

GRAND ROUNDS CLINICI DEL MERCOLEDÌ

con il Policlinico San Matteo

Sistema Socio Sanitario



Regione
Lombardia



Fondazione IRCCS
Policlinico San Matteo

ATS Pavia

Aula Magna "C. Golgi"
& WEBINAR

Mercoledì 27 aprile 2022

Marco Zecca

**Quando la patologia EBV-correlata è
famigliare**



Caso 1: E.H.

- Maschio, 16 anni, di origine egiziana.
- Ottobre 2014: in Egitto, comparsa di linfadenopatia e febbre; diagnosi di **Linfoma a grandi cellule B**.
- Alla TC collo-torace-addome presenza di linfadenomegalie diffuse, epatosplenomegalia e lesioni spleniche focali. La diagnosi istologica è stata effettuata mediante splenectomia.
- Trattamento chemioterapico secondo protocollo NHL gruppo B, stop terapia nell'aprile 2015.
- Giugno 2015: comparsa nuovamente di linfadenopatia laterocervicale e febbre; diagnosi di **recidiva di malattia**, confermata da biopsia. Trattamento con 6 cicli chemioterapici R-ICE, stop terapia nel gennaio 2016.

- Agosto 2016, presa in carico presso il nostro centro, dove ha eseguito rivalutazione di malattia.

Caso 1: E.H.

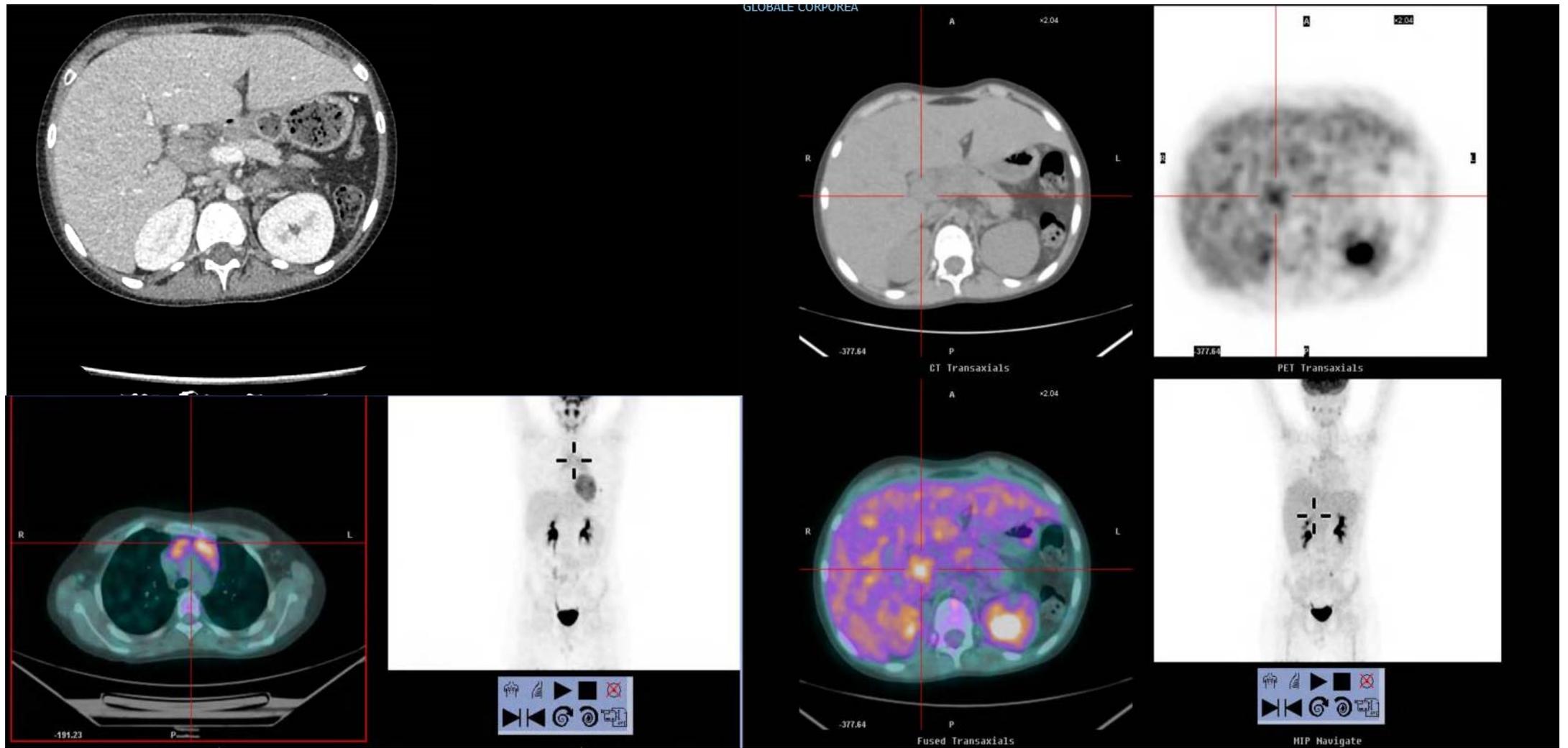
Settembre 2016

- **TC collo-torace-addome:** “numerosi tumefazioni linfoghiandolari patologiche in sede mediastinico - ilare in sede parailare inferiore destra, parenchima polmonare, retrocavità degli epiploon, e intorno all'ilo epatico.”
- **PET total body:** non eseguita per necessità familiare di tornare in Egitto
- **EBV DNA (settembre 2016):** 717.130 copie/ml, sierologie con elevati valori di EBNA IgG e VCA IgG.

Da ottobre a dicembre 2016 ricovero in urgenza presso il nostro Reparto per comparsa di febbre, dispnea e riscontro di versamento pleurico. Durante il ricovero sono state eseguite nuove indagini di rivalutazione di malattia:

- **TC torace-addome:** “multiple linfadenopatie patologiche in senso oncologico a livello polmonare, ilo-mediastinico e a livello mesenterico, in particolar modo a livello dell'ilo epatico”.
- **PET total body:** “focalità ipermetaboliche, di attribuzione linfonodale, in sede laterocervicale bilaterale, ilare polmonare destra ed in corrispondenza dell'ilo epatico”.

Caso 1: E.H.



Caso 1: E.H.

- **Biopsia osteomidollare e linfonodale a livello dell'ilo epatico:** “assenza di immagini riferibili a localizzazione / recidiva del linfoma B in anamnesi (tipo DLBCL), quadro compatibile con un disordine linfoproliferativo da infezione cronico attiva da EBV”.
- **EBV DNA:**
 - su sangue periferico: 292.680 copie/ml,
 - su aspirato midollare: 18.661.500 copie/ml,
- Inizio trattamento con anticorpo monoclonale anti-CD20+ (Rituximab).

Progressivo peggioramento delle condizioni generali del paziente durante il ricovero, con persistenza di versamento pleurico (per cui è stato posizionato il drenaggio pleurico), elevazione degli indici infiammatori, della ferritina (104.700 ng/ml) e degli indici di funzionalità epatica, associati a comparsa di ittero, alterazione del profilo emocoagulativo e calo della conta piastrinica.

Caso 1: E.H.

Diagnosi: sindrome da attivazione macrofagica, nel contesto di una infezione cronica attiva da virus EBV (CAEBV).

- Inizio trattamento secondo il protocollo HLH 2004 delle istiocitosi emofagocitiche (Desametasone + Etoposide + Ciclosporina-A).
- Progressivo miglioramento clinico, con normalizzazione della curva termica, degli indici di flogosi e di funzionalità epatica.
- EBV DNA su sangue periferico eseguito in pre-dimissione: 4.410 copie/ml.

Caso 1: E.H.

Viene posta indicazione ad un trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche.

Sorella HLA identica, ma risultata positiva per EBV-DNA:

- si è deciso di procedere ad un trapianto aploidentico utilizzando come donatrice la madre.

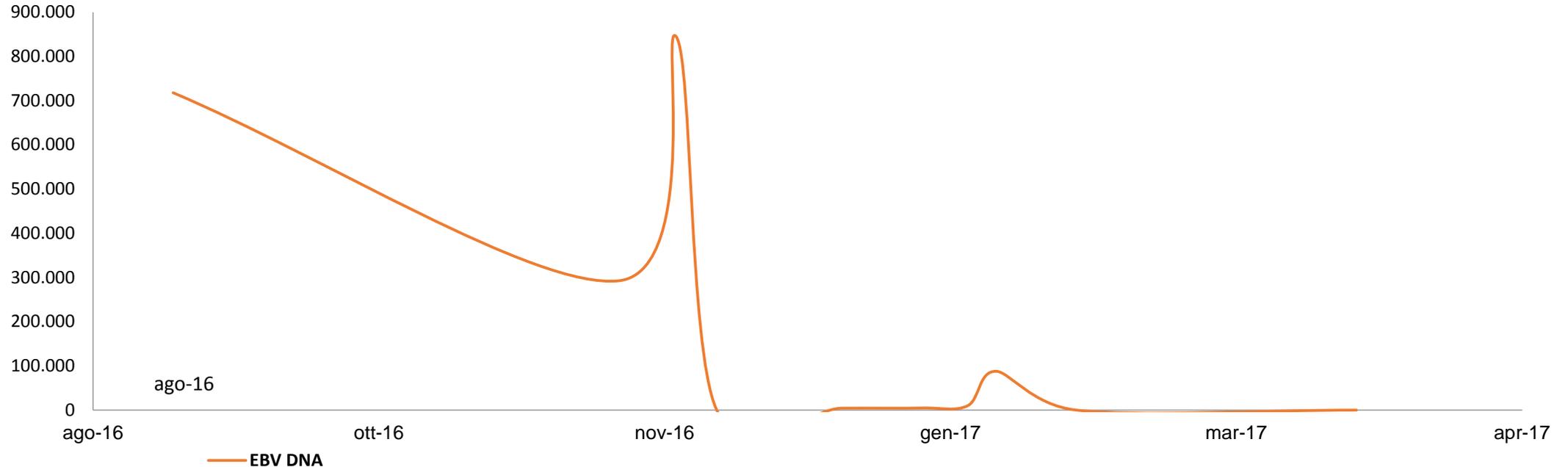
31/01/2017: trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche da donatore familiare HLA-aploidentico (la madre) dopo procedura di T-deplezione (immunoselezione negativa CD3+ TCR α/β + e CD19+).

Complicanze post TCSE:

- Infezione da RSV.
- Mucosite Grado III.
- GVHD III grado globale, cutanea ed epatica.
- Riattivazione virale CMV ed HHV6.

Paziente vivo ed in remissione a circa 5 anni dal trapianto.

Caso 1: E.H.



Valori di EBV-DNA dalla presa in carico al successivo follow-up post TCSE.

Caso 2: E.M.

- 17 anni, **sorella minore di E.H.** con infezione cronica da EBV diagnosticata nel 2017, per riscontro di persistenza di EBV DNA positivo e sierologie con elevati valori di EBNA IgG e VCA IgG.
- Da giugno 2021 comparsa di alcune tumefazione laterocervicale bilaterale, in assenza di sintomatologia associata.
- A gennaio 2022, progressivo aumento dimensionale della tumefazione, associato a comparsa di astenia intensa, sudorazioni, prurito incostante, in associazione a calo ponderale ed inappetenza. Eseguita in Egitto la biopsia linfonodale della tumefazione laterocervicale destra con riscontro istologico di linfoma maligno.
- Marzo 2022: ricovero a Pavia per peggioramento ulteriore della sintomatologia e comparsa di distress respiratorio.

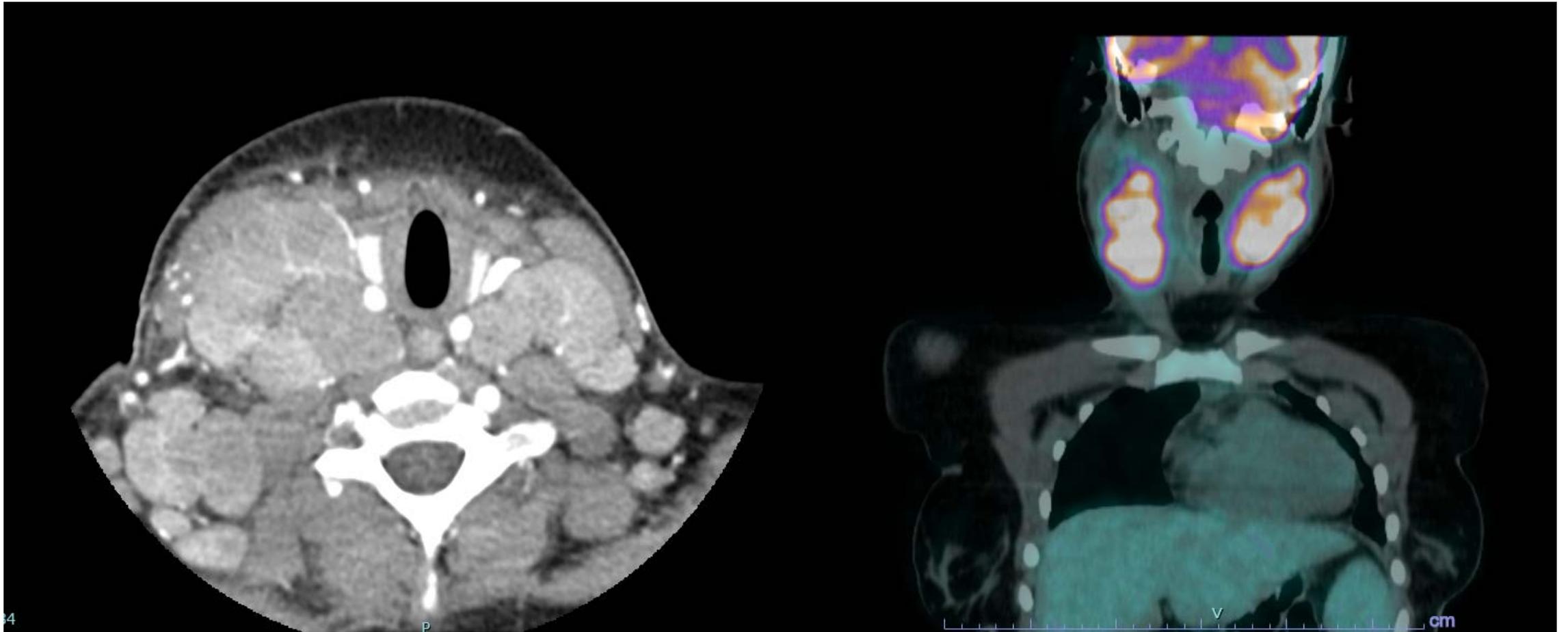
Monitoraggio EBV DNA:

- 01/2017: 78.210 copie/ml
- 03/2018: 190.800 copie/ml
- 07/2019: 28.080 copie/ml
- 09/2021: 32.130 copie/ml
- 02/2022: 216.180 copie/ml
- 03/2022: 2.241.000 copie/ml

Caso 2: E.M.

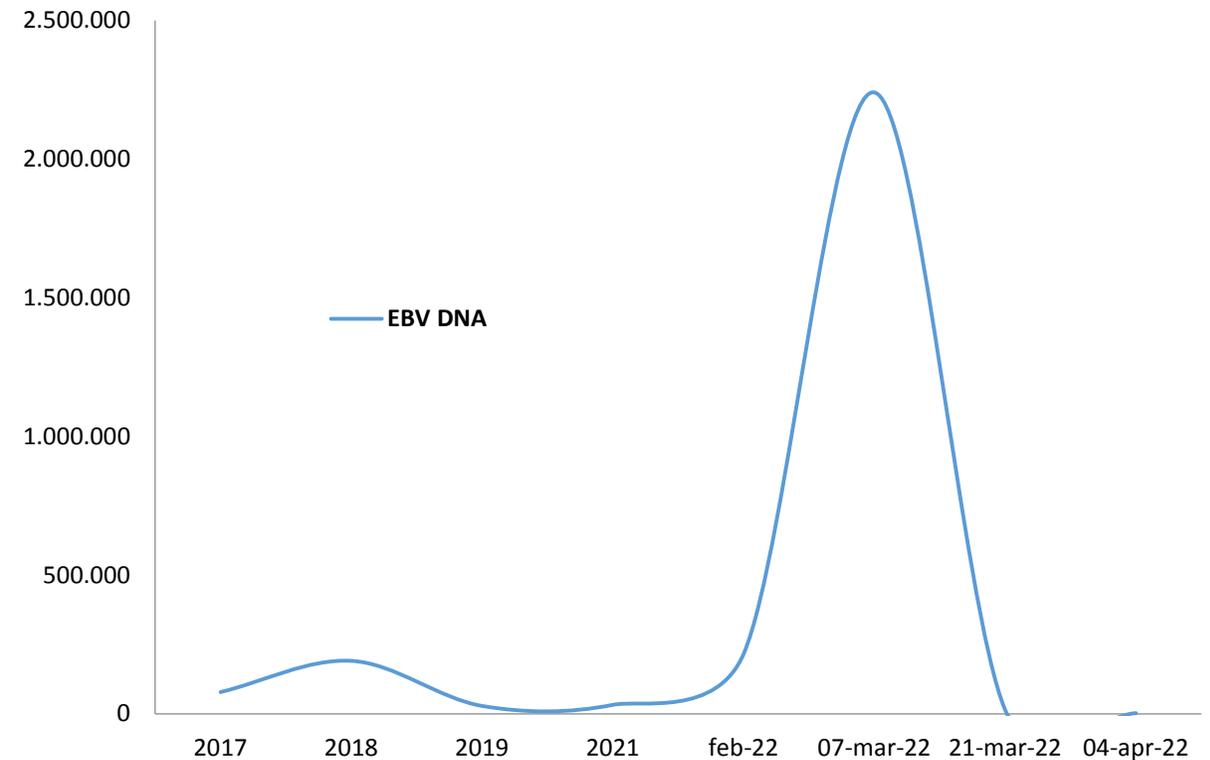
- **TC collo-torace-addome:** “presenza in sede latero-cervicale bilateralmente, in particolar modo a destra, sono presenti a tutti i livelli, numerose linfadenomegalie patologiche, con incremento anche dimensionale. Non evidenti linfadenomegalie sottodiaframmatiche”.
- **PET total body:** “adenopatie ipermetaboliche, a sede laterocervicale bilateralmente pressoché a tutti i livelli (SUV max 22.2). Tessuto patologico ipercaptante nei tessuti molli della parete toracica anteriore all'altezza del corpo dello sterno e a livello della muscolatura a ridosso della parte intertrocanterica e dell'epifisi prossimale del femore destro”.
- **Biopsia linfonodale laterocervicale destra:** “linfoma di Hodgkin classico (ipotesi più verosimile) versus eventuale forma di tipo "Hodgkin-like", nel contesto di un disordine linfoproliferativo EBV-correlato.”

Caso 2: E.M.



Caso 2: E.M.

- Inizia trattamento chemioterapico secondo il Protocollo AIEOP-PHL-2021 per la cura del Linfoma di Hodgkin classico in età pediatrica:
- 07/03/2022: I ciclo OEPA.
- 05/04/2022: II ciclo OEPA
- Buona risposta al trattamento, con netta riduzione dimensionale della tumefazione laterocervicale; ultimo EBV DNA di Aprile 2022: 1.890 copie/ml.
- Prevista PET di rivalutazione il 03/05/2022.
- Candidata a TCSE allogenico.



Caso 3: E.N.

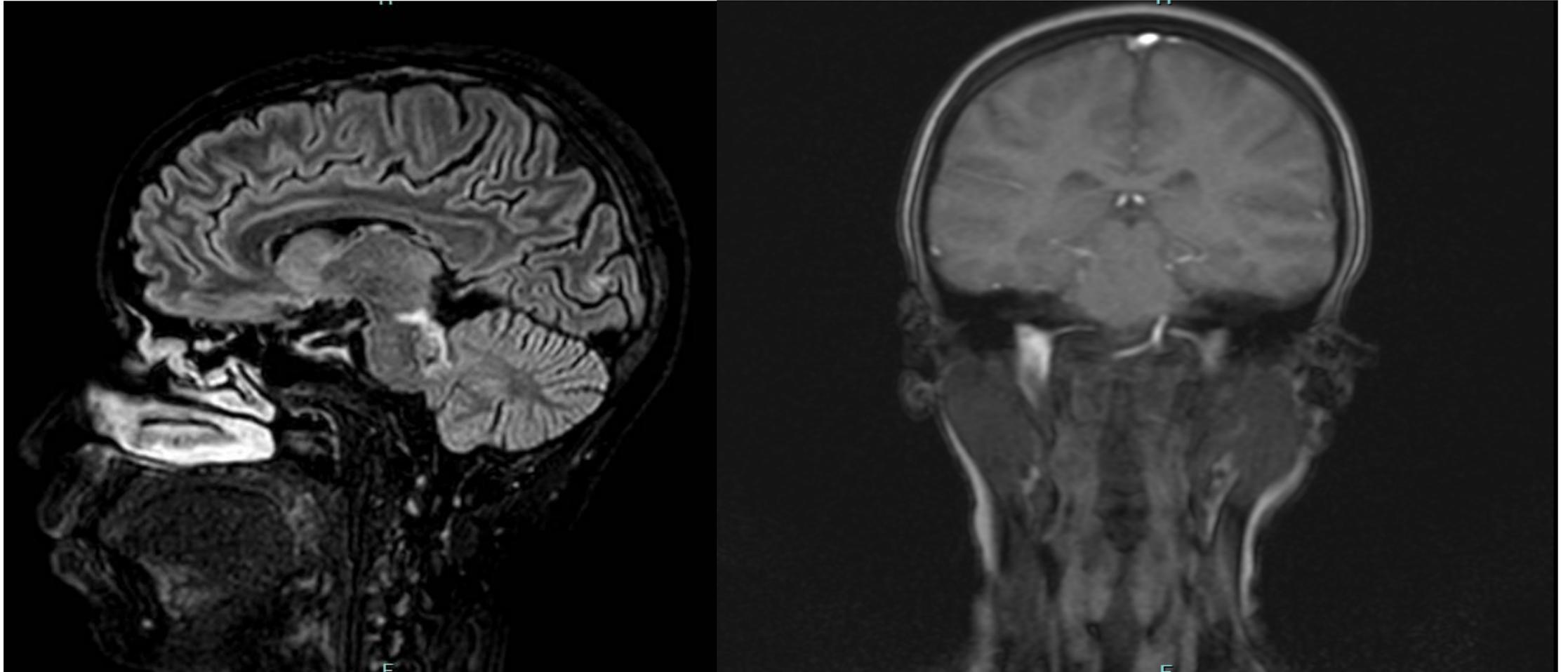
- Donna, 25 anni, sorella maggiore di H. e di M.
- A gennaio 2021 comparsa di **parestesie e disestesie associate ad ipostenia di tutto l'emisoma sinistro e diplopi**a. Eseguita, presso il paese di origine, RMN encefalo, con evidenza di “lesione a livello pontino a destra ed a livello occipito mesiale sinistro, sospette in senso demielinizzante”.
- A febbraio 2021 ricovero, in Egitto, per comparsa di febbre e dispnea. Eseguita **TC torace** con riscontro di grave interstiziopatia con multiple lesioni polmonari patologiche. Eseguita **PET** che ha evidenziato la presenza di “lesioni captanti polmonari, milza, fegato e linfonodi sotto e sovradiaframmatici”. **Biopsia polmonare** con referto riferito compatibile con diagnosi di “Linfoma non Hodgkin CD5+ vs. sarcoidosi”.
- A maggio 2021 ripetuta, in Egitto, RMN encefalo che fa porre il sospetto di MAV pontina.
- A novembre **accede presso il nostro pronto soccorso generale per peggioramento della sintomatologia respiratoria e delle già note parestesie, con difficoltà alla deambulazione**, associato a calo ponderale, febbre ed astenia. Ricovero.

Caso 3: E.N.

A completamento diagnostico, sono stati pertanto eseguiti:

- **Biopsia polmonare:** “presenza di infiltrato infiammatorio su base disreattiva/infiammatoria, dubbia positività della ricerca degli RNA strutturali (EBER1-2) dell’EBV.”
- **Biopisa osteomidollare:** “componente linfoide di natura verosimilmente reattiva”.
- **Ed esame chimico-fisico ed immunofenotipo su liquor cefalorachidiano:** negativi.
- **RMN encefalo e tronco encefalo:** “aumento dimensionale della nota lesione pontina in sede paramediana a destra, estesa al peduncolo cerebellare medio omolaterale ed alla porzione postero laterale destro del mesencefalo. Netto peggioramento del noto quadro neuroradiologico, alterazioni di tipo infiammatorio, non escludibili localizzazioni parenchimali e leptomeningee secondarie”.

Caso 3: E.N.



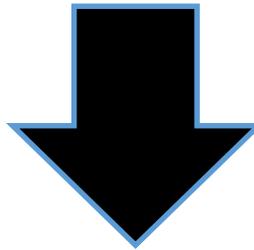
Caso 3: E.N.



Durante il ricovero, sono state eseguite le indagini infettivologiche, con riscontro unicamente di sierologie con **elevati valori di EBNA IgG e VCA IgG ed EBV DNA pari a 1.800 copie/ml**, in assenza di ulteriori isolamenti .

Caso 3: E.N.

ESEGUITA LA BIOPSIA CEREBRALE



Quadro compatibile con “Linfoma cerebrale CD8+ con parziale fenotipo NK-citotossico, inquadrabile all’interno di un disordine EBV-correlato”.

Progressivo scadimento delle condizioni generali, con comparsa di emorragia cerebrale acuta, sino all’exitus della paziente.

Ricapitolando

E.H.

Febbre, dispnea,
linfadenopatie a livello splenico,
polmonare, ilo-mediastinico e
mesenterico.

EBV DNA 717.130 copie/ml.



Sindrome da attivazione macrofagica in
infezione cronica attiva da EBV.



Trattamento chemioterapico, seguito da
TCSE
(EBV DNA negativo al follow-up,
+5 anni)

E.M

Riscontro di positività EBV-DNA (78.210
copie/ml)



Dopo 4 anni comparsa di astenia, calo
ponderale, sudorazione notturna,
dispnea, linfadenopatie laterocervicali.
EBV DNA 216.180 copie/ml.



Linfoma di Hodgkin IV stadio, nel
contesto di disordine linfoproliferativo
cronico da EBV.



Trattamento chemioterapico secondo
protocollo AIEOP-PHL-2021 (ultimo EBV
DNA 1.890 copie/ml).
In programma TCSE.

E.N

Parestesie all'emisoma sinistro,
diplopia, difficoltà alla deambulazione,
febbre e dispnea

EBV DNA 1800 copie/ml.



Linfoma cerebrale CD8+ , inquadabile
nel contesto di un disordine EBV
correlato



Exitus per emorragia cerebrale

Virus di Epstein-Barr

Il virus di Epstein-Barr (EBV) o, *Human herpesvirus 4*, è un virus a DNA appartenente alla famiglia degli herpesvirus. Responsabile della mononucleosi infettiva, è coinvolto nella genesi di alcuni sottotipi di linfoma ed alcuni tumori solidi, >> epiteliali (NPC, CA gastrico).

Infezione primaria:

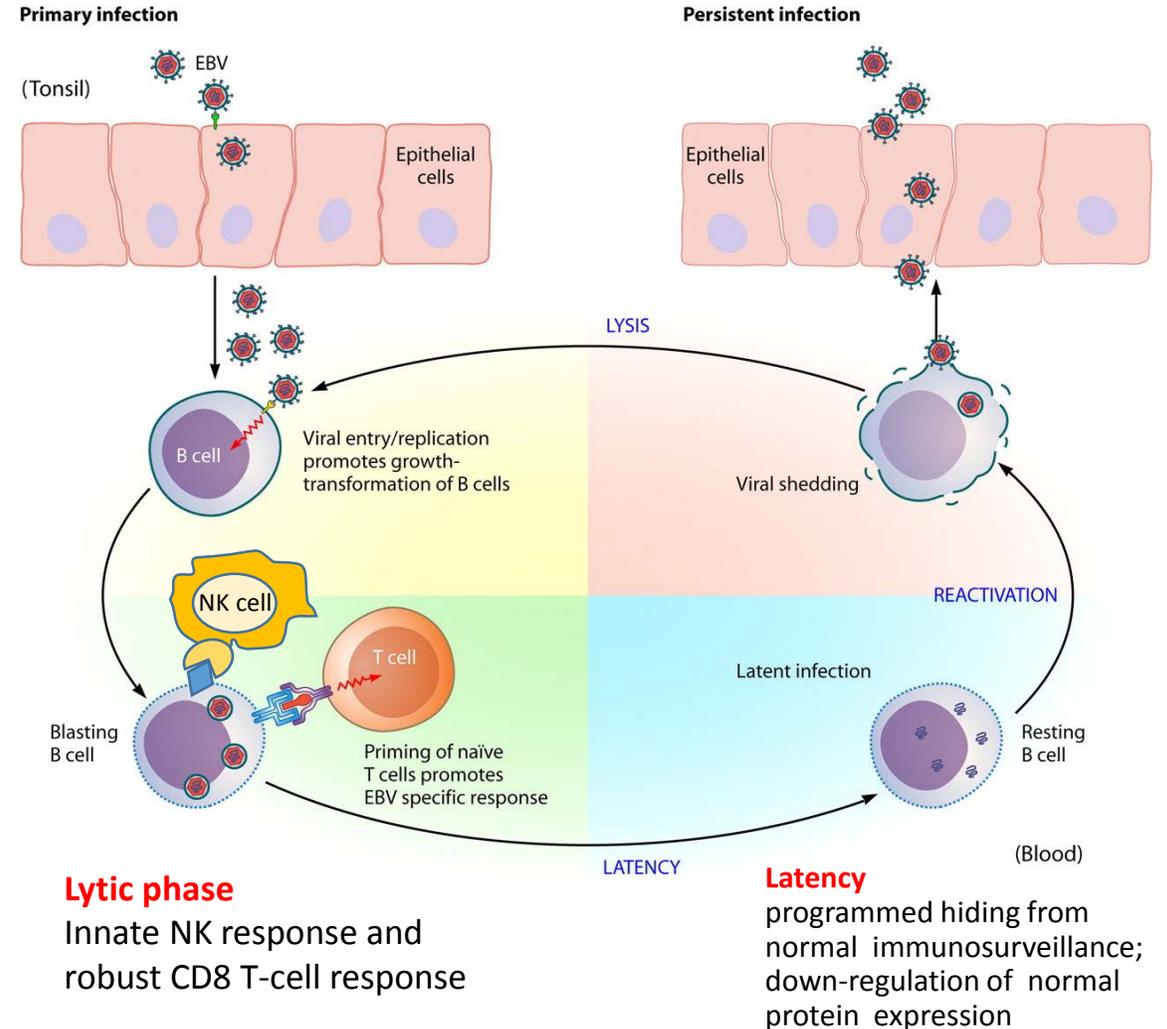
virus entra nei linfociti B presenti a livello orofaringeo (recettore: molecola CD21)

→ inizio del ciclo replicativo virale e morte della cellula infettata per lisi, a cui segue il rilascio di nuove particelle virali. In questa fase può manifestarsi la mononucleosi infettiva.

La risposta immune innata (NK) e T cellulare controlla l'infezione primaria.

Stato di *latenza*:

il virus **si rende invisibile** al sistema immunitario down-regolando l'espressione di proteine virali sulla superficie cellulare; a questo stato può far seguito la *riattivazione* del virus.



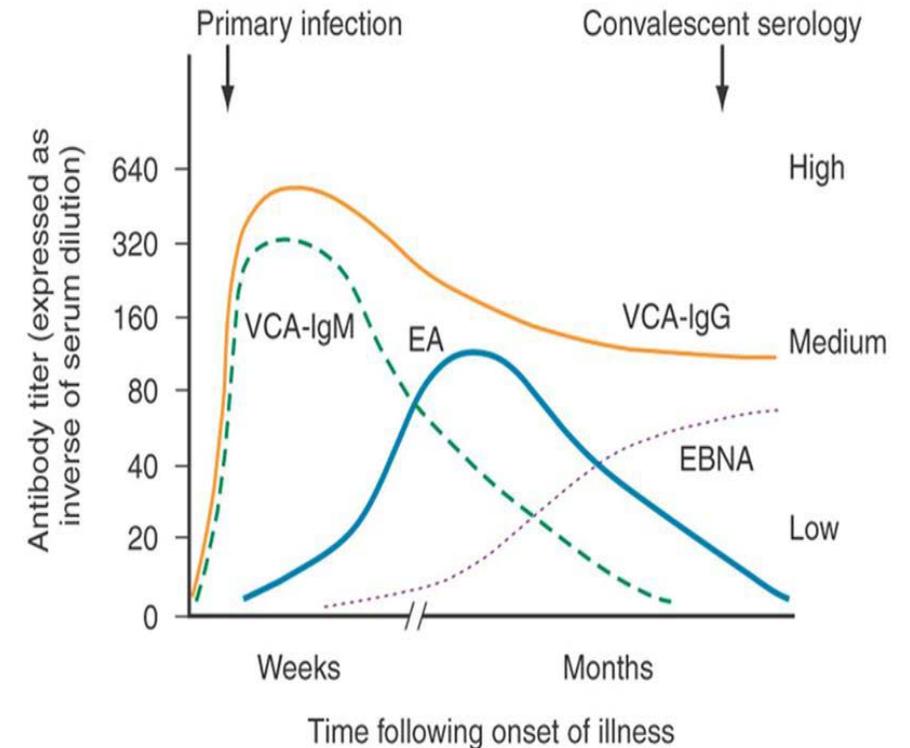
Virus di Epstein-Barr: infezione primaria

□ Primary EBV infection with containment:

1. Asymptomatic infection (common in children with naturally lower populations of memory B cells)
2. Acute IM (adolescents)
3. Recurrent infection/reactivation

□ Primary EBV infection with loss of containment:

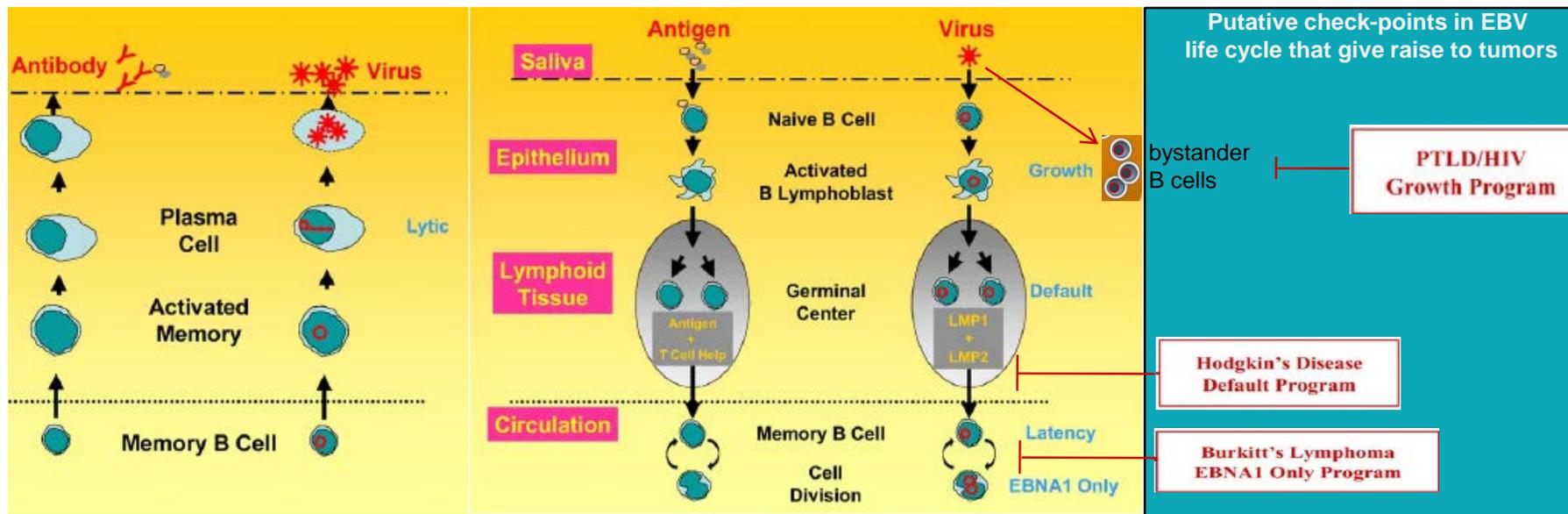
1. (Severe) Chronic active infection
2. Lymphoproliferative disorders (e.g., in the setting of XLP or organ transplantation)
3. Malignancy



J Clin Microbiol. 2009 Oct;47(10):3204-10. doi: 10.1128/JCM.00164-09. Epub 2009 Aug 5. Evidence-based approach for interpretation of Epstein-Barr virus serological patterns. Klutts JS, Ford BA, Perez NR, Gronowski AM.

Virus di Epstein-Barr: modello di linfomagenesi

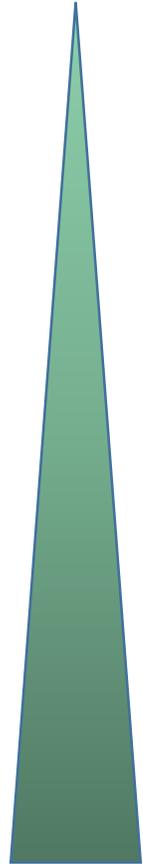
- EBV exploits the normal B-cell biology to maintain persistent infection and replicate and be shed in the saliva.
- EBV normally infects naive B cells in the Waldeyer's ring, and these cells can differentiate into memory cells and out of the cell cycle: they are not pathogenetic.
 - If a cell **other than the naive B cell** in the Waldeyer ring becomes infected, it will express the growth program and continue to proliferate because it cannot differentiate out of the cell cycle



Thorley-Lawson 2009

EBV: espressione genica nelle patologie associate

Antigen load



Latency	EBNA1	EBNA2	EBNA3	LMP-1	LMP-2	EBER	Pathology
TYPE 0 <i>Resting program</i>	+	-	-	-	+	+	Healthy carrier
TYPE 1	+	-	-	-	-	+	Burkitt's lymphoma
TYPE 2 <i>Rescue program</i>	+	-	-	+	+	+	Hodgkin lymphoma T cell lymphoma Nasopharyngeal Ca Gastric Ca
TYPE 3 <i>Growth program</i>	+	+	+	+	+	+	Mononucleosis XLP PTLD AIDS-associated ly. SCAEBV

Infezione cronica attiva da EBV (CAEBV)

- Complicanza dell'infezione da EBV, dovuta al mancato controllo immunologico. E' più comune nel sud-est asiatico, dove l'infezione da EBV è endemica.
- Esordio spesso caratterizzato da sintomi aspecifici quali febbre, citopenia, linfadenopatie o epato-splenomegalia con andamento cronico ed estremamente eterogeneo.
- Le complicanze sono numerose, ma le più temibili sono lo sviluppo di **linfocitosi emofagocitica** e di **linfomi chemio-resistenti** (più comunemente B cellulari nella popolazione caucasica, NK o T cellulari nelle coorti asiatiche).
- Attualmente l'unico trattamento curativo è il **trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche**.

TABLE 1 | Comparison of signs and symptoms of CAEBV disease in the US and Japan.

Sign or symptom	US (%) ^a	Japan (%) ^b
Lymphadenopathy	79	40
Splenomegaly	68	73
Fever	47	93
Hepatitis	47	67
Pancytopenia	42	NR
Hypogammaglobulinemia	42	NR
Hepatomegaly	32	79
Hemophagocytosis	32	24
Interstitial pneumonia	26	5
CNS disease	21	9
Neuropathy	21	NR
Rash	21	26
Hypersensitivity to mosquito bite	0	13
Hydroa vacciniforme	5	10

^a Cohen et al. Blood 2011

^b Kimura et al, J Infect Dis 2003

CAEBV: diagnosi

- Trattandosi di una patologia rara, con andamento cronico/progressivo ed estremamente eterogeneo, è molto difficile da diagnosticare.
- Criteri per la diagnosi:
 - Sintomi sistemici infiammatori (febbre, linfadenopatia, disfunzione epatica) di durata > 3 mesi
 - Livelli elevati di Ab anti-VCA o EA (con bassi/assenti Ab anti-EBNA)
 - Livelli elevati di EBV DNA su sangue periferico o tessuto ($\geq 10^{2.5}$ copie/ μg DNA)
 - Presenza di linfociti B \pm T \pm NK positivi per EBV DNA
 - *Diagnosi di esclusione: diagnosi differenziale con IM, malattie autoimmuni, PID, altre ID, HLH.*

^a Kimura & Cohen. Front Immunol 2017

^B Arai. Front Pediatrics 2019

CAEBV: infezione, disordine linfoproliferativo, immunodeficienza?

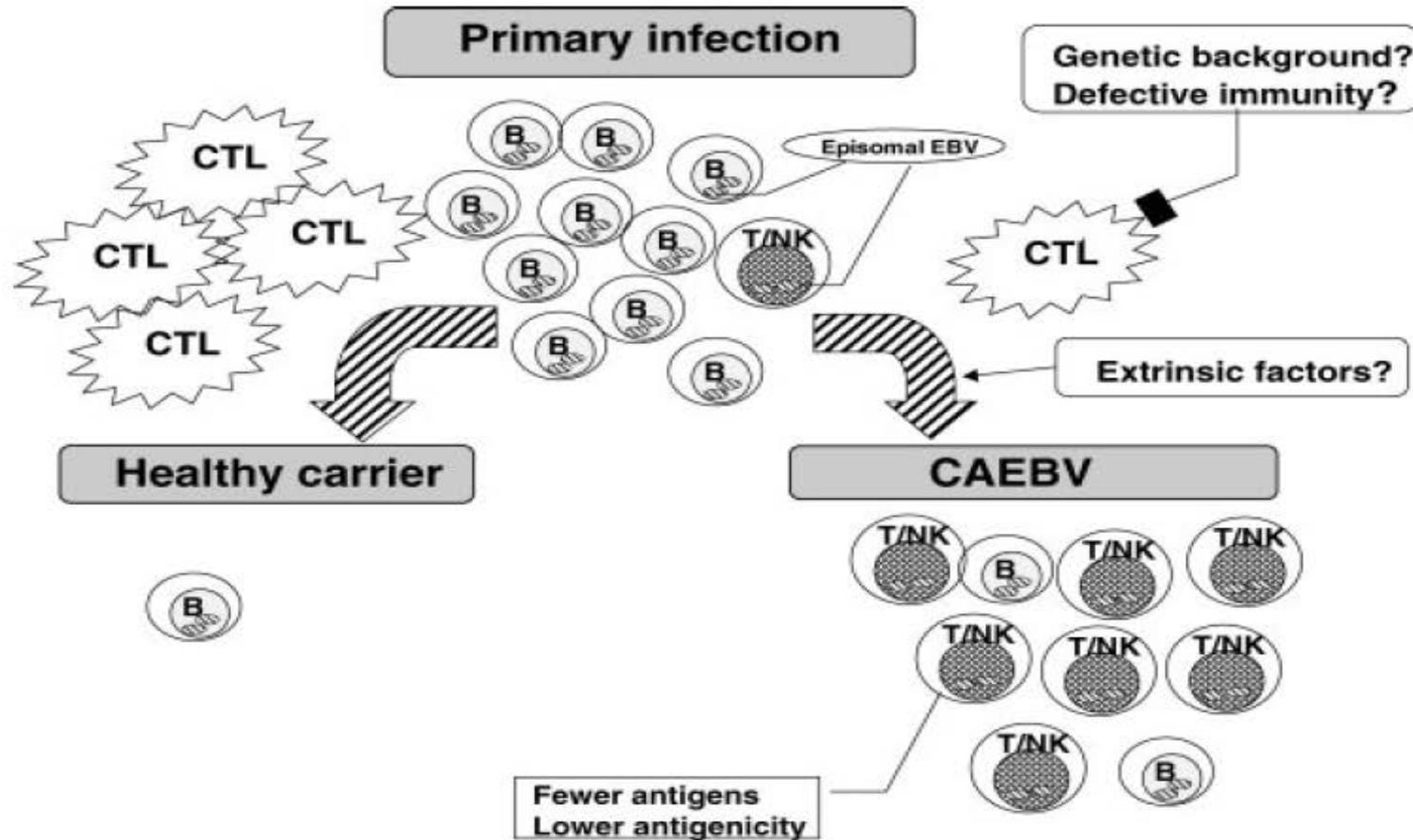


Figure 1. Hypothetical immune evasion mechanism of EBV-infected T or natural killer (NK) cells in patients with chronic active EBV Infection (CAEBV). CTL; cytotoxic T lymphocytes

Kimura H. *Rev Med Virol* (2006) 16:251–61. doi:10.1002/rmv.505

✓ Pur non essendo stata ancora dimostrata una chiara relazione genetica alla base della CAEBV, lo sviluppo di tecniche sempre più sofisticate di analisi genica, ha reso possibile l'evidenza di diverse mutazioni correlabili alla CAEBV.

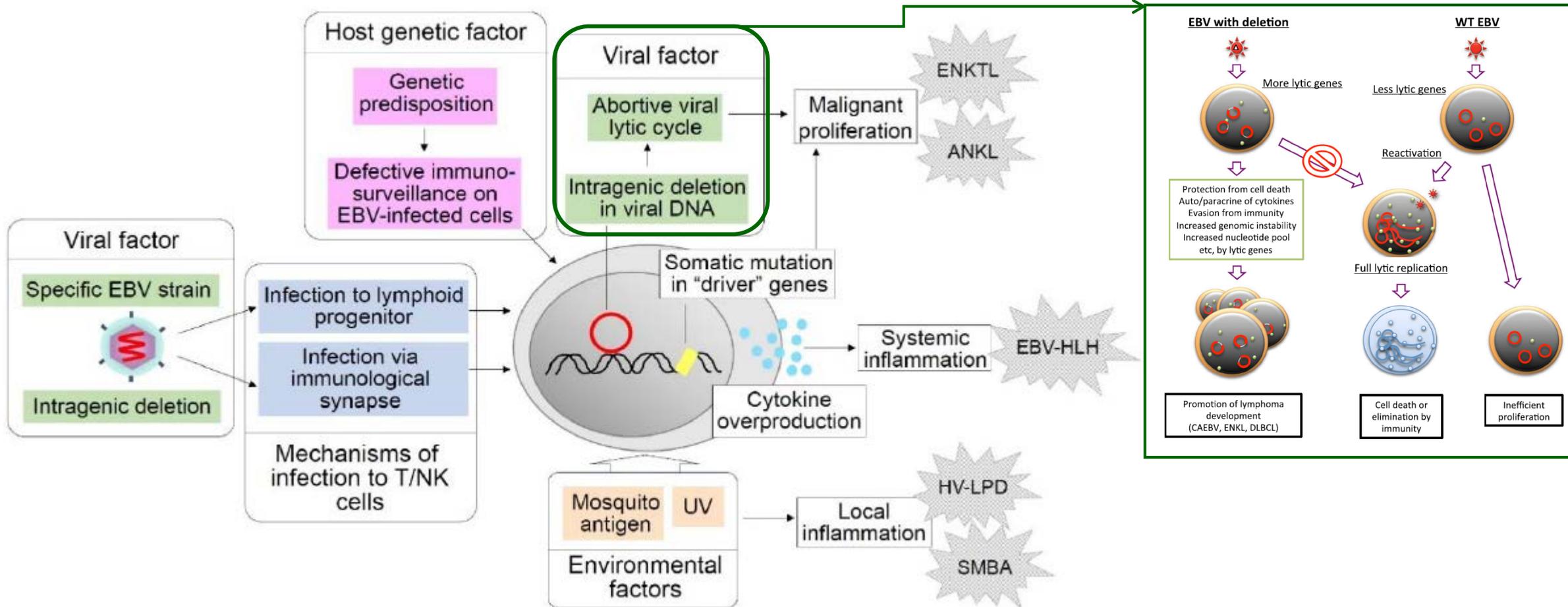
✓ Tale dato è supportato dall'evidenza di come la CAEBV sia prevalente soprattutto in determinate regioni geografiche (America latina, sud est Asiatico).

Chronic Active Epstein–Barr Virus Infection: Is It Immunodeficiency, Malignancy, or Both? Shigeyoshi Fujiwara 1,2,* and Hiroyuki Nakamura
2 Cancers 2020, 12, 3202

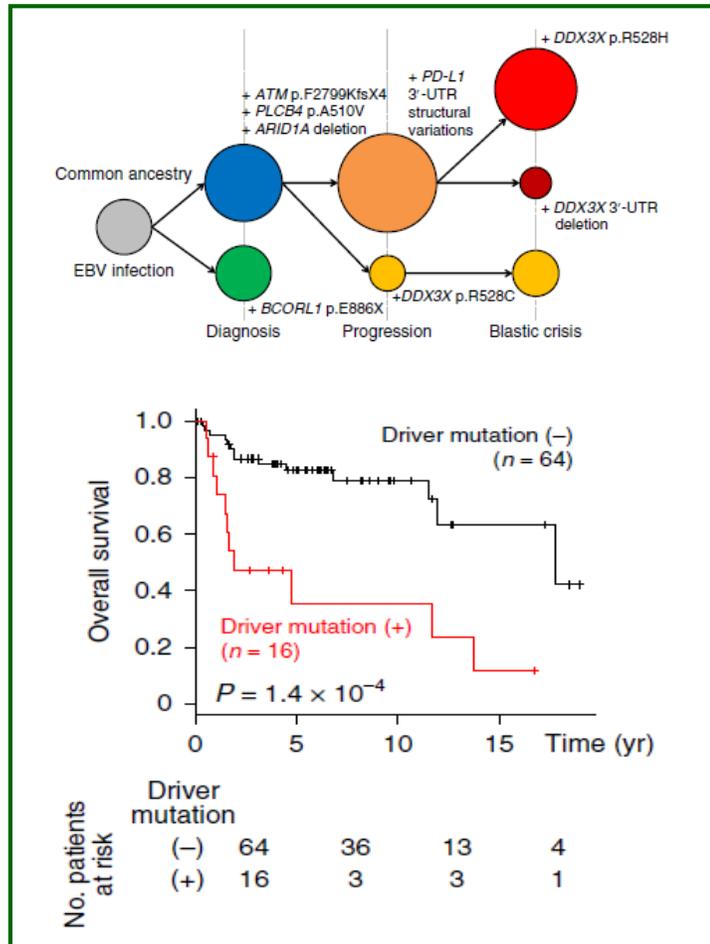
Table 1. Mutations/variations in immune-related genes detected in patients with Epstein–Barr virus (EBV)-positive T/NK-cell lymphoproliferative disorders (LPDs).

Affected Gene	Type of Mutation/Variation	EBV-Related Manifestation	EBV-Unrelated Manifestation	Reference
GATA2	Haploinsufficiency due to uniallelic expression	HV-like LPD HLH	<i>Enterococcus faecium</i> bacteremia, infections with <i>Mycobacterium avium</i> complex and histoplasma; neutropenia, lymphopenia, reduced numbers of B cells and NK cells, hypogammaglobulinemia	[64]
	Heterozygous mutations (c.G28fs and p.H26P)	EBV-positive non-Hodgkin T-cell lymphoma	Pancytopenia	[71]
CD27	Homozygous mutation (c.G158A, p.C53Y)	EBV+ T-cell LPD developing into lymphoma	Oral ulcer, uveitis, recurrent non-EBV infections	[72]
FANCA	Homozygous mutation (c.190_191insT, p.E65RfsX5)	NK-cell-type CAEBV	Common variable immunodeficiency (hypogammaglobulinemia, sinusitis)	[73]
IL2RG	Hemizygous hypomorphic point mutation (c.C982T, p.R328*)	EBV-positive $\gamma\delta$ T-cell LPD	Recurrent respiratory infection, <i>Yersinia enterocolitica</i> , infection with <i>Haemophilus influenzae</i> Low T-cell count, complement deficiency (C2, C9), reduced mitogen-induced proliferation, dysgammaglobulinemia	[74]
SH2D1A	Hemizygous hypomorphic mutation/variation (c.G7T, p.A35)	NK-cell-type CAEBV (indolent), photosensitivity, SMBA	No apparent immunodeficiency or other infections	[75]
XIAP	Hypomorphic mutation/variation (c.1045_1047delGAG, p.E349del)	NK/B-cell type CAEBV and SMBA in a hemizygous boy	No apparent immunodeficiency or other infections	[75]
		EBV-HLH following primary infection in a hemizygous boy	No apparent immunodeficiency or other infections	
TNFRSF9/PIK3CD	Homozygous LOF mutation in TNFRSF9 (c.170delG, p.G57fsX91); homozygous LOF mutation in PIK3CD (c.2462G > A, p. R821H)	NK/CD4+ T-cell type CAEBV and SMBA in a heterozygous woman	No apparent immunodeficiency or other infections	[76]
		T-cell type CAEBV, HV-like LPD, EBV-HLH	Recurrent respiratory and skin infections (panaritium and boils), no apparent signs of immunodeficiency	
TNFRSF9	Homozygous LOF mutation in TNFRSF9 (c.170delG, p.G57fsX91)	EBV+ T-cell lymphoproliferation without symptoms in the healthy sister of the patient described in the row above	No apparent signs of immunodeficiency	[76]

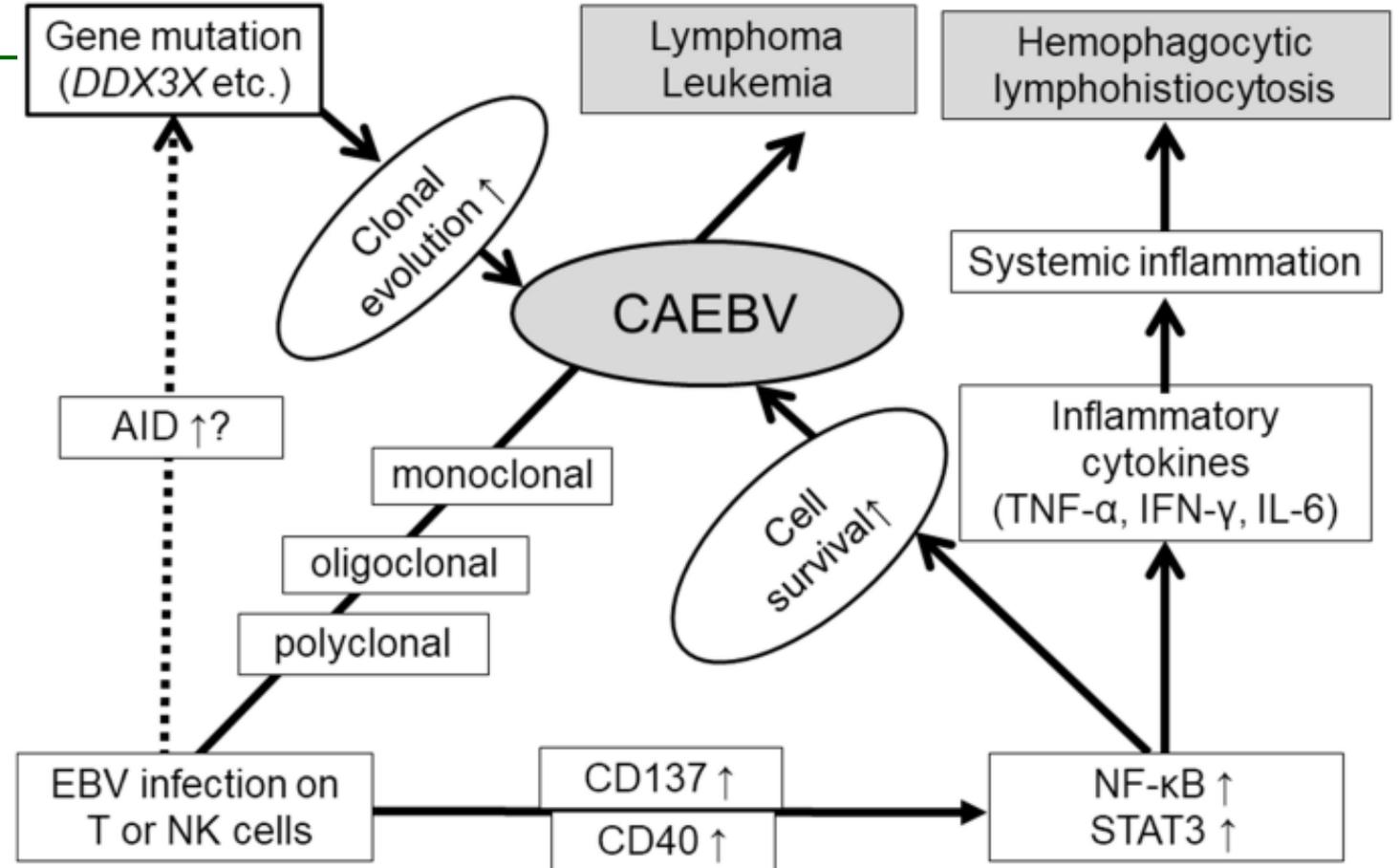
CAEBV: patogenesi



CAEBV: patogenesi



Okuno et al. Nat Microbiol 2019

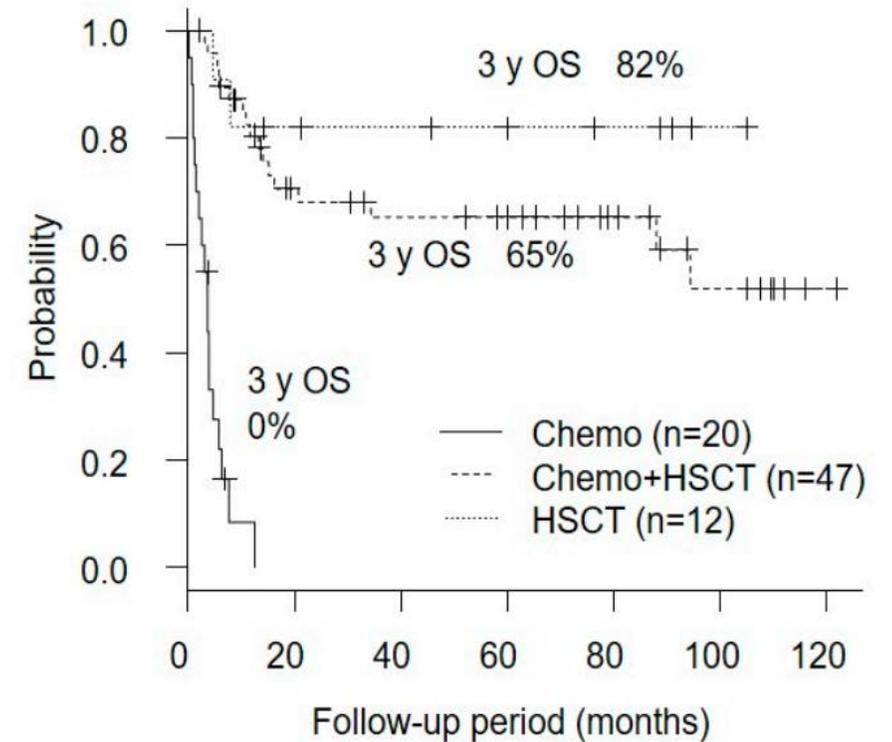


Arai. Microorganisms 2021

CAEBV: outcome

Table 1. Outcome of patients with chronic active EBV disease

Patient	Race/sex	Age at onset, y	Age at death, y	Outcome
Unknown whether B-, T-, or NK-cell disease				
1	WM	28	38	Died, LPD, MDS/acute myelomonocytic leukemia
2	WM	13	30	Died, infection
4	AF	11	14	Died, LPD, pneumonia
5	WM	22	23	Died, LPD, pulmonary thrombosis
B-cell disease				
3	WM	9	17	Died, progressive disease, disseminated candidiasis
6	WM	18	24	Died, progressive disease, <i>Aspergillus</i> pneumonia, brain abscess
7	BF	13	17	Died, B-cell lymphoma
8	WM	29	36	Died, cirrhosis (alcohol-related)
9	WM	17	Alive (37 y)	Alive 11 years after BMT, EBV negative
11	WF	20	31	Died, progressive disease
12	WM	51	Alive (64 y)	Alive 6 years after HSCT, EBV positive, mild GVHD, infections
13	WM	44	45	Died, central pontine myelinolysis after HSCT, residual B-cell lymphoma
14	AF	22	Alive (30 y)	Alive with B-cell LPD, 1 year after autologous EBV CTLs (LCL-specific and LMP1/2- specific cells)
16	WM	29	31	Died, residual B-cell lymphoma after HSCT × 3
17	HF	5	Alive (16 y)	Alive 6 years after HSCT, EBV negative
T-cell disease				
10	WF	9	15	Died, T-cell lymphoma
15	HM	8	Alive (15 y)	Alive 2 years after HSCT
18	AM	4	9	Died, 4 years after HSCT, T-cell lymphoma
NK-cell disease				
19	HM	7	Alive (14 y)	Alive 2 years after HSCT in complete remission



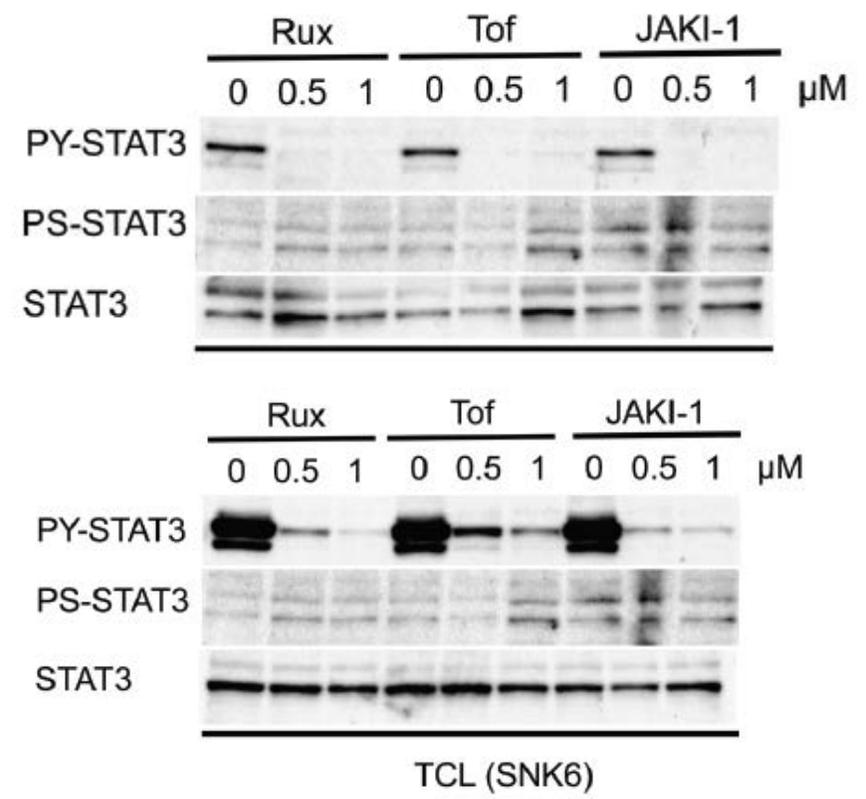
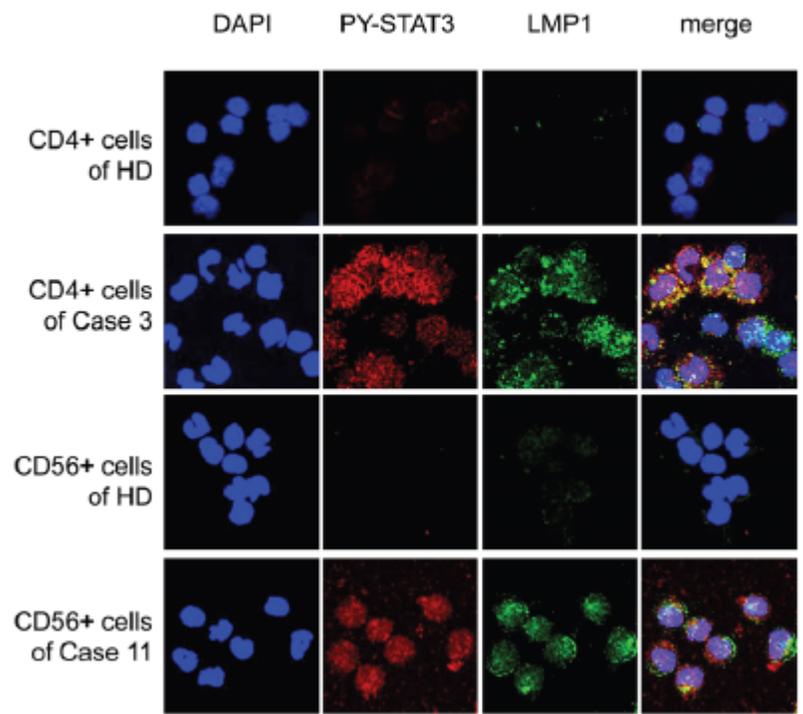
Cohen et al. Blood 2011

vivi 6/19

Arai. Microorganisms 2021

CAEBV: trattamenti in sperimentazione

Attivazione costitutiva di STAT3 in pz con CAEBV: inibizione dose-dipendente indotta da inibitori di JAK



Onozawa et al. Oncotarget 2018

Take home messages

- ✓ L'infezione cronica attiva da EBV è una patologia rara ma potenzialmente fatale e richiede pertanto uno stretto follow-up ed un trattamento tempestivo.
- ✓ Restano ancora molti interrogativi in merito alla fisiopatologia della CAEBV, e sui meccanismi attraverso cui l'EBV entra nei linfociti T ed NK.
- ✓ Ad oggi non è descritta una chiara componente genetica causativa della CAEBV, ma sono state evidenziate diverse mutazioni che in qualche modo contribuiscono a spiegare l'elevata eterogeneità del quadro. I nostri casi clinici rappresentano uno dei pochi casi descritti in letteratura di presenza di infezione cronica all'interno dello stesso nucleo familiare.
- ✓ Ad oggi l'unico trattamento curativo della patologia è rappresentato dal trapianto di cellule staminali ematopietiche: tuttavia la miglior comprensione di alcuni pathway molecolari coinvolti (NF-KB, STAT3 ad esempio), ha consentito di porre le basi per l'utilizzo di altri farmaci potenzialmente utili nel trattamento (Bortezomib, Ruxolitinib).