

Herpesviry a rezistence k antivirotické terapii

Miroslav Fajfr, Vlasta Štěpánová

Ústav klinické mikrobiologie, Lékařská fakulta UK v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové

Herpetické viry patří mezi významné patogeny v imunosuprimované populaci, což vede ke stoupající spotřebě antiherpetik a také ke stoupajícímu problému se vznikem rezistence k těmto lékům. Článek stručně pojednává o nejvýznamnějších zástupcích z antiherpetik, o základních mechanismech vzniku rezistence a u vybraných herpetických virů také o současných znalostech o prevalenci rezistentních kmenů a genetických změnách spojených se vznikem rezistence.

Klíčová slova: herpetické viry, antivirotika, rezistence.

Herpesviruses and resistance to antiherpetics

Herpesviruses belong to important pathogens in immunosuppressed population, which lead to increased consumption of antiherpetics and of course also in increased level of resistant viruses to these therapeutics. This paper review basic informations about the most important members of antiherpetics, basic mechanisms resistance to antiherpetics and up to date knowledge about resistance prevalence and genomic changes associated to resistance.

Key words: herpesviruses, antivirals, resistance.

Úvod

Lidské herpesviry, zástupci virové čeledi *Herpesviridae*, se tradičně dělí do tří podčeledí, *Alpha-*, *Beta-* a *Gammapherpesvirinae*. Jednotlivé podčeledi se od sebe odlišují celou řadou vlastností, od generační doby přes schopnost růstu na tkáňových kulturách, po rozdílnou klinickou manifestaci včetně schopnosti onkogeneze u gamaherpesvirů. Podle obecného schématu se člověk setká s herpesviry v útlém dětském věku a séroprevalence v dospělé populaci dosahuje vysokých hodnot, mezi 60–100 % podle typu viru (1). Určitou výjimkou je herpes simplex virus typ 2 (HSV2) se séroprevalencí v dospělé populaci kolem 20–50 %, a nebo lidský herpetický virus 8 (HHV8), kdy séroprevalence nedosahuje 5 % (1).

Velmi důležitou vlastností herpetických virů je jejich schopnost latentní infekce a následné reaktivace při oslabení imunitního systému hostitele. Právě tato vlastnost řadí herpetické

viry mezi jedny z nejdůležitějších virových patogenů ve skupině pacientů s imunosupresí. Častá reaktivace herpetických infekcí u těchto pacientů vede k užívání specifické virostatické terapie a u některých skupin pacientů (zejména po transplantacích) i k dlouhodobé profylaxi těmito terapeutiky. To s sebou podobně jako v bakteriální říši nese problém vzniku a stoupající prevalence rezistence herpetických virů k těmto lékům. Tento přehledový článek přináší stručný souhrn informací o problematice rezistence herpesvirů k antiherpetikům, respektive pouze u těch herpetických virů, proti kterým máme účinnou terapii (HSV 1, HSV2, VZV, CMV a HHV6).

Antiherpetická terapie

Herpetické viry patří mezi nemnoho virových čeledí, u nichž je k dispozici účinná kauzální antivirotická (virostatická) terapie. Mezi základní léky proti infekcím způsobeným herpes simplex virem (HSV) a varicella-zoster virem

(VZV) patří acyclovir (ACV) a penciclovir (PCV) a jejich esterové deriváty – valaciclovir (VACV) a famciclovir (FCV). Jedná se o tzv. nukleosidová analoga, jejichž účinná forma vyžaduje vždy trifosforylaci a cílovým místem je virová polymeráza (2, 3). Dalším antivirotikem z této skupiny je brivudin (BVD), který má prokázanou aktivitu proti HSV1 a VZV. Brivudin patří mezi velmi účinná antivirotika s EC_{50} pro VZV v rozmezí 0,001–0,003 $\mu\text{g/ml}$ a pro HSV1 o jeden řád vyšší. Velmi zajímavé je, že i když velmi dobře funguje u viru HSV1, nefunguje u viru HSV2 (EC_{50} pro HSV2 je 10 $\mu\text{g/ml}$), což je způsobeno změnou v jedné aminokyselině v aktivním místě HSV2 TK (4). Zcela stejné schéma platí i u základních léků proti cytomegaloviru (CMV), tedy gancicloviru (GCV) a jeho valyl-esterového derivátu valgancicloviru (VGCV), pro účinnou formu vyžadují trifosforylaci a cílovým místem je opět virová polymeráza (2). Podle studií je prokázaná dobrá aktivita gancicloviru i k HSV (ID_{50} 0,2–8,0 μmol)

a in vitro nejistá aktivita u EBV (ID_{50} 1–4 μ mol), VZV (ID_{50} 4–40 μ mol) a lidskému herpetickému viru 6 (EC_{50} 3,1–5,8 μ mol) (2, 5). Podobně je popisována i nejistá in vitro aktivita acycloviru k infekcím virem Epstein-Barrové (EBV) či lidských herpetických virů 6 a 7 (HHV6 a HHV7) (2).

Jako rezervní (pro poměrně vysokou toxicitu) antiherpetika je možno použít analoga pyrofosfátu foscarnet (FOS) a acyklický analog cytidinu cidofovir (CDV). Místem účinku obou těchto antivirotik je virová polymeráza, přičemž FOS nevyžaduje fosforylaci a CID vyžaduje pouze difosforylaci buněčnými kinázami (2, 3). Poměrně novým antivirotikem s účinkem na CMV je maribavir (MBV). Jedná se o derivát benzimidazolu, který funguje jako kompetitor ATP v místě jeho vazby na virovou thymidinkinázu. Jedná se tedy o antivirotikum se zcela jiným mechanismem účinku, neboť nejenže nepotřebuje fosforylaci pro svůj účinek, ale jeho cílem není ani virová polymeráza, jak je tomu u všech předchozích antivirotik (6).

Základní mechanismus vzniku rezistence

V rámci replikačního cyklu herpesvirů probíhá i přepis mateřské DNA do dceřiných, které jsou poté součástí nově tvořených virových partikulí. Pro tento krok je zcela nezbytná funkce virem kódované polymerázy (virová DNA dependentní DNA polymeráza), která v rámci replikačního cyklu funguje jako enzym syntézy komplementárních vláken virové DNA. To je důvodem, proč je tento enzym hlavním cílem valné většiny antiherpetik, protože bez funkční virové polymerázy není virus schopen replikace a infekce se tak zastavuje.

Trifosforylace nutná pro vznik účinných forem antiherpetik je velmi důležitý krok spojený s tvorbou rezistentních mutant, neboť první fosforylace je prováděna pomocí virových thymidinkináz (TK). Trifosforylovaná forma léčiv pak působí jako kompetitivní inhibitor virové DNA polymerázy. Pokud je inkorporována do replikované DNA, pak zamezí její další replikaci (2, 3). Mutace v genu pro enzym TK patří mezi hlavní místo vzniku rezistentních mutant, neboť změny v aktivní části enzymu vedou ke změně schopnosti fosforylovat nukleosidová analoga. Obecně mohou nastat tři varianty defektu TH. Buď nedojde k vytvoření funkční TK (Thymidine-kinase negative mutants), nebo je vytvořen

enzym se sníženou funkcí (TK low producer mutants). Vzácně dojde k vytvoření substrátově specifického enzymu (TH altered mutant, enzym funkční pouze pro thymidin, ale ne již např. pro ACV) (3). Enzym TK není pro virus vitálně nezbytný, ale hraje pravděpodobně důležitou roli v patogenitě viru, neboť u TK low producer mutací byla zaznamenána na zvířecích modelech snížená patogenita a TK negativní mutanty mají dle studií velmi omezenou (i když za určitých situací možnou) schopnost reaktivace (3).

Protože cílové místo většiny antiherpetik je virová polymeráza (pol), mohou se některé mutace v genu pro tento enzym projevit také ztrátou funkčního enzymu nezbytného pro replikaci viru. Mutace v genu pro virovou polymerázu tak patří mezi druhé nejčastější místo mutací spojených s rezistencí na antiherpetika, ale v porovnání s mutacemi v genech pro TK velmi minoritní. Důvodem je fakt, že virová polymeráza patří, na rozdíl od TK, k esenciálním enzymům pro virovou replikaci, a tak jakákoli mutace v tomto polyproteinu virus znevýhodňuje (3).

Herpes simplex virus

Podezření na infekci virem HSV s rezistencí na antivirotika lze vyslovit při přetrvávání aktivních ložisek i přes 7–10denní standardní antivirotickou léčbu nebo při objevení se nových nebo atypických ložisek v průběhu této terapie (7). Pro HSV platí, že u klinických izolátů je cca 95 % rezistentních kmenů spojených se změnami v genu UL23 – genu pro virovou TK, a zbylých 5 % pak v genu UL30 – genu pro virovou polymerázu (3, 7).

V genu UL 23 bylo identifikováno celkem 6 konzervativních úseků, přičemž změny v regionech tzv. „ATP-binding site“ (část enzymu TK vážící se s ATP), „nucleoside-binding site“ (část enzymu TK vážící se s substrátem – nukleosidem) a Cys 336 (HSV1), resp. 337 (HSV2), jsou nejvíce spojovány se vznikem ACV-rezistentních mutant (3, 7). Podle dřívějších studií byla změna v cca 50 % spojena s delecí/inzercí (frame shift mutace, tj. delece nebo inserce úseku genu vede k posunu čtecího rámce, a tím k vytvoření změněného produktu, nebo k vytvoření stop kodonu) a v 50 % se substitucí 1 nukleotidu (single aa substituce, tj. změna nukleotidu za nukleotid, a tak v určitých případech i ke změně vedoucí k vytvoření jiné aminokyseliny). Dle recentních

studií nyní převládá v 62–80 % změna typu delece/inserce (3, 8). Rezistence HSV k PCV je popisována se změnami v UL23 genu, nejčastěji ve shodných regionech jako u ACV-rezistentních mutant, v 96 % se jedná o frame shift mutaci (3). Výsledkem těchto změn v genu UL23 jsou změny ve funkčnosti enzymu TK. Mutace v genu UL23 jsou spojeny s rezistencí na jeden typ antivirotika (a jeho derivátů). Celkem je v genu UL23 popsáno 134 mutací spojených s rezistencí k antiherpetikům a počet tzv. přirozených polymorfismů (tj. změn sekvence genu) bez vztahu ke vzniku rezistence, je dokonce mnohonásobně vyšší. To s sebou přináší mnohdy obtížné hodnocení při diagnostice rezistentních kmenů metodou sekvenční analýzy (9).

Mutace v genu pro virovou polymerázu mají velkou důležitost, protože vzniká rezistence bývá velmi často sdružena s rezistencí k dalším antiherpetikům s účinkem na virovou polymerázu (7, 9). V genu UL30 bylo identifikováno celkem 7 konzervativních regionů – I–VII. Mutace spojené s rezistencí na ACV a jeho esterovým derivátům jsou nejčastěji popisovány v regionu II, III a VI a vzácněji i δ -regionu C. Rezistence k FOS je pak popisována nejčastěji v regionech II, III a VI, méně často v nekonzervativním úseku mezi regionem VI a I. Z výše uvedeného vyplývá, že velmi často se jedná o sdruženou rezistenci na ACV a FOS, která je nejvíce popisována u mutací v regionech II a VI. Mutace S724N (region II) a L778M (region VI) je pak spojena s rezistencí k ACV (a jeho esterovým derivátům), FOS a se sníženou citlivostí k CDV (7, 9). Na rozdíl od mutací v genu UL23 se u genu UL30 jedná nejčastěji o single aa substituce, méně často pak o inserce/delece (7).

Prevalence rezistentních mutant se významně liší dle stavu imunity hostitele. V imunokompetentní populaci bývá prevalence rezistence k ACV udávána nejčastěji mezi 0,1–0,7 %, vyšší procento je ale popisováno např. u pacientů s herpetickou keratitidou, a to až v 6,4 %, což velmi pravděpodobně souvisí s délkou podávaných antiherpetik (7). Zcela jiná situace je u pacientů s imunosupresí, kdy je prevalence rezistentních mutant popisována u 3,5–14 % pacientů (pacienti HIV pozitivní, pacienti po transplantaci solidního orgánu nebo hematopoetických buněk) (7, 8). Výjimečně je udávána prevalence až 29–36 %, a to ve studiích u hematologických pacientů po alogenní transplantaci (7, 10).

Vzácněji byly také popsány mutace bez selekčního tlaku podávaného antivirotika (7). Informace o rezistenci HSV k antiherpetikům jsou z území ČR velmi sporadické. Např. v práci brněnských autorů zabývajících se terapií očních infekcí způsobených HSV1 bylo selhání terapie popsáno u 14 % pacientů, ale bez potvrzení genotypizací nebo provedením stanovení EC_{50} (11).

Varicella zoster virus

Podezření na selhání terapie u infekcí virem VZV lze vyslovit při perzistenci klinických příznaků VZV infekce po více jak 10–14denní terapii ACV (7). I přes to, že VZV náleží do stejné podčeledi jako HSV, má poměrně významné změny v genetické výbavě. Hlavním rozdílem je významně nižší CG poměr v genomu VZV (46 %) oproti HSV (68 %), strukturální odlišnosti v molekule DNA i celková velikost genomu (7, 12).

Podobně jako u HSV jsou hlavními místy pro vznik mutací spojenými s rezistencí na antivirotika dva geny, gen pro VZV thymidinkinázu (ORF36) a gen pro virovou polymerázu (ORF28). V genu ORF36 se nachází několik homopolymerních úseků a ty se zdají být častým místem pro vznik mutací spojených s rezistencí na ACV, a to nejčastěji formou delece/inzerce (3, 7). Mutace typu single aa substituce jsou pak nacházeny po celém genu, ale s jistou predispozicí pro dva úseky – „ATP binding site“ a „nucleotide binding site“, kde jsou tyto mutace nacházeny častěji než v jiných úsecích.

DNA polymeráza má velmi podobnou strukturu jako u HSV, také je popsáno 6 konzervativních úseků. Mutace v tomto genu jsou nejčastěji typu substituce single aa. Predominantním místem pro mutace spojené se vznikem rezistence je tzv. katalytická část virové polymerázy, konkrétně pak úseky II a III (7, 12). Některé mutace v genu ORF 28 jsou spojené se vznikem zkřížené rezistence k ACV a FOS, nicméně kmeny s rezistencí k FOS jsou poměrně vzácné. V porovnání s HSV jsou také mnohem méně popisovány tzv. přirozené polymorfismy, a zdá se tedy, že genom VZV je mnohem konzervativnější.

V imunitně kompetentní populaci byla rezistence na antivirotika u VZV popsána pouze u pacientů s rekurentní VZV keratitidou. Více popisovaných případů je u pacientů s imunosupresí, a to u pacientů s HIV a po transplantacích solidních orgánů nebo hemopoetických buněk. Prevalence ale není ani u těchto pacientů známa,

neboť většinou jsou publikovány pouze jednotlivé kazuistiky u pacientů nereagujících na terapii. Nicméně podle jedné z nemnoha větších studií byly v souboru 87 pacientů s hematologickou diagnózou u 27 % izolátů VZV nalezeny změny v genomu spojujované se vznikem rezistentních mutací (13), což by mohlo nasvědčovat, že nejméně v této skupině pacientů je prevalence rezistence podobná jako u HSV.

Lidský cytomegalovirus

Podezření na přítomnost rezistence je definováno stavem, kdy po 14denní terapii antivirotikem nedojde ke snížení viremie nebo u pacientů po transplantacích orgánů dojde k rozvoji CMV choroby v době podávání nebo krátce po ukončení dlouhodobé profylaxe ganciclovirem (14, 15).

Stejně jako u předchozích virů je rezistence na antivirotika spojována s mutacemi ve dvou genech – genu pro CMV thymidinkinázu (CMV-TK, gen UL97) a genu pro virovou polymerázu (pol, gen UL54). Gen UL 97 má na rozdíl od HSV a VZV celkem 9 (I–IX) konzervativních úseků a popsané mutace spojené se vznikem rezistence jsou buď typu single aa substituce, nebo typu frameshift mutace (delece 1–17 aminokyselin). Nejčastěji jsou mutace nacházeny v místě „ATP-binding site“ (kodony 460–520) a „substrate binding site“ (kodony 590–607) a sedm nejčastějších – M460I, M460V, H520Q, C592G, A594V, L595S, C603W – pak tvoří více jak 80 % všech dosud zaznamenaných mutací. Zbýlé se pak nacházejí mimo tyto úseky, popsány byly např. v konzervativním úseku IVb a VII ale i jinde (14, 15). Změny v genu pro CMV-TK jsou nejčastěji spojovány se vznikem rezistence ke GCV a jeho esterovým derivátům. Nicméně experimentálně (po selekčním tlaku maribaviru) byla v tomto genu prokázána i mutace spojená se vznikem rezistence k MBV, a to při single aa mutacích v kodonech 353, 397, 409 a 411. Tyto kmeny vykazovaly 9–200násobné zvýšení ID_{50} a rezistence nebyla spojená s rezistencí na jiná antivirotika (6).

Gen pro virovou polymerázu má několik konzervativních domén – exonukleázové domény I–III (Exo I–III) a dále 7 konzervativních úseků (I–VII) v části zodpovědné za polymerizaci (12, 13). Mutace v tomto genu jsou nacházeny ve velmi širokém úseku – kodony 300–1 000, a na rozdíl od mutací v genu UL97 zde nejsou zaznamenána žádná jasná predispoziční mís-

ta, což klade zvýšené nároky na detekci těchto mutací (14, 15). Nicméně se dle literárních údajů zdá, že zkřížená rezistence GCV+CDV je spojována častěji se změnami v části genu Exo a v regionu V, zatímco zkřížená rezistence FOS+GCV a FOS+CDV+GCV spíše v regionu III genu UL54 (6). V klinických izolátech se mnohem častěji a dříve (ve více jak 90 %) objevují mutace v genu pro TK než v genu pro virovou polymerázu, patrně ze stejných důvodů, jako je tomu u viru HSV (14). Dokonce se udává, že mutace v genu pro virovou polymerázu se objevují téměř vždy již u kmene s koexistující mutací v genu pro TK, samostatné mutace v genu pro virovou polymerázu jsou popisovány velmi zřídka (6).

Co se týká prevalence rezistentní populace, je udávána v rozmezí 0–17,6 % u pacientů po transplantaci plic, 0–6,2 % u pacientů po transplantaci ledvin a 0–7,9 % (až 14,5 % u vysoce rizikových pacientů) u pacientů po transplantaci kostní dřeně (6, 16). Situace s rezistencí cytomegaloviru ke GCV je obdobná jako v jiných pracích. V práci hradecských autorů bylo ze 40 pacientů u 7 prokázáno selhání GCV v terapii, ale pouze u dvou (5 %) byl prokázán i genetický substrát pro tuto rezistenci (17). Rizikovými faktory vzniku rezistence jsou jako u předchozích virů – typ a míra imunosuprese, délka antivirotické terapie, a u transplantovaných pacientů pak i sérostatus jak dárce, tak příjemce orgánu (6, 16).

Lidský herpetický virus 6

Infekce, resp. reaktivace HHV6 patří mezi významné komplikace imunosuprese zejména u pacientů po transplantacích, a u této skupiny pacientů je i nežídka léčena GCV. Vznik rezistence je spojován s mutacemi v genu pro virovou thymidin kinázu (U69) a genu pro virovou polymerázu (U38) (3). Údajů o mutacích spojených s rezistencí na antivirotika není u tohoto viru mnoho a většinou se jedná pouze o kazuistiky. V genu U69 jsou mutace soustředěny do subdomén VIb a XI a změny vedou k rezistenci ke GCV. V genu pro virovou polymerázu jsou mutace soustředěny v δ -regionu C (rezistence k FOS), regionu VII (polyvalentní rezistence FOS, GCV, CDV) a v úseku genu za regionem V (časté polymorfismy, ale i polyvalentní rezistence FOS, GCV, CDV) (3). Údaje o prevalenci rezistentních kmenů HHV6 v literatuře zcela chybí.

Závěr

Závěrem je třeba se zmínit o problematice definice rezistence. Podle studií se totiž zdá, že velká část případů, kdy antivirotická terapie nefunguje, není spojena s nálezem mutací v genu, která by tuto rezistenci vysvětlovala. Hovoří se o tzv. klinické rezistenci, která je zapříčiněna

celou řadou faktorů od non compliance pacienta, přes nevhodné dávkování po negenetické mechanismy spojené se selháním účinku antivirotika. Identifikace typu rezistence (klinická nebo genetická) je důležitá pro další léčebný postup. U klinické formy je třeba zajistit standardní podávání antivirotika, ale při prokázané

mutaci spojené s rezistencí je nutno postupovat podle vypracovaných postupů spojených buď s navýšením dávky antivirotika, nebo se změnou v antivirotikum záložní.

Publikace vznikla za podpory MZ ČR – RVO (FNHK, 00179906).

LITERATURA

1. Cohen JL. Chapter 135 Introduction to Herpesviridae in Mandell, Douglas, and Bennett's, Principles and practice of infectious diseases, 7th Edition, Churchill Livingstone, 2010.
2. Whitley RJ. Chapter 37 Other antiviral agents in Finch, Greenwood, Norrby and Whitley's Antibiotic and Chemotherapy: Anti-Infective Agents and Their Use in Therapy, 9th Edition, Elsevier, 2010.
3. Piret J et Boivin G. Antiviral drug resistance in herpesviruses other than cytomegalovirus. Rev. Med. Virol. 2014; 24: 186–218 DOI:10.1002/rmv.1787.
4. De Clercq E. Discovery and development of BVDU (brivudin) as a therapeutic for the treatment of herpes zoster. Biochem Pharmacol. 2004; 68(12): 2301–2315.
5. Bounaadja L, Piret J, Goijette N et Boivin G. Evaluation of Epstein-Barr virus, human herpes virus 6 (HHV-6) and HHV-8 antiviral drug susceptibilities by use of real-time PCR-based assays. J Clin Microbiol 2013;51:1244–46. DOI:10.1128/JCM.03234-12.
6. Laurain NS and Chou S. Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. Clin Microb Rev 2010; 23(4): 698–712.
7. Piret J, Boivin G. Antiviral resistance in herpes simplex virus and varicella-zoster virus infections: diagnosis and management. Curr Opin Infect Dis. 2016; 29(6): 654–662.
8. Burel S, Aime C, Hermet L, et al. Surveillance of herpes simplex virus resistance to antivirals: 4-year survey. Antiviral Res 2013; 100: 365–372.
9. Sauerbrei A, Bohn-Wippert K, Kaspar M, 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. 2016; 71(1): 6–16. doi: 10.1093/jac/dkv285.
10. Mofin F et Thouvenot D. Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs. J Clin Virol 2003; 26(1): 29–37.
11. Hlinomazová Z, Loukotová V, Horáčková M, Šerý O. The treatment of HSV1 ocular infections using quantitative real-time PCR results. Acta Ophthalmol. 2012; 90(5): 456–460.
12. Topalis D, Gillemont S, Snoeck R, Andrei G. Distribution and effects of amino acid changes in drug-resistant α and β herpesviruses DNA polymerase. Nucl Acids Res 2016; 44(20): 9530–9554 doi: 10.1093/nar/gkw875.
13. van der Beek MT, Vermont CL, Bredius RG, et al. Persistence and antiviral resistance of VZV in hematological patients. Clin Infect Dis 2013; 56(3): 335–343.
14. El Chaer F, Shah DP and Chemaly RF. How I treat resistance cytomegalovirus infection in hematopoietic cell transplantation recipients. Blood 2016; 128(23): 2624–2636.
15. Gilbert C, Boivin G. Human cytomegalovirus resistance to antiviral drugs. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49(3): 873–883.
16. Le Page AK, Jager MM, Iwasenko JM, et al. Clinical aspects of cytomegalovirus antiviral resistance in solid organ transplant recipients. Clin Infect Dis. 2013; 56(7): 1018–1029.
17. Vejražková E, Hubáček P, Kutová R, et al. Ganciclovir treatment failure in adult allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients with cytomegalovirus infection—a single centre experience. Epidemiol Mikrobiol Imunol. 2015; 64(3): 160–168.