

kvantitativní detekce CMV a její dopad na management pacienta po alogenní HSCT



L. Król^{1,2}, P. Hubáček^{1,3}, T. Kalina^{1,2}

¹Klinika dětské hematologie a onkologie UK 2. LF a FN Motol

²CLIP-Cytometrie, UK 2. LF

³Ústav lékařské mikrobiologie, UK 2. LF a FN Motol

agenda

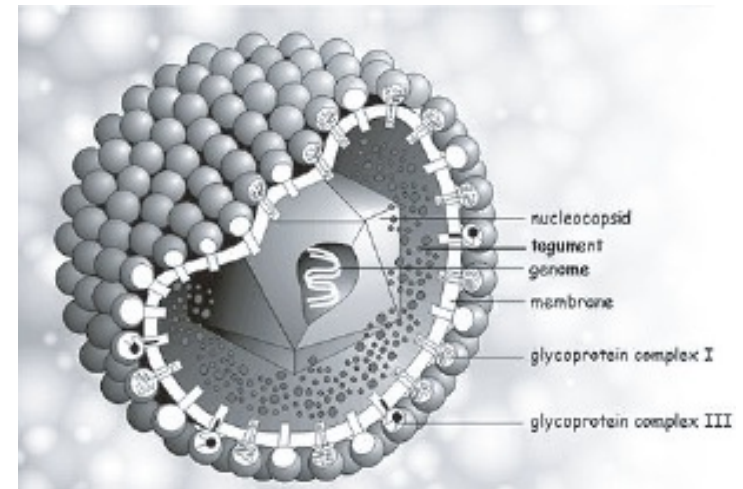
- **úvod**
- **kvantitativní detekce CMV a rezistence k virostatikům**
- **rekonstituce CMV specifické imunity**

úvod

úvod

- **cytomegalovirus (CMV)**

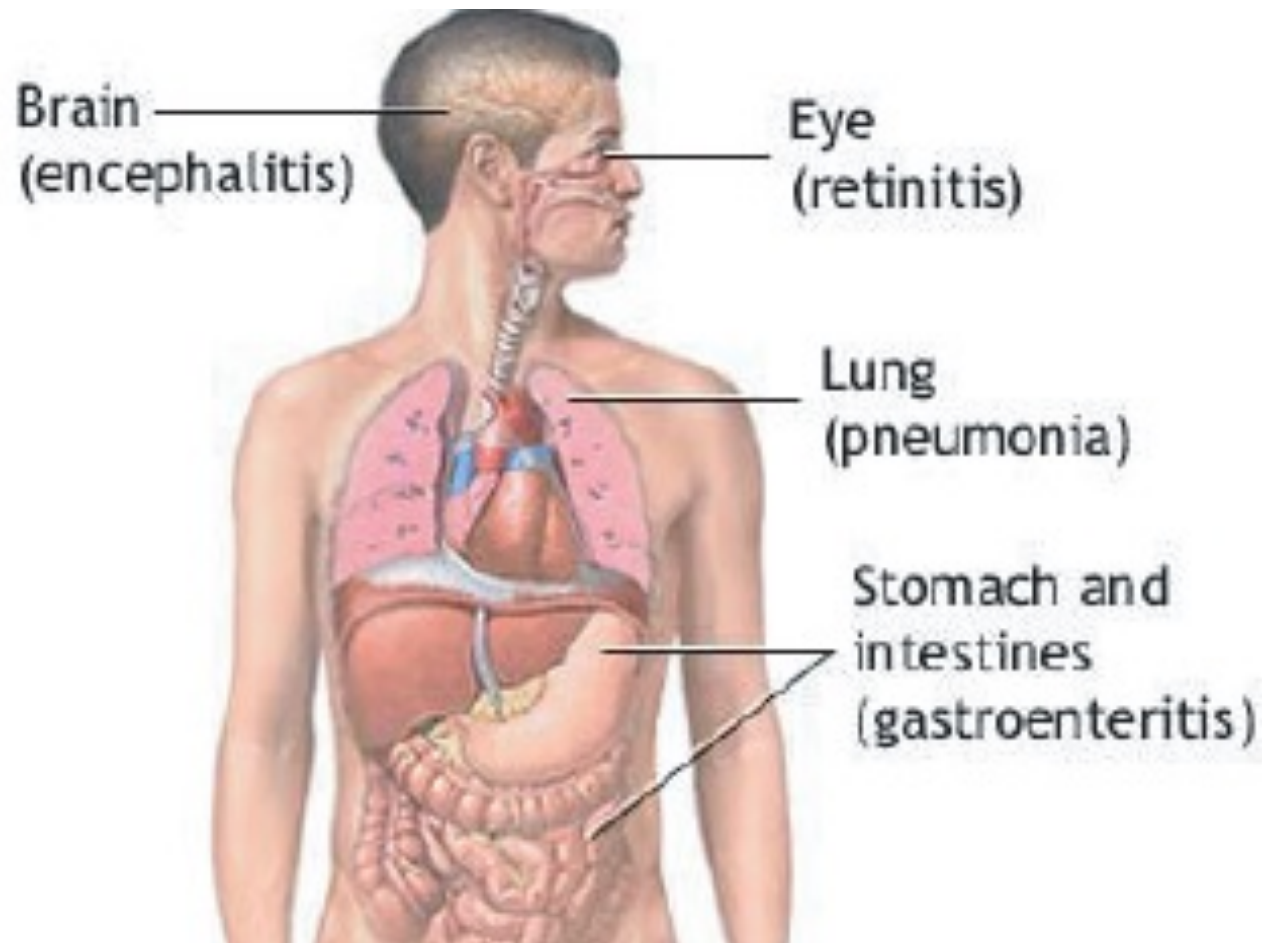
- patří do rodiny β -herpesvirů
- séroprevalence je 60-90% zdravých dospělých
- séroprevalence narůstá s věkem
- po primoinfekci přežívá v infikovaném jedinci po zbytek života
 - zejména v makrofázích
 - RES



CMV infekce

- **zdravý imunokompetentní jedinec**
 - nejčastěji inaparentní primoinfekce
 - během života dochází k občasným reaktivacím
 - reaktivace probíhají pod obrazem chřipkových symptomů
 - kontrola infekce zajištěna CMV-specifickými T-lymfocyty
- **imunokompromitovaný jedinec**
 - časté reaktivace způsobené poruchou adaptivní imunity
 - život ohrožující infekce ve stádiu tzv. CMV nemoci
 - vysoká morbidita a mortalita (až 90%)

CMV nemoc



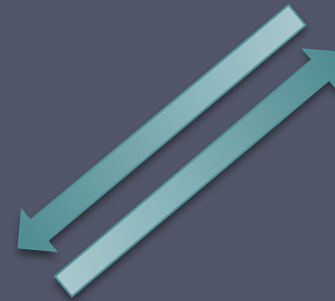
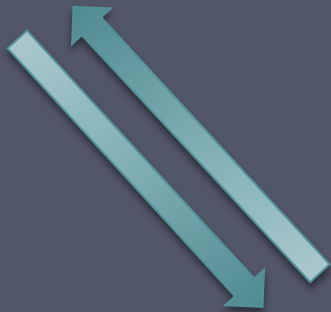
CMV po HSCT

- CMV zůstává jednou z nejvýznamnějších komplikací po HSCT
- **imunosuprese** vede k vysokému riziku opakovaných reaktivací a rozvoje **CMV nemoci s vysokou mortalitou**
- signifikantní rizikové faktory jsou GvHD grade II-IV a pre-transplantační sérologická kombinace D+/R-
- klinický obraz
 - **symptomatická CMV infekce**
 - horečka s/bez myelosuprese bez orgánové nemoci
 - **CMV nemoc**
 - symptomy pneumonitidy, kolitidy, encefalitidy, retinitidy...

GVHD

imunosuprese

infekce
(IFI, viry)



CMV po HSCT

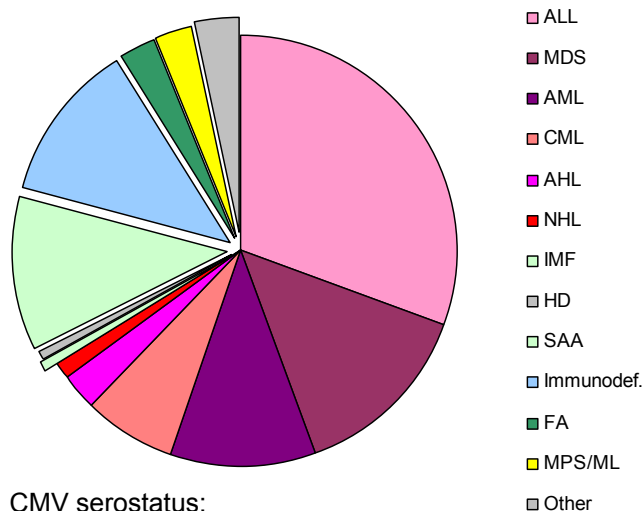
- terapie je založena na podávání virostatik (GCV, VGCV, FCV, CDV atd.) a/nebo snížení imunosuprese
 - **pre-emptivní režim**
 - založen na pravidelném monitoringu pomocí PCR
 - 1x týdně po dobu pobytu na transplantační jednotce
 - dále min. 1x měsíčně během ambulantního sledování
 - riziko rozvoje pozdní CMV nemoci – důvodem je snižující se počet vyšetření s prodlužujícím se časem po transplantaci
 - při překročení limitu zahájení terapie virostatiky
 - v našem případě 1000 kopií na 100 tisíc genomových ekvivalentů
 - může vést k přeléčení pacientů s rizikem nežádoucích účinků virostatik
 - terapie může selhat díky rozvoje rezistence nebo špatného stavu imunity
 - definitivní kontrolu CMV infekce umožní rekonstituce **CMV-specifické imunity**
 - zejména CD4+ a CD8+ T-lymfocyty
 - trvá měsíce až roky po HSCT
 - rekonstituci je možné také monitorovat a lépe cílit virostatickou terapii

kvantitativní detekce CMV a rezistence k virostatikům

pacienti

děti

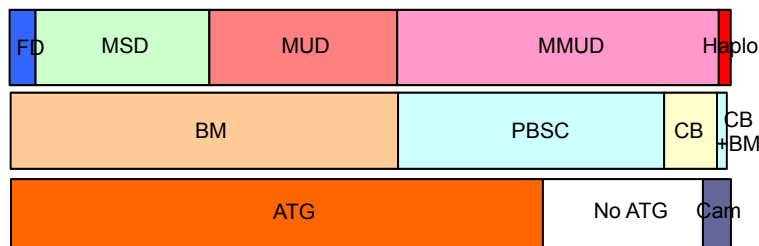
133 chlapců a 81 dívek
medián věku při HSCT 9.3 let (0.2-20.5)
248 allogenních HSCT; zemřelo 38



CMV serostatus:

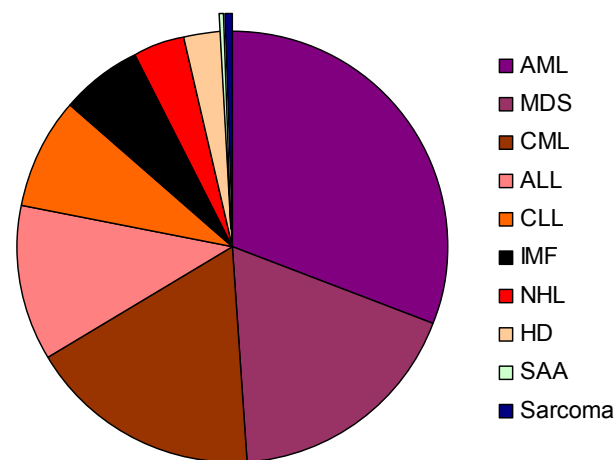
D-/R+ - 13% D+/R- - 39%

D+/R+ - 29% D-/R- - 18%



dospělí

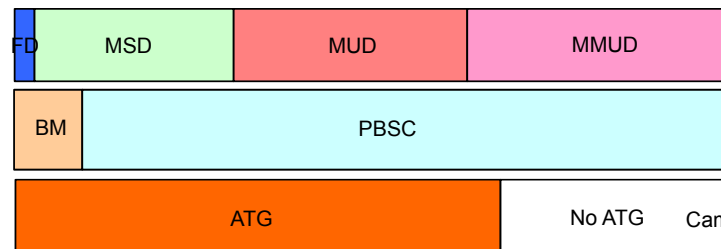
261 mužů a 170 žen
medián věku při HSCT 45.3 let (18.7-60.2)
451 allogenních HSCT; zemřelo 172



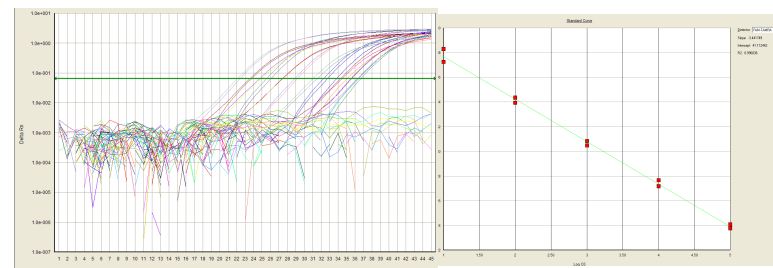
CMV serostatus:

D-/R+ - 32% D+/R- - 10%

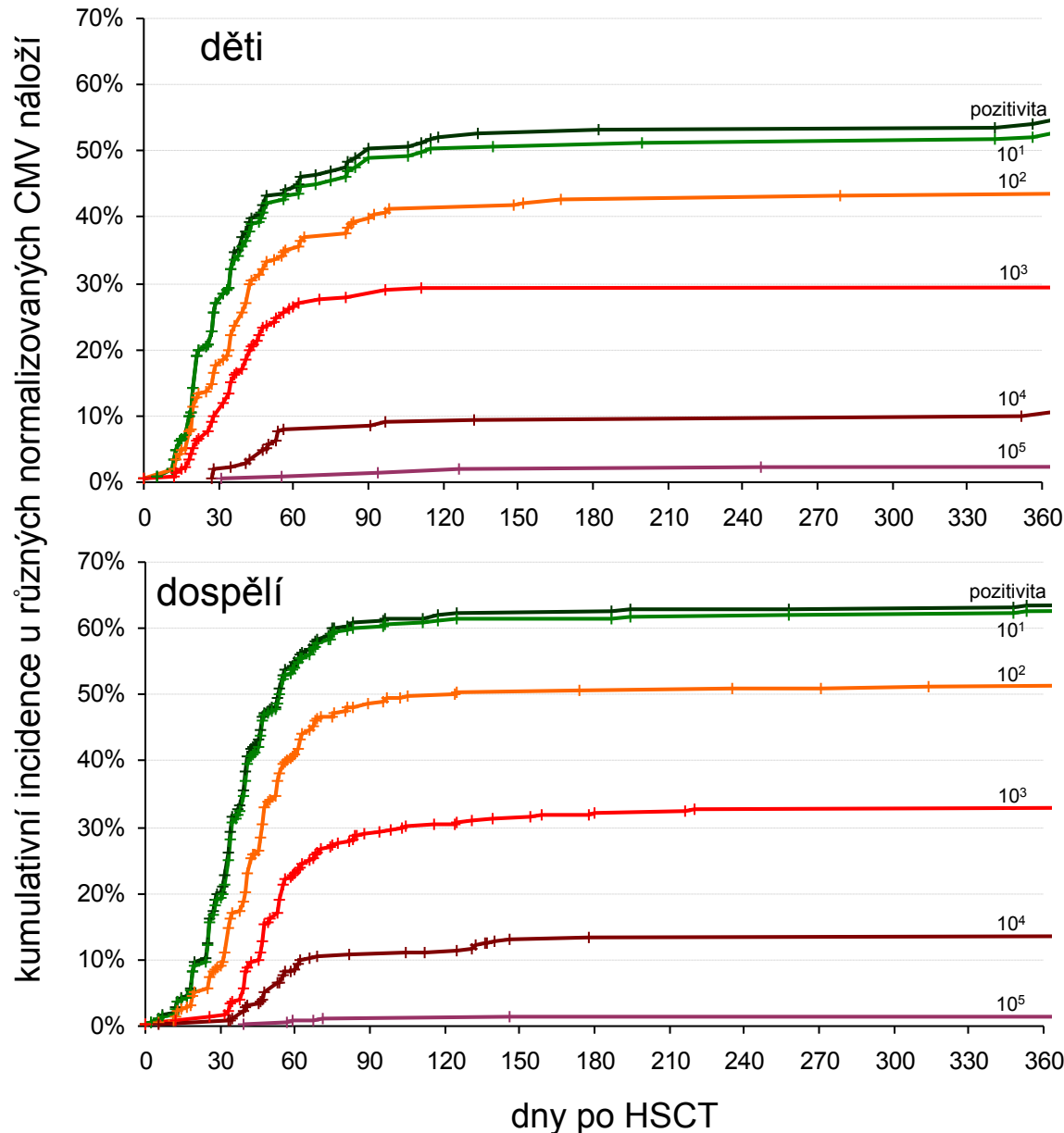
D+/R+ - 50% D-/R- - 8%



prospektivně testováno 17,463 vzorků krve (7,546 od dětských pacientů, 9,917 od dospělých pacientů) a 975 vzorků jiných biologických materiálů (BM, plazma, CSF, vzorky tkání...) od 76 dětí a 147 dospělých



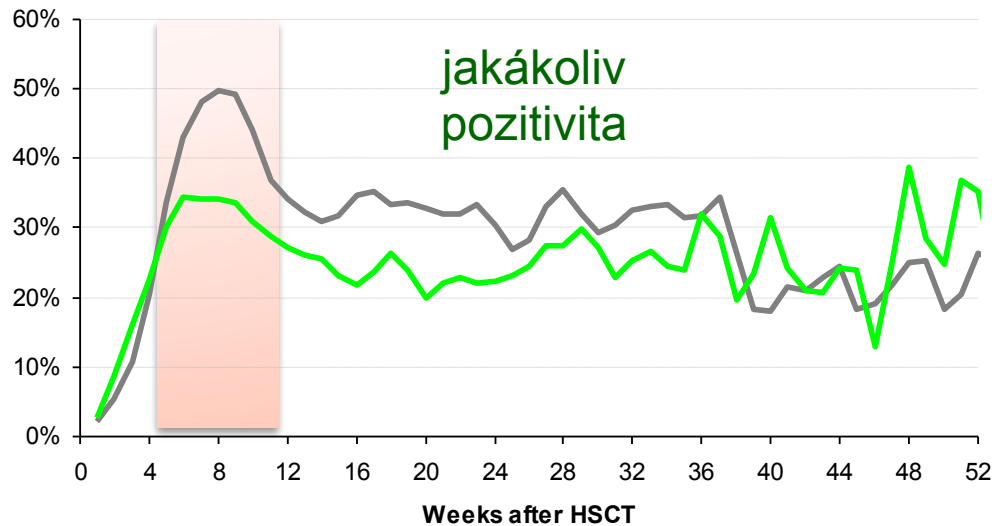
incidence v čase



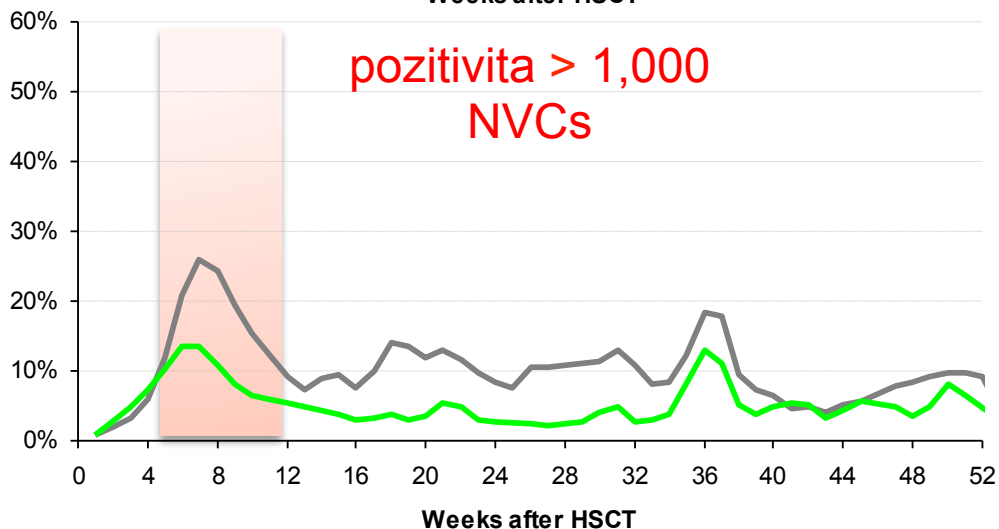
threshold pro zahájení
terapie 1,000 NVCs

- překročeno u 28% dětí
a 34% dospělých v 1
roce po HSCT
- nesignifikantní rozdíl
mezi dětmi a dospělými
(p=0.08)

proporce pozitivních pacientů dle týdne a počtu kopií

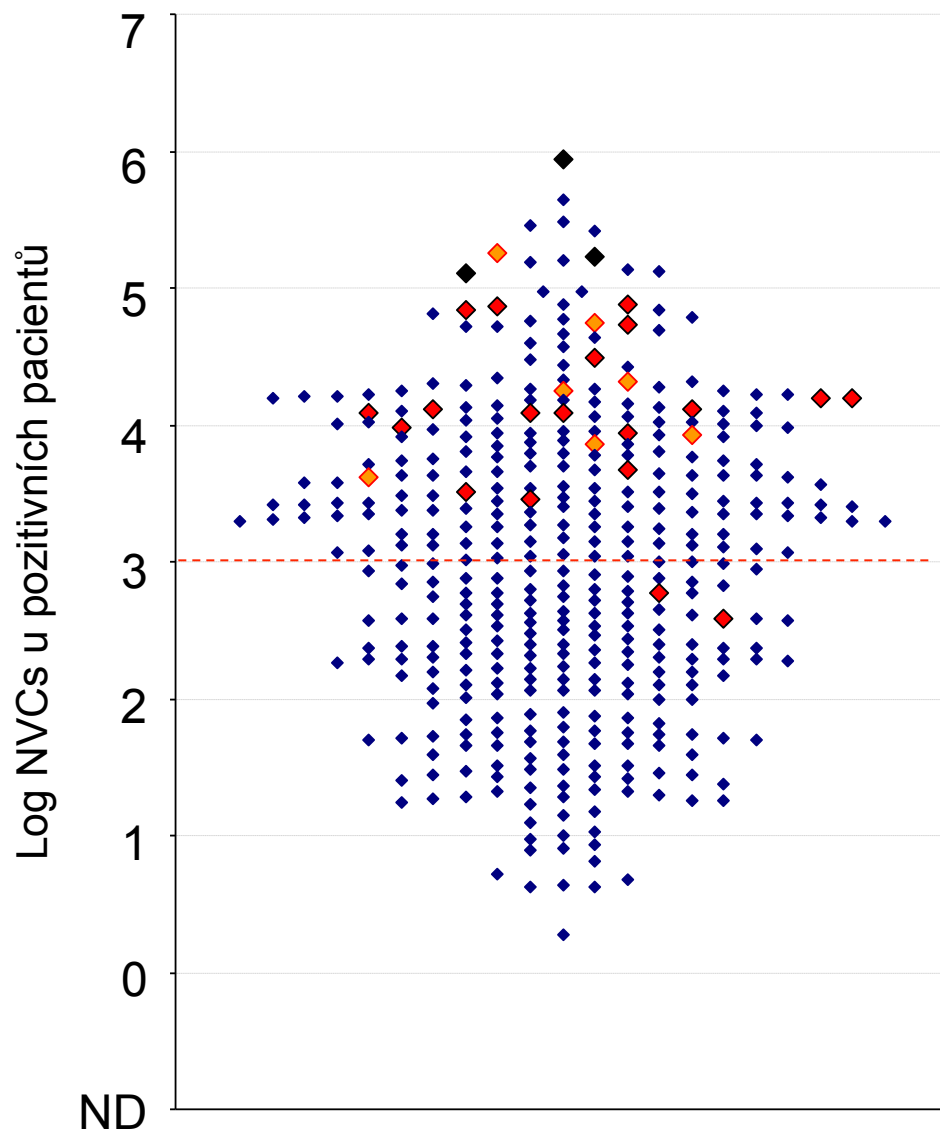


— děti
— dospělí



CMV nejčastěji detekováno
kolem 8. týdne po HSCT

maximální kvantita v krvi

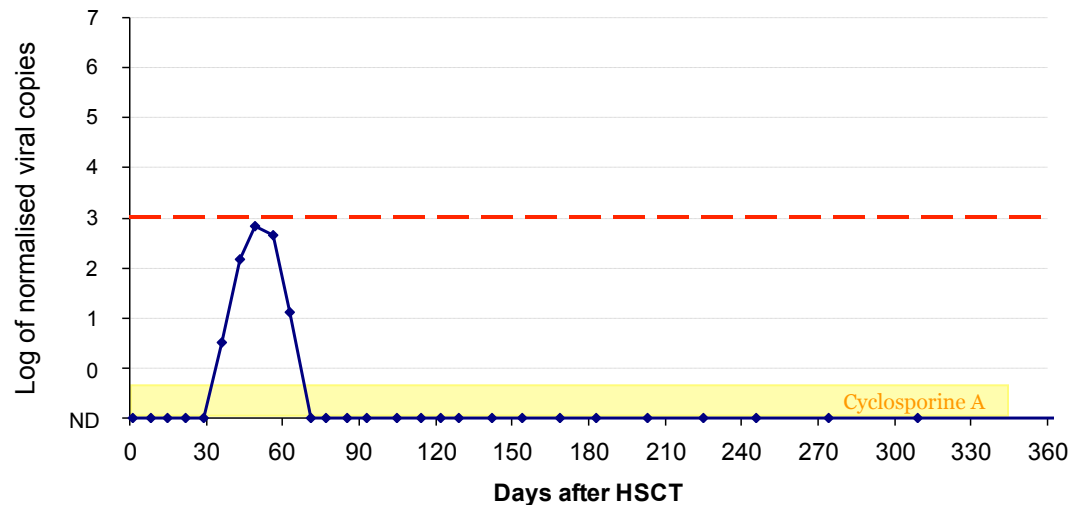


- ◆ pacienti, kteří zemřeli na CMV pneumonitidu
- ◆ pacienti, kteří zemřeli na kombinaci CMV nemoci a jiné infekce nebo refrakterní GvHD
- ◆ pacienti s jasnými klinickými a laboratorními známkami CMV nemoci, kteří byli úspěšně léčeni
- ◆ pacienti bez známek CMV nemoci

CMV nemoc byla diagnostikována u 29 pacientů

- pneumonitis - 17
- GIT – 9
- encefalitis/retinitis - 1
- retinitis - 2

nekomplikovaná reaktivace/infekce



dívka, 3.3 let

dárce: MSD

štěp: BM

Conditioning: ALG (75 mg/kg)

Cyklofosfamid (200 mg/kg)

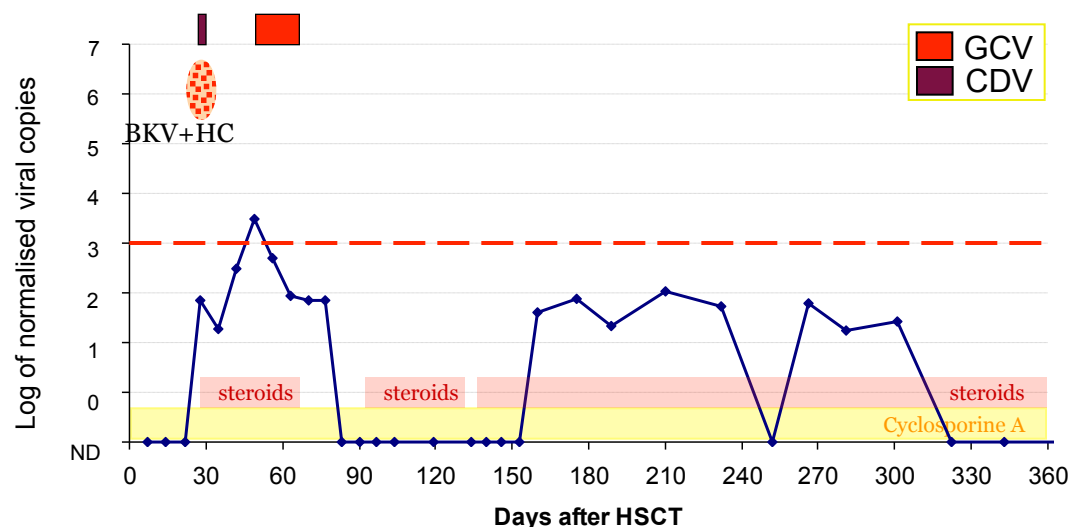
GvHD profylaxe: CsA, MTX

GvHD: ne

Outcome: žije bez klinických obtíží

HSCT pro SAA

CMV ser.: D+/R+



chlapec, 13 let

dárce: MMUD_(9/10)

štěp: PBSC

Conditioning: Busulphan (16 mg/kg)

Cyklofosfamid (120 mg/kg)

Melphalan (140 mg/m²)

ATG (40 mg/kg)

GvHD profylaxe: CsA+MTX

GvHD: grade II (D+28), cGvHD

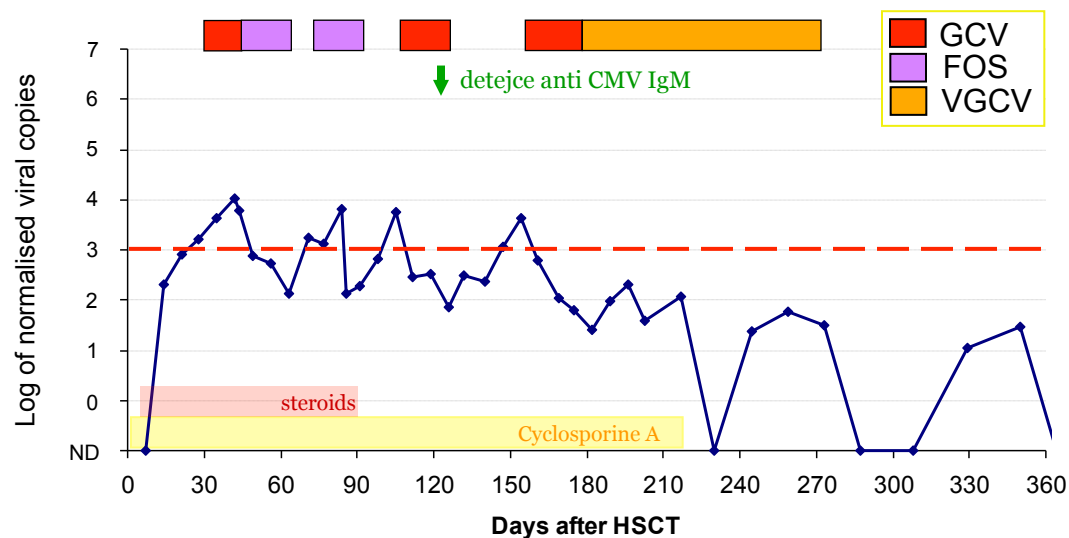
BKV+ HC (D+40; 1x CDV-zlepšení)

Outcome: žije, hypofunkce štítné žlázy

HSCT pro MDS-RAEB

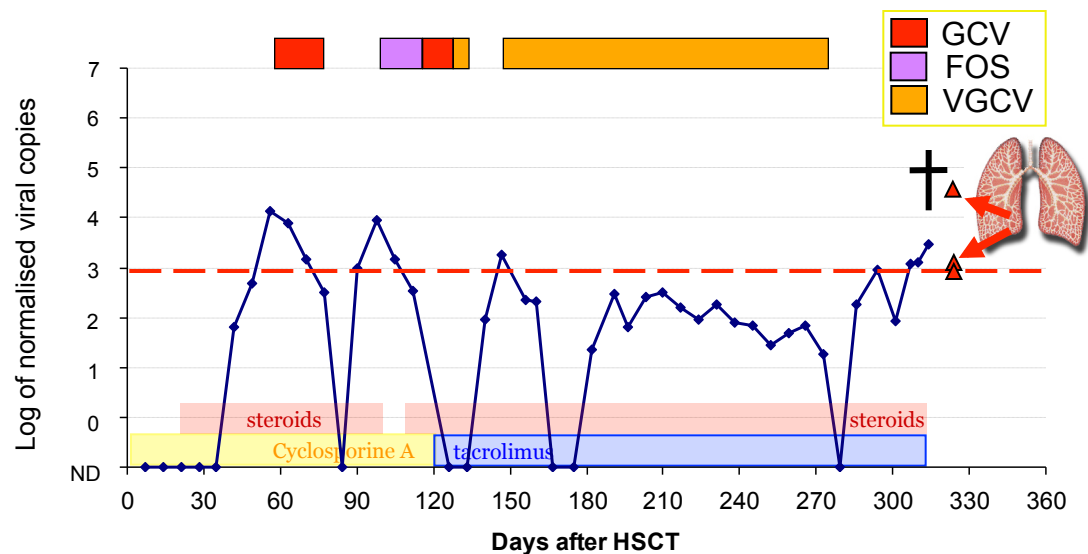
CMV ser.: D+/R+

komplikovaná infekce



dívka, 2.9 let HSCT pro MDS-RC
dárce: MMUD (4/6) CMV ser.: D-/R+
štěp: CB

Conditioning: Busulphan (18 mg/kg)
Cyklofosfamid (120 mg/kg)
Melphalan (140 mg/m²)
ATG (40 mg/kg)
GvHD profylaxe: CsA, MTX, steroidy
GvHD: ne
Outcome: žije, STH deficiencie



dívka, 14.3 let HSCT pro AML/EWS
dárce: MUD CMV ser.: D+/R+
štěp: PBSC

Conditioning: Busulphan (16 mg/kg)
Cykofosfamid (120 mg/kg)
Melphalan (140 mg/m²)
ATG (40 mg/kg)
GvHD profylaxe: CsA+MTX
GvHD: grade II (D+28, +41), cGvHD
Outcome: zemřela D+317 na mukormykózu v kombinaci s CMV nemocí

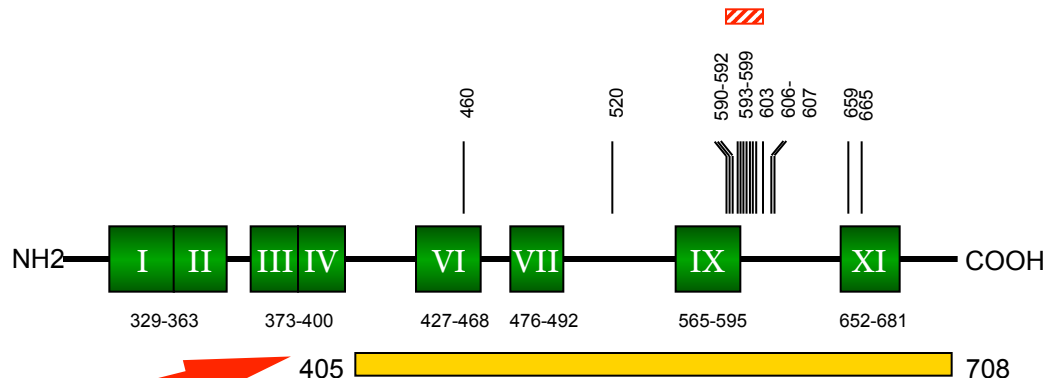
CMV rezistence

klinické podezření na rezistenci k
podávanému virostatiku v případě
že nedošlo k poklesu, nebo se
objevil vzestup, CMV kopií v
periferní krvi po 2 týdnech terapie

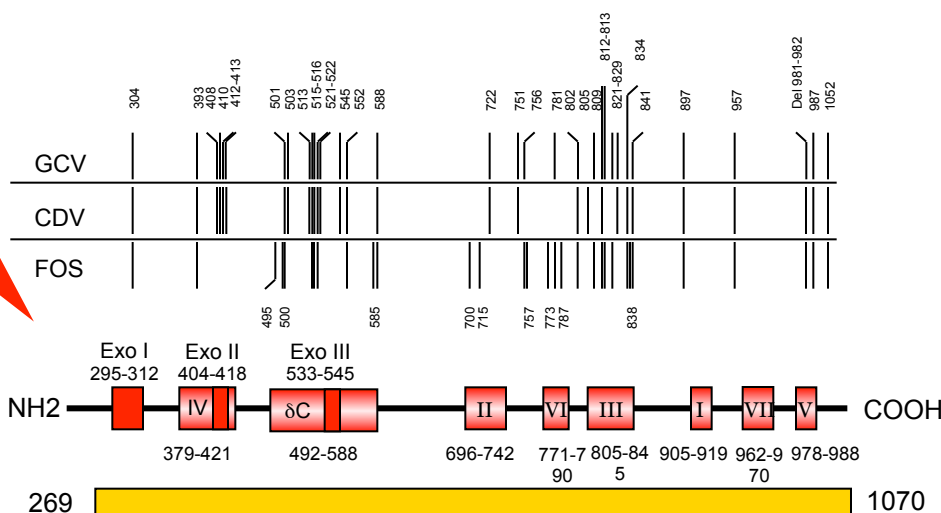
potvrzení sekvenční analýzou
regionů UL97 a UL54, které
kódují rezistenci*

**potvrzena u 242 vzorků od 22
dětí a 50 dospělých**

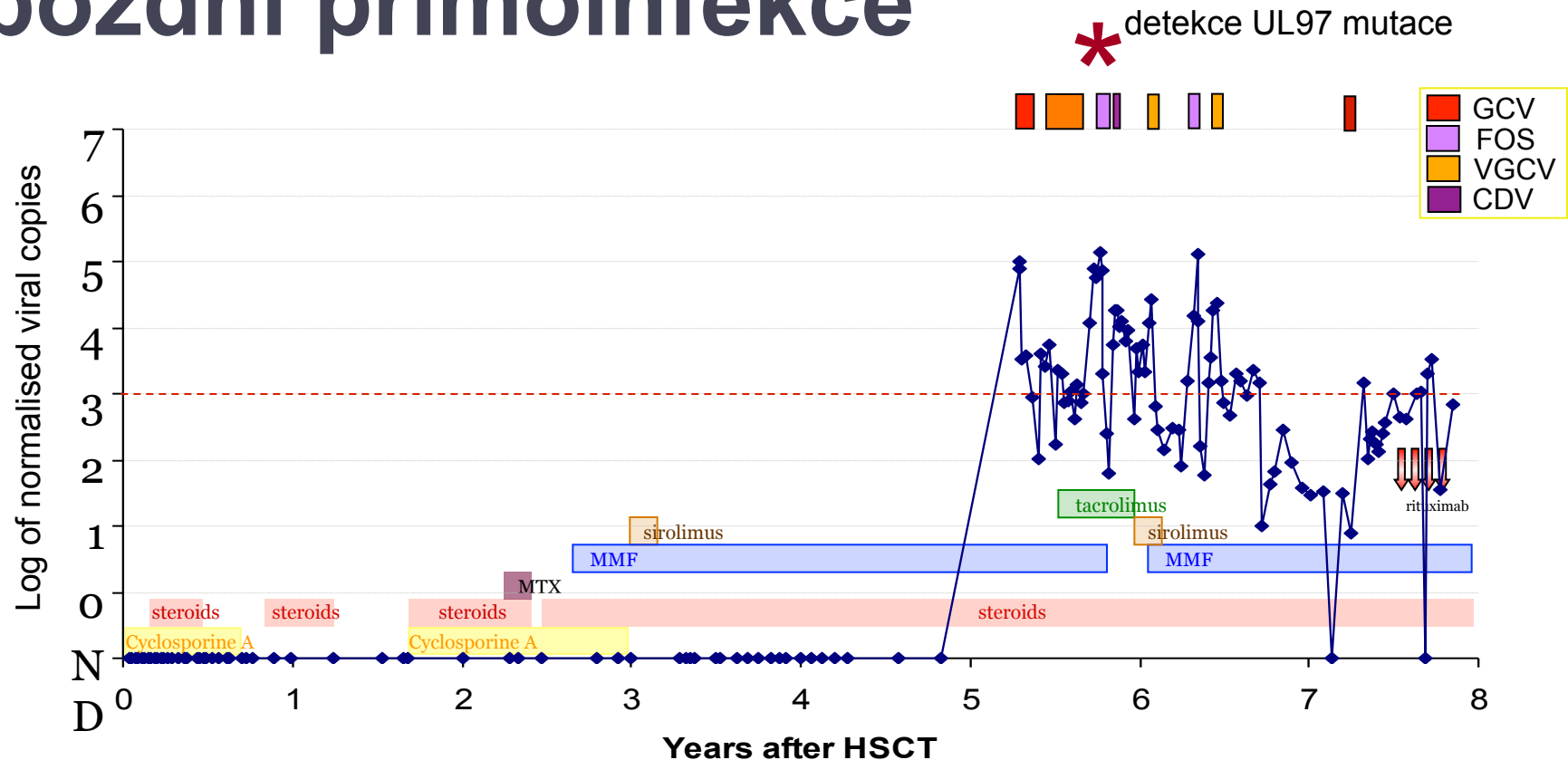
UL97 phosphotransferase - **resistance ke GCV**



UL54 DNA polymerase – **rezistence ke GCV, CDV, FOS**



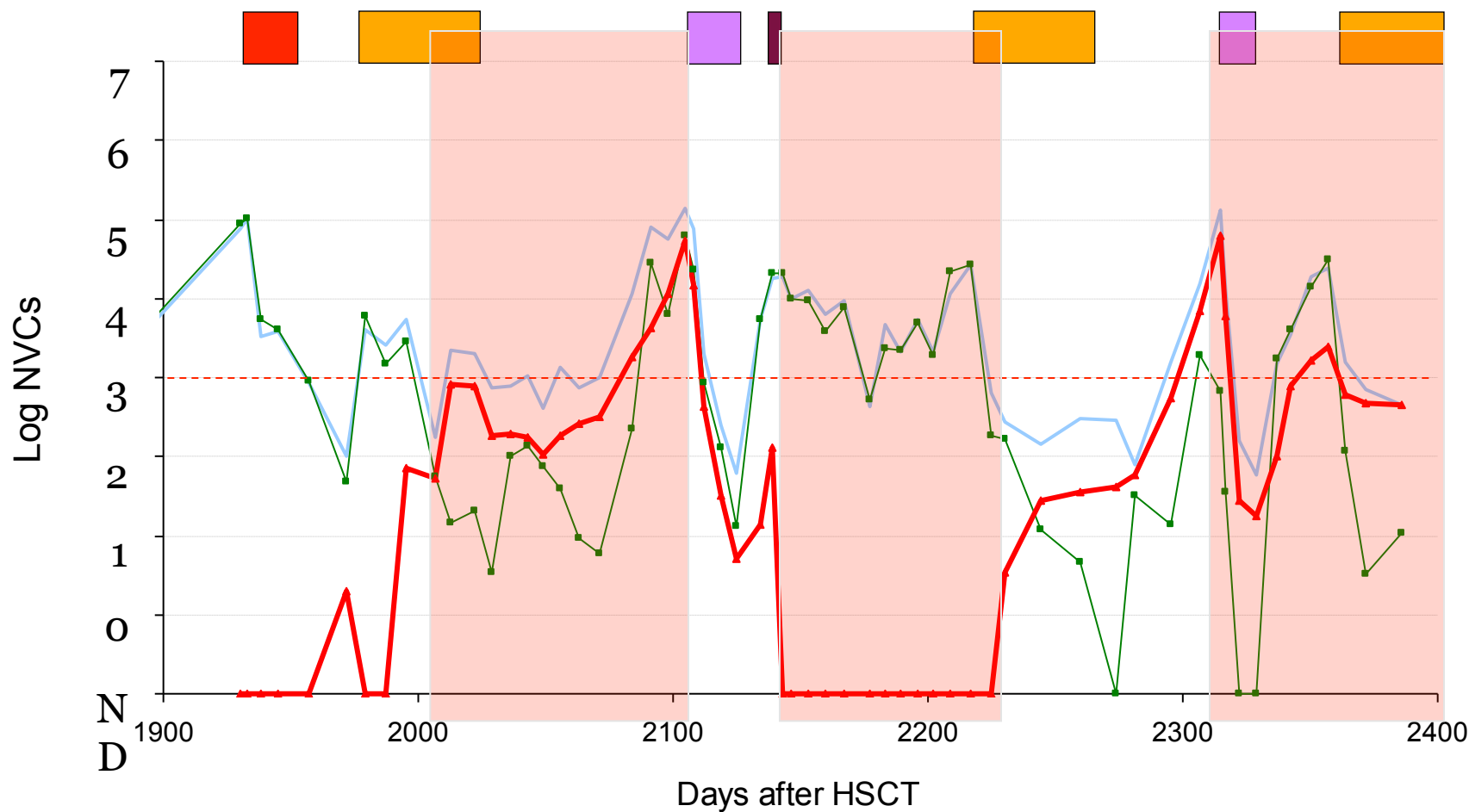
pozdní primoinfekce



chlapec, 18.6 let, HSCT pro AML M2 dárce: MMUD (8/10) CMV ser.: D-/R-
 štěp: PBSC
 conditioning: TBI (14.4 Gy), Cyklofosamid (120 mg/kg), ATG (30 mg/kg)
 GvHD profylaxis: CsA+MTX
 GvHD: grade II (D+20), chronická extensivní GvHD,
 další komplikace: TTP/HUS, stenóza esofagu, Coombs++, aseptická nekróza kyčelního kloubu bilat.
 outcome: žije, TEP kyčelních kloubů, opakované dilatace esofagu bužemi

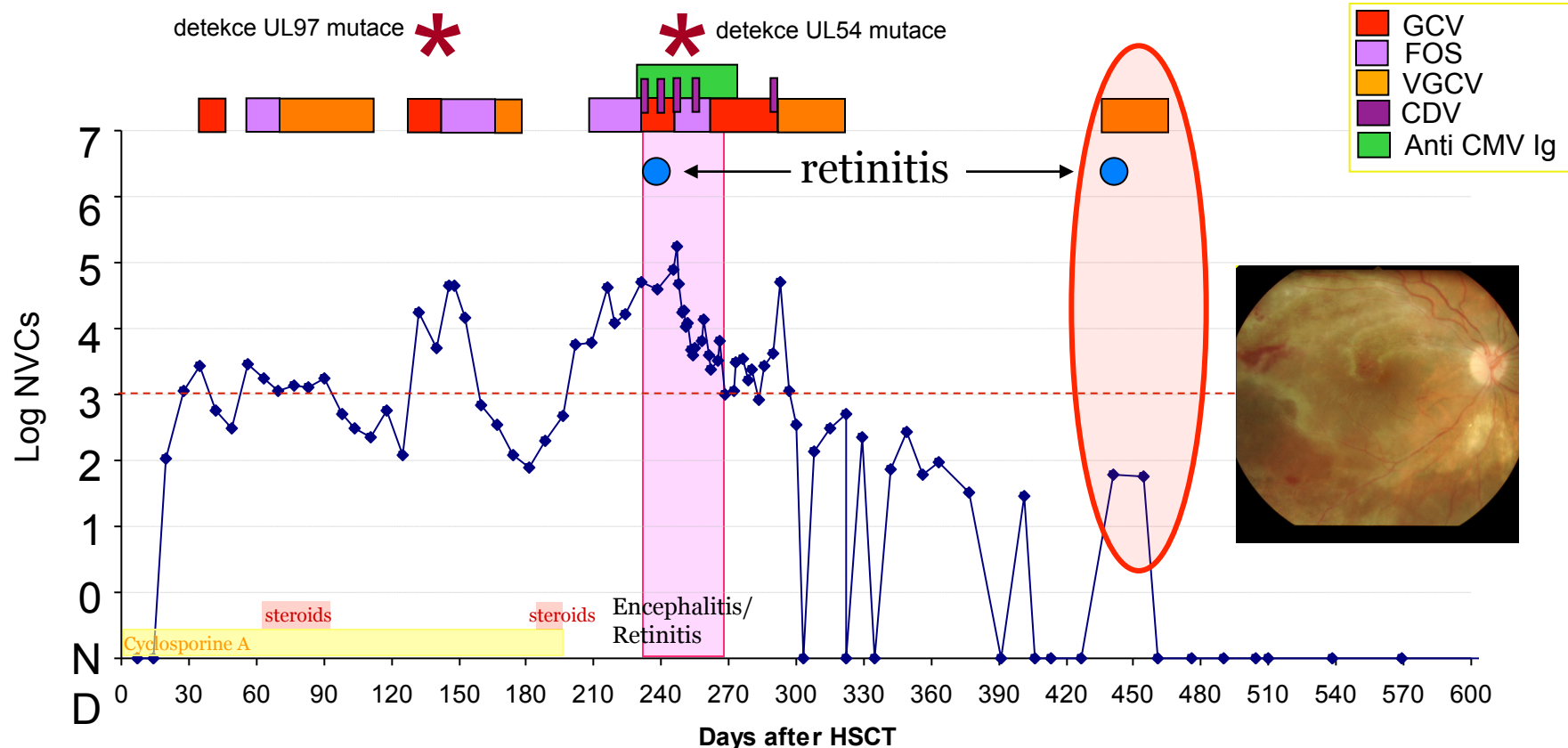
poměr mezi WT a L595S CMV mutantou

* detekce UL97 mutace



— Total CMV — WT — Mutant CMV

CMV encefalitida/retinitida



dívka, 18.6 let, HSCT pro AML M2
štěp: PBSC

dárce: MMUD_(8/10) CMV ser.: D-/R-

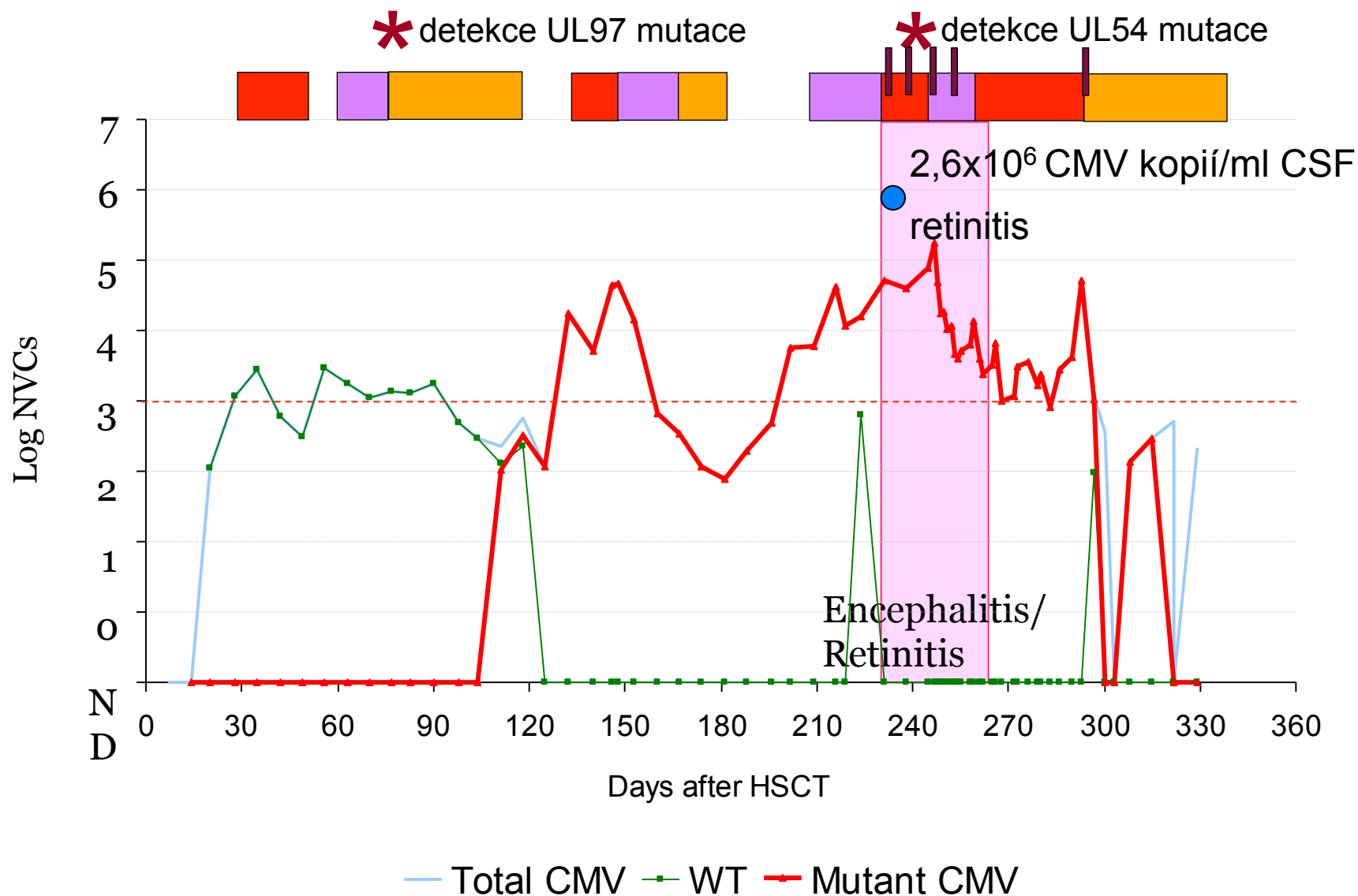
conditioning: Busulphan (16 mg/kg), Cyklofosamid (120 mg/kg), Melphalan (140 mg/m²) ATG (40 mg/kg)

GvHD profylaxe: CsA+MTX

GvHD: grade II (D+61) – skin GIT ostatní komplikace: D+16 BKV+ HC, D+377 Herpes zoster

outcome: žije, částečná slepota

poměr mezi WT a L595S CMV mutantou



závěry I.

- kvantitativní detekce CMV v pravidelných intervalech po Tx pomáhá klinikům k včasnému zahájení terapie a předchází rozvoji CMV nemoci
- nejčastěji je reaktivace detekována 2 měsíce po transplantaci
- nedojde-li k odpovědi do 2 týdnů od zahájení terapie, narůstá klinické podezření na CMV rezistenci k podávanému virostatiku
- rezistence na virostatika se objevuje po 2-3 měsících selektivní terapie
- v případě rozvoje CMV nemoci je potřeba výsledky z plné krve interpretovat velmi obezřetně, protože virové nálože v tkáních mohou být mnohem vyšší

rekonstituce CMV specifické imunity

CMV po HSCT

- terapie je založena na podávání virostatik (GCV, VGCV, FCV, CDV atd.) a/nebo snížení imunosuprese
 - **pre-emptivní režim**
 - založen na pravidelném monitoringu pomocí PCR
 - při překročení limitu zahájení terapie virostatiky
 - může vést k přeléčení pacientů s rizikem nežádoucích účinků virostatik
 - terapie může selhat díky rozvoje rezistence nebo špatného stavu imunity
- definitivní kontrolu CMV infekce umožní rekonstituce **CMV-specifické imunity**
 - zejména CD4+ a CD8+ T-lymfocyty
 - trvá měsíce až roky po HSCT
 - rekonstituci je možné také monitorovat a lépe cílit virostatickou terapii

výzkumné otázky

- **1. Jak najít pacienty, kteří jsou schopni kontrolovat CMV infekci po HSCT?**
 - takový pacient již není v riziku CMV infekce a nepotřebuje další léčbu virostatiky
 - prognóza takového pacienta je mnohem lepší, protože je ušetřen vedlejších účinků virostatik
 - **neutropenie (ganciclovir)** – zvyšuje rizika dalších komplikací (sepse, invazivní mykotické infekce)
 - **nefrotoxicita (foscavir, cidofovir)**
 - cost-benefit pro zdravotnické zařízení – virostatika jsou velmi drahá
- **2. Co můžeme udělat pro vysoce rizikové pacienty?**
 - pacienti s rezistencí na virostatika
 - pacienti se špatnou funkcí imunitního systému

1. Jak najít pacienty, kteří jsou schopni...?



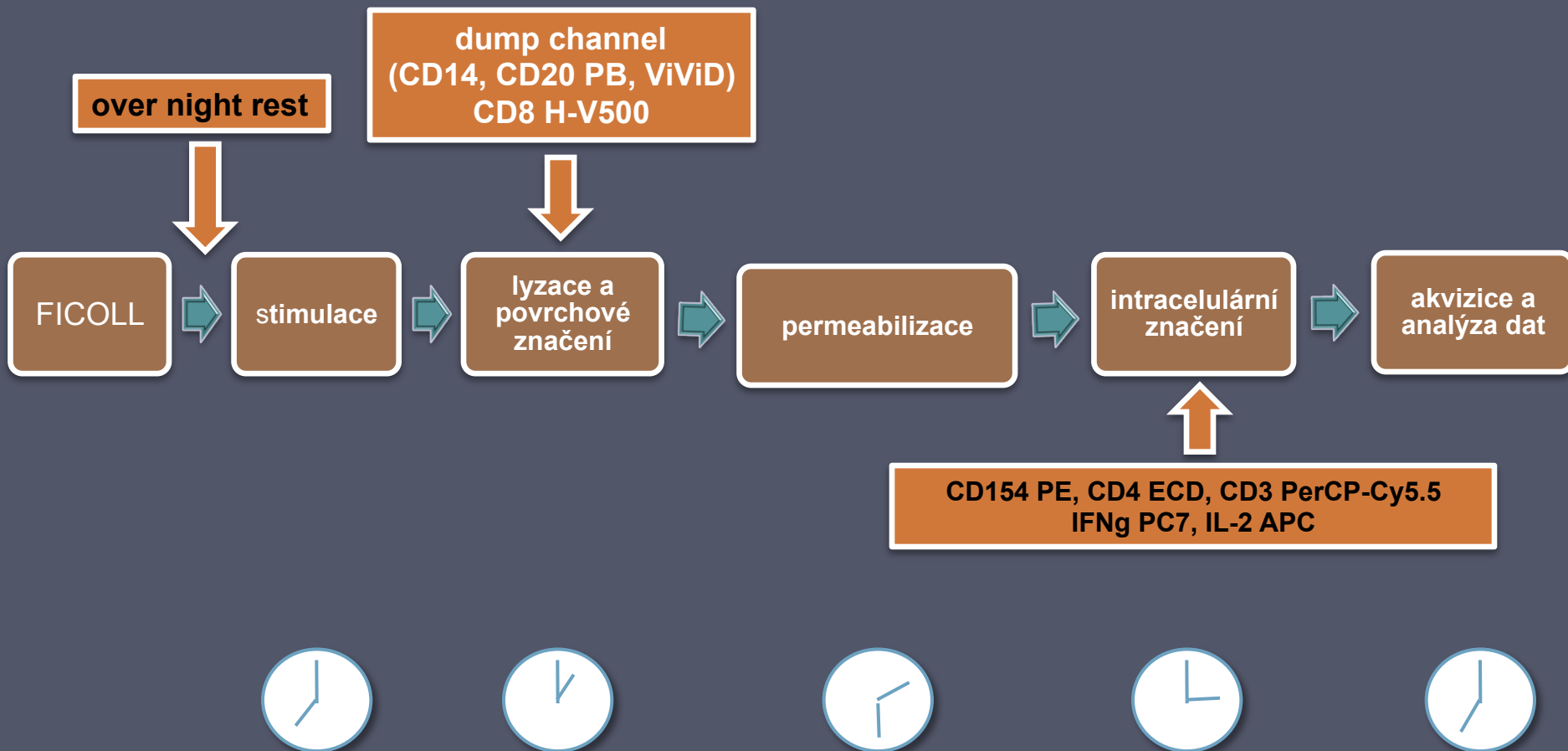
trvalou kontrolu CMV zajistí pouze rekonstituce CMV-specifické imunity, a to zejména CD4+ a CD8+ T-lymfocyty...!!!

- **metoda intracelulárního značení cytokinů (ICS)**
 - technika mnohobarevné průtokové cytometrie
 - umožňuje nám sledovat 12 různých parametrů na single cell úrovni
 - současná detekce různých efektorových funkcí CD4+ a CD8+ T-lymfocytů

interferon γ (IFN γ)
interleukin 2 (IL2)
CD154 (CD40 ligand)
CD107a (LAMP1)

hlavní prozánětlivý cytokin
růstový faktor pro lymfocyty
aktivační molekula
degranulační marker

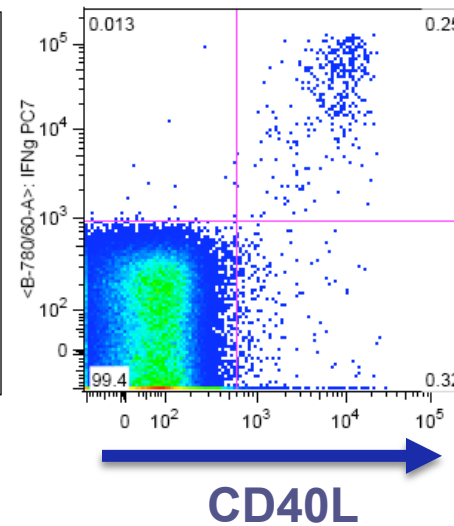
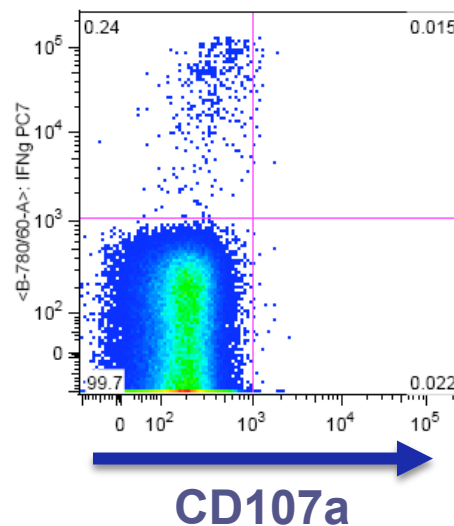
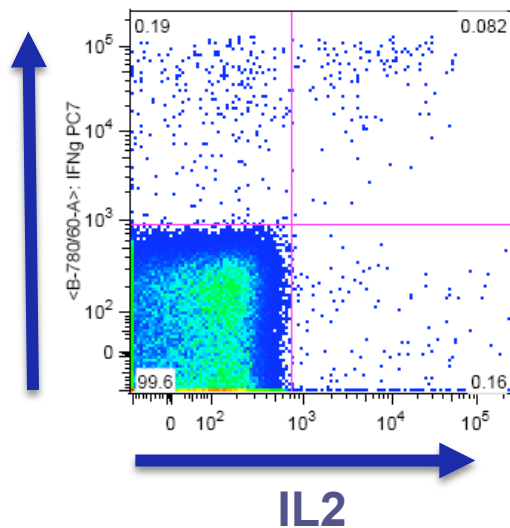
intracelulární značení cytokinů



efektorové funkce T-lymfocytů

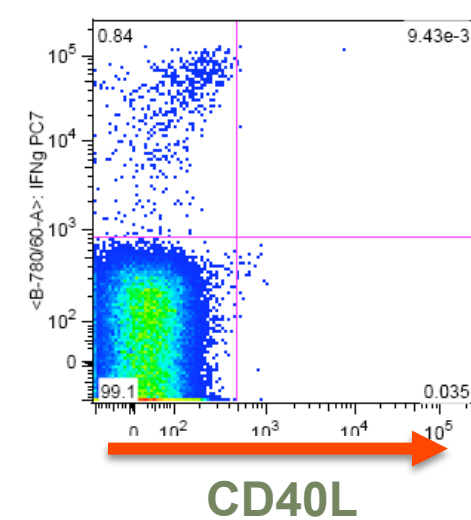
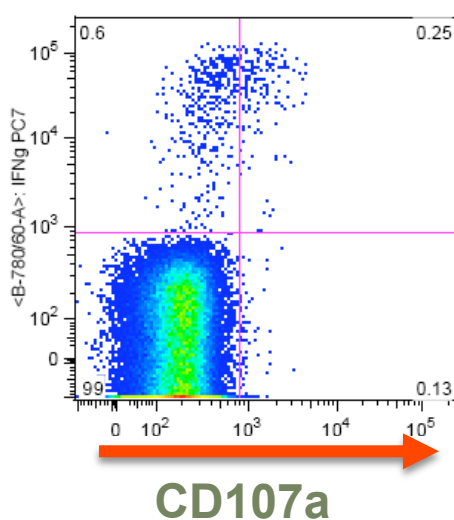
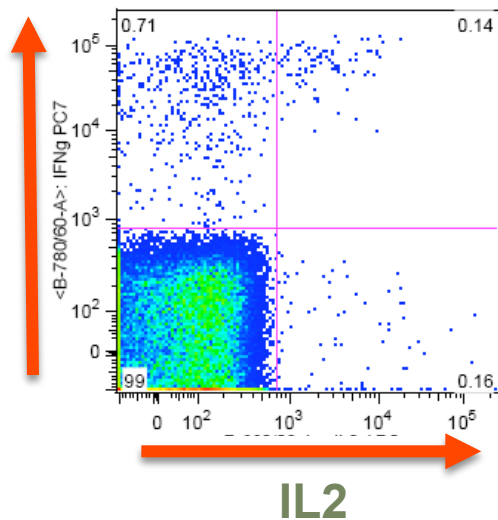
CD4+

IFN- γ



CD8+

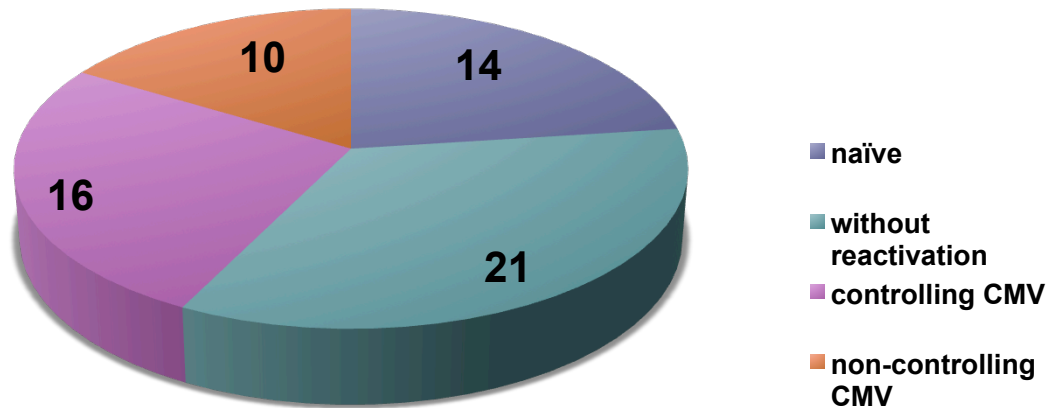
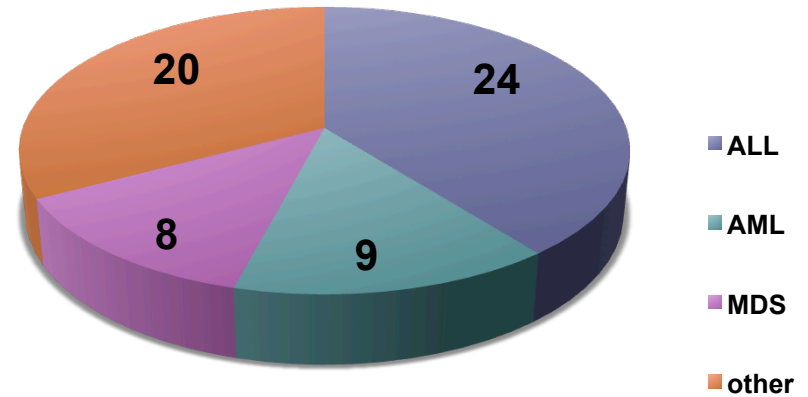
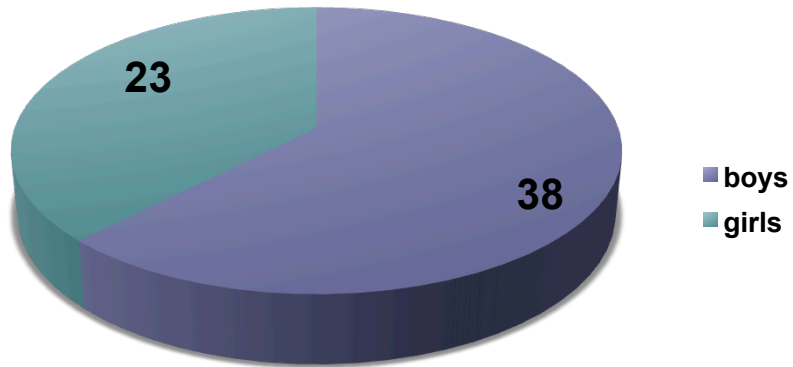
IFN- γ



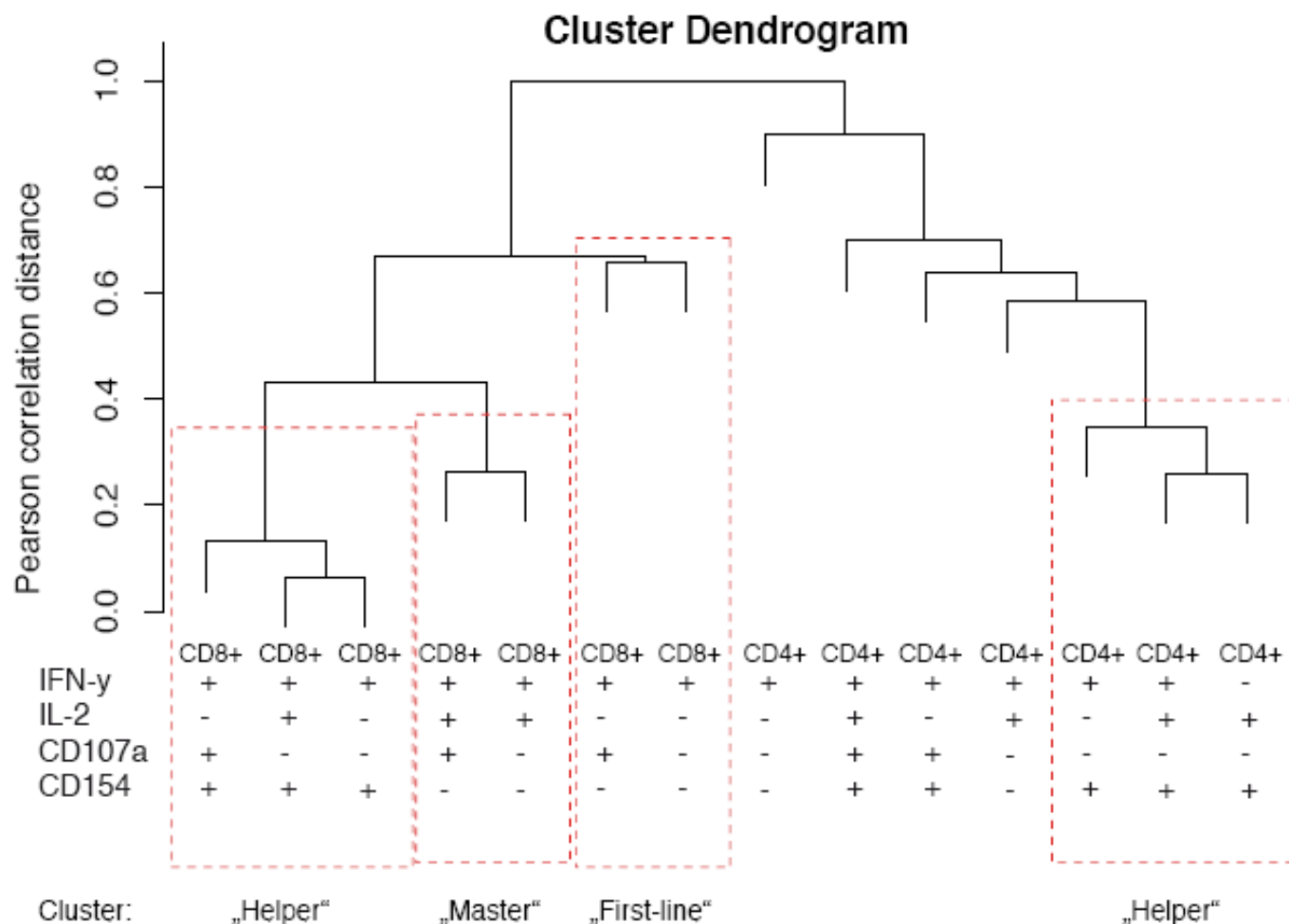
pacienti

- vyšetřili jsme pomocí ICS 118 jedinců
 - dospělí dobrovolní dárce 19
 - dětští dobrovolní dárce 38
 - dětští pacienti po HSCT 61
- virová nálož všech pacientů byla monitorována od 1x týdně od dne +7 po HSCT pomocí RQ-PCR
- pacienti byli testováni ve fixních časových bodech po SCT
 - den +28, +56, +90, +180 a +365 po HSCT
 - v případě reaktivace CMV byli pacienti testováni 1x týdně do PCR negativity

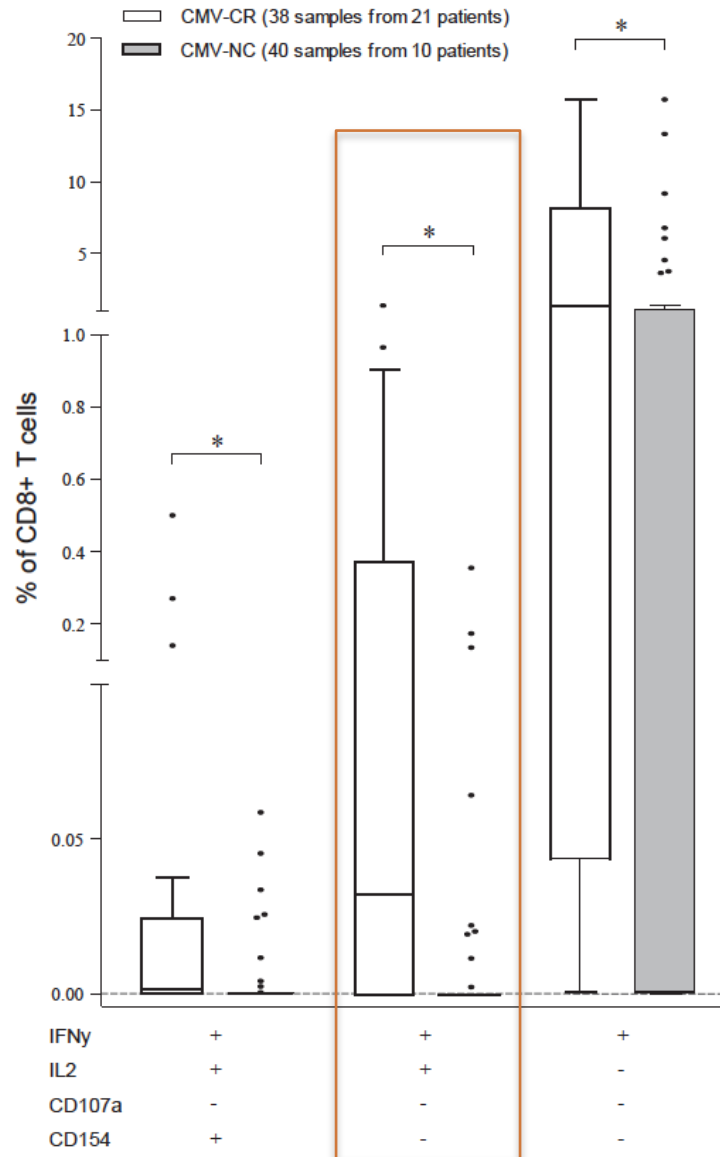
charakteristika pacientů



vztahy mezi profily odpovědí

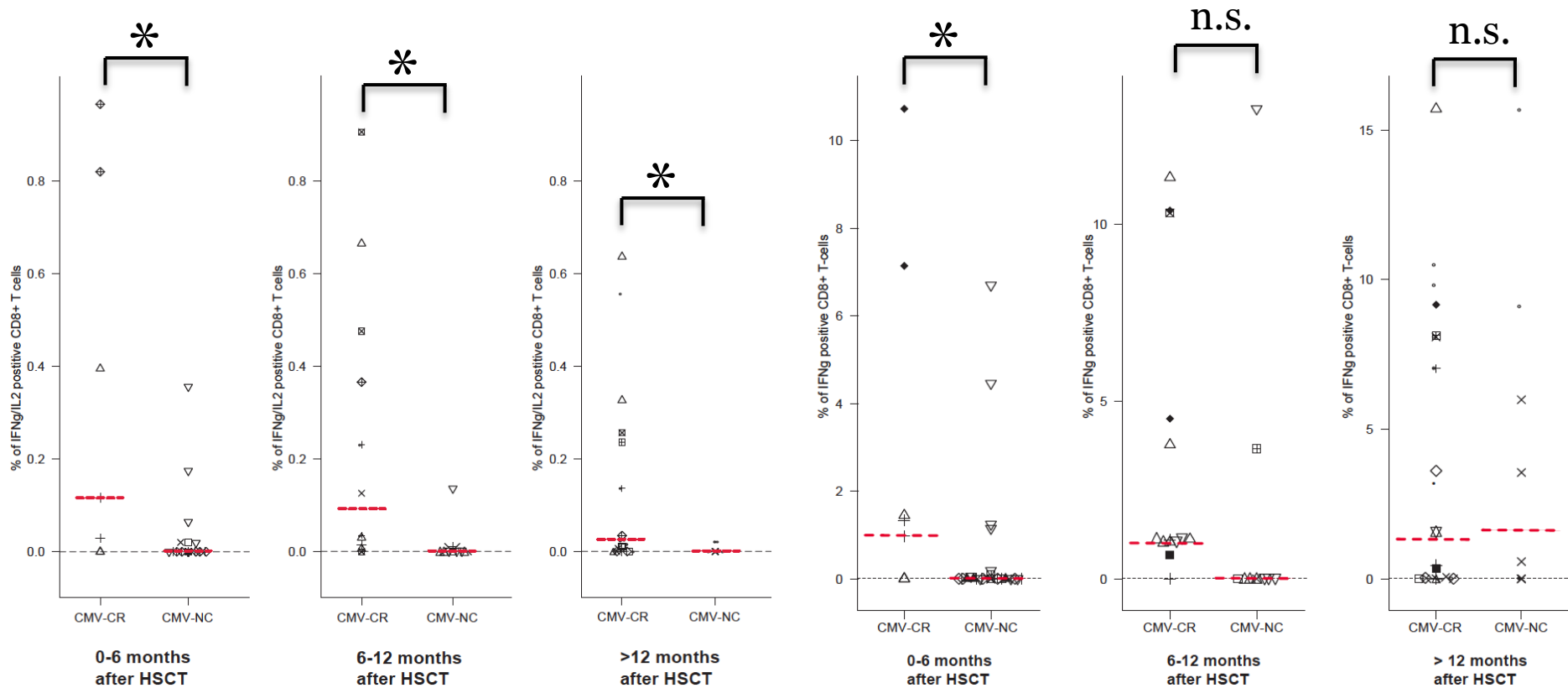


CD8+ T-lymfocyty



master efektny
IFN γ +/IL2+
marker protekce

proč master efektný?



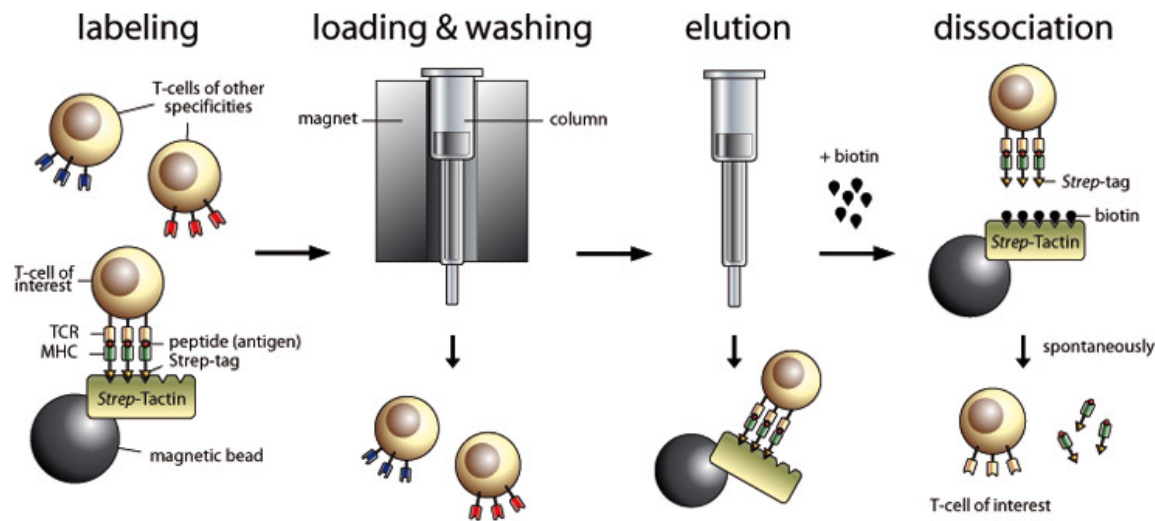
2. Co můžeme udělat pro high risk pacienty?

- pacienti s rezistencí na virostatika
- pacienti se špatnou rekonstitucí CMV-specifické imunity
- **adoptivní transfer CMV-specifických CD8+ T-lymfocytů**
 - dříve se k terapii virových infekcí používala infúze dárcovských lymfocytů (DLI)
 - neselektované lymfocyty
 - vysoké riziko indukce těžké GvHD s možností smrti pacienta
 - nyní jsou dostupné metody in vitro buněčných manipulací
 - umožňují selekci vysoce specifických protivirových T-lymfocytů
 - založeny na magnetické selekci nebo krátkodobé kultivaci
 - T-lymfocyty dostupné do 24 hod – 1 týdne od indikace terapie



- **CMV-specifické T-lymfocyty**

- připravujeme single centre nerandomizovanou klinickou studii fáze I
- dárce CMV-specifických lymfocytů bude jeden z rodičů (3rd party donor)
- lymfocyty budou získány magnetickou separací na CliniMACS pomocí Streptamerů



- **AdV-specifické T-lymfocyty**

- ve spolupráci se sv. Annou ve Vídni připravujeme multicentrickou studii fáze I/II
- založeno na selekci AdV-sepcifických T-lymfocytů pomocí Streptamerů a jejich následné 3 dny trvající in vitro expanzi
- již léčen 1. pacient z našeho pracoviště na compassionate use úrovni

závěry II

- mnohobarevná průtoková cytometrie je vhodným nástrojem pro imunitní monitoring a umožňuje studovat komplexitu CMV-specifických T-buněčných odpovědí
- master efekторы (CD8+IFN γ +/IL2+) korelují s kontrolou CMV
- **master efekторы mohou sloužit jako marker dobré rekonstituce imunitního systému po HSCT**
- CD4+ T-lymfocyty nekorelují s kontrolou CMV, ale jsou nezbytné pro správnou funkci imunitního systému
- high risk pacienty bude výhledově možné léčit podáním CMV-specifických CD8+ T-lymfocytů získaných od jednoho z rodičů pomocí CMV Streptamerů

děkuji za pozornost

