

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/20141> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Beek, Martha Trijntje van der

Title: Herpesvirus infections in immunocompromised patients : treatment, treatment failure and antiviral resistance

Issue Date: 2012-11-20

Nederlandse samenvatting

SAMENVATTING

NEDERLANDSE SAMENVATTING VOOR NIET (BIO)MEDISCH GESCHOOLDE LEZERS

Inleiding

Het onderzoek zoals beschreven in dit proefschrift betreft het beloop en de gevolgen van infecties met herpesvirussen bij immuungestoorde patiënten. Herpesvirussen komen veel voor en leiden na besmetting tot een levenslange, zogenoemd latente, infectie. Doorgaans verlopen deze latente infecties onopgemerkt, maar wanneer sprake is van een verminderde afweer kunnen zij opvlammen, reactiveren genoemd, en tot ernstige ziektebeelden leiden. De herpesvirussen die behandeld worden in dit proefschrift staan weergegeven in Tabel 1.

Tabel 1. Humane herpesvirussen behandeld in dit proefschrift.

virus	ziektebeeld bij eerste besmetting	ziektebeeld bij reactivatie
Herpes simplex virus type 1	blaasjes in de mond	koortslip, zweren in mond/keel
Varicella-zoster virus	waterpokken	gordelroos
Epstein-Barr virus	ziekte van Pfeiffer	tumoren, slijmvliesafwijking mond
Cytomegalovirus	ziekte van Pfeiffer	koorts, ontsteking van inwendige organen, ogen, hersenen

Zo kan een infectie met het herpes simplex virus type 1 (HSV-1) bij reactivatie leiden tot een koortslip en bij ernstig gestoorde afweer tot uitgebreide pijnlijke afwijkingen in en om de mond. Wanneer een latente infectie met varicella zoster virus (VZV) opvlamt kan dit leiden tot een lokale ophoping van pijnlijke blaasjes, beter bekend als gordelroos, maar uitgebreidere huidafwijkingen en aantasting van interne organen, ogen en hersenen kan ook voorkomen. Tenslotte kan reactivatie van een latente infectie met cytomegalovirus (CMV) koorts veroorzaken, evenals infectie van bijna alle interne organen, ogen en hersenen.

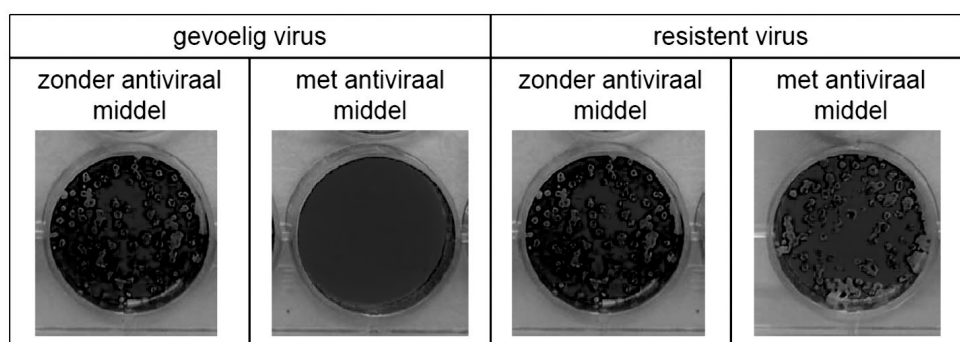
Bij immuungestoorde patiënten wordt daarom behandeling met antivirale middelen toegepast om symptomen te voorkomen of verminderen. In dit proefschrift is bij patiënten met een verminderde afweer onderzocht hoe deze drie herpesvirussen reageren op behandeling met antivirale middelen en of er sprake is van resistentie tegen antivirale middelen, wanneer de infectie niet vlot herstelt. Daarnaast zijn technieken opgezet om resistentie te kunnen aantonen bij de verschillende virussen.

Hoofdstuk 2

In **hoofdstuk 2** wordt de opzet beschreven van een nieuwe techniek om de gevoeligheid van HSV-1 voor antivirale middelen te bepalen. Bij de zogenaamde fenotypische

gevoeligheidstesten wordt bepaald in welke mate antivirale middelen de vermenigvuldiging van een virus remmen (zie figuur 1). Door de hoeveelheid virus na kweek in aan- en afwezigheid van antiviraal middel te vergelijken kan nagegaan worden in hoeverre er remming is door het antivirale middel. Afwezigheid van remming duidt op resistentie tegen het betreffende middel.

Figuur 1. Fenotypische gevoeligheidsbepaling HSV-1.



HSV-1 wordt gekweekt in een laag cellen in een kweekplaat. Daar waar het virus zich vermenigvuldigt worden de cellen vernietigd door het virus en dat zorgt voor de ophelderingen (plaques) in de blauwe cellaag (linker foto voor beide virussen). Elke plaque staat voor 1 virusdeeltje dat zich vermenigvuldigt. Wanneer antiviraal middel de vermenigvuldiging van een virus remt, ontstaan er geen plaques (rechter foto gevoelig virus). Wanneer virus resistent is tegen het antivirale middel, zal er ondanks de aanwezigheid van antiviraal middel vermenigvuldiging optreden en ontstaan er plaques (rechter foto resistent virus).

Eerder ontworpen methodes zijn afhankelijk van zichtbare en voldoende groei van het virus, waardoor deze testen lang duren en veel handwerk vergen. De nieuwe methode die is opgezet ondervangt deze nadelen door gebruik te maken van snelle en gevoelige detectie van DNA van HSV-1. Vergeleken met de traditionele testen, voldeed de methode goed in een testpanel van opgekweekt HSV-1 en in bepaalde gevallen (bij een geringe mate van resistentie) zelfs beter. Met het nieuwe protocol werd bovendien vlot een resultaat verkregen.

Bij patiënten die een stamceltransplantatie ondergaan worden de eigen bloed- en afweervormende cellen vernietigd om ziektes die hierin aanwezig zijn te genezen. Vervolgens krijgen deze patiënten stamcellen uit het beenmerg of bloed van een donor die weer kunnen uitgroeien tot effectieve bloed- en afweercellen. In de fase waarin de donorcellen nog niet volledig zijn uitgegroeid zijn deze zogenoemde stamcel transplantatie (SCT) ontvangers zeer ernstig immuungestoord. Een frequente en vervelende bijwerking van SCT is het ontstaan van pijnlijke zweren in en om de mond. Deze kunnen veroorzaakt worden door de chemotherapie die gegeven wordt

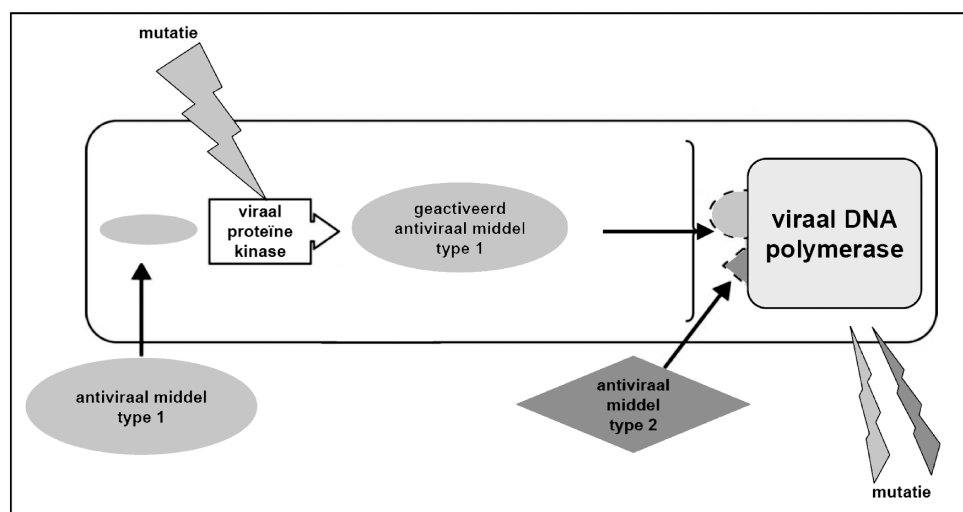
om de eigen cellen van de patiënt te vernietigen, maar het reactiveren van HSV-1 of andere herpesvirussen zoals Epstein-Barr virus (EBV) kan hierbij ook een rol spelen.

Hoofdstuk 3

In **hoofdstuk 3** is een groep patiënten tijdens het SCT traject gevolgd. Geregistreerd werd of zij last kregen van afwijkingen in de mond en of er HSV-1, CMV of EBV in hun mond aanwezig was. Daarnaast werd bij de patiënten die HSV-1 bleken te hebben onderzocht hoe vaak er sprake was van een blijvende infectie in de mond ondanks behandeling. Bij de patiënten met een blijvende infectie werd tenslotte bekeken of er sprake was van een resistent virus.

De aanwezigheid van HSV-1 bleek verband te houden met zweren in de gehele mond. EBV leek verband te houden met het optreden van zweren in specifieke gedeelten van de mond. Een blijvende HSV-1 infectie ondanks behandeling trad op bij 43% van de behandelde patiënten en ging gepaard met een resistent virus bij 42% van de blijvende infecties. Dit betekent dat preventie, diagnose en behandeling van HSV-1 infecties na SCT van belang zijn evenals resistentie onderzoek, wanneer de infectie niet reageert op behandeling. De rol van EBV verdient nog nader onderzoek.

Figuur 2. Werkings- en resistentiemechanismen antivirale middelen tegen herpesvirussen.



Vereenvoudigde weergave van het werksmechanisme van anti-herpesvirus middelen in een virus geïnfecteerde cel. Deze middelen kunnen in 2 typen verdeeld worden op grond van hun aangrijpingspunt in het virus. Middelen van type 1 dienen voordat zij werkzaam zijn geactiveerd te worden door het virale enzym proteïne kinase. Daarna blokkeren zij de werking van het virale enzym DNA polymerase waardoor het virus zich niet meer kan vermenigvuldigen. Middelen van type 2 zijn direct actief tegen het virale DNA polymerase. Hieruit volgt dat mutaties in het virale proteïne kinase de werking van type 1 middelen teniet doen. Mutaties in het virale DNA polymerase kunnen de werken van beide typen antivirale middelen blokkeren.

Hoofdstuk 4

In hoofdstuk 4 zijn het beloop, het effect van antivirale behandeling en het vóórkomen van resistent virus onderzocht bij hematologische patiënten met een VZV infectie. Hoewel VZV veel voorkomt in deze patiëntengroep, is over het voorkomen van langdurige VZV infecties en de rol van resistent virus hierbij weinig bekend. Daarom is dit terugkijkend onderzocht bij een groep volwassenen en kinderen die ofwel chemotherapie voor bloed- of lymfeklierkanker ofwel een SCT hadden ondergaan in het recente verleden en daarna een VZV infectie ontwikkelden. Van deze patiënten is nagezocht hoe lang zij symptomen hadden en wat voor soort symptomen dat waren. Ook is bij hen achteraf bepaald in opgeslagen monsters hoeveel en hoe lang VZV aantoonbaar was. Tenslotte is bij langdurige infecties gekeken of er sprake was van resistent virus.

Van de patiënten bij wie dit achteraf onderzocht kon worden had 59% een langdurige infectie en dit ging bij de helft van de patiënten gepaard met complicaties. Resistent virus werd gevonden in 27% van de patiënten en ging in een aantal gevallen gepaard met zeer ernstige infecties met resistent virus in ogen of hersenen. Dit betekent dat bij langdurige VZV infectie tijdig en uitgebreid resistentie onderzoek van virus uit alle mogelijk aangedane organen noodzakelijk is.

Hoofdstuk 5

Antivirale middelen die CMV en andere herpesvirussen remmen hebben twee aangrijpingspunten in het virus (zie figuur 2). De eerste is het virale enzym proteïne kinase dat door het antivirale middel benut wordt om zich te laten omzetten tot actieve remmende stof. De tweede is het enzym DNA polymerase waarvan de werking door de antivirale middelen geblokkeerd wordt, waardoor het virus zich niet meer kan vermenvuldigen.

In het DNA van CMV liggen de twee genen die, wanneer zij afgelezen en vertaald worden, leiden tot de productie van deze twee enzymen. Resistentie ontstaat in een virus zoals CMV bij toeval, omdat tijdens de vermenigvuldiging van een virus het DNA ervan wordt gekopieerd voor het nieuwe virusdeeltje en hierbij wel eens fouten, mutaties genoemd, ontstaan. Wanneer zo'n mutatie gelokaliseerd is in een stuk viraal DNA waarin zich de genen voor proteïne kinase of DNA polymerase bevinden is het mogelijk dat deze enzymen niet meer of anders gaan werken. Daardoor kan het virus het aangrijpingspunt van een antiviraal middel verliezen. Het virus is dan resistent geworden tegen het middel.

Resistentie kan bij een virus daarom gedetecteerd worden door op zoek te gaan naar mutaties in de genen van de enzymen proteïne kinase en DNA polymerase. De gebrui-

kelijke techniek hiervoor bestaat uit het volledig aflezen van de betreffende genen. Dit behelst vrij veel handwerk en veel analysetijd. Massa spectrometrie gebaseerde vergelijkende sequentie analyse (mass spectrometry-based comparative sequence analysis, MSCSA) is een nieuwe techniek waarbij het niet nodig is een heel gen af te lezen. Met massa spectrometrie worden het gewicht en de lading van een molecuul bepaald. Dit kan gebruikt worden voor het analyseren van DNA door een gen in ontelbare kleine fragmentjes te knippen en daarvan de lading en massa te bepalen. Software kan de gegevens van alle kleine fragmentjes vergelijken met gegevens over hoe het gen samengesteld zou moeten zijn en zo herleiden op welke volgorde de fragmenten zich in het oorspronkelijke gen bevonden. Als het gewicht van een fragment veranderd is betekent dit dat er iets veranderd is in het gen en zo kan bepaald worden of er mutaties in aanwezig zijn. De bewerking van het virus monster en de analyse kunnen beide halfautomatisch verricht worden en dat bespaart dus tijd.

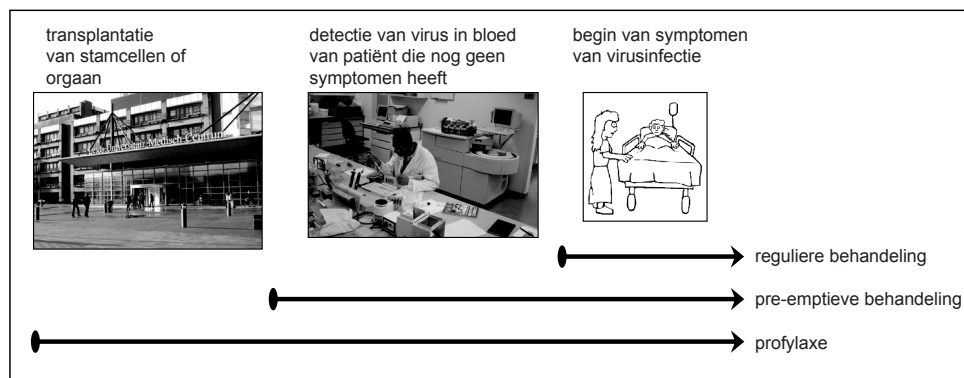
In **hoofdstuk 5** is deze nieuwe techniek om resistentie veroorzakende mutaties op te sporen onderzocht voor het proteïne kinase gen van CMV. In een testpanel van gevoelige en resistente CMV monsters werkte de nieuwe techniek net zo goed als de gebruikelijke voor het opsporen van mutaties in het proteïne kinase gen. Wanneer er een groot aanbod is van monsters voor resistentie analyse zou deze techniek dus ingezet kunnen worden.

Hoofdstuk 6

CMV infecties kunnen bij SCT patiënten ernstig verlopen in de fase waarin hun donor stamcellen nog onvoldoende zijn uitgegroeid. Om dit te voorkomen worden deze infecties al behandeld voordat de patiënt er symptomen van heeft door regelmatig in het bloed van de patiënten te kijken of er CMV aantoonbaar is. Het monitoren van het ontstaan van een infectie en het starten met behandelen voordat deze klinisch merkbaar is heet pre-emptieve therapie (zie Figuur 3). Soms is na een pre-emptieve behandeling toch nog virus meetbaar in het bloed van patiënten. Het is onduidelijk hoe dit komt.

In **hoofdstuk 6** is bij SCT patiënten terugkijkend onderzocht hoe vaak er ondanks pre-emptieve behandeling van CMV sprake was van een aanhoudende infectie in het bloed. De risicofactoren hiervoor en de rol van resistent virus zijn bestudeerd. Bij 45% van de ziekte episodes bleek sprake van een aanhoudende infectie ondanks behandeling. Dit kwam vooral voor tijdens de eerste CMV infectie sinds de SCT en bij patiënten die veel afweer onderdrukkende medicijnen gebruiken. Resistent virus kwam slechts bij één patiënt voor. Dit betekent dat een langdurige CMV infectie na SCT vooral verband houdt met een slechte afweer en dat het meestal niet nodig is een ander antiviraal middel te geven.

Figuur 3 Preventie- en behandelingsstrategieën van herpesvirus infecties na transplantatie.



Om een ernstig verloop van infecties met herpesvirussen bij transplantatiepatiënten te voorkómen kunnen verschillende strategieën worden toegepast. Profylaxe bestaat uit het geven van antivirale middelen vanaf het moment van transplantatie. Pre-emptieve behandeling omvat het regelmatig monitoren van virus in het bloed om therapie te kunnen starten zodra virus aantoonbaar is nog voordat de patiënt hier verschijnselen van heeft. Tenslotte kunnen infecties ook pas behandeld worden wanneer de patiënt er symptomen van heeft, maar dan is de kans op een ernstig beloop groter.

Na een orgaan transplantatie komen CMV infecties ook veelvuldig voor. Dit komt enerzijds doordat patiënten sterke afweer onderdrukkende medicatie gebruiken na transplantatie om afstoting van het donor orgaan te voorkomen. Anderzijds komt dit doordat ontvangers van een orgaan geïnfecteerd kunnen worden doordat CMV zich in het donor orgaan bevindt. Vooral wanneer de ontvanger zelf nog nooit CMV heeft opgelopen en hiertegen dus geen afweer heeft opgebouwd is dit gevaarlijk, omdat de patiënt dan een eerste CMV infectie oploopt op een moment waarop er sprake is van een sterk onderdrukte afweer. Om ernstige ziekteverschijnselen te voorkomen krijgen patiënten zonder afweer tegen CMV daarom soms preventief antivirale middelen toegediend na transplantatie van een orgaan dat CMV bevat (profylaxe, zie Figuur 3). Een pre-emptieve strategie, zoals in de vorige paragraaf beschreven kan ook worden toegepast. Het is onbekend welke van deze twee strategieën het meest effectief is en het laagste risico op resistentie geeft.

Hoofdstuk 7

In het LUMC is men recent van een pre-emptieve strategie overgegaan op een strategie van 3 maanden profylaxe gevolgd door een pre-emptieve strategie ter voorkoming van CMV infecties bij niertransplantatie patiënten uit de genoemde hoog risico categorie. In **hoofdstuk 7** is terugkijkend een vergelijking gemaakt van het vóórkomen van langdurige infecties en het vóórkomen van resistent virus tussen beide behandelingsstrategieën. Blijvende CMV infecties ondanks behandeling kwam voor bij 71% van de patiënten uit

het pre-emptieve cohort en slechts 14% van de patiënten in het profylaxe gevolgd door pre-emptieve behandeling cohort. Resistentie kwam voor bij respectievelijk 3 en 1 patiënt uit de beide groepen en deze infecties verdwenen zonder behandeling. Dit betekent dat profylaxe leidt tot minder langdurige infecties en dat, wanneer profylaxe gevolgd wordt door pre-emptieve therapie, er geen grotere kans op resistentie is en misschien zelfs een kleinere kans.

Hoofdstuk 8

Omdat bepaalde delen van de afweer na orgaantransplantatie sterk onderdrukt worden met medicatie, spelen de minder onderdrukte componenten zoals de aangeboren afweer waarschijnlijk een belangrijke rol in de afweer tegen infecties. De zogenoemde aangeboren afweer bestaat onder andere uit verschillende eiwitten die ziekteverwekkers zoals CMV kunnen herkennen en onschadelijk kunnen maken. Voorbeelden van deze eiwitten zijn mannose-bindend lectine (MBL), ficoline-2 (FCN2) en MBL-geassocieerd serine protease (MASP2). Door verschillen in de genen die voor deze eiwitten coderen, zijn er verschillen tussen mensen wat betreft de hoeveelheid en de werking van deze eiwitten. Mogelijk leidt dit ook tot verschillen in de effectiviteit van de aangeboren afweer tegen infecties zoals CMV. De eiwitten MBL, FCN2 en MASP2 worden geproduceerd door de lever. Na een levertransplantatie erft de ontvanger daarmee de genen van de leverdonor en gaat voortaan eiwitten produceren in de hoeveelheid en werking zoals voorgeschreven door die genen.

In **hoofdstuk 8** is onderzocht of dit gevolgen heeft voor de kans op CMV infecties na levertransplantatie. Terugkijkend is van ontvangers van een levertransplantaat gekeken naar hun MBL, FCN2 en MASP2 genen en die van de leverdonor. Van alle patiënten is vervolgens terugkijkend geregistreerd of zij een CMV infectie opliepen na transplantatie.

Ontvangers van een levertransplantaat met genen die zorgden voor verminderde productie van MBL2 of een minder effectief FCN2 hadden inderdaad een grotere kans op CMV infecties, vooral wanneer zij beide ongunstige genvarianten hadden. Dit risico was het grootst bij patiënten die zelf vóór transplantatie gunstige genvarianten hadden. Bij de patiënten die zelf al ongunstige genvarianten hadden was dit risico minder groot. Misschien komt dit door het feit dat deze patiënten al 'gewend' waren aan minder effectieve onderdelen van de aangeboren afweer en ter compensatie andere onderdelen van de afweer extra hadden benut. Een patiënt die van nature geen ongunstige genvarianten had en dus geen compensatiemechanismen had ontwikkeld en een lever met een verminderde productie van effectief MBL2 en FCN2 ontvangt heeft daardoor mis-

schien op een moment van sterk onderdrukte afweer ook nog eens een minder optimale aangeboren afweer. In de toekomst kan het in detail bepalen van onderdelen van de afweer bij een patiënt vóór transplantatie mogelijk leiden tot betere risico inschattingen en preventie van CMV infecties na transplantatie.

Conclusie

Concluderend kan gesteld worden dat langdurige infecties met HSV, VZV en CMV frequent voorkomen bij immuungestoorde patiënten. Resistent virus is bij een minderheid van de patiënten een oorzaak van een blijvende infectie. Echter, infecties met resistent virus kunnen ernstig verlopen. Daarom is bij blijvende infecties tijdig onderzoek naar resistentie noodzakelijk. Hiervoor kunnen onder andere de beschreven nieuwe technieken gebruikt worden.

Om in de toekomst infecties met herpesvirussen bij immuungestoorde patiënten beter te kunnen voorkómen en behandelen is meer kennis nodig over het voorspellen en versterken van de afweer tegen herpesvirussen, over aanvullende technieken voor resistentiebepaling en over nieuwe middelen voor behandeling van infecties met resistente virussen. Ook is meer inzicht nodig in de optimale behandelduur van deze infecties om het beleid bij een langdurige infectie beter te kunnen vaststellen.