

Diagnostik und Therapie EBV-assoziierter Erkrankungen

Uta Behrends

Kinderklinik Schwabing
Technische Universität München

Klinische Kooperationsgruppe Pädiatrische Tumorimmunologie
Helmholtz Zentrum München

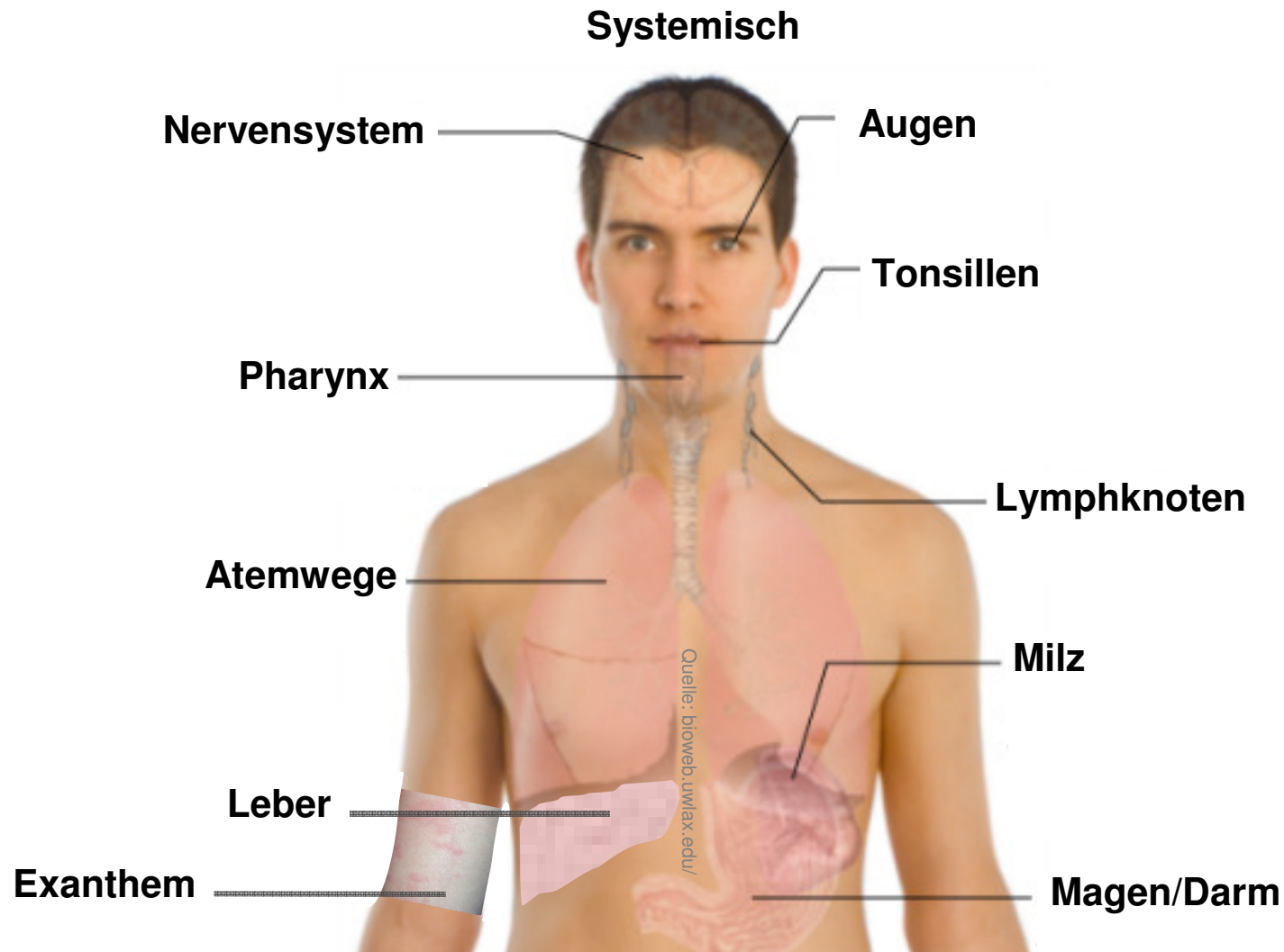
Indikation der EBV-Diagnostik

≥ 2 der 4 Symptome

- **Fieber**
- **Müdigkeit**
- **Pharyngitis**
- **Lymphadenopathie**

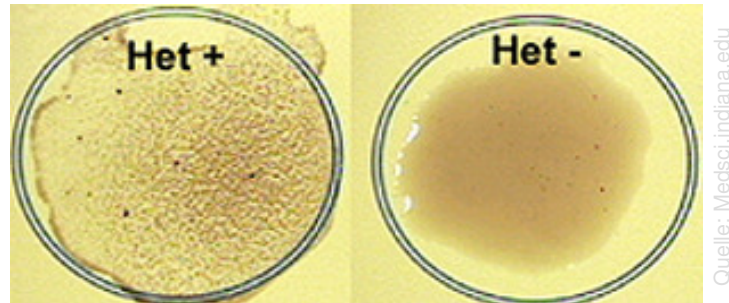


Indikation bei kombinierter *und/oder* isolierter Symptomatik



Bei unklarer Symptomatik an EBV denken und ggf. abklären !

Serologische Diagnose



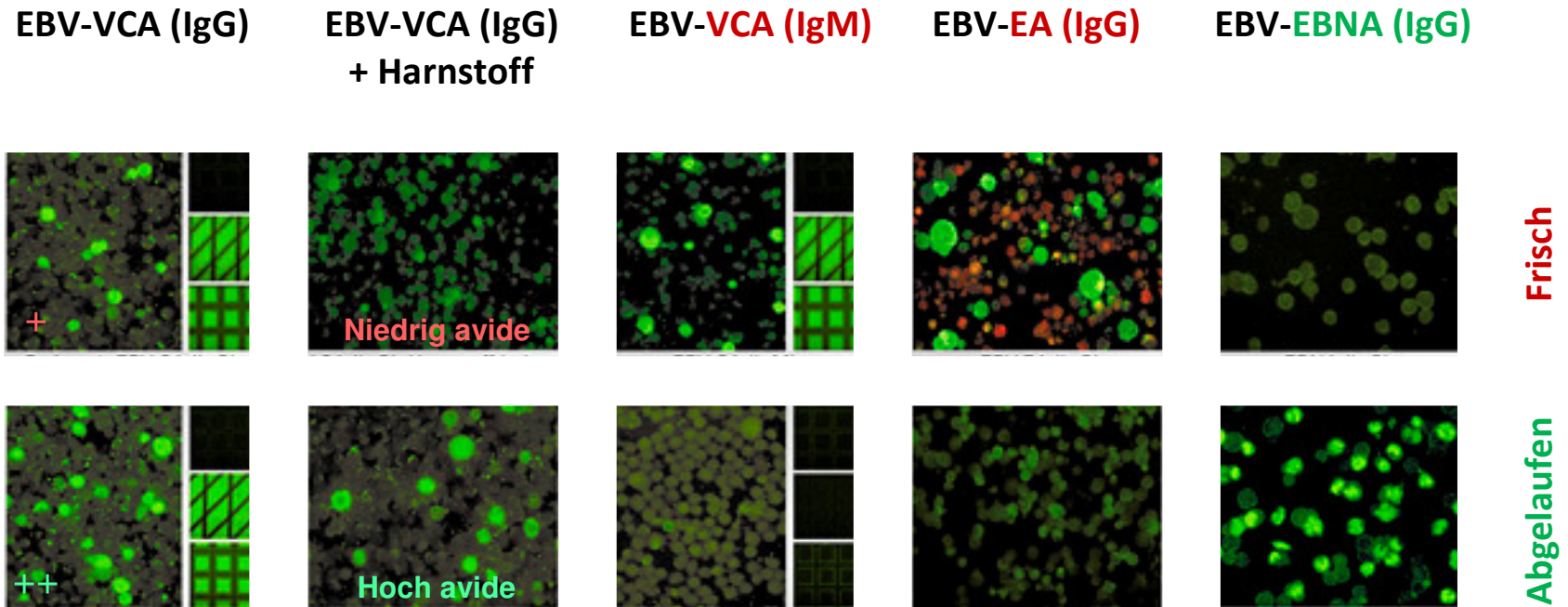
Historisch

- **Paul Bunell Test** (Monospot-Test,)
- **Heterophile Antikörper** agglutinieren Tier-Erythrozyten
- Bei Kindern **< 5 Jahre negativ**

Goldstandard

- Immunfluoreszenztest (**IFT**)

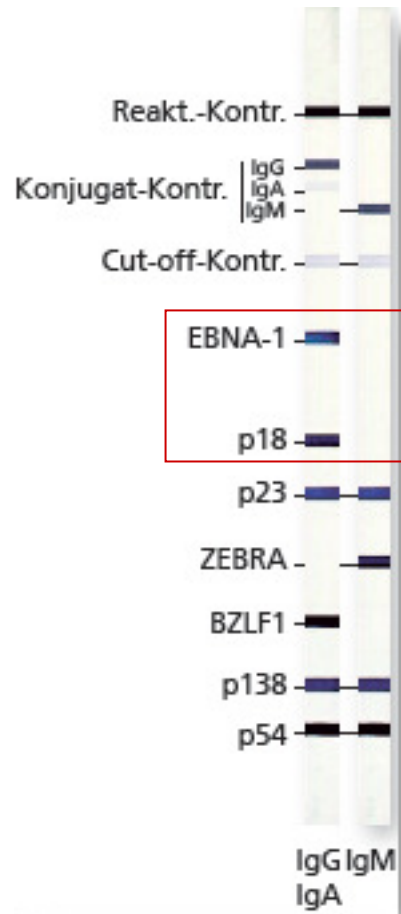
Indirekter Immunfluoreszenztest (IFT) - Goldstandard



VCA = Viruskapsid-Antigen
 EA = Early Antigen
 EBNA = EBV Nukleäres Antigen

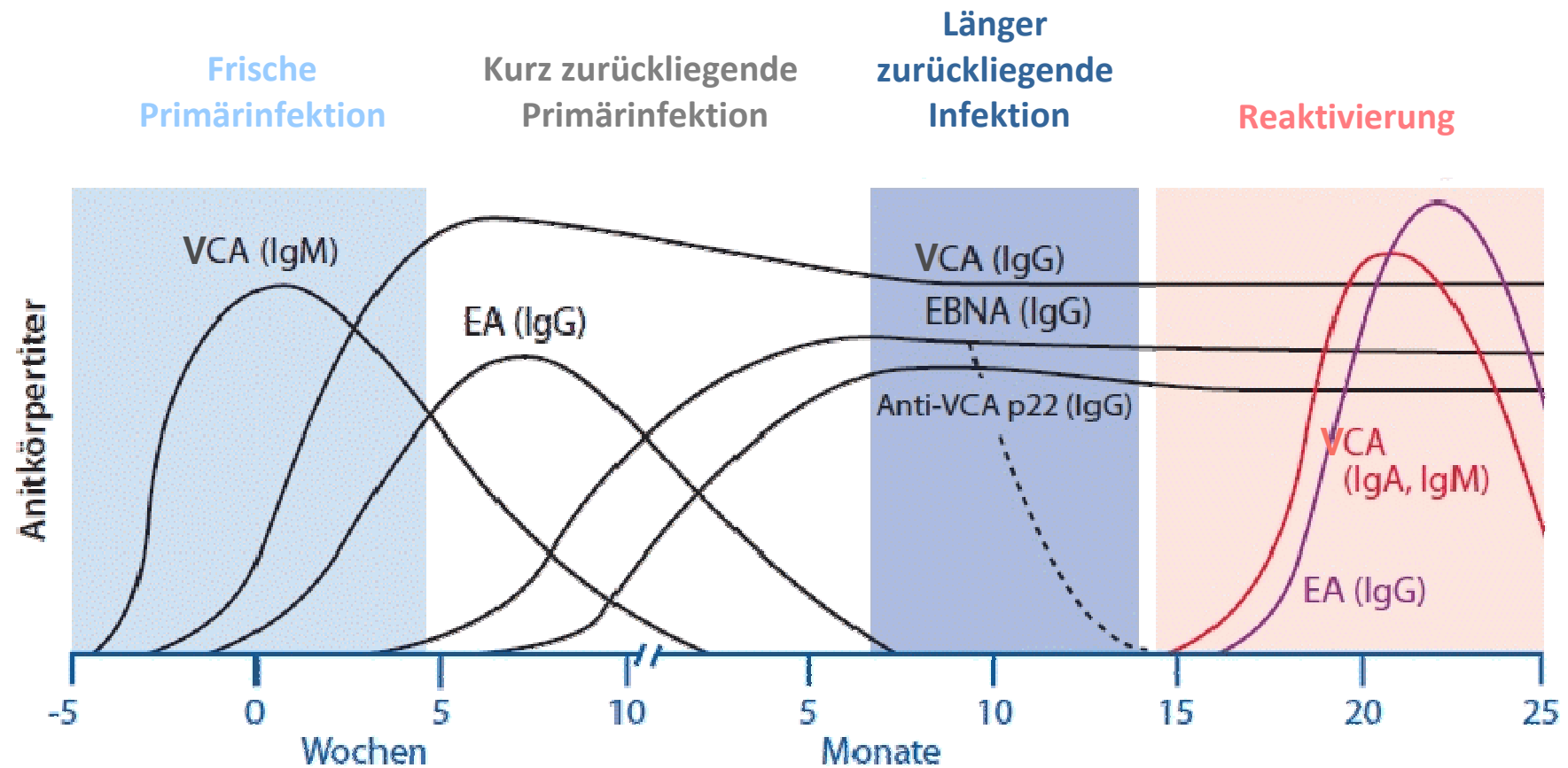
Quelle: Euroimmun, modifiziert

Immunoblot - Bestätigungstest



Quelle: Mikrogen, EUROIMMUN, modifiziert

Serologisches Profil im Krankheitsverlauf



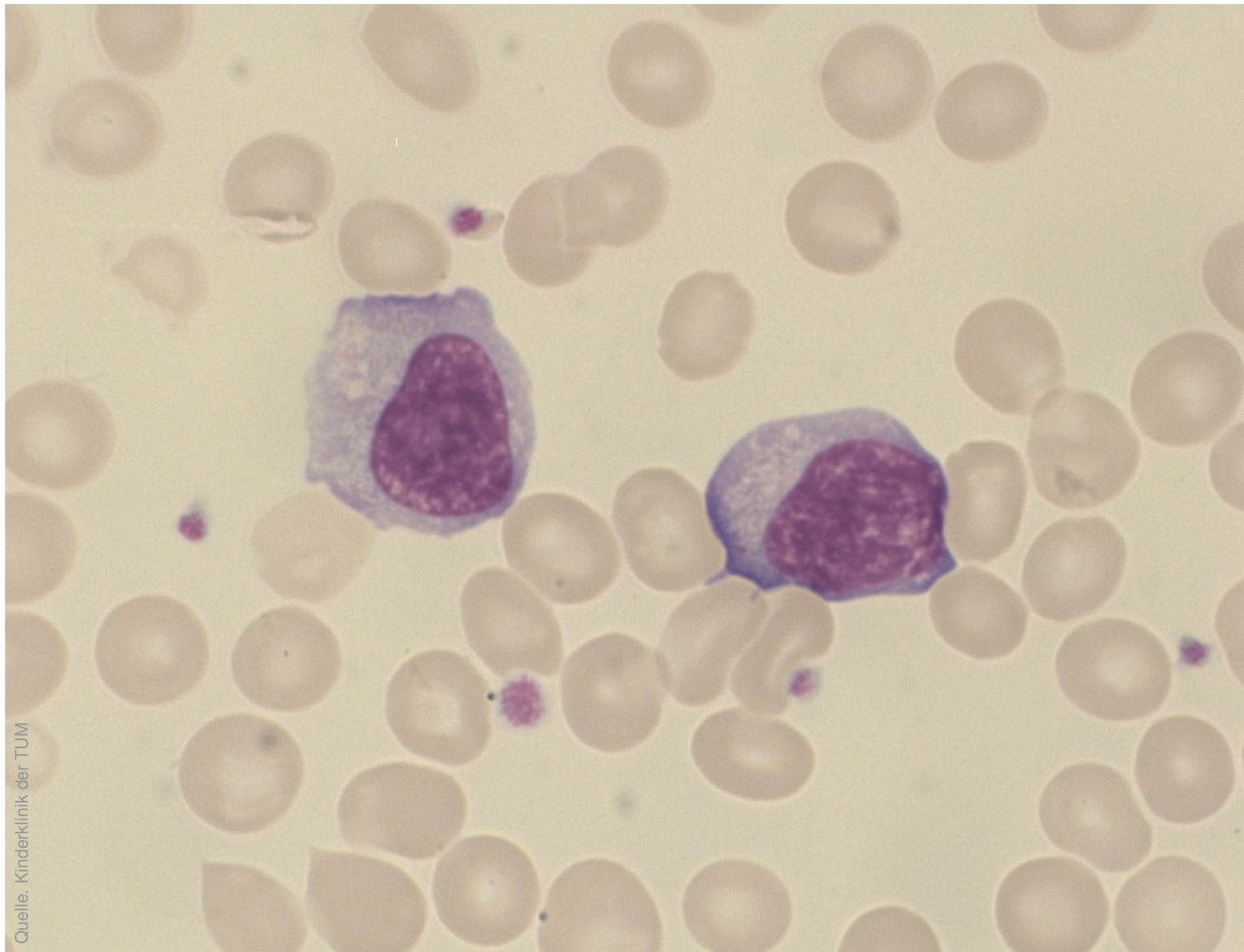
EBV IgA: Marker des Nasopharynxkarzinoms !

Antikörpermuster bei Reaktivierung

	Anti-VCA-IgG	Anti-VCA-IgM	Anti-EA (D)	Anti-EBNA
keine frühere EBV-Infektion	-	-	-	-
akute infektiöse Mononukleose	+	+	+/-	-
länger zurückliegende EBV-Infektion	+	-	-	+
„chronisch-aktive“ EBV-Infektion (CAEBV)	+++	-/+	+++	-/+
lymphoproliferative Krankheitsbilder nach Organtransplantation (EBV-Reaktivierung) (LPD)	++	-/+	++	-/+

Quelle: DPI-Handbuch 2013, modifiziert

Atypische Lymphozyten im Blutausstrich - Pfeiffer-Zellen

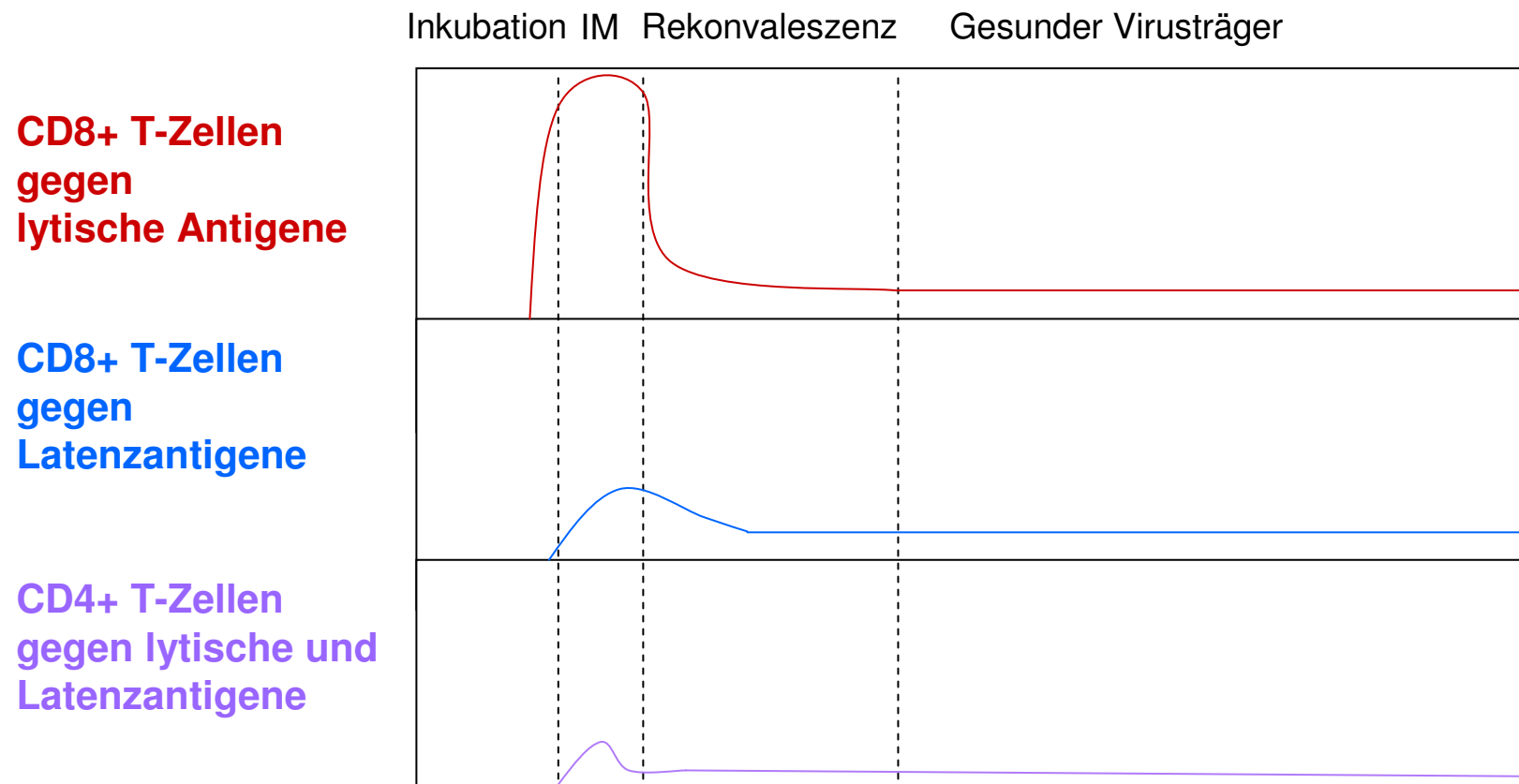


Quelle: Kinderklinik der TUM

Klassische Trias bei Primärinfektion

- **Positive EBV-Serologie im Sinne frischer Infektion**
- **> 10% atypische Lymphozyten im peripheren Blut**
- **Lymphozytose**

Lymphozytose im Verlauf der EBV-Infektion



Quelle: Field's Virology 2013, modifiziert

CD8+ und CD4+ T-Zellen erkennen EBV-Antigene

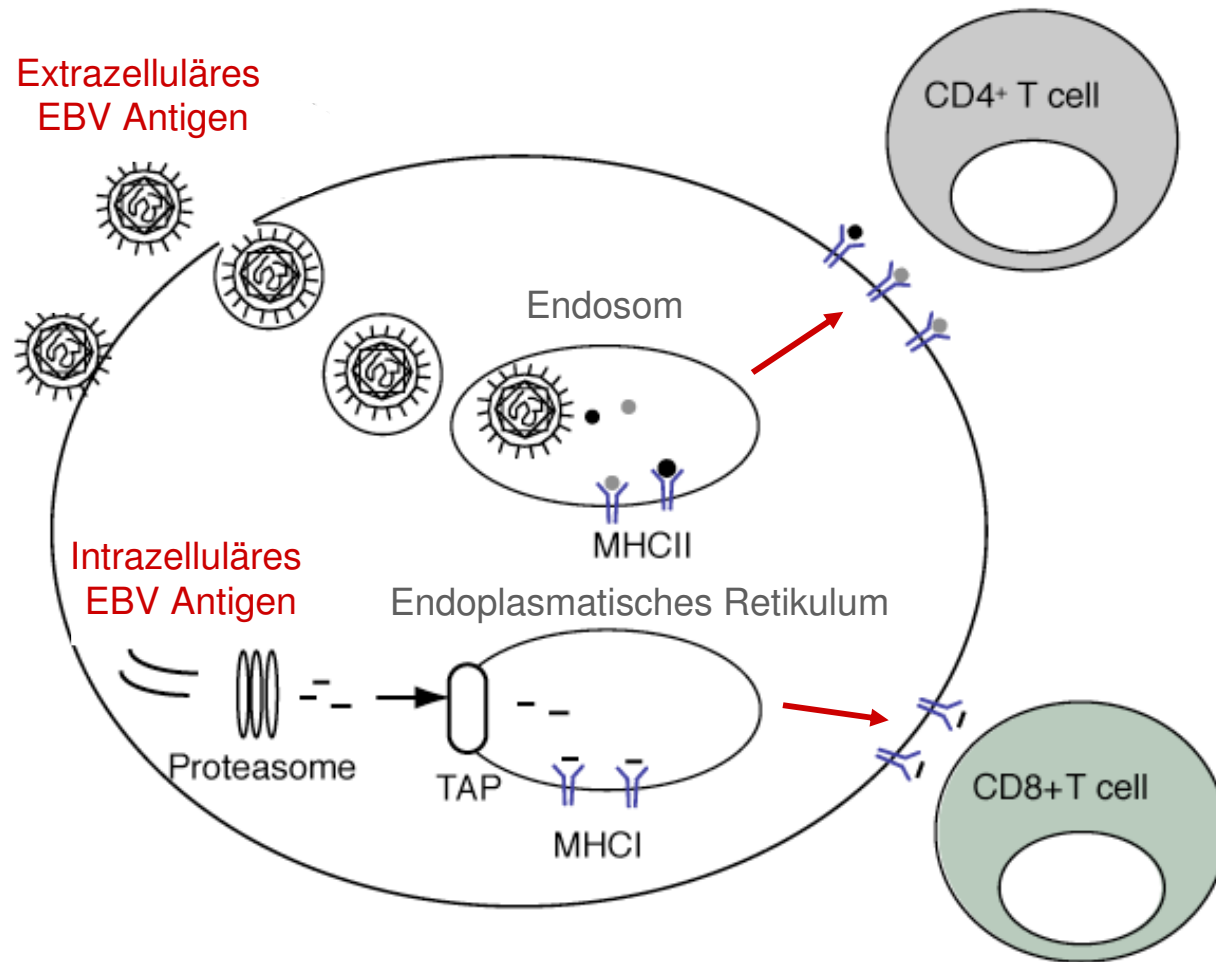
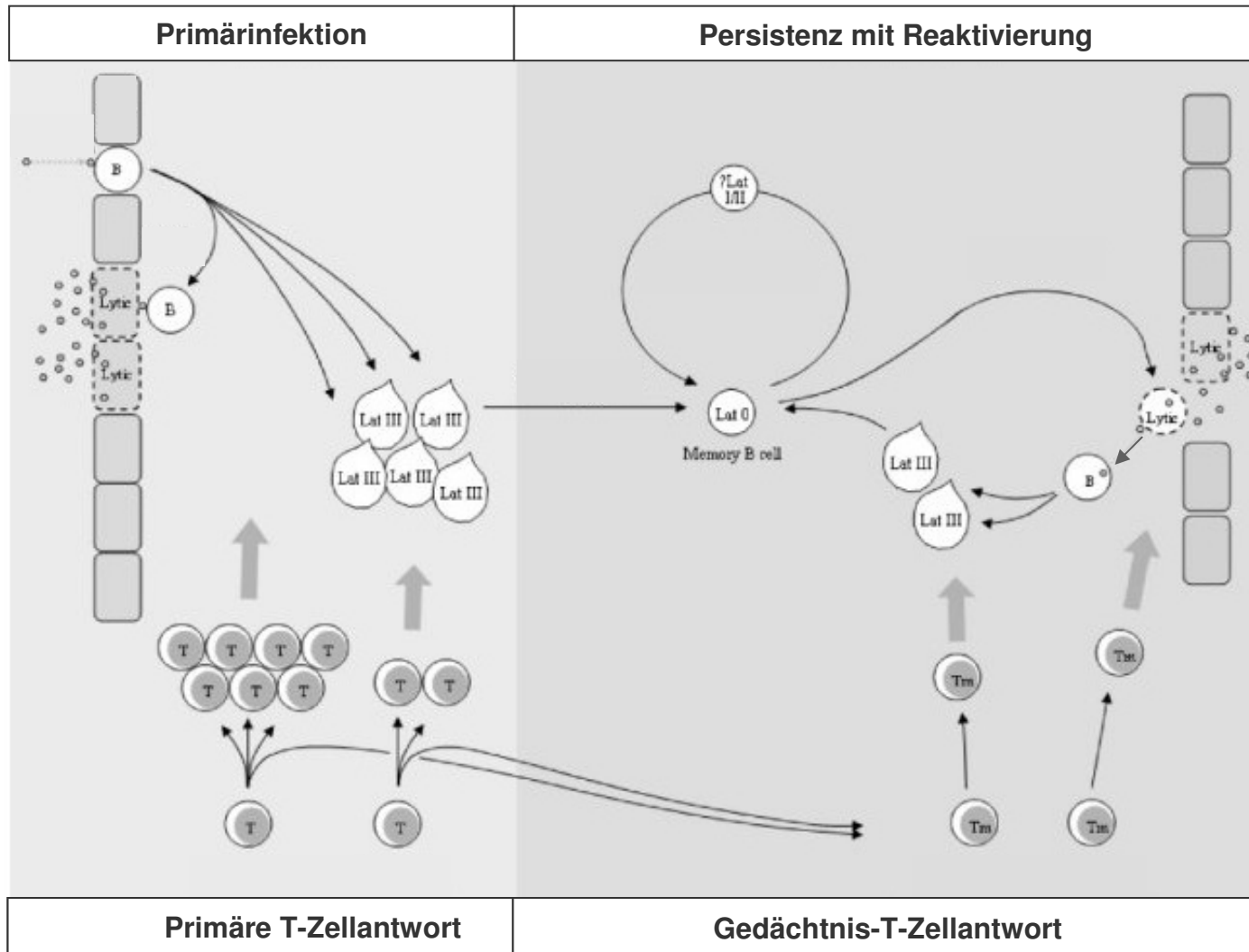


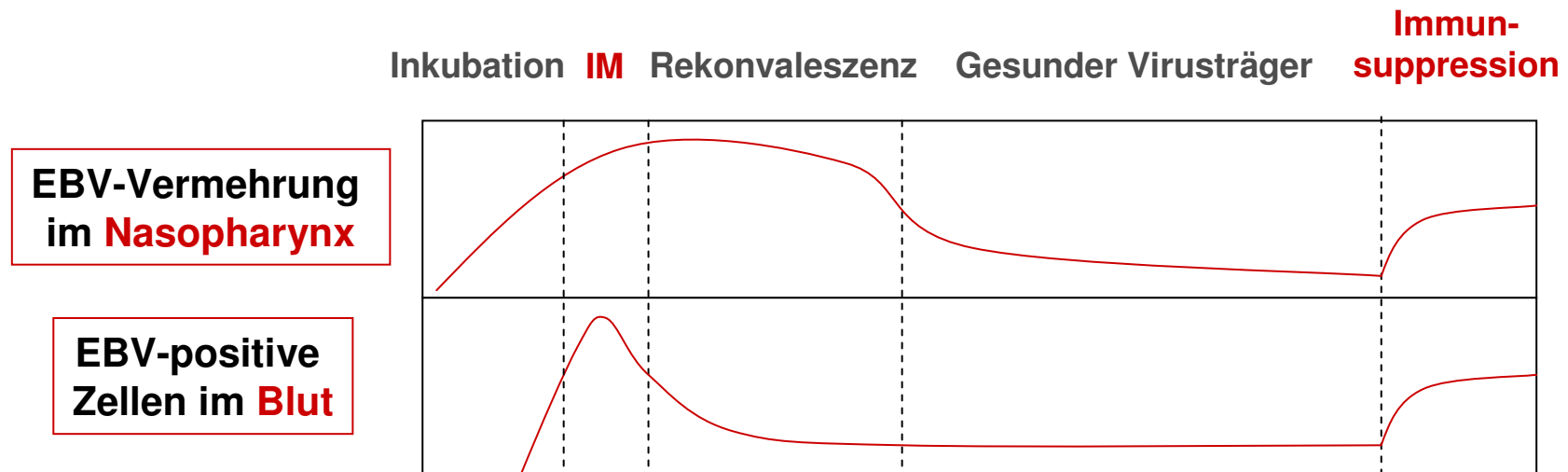
Abb. mit freundlicher Genehmigung von HJ Delecluse, modifiziert

T-Zellkontrolle der EBV-Infektion



Quelle: Field's Virology 2007, modifiziert

Viruslast im Verlauf der EBV-Infektion



Quelle: Field's Virology 2013, modifiziert

Polymerase chain reaction (PCR)

- **ml** Vollblut, Plasma, Rachenspülwasser, Liquor
- **10⁵** PBMC
- [**µg** DNA]

EBV-Zielgene

- **> 25 Assays**
- *BALF-5 Gen, BamHI-W, EBNA1 Gen, LMP1, LMP2, BZLF1, EBER*
- Kalibrierung gegen **WHO-Standard** empfohlen

Cut off

- **Gibt es nicht**
- Hohe EBV-Last ohne PTLD möglich
- PTLD ohne hohe EBV-Last möglich
- Cave: **EBV-Last > 1.000 Geg** pro ml o. 10⁵ PBMC o. µg/DNA

Quelle: Ruf S & Wagner HJ, Expert Rev Clin Immunol 2013

Wahl des Probenmaterials für die EBV-PCR

Erkrankung	Vollblut	Plasma	PPMC	Liquor	Bedeutung	Ref.
<i>Primary infection</i>						
Infectious mononucleosis	--	++	--		Primary infection, reactivation, but not necessary for diagnosis Correlates with disease severity	[22,25] [22,34]
EBV-associated hemophagocytic syndrome		++			Diagnosis Therapeutic response	[33,34] [34-36]
Chronic active EBV infection		++	++		Diagnosis (PBMC) Severity of disease and prognosis	[4] [22,38-40]
<i>Immunocompetent patients</i>						
Nasopharyngeal carcinoma		++			Response to therapy Prognostic factor/overall survival Tumor relapse	[41-46] [41-46] [41-46]
Nasal T/NK lymphoma		++	--		Staging and prognosis Monitoring response and relapse	[41,47,48] [41,49,52]
Hodgkin's lymphoma		++			Therapeutic response and prognosis	[41,47,54-58]
B-non-Hodgkin's lymphoma	+	+	+		Diagnosis, prognosis and follow-up	[59-61]
<i>Immunodeficient patients</i>						
Transplant recipients and PTLT	++	+/-	+		Guidance of immunosuppressive therapy Prediction/indication of PTLT PTLD response to therapy Monitoring of EBV-reactivation Prevention of GvHD Prevention of transplant rejection	[73-75,135,136] [8,25,79,94-96,98,133,137-139] [8,76,81,85,86,138] [77,79,98,134,136,139] [73,76,77]
AIDS-related lymphoma		+/-	+/-		Role of EBV-load measurement unclear Maybe therapeutic response and prognosis Progression to systemic B-lymphoma	[111-115] [111,113,114] [112]
AIDS-related primary CNS lymphoma		--	--	++	Diagnosis	[116-120]
X-linked lymphoproliferative disease	++	++			Monitoring for EBV primary infection, HLH or PTLT at least every 6 months	[125]

Quelle: Ruf S, Wagner HJ: Expert Rev Clin Immunol 2013

Routinelabor zur Erfassung von Risiken & Komplikationen

- **Diff. BB**

Absolute Neutrophilenzahl < 1.000/ μ l
Lymphozyten > 25.000/ μ l,
Lymphozyten < 2000/ μ l (Normwerte!)

Superinfektion

Lymphoproliferative Erkrankung (LPD)

Primäre Immundefekte (PID)

- **Thrombozyten**

Schwer (< 20.000/ μ l)
Mild bei 25-50% der Patienten

Immunthrombozytopenie (ITP)

Hämophagozytische Lymphohistiozytose (HLH)

- **Hb, Reti's**

**Autoimmunhämolytische Anämie (AIHA),
Aplastische Anämie (AA), HLH**

↑ **LDH (95 %)**

AIHA, Hepatitis

↑ **Transaminasen (80-100%), γ GT, Bili**

Hepatitis

↑ **Ferritin**

HLH

↑ **Triglyceride**

HLH

↓ **Fibrinogen**

HLH

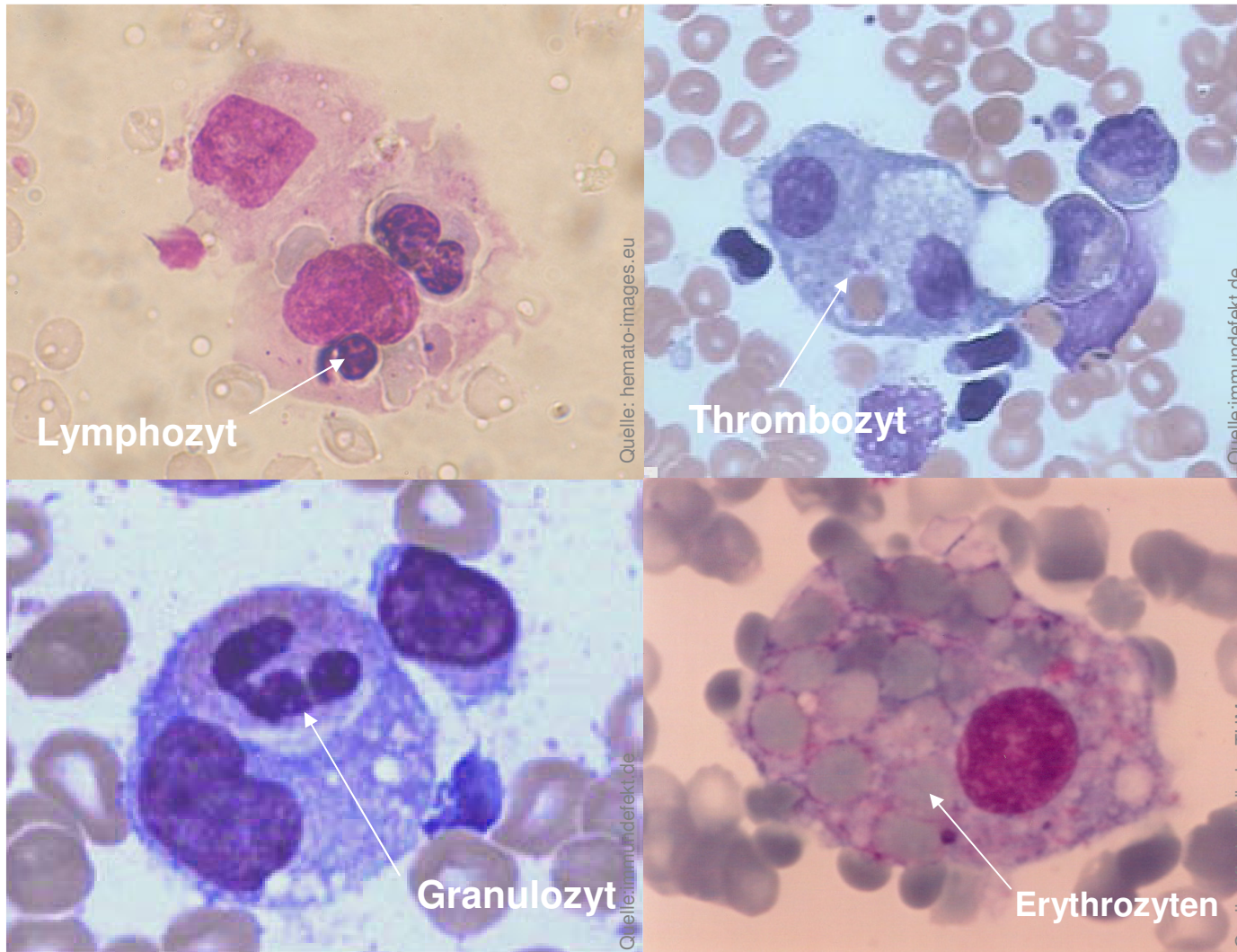
EBV-assoziierte Hämophagozytische Lymphohistiozytose (EBV-HLH)

≥ 5/8 Kriterien

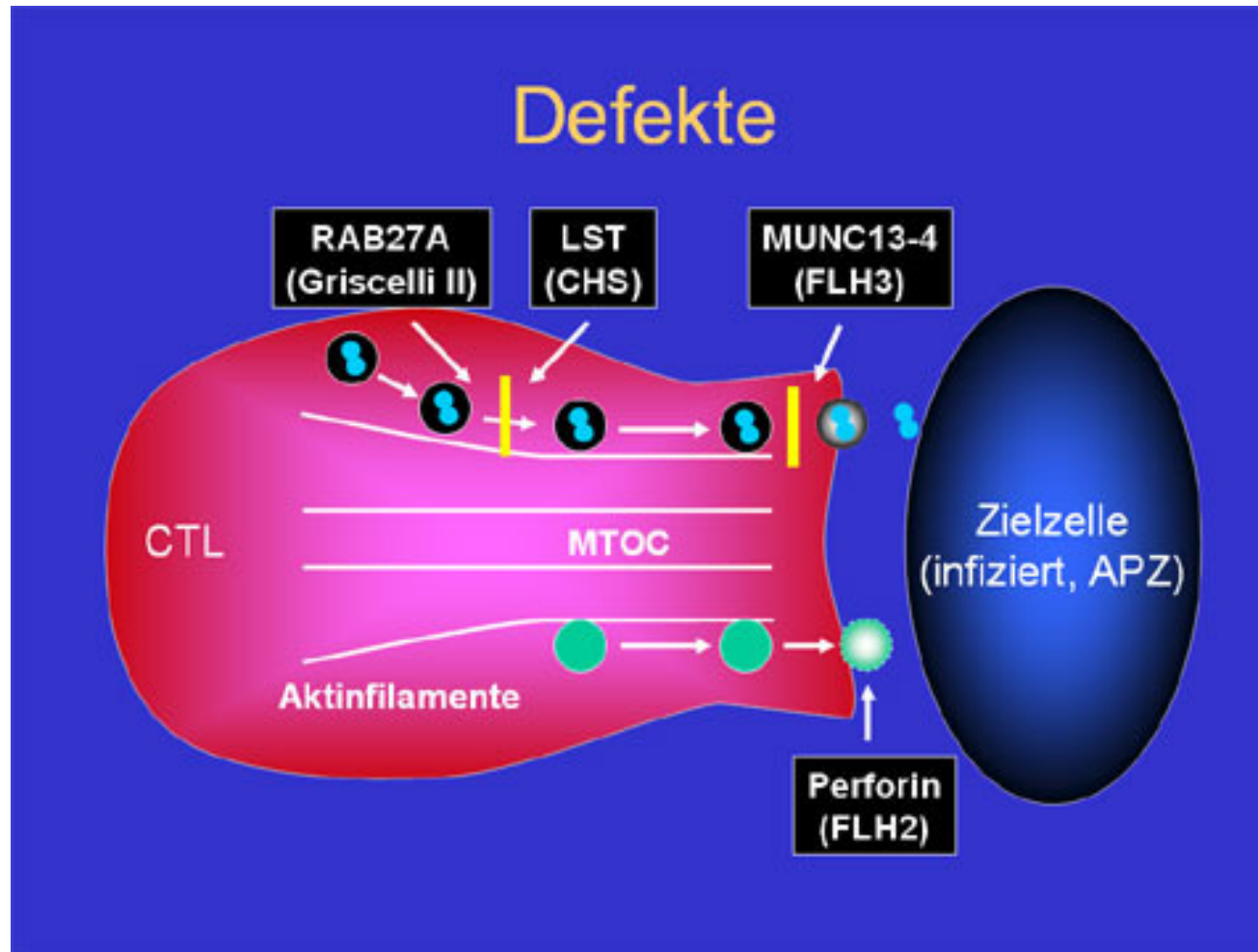
1. Fieber
2. Splenomegalie
3. Zytopenie ≥ 2/3 Zelllinien
(Hb < 9 g/dl, Thrombo < 100 G/l, ANC < 1000/μl)
4. Hypertriglyceridämie und/oder Hypofibrinogenämie
5. Ferritin > 500 ng/ml
6. Erniedrigte NK-Zell Zytotoxizität
7. CD25 > 2400 U/ml
8. Nachweis einer Hämophagozytose in KM, Milz, LK oder Liquor

Quelle: Histiocyte Society

Hämophagozytose im Knochenmark



Störung der „immunologischen Synapse“ bei EBV-HLH



Quelle: Immundefektzentrum der Charite, Berlin

Procedere bei Verdacht auf EBV-HLH

- **Videofallkonferenz** der HLH-Studiengruppe der GPOH
- Ggf. **Molekulargenetik**
- GGf. Therapie nach **HLH-Protokoll** der Histiocyte Society



http://www.kinderkrebsinfo.de/fachinformationen/studien_portal_der_gpoh/pohkinderkrebsinfotherapiestudien/hlh_2004/index_ger.html

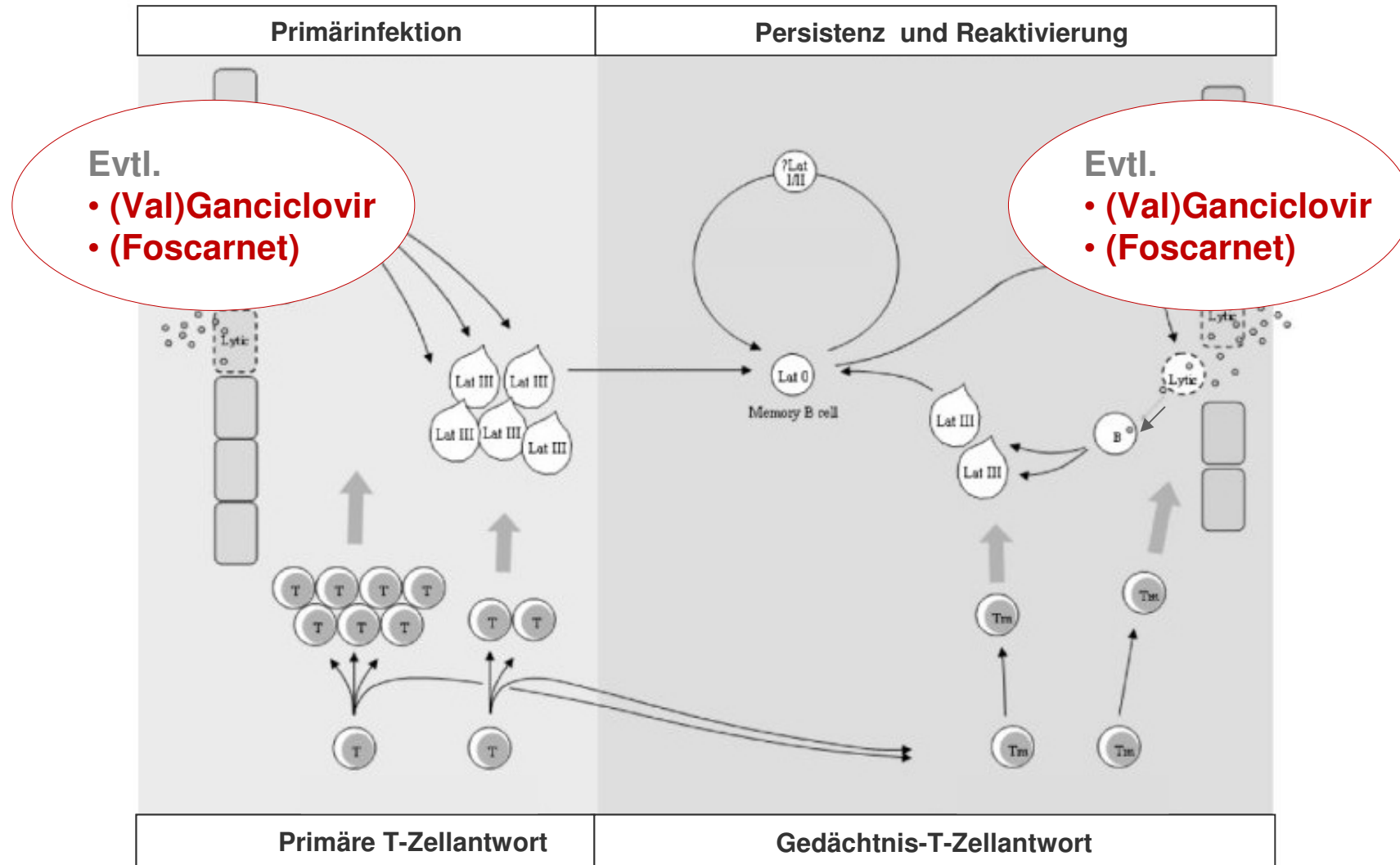
Erweiterte Diagnostik bei fulminanter EBV-Infektion / LPD

- **Lymphozytensubpopulationen** (einschl. iNKT-Zellen)
 - **Molekulare Defekte** (z.B. SAP, XIAP, ITK, CD27, MAGT1)
- Labors des **CCI Freiburg** und der **IKT Ulm**

Anmerkung

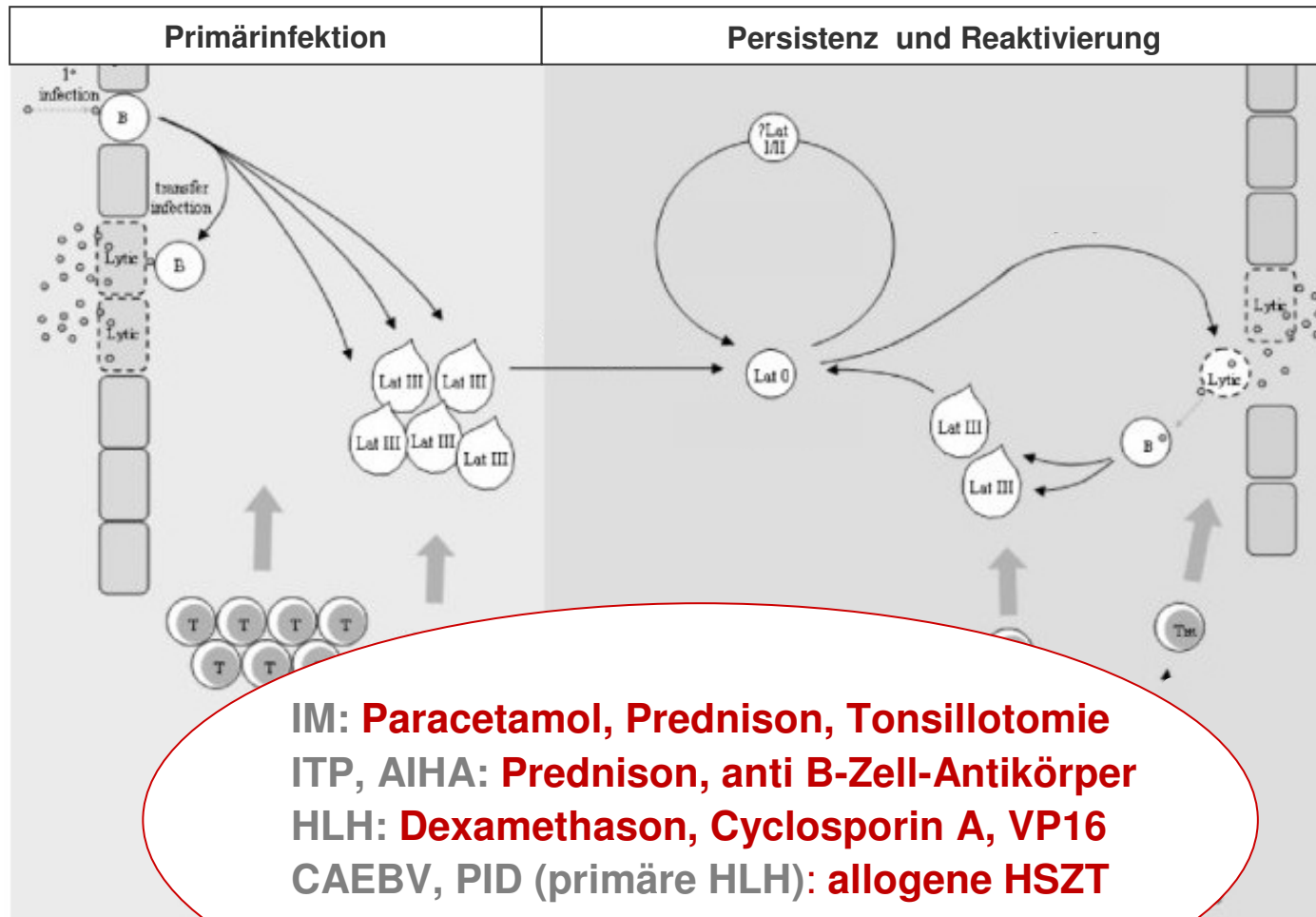
- **Patienten mit XLA (Bruton's Disease) sind **resistent** gegenüber EBV, weil reife B-Zellen fehlen**

Virustatische Prophylaxe und Therapie bei hoher Viruslast

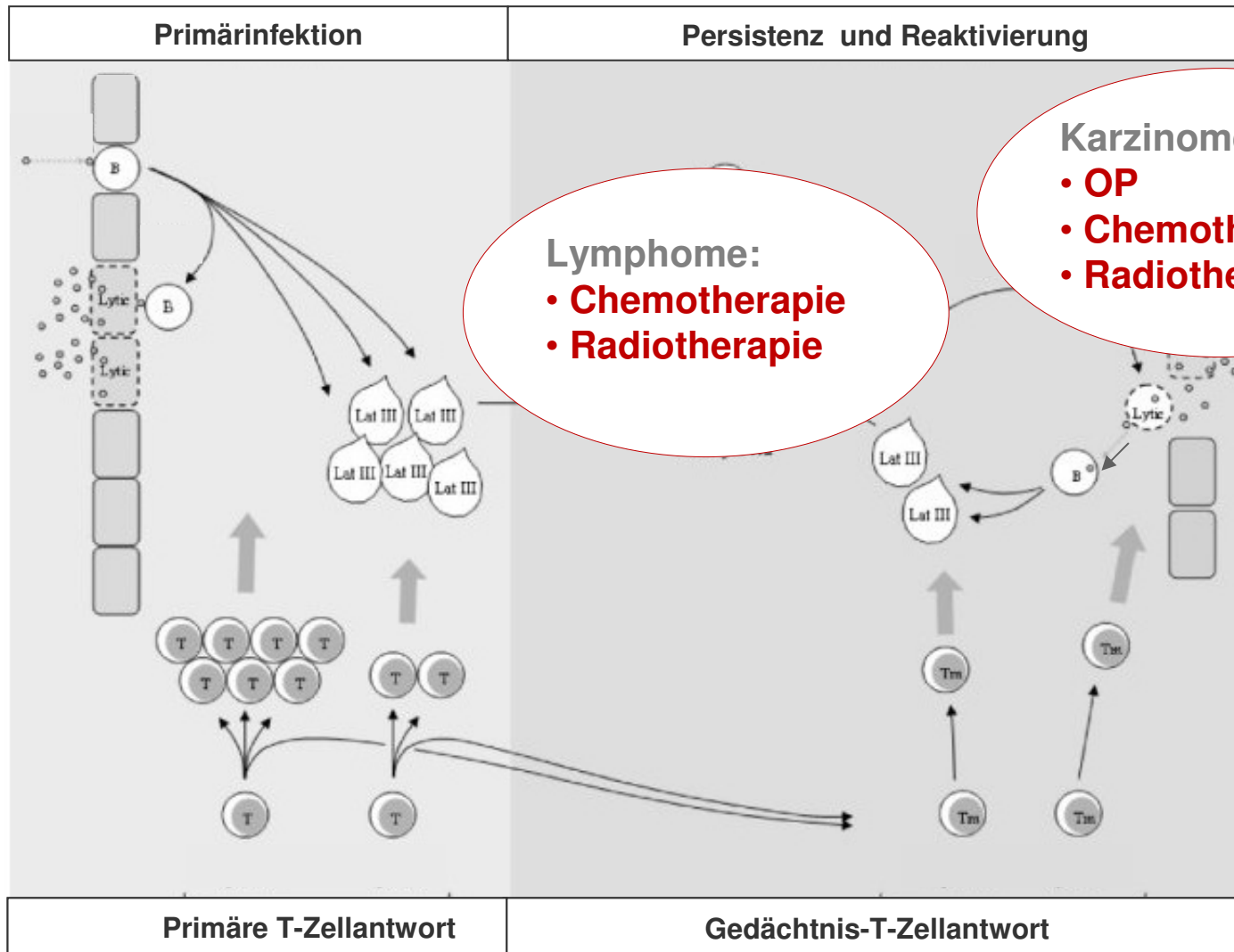


Field's Virology, 2007, modifiziert

Therapieoptionen bei EBV-assoziiierter Immundysregulation



Konventionelle Therapie EBV-assoziierter Malignome



Lymphome:

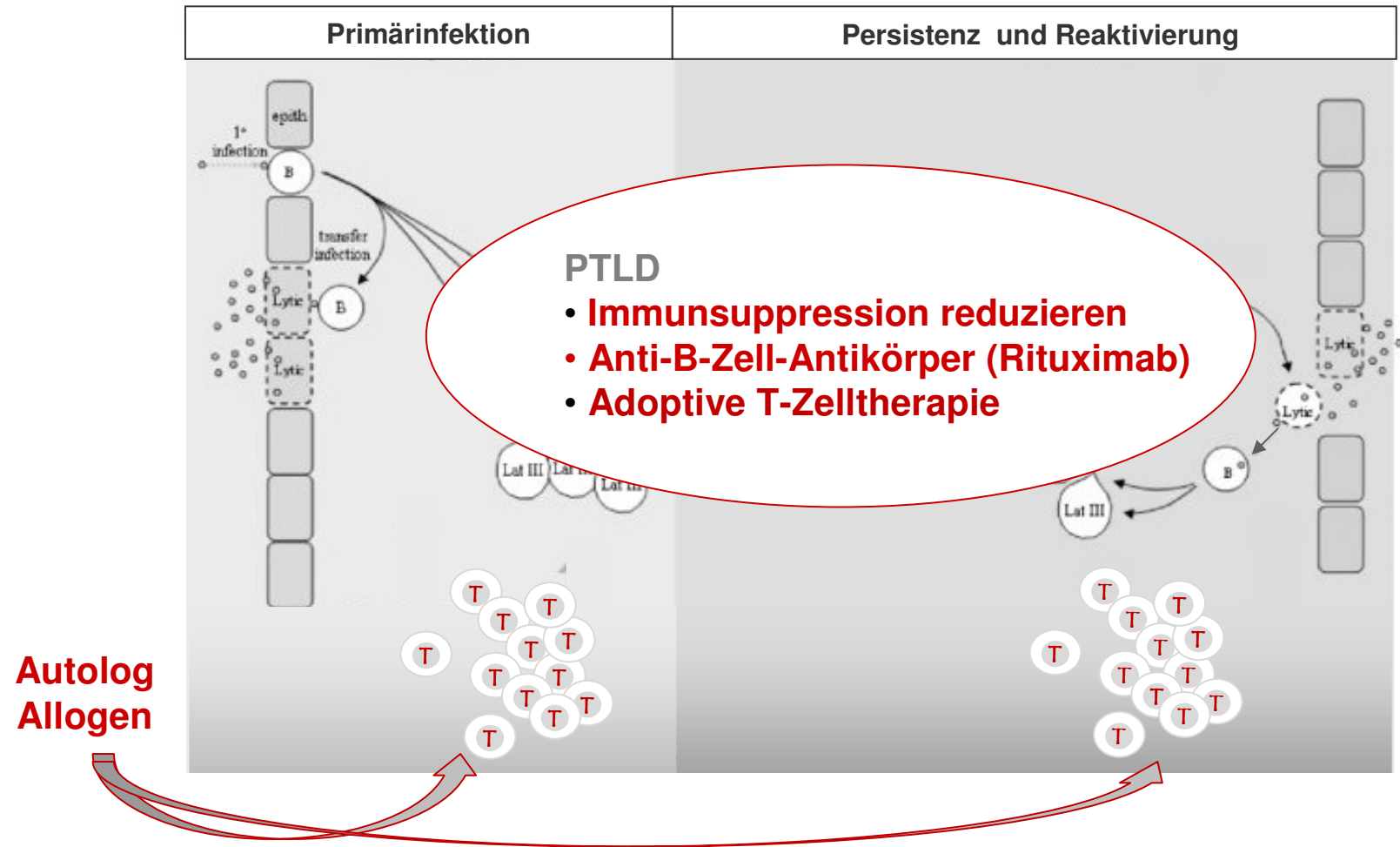
- **Chemotherapie**
- **Radiotherapie**

Karzinome:

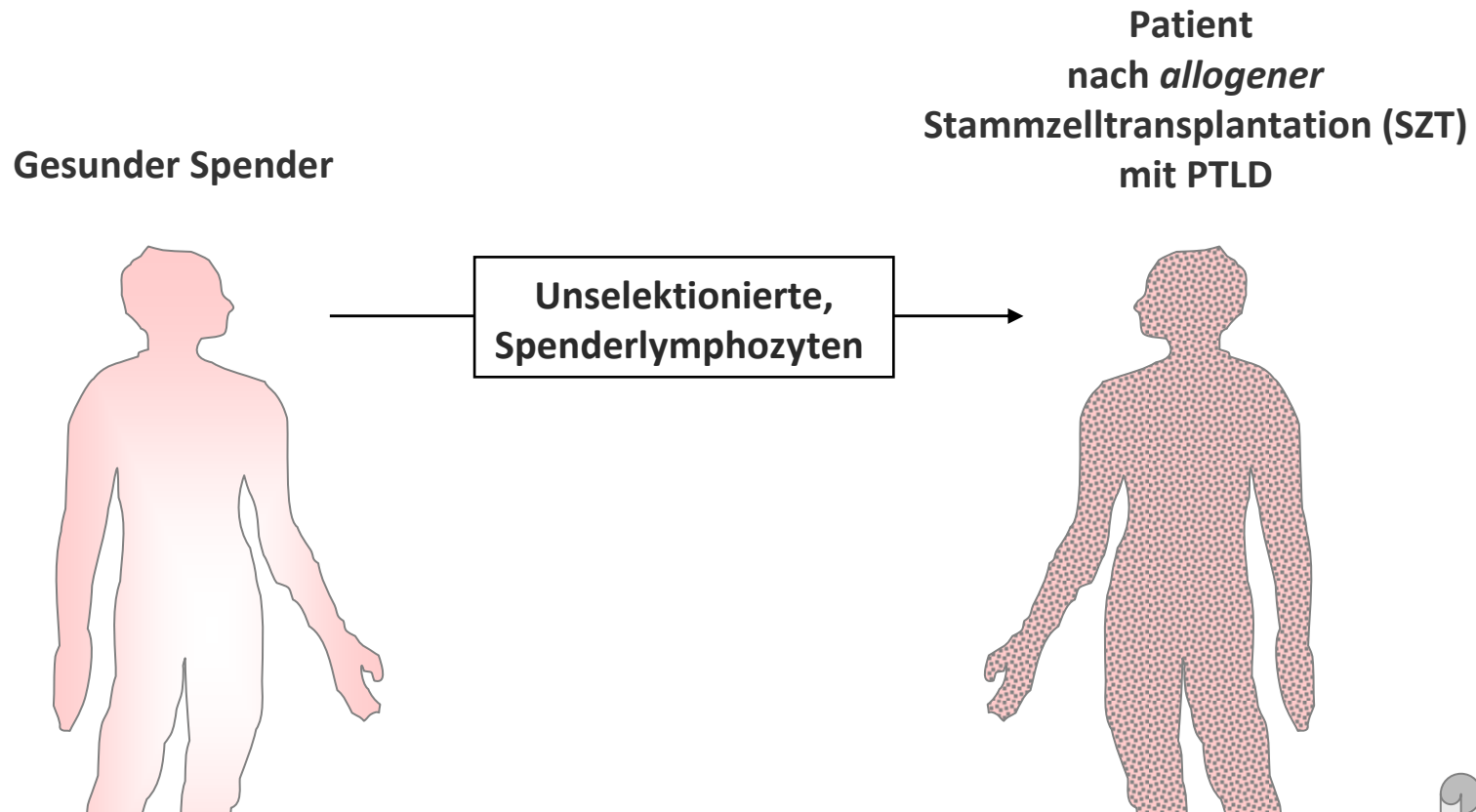
- **OP**
- **Chemotherapie**
- **Radiotherapie**

Field's Virology, 2007

Therapie der EBV-assoziierten PTLD

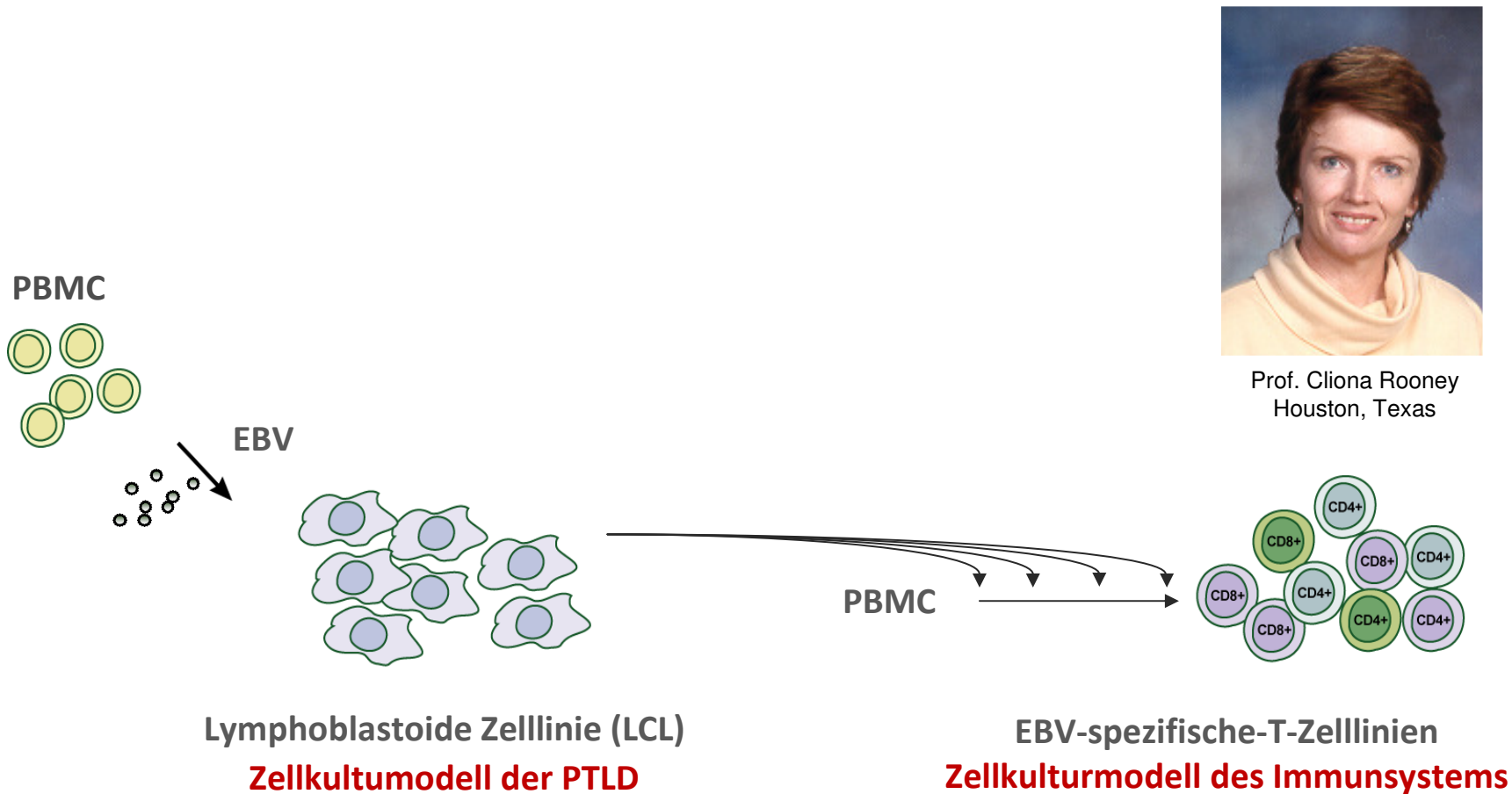


Donorlymphozytentransfusion (DLI)



Hohes Risiko einer Spender-gegen-Empfänger-Reaktion (GvHD)

LCL-basierte T-Zellexpansion



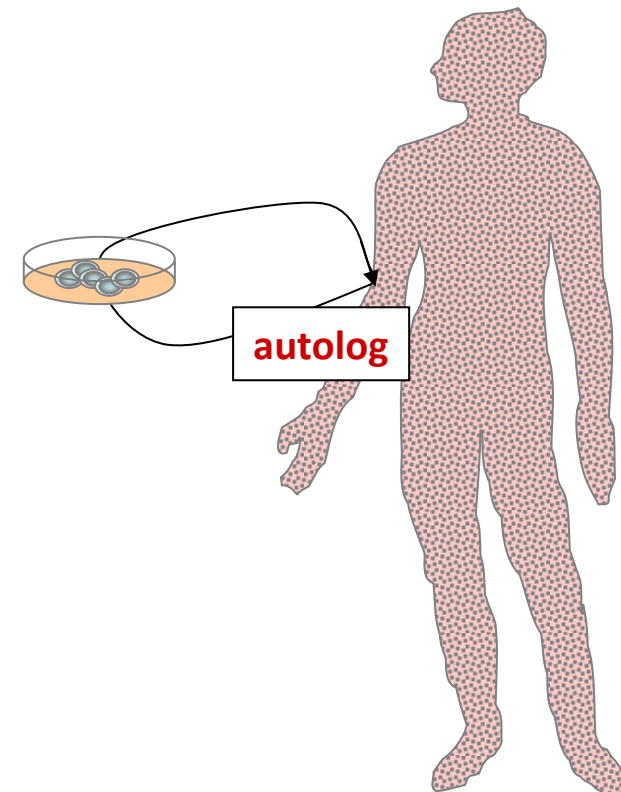
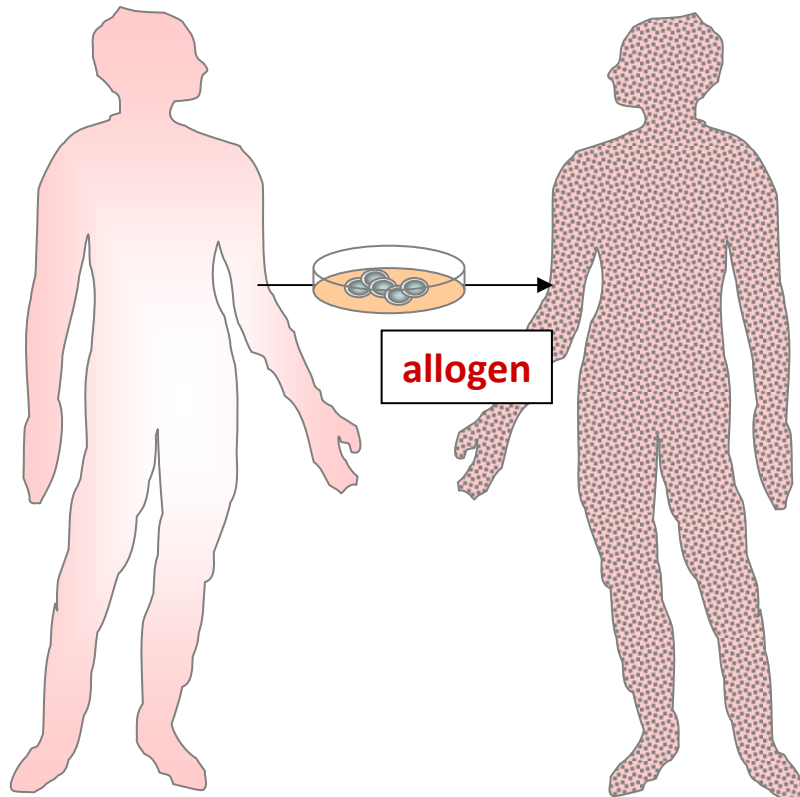
Prof. Cliona Rooney
Houston, Texas

LCL-basierte T-Zelltherapie

Gesunder Spender

Patient mit
PTLD nach
allogener SZT

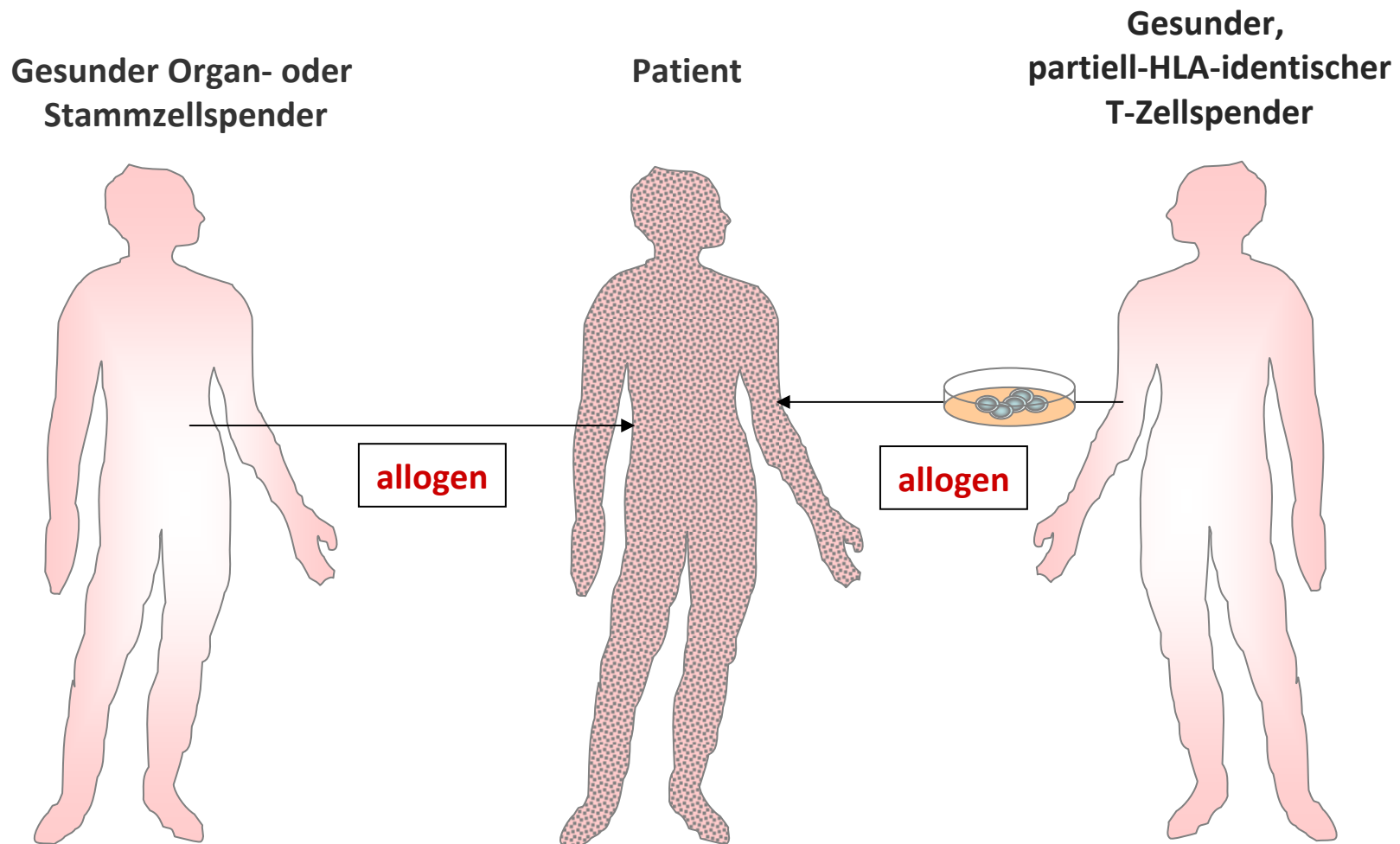
Patient mit
PTLD nach Organtransplantation
oder mit **EBV-assoz. NPC, HL**



Rooney CM et al., Lancet 1995 (**PTLD-HSCT, Therapie**)
Rooney CM et al., Blood, 1998 (**PTLD-HSCT, Prophylaxe**)

Savoldo B et al., Blood 2006 (**PTLD-SOT, Therapie**)
Comoli P et al., Blood 2002 (**PTLD-SOT, Prophylaxe**)
Bollard CM et al., JEM 2004 (**Hodkin-Lymphom**)
Comoli P et al., Ann Oncol 2004 (**Nasopharynxkarzinom**)

T-Zelltherapie von partiell HLA-identischem „Third Party Donor“



Haque T et al., Transplantation 1995 (PTLD-SOT, Therapie)
Haque T et al., Lancet 2002 (PTLD-SOT, Therapie - Donor-Bank)
Haque T et al., Blood 2007 (PTLD-SOT, Therapie - Phase 2-Studie)

EBV-spezifische T-Zelltherapie aus einer T-Zellbank

frontiers in
IMMUNOLOGY

REVIEW ARTICLE
published: 28 January 2013
doi: 10.3389/fimmu.2012.00410



Adoptive T-cell immunotherapy from third-party donors: characterization of donors and set up of a T-cell donor registry

Britta Eiz-Vesper^{1*}, Britta Maecker-Kohlhoff² and Rainer Blasczyk¹

¹ Institute for Transfusion Medicine, Hannover Medical School, Hannover, Germany

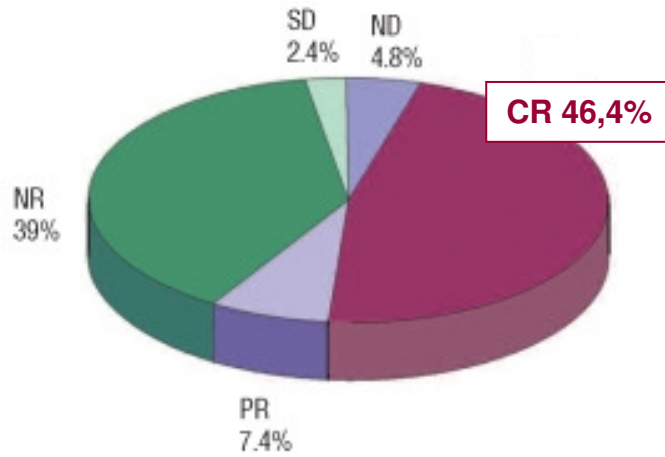
² Department of Pediatric Hematology and Oncology, Hannover Medical School, Hannover, Germany



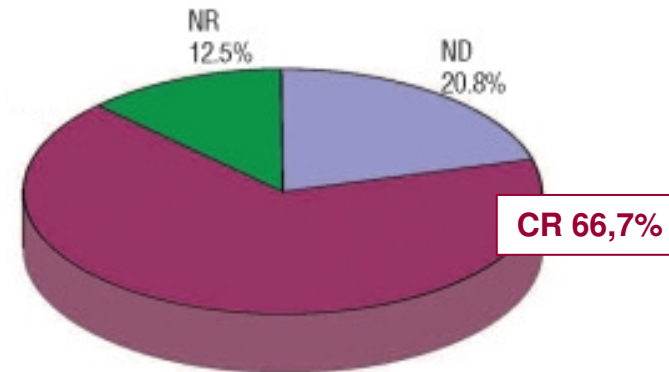
PD Dr. Britta Maecker-Kohlhoff, MHH Hannover

Heilungsraten mit EBV-spezifischem T-Zelltransfer

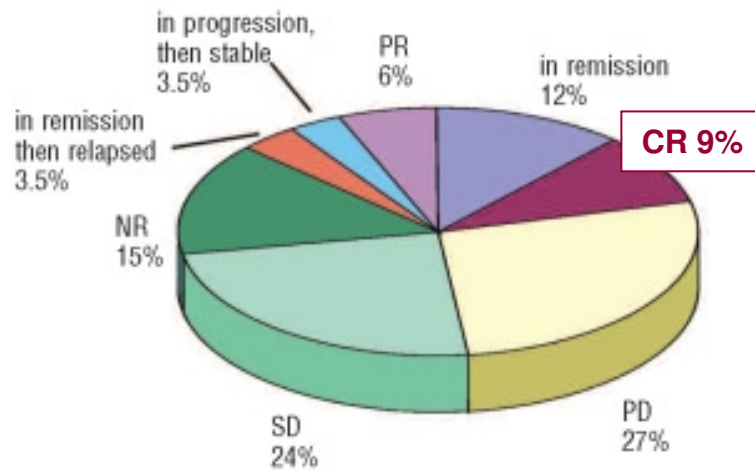
PTLD-SOT



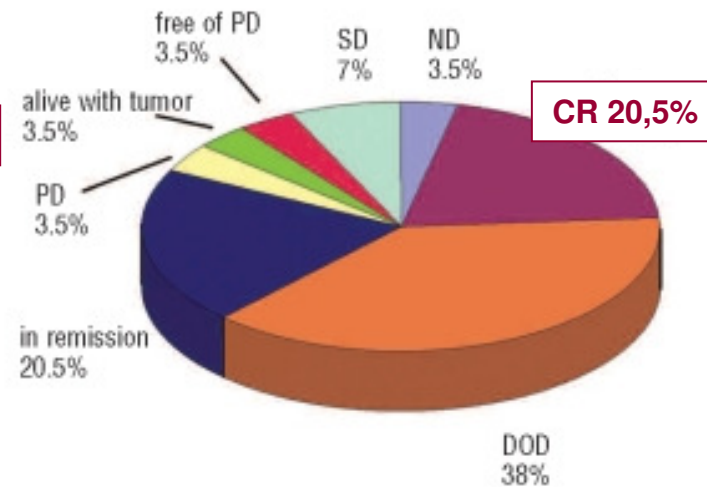
PTLD-HSCT



Nasopharynxkarzinom

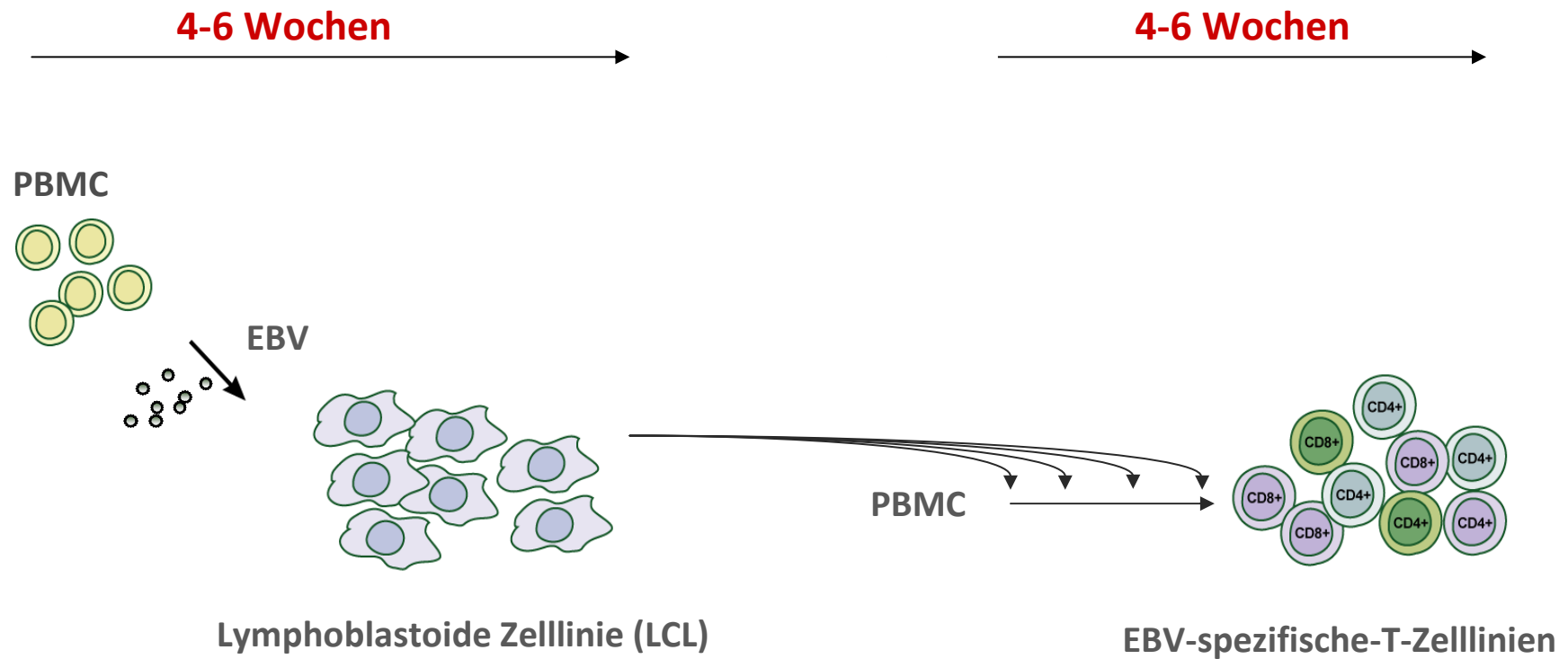


Hodgkin-Lymphom

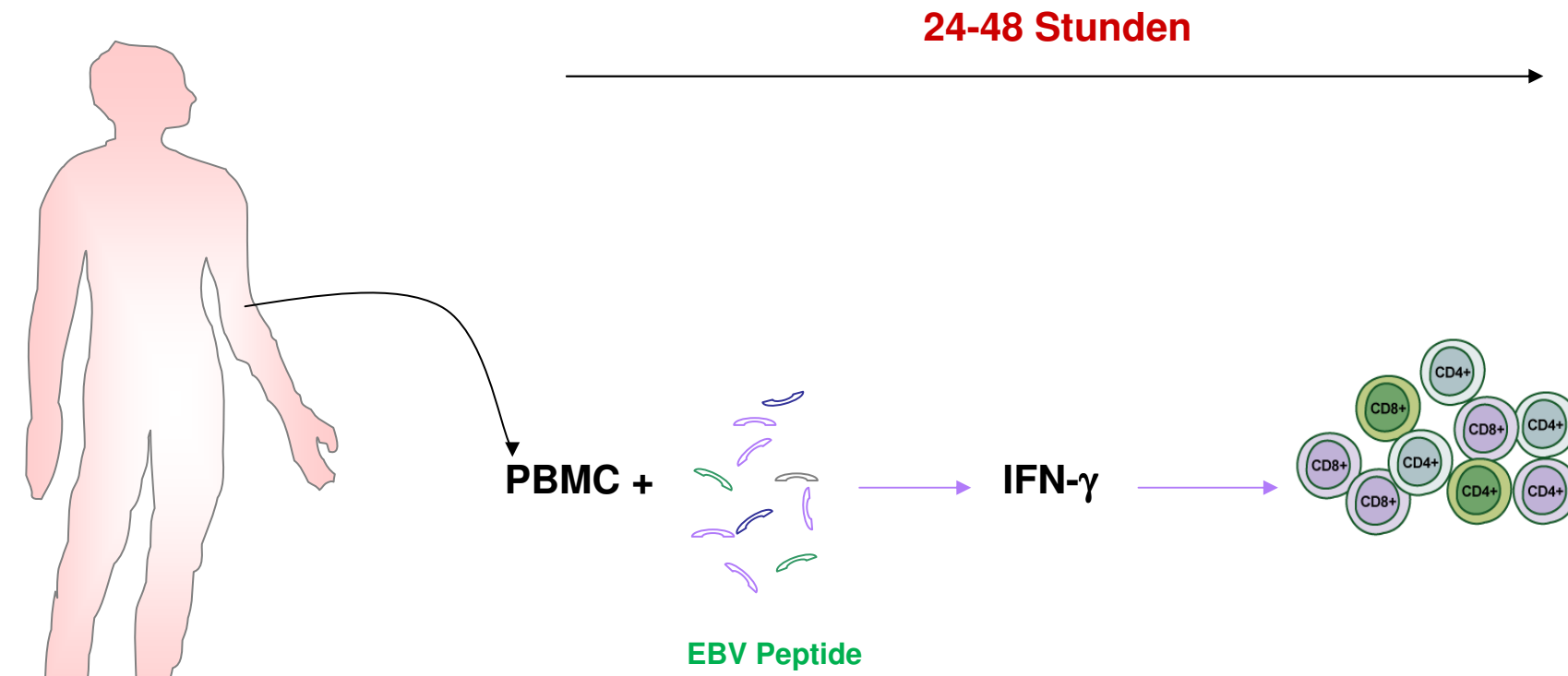


Merlo A, Int J Hematol 2011

Langwieriger Herstellungsprozess



Isolation und Kurzzeitstimulation EBV-spezifischer T-Zellen



Dr. Andreas Moosmann
München

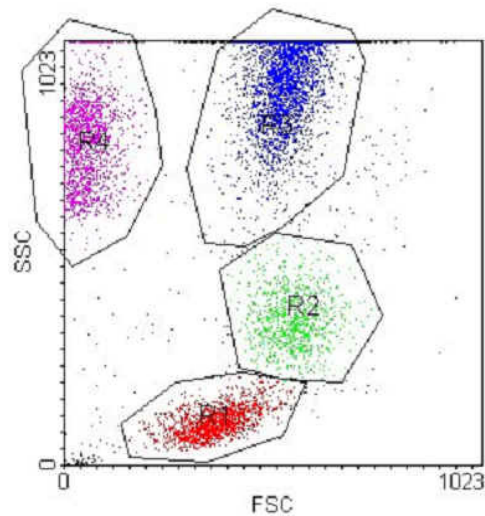
Moosmann A et al., Blood 2010; Icheva V et al., JCO 2013



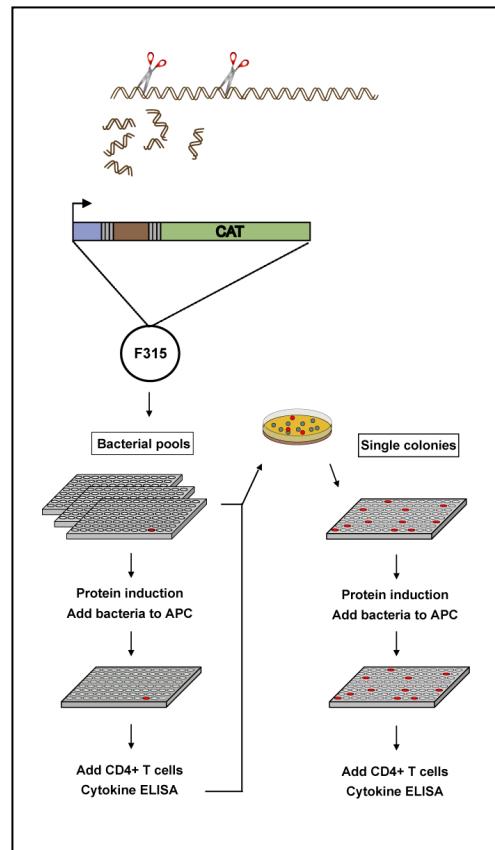
PD Dr. Tobias Feuchtinger
Tübingen

Detaillierte Analyse der Immunantwort

Multiparametrische FACS-Analysen



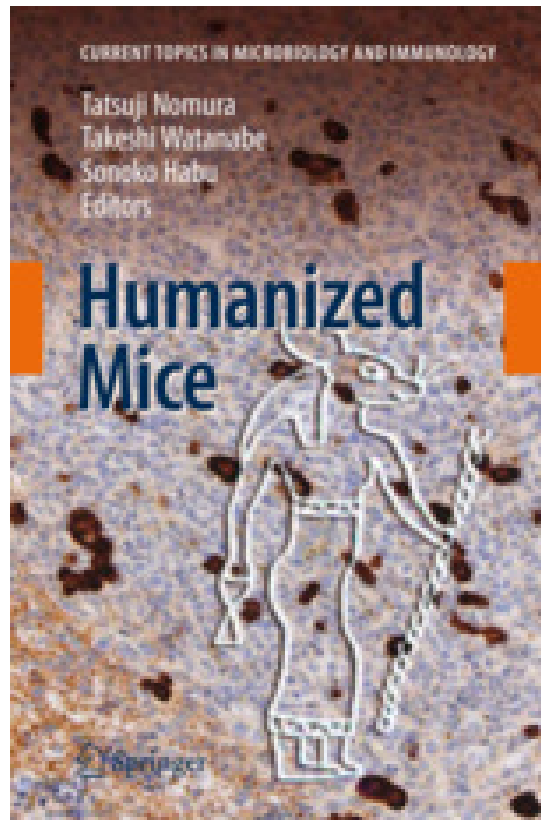
Identifikation von EBV Epitopen



**Neue Zielstrukturen
für Diagnostik,
Prophylaxe
und Therapie**

Milosevic S et al., Eur J Immunol 2004 und J Immunol Methods 2005

Tiermodelle



Verbessertes pathogenetisches Verständnis

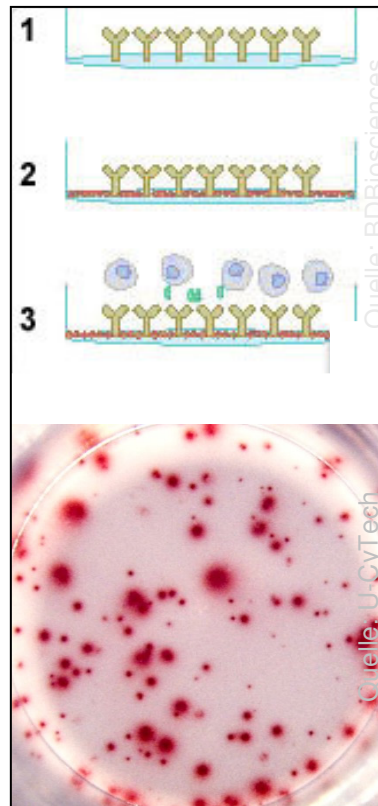
- **Ablauf der Primärinfektion**
- **Rolle einzelner T-Zellpopulationen**
- **Rolle von NK-Zellen**
- **Vergleich verschiedener EBV-Stämme**

Hochdurchsatzverfahren für die EBV-Diagnostik

Multiplex Serology



ELISPOT Assay



- Risikomarker
- Verlaufsmarker
- Zielstrukturen für Therapie/Prophylaxe

„Biomarker der protrahierten und/oder komplizierten Infektiösen Mononukleose“

**Münchener Praxen
Münchener Kliniken
Münchener Medizinstudenten**

**Technische Universität München (TUM)
Ludwig Maximilians Universität München (LMU)
Helmholtz Zentrum München (HMGU)**

**Deutsches Zentrum für Infektionsforschung (DZIF)
Deutsches Zentrum für Krebsforschung (DKFZ)**

**Medizinische Hochschule Hannover (MHH)
Eberhard Karls Universität Tübingen (EKU)**

EBV-assoziierte LPD bei nicht immunsupprimierten Kindern



- 1) Inzidenz ?
- 2) Art der Erkrankung/Histologie ?
- 3) Hinweise auf genetische Grundlage ?
- 4) Auffällige immunologische Befunde ?
- 5) Bei Jungen: SH2D1A- oder XIAP-Mutation?
- 6) Hämophagozytose im Knochenmark ?

www.esped.uni-duesseldorf.de

EBV Sprechstunde , Konsil- und Beratungsdienste



Technische Universität München
Kinderklinik Schwabing
Immunologie & Infektiologie
Hämatologie & Onkologie



Helmholtz Zentrum München
Klinische Kooperationsgruppe
Pädiatrische Tumormunologie
& Arbeitsgruppe Genvektoren



Deutsches
Krebsforschungszentrum
Krebsinformationsdienst

uta.behrends@lrz.tum.de
termine.kinderpoliklinik@lrz.tum.de
Kinderpoliklinik Tel. 089 / 3068 2632 o. 3415

Hinweise auf eine Rolle des EBV bei Autoimmunerkrankungen

Multiple Sklerose (MS)
Rheumatoide Arthritis (RA)
Systemischer Lupus erythematoses (SLE)

	SLE	RA	MS
Erhöhte EBV Seroprävalenz	+	-	+
Erhöhte anti-EBV IgG-Serumtiter	+	+	+
Anstieg der EBV-IgG-Titer vor Symptomatik	+	-	+
Assoziation mit IM	-	-	+
Aberrante systemische T-Zellantwort	+	+	+
Vermehrte lokale T-Zellantwort	n.a.	+	+
Erhöhte Viruslast im Blut	+	+	+/-
EBV-Nachweis im kranken Organ	n.a.	+/-	+/-

Quelle: Lossius A et al., Viruses 2012