (L)
- Amorfní **tegument** – nejdůležitější fosfoproteiny pp150, pp65 a pp71 – antigenní, časné markery inf.
- **Vnější obal** (hostitelská jaderná a cytoplasmatická membrána) – glykoproteiny (vazba na receptory host. b. a fúze) → tvorba VN protilátek blokuujících přilnutí viru

Replikace viru v hostitelské b.



- 3 stádia replikačního procesu a produktů (exprese genů a tvorba proteinů):
- **Immediate early proteiny** (IE – pp. 68-72 kD) – role v regulaci vlastní virové replikace a stimulace exprese early genů
pp72-IE1: nestrukturální, regulační, bezprostředně časný jaderný antigen, zahajuje replikační cyklus viru, časný průkaz infekce b.
- **Early (E) proteiny** – 140 kD – HCMV DNA polymeráza, klíčová role ve virové replikaci
- thimidin kináza, syntéza strukturálních proteinů



Replikace viru v hostitelské b.

- **Late (L) proteiny** – strukturální proteiny – 150 kD, pp65, pp28 – skládání vir. částic, vynoření z b.
Antigenní, protilátky specifické (pp150)
- **Obálka** (envelope) – obalové glykoproteiny, **gpB**
~ genetická variabilita, genotypizace
- (~ HSV, VZV, EBV) → zkřížené reakce
- Latentní infekce – minimalizace exprese genů

Antigeny



- **pp72-IE1** – nestrukturální, regulační, bezprostředně časný jaderný antigen
- **pp65** – strukturální tegumentový protein, antigenní, nadprodukován při replikaci viru → částice, akumuluje se v granulocytech
- **UL97** – protein-kináza, fosforylace gancyklovir na GCVp → detekce resistantních mutant
- **UL54** – DNA-polymeráza → detekce rezistence
- **UL27** – rezistence na maribavir (syntéza HCMV DNA, vynoření částic CMV z jádra)
- **pp150** – hlavní kapsidový protein

CMV – biologické vlastnosti



- Virus se mezidruhově nepřenáší
- **zvířecí CMV** - myši, krysy, morčata, vepř, opice, kůň)
- Identifikováno několik **kmenů HCMV** – klinický význam u imunosuprimovaných pacientů, terapie
- **Množí se v bb. a vylučuje se** – CNS (likvor), spojivka (konjunktivální sekret, slzy), nasofaryng (sekret), slinná žláza (sliny), plíce (BAL), mléčná žláza (mateřské mléko), ledviny (moč), Git (sliznice žaludku, střeva, stolice), genitál (ejakulát), bb. cervixu (cervikální sekret), amniotická tekutina (infekce placenty, plodu), krevní elementy (PMN, různá vývojová stádia, T a B lymfocyty, monocyty)

CMV – epidemiologie



- ~ **40 až 100% prevalence protilátek** v dospělé populaci, ~ socioekonomická situace
- Vyspělé státy – až 20% pokles séroprevalence za posledních 20 let, 40 – 85% dospělí
- První nárůst séropozitivity – malé děti (částečně vertikální přenos), horizontální přenos v jeslích, školkách – respiračními sekrety, močí
- Druhý – dospívající a mladí dospělí, předpokládaný hlavně sexuální přenos, geografické rozdíly
- **Iatrogenní přenos** – krevní produkty, transplantované orgány a tkáně, přímý kontakt

Sérologické přehledy ČR 1996

zdroj: Zprávy CEM, 1998, ročník 7, Příloha 1

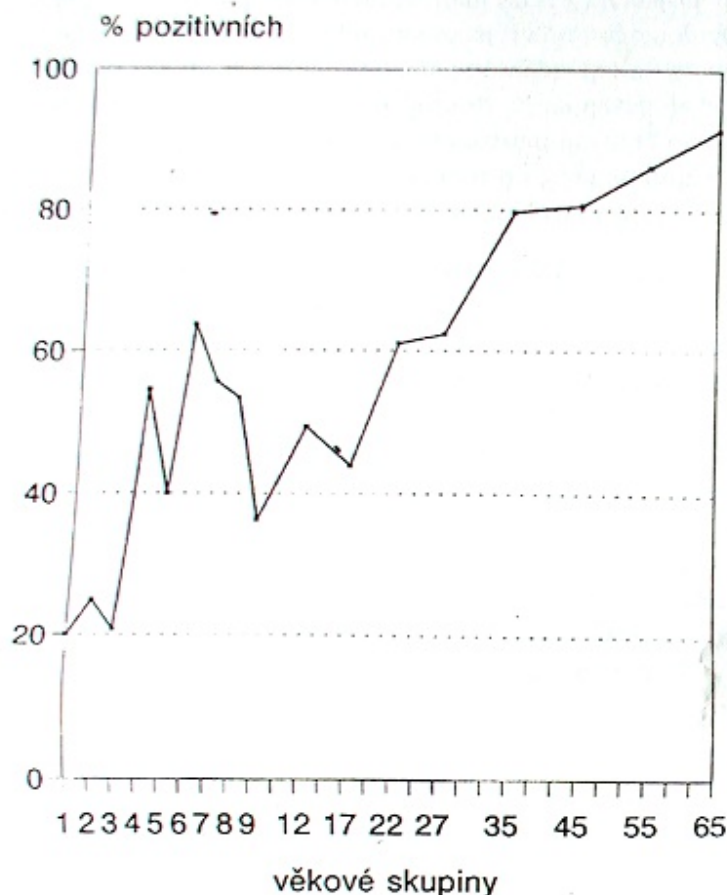


U VZV se promořenost malých dětí ve věku do 4 let pohybuje kolem 40 %, u 5–10letých 70–80 %, ve vyšších věkových skupinách dosahuje 90–98 % (graf 7). Mezi muži a ženami opět nejsou významné rozdíly.

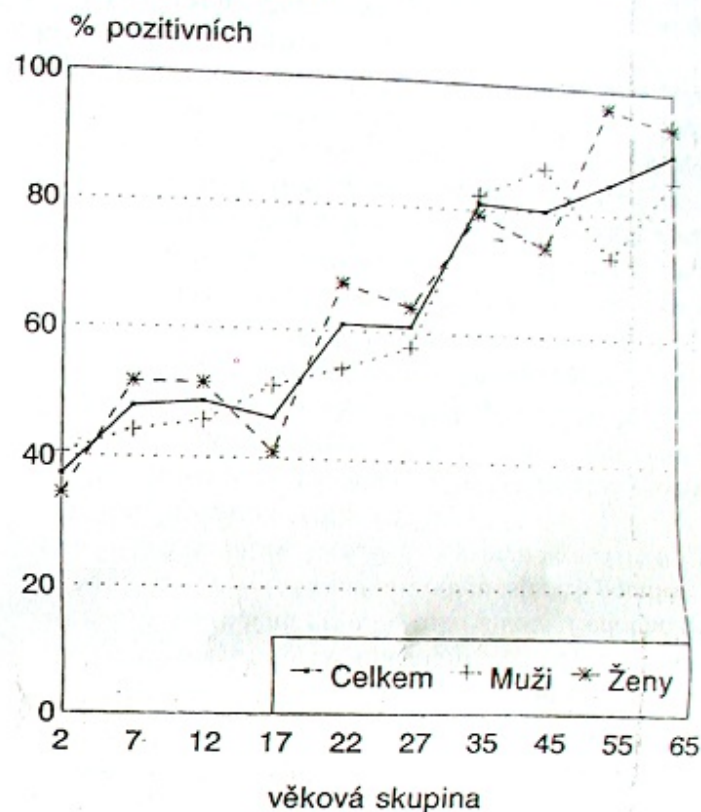
Při porovnání promořenosti v jednotlivých sledova-

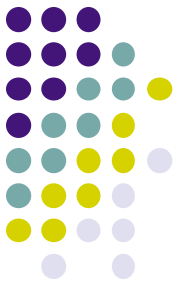
ných oblastech (graf 8) se ukázalo, že v Severočeském kraji docházelo k sérokonverzi v nižších věkových skupinách – ve věkové skupině 5–9 let je již 80 % promořenost, v Praze a Západočeském kraji je této hodnoty dosaženo až zhruba ve věku 15ti let.

Graf 1: SÉROLOGICKÝ PŘEHLED ČR 1996 – CYTOMEGALOVIRUS



Graf 3: SÉROLOGICKÝ PŘEHLED ČR 1996 – CYTOMEGALOVIRUS
porovnání podle pohlaví





Sérologické přehledy 1996

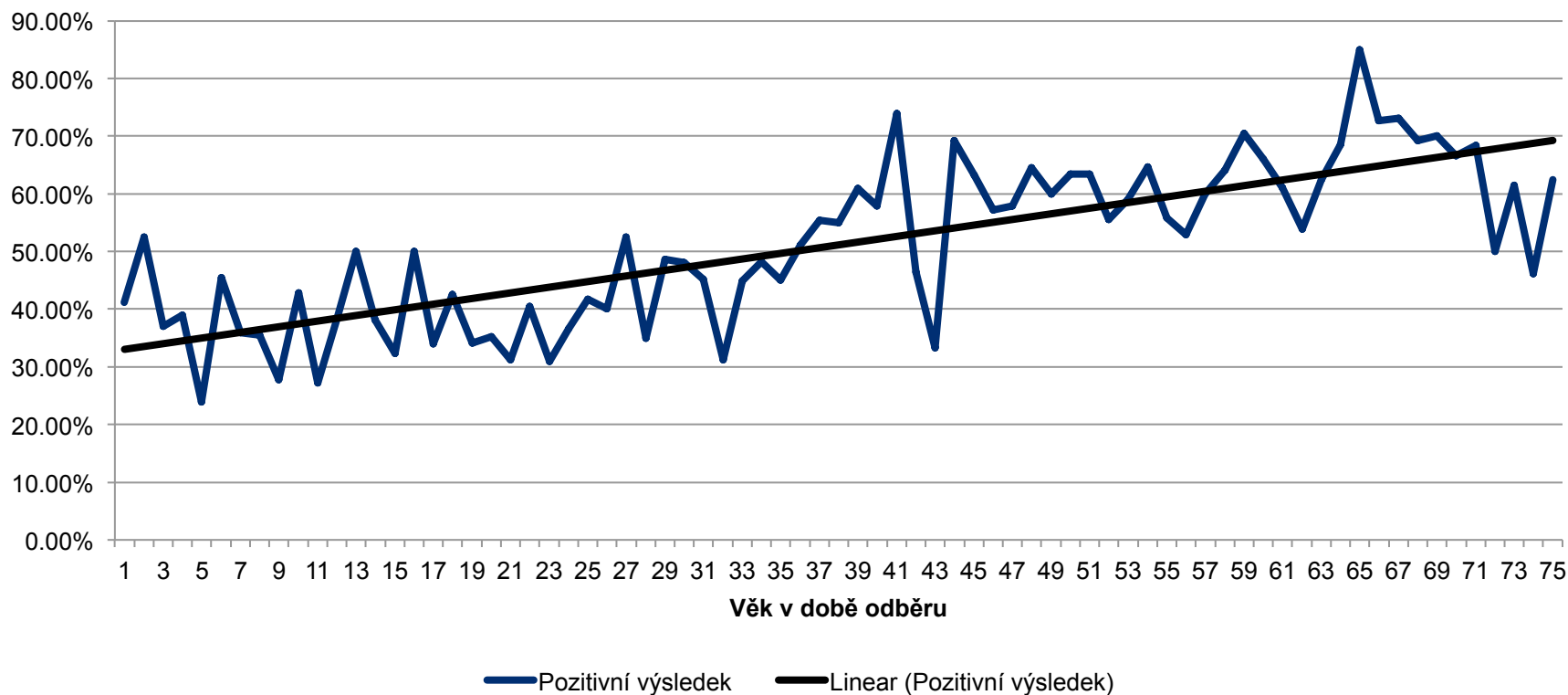
- Organizace - SZÚ, vyšetření provedla NRL pro herpetické viry, hodnocení RNDr. K. Roubalová, CSc., RNDr. J. Seeman, CSc.
- Vyšetřeno 600 – 700 sér z Prahy, západočeského a severočeského kraje
- Séroprevalence stoupala s věkem, muži $\approx$ ženy
- 9 let – 40% promořenost, 35 let 80%, $\geq$ 65 let 90%
- Vyšší promořenost v Severočeském kraji

Výsledky – séroprevalence 2008-2011, FN HK



Výsledky - muži

n=2762

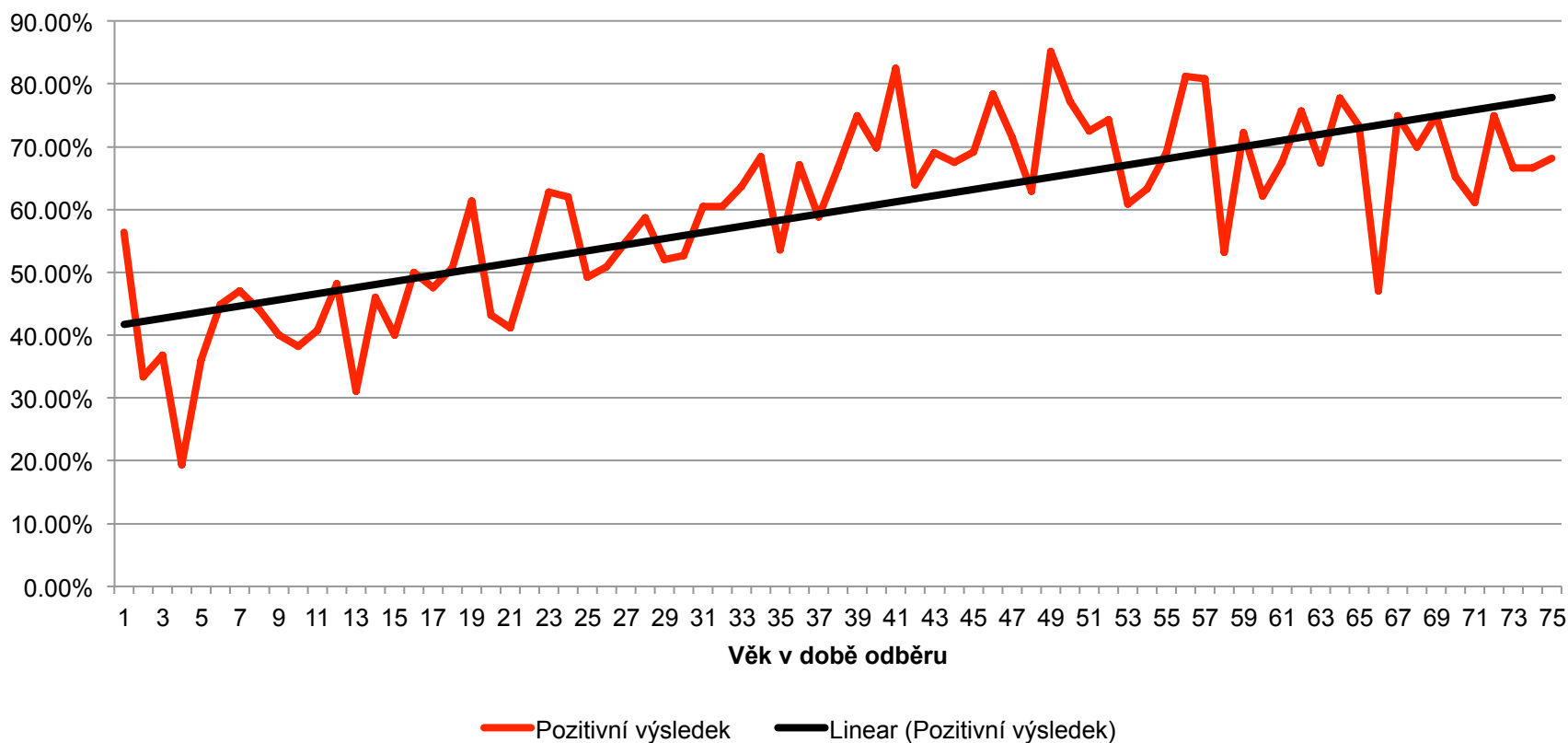


Výsledky – séroprevalence 2008-2011, FN HK

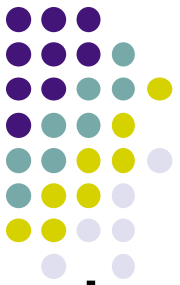


Výsledky - ženy

n=3220

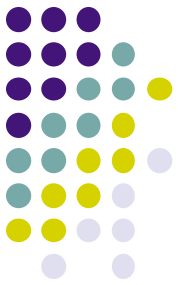


CMV - patogenese



- CMV vyvolává **humorální i buněčnou imunitní odpověď**
- Suprese hostitelské buněčné imunity – hlavní faktor rozvoje infekce (pacienti s hematologickým onemocněním, po transplantaci orgánů, HIV+)
- buněčná imunita zprostředkovaná CD4+ a CD8+ T-lymfocyty, efektorová aktivita, produkce cytokinů
- Klinická forma onemocnění ~ imunitní stav, kmen viru
- **CMV infekce** – **primoinfekce, latentní infekce** (bb. bílé krevní řady) - celoživotní, možnost vylučování viru → **reaktivovaná infekce**
- **Latentní infekce** – nejvíce prevalence
- **Reinfekce** – různé kmeny viru, genotypy
- Infekce současně více genotypy
- Genetická variabilita – mutace ve strukturálních (obalové glykoproteiny) i nestrukturálních genech

I. Imunokompetentní hostitel



- **primoinfekce** - většinou asymptomatická, syndrom mononukleosy, hepatitida, hemolytická anemie, trombocytopenie
- Infekce epiteliálních bb. nasofaryngu → vylučování viru sekretem →
virémie (krátká) →
rozšíření do dalších orgánů →
bb. slinných žláz, leukocytů, hepatocytů, renálních tubulů, plicních alveolů →
vylučování viru močí, různými sekrety (dlouhodobé)

II. Infekce těhotné ženy



- CMV – nejčastější etiologické agens způsobující kongenitální infekce (1 – 3 % novorozenců)
- Primoinfekce matky v těhotenství - symptomatické infekce – krev matky → přes cytotrofoblast placenty → fetální cirkulace → **kongenitální infekce**
- 1 – 5% těhotných žen primoinfikováno (0,15-2%)
 - z nich 30 – 40% infikovaných plodů
 - z nich 10% klinická forma CIN – hepatosplenomegalie, hemolytická anémie, hyperbilirubinémie, trombocytopenie, pneumonie, poškození CNS, slepota
- **Pozdní následky kongenitální CMV infekce** – hluchota, mentální retardace, poruchy chování

III. Postnatální přenos CMV



- Přenos během porodu – CMV vylučován na čípku děložním
- matka → dítě **mateřským mlékem** – reaktivace CMV infekce během kojení
- Virolaktie a detekce CMV DNA v mateřském mléce –
- 13 – 70 % kojících matek (studie UK 2002, Japonsko 2003) 40 – 96 % séropozitivních matek vylučovalo virus mat. mlékem – detekce PCR (studie Japonsko, Itálie, Německo)
- Riziko pro stigmatizované novorozence

Přenos CMV mateřským mlékem

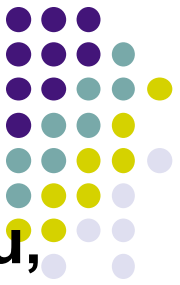


- **CMV volný, vázaný na bb.**
- **vrchol vylučování – 1 měsíc po porodu - postnatální přenos**

**a) fyziologičtí novorozenci narození v termínu →
asymptomatická infekce**

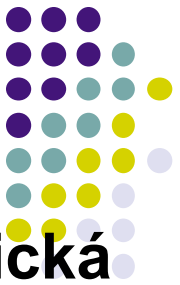
**b) novorozenci narození před termínem s nízkou por.
hmotností → větší riziko rozvoje CMV infekce (studie
– 60 až 87 % postnatálně infikovaných), 9 %
symptomatická infekce**

Přenos CMV mateřským mlékem



- **Klinický obraz - stáří dítěte, stavu imunitního systému, základní dg. a klinickém stavu dítěte**
- **Subakutní hepatitida, intersticiální pneumonie, hemolytická anémie, trombocytopenická purpura, následky – poruchy sluchu**
- **Prevence přenosu CMV mat. mlékem - inaktivace viru - mléko zahřáto na teplotu 72° C po dobu 5 minut**
- **Zmražení a rozmražení mat. mléka**
- **Riziko přenosu se úplně neodstraní**
- (Diskuze a doporučení: Pediatr. Spol. Rakouska – pasterizace mléka u nedonošených dětí, 2003; Francie – nedávat čerstvé mléko dětem nar. před 32. týdnem gestace s váhou méně než 1500 g, 2005)

IV. Imunosuprimovaný hostitel



- nádorové onemocnění, transplantace, HIV+, terapeutická imunosuprese
- **Primoinfekce, reaktivace – symptomatická**
- **Cíl - často transplantovaný orgán**
- Respir. inf., pneumonie (17 – 38%), hepatitida, infekce Git (esofagitida, gastritida, infekce střevní sliznice), infekce CNS, GVHD, infekce graftu, retinitida (AIDS)
- Dlouhodobý průběh, mortalita
- kontrola replikace CMV infekce - buněčná imunita, Ag specifické CD4+ a CD8+ T-lymfocyty (jako efektor i produkce cytokinů, IL2, IFN gamma)
- Po transplantaci kmenových buněk - systematické monitorování průběhu rekonstituce CMV specifické buněčné imunity + kontrola CMV virémie (virová nálož) real-time PCR

Terapie CMV infekce



- **Ganciclovir** (Cytovene, Cymevene, analog nukleosidu) léčba nebo prevence CMV infekce, nejprve fosforylován na deoxyguanosine trifosfát - kompetitivní inhibice syntézy DNA, (DNA polymeráza)
- **Valganciclovir** (Valcyte) – aktivován pomocí thymidin kinázy, fosfotransferázy, derivát GCV p.o. podání
- **Foscarnet** - selektivní inhibice virové polymerázy
- **Cidofovir** – inhibice virové polymerázy
- **Maribavir** – inhibuje virovou proteinkinázu, blokuje tvorbu kapsidy a uvolnění viru z buňky
- **Cytotect** – lidský IgG proti CMV

Diagnostika CMV infekce



- **Diagnóza CMV infekce – komplexní, reaktivovaný virus nemusí být signifikantní patogen!**

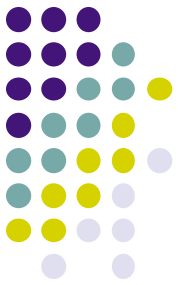
I. Přímý průkaz

- **1. izolace viru**
- **2. průkaz antigenu pp65 v izolovaných polymorfonukleárech, průkaz pp67**
- **3. průkaz CMV DNA molekulárně biologickými metodami**

II. Nepřímý průkaz

- **Průkaz protilátek**

Izolace CMV na buněčné kultuře

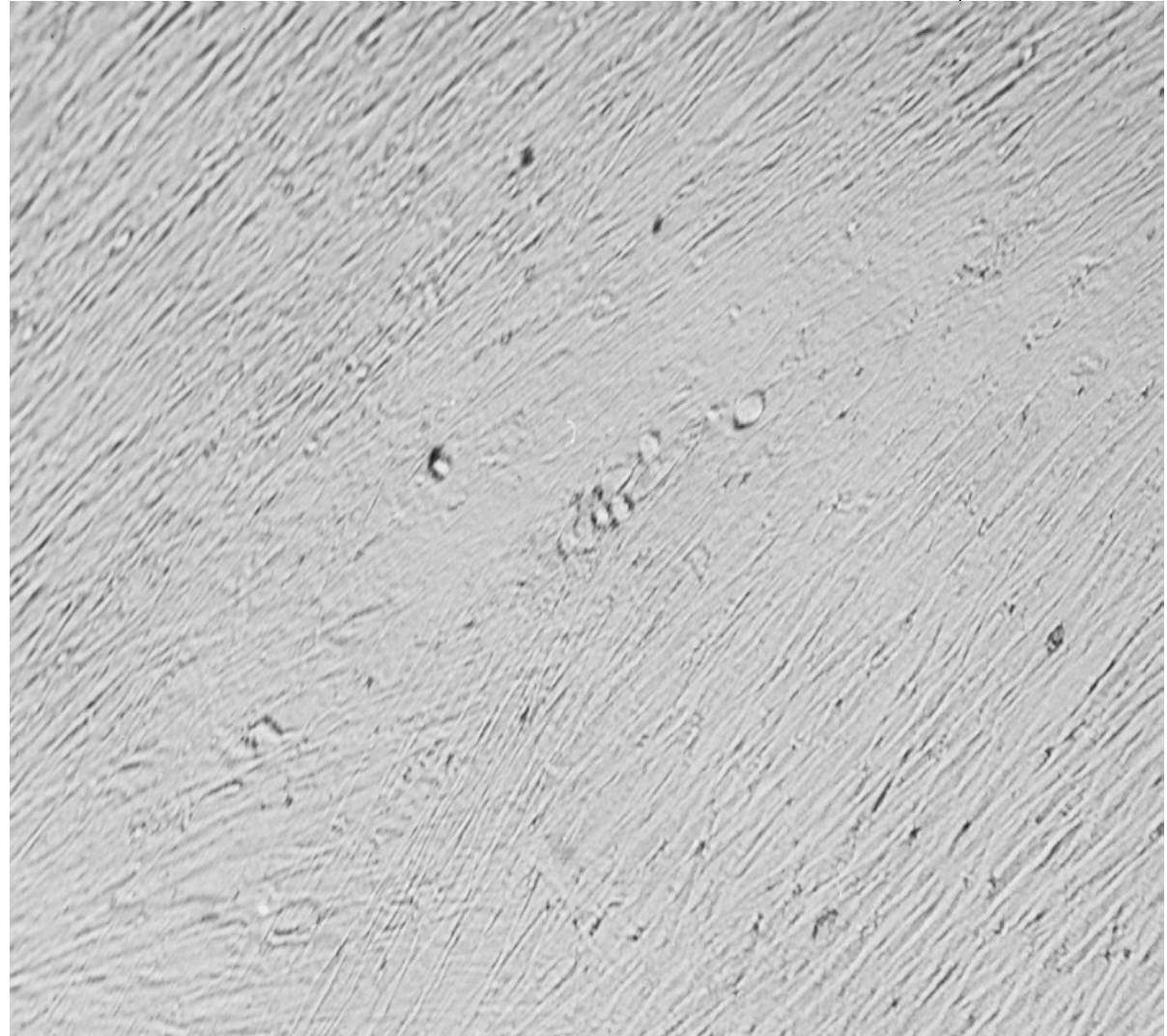


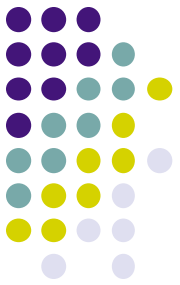
- Množí se v lidských embryonálních fibroblastech nebo epiteliálních buňkách – bun. kultury LEP
- Moč, nasofaryng. sekret, BAL – CPE za 2 – 21 dnů
- Citlivost, časová náročnost; **klasická kultivace, shell-vial**
- IF průkaz IE antigenu
- Pozitivní izolace – interpretace nálezu záleží na klinických okolnostech
- Vysoký titr izolovaného viru a současná izolace viru z různých materiálů ~ aktivní infekce, klinický význam → vyšetření virémie
- Dlouhodobé vylučování viru jak u primoinfekce, tak reaktivace
- Epidemiologické hledisko vylučování živého viru (séronegativní pacienti, virové kmeny??)



Izolace CMV na buněčné kultuře

- **Buněčná kultura LEP infikovaná CMV v I. pasáži, 5.den po infekci.**
- **Nativní preparát. Zvětšení 40x**
(*prof. Horáček, 1985*)





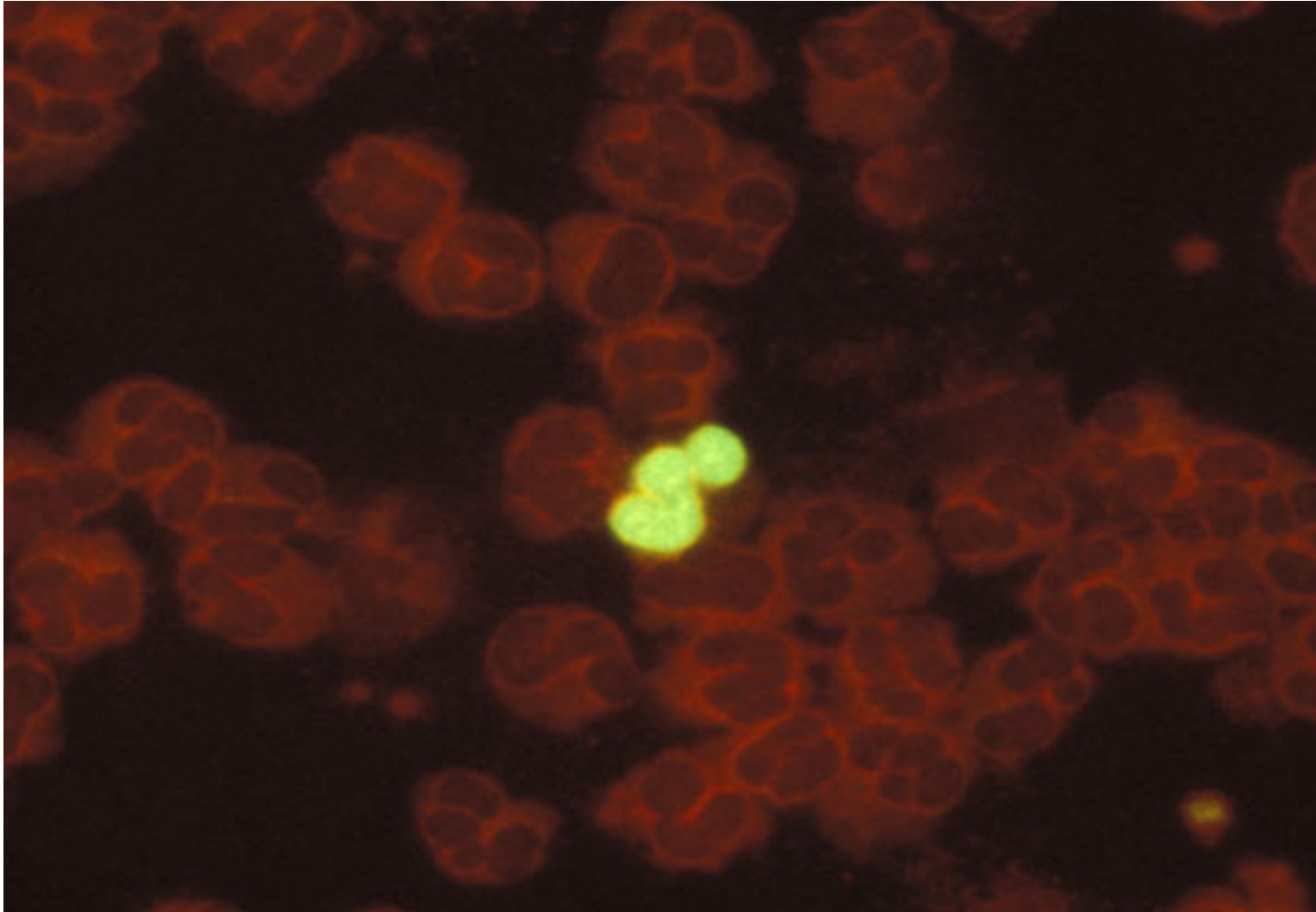
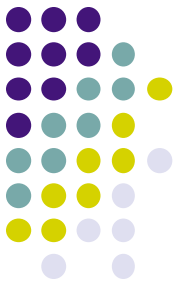
Průkaz CMV antigenu pp65

- v izolovaných polymorfonukleárech periferní krve
- Detekce IF – komerční souprav, imunoperoxidásovým barvením, biotynylová detekce
- Průkaz pomocí flow cytometrie

**Gerna et al. (Pavia) – antigenémie ~ virémie –
(10 pp65+ bb ~ 2000 cp/ml Bordeaux)**

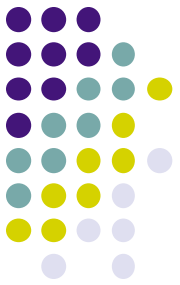
**(v současné době již neprovádíme → nahrazeno
mol. biol. metodami)**

Průkaz CMV antigenu pp65



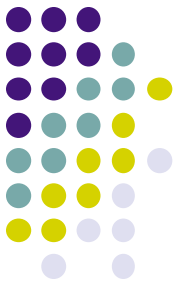
From: David Ferguson, Yale New Haven Hospital, New Haven, CT

Průkaz CMV DNA mol. biol. metodami



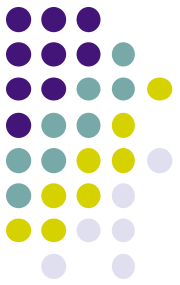
- **PCR**, nested-PCR, mRNA – kvalitativní průkaz
- **Real-time PCR – kvantifikace**, „viral load“ → virová nálož, monitoring účinnosti terapie
- Virémie → riziko rozvoje CMV infekce
- BAL → riziko rozvoje plicních komplikací
- Průkaz rezistence na ganciclovir (specifický úsek genu – sekvenace)
- Infekce různými kmeny CMV, genotypy → různé klinické aspekty (orgánový tropismus) a → imunologické aspekty (imunitní odpověď)

Real-time PCR – kvantifikace CMV DNA



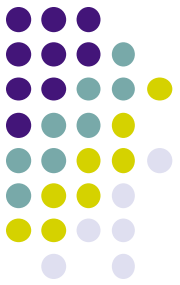
- **Kvantifikace CMV DNA (kopie/ml) – citlivost – 120 kopií/ml**
- **Virémie**
- **Klinický cut-off - 10^5 kopií/ml**
u imunokompetentních pacientů
u imunosuprimovaných pacientů – nižší hladiny (10^2 - 10^3 kopií/ml)
- **BAL - kvantifikace**
- **Monitoring – intervaly, dynamika, vyš. ve stejné laboratoři!!**
- **PharmDr. Lenka Plíšková – ÚKBD, bud. č. 22, FN HK**

Průkaz rezistence na ganciclovir



- **Léčba CMV infekce i preemptivní → riziko vzniku mutace → rezistence**
- **Ganciclovir, valganciclovir p.o. , cidofovir**
- **Mutace v genu UL97 a UL54**
- **Susp. dlouhodobé přetrvávání virémie při léčbě**
- **specifický úsek genu – sekvenace**

Průkaz CMV DNA - materiály



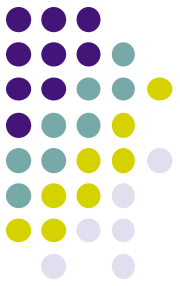
- I. imunokompetentní pacienti
- Nesrážlivá plná krev (EDTA) – virémie kvantitativně
- BAL - kvantitativně
- Plodová voda – kvantitativně
- Mateřské mléko – kvalitativně
- Novorozenec – moč – kvantitativně, krev – vzorek krve na filtračním papíře („dried blood spots“)

Průkaz CMV DNA - materiály



- I. imunokompromitovaní pacienti
- Nesrážlivá plná krev (EDTA) – virémie kvantitativně
- BAL – kvantitativně
- Další materiály podle klinického obrazu: moč, likvor, stolice, biopsie střevní sliznice

Nepřímý průkaz CMV infekce - sérologické vyšetření



- 1. průkaz CMV IgG
- Séronegativita, séropozitivita
- Latentní infekce, epidemiologické studie
- Sérostatus před transplantací – dárce, příjemce
Séronegativní příjemce – vysoké riziko primoinfekce
Přenesené protilátky po aplikaci krevních produktů
- Séronegativita v graviditě
- Dg. infekce novorozence
- Sérokonverze ~ primoinfekce
- Konfirmace primoinfekce – IgM protilátky, nízká avidita IgG, virémie, vylučování viru (izolace viru)

Průkaz CMV IgG



- **Antigen – virový lyzát obsahující hlavní antigeny viru, kmen AD 169, rekombinantní Ag**
- **EIA, ELISA, IF**
- **KFR – málo citlivá, nevhodná pro stanovení sérostatusu, doplňkové vyšetření při sérokonverzi**
- **Kvalitativní, kvantitativní průkaz – AU/ml, index positivity**

Avidita CMV IgG protilátek



- Aviditní testy – současně nejspolehlivější průkaz primoinfekce u těhotné ženy, kongenitální infekce
- Avidita – interakce mezi protilátkami a multivalentními antigeny (viry, bakterie, prvoci)
- Avidita narůstá s afinitou (jednoduchá interakce protilátka – antigen) a s počtem současně se uplatňujících vazebných míst
- Avidita - „vyzrálost“ - první IgG protilátky při primoinfekci mají **nízkou aviditu**, přetrvávání virémie, progresivní zvyšování avidity IgG protilátek (tzv. maturace humorální imunitní odpovědi)
- Sekundární infekce, reaktivace – rychlá produkce IgG protilátek s **vysokou aviditou**

Avidita CMV IgG protilátek



- Mikrodestičkové testy – princip: **narušení vazby IgG a antigenu denaturačním činidlem** (roztok urea)
- index avidity = % IgG , které zůstaly navázány na antigen po inkubaci s ureou: normální inkubace
< 40% - nízká avidita, primoinfekce před méně než 18 týdny
40 – 60% - hraniční
> 60% - vysoká – latentní infekce, primoinfekce před dobou delší než 18 týdnů
- **vychytání IgG s vysokou aviditou** z vyš. séra pomocí blokovacího roztoku (virový lyzát CMV AD169)

Algoritmus testování těhotné ženy při susp. CMV infekci



Vol. 43, 2005

CYTOMEGALOVIRUS SCREENING 4715

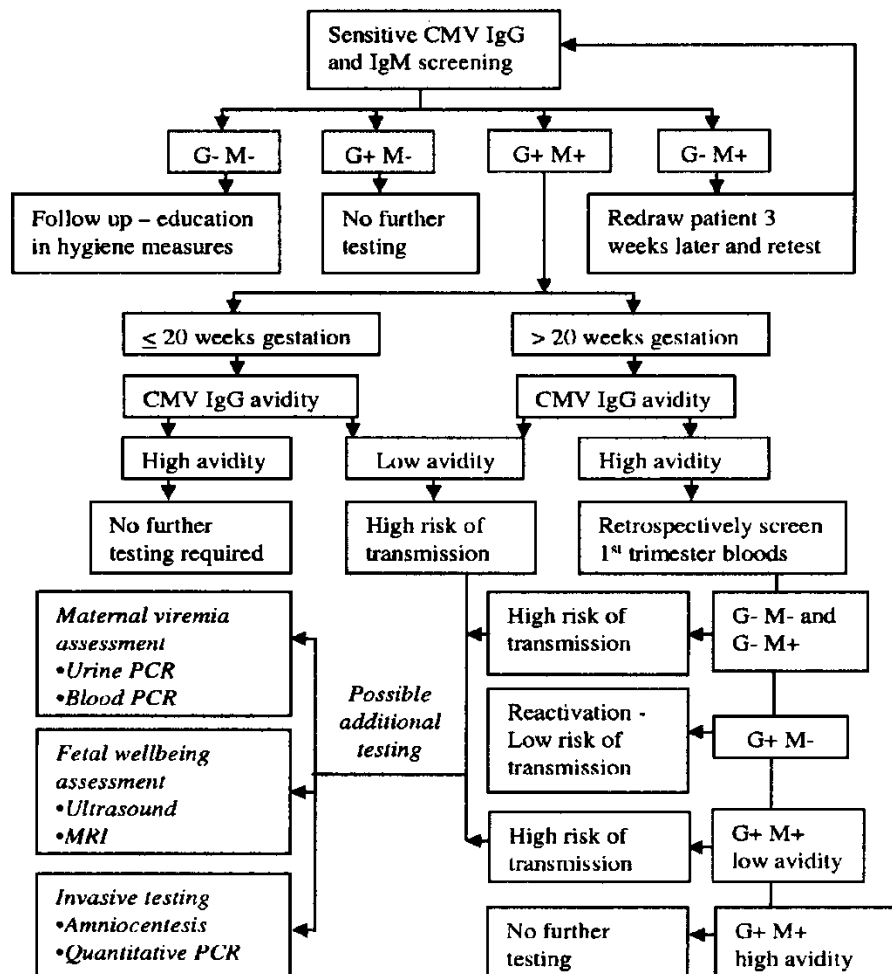


FIG. 1. Proposed diagnostic algorithm for CMV serology screening in pregnant women.

Průkaz CMV IgM



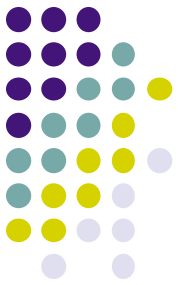
- Průkaz u primoinfekce, reaktivace latentní infekce, aktivní infekce i subklinické
- Ab proti pp150, pp38 – hlavní imunodominantní markery – korelace s expresí virové mRNA
- Průkaz IgM spolu s nízkou aviditou CMV IgG – indikátor primoinfekce
- Peak 1 – 3 měsíce po primoinfekci, možnost persistence v nízkých hladinách několik měsíců (~ citlivost dg. souprav)
- Možnost falešně pozitivních výsledků při jiné virové infekci (např. EBV, PV B19)
- Možnost zkřížené reaktivity u herpetických virů
- Revmatoidní faktor
- Immunoblot – confirmace specificity nálezu
- Falešně negativní výsledky – imunosuprese, antivirová léčba

Imunoblot CMV IgM



- **Průkaz protilátek proti strukturálním a rekombinantním proteinům obsahujícím signifikantní imunogenní části**
- **Separace na gelu z purifikovaných CMV partikulí a přenesení na nitrocelulózu**
- **pp150, pp38, pp65, pp52, pp130, pp72, pp82**
- **pp150 – nejsilnější imunogen**
- **pp38 – indukuje tvorbu IgM protilátek a může být zodpovědný za dlouhodobé přetrvávání IgM po skončení akutní fáze replikace**
- **Reaktivita pouze s jedním Ag nemusí být známkou současné infekce (př. pp82)**

Průkaz CMV IgM



- **Vyšetřování dárců a příjemců transplantátu**
- **Algoritmus vyšetřování imunosuprimovaných pacientů – dlouhodobá virémie**
- **Vyšetření těhotných žen → indikace vyš. plodové vody**
- **Vyšetřování indikovaných novorozenců**
- **Klinické diagnózy**

Kontrola kvality lab. dg. CMV



- **EHK - Sérologie CMV**

Cca 130 laboratoří, 2 vzorky pro specifické IgM a IgG

- **EIA – 20 různých testů mikrodest. i analyzátorových**

- **Instand** (Německo) – sérologie CMV, avidita IgG , 2 vzorky 4 x /rok

- **EHK - průkaz CMV DNA**

(duben 2008 - dr. Plíšková) – 25 laboratoří, 6 vzorků, kmen CMV AD169 - kvantita od 10^2 kopií/ml

- **QCMD** (Velká Británie) – průkaz **CMV DNA**, 10 vzorků,

- **BBI** (USA, Boston Biomedica Diagnostics) – 25 vzorků pro kontrolu sérolog. reakcí, vyš. 5 různými metodami

Porovnání výsledků – CMV

IgG, IgM, interpretace výsledku



- **Kvantitativní hodnocení** – rozdíly v metodách ELISA a analyzátorových, ty obecně citlivější
→ vyšší hladiny PL
- **Závěr:** vyšetřování a hlavně **monitorování pacientů by se mělo provádět stejným testem**
→ **výsledky srovnatelné v čase a dynamice**, kvantitativní stanovení protilátek rozdílné podle metod (jednak vzhledem k citlivosti a jednak vzhledem k zastoupení jednotlivých antigenů v testu)



Děkuji za pozornost