

JC-virus infektion och progressiv multifokal leukoencefalopati (PML) – bakgrundsdocumentation

Artiklar publicerade under rubriken Bakgrundsdocumentation är författarnas enskilda manuskript. Budskapet i dessa delas därför inte alltid av expertgruppen i sin helhet.

Progressiv multifokal leukoencefalopati (PML): Klinik och diagnostik

Fredrik Piehl

Progressiv multifokal leukoencefalopati (PML) vid behandling av multipel skleros (MS)

Fredrik Piehl

Progressiv multifokal leukoencefalopati (PML) i samband med hematologisk malignitet och transplantation

Per Ljungman

Progressiv multifokal leukoencefalopati (PML) vid hiv-infektion

Anders Thalme

Mikrobiologisk diagnostik av JC-virus infektion

Anna-Lena Hammarin

Progressiv multifokal leukoencefalopati (PML): Klinik och diagnostik

Fredrik Piehl

Bakgrund

Progressiv multifokal leukoencefalopati (PML) är en opportunistisk hjärn-infektion orsakad av JC-virus (JCV). PML är en fruktad komplikation vid sjukdomstillstånd eller behandlingar som nedsätter det cellulära immunförsvaret och medför betydande risk för död eller svårt bestående neurologiskt handikapp. Symptomen inkluderar vanligen kognitiva och/eller halvsidiga neurologiska kroppssymptom (motorik, syn, tal) eller mer sällan sensoriska eller cerebellära syndrom och utvecklas gradvis under veckor och månader. Magnetkamera och likvorundersökning utgör hörnstenar i diagnostiken. Beroende på bakomliggande orsak kan immunbriststillståndet i vissa fall reverseras, vilket leder till att infektionen kan bekämpas men också risk för ett immunrekonstitutionssyndrom som i sig kan vara livshotande. Tidig diagnostik och korrekt handläggning har därför mycket stor betydelse för utfallet vid PML.

Incidensen av PML är låg, i Sverige 0,026 per 100 000 personer och år 1988–2010, vilket steg till 0,11 under 2011–2013 (1), trots att drygt hälften av befolkningen potentiellt är bärare av JCV (2). Ett stort antal förvärvade cellulära immunbriststillstånd orsakade av hög ålder, sjukdom eller läkemedelsbehandling har kopplats till ökad risk för att utveckla PML. I den svenska incidensstudien var hematologisk malignitet och HIV/AIDS vanligaste associerade sjukdomstillstånd, följt av autoimmun sjukdom (1). Under senare år har kunskapen om PML ökat i takt med att ett flertal nyare immunomodulerande läkemedel har associerats med PML. Särskilt gäller detta natalizumab (Tysabri) som används för skovformad MS. Det utvecklingsarbete som gjorts för att identifiera individer med förhöjd risk att utveckla PML med denna behandling, övervakningsrutiner, diagnostik och handläggning av uppkomna fall har till stora delar relevans även för PML generellt (se avsnitt om PML vid behandling av MS).

Klinik

PML uppstår oftast i den kortexnära vita substansen i endera storhjärnskemisfären (vanligast hjäss-, nack- eller pannloberna). Mer sällan förekommer PML i hjärnbalken, lillhjärna eller med bilateralt engagemang. Den kliniska bilden styrs av lokalisationen och kan inkludera halvsidig motorisk nedsättning med fynd som vid övre motorneuronpåverkan, synfältspåverkan, talstör-

ning eller mer sällan sensorisk påverkan. Därutöver är kognitiva symptom med nedsättning av exekutiva funktioner, apati och minnesstörning mycket vanliga och en mer noggrann neuropsykologisk bedömning visar ofta på betydande kognitiva defekter. Partiella epileptiska anfall med eller utan sekundär generalisering är också vanligt förekommande. Symptomen utvecklar sig progressivt utan större fluktuationer över veckor och månader, snarare än timmar och dagar. I en studie av MS-patienter som följts med regelbundna MR-undersökningar av hjärnan kunde tidiga asymptomatiska lesioner påvisas retrospektivt i medeltal 5 månader före tidpunkt för diagnos och PML-lesionsvolymen tredubblades varje månad under den pre-symptomatiska fasen (3). Till skillnad från många andra infektioner i centrala nervsystemet saknas symptom som feber, huvudvärk och tecken till retning av hjärnhinnor (meningism) vid PML.

Diagnostik

Diagnosen PML kan ställas på bas av kliniska symptom och hjärnbiopsi, som utöver påvisande av JC-virus visar demyelinisering, atypiska astrocyter och förstörade cellkärnor i oligodendrocyter. Mer vanligt är dock att man använder likvordiagnostik (replikation av JCV visad med PCR) och stöd av neuroradiologi (4). Vid samtidig förekomst av typisk klinik och neuroradiologi samt påvisande av JCV DNA i likvor kan en definitiv diagnos ställas. Uppfylls vissa av parametrarna bedöms tillståndet som trolig eller möjlig PML.

Neuroradiologi

Vid klinisk misstanke om PML görs i normalfallet först en MR hjärna. De sekvenser som har störst nytta för att skilja PML från annan patologi är T2 flair- och diffusionsviktade sekvenser (3D T2WI-FLAIR och DWI). Ett bredare undersökningsprotokoll kan dock behövas för differentialdiagnostik mot andra tillstånd, särskilt om tidigare undersökning för jämförelse inte är tillgänglig, t ex det protokoll som antagits nationellt för utredning av MS (3D T1WI, SWI, DWI, samt efter kontrast; Axial T2WI, 3D T2WI-FLAIR, 3D T1WI) (5). Den typiska MR-bilden vid PML visar på enskilda eller multipla, delvis konfluerande >3 cm stora lesioner med dålig avgränsning mot vitsubstans, men med tydlig gräns mot grå substans (6). Mycket sällan ses masseffekt som tecken på svullnad. Lesionerna är intensivt högsignalerande på flair-viktade bilder och med

normal till sänkt signal på T1-viktning. Tidigare har man ansett att avsaknad av kontrast-laddning är typiskt för PML, men senare data visar att detta är relativt vanligt (7). Mönstret är dock högst variabelt (punktformat, nodulärt, linjärt och/eller perifert) och har inte den intensitet som vanligen förekommer vid akut inflammation eller metastaser. Om MR-undersökningen stärker misstanke om PML eller någon alternativ förklaring till de kliniska symptomen inte har kunnat fastställas görs i nästa steg likvorundersökning.

Likvordiagnostik

Provpanelen får anpassas individuellt beroende på den kliniska situationen, men bör vanligen inkludera celltal, albumin, IgG, albumin- och IgG-index och elfores. Normalt ses vid PML normala till lätt stegrade celltal och avsaknad eller endast lätta tecken till blod-hjärnbarriärdysfunktion. Därutöver kan diagnostik för andra virus (herpesvirusgruppen, CMV, TBE) liksom 14-3-3 protein övervägas. För diagnostik av JCV DNA skickas minst 0,2 mL likvor till t ex avdelningen för klinisk mikrobiologi vid Akademiska Sjukhuset i Uppsala eller Sahlgrenska Universitetssjukhuset i Göteborg. Detektionsgränsen är idag 50 kopior per mL och vid PML är vanligen viruskoncentrationen betydligt högre (10 000 – 100 000 kopior per mL). För MS patienter under behandling med natalizumab kan dock koncentrationen vara lägre (50 – 1000 kopior per mL), och ibland under detektionsgränsen. Vid fortsatt misstanke om PML bör uppföljande MR-undersökning med 3D T2WI-FLAIR och DWI-sekvenser liksom ny likvor göras inom några veckor.

Behandling

Specifik antiviral behandling mot JCV saknas. Alla behandlingsstudier har gjorts på patienter med hiv, och sammanställning av studierna presenteras under avsnittet "Progressiv multifokal leukoencefalopati (PML) vid hiv-infektion". Vid konstaterad PML beror den fortsatta handläggningen på underliggande orsak. I vissa tillstånd, t ex vid insättning av antiretroviral terapi hos patienter med HIV-associerad PML eller plasmaferes hos patienter med natalizumab-associerad PML, kan underliggande immunosuppression reverseras. I samband med det kan ett immunrekonstitutionssyndrom (immune reconstitution inflammatory syndrome; IRIS) uppkomma som i sig kan vara livshotande (8,9). Vid natalizumab-associerad PML har man vanligen använt sig av plasmaferes för att snabba på normaliseringen av immunsystemets funktioner, även om värdet av denna behandling i en nyligen genomförd meta-analys har ifrågasatts (9).

Referenser

1. Iacobaeus E, Burkill S, Bahmanyar S, et al. The national incidence of PML in Sweden, 1988-2013. *Neurology* 2018;90:e498-e506.
2. Olsson T, Achiron A, Alfredsson L, et al. Anti-JC virus antibody prevalence in a multinational multiple sclerosis cohort. *Mult Scler* 2013;9: 1533-8.
3. Scarpazza C, De Rossi N, Prosperini L, Cosottini M, Capra R, Gerevini S. Early diagnosis of PML: results from the Italian cohort. *ECTRIMS Online Library* 2017:P1206.
4. Berger JR, Aksamit AJ, Clifford DB, et al. PML diagnostic criteria: consensus statement from the AAN Neuroinfectious Disease Section. *Neurology* 2013;80:1430-8.
5. Vagberg M, Axelsson M, Birgander R, et al. Guidelines for the use of magnetic resonance imaging in diagnosing and monitoring the treatment of multiple sclerosis: recommendations of the Swedish Multiple Sclerosis Association and the Swedish Neuroradiological Society. *Acta Neurol Scand* 2017;135: 17-24.
6. Yousry TA, Pelletier D, Cadavid D, et al. Magnetic resonance imaging pattern in natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann Neurol* 2012;72: 779-87.
7. Wattjes MP, Vennegoor A, Steenwijk MD, et al. MRI pattern in asymptomatic natalizumab-associated PML. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2015;86:793-8.
8. Vermersch P, Kappos L, Gold R, et al. Clinical outcomes of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurology* 2011;76:1697-704.
9. Landi D, De Rossi N, Zagaglia S, et al. No evidence of beneficial effects of plasmapheresis in natalizumab-associated PML. *Neurology* 2017; 88:1144-52.

Progressiv multifokal leukoencefalopati (PML) vid behandling av multipel skleros (MS)

Fredrik Piehl

MS-behandling och PML

Multipel skleros (MS) utgör i sig inte en känd riskfaktor för utveckling av progressiv multifokal leukoencefalopati (PML), men flera idag använda sjukdomsmodulerande MS-behandlingar medför en ökad risk. Särskilt gäller det natalizumab (Tysabri), där 749 fall har rapporterats globalt på totalt 174 000 behandlade patienter och 599 734 patientår (Biogen MedInfo uppdaterad 2017-08-31; <https://medinfo.biogen.com>). Åtta av dessa fall har uppkommit i Sverige. Den ökade risken att insjukna med PML vid behandling med natalizumab har lett till ett intensivt utvecklingsarbete för att minimera riskerna med denna behandling, bland annat genom ett känsligt test för att detektera antikroppar mot JC virus (STRATIFY JCV DxSelect; Focus Diagnostics, Cypress, CA). Drygt hälften av den svenska MS populationen är positiv för anti-JCV antikroppar och andelen stiger med stigande ålder (1). Uppföljande studier har visat att risken för PML är låg för den andel av populationen som saknar antikroppar mot JCV (<1/1000 ackumulerad risk), men eftersom 2–10% konverterar till seropositiv status per år ska antikroppstiter kontrolleras två gånger per år. För de som har antikroppar stiger risken för PML med behandlingsduration med natalizumab och anti-JCV antikroppstiter (2). Andelen som är positiva för JCV vid testning med två-steps ELISA varierar mellan 50–70% (2). För JCV positiva individer påverkas risken av behandlingsduration, anti-JCV titrar i serum och tidigare immunosuppressiv behandling (vid MS ffa mitoxantron, azatioprin). För de som har de högsta titrarna ligger risken på drygt 8/1000 per två-års cykel efter de två första behandlingsåren, vilket stiger till 12–13/1000 för de som tidigare exponerats för immunosuppressiv terapi. Om fortsatt behandling med natalizumab är indicerad hos JC antikroppspositiva individer, särskilt de med titerindex >0,9, ska frekvent uppföljning med MR hjärna var 3–6:e månad övervägas för tidig diagnostik av PML, vilket är av avgörande betydelse för utfallet vid PML (3). Med tanke på den kumulativt ökande PML-risken med längre behandlingsduration, särskilt för personer med hög anti-JCV antikroppstiter, bör dock terapibyte starkt övervägas (4). Vid byte av behandling från natalizumab till annan sjukdomsmodifierande behandling ska MR hjärna göras i anslutning till bytet (se MS sällskapetets riktlinjer; www.mssallskapet.se/lakemedel.html). Utöver natalizumab har även behandling med fingolimod

(Gilenya; 13 rapporterade fall på 213 000 behandlade patienter) och dimetylfumarat (Tecfidera; fyra rapporterade fall på 270 000 behandlade patienter) kopplats till ökad risk för PML. För patienter behandlade med dimetylfumarat förefaller låga lymfocytantal (<0,6) vara en riskfaktor och utgör skäl för att överväga terapibyte. Det finns hittills inte någon indikation på att övriga behandlingar för MS medför ökad risk för PML. Rituximab är inte en godkänd behandling för MS, men används i stor utsträckning i Sverige på denna indikation. Totalt finns >400 kända fall av PML vid rituximab-behandling på ca 4 miljoner patienter, dock ingen vid MS. Baserat på data från användning av rituximab på reumatologisk indikation kan den årliga risken uppskattas till maximalt ca 1/30 000, men kan vara lägre för rituximab i monoterapi, då behandlingen på reumatologisk indikation ofta kombineras med orala immunosuppressiva läkemedel så som metotrexat.

PML-immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS)

Vid natalizumab-associerad PML kan tecken till inflammatorisk aktivering runt PML härdarna i hjärnan visualiseras med MR från omkring tre veckor efter start av plasmaferes, med nyttillkommen kontrastladdning och tecken till ödem. Beroende på volymen av PML-afficerad hjärnvävnad kan denna inflammatoriska reaktion variera stort i svårighetsgrad. I allvarliga fall uppkommer en mycket kraftig inflammation med påföljande ödem som pga masseffekt kan vara direkt livshotande. Puls-kurer med metylprednisolon (1g per dag i tre dagar) alternativt betametason kontinuerligt (upp mot 16 mg per dag) kan användas för att dämpa den akuta inflammatoriska fasen och risken för ödembildning. Eftersom IRIS kan uppkomma plötsligt bör monitorering med MR göras med korta intervall (var 3–5:e dag). Svår IRIS leder till kraftig klinisk försämring med ökade fokala och generella neurologiska funktionsbortfall. Feber är vanligt och det föreligger risk för status epilepticus, vilket motiverar vård på enhet med adekvat vårdnivå (neurologisk övervakningsavdelning/intensivvård).

Referenser

1. Olsson T, Achiron A, Alfredsson L, et al. Anti-JC virus antibody prevalence in a multinational multiple sclerosis cohort. *Mult Scler* 2013;19: 1533-8.

2. Plavina T, Subramanyam M, Bloomgren G, et al. Anti-JC virus antibody levels in serum or plasma further define risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann Neurol* 2014;76:802-12.
3. Vermersch P, Kappos L, Gold R, et al. Clinical outcomes of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurology* 2011;76:1697-704.
4. Alping P, Frisell T, Novakova L, et al. Rituximab versus fingolimod after natalizumab in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 2016;79:950-8.

Progressiv multifokal leukoencefalopati (PML) i samband med hematologisk malignitet och transplantation

Per Ljungman

Progressiv multifokal leukoencefalopati (PML) är en sällsynt komplikation hos patienter med hematologiska maligniteter. Kliniken skiljer sig inte från andra patientgrupper. De flesta fall har diagnostiserats efter allogen eller autolog stamcellstransplantation. Det går inte att uppskatta någon frekvens då inga välgjorda prospektiva eller retrospektiva studier har publicerats men det är sannolikt att hur man genomför transplantationen (konditionering, donatorval, stamcellskälla, immunsuppression) påverkar. Wittman et al beskrev i en retrospektiv studie två fall av PML i en population av 164 patienter varav en patient avled och en förbättrades vid utsatt immunsuppression (1). Å andra sidan i ett svenskt patientmaterial transplanterade vid Karolinska Universitetssjukhuset är frekvensen av PML lägre än 0,2% (opublicerad observation).

PML hos icke transplanterade patienter har främst diagnostiserats hos patienter med kronisk lymfatisk leukemi eller non-Hodgkin lymfom behandlade med purinanaloger, ibrutinib och/eller monoklonala antikroppar såsom rituximab eller alemtuzumab, medan det verkar vara mycket sällsynt hos patienter behandlade för akuta leukemier (2-5).

Det har inte beskrivits någon effektiv behandling för PML hos patienter med hematologisk malignitet eller efter stamcellstransplantation, dock brukar reduktion av immunsuppressionen rekommenderas om det är möjligt. En intressant möjlig behandling för svåra virusinfektioner efter stamcellstransplantation är att använda virus-specifika T-celler och kliniska studier pågår för närvarande för cellterapi av patienter med PML.

Referenser

1. Wittmann T, Horowitz N, Benyamini N, Henig I, Zuckerman T, Rowe JM, et al. JC polyomavirus reactivation is common following allogeneic stem cell transplantation and its preemptive detection may prevent lethal complications. *Bone Marrow Transplant* 2015;50:984-91.
2. Rey J, Belmecheri N, Bouayed N, Ivanov V, Coso D, Gastaut JA, et al. JC papovavirus leukoencephalopathy after first line treatment with CHOP and rituximab. *Haematologica* 2007;92:e101.
3. Gonzalez H, Bolgert F, Camporo P, Leblond V. Progressive multifocal leukoencephalitis (PML) in three patients treated with standard-dose fludarabine (FAMP). *Hematol Cell Ther* 1999;41:183-6.
4. Lane MA, Renga V, Pachner AR, Cohen JA. Late Occurrence of PML in a patient treated for lymphoma with immunomodulatory chemotherapies, bendamustine, rituximab, and ibritumomab Tiuxetan. *Case Rep Neurol Med* 2015;2015:892047.
5. Al-Tawfiq JA, Banda RW, Daabil RA, Dawamneh MF. Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) in a patient with lymphoma treated with rituximab: A case report and literature review. *J Infect Public Health*. 2015; 8:493-7.

Progressiv multifokal leukoencefalopati (PML) vid hiv-infektion

Anders Thalme

Bakgrund

Progressiv multifokal leukoencefalopati (PML) är en av de ovanligare opportunistiska infektionerna (oi) som ses bland hiv-infekterade. Den är vanligen associerad med avancerad immundefekt, i hiv sammanhang uttryckt som CD4 hjälparcells (CD4) nivåer under $200 \times 10^6/l$.

Hiv-populationen utgör patientgruppen med högst antal PML drabbade individer följt av patienter med hematologiska maligniteter och patienter behandlade med immunosuppressiva läkemedel för autoimmun sjukdom. Hiv-infekterade utgör den största gruppen immunosupprimerade, 36,7 miljoner hiv infekterade vid årsskiftet 2016-17 där 54% av vuxna har tillgång till antiretroviral behandling (cART = combination antiretroviral therapy) [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/en/ accessed 2/12 2017] men där resterande 17 miljoner obehandlade kommer utveckla succesivt mer avancerad immundefekt.

PML som beskrevs 1958, har observerats bland hiv positiva personer med ökande prevalens fram till introduktionen av effektiv cART 1996.

Under perioden innan cART fanns att tillgå beräknades prevalensen till 0,3 – 8% (1-3) kombinerat med en usel prognos med < 10% som överlevde ett år. I aktuella material är både prevalensen lägre och överlevnaden bättre. I en schweizisk kohortstudie (4) som inkluderar 186 pat med PML från 1988 – 2007 var prevalensen som högst 1993-95, 0,9%, med en PML associerad 1-års mortalitet på 82,3 / 100 patientår för att efter introduktion av cART 1996 och framåt sjunka till 0,1% med en 1-års mortalitet på 37,6 / 100 patientår. I ett spanskt material omfattande 72 patienter med PML mellan 1996 och 2011 sjönk incidensen från 14,8 fall /1000 patientår 1996 till 0,8 fall / 1000 patientår 2011, med en PML associerad mortalitet på 36%, varav två tredjedelar förekom bland obehandlade patienter.

På infektionskliniken Karolinska Huddinge som har hand om hiv-vården för ca 2000 patienter förekom det under 10 år, 2004 – 2014, 255 inläggningar relaterade till oi hos hiv-positiva patienter varav 6 med diagnos PML, vilket motsvarar en incidens i samma storleksordning som ovan (personligt meddelande Dr Axelsson, infektionskliniken Karolinska Universitetssjukhuset).

Hiv-populationen och risken för PML kan tidsmässigt delas upp i minst två faser, perioden innan 1995 då cART inte fanns att tillgå och perioden därefter då möjligheten att upphäva den hiv-orsakade immunosuppression kom men där behandling inte startats omedelbart efter hiv-diagnos. Sannolikt är vi nu i en tredje fas sedan 2015 då WHO rekommenderade att alla hiv positiva personer ska erbjudas behandling direkt efter diagnos.

Klinik

Kliniken karakteriseras liksom bland övriga PML populationer av en blandning av kognitiva och fokala neurologiska symtom beroende på lokalisationen av PML lesioner i det aktuella fallet. För beskrivning se det allmänna avsnittet.

Speciellt vid hiv-infektion

Utredningen inkluderar bestämning av T-cellsprofil för att avgöra grad av immundefekt, samt bestämning av hiv-RNA i både plasma och CSF. Vid signifikant viremi trots pågående cART beställ hiv-resistensbestämning för att utesluta resistens som orsak till virologisk svikt. Vid förekomst av hiv-viremi i CNS trots låga virusnivåer i plasma bör även resistensbestämning av hiv i CSF utföras och behandlingen anpassas därefter.

I en studie publicerad 2011 (5) har prognosen vid PML korrelerats till JC specifik T-cells medierad immunitet, analysen finns dock inte uppsatt som rutinmetod i Sverige.

PML-immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS)

En översikt publicerad 2017 (6) behandlar PML-IRIS hos 46 hiv positiva patienter med definitiv PML i artiklar publicerade mellan 1998 och 2016. Man skiljer där mellan unmasking IRIS (neurologiska symtom med debut efter cART start) och paradoxal IRIS med förvärrade neurologiska symtom efter cART. Man bedömer att PML-IRIS förekommer i ca 25% av hiv-associerad PML, och att diagnosen ska övervägas vid debut eller förvärrande av neurologiska symtom efter start eller återstart av cART. Slutsatsen i artikeln är att prognosen för AIDS associerad PML inte påverkas av förekomsten av IRIS, att etablerad behandling saknas men att steroider kan prövas vid svår PML-IRIS.

Behandling

Specifik antiviral terapi riktad mot JC saknas!

All behandling syftar därför till att reducera patientens immunosuppression vilket hos den hiv positiva patienten innebär att säkerställa att patienten erhåller effektiv cART med bra penetration till CNS.

I en öppen studie 2005-2006 (5) som utvärderade effekten av tidig ART inkluderande enfuvirtide med 5 preparat vid PML hos 28 patienter (12 ART naiva) förefaller tidig effektiv ART öka överlevnaden och den förbättrade överlevnaden är associerad med återhämtning av T-cellsvar riktad mot JCV och elimination av JCV från CSF. Ett kvarstående lågt CD4 tal och höga JCV nivåer vid diagnos utgör tvärtom riskfaktorer för död.

Med tanke på den dåliga prognosen för manifest PML även idag med tillgång till effektiv cART och att man in vitro kunnat visa antiviral effekt mot JCV för olika substanser finns fallbeskrivningar av olika försök till antiviral behandling riktad mot JCV, dock har inga av dessa behandlingar från fallbeskrivningarna senare kunnat konfirmeras i de kliniska prövningar som gjorts.

Det finns bara 5 publicerade prospektiva kliniska interventionsstudier sedan 1994 som studerar specifik behandling av PML:

1. Cytarabidine, Ara-C, 1994-97, 57 Hiv pos patienter med biopsi verifierad PML, 3 armar, ART vs ART + iv Ara-C vs ART + it Ara-C. Ingen skillnad i överlevnad mellan armarna (7)
2. Topotecan, 1997-99, planerade att ta in 54 hiv-pos patienter, 2 armar, omedelbar topotecan behandling vs 8 v fördröjd topotecan behandling. Endast 12 pat togs in, 10 fick omedelbar behandling, en fördröjd, 1 avled av överdos (topotecan). Inga konklusiva data (8)
3. Cidofovir, 1999, 24 patienter, 17 på cART, cidofovir iv vid baseline, vecka 1 och därefter varannan vecka i totalt 24 veckor. Bättre neurologiska resultat vecka 8 hos patienter med låga hiv-rna nivåer, kan betingas av cART eller cidofovir(9). Senare multicohort analys 2008 – ingen effekt av cidofovir (10)
4. Tidig ART inkluderande enfuvirtide – se ovan (5)
5. Mefloquine, 2008 – 2010, hiv pos och hiv neg patienter, 2 armar, Standard of Care (SOC) vs SOC + mefloquine, stoppad, interim analys ingen skillnad mellan grupperna (11)

Framtida behandlingar: Det finns i dagsläget ingen etablerad behandling, men många forskningslinjer. Dessa sammanfattas i två översikter om behandlingsalternativ för PML (12, 13)

Referenser

1. Berger JR, Kaszovitz B, Post MJ, Dickinson G. Progressive multifocal leukoencephalopathy associated with human immunodeficiency virus infection. A review of the literature with a report of sixteen cases. *Ann Internal Med* 1987;107:78-87.
2. Gillespie SM, Chang Y, Lemp G, Arthur R, Buchbinder S, Steimle A, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy in persons infected with human immunodeficiency virus, San Francisco, 1981-1989. *Ann Neurol* 1991; 30:597-604.
3. Martinez AJ, Sell M, Mitrovics T, Stoltenburg-Didinger G, Iglesias-Rozas JR, Giraldo-Velasquez MA, et al. The neuropathology and epidemiology of AIDS. A Berlin experience. A review of 200 cases. *Pathol, Res Pract* 1995; 191:427-43.
4. Khanna N, Elzi L, Mueller NJ, Garzoni C, Cavassini M, Fux CA, et al. Incidence and Outcome of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy over 20 Years of the Swiss HIV Cohort Study. *Clin Infect Dis* 2009;48: 1459-66.
5. Gasnault J, Costagliola D, Hendel-Chavez H, Dulioust A, Pakianather S, Mazet A-A, et al. Improved survival of HIV-1-infected patients with progressive multifocal leukoencephalopathy receiving early 5-drug combination antiretroviral therapy. *PLoS One* 2011;6: e20967.
6. Fournier A, Martin-Blondel G, Lechapt-Zalcman E, Dina J, Kazemi A, Verdon R, et al. Immune reconstitution inflammatory syndrome unmasking or worsening AIDS-related progressive multifocal leukoencephalopathy: A Literature Review. *Front Immunol* 2017;8: 577.
7. Hall CD, Dafni U, Simpson D, Clifford D, Wetherill PE, Cohen B, et al. Failure of cytarabine in progressive multifocal leukoencephalopathy associated with human immunodeficiency virus infection. *AIDS Clinical Trials Group 243 Team. N Engl J Med* 1998;338:1345-51.
8. Royal W, 3rd, Dupont B, McGuire D, Chang L, Goodkin K, Ernst T, et al. Topotecan in the treatment of acquired immunodeficiency syndrome-related progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurovirol.* 2003;9: 411-9.
9. Marra CM, Rajicic N, Barker DE, Cohen BA, Clifford D, Donovan Post MJ, et al. A pilot study of cidofovir for progressive multifocal leukoencephalopathy in AIDS. *AIDS* 2002;16:1791-7.
10. De Luca A, Ammassari A, Pezzotti P, Cinque P, Gasnault J, Berenguer J, et al. Cidofovir in addition to antiretroviral treatment is not

- effective for AIDS-associated progressive multifocal leukoencephalopathy: a multi-cohort analysis. *AIDS* 2008;22:1759-67.
11. Clifford DB, Nath A, Cinque P, Brew BJ, Zivadinov R, Gorelik L, et al. A study of mefloquine treatment for progressive multifocal leukoencephalopathy: results and exploration of predictors of PML outcomes. *J Neurovirol* 2013;19:351-8.
12. Loignon M, Toma E. Treatment options for progressive multifocal leukoencephalopathy in HIV-infected persons: current status and future directions. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2016;14:177-91.
13. Pavlovic D, Patera AC, Nyberg F, Gerber M, Liu M, Progressive multifocal leukoencephalopathy: current treatment options and future perspectives. *Ther Adv Neurol Disord* 2015; 8:255-73.

Mikrobiologisk diagnostik av JC-virus infektion

Anna-Lena Hammarin

Diagnostik av JC-virus

Infektion med JC-virus (JCV) är vanligt och seroprevalensen hos vuxna beräknas till 50–70 % (1-3), antalet seropositiva personer ökar med stigande ålder (1). Efter primärinfektionen som är asymtomatisk och vanligen sker i tidig skolålder etablerar JCV latens, huvudsakligen i njure och urinvägar. Det är inte ovanligt med asymtomatisk viruri, vilket ses hos cirka en tredjedel av infekterade immunkompetenta personer (4). Flera studier har även påvisat JCV/JCV DNA i lymfoproliferativ vävnad (benmärg, mjälte, tonsiller, lymfknutor samt i B-lymfocyter (5-10). JCV DNA har även påvisats i astrocyter och oligodendrocyter i normal hjärnvävnad (11, 12).

Vid immunosuppression, framför allt vid cellulär immunbrist, kan latent JCV reaktiveras och då orsaka progressiv multifokal encephalopati (PML). Det har spekulerats om PML även kan vara resultatet av en primärinfektion, men majoriteten av data talar för att reaktivering (13, 14) är den övervägande orsaken.

JCV är ett dubbelsträngat naket DNA-virus vars cirkulära genom omfattar cirka 5 100 baspar. Genomet är indelat i tre regioner, en tidig, en sen samt en icke-kodande kontrollregion (non-coding control region, NCCR) som bland annat omfattar startsekvensen för virus DNA-replikation. Den tidiga regionen kodar för de regulatoriska proteinerna; stora T antigenet, lilla t-antigenet samt tre mindre "splice" varianter av t-antigenet vilka bland annat är involverade i replikation, genreglering och transformation. Den sena regionen av genomet kodar för de strukturella proteinerna VP1, VP2, VP3 samt agnoproteinet (15, 16). Baserat på helgenomsekvensering och typning av specifika områden i genen för VP1 kan JCV indelas i genotyper.

JCV förekommer i två olika former. Den form som påvisas i hjärnan hos PML-patienter har ett genetiskt förändrat DNA jämfört med det JCV som efter primärinfektionen etablerar latens i njuren. Det virus som påvisas i hjärna/likvor hos PML-patienter benämns "PML-typ", det virus som etablerar latens i njure och urinvägar kallas "arketyp". Skillnaden mellan dessa två genetiskt skilda varianter är ett antal duplikationer, deletioner och/eller kombinationer av båda i NCCR (16-18). Arketypen har inte förmåga att effektivt replikera i oligodendrocyter utan måste genomgå en mutation för att bli neurotropt. Hur, var och när den genetiska "förändringen" sker är inte helt klarlagt. B-celler anses spela en viktig roll och flera studier pekar på att "förändringen"

från arketyp till PML-typ sker i B-cellerna som sedan transporterar neurotropt JCV till hjärnan (16, 19). Även mutationer som påverkar receptorspecificiteten i det strukturella proteinet VP1 tros spela roll för utveckling av PML (20).

Diagnostik vid misstanke om PML

En definitiv diagnos av PML kräver histopatologisk undersökning av hjärnvävnad med karakteristiska fynd såsom demyelinisering, förstörade "bisarra" astrocyter och förstörade oligodendrocyter med inklusioner i kärnan (21) samt påvisning av JCV-protein och/eller JCV DNA i hjärmaterial/likvor (22). Diagnosen kan även baseras på klinik, karakteristiska fynd vid neuro-radiologisk undersökning (MR) samt detektion av JCV DNA i likvor (23), en så kallad "laboratorie-verifierad" diagnos. En laboratorieverifierad diagnos anses dock ha en lägre "tyngd" än en histopatologiskt verifierad diagnos beroende på varierande specificitet och sensitivitet hos de PCR-system som finns på olika laboratorier (23).

Påvisning av virusprotein och virus-nukleinsyra i hjärnmaterial/likvor

Det finns en rad olika tekniker beskrivna för påvisning av JCV protein/DNA. JCV protein kan påvisas i hjärnvävnad med immunhistokemi och/eller Western blot-teknik, JCV DNA i hjärnvävnad eller likvor kan påvisas med *in situ* hybridisering och/eller PCR (24). Majoriteten av de metoder som används i dag för påvisning av JCV DNA i likvor är kvantitativ PCR (qPCR) (25, 26, 27, 28). I Sverige är det i dagsläget en handfull laboratorier som kan erbjuda qPCR för JCV DNA, både kitbaserade metoder och in-house-analyser används. Generellt är metoderna validerade för flera olika provmaterial såsom urin, serum, plasma, likvor och hjärnmaterial.

Specificitet

En utmaning vid etablering av qPCR är att hitta en unik sekvens för JCV då JCV delar cirka 75% av genomet med BK-virus (BKV) (15), vilket begränsar antalet unika bindningsställen för primers och probe och korstest mot BKV måste alltid ingå vid validering av qPCR för JCV. Förutom agensspecificitet måste primers och prober vara riktade mot en konserverad del av genomet gemensam för samtliga kända genotyper (27). Att analysen detekterar samtliga genotyper är viktigt för att undvika falskt negativa resultat (28).

Sensitivitet

En annan utmaning är att ha tillräckligt hög känslighet då mängden JCV DNA i likvor kan vara mycket låg trots PML. Hos immunsupprimerade patienter med låga CD4-värden (<200 celler/ mm^3) ses vanligen höga nivåer ($\geq 10^4$ - 10^5 genom/mL) av JCV DNA i likvor (27), till skillnad från patienter med terapiinducerad immundefekt som generellt har låga nivåer ($\leq 10^3$ genom/mL) (29). För att öka känsligheten har flera av de qPCR-protokoll som finns publicerade ett koncentrationssteg inlagt vid den inledande DNA-extraktionen (30, 31).

Negativt analysvar avseende JCV DNA i likvor men fortsatt klinisk misstanke

Generellt gäller att ett negativt PCR-resultat avseende JCV DNA i likvor inte utesluter PML och om den kliniska misstanken om PML kvarstår ska ytterligare (ett eller flera) likvorprov undersökas. Detta gäller framför allt om provet är taget tidigt i sjukdomsförloppet eller hos patienter med lågradig immunsuppression (32, 33, 34). I fall där den kliniska misstanken kvarstår och MR talar för PML men upprepade analyser med PCR visar ett negativt resultat kan undersökning av hjärnvävnad (biopsi) ge diagnosen (35, 36).

JCV DNA och protein i hjärna/likvor hos icke PML patienter

Flera studier har påvisat JCV/JCV DNA i hjärna och/eller likvor hos patienter utan tecken på PML (37-42). I en studie av Iacobaeus et al kunde låg mängd JCV DNA (10^3 respektive 25 genom/mL) påvisas i likvor hos 2 av 515 patienter utan PML (30). Förekomst av JCV DNA i hjärnmaterial eller likvor hos patienter utan tecken på PML har dock ifrågasatts i andra studier där man inte kunnat verifiera förekomst av JCV i hjärnmaterial och/eller JCV DNA i likvor (43-47). Dessa divergerande data har medfört en viss försiktighet vid tolkningen av positivt PCR-svar i likvor. Då JCV DNA dessutom kan påvisas i blod hos vissa patienter kan blodkontaminerade likvorprov visa "falskt" positivt resultat.

Påvisning av JCV DNA i plasma

Hos kraftigt immunsupprimerade patienter är det inte ovanligt med påvisbart JCV DNA i plasma, däremot är det ovanligt med JCV viremi hos immunkompetenta (2, 8, 49, 50). Påvisning av JCV DNA i serum/plasma är framför allt korrelerat till immunsuppression och kan inte användas som markör för PML (2, 49-51). JCV DNA som detekteras i serum kan vara av arketyp eller PML-typ. I en studie av Pfister et al (52) visades att JCV DNA av PML-typ i plasma korrelerade till dålig prognos hos patienter med PML.

Förekomst av JCV DNA i urin

Asymtomatisk utsöndring av JCV i urin är relativt vanligt. Det virus som påvisas i urin, även hos PML-patienter, är generellt av arketyp och inte associerat till PML (4, 53, 54). Dock har Chen et al (12) påvisat den neurotrofa formen av JCV DNA i urin hos åtta patienter som utvecklade viruri under behandling med natalizumab. Glekaprevir (GLE) är en hämmare av NS3/4A, och Pibrentasvir (PIB) av NS5A. Läkemedlen finns endast som fixdos-produkt.

Antikroppsdiagnostik

Vid PML har påvisning av antikroppar mot JCV tidigare ansetts ha ett begränsat värde och under många år har analysen inte efterfrågats. De senaste åren har dock antikroppspåvisning visats vara viktig inför behandling med immunmodulerande preparat, då fynd av antikroppar visar på förekomst av latent virus och "uppmanar" till en ökad vaksamhet vid behandling (55). Flera studier har också visat värdet av antikroppspåvisning för att estimerar risken för patienter som behandlas med natalizumab att utveckla PML. Höga antikroppsnivåer skyddar inte mot PML, snarare kan de vara associerade till ökad risk (56-62). Antikroppsdiagnostik finns i dag inte tillgängligt på något laboratorium i Sverige, däremot utförs analysen på Unilabs i Köpenhamn men då endast för de patienter som står inför behandling eller behandlas med natalizumab (Tysabri).

Intratekala antikroppar – diagnostiskt värde

Påvisning av intratekala antikroppar vid misstanke om PML har i ett flertal studier (60, 63) visats kunna föregå förekomst av JCV DNA i likvor. I en fallbeskrivning av Kuhle et al (64), kunde JCV DNA inte påvisas i likvor hos en MS-patient med misstänkt PML, trots upprepade försök, däremot påvisades intratekala antikroppar. PML-diagnosen fastställdes senare med realtids-PCR på hjärnvävnad. Vid analys av intratekala antikroppar måste kontroller fastställa att antikropparna är producerade intracerebralt och inte härstammar från ett läckage över blod-hjärnbarriären.

Referenser

1. Knowles WA, Pipkin P, Andrews N, et al. Population-based study of antibody to the human polyomaviruses BKV and JCV and the simian polyomavirus SV40. *J Med Virol* 2003;71:115-123.
2. Egli A, Infanti L, Dumoulin A, et al. Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *J Infect Dis* 2009;199:837-846.

3. Stolt A, Sasnauskas K, Koskela P, et al. Sero-epidemiology of the human polyomaviruses. *J Gen Virol* 2003;84:1499-504.
4. Hirsch HH, Kardas P, Kranz D, et al. The human JC polyomavirus (JCPyV): virological background and clinical implications. *APMIS* 2013;121:685-727.
5. Grinnell BW, Padgett BL, Walker DL. Distribution of nonintegrated DNA from JC papovavirus in organs of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Infect Dis*. 1983;147:669-675.
6. Caldarelli-Stefano R, Vago L, Omodeo-Zorini E, et al. Detection and typing of JC virus in autopsy brains and extraneural organs of AIDS patients and non-immunocompromised individuals. *J Neurovirol* 1999;5:125-33.
7. Monaco MC, Atwood JW, Gravell M, et al. JC virus infection of hematopoietic progenitor cells, primary B lymphocytes, and tonsillar stromal cells: implications for viral latency. *J Virol* 1996;70:7004-12.
8. Tornatore C, Berger JR, Houff SA, et al. Detection of JC virus DNA in peripheral lymphocytes from patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann Neurol* 1992;31:454-462.
9. Atwood WJ, Amemiya K, Traub R, et al. Interaction of the human polyomavirus, JCV, with human B-lymphocytes. *Virology* 1992;190:716-23.
10. Dorries K, Vogel E, Gunther S, et al. Infection of human polyomaviruses JC and BK in peripheral blood leukocytes from immunocompetent individuals. *Virology* 1994;198:59-70
11. Perez-Liz G, Del Valle L, Gentilella A, et al. Detection of JC virus DNA fragments but not proteins in normal brain tissue. *Ann Neurol* 2008;64:379-387.
12. Chen Y, Bord E, Tompkins T, et al. Asymptomatic reactivation of JC virus in patients treated with natalizumab. *N Engl J Med* 2009;361:1067-74.
13. Steiner I, Berger JR. Update on progressive multifocal leukoencephalopathy. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2012;12:680-686.
14. Tan CS, Koralnik IJ. Progressive multifocal leukoencephalopathy and other disorders caused by JC virus: clinical features and pathogenesis. *Lancet Neurol*. 2010;9:425-437.
15. Frisque RJ, Bream GL, Cannella MT. Human polyomavirus JC virus genome. *J Virol* 1984;51:458-69.
16. Ferenczy MW, Marshall LJ, Nelson CDS, et al. Molecular biology, epidemiology, and pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain. *Clin Microbiol Rev* 2012;25:471-506.
17. Martin JD, King DM, Slauch JM, et al. Differences in regulatory sequences of naturally occurring JC virus variants. *J Virol* 1985;53:306-11.
18. Jensen PN, Major EO. A classification scheme for human polyomavirus JCV variants based on the nucleotide sequence of the noncoding regulatory region. *J Neurovirol* 2001;7:280-87.
19. Chapagain ML, Nerurkar VR. JCV infection of human B lymphocytes: A possible mechanism for JCV transmigration across the blood-brain barrier. *J Infect Dis* 2010;15:184-191.
20. Sunyaev SR, Lugovskoy A, Simon K, et al. Adaptive mutations in the JC virus protein capsid are associated with progressive multifocal leukoencephalopathy (PML). *PLoS Genet* 2009;5:e1000368.
21. Åstrom KE, Mancall EL, Richardson EP. Progressive multifocal leukoencephalopathy; a hitherto unrecognized complication of chronic lymphatic leukaemia and Hodgkin's disease. *Brain* 1958;81:93-111.
22. Berger JR, Aksamit AJ, Clifford DB, et al. PML diagnostic criteria. Consensus statement from the AAN Neuroinfectious Disease Section. *Neurology* 2013;80:1430-1438.
23. White MK, Sariyer IK, Gordon J, et al. Diagnostic assays for polyomavirus JC and progressive multifocal leukoencephalopathy. *Rev Med Virol* 2016; 26:102-14.
24. Ryschkewitsch C, Jensen P, Hou J et al. Comparison of PCR-southern hybridization and quantitative real-time PCR for the detection of JC and BK viral nucleotide sequences in urine and cerebrospinal fluid. *J Virol Methods* 2004;121:217-21.
25. Bossolasco S, Calori G, Moretti F et al. Prognostic significance of JC virus DNA in cerebrospinal fluid of patients with HIV-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Clin Infect Dis* 2005;40:738-44.
26. Pal A, Sirota L, Maudru T, et al. Real-time, quantitative PCR assays for the detection of virus-specific DNA in samples with mixed populations of polyomaviruses. *J Virol Methods* 2006;135:32-42.
27. Glass AJ, Venter M. Improved detection of JC virus in AIDS patients with progressive multifocal leukoencephalopathy by T-antigen specific fluorescence resonance energy transfer hybridization probe real-time PCR: Evidence of diverse JC virus

- genotypes associated with progressive multifocal leukoencephalopathy in Southern Africa. *J Med Virol* 2009;81:1929-1937.
28. Landry ML, Eid T, Bannykh S, et al. False negative PCR despite high levels of JC virus DNA in spinal fluid: Implications for diagnostic testing. *J Clin Virol* 2008;42:247-249.
 29. Lindå H, von Heijne A, Major EO, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy after natalizumab monotherapy. *N Engl J Med* 2009;361:1081-87.
 30. Iacobaeus E, Ryschkewitsch C, Gravel M, et al. Analysis of cerebrospinal fluid and cerebrospinal fluid cells from patients with multiple sclerosis for detection of JC virus DNA. *Mult Scler* 2009;15:28-35.
 31. Berger JR, Clifford DB. The manifold faces of PML and the challenge of diagnosis. *Neurology* 2011;77:2006-2007.
 32. Kuhle J, Gosert R, Buhler R, et al. Management and outcome of CSF-JC virus PCR-negative PML in a natalizumab-treated MS patient. *Neurology* 2011;77:2010-2016.
 33. Maas RP, Muller-Hansma AHG, Esselink RAJ, et al. Drug-associated progressive multifocal leukoencephalopathy: a clinical, radiological, and cerebrospinal fluid analysis of 326 cases. *J Neurol* 2016;263:2004-2021.
 34. Gheusens S, Pierone G, Peeters P et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy in individuals with minimal or occult immune-suppression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010;81:247-254.
 35. Ikeda J, Matsushima A, Ishii W, et al. Brain Biopsy Is More Reliable than the DNA test for JC Virus in cerebrospinal fluid for the diagnosis of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Intern Med* 2017;56:1231-1234.
 36. White MK, Khalili K. Pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy - Revisited. *J Infect Dis* 2011;203:578-586.
 37. Tan CS, Ellis LC, Wuthrich, et al. JC Virus Latency in the brain and extraneural organs of patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Virol* 2010;84:9200-9209.
 38. McGuire D, Barhite S, Hollander H, et al. JC virus DNA in cerebrospinal fluid of human immunodeficiency virus-infected patients: Predictive value for progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann Neurol* 1995;37:395-399.
 39. Ferrante P, Omodeo-Zorini E, Caldarelli-Stefano R, et al. Detection of JC virus DNA in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 1998;4:49-54.
 40. Mori M, Kurata H, Tajima M, et al. JC virus detection by in situ hybridization in brain tissue from elderly patients. *Ann Neurol* 1991;29:428-432.
 41. Delbue S, Tadeo CS, Elia F, et al. JC virus replication at the first symptoms of multiple sclerosis: a case report. *Intervirology* 2015;58:278-282.
 42. Alvarez-Lafuente R, Garcia-Montojo M, De Las Heras V, et al. JC virus in cerebrospinal fluid samples of multiple sclerosis patients at the first demyelinating event. *Mult Scler* 2007;13:590-595.
 43. Telenti A, Aksamit AJ Jr, Proper J, et al. Detection of JC virus DNA by polymerase chain reaction in patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Infect Dis* 1990;162:858-861.
 44. Bogdanovich G, Hammarin A-L, Grandien M, et al. No association of JC virus with Alzheimer's disease or astrocytomas. *Clin Diag Virol* 1995;4:223-230.
 45. Khalili K. Human neurotropic JC virus and its association with brain tumors. *Dis Markers* 2001;17:143-147.
 46. Procop GW, Beck RC, Pettay JD, et al. JC virus chromogenic in situ hybridization in brain biopsies from patients with and without PML. *Diagn Mol Pathol* 2006;15:70-73.
 47. Bogdanovic G, Priftakis P, Hammarin A-L, et al. Detection of JC virus in cerebrospinal fluid (CSF) samples from patients with progressive multifocal leukoencephalopathy but not in CSF samples from patients with herpes simplex encephalitis, enteroviral meningitis, or multiple sclerosis. *J Clin Microbiol* 1998;36:1137-1138.
 48. Dubois V, Dutronc H, Lafon ME, et al. Latency and reactivation of JC virus in peripheral blood of human immunodeficiency virus type 1-infected patients. *J Clin Microbiol* 1997;35:2288-2292.
 49. Koralnik IJ, Boden D, Mai VX, et al. JC virus DNA load in patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurology* 1999;52:253-60.
 50. Rudick RA, O'Connor PW, Polman CH, et al. Assessment of JC virus DNA in blood and urine from natalizumab-treated patients. *Ann Neurol* 2010;68:304-310.
 51. Viscidi RP, Khanna N, Tan CS, et al. JC virus antibody and viremia as predictors of progressive multifocal leukoencephalopathy in human immunodeficiency virus-1-infected individuals. *Clin Inf Dis* 2011;53:711-715.
 52. Pfister L-A, Letvin NL, Koralnik IJ. JC virus regulatory region tandem repeats in plasma and central nervous system isolates correlate with poor clinical outcome in patients

- with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Virol* 2001;75:5672–76.
53. Van Loy T, Thys K, Ryschkewitsch C, et al. JC Virus quasispecies analysis reveals a complex viral population underlying progressive multifocal leukoencephalopathy and supports viral dissemination via the hematogenous route. *J Virol* 2015;89:1340-1347.
54. Reid CE, Li H, Sur G, et al. Sequencing and Analysis of JC virus DNA from natalizumab-treated PML patients. *J Inf Dis* 2011;204:237-244.
55. Kardas P, Leboeuf C, Hirsch HH. Optimizing JC and BK polyomavirus IgG testing for seroepidemiology and patient counseling. *J Clin Microbiol* 2015;71:28-33.
56. Gorelik L, Lerner M, Bixler S, et al. Anti-JC virus antibodies: implications for PML risk stratification. *Ann Neurol* 2010;68:295–303.
57. Bloomgren G, Richman S, Hotermans C, et al. Risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med* 2012;366:1870-1880.
58. Berger JR, Miller CS, Danaher RJ, et al. Distribution and quantity of sites of John Cunningham virus persistence in immunologically healthy patients: correlation with John Cunningham virus antibody and urine John Cunningham virus DNA. *JAMA Neurol* 2017;74: 437-444.
59. Ho PR, Koendgen H, Campell N, et al. Risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with multiple sclerosis: a retrospective analysis of data from four clinical studies. *Lancet Neurol* 2017;16:925-933.
60. Reuwer AQ, Heron M, van der Dussen D, et al. The clinical utility of JC virus antibody index measurements in the context of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Acta Neuro Scand* 2017;136 (Suppl 201): 37-44.
61. Schwab N, Schneider-Hohendorf T, Pignolet B, et al. Therapy with natalizumab is associated with high JCV seroconversion and rising JCV index values. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2016;3:e195.
62. Vennegoor A, van Rossum JA, Leurs C, et al. High cumulative JC virus seroconversion rate during long-term use of natalizumab. *Eur J Neurol* 2016;23:1079-1085.
63. Warnke C, Geldern G, Markwerth P, et al. Cerebrospinal Fluid JC Virus Antibody Index for Diagnosis of Natalizumab-Associated Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *Ann Neurol* 2014;76:792–801.
64. Kuhle J, Gosert R, Buhler R, et al. Management and outcome of CSF-JC virus PCR-negative PML in a natalizumab-treated MS patient. *Neurology* 2011;77:2010–2016.