

Britta L. Hirsch¹, Rainer Gosert²

Therapieresistenz von Herpes-simplex-Reaktivierung: neue Möglichkeiten in der Labordiagnostik?

Reaktivierung von Herpes-simplex-Virus (HSV)-1 und -2 betreffen 5–25 % der Bevölkerung. Acyclovir (ACV) ist in den meisten Fällen wirksam gegen HSV, aber ACV-Unterdosierung, lang andauernde ACV-Einnahme und Immunschwäche sind Risikofaktoren für ein klinisches Versagen und die Entstehung viraler ACV-Resistenz. Die Labordiagnostik hat Limitationen: Bekannte genotypische Resistenzen sind auf wenige Mutationen beschränkt, während phänotypische Resistenztests variabel und zeitaufwendig sind. An zwei Fallbeispielen geben wir eine Übersicht zu aktuellen Möglichkeiten der HSV-Resistenztestung.

Die Primärinfektion mit Herpes-simplex-Viren (HSV) erfolgt im Kindes- und Erwachsenenalter durch mukokutanen Kontakt. Anschliessend verbleibt HSV als klinisch latente Infektion in den sensorischen Ganglien. Bei Reaktivierung zeigt es sich als Bläschen an (muko-)/kutanen Stellen, z.B. im Gesichtsbereich [1]. Eine signifikante Morbidität ist mit Nagelbettentzündung, Keratitis, rezidivierender aseptischer Meningitis und Enzephalitis verbunden, die auch bei immunkompetenten Personen auftreten, jedoch gehäuft bei immungeschwächten Patienten einen schweren Verlauf nehmen können. Nach Solidorgantransplantation (SOT) oder allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HCT) trägt die HSV-Reaktivierung zur frühen Morbidität bei, die durch antivirale Prophylaxe wirksam unterdrückt wird [2, 3].

Resistenz gegen ACV – zwei Fallbeispiele

Die antivirale Behandlung von HSV als Prophylaxe oder Therapie basiert meist auf dem Guanosinanalogen Acyclovir (ACV), das von der viralen DNA-Polymerase UL30 in die wachsende virale DNA eingebaut wird und einen Kettenabbruch verursacht. Die Prävalenz von ACV-resistentem HSV bei immunkompetenten Patienten liegt im Bereich von 0,1 bis 0,7%. Bei HSV-1-Keratitis zeigen bis zu 6,4% der Iso-

late eine verringerte Empfindlichkeit [6]. In immungeschwächten Individuen, wie bei HIV/AIDS-Patienten, liegen die ACV-Resistenzraten bei 5%, 10% bei Empfängern von Transplantaten bis zu 30% nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation [4, 5]. Die zunehmend beobachtete ACV-Resistenz bei immunkompetenten und immungeschwächten HSV-Patienten verlangt nach neuen Ansätzen mit kurzen Durchlaufzeiten. Der Echtzeit-Zellanalysator (RTCA) verwendet Mikrotiterplatten mit Goldmikroelektroden-Biosensoren. Ein angelegtes elektrisches Potenzial wird durch Anzahl, Grösse, Form und Zellhaftung beeinflusst. Die Änderung der Impedanz wird in Echtzeit aufgezeichnet und von der RTCA-Software in einen Cell Index umgewandelt.

Fall 1: Eine 24-jährige Frau stellte sich mit geschwollener Gingiva und zunehmenden Schmerzen vor. Dies begann eine Woche nach Zahnreinigung, trotz prophylaktischer Valacyclovir-Einnahme einen Tag vor dem Eingriff. Ein Zahnfleischabstrich wurde entnommen, um HSV-1-Replikation und ACV-Resistenz zu testen. Aus der Krankengeschichte ist eine schwere, ausgedehnte Gingivostomatitis, durch HSV-1 verursacht, bekannt, die erst verzögert diagnostiziert und mit Valacyclovir (Val-ACV) behandelt wurde.

Fall 2: Eine 36-jährige Frau mit Diabetes mellitus Typ 1 stellte sich wegen rezidivierenden Herpes genitalis vor. Aus der Krankengeschichte ist Herpes genitalis seit ungefähr 15 Jahren bekannt. Anfänglich traten Rezidive spo-

radisch auf, wurden jedoch in den letzten 10 Jahren immer häufiger. Unter einer einjährigen Prophylaxe mit Val-ACV traten mindestens zwei klinische Rezidiv-Episoden auf. In einem Genitalabstrich wurde HSV-2 nachgewiesen und ein Versagen der Behandlung aufgrund von ACV-Resistenz vermutet.

Laborresultate

Echtzeit-Zellproliferation zeigt sich durch eine Zunahme des Cell Index (C-I), für A549-Zellen in Abbildung 1 über 144 Stunden dargestellt ist. Der durch die HSV-Vermehrung ausgelöste cytopathische Effekt (CPE) führt zu einer Zerstörung des Zellrasens, der durch eine Abnahme des C-I im RTCA sichtbar wird (HSV, Abb. 1). Die niedrigste (0,5 µg/ml) und höchste ACV-Konzentration (500 µg/ml) hat praktisch keinen Einfluss/cytotoxischen Effekt auf das Zellwachstum (0,5, 500 µg/ml, Abb. 1) und damit auf den C-I.

Unter Verwendung der beiden HSV-Isolate (1×10^6 und 1×10^7 GEq/mL) und A549-Zellen (3×10^3 and 1×10^4 pro Vertiefung) in Gegenwart von 0,5, 5, 50 und 500 µg/ml ACV wurde der C-I/Wachstum ermittelt. Der C-I wurde für 144 Stunden aufgezeichnet und der mittlere Hemmkonzentrations(IC-50)-Wert (2 Zelldichten und 2 Inokulumkonzentrationen) berechnet.

Fall 1: Nach Inokulation des HSV-1-Isolats erreichte der C-I vier Stunden nach Infektion unabhängig von der ACV-Konzentration ein Maximum von 2,5, gefolgt von einer Abnahme der Impedanz auf Hintergrundwerte. Bei höheren ACV-Konzentrationen war der Rückgang weniger ausgeprägt und er-

¹ Britta L. Hirsch, Klinische Virologie, Labormedizin, Universitätsspital Basel, und Innere Medizin, Spital Davos

² PD Dr. Rainer Gosert PhD, FAMH Medizinische Mikrobiologie, Klinische Virologie, Labormedizin, Universitätsspital Basel



Résistance thérapeutique dans la réactivation de l'herpès simplex: de nouvelles possibilités en diagnostic de laboratoire?

L'échec clinique du traitement par ACV dans les réactivations de l'herpès constitue un problème grandissant, de même que l'infection par des souches pharmacorésistantes. Dans les deux études de cas présentées ici, les isolats cliniques de HSV-1 et HSV-2 ont montré une résistance phénotypique contre l'ACV. Pour les isolats de HSV des deux types, les tests de résistance génotypique n'ont mis en évidence aucune mutation connue associée à la résistance. Ces modifications génétiques sont probablement pour la plupart des polymorphismes, bien que la responsabilité d'une ou plusieurs mutations combinées ne puisse être exclue dans le cadre du phénotype constaté de résistance à l'ACV. L'analyseur cellulaire en temps réel (RTCA) utilisé constitue un instrument pratique pour réaliser les tests de résistance phénotypique, permettant d'ailleurs de tester en parallèle plusieurs paramètres tels que la densité cellulaire, l'inoculum viral et les concentrations de médicament. Le RTCA est en mesure de livrer rapidement, en temps réel, des données solides sur la pharmacorésistance du HSV et, au-delà des deux études de cas décrites ici, peut s'avérer utile en clinique.

reichte nach 144 Stunden einen C-I von 0,5 bis 1,1. Die Phasenkontrastmikroskopie bestätigte einen HSV-1-vermittelten CPE (Abb. 2 A-B). Der mittlere IC-50-Wert des HSV-1 Isolats betrug 15,5 µg/ml (IQR: 11,0–23,6), was 62,7 µM entspricht, während ACV-sensitive Wildtyp-Stämme einen IC-50-Wert <1 µg/ml (<4 µM) aufweisen. Dies deutet auf eine phänotypisch hochgra-

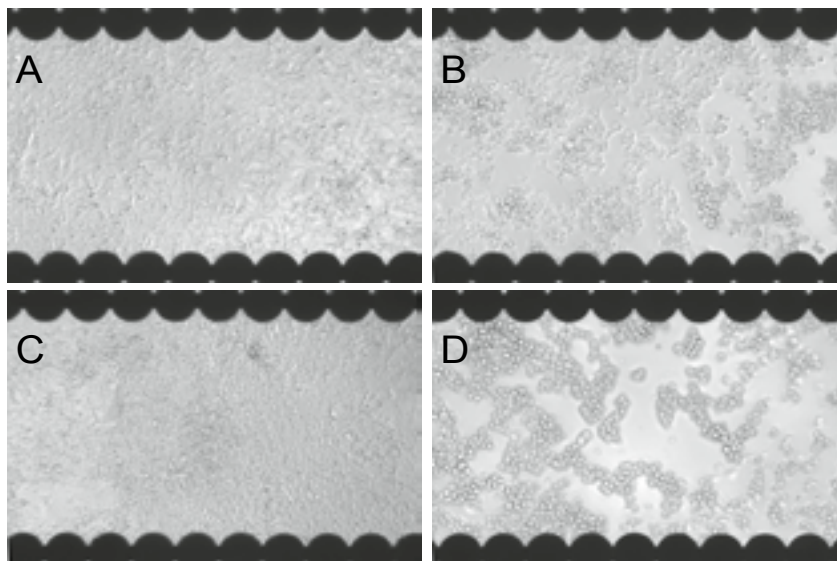


Abbildung 2: HSV-induzierte cytopathische Wirkung. Nach 144 h werden 10000 Zellen pro Vertiefung in Gegenwart von 0,5 µg/ml ACV gezeigt. (A, C) Mock-infiziert oder mit 1×10^7 GEq/ml HSV-1 (B) oder HSV-2 (D) inokulierte Zellen. Phasenkontrastbilder, 100-fache Vergrößerung.

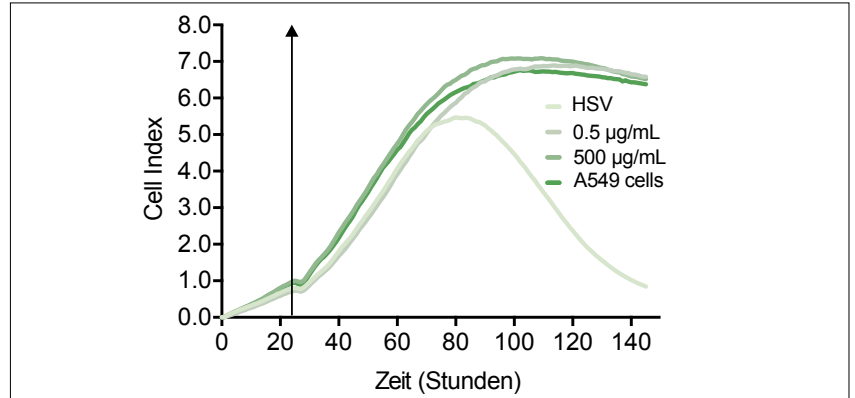


Abbildung 1: Echtzeit-Zellproliferation, HSV-vermittelter cytopathischer Effekt und ACV Cytotoxizität über 144 Stunden. Die Linien zeigen den durchschnittlichen C-I (Triplikate) für 10000 Zellen pro Vertiefung mock-infizierte A549-Zellen (pastellgrün), in Gegenwart von 0,5 µg/ml ACV (blassgrün), 500 µg/ml ACV (grün) und mit 1×10^7 GEq/ml HSV (dunkelgrün) beimpfte Zellen, Mittelwert (n=3) ± SD (durchgezogener schwarzer Pfeil markiert die Infektion und Zugabe von ACV 24 Stunden nach Zellaussaat). x-Achse: Zeit in h, y-Achse: C-I.

dige ACV-Resistenz des HSV-1 Isolats hin.

Fall 2: Nach Inokulation des HSV-2-Isolats erreichte der C-I 38 Stunden nach Infektion ein Maximum von 3,0, gefolgt von einem Abfall auf die Ausgangswerte 96 Stunden nach Infektion. Bei höheren ACV-Konzentrationen lag das C-I-Maximum zwischen 6 und 7, gefolgt von einem langsamen Abfall bis 144 Stunden. Nach dieser Zeit war ein HSV-2-vermittelter CPE sichtbar (Abb. 2C-D). Der mittlere IC-50-Wert des HSV-2-Isolats betrug 4,3 µg/ml (IQR: 2,9–4,8), was 17,6 µM entspricht, kompatibel mit ACV-Resistenz.

Um das mögliche Vorhandensein bekannter Mutationen mit ACV-Resistenz zu charakterisieren, wurden genotypische Resistenztests für HSV-Thymidinkinase (UL23) und DNA-Polymerase (UL30) durchgeführt. Keiner der Polymorphismen der Isolate war mit einer zuvor beschriebenen verminderten ACV-Empfindlichkeit assoziiert. Beide Isolate wurden im Detail im Rahmen einer medizinischen Masterarbeit charakterisiert [6] und zur Kontrolle an ein externes Referenzlabor geschickt, das die phänotypische Resistenz und das Fehlen bekannter genotypischer Resistenzmutationen bestätigte.

Fazit

Das klinische Versagen der ACV-Behandlung bei Herpesreaktivierung ist ein zunehmendes Problem, einschliesslich der Infektion mit arzneimittelresistenten Stämmen. In den beiden hier vorgestellten Fallstudien zeigten klinische Isolate von HSV-1 und HSV-2 eine phänotypische Resistenz gegen ACV. Die Bewertung verschiedener ACV-Konzentrationen ermöglichte die Bestimmung der IC-50-Werte für HSV-1 von 15,510 µg/ml (62,7 µM) und HSV-2 von 4,3 µg/ml (17,6 µM) in einem Echtzeit-Zellkulturassay auf der Grundlage von CPE-vermittelter Impedanzänderungen. Dies wurde unabhängig von einem externen Referenzlabor bestätigt und phänotypisch als hochgradige Resistenz mit einem IC-50-Wert >2,7 µg/ml (13,0 µM) charakterisiert. Diese Er-

gebnisse legen nahe, dass eine verringerte ACV-Empfindlichkeit in beiden Fällen zum klinischen Versagen der ACV-Therapie beiträgt. Teilweise auf Basis dieser Ergebnisse integrierte das klinische Management diese Ergebnisse, indem in Fall 1 auf eine antivirale Behandlung mit Val-ACV verzichtet wurde. In Fall 2 wurde eine lokale Stimulierung der Immunität mit Imiquimod versucht.

Genotypische Resistenztests identifizierten keine der bekannten resistenzassoziierten Mutationen in beiden HSV-Isolaten. Wahrscheinlich stellen viele dieser genetischen Veränderungen Polymorphismen dar, obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, dass eine oder eine Kombination von Mutationen für den beobachteten Phänotyp der ACV-Resistenz verantwortlich sein könnte [7].

Die in unserem Routinelabor erzielten Ergebnisse legen nahe, dass der RTCA ein praktisches Instrument zur Durchführung phänotypischer Resistenztests darstellt, mit dem mehrere Parameter

wie Zelldichte, virales Inokulum und Arzneimittelkonzentrationen parallel getestet werden können. Der RTCA ermöglicht, in Echtzeit robuste Daten zur HSV-Arzneimittelresistenz in relativ kurzer Zeit zu liefern, und kann sich über die beiden hier beschriebenen Fallstudien hinaus als klinisch nützlich erweisen.

Korrespondenz
rainer.gosert@usb.ch

Die Autoren danken Beatrice Hess und Sibylle Stauffer vom Labor für Virusisolierung und Klaudia Nägele, MSc, Labor für Genotypisierung und Resistenz in der Klinischen Virologie, Universitätsspital Basel, für die hervorragende technische Unterstützung, sowie PD Dr. Kathrin Scherer, Dermatologie, und Prof. Dr. med. Hans H. Hirsch, MSc, FMH Infektiologie, FMH Innere Medizin, FAMH Medizinische Mikrobiologie, Transplantation & Klinische Virologie, Departement Biomedizin, Universität Basel, für hilfreiche Diskussionen und Anregungen.

Referenzen

1. Whitley, R. J. & Roizman, B. in Clinical Virology, 4th Edition (ed ASM American Society for Microbiology) Ch. 20, 415-445 (2017).
2. Zaia, J. et al. Viral disease prevention after hematopoietic cell transplantation. Bone Marrow Transplant 44, 471-482 (2009).
3. Martin-Gandul, C. et al. Preventive Strategies Against Cytomegalo-virus and Incidence of alpha-Herpesvirus Infections in Solid Organ Transplant Recipients: A Nationwide Cohort Study. Am J Transplant 17, 1813-1822 (2017).
4. Danve-Szatanek, C. et al. Surveillance network for herpes simplex virus resistance to antiviral drugs: 3-year follow-up. J Clin Microbiol 42, 242-249 (2004).
5. Morfin, F. & Thouvenot, D. Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs. J Clin Virol 26, 29-37 (2003).
6. Hirsch, B. L. Phenotypic Resistance Testing of Herpes simplex virus-1 and -2 Isolates by real-time Impedance Cell Culture Measurements, Faculty of Medicine, University of Basel. Accepted: August 2017, Supervisor: PD Dr. Rainer Gosert.
7. Sauerbrei, A. et al. Database on natural polymorphisms and resistance-related non-synonymous mutations in thymidine kinase and DNA polymerase genes of herpes simplex virus types 1 and 2. J Antimicrob Chemother 71, 6-16 (2016).

HO0005162003106781

SARS-CoV-2 Total Assay

Unser wissenschaftlicher Beitrag zum Schutz der Bevölkerung

Gesamtantikörpertest für ein genaueres klinisches Bild des Infektionsstatus und der Immunantwort

siemens-healthineers.ch

