

Infecția cu virus Epstein-Barr la copil

Doctorand **Simona Sorana Căinap**

Conducător de doctorat **Prof Dr. Nicolae Miu**

Cluj-Napoca 2012

CUPRINS

ABREVIERI	11
INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	15
1. Virusul Epstein-Barr	17
1.1. Istoricul virusului Epstein-Barr	17
1.2. Epidemiologia infecției cu virusul Epstein-Barr	17
1.3. Taxonomie. Structură. Biologie moleculară	18
1.4. Istoria naturală a infecției cu virusul Epstein-Barr	18
1.4.1. Ciclul litic (infecția activă).....	18
1.4.2. Infecția latentă	19
1.5. Răspunsul imun	21
1.5.1 Răspunsul imun celular	21
1.5.2 Răspunsul imun umoral	22
2. Bolile asociate infecției cu virusul Epstein-Barr	22
2.1. Mononucleoza infecțioasă	23
2.2. Infecția cronică activă cu EBV (CAEBV)	24
2.3. EBV și patologia hepatică	25
2.4. EBV și bolile autoimune asociate	26
2.5. Limfocitocitoza hemofagocitică asociată EBV	27
2.6. EBV și malignitățile asociate	29
3. Diagnosticul infecției cu virusul Epstein-Barr	32
3.1. Markerii serologici	32
3.2. Detectarea ADN-ului EBV în ser.....	34
3.3. Detectarea ADN-ului EBV în țesuturi	34
4. Tratamentul infecției cu virusul Epstein-Barr	35
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	37
1. Ipoteza de lucru/obiective	39
2. Metodologie generală	41
3. Studiul 1. Caracteristicile clinice, biologice și evolutive ale infecției cu virusul Epstein-Barr la copii	43
3.1. Introducere	43
3.2. Ipoteza de lucru. Obiective.....	43
3.3. Material și metodă	44
3.4. Rezultate.....	44

3.5. Discuții.....	53
3.6. Concluzii	56
4. Studiul 2. Influența virusului Epstein-Barr în evoluția neoplaziei la copii – studiu pilot	57
4.1. Introducere	57
4.2. Ipoteza de lucru. Obiective.....	57
4.3. Material și metodă	58
4.4. Rezultate.....	59
4.5. Discuții.....	63
4.6. Concluzii	64
5. Studiul 3. Virusul Epstein-Barr – factor de prognostic independent în neoplaziile pediatrice	65
5.1. Introducere	65
5.2. Ipoteza de lucru. Obiective.....	65
5.3. Material și metodă	66
5.4. Rezultate.....	67
5.5. Discuții.....	91
5.6. Concluzii	95
6. Studiul 4. EBER – factor de prognostic în neoplaziile pediatrice.....	97
6.1. Introducere	97
6.2. Ipoteza de lucru. Obiective.....	97
6.3. Material și metodă	98
6.4. Rezultate.....	99
6.5. Discuții	103
6.6. Concluzii	105
7. Concluzii generale	107
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	109
REFERINȚE.....	111

Cuvinte cheie: virusul Epstein-Barr, neoplazii, copil.

INTRODUCERE

EBV este unul din cei mai vechi, mai cunoscuți și de succes viruși, evoluția sa fiind strâns legată de cea a speciei umane. După aproape 50 ani de la descoperirea sa, EBV continuă să fascineze lumea cercetătorilor, prin complexitatea mecanismelor sale patogenetice și spectrul tot mai larg de boli în care este implicat. Datele privind implicarea sa în diverse entități patologice variază în funcție de zona geografică, vârsta și statusul socio-economic al gazdei.

În absența unor date epidemiologice privind infecția cu EBV la populația din România, în prima parte a sa cercetarea și-a propus *definirea principalelor caracteristici clinice, biologice și evolutive ale acestei infecții*, la populația pediatrică dintr-o zonă geografică extinsă, nord-vestul Transilvaniei, care se adresează unui centru important de pediatrie din România.

Principala caracteristică a virusului EBV este capacitatea lui de a stabili o infecție latentă în organismul gazdei, care persistă toată viața. Proteinele virale exprimate în perioada de latență sunt cele responsabile de stimularea mecanismelor antiapoptotice, creșterea proliferării celulare pentru a menține rezervorul infecțios și evadarea de sub supravegherea imună. Izolat inițial în liniile celulare limfocitare B, cercetările ulterioare au identificat noi ținte ale EBV: limfocitele T, NK, celulele epiteliale, celulele musculare. Astfel, abilitatea EBV de a infecta diferite tipuri de celule, coroborată cu capacitatea lui de a eluda sistemul imun și de a immortaliza limfocitele B, constituie explicația, cea mai probabilă, pentru asocierea lui cu un spectru tot mai larg de boli: de la clasică mononucleoză, la boli autoimune și malignități.

Dacă rolul său etiologic în mecanismul multifactorial al cancerului este bine dovedit, studiile publicate privind rolul EBV în outcome-ul neoplaziilor sunt puține și cu rezultate controversate. În plus, studiile efectuate la copii au rezultate extrem de diferite față de cele publicate la populațiile adulte.

Acestea au fost premisele care au stat la baza inițierii unui studiu privind rolul infecției cu EBV în evoluția neoplaziei la copii. Au fost selectați pacienți cu neoplazie confirmată histopatologic (limfoame Hodgkin și non-Hodgkin, carcinoame nazofaringiene), la care a fost demonstrată serologic și prezența EBV. În analiza statistică s-a identificat o valoare cut-off pentru titrul IgG anti VCA (markerul imunologic al infecției virale cu sensibilitatea cea mai mare), față de care s-au putut identifica legături semnificative statistic cu factorii de prognostic clasici din neoplaziile prezentate de către pacienții incluși în studii.

Dacă prin anticorpii serologici anti EBV este confirmată prezența infecției în antecedente, identificarea EBER în țesutul tumoral certifică rolul etiologic al virusului în neoplazia subjacentă. *Determinarea EBER în celulele tumorale ale neoplaziilor studiate, prin hibridizare in situ, a fost pentru prima dată utilizată în România, tehnica fiind pusă la punct de doctorul Bogdan Fetică de la Institutul Oncologic Cluj.* Demonstrarea prezenței EBER în celulele tumorale certifică rolul etiologic al EBV în mecanismul complex al cancerogenezei.

Evidențierea influenței prognostice a EBV în evoluția limfoamelor la copii deschide calea spre noi cercetări privind rolul terapiei țintite la această grupă de neoplazii, terapie menită să îmbunătățească supraviețuirea.

Prin urmare, rezultatele cercetării noastre vin să susțină, prin dovezi clinice, ideea lansată de cercetători conform căreia limfomul EBV al copilului este o entitate clinică aparte, care trebuie abordată special din punct de vedere terapeutic. Astfel, se deschid perspectivele cercetării în vederea identificării unei terapii țintite, asociate tratamentului clasic, în acest tip de neoplazii la copii.

EBV rămâne un virus "clasic", cercetat extensiv și care ne demonstrează încă o dată că ne poate surprinde cu noi și noi aspecte, care îi garantează menținerea în lumina reflectoarelor științifice.

Studiul 1. Caracteristicile clinice, biologice și evolutive ale infecției cu virusul Epstein-Barr la copii

Introducere

Infecția cu EBV face parte din categoria infecțiilor ubiquitare – aproximativ 90% din populație având anticorpi împotriva acestui virus până la vârsta de adult. Seroprevalența infecției cu EBV cunoaște largi variații geografice. În țările cu status economic scăzut se pare că peak-ul infecției este înregistrat în mica copilărie, în timp ce în țările dezvoltate infecția apare cu preponderență la adolescent și adulții tineri.

Apărută în copilărie, infecția cu EBV este cel mai frecvent asimptomatică. Astăzi, spectrul bolilor asociate infecției EBV este tot mai larg, de la boli autoimune, la malignități hematologice și non-hematologice. Abilitatea EBV de a infecta diferite tipuri de celule, coroborată cu statusul imun diferit al indivizilor, constituie explicația cea mai probabilă pentru numărul mare de boli asociate infecției cu EBV.

Ipoteza de lucru. Obiective

Având în vedere larga adresabilitate a pacienților – practic din toată țara – pentru Clinica Pediatrie II, prin acest studiu s-a dorit o radiografiere a incidenței infecției cu EBV, a complicațiilor acesteia și a bolilor asociate la pacienții internați.

Obiectivele studiului au fost :

- Stabilirea caracteristicilor demografice ale pacienților cu EBV
- Evaluarea modului de prezentare clinică
- Caracteristicile serologice ale infecției cu EBV
- Evaluarea parametrilor hematologici și biochimici în cursul infecției cu EBV
- Stabilirea unor corelații între titrurile de anticorpi anti EBV și alți parametri clinici sau de laborator

- Corelații între prezența infecției EBV și bolile asociate sau coinjecțiile virale

Material și metodă

A fost inițiat un studiu prospectiv, consecutiv, fiind incluși pacienții cu infecție certificată cu EBV (la prima internare sau la o internare anterioară în Clinica Pediatrie II). Astfel, au fost incluși 418 pacienți EBV pozitivi, internați între anii 2005-2010.

Criterii de includere:

- Vârsta între 1 lună și 18 ani
- Infecția EBV certificată serologic

- Comorbidități prezente: hepatite, autoimunități, vasculite

Criterii de excludere:

- Date incomplete în dosarul clinic
- Absența Ac pozitivi pentru EBV
- Pacient necompliant

Din dosarele clinice au fost recoltate numeroase date demografice, rezultatele examinărilor de laborator, diagnosticele bolilor asociate etc.

Analiza statistică a fost efectuată cu ajutorul programului Excel Office 2010.

Concluzii

1. Incidența maximă a infecției EBV este la vârsta mică, sub 7 ani, caracteristic țărilor cu status socio-economic scăzut.
2. Din punct de vedere serologic, forma latentă de infecție este cea mai frecventă.
3. 1/3 din pacienți prezintă hepatomegalie, dar 1/2 prezintă creșteri ale valorilor transaminazelor. Dar creșterile transaminazelor sunt ușoare, în majoritatea cazurilor.
4. Asocierea coinfecțiilor virale, cu tropism hepatic, este fără semnificație statistică raportat la nivelul transaminazelor.
5. Asocierea bolilor autoimune este de aproape 9%, mai mare decât în populația generală.
6. Leucocitoza, limfocitoza este semnificativ statistic mai frecventă la cei cu IgM anti EBV pozitiv.

Studiul 2. Influența virusului Epstein-Barr în evoluția neoplaziei la copii – studiu pilot

Introducere

De la prima descriere în 1958, în asociere cu limfomul Burkitt, spectrul neoplaziilor în care este implicat EBV este în continuă extindere. Rezultatele studiilor epidemiologice și moleculare au adus dovezi certe privind implicarea lui în etiopatogeneza a tot mai multe neoplazii: limfomul Hodgkin, limfomul cu celule T, carcinomul nazofaringian, bolile limfoproliferative postransplant, cancerul gastric și, bineînțeles limfomul Burkitt.

Ipoteza de lucru. Obiective

Un prim studiu a fost inițiat având ca obiectiv investigarea rolului infecției cu EBV în evoluția neoplaziilor la copii, având în vedere că există extrem de puține studii publicate pentru populația pediatrică și rezultatele acestora sunt contradictorii. În condițiile de imunosupresie indusă de tumoră sau de tratamentul oncologic poate apare o reactivare a EBV, caracterizată serologic prin titruri mari de anticorpi anti VCA.

Există studii care au pus în evidență faptul că titrurile mari de IgG anti VCA se corelează cu reactivarea virusului, putând fi considerate markeri serologici ai reactivării, direct proporționali cu încărcătura virală. Titrurile mari de anticorpi sunt considerate, în unele studii, factori de prognostic independenți, mai ales pentru limfomul Hodgkin sau limfomul Burkitt.

Având în vedere aceste informații, ne-am propus, în condițiile noastre, evaluarea rolului pe care titrul crescut al Ac anti VCA, ca marker al reactivării sau încărcăturii virale crescute, îl are în evoluția a două dintre cele mai importante tipuri de neoplazii la copil.

Material și metodă

Au fost luați în studiu, de manieră retrospectivă și consecutivă, pacienți tratați în Institutul Oncologic "I. Chiricuță" Cluj-Napoca, cu limfom Hodgkin sau nonHodgkin și infecție cu virus Epstein-Barr, între anii 2005 și 2010.

Criteriile de includere în lot au fost: confirmarea histologică de neoplazie, vârsta cuprinsă între 1 lună și 18 ani, efectuarea unui tratament oncologic – chimioterapie cu un regim standard conform ghidurilor în vigoare, terminarea chimioterapiei, certificarea infecției cu EBV (serologic IgG anti VCA), follow up efectuat.

Criteriile de excludere au fost: pacienții care nu au putut efectua întreg tratamentul recomandat din alte motive în afara progresiei tumorale, cei cu documentație incompletă sau cei EBV negativi.

Din dosarele clinice ale pacienților au fost culese date referitoare la demografie, valorile tabloului hematologic, viteza de sedimentare a hematiilor, albumina, nivelul de LDH, stadiul clinic tumoral,

pozitivitatea semnelor B (scădere ponderală >10%, subfebrilități, transpirații), prezența sau nu a "bulky disease" (tumori >10 cm sau diametrul tumoral mediastinal >1/3 din diametrul toracic). S-a calculat scorul IPI (International Prognostic Index), a fost notat tipul de tratament și răspunsul la tratament – complet sau nu (aici fiind incluse: remisiunea parțială, boala stabilizată și boala în evoluție). Toate rezultatele histologice au fost revăzute în vederea asigurării unei consistențe a datelor cu dosarele clinice, în plus s-a efectuat imunohistochimia necesară studiului 4 care va fi detaliat ulterior (evidențierea EBV pe lame).

Am utilizat tehnici statistice descriptive sau inferențiale. Diferențele între loturile cu nivele mari de IgG anti VCA și caracteristicile bolii au fost investigate cu testul Chi-square sau Fischer. Am utilizat programul SPSS 17.0, Medcalc 8.3.1.1. sau facilitățile programului Excel al Microsoft Office 2007.

Concluzii

1. Acest studiu pilot a permis identificarea unei valori cut-off pentru IgG anti VCA, care a condus la identificarea unor subgrupe de pacienți cu șanse statistic semnificativ diferite de a obține remisiune completă la finalul chimioterapiei.

2. Prezența infecției cu EBV, cuantificată prin titrul IgG anti VCA, poate fi considerată ca factor de prognostic pozitiv în evoluția limfoamelor la copii.

3. Băieții par a fi mai afectați de hemopatii, indiferent de intensitatea infecției cu EBV.

4. Tipul histologic, stadiul clinic, nivelul LDH nu s-au corelat cu intensitatea infecției cu EBV.

Studiul 3. Virusul Epstein-Barr – factor de prognostic independent în neoplaziile pediatrice

Introducere

Rolul EBV ca și factor etiologic al limfoamelor a fost inițial sugerat de datele epidemiologice, prezența anticorpilor anti EBV fiind identificată într-un procent crescut la copiii cu neoplazii hematologice comparativ cu populația generală, apoi a fost confirmat de prezența genomului EBV în celulele tumorale.

Dacă rolul etiologic al EBV în limfoame este bine stabilit, rămâne însă întrebarea asupra cuantumului influenței pe care o are EBV în evoluția acestora.

Ipoteza de lucru. Obiective

Într-un prim studiu – studiul pilot am reușit să punem în evidență o valoare cut-off a IgG anti VCA de 213,44 UI/ml, care reprezintă un factor predictiv pentru obținerea remisiunii complete la finalul chimioterapiei. Intensitatea infecției cu EBV, reflectată de titrul de anticorpi IgG antiVCA, pare să reprezinte un factor de prognostic favorabil – cei cu infecție EBV activă/reactivată par a avea șanse crescute de a obține un răspuns complet la finalul tratamentului. În acest studiu, pe un lot mărit care a inclus pacienții din două unități sanitare care tratează în mod curent pacienți cu neoplazii pediatrice, a fost extinsă cercetarea asupra influenței pe care EBV o poate avea asupra evoluției bolii. Sfera de interes a fost lărgită, fiind luate în cercetare atât aspectele demografice, de prezentare clinică, tabloul hematologic sau biochimic, cât și cele legate de toxicitatea la tratament și supraviețuirea globală sau supraviețuirea liberă de boală.

Material și metodă

Am selectat, prospectiv și consecutiv, pacienți tratați în Institutul Oncologic "I Chiricuță" Cluj-Napoca și secția de Oncopediatrie a Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii Cluj-Napoca, între anii 2005 și 2010. Lotul de pacienți a constat din 89 de copii internați și tratați în aceste unități spitalicești, cu neoplazii de tip limfom Hodgkin sau nonHodgkin sau altă patologie neoplazică certificată a fi Epstein-Barr pozitivă, prin identificarea unui titru de anticorpi IgG anti VCA în serul pacienților (carcinom nazofaringian, sarcoame, nefroblastom, neuroblastom etc). Din dosarele clinice ale pacienților au fost culese date în ceea ce privește demografia, date de hematologie și biochimie, cum ar fi VSH, LDH, albumina serică, stadiul clinic al tumorii, prezența sau nu a semnelor B de boală, tipul "bulky" de boală sau nu, a fost calculat scorul IPI (detaliat în studiul anterior), tipul de tratament, răspunsul la tratament.

Toate histologiile cazurilor au fost revizuite pentru a oferi consistență datelor culese din dosarele clinice.

Criteriile de includere nu au fost diferite față de studiul pilot și anume:

- Cazuri certificate histologic cu neoplazie
- Vârsta între 1 și 18 ani

- Tratamentul complet cu scheme standard de chimioterapie, conform ghidurilor internaționale în vigoare

- EBV IgG anti VCA pozitiv

Criteriile de excludere:

- Negativitatea pentru EBV
- Dosare clinice incomplete în ceea ce privește tratamentul, evaluările răspunsului la tratament, analizele în decursul chimioterapiei
- Cazuri neconfirmate histologic
- Comorbidități care au impus modificarea schemei standard de chimioterapie

Lotul de pacienți a fost împărțit în două categorii, în funcție de valoarea cut-off identificată la studiul pilot < și, respectiv, > 213,44 UI/ml, analiza statistică fiind centrată pe intensitatea infecției cu EBV reflectată de titrul IgG, la care s-a adăugat cercetarea privind corelarea cu diferiți factori de prognostic clasici pentru neoplaziile prezentate de acești pacienți. Au fost în final selectați pacienții cu limfom Hodgkin sau nonHodgkin, precum și cei cu carcinom nazofaringian, neoplazii în care rolul EBV ca și agent etiologic este bine stabilit.

Analiza statistică a fost efectuată cu ajutorul tehnicilor descriptive și inferențiale: Chi square sau testul Fisher exact au fost utilizate pentru a evalua corelațiile între variabilele cantitative, urmând aplicațiile standard pentru fiecare test. Datele continue au fost analizate cu ajutorul testului Shapiro Wilk. Diferențele dintre grupurile de date continue au fost interpretate cu testul Student sau testul Mann & Whitney U. Analiza R.O.C incluzând curbe sau aria de sub curbă (AUC) cu interval de confidență de 95% (95% CI), sensibilitate și specificitate au fost, de asemenea, utilizate. Un prag de semnificație statistică de <0,05 a fost ales pentru toate testele. Software-ul utilizat a fost SPSS 13.0 (Chicago II) și MedCalc 8.3.1.1.

Concluzii

1. EBV poate fi considerat factor de prognostic independent în evoluția limfoamelor la populația pediatrică.
2. Șansa de răspuns complet la tratamentul oncologic este mai mare la cei cu titrul mare de Ac anti VCA tip IgG, atât pentru limfomul Hodgkin, cât și pentru LNH.
3. Supraviețuirea liberă de boală este dependentă de obținerea unui răspuns complet la chimioterapie.
4. Limfomul Hodgkin pare a fi asociat în proporție mai mare cu infecția cu EBV intensă, spre deosebire de LNH.
5. Intensitatea infecției cu EBV se corelează cu subtipul histologic cu celularitate mixtă și scleroză nodulară.
6. Modul clinic de prezentare a pacienților cu limfoame (stadiul TNM, boala "bulky", nivelul LDH, diametrul tumoral maxim, prezența semnelor B, boala extraganglionară) nu este influențat de titrul IgG anti VCA.
7. Infecția intensă cu EBV crește toxicitatea pe linie leucocitară și eritocitară.
8. Coinfecțiile virale nu sunt influențate de prezența EBV.

Studiul 4. EBER – factor de prognostic în neoplaziile pediatrice

Introducere

O tumoră este încadrată ca fiind virus asociată atunci când genomul viral sau produșii lui (micro ARN, proteine) sunt evidențiați în celulele tumorale. Prezența genomului EBV și expresia constantă a unor proteine virale într-un spectru larg de malignități reprezintă dovezi puternice care susțin implicarea EBV în carcinogeneză.

Expresia proteinelor virale diferă în funcție de tipul de malignitate asociată, dar EBER (EBV encoded small RNA) este singurul produs care este intens exprimat în toate cele 3 tipuri de stări de latență. Din această cauză, EBER este ținta ideală pentru metodele de diagnostic histologic. Punerea în evidență a EBER, cu ajutorul metodei de hibridizare *in situ*, reprezintă "gold standard"-ul diagnostic pentru demonstrarea asocierii dintre EBV și o serie de malignități: limfomul Hodgkin, limfomul Burkitt, PTLPD, anumite tipuri de limfoame T, carcinomul nazofaringian.

Recent s-a demonstrat rolul pe care îl are EBER în menținerea fenotipului malign: determină rezistență la apoptoză, induce secreție de IL-10 - care acționează ca factor autocrin de creștere pentru

celulele tumorale din limfomul Burkitt, conferă rezistență la acțiunea apoptotică a IFN γ , prin blocarea activității proteinkinazei.

Ipoteza de lucru. Obiective

Studiul și-a propus stabilirea unei corelații între titrul crescut al IgG anti VCA ca marker serologic al prezenței virusului EBV (infecție activă/reactivare, boală asociată procesului tumoral) și prezența EBER în țesutul tumoral (martor al rolului etiologic al EBV) și evaluarea EBER ca factor prognostic în evoluția neoplaziilor la copii.

Material și metodă

Din lotul stabilit pentru studiul precedent (89 de pacienți), au fost identificate 20 de cazuri cu blocuri la parafină - 12 băieți și 8 fete, în histoteca IOCN sau a Spitalului de Copii. Aceste probe la parafină au fost secționare pentru prepararea lamelor necesare colorațiilor imunohistochimice. S-a verificat cu acest prilej concordanța diagnosticului cu cel menționat în foaia clinică a cazului.

Pe lotul selectat de pacienți au fost studiați principalii factori de prognostic ai limfoamelor în corelație cu statusul EBER: răspunsul la tratament, stadiul bulky - dimensiunea tumorală, toxicitatea hematologică și biochimică la tratamentul oncologic.

Tehnica de colorare EBER

Hibridizarea in situ pentru detecția virusului EBV

Au fost identificate și selectate (folosind secțiuni standard colorate HE) blocurile cu conținut maxim de material tumoral (cele mai multe celule carcinoatoase pentru carcinoamele nazofaringiene sau cele mai multe celule Hodgkin pentru limfomul Hodgkin). Pentru hibridizare a fost folosită o probă complementară oligonucleotidei EBER conjugată cu fluoresceina (Novocastra™ Fluorescein-conjugated probes for in situ hybridization Epstein-Barr Virus Probe ISH Kit).

Concluzii

1. Prezentarea clinică a neoplaziilor (dimensiunea tumorală maximă) este independentă de statusul EBER.
2. Răspunsul la tratamentul chimioterapic nu este influențat de statusul EBER.
3. Supraviețuirea liberă de boală nu este influențată de statusul EBER.
4. Toxicitatea tratamentului oncologic nu este influențată de pozitivitatea sau negativitatea EBER.
5. Titrul Ac anti VCA IgG nu este statistic legat de statusul EBER.