

**UNIVERZITA KARLOVA**

**Lékařská fakulta v Hradci Králové**

**DISERTAČNÍ PRÁCE**

**Eva Vejražková**

**2019**

Doktorský studijní program

**Vnitřní nemoci**

**Problematika CMV infektu u pacientů po alogenní  
transplantaci krvetvorných kmenových buněk**

**Human Cytomegalovirus Infection in Patients after  
Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation**

**MUDr. Eva Vejražková**

Školitel: doc. MUDr. Pavel Žák, Ph.D.

Školitel konzultant: MUDr. Petr Hubáček, Ph.D.

Hradec Králové 2019

## **Prohlášení autora**

---

### **Prohlášení:**

Prohlašuji tímto, že jsem tuto doktorskou dizertační práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby byla tato práce uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy.

**Hradec Králové, 28. 3. 2019**

**podpis autora**

## Poděkování

Děkuji svým školitelům doc. MUDr. P. Žákovi, Ph.D., a MUDr. P. Hubáčkovi, Ph.D., za odborné vedení práce, materiální zajištění laboratorního vyšetření a pomoc v průběhu mého postgraduálního studia. Děkuji PharmDr. L. Plíškové, Mgr. R. Kutové, Mgr. R. Bolehovské, Ph.D., za opakované konzultace, zavedení metodiky do praxe a celému úseku molekulárních metod ústavu Klinické biochemie a diagnostiky za provedené sekvenční analýzy CMV kmenů. Děkuji panu J. Vejražkovi za sestavení softwaru na detekci změn mutací, vytvoření databáze dat, za výsledky univariantní analýzy, a veškerou pomoc, podporu a trpělivost, kterou mne zahrnuje. Děkuji MUDr. V. Štěpánové, Ph.D., za pomoc a neutuchající podporu. Děkuji za prvotní seznámení se statistikou MUDr. M. Košťálovi, Ph.D., a Ing. M. Menšíkovi, Ph.D. Děkuji paní RNDr. E. Čermákové za obětavou pomoc s výpočty a interpretací výsledků multivariantní analýzy. Dále děkuji za konzultace a připomínky prof. RNDr. J. Krejskovi, CSc., MUDr. T. Rozkošovi, Ph.D., MUDr. P. Kosinovi, Ph.D. Děkuji paní Mgr. K. Čebišové za jazykovou korekturu textu. Děkuji za pomoc paní M. Židové a paní M. Stradiotové.

## Obsah

Použité zkratky .....	7
1. Úvod do problematiky .....	9
1.1 CMV – biologické vlastnosti .....	9
1.2 Epidemiologie CMV .....	10
1.3 Patogeneze CMV .....	11
1.4 CMV imunologie .....	13
1.5 Diagnostika CMV .....	14
1.6 CMV profylaxe, léčba .....	15
1.7 Klinická a virová rezistence na léčbu .....	18
2. Cíle dizertační práce .....	22
3. Soubor nemocných, metodika, statistická analýza .....	24
3.1 Pacientský soubor .....	25
3.1.1 Podskupina pacientů v přípravném transplantačním režimu fludarabin/ busulfan/thymoglobulin s dávkováním thymoglobulinu 7,5 vs. 6 mg/kg .....	28
3.2 Detekce CMV infekce .....	31
3.3 Sekvenační analýza .....	33
3.3.1 Porovnání metod sekvenační analýzy podle Sangera a sekvenování nové generace u pacientů s prokázanou virovou rezistencí .....	35
3.4 Schéma léčby CMV .....	36
3.5 Statistická analýza .....	37
4. Vlastní výsledky .....	38
4.1 CMV reaktivace/primoinfekce a její léčba .....	38
4.2 Podání thymoglobulinu 7,5 vs. 6 mg/kg v rámci přípravného režimu fludarabin/busulfan/thymoglobulin .....	47
4.3 Klinická a virová rezistence na ganciclovir .....	50
4.4 Sekvenační analýza CMV DNA u pacientů s prokázanou virovou rezistencí podle Sangerovy metody a NGS .....	54

5. Diskuze .....	57
5.1 CMV reaktivace/primoinfekce po HSCT .....	57
5.2 Podání thymoglobulinu 7,5 vs. 6 mg/kg v rámci přípravného režimu fludarabin/busulfan/thymoglobulin .....	61
5.3 Klinická a virová rezistence na ganciclovir.....	63
5.4 Sekvenční analýza metodou podle Sangera a NGS .....	66
6. Závěry .....	67
7. Literatura.....	71
8. Přílohy.....	93

## Použité zkratky

95% CI	95% interval spolehlivosti (Confidence Interval)
CID	Cidofovir
CMV	Lidský cytomegalovirus
cp/ml	Počet kopií cytomegalovirové DNA v 1 mililitru periferní krve
ČR	Česká republika
D	Den/dní po transplantaci krvetvorných kmenových buněk
D <sup>-</sup> /R <sup>-</sup>	CMV sérostatus: séronegativní dárce i příjemce krvetvorných kmenových buněk
D <sup>-</sup> /R <sup>+</sup>	CMV sérostatus: CMV séronegativní dárce a séropozitivní příjemce krvetvorných kmenových buněk
D <sup>+</sup> /R <sup>-</sup>	CMV sérostatus: CMV séropozitivní dárce a séronegativní příjemce krvetvorných kmenových buněk
D <sup>+</sup> /R <sup>+</sup>	CMV sérostatus: CMV pozitivní dárce i příjemce krvetvorných kmenových buněk
FNHK	Fakultní nemocnice v Hradci Králové
FOS	Foscarnet
GCV	Ganciclovir
GVHD	Reakce štěpu proti hostiteli (Graft versus Host Disease)
HLA	Lidský hlavní histokompatibilní komplex (Human Leukocyte Antigen)
HSCT	Transplantace krvetvorných kmenových buněk (Haematopoietic Stem Cell Transplantation)
NGS	Sekvenace nové generace (Next-Generation Sequencing)
OR	Poměr šancí (Odds Ratio)
PCR	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)

R <sup>2</sup>	Koeficient determinace (R square)
TG	Thymoglobulin
μmol/l	mikromol/litr
VCGC	Valganciclovir
vs.	versus



## 1. Úvod do problematiky

První popis buňky infikované lidským cytomegalovirem (CMV) přinesl již v 80. letech 19. století německý profesor patologie Hugo Ribbert [1], který ve zvětšených buňkách slinných žláz a ledvin kojenců *post mortem* popsal typické intranukleární inkluze, které byly podobné struktuře prvoků [1, 2]. Goodpasture a Talbert vyslovili poprvé v roce 1921 teorii, že „cytomegalie“ by mohla být virového původu [1]. V 50. letech 20. století se zdařila izolace myšího i lidského CMV a původní název „virus slinné žlázy“ byl nahrazen termínem lidský cytomegalovirus [1, 3]. Jako druhý v Evropě v r. 1966 izoloval tento virus na buněčné kultuře lidských embryonálních fibroblastů MUDr. Jiří Horáček s kolektivem ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové (FNHK) [3]. Na základě odborné činnosti týkající se diagnostiky infekcí vyvolaných CMV byla v roce 1985 na Ústavu klinické mikrobiologie FNHK založena Národní referenční laboratoř pro CMV pod vedením prof. MUDr. J. Horáčka, CSc. Tato národní referenční laboratoř ve FNHK sídlí dodnes, pod vedením MUDr. Vlasty Štěpánové, Ph.D.

### 1.1 CMV – biologické vlastnosti

Cytomegaloviry jsou běžně rozšířené viry způsobující rozmanité akutní, latentní a rekurentní infekce u lidí i zvířat [4]. Bylo popsáno několik zvířecích druhů cytomegaloviru (myší, morčecí, opičí, krysí, ...), které jsou přísně druhově specifické [5, 6]. Lidský cytomegalovirus, také označovaný jako lidský herpesvirus 5 (HHV-5), je celosvětově rozšířený virus patřící do čeledi *Herpesviridae*, podčeledi *Betaherpesvirinae* [6, 7]. Jedná se o obalený DNA virus o velikosti cca 200 nm [7, 8]. Na kůži a povrchích přežívá infekční běžně několik hodin, při teplotě +4 °C několik dnů, zatímco při teplotě -20 °C je rychle inaktivován. Uchovává se při zamražení při teplotě -80 °C nebo -196 °C v tekutém dusíku. Virus je inaktivován tukovými rozpouštědly, éterem, UV zářením, kyselým pH (pH 3) [6].

Stejně jako ostatní herpetické viry má kapsida CMV kubickou symetrii [6, 7]. Virus sestává ze základních strukturních prvků: vnitřní nukleoproteinové jádro, obsahující virový genom (nukleokapsida), tegument a zevní obal tvořený lipidovou dvouvrstvou [7, 8]. Virová kapsida obsahuje genom, který je tvořený dvojřetězcovou DNA, kóduje cca 165 genů a je ze všech herpetických virů největší (230 kb) [7, 9, 10]. Na nukleokapsidu navazuje amorfní tegument (matrix), který obsahuje nejdůležitější fosfoproteiny pp150, pp65 a pp71. Vnější obal CMV je tvořen glykoproteiny hostitelské membrány, jejichž funkcí je vazba na receptory

hostitelské buňky a fúze s hostitelskou buňkou. Tyto glykoproteiny jsou antigenní a indukují tvorbu virus neutralizačních protilátek blokujících přilnutí viru [6, 8].

Replikační cyklus viru je pomalý, skládá se ze 3 stadií, během nichž dochází k expresi genů a tvorbě proteinů [8]. V bezprostředně časné fázi (IE – Immediate-Early) je exprimováno několik proteinů, které mají roli v regulaci vlastní virové replikace a stimulují expresi „early delayed genů“ [8, 11]. Mají zásadní roli ve fázi akutní infekce a reaktivace z latentní fáze [12]. Jsou aktivovány buněčnými pochody a komponenty virového tegumentu bez přítomnosti *de novo* syntetizovaných virových proteinů [11]. Časné (Delayed Early – DE) proteiny iniciují replikaci virové DNA a připravují vnitřní prostředí buňky pro replikaci a účastní se maturace kapsidy [8]. Dochází mj. k aktivní transkripci genů kódujících proteiny nezbytných pro aktivitu DNA polymerázy [8]. Terminázový komplex se uplatní v pozdní fázi (Late – L) replikačního cyklu a řídí štěpení a skládání vytvořené virové DNA [13, 14]. V pozdní fázi jsou mj. tvořeny strukturální proteiny, které se účastní skládání a vyoření virových částic [8].

## 1.2 Epidemiologie CMV

CMV patří mezi nejrozšířenější lidské viry, jeho séroprevalence je v obecné populaci vysoká: 40 až 100 % v dospělém věku v závislosti na geografické a socioekonomické situaci: prevalence stoupá s nízkou socioekonomickou úrovní a vyšší hustotou obyvatelstva, roste s věkem a je vyšší u žen [4, 15–17]. Za posledních 20 let došlo ve vyspělých státech včetně České republiky (ČR) k poklesu séroprevalence tohoto viru. Poslední oficiální séroprevalenční studie v ČR byla organizována Státním zdravotním ústavem v Praze v roce 1996 [18]. U dětí ve věku 5 až 9 let byla CMV IgG séroprevalence cca 40 až 62 %, ve věku 35 let byla séroprevalence 80 %, u starších 65 let dokonce 90 % [18]. Novější data pocházejí z práce virologické laboratoře Ústavu klinické mikrobiologie FNHK, kde byla séroprevalence zjišťována u více než 4500 pacientů spádového regionu všech věkových skupin rutinně vyšetřených v této laboratoři v období 2011 až 2014. Séropozitivita u dětí ve věku 5 až 9 let byla 37 až 49 %, ve věku 35 let byla séroprevalence 43 %, ve věku 65 let 62 % [19]. Přestože se nejedná o séroprevalenční studii v obecné populaci, pokles prevalence CMV je patrný i z těchto dat.

Virus může být přenášen jak horizontálně, tak vertikálně. K prvnímu nárůstu séropozitivity dochází u malých dětí částečně vertikálním přenosem z matky na dítě intrauterinně, během porodu infikovaným cervikovaginálním sekretem v porodních cestách, častěji však postnatálně mateřským mlékem [20]. Hlavní je potom horizontální přenos v jeslích,

dětských střediscích a školkách, a to respiračními sekrety a močí. Ke druhému peaku přenosu dochází u dospívajících a mladých dospělých, kdy se jedná hlavně o sexuální přenos viru [6]. Jednoznačně identifikovatelným zdrojem a vektorem viru je iatrogenní cesta: krevními produkty, transplantovanými orgány a tkáněmi i přímým kontaktem [6, 21].

Incidence CMV primoinfekce/reaktivace je po transplantaci krvetvorných kmenových buněk (HSCT) ovlivněna sérostatusem pacienta a dárce: u séropozitivních pacientů je CMV DNA detekována v 70–80 %, u séronegativních pacientů se séropozitivním dárce se primoinfekce prokáže v 15 % [22]. Po zavedení specifické preemptivní léčby poklesla incidence CMV nemoci z 20–30 % na současných cca 5 % [22–24]. Kromě vlivu CMV sérostatusu příjemce/dárce lze nalézt v jednotlivých pracích další faktory zvyšující incidenci CMV infektu po HSCT: přítomnost reakce štěpu proti hostiteli po transplantaci, neshoda dárce/příjemce v hlavním histokompatibilním komplexu (HLA), nepříbuzenský dárce, použití antithymocytárního globulinu, alemtuzumabu nebo celotělového ozáření v rámci přípravného režimu, použití režimu s redukovanou intenzitou, použití kostní dřeně nebo pupečnickové krve jako zdroje krvetvorných kmenových buněk [25–31]. Nicméně napříč jednotlivými pracemi není vliv jednotlivých rizikových faktorů hodnocen shodně.

### 1.3 Patogeneze CMV

Pro CMV je charakteristický široký buněčný tropismus. Je schopen infikovat různé typy buněk, jako např. buňky slinných žláz, leukocyty, hepatocyty, buňky renálních tubulů, plicních alveolů, endotelu cév apod. [32], v podstatě jakýkoliv typ lidské buňky [25]. Během krátké virémie je virus rozšířen do různých orgánů, v jejichž buňkách celoživotně perzistuje v asymptomatické latentní formě s intermitentními subklinickými reaktivacemi kontrolovanými imunitním systémem [32]. Po primoinfekci dochází často k dlouhodobému vylučování viru různými sekrety, v nichž jej můžeme prokázat [33].

Rozeznáváme primární infekci, tj. infekci u séronegativního jedince, a reaktivaci, která je dána buď reaktivací latentního viru v organismu, nebo reinfekcí jiným kmenem CMV u již séropozitivního jedince [4].

Primoinfekce je u imunokompetentního dítěte nebo dospělého zpravidla asymptomatická, manifestuje se pouze ve 2–5 % [21]. Nejčastějším klinickým obrazem manifestní primoinfekce je syndrom infekční mononukleózy, ale nebývají povlaky na tonzilách a nejsou přítomné heterofilní protilátky na rozdíl od infekční mononukleózy vyvolané virem Epstein-Barrové. Průvodním jevem CMV primoinfekce je hepatopatie, jen vzácně

symptomatická, leukocytóza s atypickou lymfocytózou, při klinickém vyšetření může být patrná krční lymfadenopatie [21, 32, 34–36].

Primoinfekce v těhotenství probíhá nejčastěji asymptomaticky (90 % případů), ale až u 40 % žen s primární infekcí může dojít k přenosu infekce na plod [21]. Infekce CMV je hlavním etiologickým agens intrauterinních infekcí s incidencí symptomatické kongenitální CMV 0,5 až 2 % z živě narozených dětí [21, 37, 38]. K nejtěžším případům s neurologickým postižením až úmrtím plodu dochází při primoinfekci v 1. trimestru těhotenství [39, 40]. Typicky dochází při kongenitální CMV infekci k poškození plodu, hepatosplenomegalii, hemolytické anémii, hyperbilirubinémii, trombocytopenii, pneumonii, mikrocefalii a poškození sluchu [21, 40, 41]. Až u 15 % dětí asymptomatických při porodu se po několika měsících i letech mohou vyvinout pozdní následky CMV infekce, a to nejčastěji poruchy sluchu, chorioretinitida, mentální retardace nebo poruchy psychomotorického vývoje [37, 40, 41].

Závažné projevy CMV nemoci nejsou spojeny jen s jedinci s nezralým imunitním systémem, ale zejména s výrazně imunokompromitovanými pacienty s malignitami, po transplantaci kostní dřeně/periferních krvevorných kmenových buněk nebo solidních orgánů, ale také u pacientů s vrozeným nebo získaným deficitem imunity [22, 42].

Před zavedením virostatické terapie byla infekce lidským cytomegalovirem jednou z hlavních příčin úmrtí pacientů po HSCT [27, 43–47]. CMV pneumonie patřila mezi nejčastější a život ohrožující nemoci po HSCT [43]. Nyní v éře preemptivní a profylaktické terapie je CMV pneumonie méně častá a na vzestupu je CMV gastroenterokolitida [44, 48, 49]. Nicméně u pacientů po HSCT, u kterých se vyvine CMV pneumonie, je mortalita stále vysoká [44]. U imunokompromitovaných pacientů se CMV infekce může projevit různorodě: CMV syndromem spojeným s horečkou, leukopenií/atypickou lymfocytózou/trombocytopenií a hepatopatií nebo jako invazivní onemocnění s příznaky dysfunkce příslušného orgánu a přímým průkazem CMV z postiženého orgánu, např. gastroenterokolitidou, hepatitidou, encefalitidou, retinitidou apod. [48, 50–52]. Aktivní CMV infekce může stát za dysfunkcí až odhojením štěpu, zvyšuje riziko bakteriálních a mykotických infekcí, přičemž všechny tyto stavy mohou vést k úmrtí pacienta [22, 49, 53–55].

## 1.4 CMV imunologie

Imunitní kontrola CMV, ať už primoinfekce nebo reaktivace latentní infekce, která je u pacientů po HSCT častější [53, 56, 57], je závislá na míře rekonstituce specifické buněčné imunity. Ta je zprostředkována CMV-specifickými CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T lymfocyty [56, 58]. Mezi faktory, které jsou spojené s opožděnou rekonstitucí CMV-specifických T lymfocytů, a tedy zvyšující riziko nebo tíži CMV infektu, patří séronegativní donor, neshodný nebo nepřibuzný dárce (spojený s nutností intenzivnější profylaxe nezbytné k zamezení reakce štěpu proti hostiteli (GVHD)), terapie kortikosteroidy pro GVHD [24, 58].

Mechanismus kontroly infektu je mnohastupňový a není dán jen počtem specifických T lymfocytů, ale i jejich efektorovou a cytokinovou aktivitou [58, 59]. Na tomto poli probíhá intenzivní výzkum, protože detekce CMV-specifických lymfocytů v periferní krvi může napomoci stratifikovat pacienty, kteří jsou sami schopni kontrolovat virovou reaktivaci, od pacientů, kteří budou profitovat z preemptivní terapie CMV [57, 58, 60, 61].

Není shoda o míře schopnosti organismu kontrolovat CMV pomocí CD4<sup>+</sup> specifických T lymfocytů vs. CD8<sup>+</sup> lymfocytů. Zatímco někteří autoři přisuzují CD8<sup>+</sup> lymfocytům hlavní roli [59], podle výsledků jiných prací se podílejí na kontrole viru až po rekonstituci CD4<sup>+</sup> specifických buněk [58]. Gabalti *et al.* [58] ve své práci demonstruje, že pro kontrolu infektu jsou zásadní polyfunkční specifické CD4<sup>+</sup> buňky trojitě produkující interleukin 2 (IL-2), tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) a interferon  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ). Pelák [62] popisuje, že všichni pacienti, kteří byli schopni kontrolovat CMV infektu bez specifické léčby, měli CD8<sup>+</sup> duálně produkující interferon  $\gamma$  a interleukin 2. Produkce CD4<sup>+</sup> buněk podle této práce neměla na kontrolu CMV vliv [62].

Samotný CMV infektu má imunosupresní efekt [53]. CMV infikuje monocyty a potlačuje prezentaci antigenu, ovlivňuje HLA expresi, produkci cytokinů, snižuje aktivitu NK buněk [43, 63, 64]. Samotný ganciclovir používaný pro profylaxi i léčbu CMV infektu je myelotoxický, vede k neutropenii i opožděné rekonstituci CMV specifické T lymfocytární imunity [43, 44, 59]. Tyto interakce mohou vysvětlit vyšší incidenci sekundárních bakteriálních i fungálních infekcí u pacientů s CMV infekcí, i vyšší výskyt pozdní CMV nemoci [63].

U pacientů po HSCT s diagnózou akutní leukémie bylo v několika pracích popsáno, že CMV infektu by mohl být spojen s nižším rizikem relapsu základního onemocnění, a tedy CMV by měl jakýsi „virus versus leukemia“ efekt [23, 50, 65]. Teorií vysvětlujících tento vliv je několik: CMV by mohl aktivovat antileukemický efekt NK buněk, je popisována up-regulace gamma-delta T lymfocytů s protinádorovou aktivitou, případně teorie, že reziduální blastické buňky s latentním virem jsou při CMV reaktivaci cílem dárcovských CMV specifických

cytotoxických lymfocytů [28, 65–68]. Další práce popisuje vliv „virus versus leukemia“ efektu, pouze pokud nebyla podána specifická anti-CMV léčba [69]. Jiné velké práce tento efekt neprokázaly a dokonce popisují opačný trend – vyšší riziko relapsu s CMV infekcí či demonstrují vyšší riziko non-relapse mortality u pacientů s CMV infektem [23, 28, 68, 70]. „Virus vs. leukemia“ efekt zůstává kontroverzní a včasné zahájení adekvátní léčby CMV infektu by nemělo být oddalováno [29, 53].

## 1.5 Diagnostika CMV

Laboratorní diagnostika se u imunokompetentních pacientů opírá o nepřímý průkaz infekce, a to o sérologické vyšetření nejčastěji pomocí imunoenzymatických metod (ELISA), chemiluminiscenčních detekcí (CMIA, CLIA) nebo pomocí nepřímé imunofluorescence. Stanovují se hladiny protilátek v krevním séru (plasmě) převážně ve třídě IgM a IgG [21]. Pro odlišení primoinfekce CMV a aktivace latentní infekce je nutné vyšetřit aviditu IgG protilátek. Přítomnost specifických IgG protilátek s nízkou aviditou je výrazem probíhající primoinfekce nebo infekce prodělané v nedávné době několika týdnů až měsíců. Přítomnost specifických IgG protilátek s vysokou aviditou primoinfekci vylučuje [71, 72]. Stanovení sérostatusu CMV (CMV IgG) před HSCT patří mezi základní sérologická vyšetření. Při interpretaci nálezů zejména u nízkých hladin CMV IgG musíme vzít v úvahu i možnost pozitivitu v důsledku přenesených IgG protilátek po aplikaci IVIG nebo krevních derivátů [71, 72].

Klasické metody založené na kultivaci viru na buněčných kulturách a přímém průkazu viru pomocí detekce cytopatického efektu se v rutinní praxi nepoužívají, protože jsou časově velmi náročné (několik týdnů) a málo citlivé [57].

U pacientů po HSCT se vzhledem k imunosupresi a omezené schopnosti tvořit protilátky standardně používají metody přímého průkazu CMV. Nejčastějším používaným testem probíhající infekce byla v minulosti detekce antigenu (nejčastěji strukturálního fosfoproteinu pp65 v přímém značení infikovaných leukocytů specifickou monoklonální protilátkou). Odebrané vzorky však bylo nutné okamžitě zpracovat a odečet byl závislý na zkušenostech laboratorních pracovníků [57]. Nevýhodou zejména u pacientů krátce po HSCT bylo, že výsledek byl ovlivněn množstvím jaderných buněk přítomných v periferní krvi.

Na přelomu 20. a 21. století dosáhly velkého rozvoje metody molekulárně biologické. Nejprve hybridizační (hybrid capture), poté metody amplifikační (např. polymerázová řetězová reakce, PCR) [52]. V současné době je základní metodikou průkazu probíhající CMV infekce u imunokompromitovaných pacientů metoda real-time PCR (PCR v reálném čase). Ta detekuje

CMV DNA a umožňuje stanovit virovou nálož v krvi, jiných tělních tekutinách (bronchoalveolární laváž, moč, likvor) nebo prokázat CMV DNA v tkáních [49, 57].

Nevýhodou PCR metod byla velká variabilita provedení testů – některé laboratoře měly svoje primery i detekční směsi (in-house metody), jiné komerční kity, testovala se plná krev nebo plazma či izolované buňky, výsledky byly vydávány jako kopie CMV DNA na mililitr tělního sekretu, v jiných laboratořích se výsledek normalizoval na 10 000 lidských genomických ekvivalentů aj. Pro lepší porovnatelnost mezi centry zavedla Světová zdravotnická organizace mezinárodní jednotku k vyjádření kvantifikace CMV DNA IU/ml [73]. Akreditované nemocnice nyní výsledky vydávají zpravidla v IU/ml, případně jako kopie CMV DNA/ml.

Monitoring CMV infekce po HSCT pomocí PCR metod umožnil rozvoj včasné, tzv. preemptivní, terapie a dramaticky snížil incidenci CMV nemoci u pacientů po HSCT [23]. V současnosti není doporučena žádná hranice virémie, při které by se měla zahájit preemptivní terapie. Její stanovení ztěžuje velká variabilita PCR vyšetření a také skutečnost, že riziko progresu CMV je u různých patientských skupin různé.

Podobně jako neexistují doporučení pro virémii v periferní krvi, nejsou obecně stanovena ani ta, která by dávala cut-off PCR kvantity CMV DNA v bronchoalveolární laváži nebo tkáni, predikující rozvoj CMV pneumonie [57]. Ani vyšetření vzorků stolice na přítomnost CMV DNA neprokázalo přínos v diagnostice CMV kolitidy [74]. Pro průkaz CMV nemoci, nejčastěji gastrointestinální nemoci nebo pneumonie, zůstává nutný přímý průkaz viru z biopsie nebo cytologie postižené tkáně přímou izolací viru, kultivačně, histopatologicky, imunohistochemicky nebo *in situ* hybridizací [49, 52]. Detekce CMV pouze průkazem PCR je pro průkaz CMV nemoci nedostačená pro vysokou senzitivitu metody a neodráží aktivitu onemocnění.

## 1.6 CMV profylaxe, léčba

S dostupností profylaktické a preemptivní léčby virostatiky se mortalita i morbidita spojená s CMV infekcí snížila [44, 48]. Profylaktické podávání běžně dostupného valgancicloviru/gancicloviru všem pacientům v prvních měsících po HSCT se vzhledem k myelotoxicitě a vyššímu riziku rozvoje virové rezistence nepoužívá [75, 76]. Na základě velké retrospektivní studie Green *et al.* [77] však bylo dokumentováno, že jakákoliv CMV virémie zvyšuje riziko celkové mortality, a s nově dostupným letermovirem se možnosti profylaktické léčby pacientů po HSCT opět otevírají [78].

Preemptivní terapie znamená včasné podání specifické léčby u rizikových pacientů s dokumentovanou CMV replikací, ještě před klinickými projevy infektu [78]. Preemptivní terapie se opírá především o citlivé PCR metody a v současnosti je standardním přístupem k prevenci CMV nemoci. Nicméně i přes preemptivní terapii dochází ke vzplanutí CMV nemoci (v současné době hlavně CMV gastroenterokolitidy) stejně jako k nárůstu pozdní CMV nemoci i virové rezistence [44, 79].

V běžné klinické praxi jsou k dispozici čtyři léky pro celkové podání: ganciclovir (GCV) a jeho perorální derivát valganciclovir (VGCV), foscarnet (FOS) a cidofovir (CID) [22, 27, 57]. V první linii léčby je nejčastěji používán GCV [22, 44, 57, 80], pro profylaktickou a preemptivní terapii pak stále více VGCV [44, 81, 82]. FOS a CID jsou vzhledem k toxicitě léčby zpravidla léky druhé volby [22, 44]. Všechny tři léky působí jako inhibitory virové DNA polymerázy (kódované genem UL54) [22, 27, 57].

GCV je nukleosidový analog, který je v infikované buňce iniciálně monofosforylován virovou protein kinázou (kódovanou genem UL97) a následně pak buněčnými kinázami fosforylován do formy trifosfátu. Takto aktivovaný GCV kompetitivně inhibuje DNA polymerázu viru a zároveň se inkorporuje do virové DNA, čímž zpomaluje, případně zastavuje, její elongaci. Cidofovir oproti tomu potřebuje ke své aktivaci (fosforylaci) pouze buněčné enzymy a poté účinkuje jako kompetitivní inhibitor podobně jako GCV [22, 83]. Foscarnet je naopak přímý inhibitor virové polymerázy působící jako pyrofosfátový analog [22].

Acyklovir má nižší aktivitu vůči CMV DNA polymeráze ve srovnání s GCV [84]. Existuje několik studií ukazujících použití vysokodávkového acykloviru a jeho esterového derivátu valacykloviru v primární profylaxi [43, 63, 78] se smíšenými výsledky. I při profylaxi acyklovirem/valacyklovirem je však nutný pečlivý monitoring CMV a včasné zahájení preemptivní terapie val/ganciclovirem nebo foscarnetem [53, 84]. U pacientů s CMV nemocí před HSCT nebo u pacientů s rekurentními CMV infekcemi může být zvaženo podání acykloviru/valacykloviru v sekundární profylaxi, opět za pečlivé CMV surveillance [53]. Singapurská práce z roku 2015 [85] ukazuje, že v dosažení virové clearance byl v preemptivním podání vysokodávkový valacyklovir (1–2 g čtyřikrát denně) stejně účinný jako VGCV nebo FOS při menším výskytu nežádoucích účinků léku. Jednalo se však o práci s malým počtem pacientů (n = 15 pro valacyklovir) bez závažnějších komplikací po HSCT, vedených v ambulantní režimu. Větší práce zatím chybí.

Letermovir je nový lék, který je u séropozitivních pacientů schválený k profylaxi reaktivace a rozvoji CMV nemoci v časném potransplantačním období [14, 78]. Letermovir



inhibuje DNA terminázový komplex CMV (kódovaný UL51, UL56 a UL89), který je potřebný ke štěpení a sbalení nově vytvořené virové DNA, a tak ovlivňuje tvorbu genomů o správné délce jednotek a interferuje se zráním virionu [13, 14]. Zatím není dostatek důkazů pro použití letermoviru k léčbě CMV nemoci způsobené polyresistentními kmeny viru [86].

Maribavir (inhibitor UL97 kinázy) inhibuje virovou enkapsidaci a vnoření virových partikulí z infikovaných buněk [86]. Po předchozích slibných výsledcích však tento lék selhal ve III. fázi klinického testování v indikaci pro profylaxi CMV po HSCT, pravděpodobně kvůli nevhodnému designu studie (zvolené neadekvátní dávkování léku, vyřazení pacientů vysoce rizikových pro CMV reaktivaci, nastavení příliš senzitivního biomarkeru reaktivace (PCR) jako end-point studie místo incidence rekurentních infekcí) [78, 87]. Recentně mu však americká léková agentura [88] udělila status průlomové terapie u transplantovaných pacientů, kteří jsou rezistentní nebo refrakterní na předchozí terapii [89]. V této indikaci je ve fázi III klinického testování [83].

Ve vývoji je dále brincidofovir, perorální prolečivo cidofoviru, které dosahuje vysokých intracelulárních koncentrací [86]. Brincidofovir není koncentrován v renálních proximálních tubulech a má nižší renální toxicitu oproti cidofoviru [86]. Ačkoliv výsledky fáze II klinického testování dávaly nadějně výsledky, ve III. fázi nebyl prokázán vliv na CMV infekci po HSCT a jeho podání bylo spojeno s výraznými gastrointestinálními nežádoucími účinky a nesignifikantně vyšší mortalitou oproti placebu [78].

Cyclopropavir je anti-herpetické virostatikum se širokým spektrem účinku, včetně CMV. Má podobný mechanismus účinku jako CGV – je nutná úvodní forforylace virovou kinázou UL97, ale má vyšší antivirovou aktivitu s nižší cytotoxicitou ve srovnání s GCV [83]. Tento lék je nyní ve fázi I klinického testování [83].

V literatuře je popsáno i použití jiných léků než primárně antivirových. Leflunomid je imunosupresivum používané při léčbě revmatoidní artritidy. Studie *in vitro* i *in vivo* prokázaly jeho účinek proti CMV, včetně kmenů rezistentních na ganciclovir [86, 90–92]. Leflunomid inhibuje tvorbu virové kapsidy, a proto nevykazuje zkříženou rezistenci s používanými anti-CMV virostatiky. Je nezbytné jeho systematické testování, ať už v monoterapii nebo v rámci kombinované léčby, a zatím nemůže být doporučen pro léčbu CMV nemoci [86].

Pro léčbu CMV rezistentních kmenů bylo popsáno použití artesunátu [93, 94] patřícího mezi antimalarika. Bylo zjištěno, že inhibuje lidský CMV *in vitro*, což bylo poté prokázáno v testech na krysách [86]. Mechanismus účinku je nejasný, pravděpodobně inhibuje buněčné aktivační dráhy, které jsou nezbytné pro virovou replikaci. Vzhledem k tomuto mechanismu

účinku se neočekává, že by vznikala rezistence na tento lék [86]. Neexistují ale silná data, která by v současné době mohla tento lék zařadit do doporučení pro léčbu rezistentních kmenů CMV.

Výzkum probíhá i v oblasti vývoje očkovací látky. Bivalentní vakcína TransVax, obsahující plasmidy kódující tegumentový protein pp 65 a povrchový glykoprotein B, je ve fázi III klinického testování. První výsledky ukazují, že její podání snížilo incidenci CMV a prodloužilo čas do první detekce po HSCT [28, 86]. V současnosti běží klinické studie několika dalších peptidových vakcín (CMVPepVax, Ankara Vaccinia a další) ve fázích I – II. V současnosti prezentovaná data ukazují nadějně výsledky (CMVPepVax snížila výskyt CMV virémie, prodloužila čas do první detekce viru po HSCT, ukázala snížení non-relapse mortality) [28].

V rámci pasivní imunoterapie je vyvíjena monoklonální protilátka proti CMV, která váže a blokuje glykoprotein B a pentamerový komplex gH/gL/U128/U130/U131, což snižuje možnost CMV replikace. Momentálně probíhá fáze II testování. [28].

V experimentech a klinických studiích je již delší dobu testován adoptivní transfer CMV specifických T lymfocytů. Specifické lymfocyty se nejnáze získají od původního dárce kmenových buněk, pokud byl séropozitivní. V těchto případech je možné přímo selektovat dárcovské antigen-specifické T lymfocyty nebo je expandovat *ex vivo*. Další možností je izolace antigen-specifických T lymfocytů získaných z krve séropozitivních dárců. Několik studií prokázalo bezpečnost a účinnost této léčby v profylaxi i léčbě CMV (snížení peaku virémie, snížení počtu pacientů vyžadujících virostatickou léčbu, i snížení incidence pozdní CMV nemoci) [28, 86, 95].

V budoucnosti by aktivní imunizace, pasivní imunoterapie nebo adoptivní transfer mohly představovat novou linii profylaxe i léčby s citelně nižší toxicitou, lékovými interakcemi a vznikem virové rezistence.

## 1.7 Klinická a virová rezistence na léčbu

Dosud není jediná obecně přijímaná definice rezistence vůči virostatikům, protože existuje více hledisek pro její posouzení. Často používaná je klinická rezistence, ta však nemusí být dána jen biologickými vlastnostmi viru, ale může záviset na míře imunosupresivní terapie, dosahovaných koncentracích léků, dalších vlastnostech viru a léčby u jednotlivého pacienta, nebo může být dána jeho nespouplací [27, 96, 97]. Klinická rezistence nebo selhání léčby bývá udávána jako narůstající nálož virové DNA po dvou týdnech řádně vedené terapie [46, 57, 79]. Někteří autoři používají časový interval jednoho týdne [22], jiní tři týdnů [98].

V roce 2017 byl uveřejněn návrh definice klinické rezistence podle doporučení pracovní skupiny ECIL – The European Conference on Infections in Leukemia [70]. O klinickou rezistenci CMV vůči virostatikům by se podle tohoto doporučení mělo jednat v případě, pokud:

- u pacienta dochází k nárůstu virové nálože alespoň o 1 řád i přes řádně vedenou specifickou virostatickou léčbu trvající alespoň 2 týdny,
- u pacienta nedochází k poklesu virové nálože alespoň o 1 řád i přes řádně vedenou specifickou virostatickou léčbu trvající alespoň 3 týdny,
- u pacienta s CMV nemocí dochází ke zhoršování jejích projevů i přes řádně vedenou specifickou virostatickou léčbu trvající alespoň 2 týdny.

Pro definování skutečné virové rezistence je nezbytná přesná charakteristika virového kmene, kdy vycházíme z fenotypové a genotypové (sekvenační) analýzy přítomného CMV. Fenotypové metody stanovení CMV rezistentních kmenů jsou založeny na stanovení koncentrace léku potřebného pro redukci virového růstu v buněčné kultuře (standardem zůstává plaková redukční metoda a určení 50% inhibiční koncentrace,  $IC_{50}$ ) [22, 27, 57, 99, 100]. Takto definovaná rezistence je uváděna jako určitý (např. dvojnásobný) nárůst inhibiční koncentrace vůči referenčnímu citlivému virovému kmeni, případně je daná konkrétní hodnota inhibiční koncentrace (ta bývá různými zdroji uváděna různě, např.  $IC_{50} \geq 6$  až  $12 \mu\text{mol/l}$  (mikromol/litr) pro GCV, pro FOS  $IC_{50} \geq 400$  až  $600 \mu\text{mol/l}$  a pro cidofovir  $IC_{50} \geq 2$  až  $4 \mu\text{mol/l}$ ) [99, 101]. Fenotypové metody jsou náročné jak na zařízení laboratoře pro práci s buněčnými kulturami a živým virem, tak na čas, protože CMV má dlouhou generační dobu. Proto jsou tyto metody nevhodné pro rutinní diagnostickou praxi, kdy může být také problém získat izolát z klinického vzorku, zejména po zahájení terapie. Nad to, pokud je u jednoho pacienta smíšená populace viru, může lépe proliferující divoký (tj. citlivý) virus přerůst rezistentní variantu, která pak nebude detekovatelná [99]. Fenotypové metody ale umožňují testovat klinický vzorek, který může sestávat z virových populací majících více mutací, a stanovit míru rezistence takového vzorku jako celku [27]. Tyto metody zůstávají zásadní pro verifikaci a určení míry rezistence u nově popsanych mutací virového genomu, které jsou testovány pomocí rekombinantních virů [22, 27, 57, 99, 100]. Genotypová rezistence je prokázána molekulárně-biologickými metodami, tj. průkazem mutace, dříve literárně dokumentované. Testování rezistence metodou sekvenační analýzy je nyní metodou první volby [27]. Zásadními výhodami sekvenačních metod je možnost průkazu rezistentního viru přímo z klinického vzorku, detekce přesně definovaných mutací již z malých náloží viru (již od 200 kopií CMV DNA/ml krve), možnost stanovení mutantní subpopulace a jejich rychlost detekce (do 48 hodin). Vzhledem k

dostupným lékům a mechanismu jejich působení jsou testovány oblasti virového genu UL97 a UL54 [27, 57]. Nejběžnějším způsobem detekce mutací je sekvenační analýza dané oblasti genu. Konvenční Sangerovo sekvenování umožňuje detekovat mutovanou populaci viru, pokud je její zastoupení vyšší než 20 % [57]. Pro rychlou detekci a screening mutací lze použít metody se štěpením PCR produktů restrikcími enzymy (RFLP – restriction fragment length polymorphism), analýzu polymorfismu délky restrikcími fragmentů, která je založena na vzniku nebo zániku restrikcími místa v sekvenci vlivem mutace, případně specifickou PCR s primery a sondami navrženými přímo pro detekci určité mutace [57, 102].

V současnosti je k dispozici technologie sekvenování Nové generace (Next-Generation Sequencing, NGS) nebo též technologie masivního paralelního sekvenování. Tato metoda je založena na principu paralelizace procesu sekvenování, kdy dochází k sekvenování tisíců až milionů sekvencí současně. Tato metoda prokáže mutovanou populaci již od 5 %, dokáže pracovat s nižšími celkovými kvantitami viru v krvi a dokáže odlišit a kvantifikovat jednotlivé subpopulace CMV testovaného klinického vzorku [103].

Rezistence viru na GCV je v 85 až 95 % způsobena mutací v genu UL97, která alteruje terciární strukturu vazebného místa léku [104], což způsobuje snížení jeho fosforylace, a tedy nižší hladinu monofosforylovaného GCV. To následně vede k nižší hladině GCV-trifosfátu, který inhibuje virovou DNA polymerázu [22, 27, 57]. Intenzita zbytkové fosforylace pak ovlivňuje míru citlivosti viru vůči léku. Mutace v genu pro virovou DNA polymerázu (UL54) mohou vést ke zvýšené exonukleázové aktivitě, která vede k rozpoznání a selektivnímu vystřížení nukleotidových analogů GCV a cidofoviru z virové DNA [22, 101]. Mezi další možná vysvětlení vzniku rezistence patří pokles selektivní inkorporace inhibitoru do prodlužujícího se řetězce virové DNA, případně snížení afinity vůči inhibitoru, přičemž toto je patrně případ i FOS, který není inkorporován do virové DNA. Jednotlivé mechanismy se mohou kombinovat a vést k mnohočetné rezistenci. Mutace UL54 také bývají spojeny se silnější rezistencí viru vůči terapii [79]. Experimentálně (po selektivním tlaku maribaviru) byly prokázány i mutace v UL97 a UL27 vedoucí k rezistenci na maribavir [105]. Na buněčných kulturách byly prokázány kmeny viru s mutacemi v oblasti UL56 vedoucí ke snížené citlivosti k letermoviru [14].

Je popsáno, že kmeny méně citlivé k léčbě se v celé populaci viru vyskytují jen v malém procentu, což je patrně dáno jejich nižší replikační schopností, a v průběhu léčby narůstá rezistentní frakce [22, 27]. To nastane při neúplné eliminaci virové replikace, k čemuž může dojít například při suboptimálním dávkování léku, ať už vlivem zhoršené absorpce či nespolečnosti pacienta, při adekvátní léčbě vlivem selektivního tlaku virostatika nebo při

extrémním imunodeficitu pacienta. Vzhledem k tomu, že se tyto méně citlivé subpopulace viru mohou v přítomnosti virostatika dále replikovat, vyvíjet se a mutovat, mohou tak získat lepší replikační schopnosti při zachování rezistence k terapii. Tím dochází k přerůstání původního citlivého viru velkou populací rezistentní mutanty. U pacientů po HSCT je incidence vzniku genetické rezistence na GCV odhadována na 2 až 8 % léčených pacientů a obvykle se objevuje po 2–3 měsících terapie [57, 79, 102, 104]. Při přerušení terapie VGCV/GCV, nebo její změny na FOS může divoký kmen opět přerůst rezistentní subpopulaci. Ta ale může perzistovat v „latentní formě“ a při opětovné léčbě GCV/VGCV (i po několika měsících) může opět dojít k její reaktivaci [106].

Rizikové faktory vzniku rezistence viru nejsou u pacientů po HSCT stále zcela objasněné [96]; nejčastěji jsou jmenovány dlouhotrvající expozice léku [27, 45, 46, 81, 101], vysoká virová nálož [45, 101] a suboptimální hladiny léku [45, 46]. V jednotlivých studiích bývají také uvedeny vysoké dávky virostatik a výrazná imunosuprese pacienta [46, 57, 101], haploidentická HSCT [79], opakované epizody CMV replikace v průběhu virostatické léčby a negativní CMV sérostatus dárce se séropozitivním příjemcem štěpu ( $D^-/R^+$ ) [46]. Tyto situace mohou přímo vést k nedostatečně kontrolované replikaci viru během virostatické léčby [22, 57, 79].

## 2. Cíle dizertační práce

Vznik virové rezistence na podávaná virostatika je stále relativně málo prozkoumanou komplikací léčby CMV u pacientů po HSCT. Její četnost, rizikové faktory a klinická data jsou v této kohortě pacientů publikována jen v několika větších pracích.

### Primární cíle práce

- stanovit četnost výskytu infektu CMV, incidenci klinické i genotypové CMV rezistence na podávaná virostatika během 1. roku po HSCT u pacientů ve Fakultní nemocnici Hradec Králové,
- srovnání dvou skupin pacientů, u kterých byl použit přípravný transplantační režim s thymoglobulinem v dávkování 7,5 mg/kg vs. 6 mg/kg – vliv nižšího dávkování na výskyt CMV infekce po HSCT,
- posoudit vztah klinické rezistence (selhání léčby) a virové rezistence podmíněné genotypicky,
- porovnání metod sekvenční analýzy podle Sangera a sekvenování nové generace (NGS) u pacientů s prokázanou virovou rezistencí.

### Sekundární cíle práce

- popsat genotypové mutace CMV v oblastech UL97 a UL54 vedoucí k rezistenci na virostatika v našem souboru pacientů,
- analyzovat, jakých plazmatických hladin GCV bylo dosaženo při podávání VGCV/GCV.

### Hypotézy

- 1) Transplantační režim s nižším dávkováním thymoglobulinu bude provázen nižším výskytem CMV infektu.
- 2) Incidence klinické i genotypicky dané rezistence CMV vůči virostatikům bude nízká.
- 3) Pouze část případů selhání léčby virostatiky bude podmíněna virovou mutací vedoucí ke snížené citlivosti na virostatika.

4) NGS analýza bude mít vyšší senzitivitu a přinese dřívější průkaz rezistence oproti analýze dle Sangerova.

### 3. Soubor nemocných, metodika, statistická analýza

Získávání dat a vzorků bylo provedeno

- prospektivně:
  - nábor pacientů,
  - sběr klinických dat, sběr a uchování zamražené CMV DNA u pacientů s CMV infektem, sběr a uchování zamražené plasmy u pacientů léčených GCV/VGCV,
- retrospektivně:
  - sekvenční analýza kmenů CMV u pacientů suspektně rezistentních k léčbě,
  - měření plazmatických hladin GCV u pacientů léčených VGCV/GCV.

Sběr klinických údajů byl zaměřen na získání těchto údajů: osobní údaje pacienta (pohlaví, diagnóza, věk a klinický stav v době HSCT, zda byla dosažena kompletní remise onemocnění před HSCT), informace o HSCT (příbuzenská/nepříbuzenská HSCT, myeloablativní přípravný transplantační režim vs. režim s redukovanou intenzitou, konkrétní přípravný režim, počet  $CD34^+ \times 10^6/kg$  ve štěpu), HLA shoda dárce a příjemce, pohlaví a věk dárce, CMV sérostatus dárce a příjemce před HSCT, rizikové situace pro vznik klinické a/nebo virové rezistence (léčba virostatiky a její délka, doba do první detekce CMV DNA po HSCT, počáteční virová nálož při první detekci CMV, maximální dosažená virémie, detekovatelná virémie při převodu na udržovací (maintenance) terapii, průkaz CMV nemoci, přítomnost GVHD a její systémová kortikoterapie), relaps onemocnění, klinický „outcome“ 365. den po HSCT.



### 3.1 Soubor nemocných

Do prospektivního sledování byli zařazeni pacienti IV. interní hematologické kliniky Fakultní nemocnice v Hradci Králové po alogenní HSCT, kteří byli transplantováni pro hematoonkologické onemocnění. Od června 2012 do prosince 2014 bylo do studie zařazeno 101 pacientů (47 žen, 54 mužů), z nichž u tří byla v tomto časovém rozmezí provedena druhá alogenní HSCT pro odhojení štěpu a relaps nemoci. Doba sledování byla alespoň 1 rok po transplantaci při nekomplikovaném průběhu, pro pacienty s opakovanými reaktivacemi CMV (třemi a více) a pro pacienty s klinickou rezistencí pak alespoň 2 roky. Věkový medián pacientů byl 55 let v době transplantace. Nejčastější malignita v souboru byla akutní myeloidní leukémie (44 % pacientů) a akutní lymfoblastická leukémie (17 %). Blíže viz tabulka č. 1 a tabulka č. 13 (Přílohy).

**Tabulka č. 1: Charakteristika souboru nemocných**

Soubor pacientů	Počet pacientů (n= 101)	%
Muži	54	53,5
Ženy	47	46,5
Věk v době HSCT	medián 55 let	
Karnofského skóre v době HSCT	medián 80 %	
Zemřelo do D +365	32 (včetně 1 retransplantovaného)	31,7
Základní diagnóza	Počet pacientů (n= 101)	%
Akutní myeloidní leukémie	45	44
Akutní lymfoblastická leukémie	17	17
Chronická lymfatická leukémie	10	10
Myelodysplastický syndrom	10	10
Myeloproliferativní choroby	5	5
Nehodgkinské lymfomy	5	5

Chronická myeloidní leukémie	5	5
Mnohočetný myelom	3	3
Aplastická anémie	1	1
<b>Přípravný režim</b>	<b>Počet HSCT (n= 104, včetně 3 pacientů s druhou alogenní HSCT)</b>	<b>%</b>
Fludarabin/busulfan /thymoglobulin	68	66
Fludarabin/busulfan	13	12,5
Fludarabin/celotělové ozáření/ thymoglobulin	10	9,5
Fludarabin/treosulfan/thymoglobulin	4	4
Cyklofosfamid/celotělové ozáření/ thymoglobulin	2	2
Fludarabin/melphalan/thymoglobulin	2	2
Fludarabin/cyklofosfamid/ thymoglobulin	1	1
Fludarabin/cyklofosfamid/celotělové ozáření/ thymoglobulin	1	1
Idarubicin/fludarabin/cytarabine/ thymoglobulin	1	1
Vepesid /celotělové ozáření/ thymoglobulin	1	1

U 79 % transplantací byl použit přípravný režim kombinující fludarabin a busulfan, buď s podáním thymoglobulinu, či bez něho. Thymoglobulin byl podán u 86,5 % transplantačních výkonů; u nepříbuzenských transplantací nebo v případě neshody HLA byl podán v celkové dávce 6 až 7,5 mg/kg, v 5 případech sourozenské transplantace při aktivitě nemoci pak v dávce nižší (3 a 5 mg/kg). Ve 14 případech bylo provedeno celotělové ozáření v dávce 12 Gy. Dárce byl v 19 % případů HLA identický sourozenec, v 55 % případů nepřibuzný dárce HLA identický v A, B, C, DR a DQ systému a v 26 % byli pacienti transplantováni neshodným dárce (shoda 9/10 u 25 pacientů, shoda 8/10 u dvou), viz tabulka č. 2 a tabulka č. 13 (Přílohy). Imunosupresivní léčba byla podávána v kombinaci takrolimus a mykofenolát mofetil podle institucionální praxe (popsáno jinde [107]).

**Tabulka č. 2: Charakteristika provedených alogenních transplantací  
krvetočných kmenových buněk**

<b>Charakteristika transplantací</b>		<b>%</b>
Pohlaví dárce – muži/ženy	81/23	78/22
Věk dárce v době HSCT	medián 30 let	
Množství CD34 <sup>+</sup> ve štěpu	medián 6,95 x 10 <sup>6</sup> /kg	
	<b>Počet HSCT (n= 104)</b>	<b>%</b>
<b>CMV sérostatus před HSCT</b>		
D <sup>-</sup> /R <sup>+</sup>	52	50
D <sup>+</sup> /R <sup>+</sup>	33	31,5
D <sup>+</sup> /R <sup>-</sup>	10	10
D <sup>-</sup> /R <sup>-</sup>	9	8,5
<b>Typ transplantace</b>		
HLA plně shodný nepříbuzenský dárce kmenových krvetočných buněk	57	55
HLA neshodný nepříbuzenský dárce	27	26
HLA plně shodný nepříbuzenský dárce kmenových krvetočných buněk	20	19
<b>Intenzita přípravného režimu</b>		
Myeloablativní přípravný režim	41	39,5
Přípravný režim s redukovanou intenzitou	63	60,5
<b>Thymoglobulin – všechny přípravné transplantační režimy</b>		
Podán	90	86,5
Thymoglobulin v jakémkoliv režimu v dávkování 7,5 mg	34	33
Thymoglobulin v jakémkoliv režimu v dávkování 6 mg	51	49
Thymoglobulin jiné dávkování (3 nebo 5 mg)	5	5
Nepodán	14	13,5

<b>Zdroj krvetvorných kmenových buněk</b>		
Periferní krvetvorné kmenové buňky	100	96
Kostní dřev	4	4
<b>Stav primárního onemocnění před transplantací krvetvorných buněk</b>		
Kompletní remise	48	46
Parciální remise	56	54

U všech pacientů po HSCT byla podávána standardní profylaxe podle institucionální praxe; trimetoprimem/sulfametoxazolem proti *Pneumocystis jirovecii* (2x 960 mg po 2 dny v týdnu po sobě), aciklovir (2x 800 mg/den) a flukonazol (400 mg/den). Délka podávané profylaxe byla upravována podle přítomnosti reakce štěpu proti hostiteli a při imunosupresivní terapii. Specifická anti-CMV profylaxe nebyla nasazena u žádného z pacientů, s výjimkou jednoho pacienta, který 296. den po HSCT podstoupil transplantaci srdce, po které měl profylaxi VGCV.

Při průkazu GVHD (podle mezinárodních kritérií [108]) byla zahájena léčba methylprednisolonem v dávce 1 až 2 mg/kg/den, s postupným snižováním dávky podle klinického stavu pacienta. U kortikorezistentních forem nemoci byla zahájena léčba druhé linie: podání nízkodávkovaného metotrexátu, cyklosporin A, sirolimus, fotoforézy.

### **3.1.1 Podskupina pacientů v přípravném transplantačním režimu fludarabin/ busulfan/thymoglobulin s dávkováním thymoglobulinu 7,5 vs. 6 mg/kg**

V rámci práce byl hodnocen dopad snížení dávkování antithymocytárního globulinu při přípravném režimu na CMV infekci, celkové jednorocní přežití a další vybrané klinické parametry. Do srovnání bylo v uvedeném období zařazeno 64 pacientů. Přípravný režim sestával z fludarabinu (30 mg/m<sup>2</sup> jednou denně po dobu 5 až 6 dní před převodem graftu v celkové dávce 150 až 180 mg/m<sup>2</sup>) v kombinaci s busulfanem (myeloablativní režim: 3,2 mg/kg jednou denně po dobu 4 dní před převodem v celkové dávce 12,8 mg/kg; pro redukované režimy 3,2 mg/kg jednou denně po dobu 2 až 3 dnů v celkové dávce 6,4 až 9,6 mg/kg) [109]. Jako antithymocytární globulin byl podán Thymoglobuline Genzyme (TG, Cambridge, MA, USA, králičí antithymocytární globulin), podávaný rozděleně ve dnech D -3 až D -1 v celkové dávce 7,5 mg/kg versus TG v celkové dávce 6 mg/kg podávaný rozděleně ve

dnech D -2 a D -1 [110, 111]. Obě kohorty pacientů se od sebe nelišily, tabulka č. 3 a tabulka č. 13 (Přílohy).

**Tabulka č. 3: Charakteristika skupin pacientů podle dávky TG 7,5 mg/kg vs. 6 mg/kg**

	TG v dávkování 7,5 mg/kg, n = 27	TG v dávkování 6 mg/kg, n = 37	Hladina významnosti, <i>p</i>
Muži/Ženy (% zastoupení)	48/52	54/46	0,80
Věk v době HSCT (medián, roky)	56	60	0,53
Karnofského skóre v době HSCT (medián)	80	80	0,31
Nejčastější základní diagnóza (% zastoupení)	Akutní myeloidní leukémie (44)	Akutní myeloidní leukémie (54)	0,82
Zastoupení ostatních diagnóz (% zastoupení)	Akutní lymfoblastická leukémie (19), chronická lymfatická leukémie (19), myeloproliferativ- ní nemoci (7), nehodgkinské lymfomy (7), myelodysplastický syndrom (4)	Myelodysplastický syndrom (16,2), akutní lymfoblastická leukémie (8,2), chronická lymfatická leukémie, myeloproliferativní nemoci, chronická myelomonocytární leukémie, nehodgkinské lymfomy (každá 5,4)	> 0,12
Pohlaví dárce: muži/ženy (% zastoupení)	85/14	76/24	0,53
Věk dárce v době HSCT (medián, roky)	29	29	0,89
Množství CD34 <sup>+</sup> x 10 <sup>6</sup> /kg ve štěpu (medián)	7	6,5	0,40
Plně shodný nepřibuzenský dárce, HLA 10/10 (zastoupení, %)	70	68	1,00
Částečně shodný nepřibuzenský dárce, HLA 9/10 nebo 8/10 (zastoupení, %)	30	26	0,80

Plně shodný příbuzenský dárce, HLA 10/10 (%)	0	5	0,50
Myeloablativní režim (% zastoupení)	26	40	0,29
Kompletní remise v době HSCT (% zastoupení)	41	55	0,32
CMV sérostatus D <sup>-</sup> /R <sup>+</sup> (% zastoupení)	52	53	1,00
CMV sérostatus D <sup>+</sup> /R <sup>+</sup> (% zastoupení)	30	29	1,00
CMV sérostatus D <sup>+</sup> /R <sup>-</sup> (% zastoupení)	4	10	0,39
CMV sérostatus D <sup>-</sup> /R <sup>-</sup> * (% zastoupení)	14	8	0,43

\* V této skupině pacientů nebyla zaznamenána primoinfekce CMV – vyňato ze statistiky.

### 3.2 Detekce CMV infekce

Pro účely této práce byl průkaz CMV DNAémie pomocí PCR, nebo průkaz CMV nemoci uvažován jako „CMV infekce“ nebo „CMV infekce“ nebo „CMV reaktivace/primoinfekce“ nebo „CMV replikace“. Průkaz CMV DNAémie pomocí PCR, nebo průkaz CMV nemoci u pacienta IgG negativního před HSCT byl označen jako „CMV primoinfekce“, termín „reaktivace“ byl používán při tomto průkazu u pacienta IgG pozitivního před HSCT.

Pro průkaz CMV nemoci byl nutný přímý průkaz viru v biopsii postižených úseků tlustého střeva v případě CMV kolitidy a v bronchoalveolární laváži nebo plicní biopsii v případě CMV pneumonie. Diagnóza CMV retinitidy se opírala o průkaz typických lézí při vyšetření oftalmologem. Definice CMV nemoci jsou přehledně uvedeny v práci Ljungmana z r. 2002 [52].

Séropozitivita CMV IgG byla testována enzymatickou imunoanalýzou s chemiluminiscenční detekcí na automatickém analyzátoru Architect i2000 (Abbott Laboratories, Chicago, IL, USA).

CMV DNAémie byla pravidelně monitorována pomocí kvantitativní real-time PCR ve vzorcích plně nesrážlivé periferní krve v EDTA, případě v bronchoalveolární laváži (200 µl z celkového množství aliquotu). Nukleová kyselina byla ze vzorků extrahována pomocí QIAamp DNA Mini Kitu (Qiagen, Hilden, Spolková republika Německo) dle pracovního návodu výrobce pro izolaci virové DNA z biologického materiálu. Ke kvantitativnímu stanovení CMV DNA byl použit komerční kit Arthus CMV RG PCR Kit (96) CE (Qiagen). Mezi detekce této metody bylo 100 kopií/ml (odpovídá 79,4 UI/ml), mezi stanovitelnosti 500 kopií/ml. Při nekomplikovaném průběhu byla frekvence odběrů jednou týdně do dne 100 po HSCT a dále každé 2–3 týdny, při komplikacích častěji.

Průkaz CMV ve tkáni byl prováděn metodou imunohistochemie. Na nebarveném parafinovém řezu tloušťky 2 µm bylo provedeno vyšetření s myší primární protilátkou proti antigenům CMV (jaderným proteinům: „early nuclear protein“ a „immediate-early nuclear protein“). Podrobný popis postupu detekce je uveden v tabulce č. 4. Detekce probíhala v přístroji VENTANA BenchMark ULTRA (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) s použitím detekčního kitu UltraView DAB IHC Detection Kit (Ventana Medical Systems). Jako chromogen byl použit diaminobenzidin (DAB).

**Tabulka č. 4: Popis imunohistochemického vyšetření CMV v bioptickém materiálu**

<b>Primární protilátka:</b>	
Klon DDG9 + CCH2 – ředění 1:100 (Dako, Glostrup, Dánsko)	
<b>Proces:</b>	<b>Čas</b>
1. Zahřívání skel na 65 °C + inkubace (sušení)	4 min.
2. Zahřívání skel na 72 °C	
3. Aplikace kondicionéru CC1, zahřívání skel na 95 °C a inkubace	64 min.
4. Ochlazení skel na 37 °C	
5. Aplikace primární protilátky + inkubace	32 min.
6. Aplikace jedné kapky HEMATOXYLIN II, zakrytí + inkubace	4 min.
7. Aplikace jedné kapky BLUING REAGENT, zakrytí + inkubace	4 min.

U pacientů s terapií VGCV nebo GCV byly měřeny plazmatické hladiny GCV. Toto vyšetření bylo provedeno za pomoci Agilent HPLC 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) retrospektivně ze vzorků mražené plazmy.



### 3.3 Sekvenační analýza

Sekvenační analýza genů UL97 a UL54 byla provedena u všech pacientů suspektně rezistentních k léčbě. Za klinickou rezistenci byl považován stav, kdy po minimálně 2 týdnech řádně vedené antivirové terapie došlo k nárůstu CMV nálože alespoň o jeden řád [70]. Vyšetření rezistence pomocí sekvenační analýzy bylo provedeno i v případě prolongovaného vylučování viru (tj. v případě, že po dvou týdnech léčby došlo k nárůstu kvantity DNAémie menšímu než 1 řád) a při opakovaných reaktivacích CMV.

Pozitivní vzorky CMV DNA byly uchovány při teplotě -20 °C pro retrospektivní testování sekvenační analýzou a pro přesné určení doby vzniku konkrétní mutace.

Sekvenační analýza genů UL97 (v rozsahu kodonů 460–607) a UL54 (v rozsahu kodonů 408–987) byla provedena metodikou dle Sangera na přístroji Sequencer Applied Biosystems 3130/3130x (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA, popsáno jinde, [112]). Získané sekvence byly srovnávány s referenčním kmenem CMV AD 169, GenBank č. FJ527563.1, pomocí programu na detekci všech odchylek proti referenčnímu kmenu, který byl pro naše potřeby vytvořen (dostupný na [http://www.vejrazka.name/apps/med/dna/sample\\_matching/](http://www.vejrazka.name/apps/med/dna/sample_matching/)), viz obrázek č. 1. Výhodou programu je, že program dokáže pracovat i s tzv. degenerovanou sekvencí, ve které jsou na jednom místě detekovány dva nukleotidy, zapsány podle mezinárodně uznávaného kódu – např. sekvenační hodnota „M“ je chápána jako „nukleotid A a C“, hodnota „H“ znamená „nukleotid A a C a T“ atd. Program může být jednoduše rozšířen o další referenční sekvence a je nyní provozován ve zkušební verzi bez garance dostupnosti. Získané výsledky tohoto porovnání DNA byly následně porovnány s naší databází literárně popsaných mutací vs. polymorfismů a s německou univerzitní databází dostupnou na webovém programu MRA – Mutation Resistance Analyzer [27].

## Obrázek č. 1: Ukázka výsledku programu na detekci změn nukleových bází testovaného kmene oproti referenčnímu kmeni

Changes Between Sample and UL97 Reference:

456: GAT -> GAC  
 460: ATG -> ATA  
 553: TTG -> CTG  
 579: GGT -> GGC  
 616: AGC -> AGT  
 634: CTA -> CTG

Complete Comparison Printout

```

1 ATGTCCTCCGCACCTTCGGTCTCGGGCTCGCTCGGCCTCGCTCGGAACGACGACTCAGGGCTGGGATCCGCCGCCATTGCG 80

1121 GCACGCGCGCCGCTGGCGAGCAACAGCAGCCGCCGCTCGCTGGTGGGCACGGCGTGCACCGCGGTCTGCTCACGGCCACG 1200

1201 GGCTGCTGTCTGCTGCACAACGTACGGTACATCGACGTTTCCACACAGACATGTTTCATCACGACCAAGTGAAGCTGGC 1280

1281 GTGCATCGACAGCTACCGACGTGCCTTTTGACGTTGGCCGACGCTATCAAATTTCTCAATCACCAGTGTGCTGATGCC 1360
      TGGCCGACGCTATCAAATTTCTCAATCACCAGTGTGCTGATGCC

1361 ACTTTGATATTACACCCATGAACGTGCTCATCGACGTGAACCCGCACAACCCAGCGAGATCGTGCAGCCGCGCTGTGC 1440
      ACTTTGACATTACACCATAAACGTGCTCATCGACGTGAACCCGCACAACCCAGCGAGATCGTGCAGCCGCGCTGTGC
      * *

1441 GATTACAGCCTCAGCGAGCCCTATCCGGATTACAACGAGCGCTGTGTGGCCGCTTTTCAGGAGACGGGCACGGCGCGCCG 1520
      GATTACAGCCTCAGCGAGCCCTATCCGGATTACAACGAGCGCTGTGTGGCCGCTTTTCAGGAGACGGGCACGGCGCGCCG

1521 CATCCCCAACTGCTCGCACCGTCTGCGCGAATGTTACCACCCTGCTTTCCGACCCATGCCGCTGCAGAAGCTGCTCATCT 1600
      CATCCCCAACTGCTCGCACCGTCTGCGCGAATGTTACCACCCTGCTTTCCGACCCATGCCGCTGCAGAAGCTGCTCATCT

1601 GCGACCCGACGCGCGTTTTCCCGTAGCCGGCTACGGCGTTATTGCATGTCGGAGTTGTCGGCGCTGGGTAACGTGCTG 1680
      GCGACCCGACGCGCGTTTTCCCGTAGCCGGCTACGGCGTTATTGCATGTCGGAGCTGTCGGCGCTGGGTAACGTGCTG
      *

1681 GGCTTTTGCTCATGCGGCTGTTGGACCGCGCGGCTGGACGAGGTGCGCATGGGTACGGAGGCGTTGCTCTTTAAGCA 1760
      GGCTTTTGCTCATGCGGCTGTTGGACCGCGCGGCTGGACGAGGTGCGCATGGGCACGGAGGCGTTGCTCTTTAAGCA
      *

1761 CGCCGGCGCGGCTGCGCGCGTTGGAGAACGGCAAGCTCACGCACTGCTCCGACGCTGTCTGCTATTCTGGCGGCGC 1840
      CGCCGGCGCGGCTGCGCGCGTTGGAGAACGGCAAGCTCACGCACTGCTCCGACGCTGTCTGCTATTCTGGCGGCGC

1841 AAATGAGCTACGGCGCTGTCTCCTGGGCGAGCATGGCGCCGCGTGGTGTGCGACACGCTACGCTTTGTGGAGGCCAAG 1920
      AAATGAGTTACGGCGCTGTCTCCTGGGCGAGCATGGCGCCGCGTGGTGTGCGACACGCTACGCTTTGTGGAGGCCAAG
      * *

1921 ATGTCTCGTGTGCGTACGCGCTTTCGCGGCTTCTACCACGAATGCTCGCAGACCATGCTGCACGAATACGTCAGAAA 2000

2001 GAACGTGGAGCGTCTGTTGGCCACGAGCGACGGGCTGATTTTATATAACGCCTTTTCGGCGCACCCAGCATAATCTGCG 2080

2081 AGGAGGACCTTGACGGTGACTGCCGTCACTGTTCCCGAGTAA 2124
  
```

Legenda: Výsledek analýzy ukazuje rozdíly ve vzorku oproti referenční sekvenci, jejich pozici a konkrétní rozdílné kodony. Je zobrazena referenční sekvence (horní řádek), analyzovaný vzorek (spodní řádek), hvězdičkami jsou označeny rozdíly.

### **3.3.1 Porovnání metod sekvenační analýzy podle Sangera a sekvenování nové generace u pacientů s prokázanou virovou rezistencí**

Při průkazu virové rezistence podle metodiky dle Sangera (pomocí genetického analyzátoru Sequencer Applied Biosystems 3130/3130x) bylo doplněno vyšetření podle platformy pro NGS MiSeq Illumina (Illumina, USA). Pro sekvenační analýzu bodových mutací na analyzátoru MiSeq (Illumina) byly vybrány odpovídající primery za použití programu Custom Primers – OligoPerfect™ (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA). Retrospektivně provedená sekvenace vzorků u pacientů s prokázanou virovou rezistencí UL97 byla využita pro analýzu proporcionálního zastoupení mutovaných kmenů CMV v čase. U pacienta č. 1 byla sekvenační analýza podle Sangera i analýza pomocí NGS provedena ve 12 vzorcích, u pacienta č. 2 v 8 vzorcích a u pacienta č. 3 byla vyšetřeno 7 vzorků pomocí Sangerovy metody a 5 vzorků pomocí NGS.

### 3.4 Schéma léčby CMV

CMV replikace byla konstatována při průkazu více než 100 kopií CMV DNA/ml plné krve. Pokud CMV nálož překročila 1000 kopií/ml, byla zahájena léčba CMV reaktivace/primoinfekce valganciclovirem v dávce 900 mg 2x denně do poklesu virové nálože alespoň o 50 % a poté byla minimálně 2 týdny podávána udržovací terapie 900 mg 1x denně obvykle do negativních výsledků vyšetření virémie. Udržovací terapie nebyla zahájena, nebo byla zkrácena na dobu jednoho týdne v případě, že úvodní nálož nepřesáhla  $10^4$  cp/ml a již v průběhu úvodní léčby došlo k rychlé negativitě DNAémie.

Léčba FOS byla preferována při závažnější formě cytopenie. Při terapii CMV nemoci byl podán GCV (v dávce 5 mg/kg dvakrát denně po dobu 2 týdnů, poté 5 až 6 mg/kg denně po dobu dalších minimálně 2–4 týdnů při vymizení všech symptomů) nebo FOS (v dávce 90 mg/kg dvakrát denně po dobu 2 týdnů, poté 120 mg/kg jednou denně po dobu dalších minimálně 2–4 týdnů při vymizení všech symptomů) podle doporučených postupů společnosti National Comprehensive Cancer Network (NCCN) [113]. U jednoho pacienta se současnou adenovirovou enteritidou byl podán cidofovir (dle schématu 5 mg/kg jednou týdně v prvním a druhém týdnu, dále jednou za dva týdny, léčba byla kombinována s probenecidem) [113].

### 3.5 Statistická analýza

Statistické zhodnocení dat bylo provedeno pomocí statistického procesoru SPSS 19 (IBM), NCSS 11 Statistical Software (2016, USA, [ncss.com/software/ncss](http://ncss.com/software/ncss)) a programovacího jazyka Python ([www.python.org](http://www.python.org)).

Hodnocení kvalitativních dat bylo provedeno Fisherovým přesným testem. Ke zjištění statistické významnosti mezi skupinami byl použit neparametrický Mann–Whitney test. Normální rozdělení dat byla zamítnuto na základě Q-Q grafu, pro výpočet korelace byl proto zvolen Spearmanův koeficient pořadové korelace. Zvolená hladina významnosti byla  $\alpha = 0,05$ . Pro výpočet vztahu kvalitativních závislých veličin na nezávislých faktorech byla použita multivariantní logistická regrese. Faktory hodnocené multivariantní analýzou byly vybrány na základě výsledků univariantní logistické regrese.

Datové grafy byly zpracovány pomocí programu Microsoft Excel a programovacího jazyka Python.

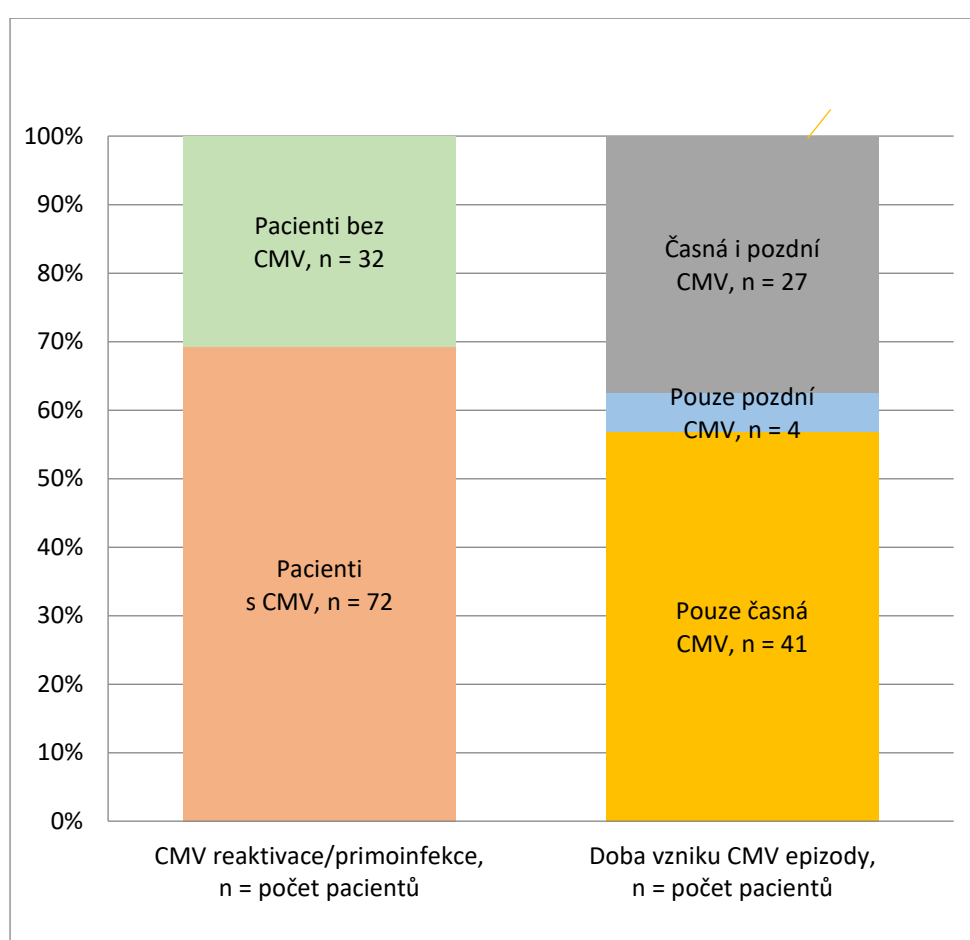
Tato práce byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice v Hradci Králové, č.j. 201704 S02P a 201808 S24P.

## 4. Vlastní výsledky

### 4.1 CMV reaktivace/primoinfekce a její léčba

DNAémie pomocí PCR byla prokázána u 72 pacientů (69 %) po HSCT. Z těchto mělo 41 pouze časnou CMV reaktivaci/primoinfekci (tj. prokázanou do 100. dne po HSCT). Pouze pozdní infekci, tj. po 100. dnu, měli 4 pacienti. Časný i pozdní průkaz viru současně, tedy buď kontinuální pozitivita před a po dni 100, nebo pozitivita před s následnou negativitou a opětovnou pozitivitou po dni 100, byla zaznamenána u 27 nemocných, graf č. 1.

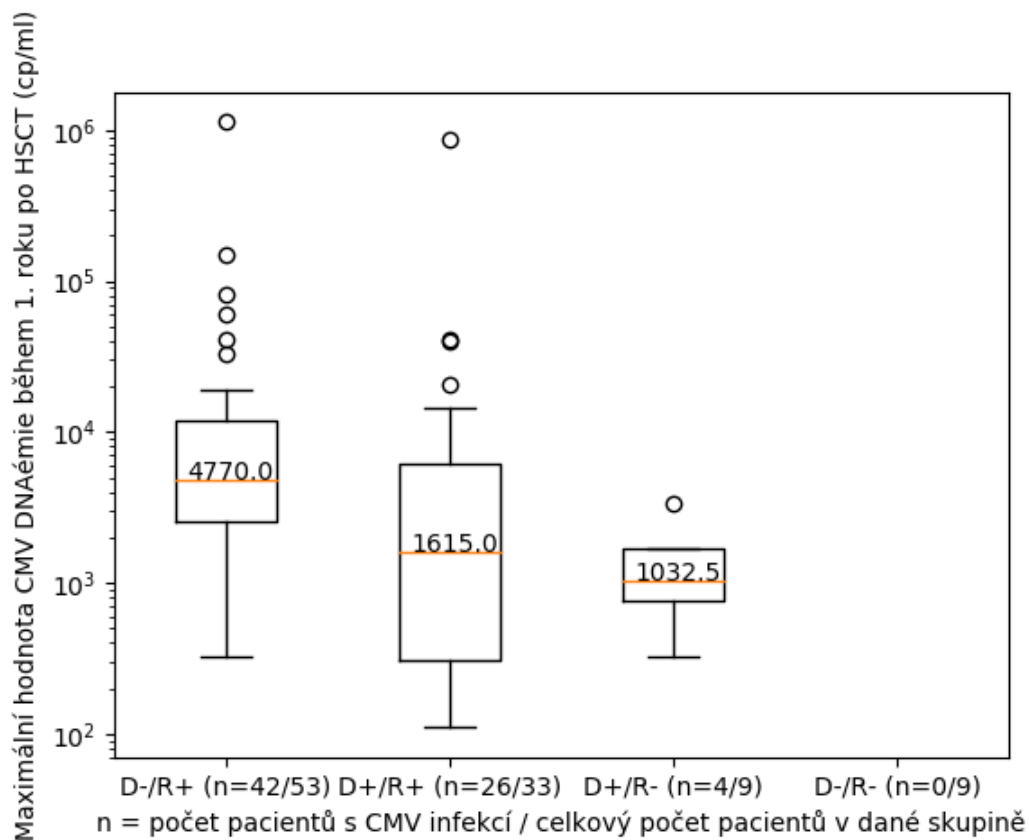
**Graf č. 1: Průkaz CMV po HSCT**



U séropozitivních pacientů ( $D^-/R^+$  nebo  $D^+/R^+$ ) došlo k reaktivaci CMV v 79 % (obě skupiny), u skupiny séronegativních nemocných se séropozitivním dárce ( $D^+/R^-$ ) byla CMV DNA detekována jen ve 44 % ( $p = 0,035$ , Fisherův přesný test). Ve skupině pacientů  $D^-/R^-$  nebyla zaznamenána CMV pozitivita. U séropozitivních pacientů se séronegativním dárce docházelo často k opakovaným CMV reaktivacím (v 71 % případů vs. 42 % u skupiny  $D^+/R^+$ ,  $p = 0,022$ ). Ve skupině  $D^+/R^-$  k opakované reaktivaci nedošlo,  $p = 0,011$  vůči  $D^-/R^+$ ). Ve

skupině séropozitivních pacientů se séronegativním dárce byly také prokázány nejvyšší maximální hodnoty CMV DNAémie (medián 4770 cp/ml u skupiny D<sup>-</sup>/R<sup>+</sup>, vs. 1615 cp/ml u D<sup>+</sup>/R<sup>+</sup> a 1032,5 cp/ml u D<sup>+</sup>/R<sup>-</sup>, p = 0,0243, resp. 0,0290, Mann – Whitneyho test), viz graf č. 2 a tabulka č. 14 (Přílohy). V jednorocní celkové mortalitě (22 až 34 %) nebyl rozdíl mezi jednotlivými sérostatusy (p = 0,634 – 1,0).

**Graf č. 2: U pacientů s CMV sérostatusem D<sup>-</sup>/R<sup>+</sup> byly detekovány nejvyšší hladiny DNAémie po HSCT (mezi skupinou pacientů se sérostatusy D<sup>+</sup>/R<sup>+</sup> a D<sup>+</sup>/R<sup>-</sup> nebyl signifikantní rozdíl, p = 0,604)**



Pacienti, u nichž byla CMV reaktivace/primoinfekce prokázána, byli oproti pacientům bez CMV mladší v době HSCT (medián 51,5 vs. 59 let,  $p = 0,0246$ ) a měli vyšší Karnofského skóre (80 % vs. 75 %,  $p = 0,0284$ ), viz tabulka č. 14 (Přílohy). Zároveň pacienti s vyšším Karnofského skóre byli mladší v době HSCT (dle Spearmanova koeficientu – 0,314 na hladině významnosti 0,001). Pacienti transplantovaní v kompletní remisi měli vyšší Karnofského skóre v době HSCT (80 % vs. 70 % u pacientů, u kterých nebylo dosaženo kompletní remise,  $p = 0,0006$ ). Stejně tak pacienti transplantovaní v myeloablativním režimu (90 % Karnofského skóre vs. 70 % Karnofského skóre u pacientů transplantovaných redukováným režimem,  $p = 0,0006$ ).

Na základě multivariantní analýzy pro incidenci CMV zůstaly jako nezávislé rizikové faktory Karnofského skóre v době HSCT a CMV sérostatus příjemce/dárce, viz tabulka č. 5.

**Tabulka č. 5: Výsledky multivariantní analýzy pro CMV reaktivaci/primoinfekci**

<b>Incidence CMV po HSCT</b>
<p>Analyzované nezávislé rizikové faktory:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- věk v době HSCT</li> <li>- Karnofského skóre v době HSCT</li> <li>- stav nemoci – kompletní remise před HSCT dosažena (ano/ne)</li> <li>- typ HSCT (plně shodný nepříbuzenský/neshodný nepříbuzenský/shodný sourozenecký dárce krvetvorných kmenových buněk)</li> <li>- plná HLA shoda dárce/příjemce 10/10 (ano/ne)</li> <li>- intenzita režimu (myeloablativní vs. redukováný)</li> <li>- CMV sérostatus dárce/příjemce</li> <li>- počet <math>CD34^+ \times 10^6/kg</math> ve štěpu</li> <li>- přítomnost GVDH (ano/ne)</li> </ul>
<p><b>Multivariantní analýza pro CMV séropozitivitu (tj. pro <math>D^-/R^+</math>, <math>D^+/R^+</math>, <math>D^-/R^-</math>, <math>n = 95</math>), signifikantní výsledky – faktory zvyšující riziko CMV reaktivace/primoinfekce:</b></p> <p>Karnofského skóre v době HSCT: OR 1,05, 95 % CI 1,01–1,08, <math>p = 0,00063</math></p> <p>CMV sérostatus: Séropozitivita příjemce (tj. <math>D^-/R^+</math>, <math>D^+/R^+</math>) oproti <math>D^+/R^-</math>: OR 5,93, 95 % CI 1,31–26,92, <math>p = 0,0215</math></p> <p>Koeficient determinace <math>R^2</math> použitého modelu: 0,27, procento správné klasifikace 75,8 %.</p>



**Multivariantní analýza pro CMV séropozitivitu (tj. pro D<sup>-</sup>/R<sup>+</sup>, D<sup>+</sup>/R<sup>+</sup>, D<sup>-</sup>/R<sup>+</sup>) pro podskupinu pacientů s maligním onemocněním (n = 82), signifikantní výsledky – faktory zvyšující riziko CMV reaktivace/primoinfekce:**

Karnofského skóre v době HSCT: OR 1,05, 95 % CI 1,018–1,083, p = 0,00070

CMV sérostatus: Séropozitivita příjemce (tj. D<sup>-</sup>/R<sup>+</sup>, D<sup>+</sup>/R<sup>+</sup>) oproti D<sup>+</sup>/R<sup>-</sup>: OR 6,3, 95 % CI 1,33–29,63, p = 0,0198

Koeficient determinace R<sup>2</sup> použitého modelu: 0,31, procento správné klasifikace 75,6 %.

**Multivariantní analýza pro CMV séropozitivitu (tj. pro D<sup>-</sup>/R<sup>+</sup>, D<sup>+</sup>/R<sup>+</sup>, D<sup>-</sup>/R<sup>+</sup>) pro podskupinu pacientů s akutní myeloidní leukémií (n = 43), signifikantní výsledky – faktory zvyšující riziko CMV reaktivace/primoinfekce:**

Karnofského skóre v době HSCT: OR 1,07, 95 % CI 1,016–1,125, p = 0,00259

CMV sérostatus: Séropozitivita příjemce (tj. D<sup>-</sup>/R<sup>+</sup>, D<sup>+</sup>/R<sup>+</sup>) oproti D<sup>+</sup>/R<sup>-</sup>: OR 20,5, 95 % CI 1,63–258,12, p = 0,0137

Koeficient determinace R<sup>2</sup> použitého modelu: 0,38, procento správné klasifikace 83,7 %.

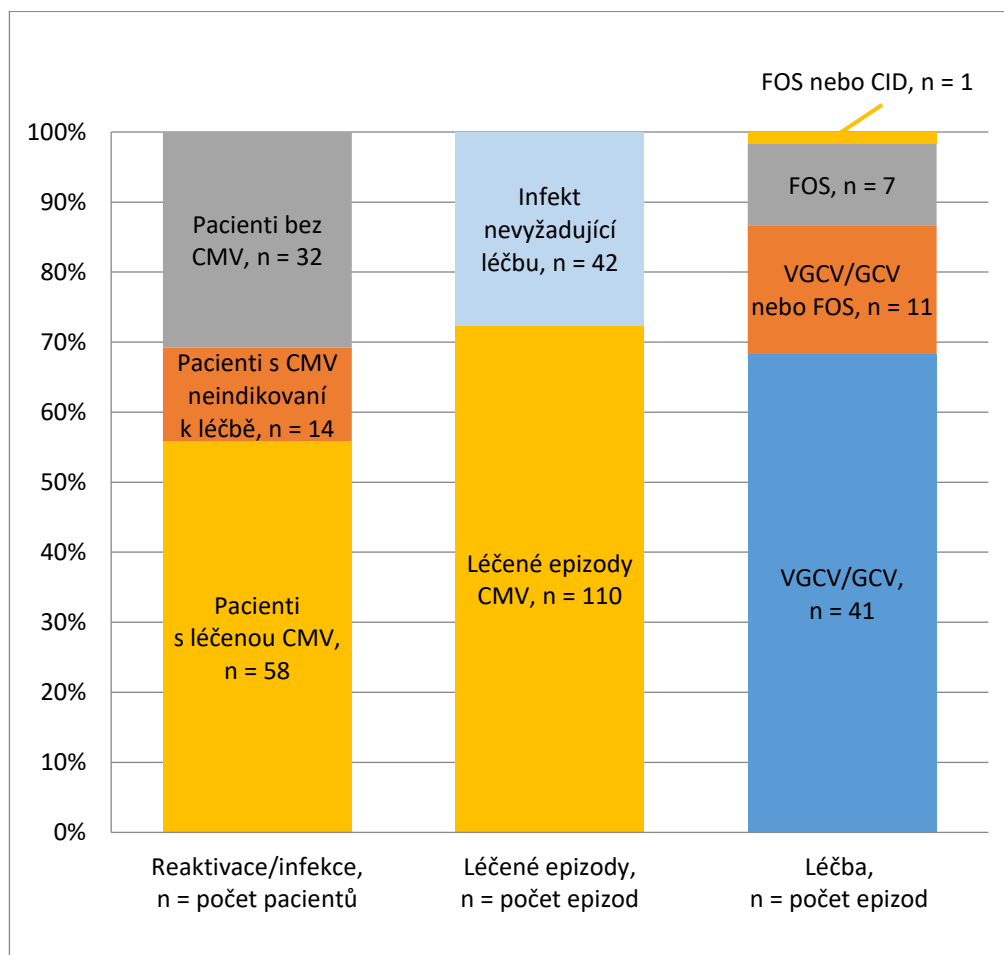
U pacientů transplantovaných v myeloablativním přípravném režimu byla CMV DNAémie prokázána častěji (81 %) než v redukovaném přípravném režimu (62 %), což je na hranici signifikance (p = 0,0525). Stejně tak u pacientů transplantovaných v kompletní remisi (CMV DNAémie u 79 %) oproti pacientům, u kterých nebyla kompletní remise před HSCT dosažena (CMV DNAémie u 61 %, p = 0,0554).

V našem souboru nebyl statisticky signifikantní rozdíl ve vzniku CMV reaktivace/primoinfekce při rozdělení pacientů dle HLA shody (plně shodní vs. neshodní), podle toho, zda se jednalo o příbuzenskou nebo nepříbuzenskou HSCT, zda byl v přípravném režimu použit thymoglobulin, případně celotělové ozáření či nikoliv, podle počtu CD34<sup>+</sup> x 10<sup>6</sup>/kg ve štěpu, ani podle přítomnosti GVHD či její systémové kortikoterapie (p = 0,14 – 0,67).

Analýza podskupiny pacientů s diagnózou akutní myeloidní leukémie neprokázala rozdíl v incidenci relapsu základního onemocnění podle přítomnosti nebo nepřítomnosti CMV infektu po HSCT (pacienti s CMV měli relaps v 17 %, pacienti bez CMV v 36 %, p = 0,219).

Preemptivní léčba CMV byla zahájena ve 110 epizodách CMV infekce u 58 pacientů (91 epizod léčeno VGCV/GCV, 11 případů VGCV/GCV nebo FOS, 7 případů léčeno FOS, 1 nemocný FOS nebo cidofoviem), viz graf č. 3.

**Graf č. 3: Léčba CMV infektu v prvním roce po HSCT**



U pacientů transplantovaných v přípravném režimu s redukovanou intenzitou byla antivirová léčba podána častěji (léčba byla podána u 90 % pacientů s CMV infektem) než u pacientů transplantovaných myeloablativním režimem (léčeno 70 % pacientů s reaktivací/primoinfekcí,  $p = 0,0402$ ).

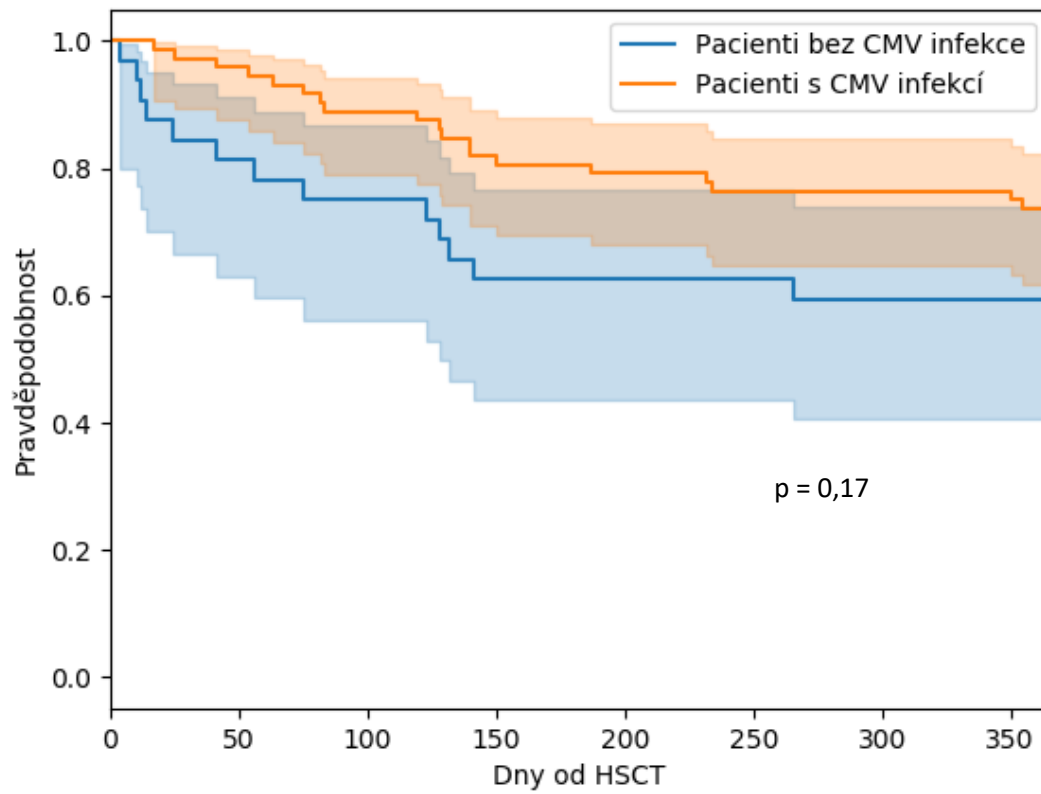
Rekurentní CMV reaktivace v našem souboru nezávisely na tom, zda byli pacienti převedeni z úvodní na udržovací léčbu ještě při detekovatelné virémii v periferní krvi ( $p = 0,576$ ), ani na případné kvantitě DNAémie v době převodu ( $p = 0,133$ ).

CMV nemoc [52] byla v 1. potransplantačním roce prokázána u osmi pacientů (tj. u 7 % celé kohorty). Jednalo se o jeden případ CMV retinitidy (den D +266 po HSCT), 6 případů časně CMV kolitidy (v rozmezí D +29 až +98) a 3 případy pozdní kolitidy (D +132 až

+346). V jednom případě pak byla pozorována suspektní pozdní CMV pneumonie (D +450 po HSCT) s odpovídajícím klinickým a radiologickým obrazem a vysokou CMV náloží v bronchoalveolární laváži ( $10^6$  cp/ml) bez difúzní alveolární hemoragie. U pacientů s prokázanou CMV nemocí byla během CMV nemoci virémie detekována jak v malých kvantitách ( $10^2$  až  $10^3$  kopií/ml), tak u jiných pacientů v kvantitách  $10^4$  až  $10^5$  cp/ml, kteří tak dosáhli svého peaku virémie za celé období. Pacienti, u kterých se vyvinula CMV nemoc, měli během sledovaného období vyšší peak CMV DNAémie (medián 12 400 cp/ml) než pacienti bez CMV nemoci (medián 3 280,  $p = 0,0198$ ), viz tabulka č. 14 (Přílohy).

Přítomnost CMV infektu neměla vliv na klinický outcome v prvním roce po HSCT: celková jednorozční mortalita pacientů s CMV byla 26 %, bez CMV 41 %, což nedosahovalo signifikance ( $p = 0,17$ ), viz graf č. 4. To, zda bylo nutné podat virostatickou terapii či nikoliv (v případě nízkých kvantit CMV), také nemělo vliv na jednorozční celkovou mortalitu ( $p = 0,499$ ). Vliv CMV infektu na jednorozční mortalitu nebyl potvrzen ani multivariantní analýzou logistické regrese, viz tabulka č. 6. V jednom případě došlo k úmrtí pacienta s jaterní GVHD mající možnou příčinnou souvislost s CMV nemocí a těžkou enteritidou. Tento pacient byl klinicky rezistentní k terapii ganciclovirem i foscarnetem, ale při opakované sekvenaci klinického izolátu nebyla prokázána mutace CMV vedoucí ke snížené citlivosti na tato virostatika. Ve zbytku souboru nedošlo k úmrtí v přímé souvislosti s CMV nemocí, a to včetně pacientů s prokázanou rezistentní mutantou viru. Ve sledovaném období zemřelo celkem 32 pacientů. Příčinou úmrtí byla nejčastěji infekční komplikace jiného původu než CMV (19 pacientů), relaps a progresse základní nemoci (4 pacienti).

**Graf č. 4: Kaplan–Meierova křivka celkového jednoročního přežití pacientů s/bez CMV primoinfekce/reaktivace**



**Tabulka č. 6: Výsledky multivariantní analýzy pro celkovou jednoroční mortalitu**

<b>Jednoroční celková mortalita</b>
<p>Analyzované nezávislé rizikové faktory:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- pohlaví pacienta</li><li>- věk v době HSCT</li><li>- Karnofského skóre v době HSCT</li><li>- stav nemoci – kompletní remise před HSCT dosažena (ano/ne)</li><li>- typ HSCT (plně shodný nepříbuzenský/neshodný nepříbuzenský/shodný sourozenecký dárce krvetvorných kmenových buněk)</li><li>- plná HLA shoda dárce/příjemce 10/10 (ano/ne)</li><li>- intenzita režimu (myeloablativní vs. redukovaný přípravný transplantační režim)</li><li>- CMV sérostatus dárce/příjemce</li><li>- počet CD34<sup>+</sup> x 10<sup>6</sup>/kg ve štěpu</li><li>- přítomnost GVDH (ano/ne)</li><li>- systémová kortikoterapie pro GVHD (ano/ne)</li><li>- relaps/progrese (ano/ne)</li><li>- dosažení kompletního chimérismu (ano/ne)</li><li>- dosažení přihojení v leukocytech, neutrofilech, trombocytech* (ano/ne)</li><li>- reaktivace/primoinfekce CMV (ano/ne)</li><li>- klinická rezistence CMV (ano/ne)</li><li>- CMV nemoc (ano/ne)</li><li>- léčba reaktivace/primoinfekce CMV (ano/ne)</li><li>- přítomnost mutovaného rezistentního kmene CMV (ano/ne)</li><li>- opakovaná reaktivace CMV(ano/ne)</li><li>- nutnost opakované léčby CMV reaktivace/primoinfekce (ano/ne)</li></ul>
<p><b>Multivariantní analýza pro celkovou jednoroční mortalitu (n = 101), signifikantní výsledky – faktory snižující mortalitu:</b></p> <p>Karnofského skóre v době HSCT: OR 0,95, 95 % CI 0,92–0,98, p = 0,00091</p> <p>Dosažení kompletního chimérismu: OR 0,042, 95 % CI 0,012–0,143, p = 0</p> <p>Koeficient determinace R<sup>2</sup> použitého modelu: 0,60, procento správné klasifikace 81,2 %.</p>

**Multivariantní analýza pro celkovou jednoroční mortalitu pro podskupinu pacientů s maligním onemocněním (n = 85), signifikantní výsledky – faktory snižující mortalitu:**

Karnofského skóre v době HSCT: OR 0,94, 95 % CI 0,90–0,98, p = 0,00094

Dosažení kompletního chimérismu: OR 0,023, 95 % CI 0,0049–0,105, p = 0

Koeficient determinace  $R^2$  použitého modelu: 0,69, procento správné klasifikace 84,7 %.

**Multivariantní analýza pro celkovou jednoroční mortalitu pro podskupinu pacientů s akutní myeloidní leukémií (n = 45), signifikantní – faktory snižující mortalitu:**

Karnofského skóre v době HSCT: OR 0,93, 95 % CI 0,88–0,97, p = 0,00009

Nepřítomnost relapsu: OR 0,078, 95 % CI 0,011–0,577, p = 0,007

Koeficient determinace  $R^2$  použitého modelu: 0,60, procento správné klasifikace 84,4 %.

\* Datum příhojení je definováno jako první den ze tří po sobě následujících dní splňujících kvantitativní kritérium, přičemž poslední transfúze byla alespoň 7 dní před tímto datem, definováno podle European Group for Blood and Marrow Transplantation [114].

#### 4.2 Podání thymoglobulinu 7,5 vs. 6 mg/kg v rámci přípravného režimu fludarabin/busulfan/thymoglobulin

Snížení dávkování thymoglobulinu z 7,5 na 6 mg/kg rámci přípravného režimu fludarabin/busulfan/thymoglobulin neovlivnilo parametry CMV infektu. U pacientů s vyšším dávkováním byl CMV prokázán časněji po HSCT, což bylo na hranici statistické významnosti ( $p = 0,056$ ), viz tabulka č. 7 a tabulka č. 13 (Přílohy).

**Tabulka č. 7: Podání thymoglobulinu v dávkování 7,5mg/kg vs. 6 mg/kg – parametry CMV infektu**

	TG v dávkování 7,5 mg/kg, n = 27	TG v dávkování 6 mg/kg, n = 37	Hladina významnosti, <i>p</i>
Průkaz CMV reaktivace/primoinfekce (% pacientů)	56	73	0,18
Doba do 1. CMV detekce (počet dní od HSCT, medián)	<b>D +28</b>	<b>D +40</b>	<b>0,056</b>
Počáteční CMV nálož (cp/ml periferní krve, medián)	395	455	0,67
Maximální virová nálož CMV (cp/ml periferní krve, medián)	4610	3140	0,44
Nutnost podání anti-CMV léčby (% pacientů)	93	85	0,63
Doba do zahájení virostatické terapie (počet dní od HSCT, medián)	D +40	D +42	0,27
Kumulativní léčba virostatiky (počet dní podávání virostatik, medián)	40	43	1,0
Výskyt CMV nemoci* (% pacientů)	14,8	5,4	0,23

\* podle definice Ljungmana [52]

Nižší dávkování thymoglobulinu nevedlo k vyšší incidenci GVHD ani vyššímu riziku relapsu či mortalitě v prvním potransplantačním roce, blíže tabulka č. 8 a tabulka č. 13 (Přílohy).

**Tabulka č. 8: Podání thymoglobulinu v dávkování 7,5mg/kg vs. 6 mg/kg a klinická data**

	TG v dávkování 7,5 mg/kg, n = 27	TG v dávkování 6 mg/kg, n = 37	Hladina významnosti, <i>p</i>
Dosažení kompletního dárcovského chimérismu (%)	59	65	0,79
Den dosažení kompletního dárcovského chimérismu (den po HSCT, medián)	D +29	D +34	0,40
Den příhojení*: leukocyty > 1x10 <sup>9</sup> /l (den po HSCT, medián)	D +13,5* <sup>2</sup>	D +14* <sup>3</sup>	0,45
Den příhojení *: Absolutní počet neutrofilů > 0,5x10 <sup>9</sup> /l (den po HSCT, medián)	D +16* <sup>2</sup>	D +16* <sup>3</sup>	0,90
Den příhojení *: trombocyty > 20x10 <sup>9</sup> /l (den po HSCT, medián)	D +16* <sup>4</sup>	D +16* <sup>3</sup>	0,32
Incidence GVHD (%)	56	43	0,44
Nutnost systémové kortikoterapie pro GVHD (%)	80	75	1,00
Odhojení štěpu (%)	4	0	0,42
Relaps (%)	26	19	0,55
Celková mortalita ke dni D+100 po HSCT (%)	19	14	0,73
Celková mortalita ke dni 365 po HSCT (%)	44	32	0,43
Non-relapse mortalita ke dni 365 po HSCT (úmrtí z jakékoliv příčiny bez předchozí relapse/progrese onemocnění, %)	26	22	0,17

\* Definováno podle European Group for Blood and Marrow Transplantation [114]



\*<sup>2</sup> Úmrtí jednoho pacienta před dosažením příhojení ve skupině s dávkováním TG 7,5 mg/kg

\*<sup>3</sup> Úmrtí jednoho pacienta před dosažením příhojení ve skupině s dávkováním TG 6 mg/kg

\*<sup>4</sup> Úmrtí pěti pacientů před dosažením příhojení ve skupině s dávkováním TG 7,5 mg/kg

### 4.3 Klinická a virová rezistence na ganciclovir

Klinická rezistence (selhání léčby) – tj. vzestup virové nálože alespoň o 1 řád i přes 2 týdny trvající specifickou virostatickou léčbu – byla pozorována u sedmi pacientů (12 % pacientů, kterým byla podaná antivirová léčba), virová rezistence byla prokázána u tří nemocných (5 % léčených pacientů). Při sekvenční analýze izolovaných kmenů CMV byly prokázány 3 bodové mutace kódující virovou rezistenci v oblasti genu UL97 (mutace L595F, M460I, A594V). Tyto kodony jsou v literatuře popsány jako mutace vedoucí ke snížené citlivosti kmene na GCV/VGCV [115–120]. Mutace v oblasti genu pro virovou polymerázu (UL54) spojené s genotypovou rezistencí nebyly v našem souboru prokázány. Klinická data pacientů s prokázanou mutací jsou prezentována v tabulce č. 9.

**Tabulka č. 9: Pacienti s prokázanou virovou rezistencí CMV na ganciclovir**

	Pacient č. 1	Pacient č. 2	Pacient č. 3
Pohlaví, věk (roky)	Muž, 48	Žena, 60	Muž, 51
Základní diagnóza	Chronická lymfocytární leukémie	Akutní myeloidní leukémie	Akutní lymfoblastická leukémie
Dárce	Plně shodný nepříbuzný (HLA shoda 10/10)	Plně shodný nepříbuzný (HLA shoda 10/10)	Neshodný nepříbuzný (HLA shoda 9/10)
Přípravný režim	Fludarabin/Treosulfan/Tg myeloablativní	Fludarabin/Busulfan/Tg myeloablativní	Fludarabin/celotělové ozáření/Tg myeloablativní
CMV sérostatus (dárce/příjemce)	D <sup>-</sup> /R <sup>+</sup>	D <sup>-</sup> /R <sup>+</sup>	D <sup>-</sup> /R <sup>+</sup>
Přihojení* <sup>1</sup> : leukocyty > 1 x 10 <sup>9</sup> /l, neutrofilů > 0,5 x 10 <sup>9</sup> /l, trombocyty > 20 x 10 <sup>9</sup> /l (dny od HSCT)	D +10 D +11 D +17	D +14 D +19 D +17	D +10 D +11 D +18
Doba do 1. průkazu CMV DNAémie (dny od HSCT)	D +20	D +28	D +15
Doba do zahájení první léčby (dny od HSCT)	D +21	D +29	D +19

Maximální peak virémie, CMV DNA kopií/ml (v periferní krvi)	82 200	41 400	13 400
Mutace kódující rezistenci k GCV	L595F	M460I	A594V
Počet CMV epizod do vzniku mutace	2	3	2
Doba do rozvoje klinické rezistence (dny od HSCT)	D +130	D +168	D +168
Doba do vzniku mutace prokázaná dle Sangera a NGS (prokázáno zpětně, dny od HSCT)	D +83 dle Sangera D +83 dle NGS	D +140 dle Sangera D +134 dle NGS	D +168 dle Sangera Není k dispozici dle NGS
CMV nálož v době rozvoje klinické rezistence, CMV DNA kopií/ml (v periferní krvi)	16 800	4 510	1420
CMV nálož v době objevení se mutace, CMV DNA kopií/ml (v periferní krvi, zjištěno zpětně)	1 150	3 160 (1 120 při průkazu dle NGS)	1 420
Kumulativní léčba do vyslovení klinické rezistence (dny)	92 VGCV/GCV	90 VGCV	124 VGCV/GCV
Kumulativní léčba do vzniku virové mutace (dny, prokázáno zpětně)	49 VGCV/GCV	61 VGCV (56 VGCV dle NGS)	124 VGCV/GCV
CMV nemoc / počet dní od HSCT	Kolitida/D +29 Kolitida/D +230	Retinitida/D +266	Ne
Nemoc se vyvinula během virostatické léčby	1. kolitida: ano 2. kolitida: ne	Ne	----
Poslední průkaz CMV DNAémie (dny od HSCT)	D +307	D +323	D +225

GVHD do doby vzniku mutace	Ne	Ano (kožní) chronická, mírná* <sup>2</sup>	Ano (kožní) akutní, grade 1* <sup>3</sup>
Klinický outcome	Zemřel D +504 (příčina: sepe, pneumonie)	Sledování ukončeno 3 roky po HSCT: Karnofského skóre: 100 %	Sledování ukončeno 3 roky po HSCT, Karnofského skóre: 100 %

\*<sup>1</sup> Definováno podle European Group for Blood and Marrow Transplantation [114]

\*<sup>2</sup> Jen s mírným postižením (bez významného omezení běžné denní činnosti) [121, 122]

\*<sup>3</sup> Vakuolární degenerace epidermálních buněk bazální a suprabazální vrstvy (nespecifické pro GVDH) [108]

Medián stanovení diagnózy klinické rezistence byl 118 dní po HSCT (rozmezí 48 až 168 dní). U tří pacientů s prokázanou virovou mutací to bylo 168 dní po HSCT, v mediánu po 90 dnech podávané kumulativní léčby, viz tabulka č. 9. U čtyř pacientů bez prokázané CMV genotypové rezistence byla doba do vyslovení diagnózy klinické rezistence kratší, medián 62 dní po HSCT (v rozmezí 48 až 118 dní,  $p = 0,0497$ ), v mediánu po 16,5 dne kumulativní léčby VGCV/GCV ( $p = 0,0497$ ).

Nemocní s klinickou rezistencí byli během prvního roku po HSCT léčení delší kumulativní dobu ve srovnání s pacienty citlivými k léčbě (medián 97 vs. 39 dnů,  $p = 0,0035$ ) a měli vyšší maximální kvantitu CMV v periferní krvi (medián 41 500 vs. 4 160 cp/ml,  $p = 0,0003$ ). Virová nálož v době převodu z úvodní na udržovací léčbu byla také vyšší (medián 1305 vs. 437 cp/ml,  $p = 0,0173$ ). Nebyl prokázán rozdíl v době do první CMV detekce ani v době do zahájení CMV léčby po HSCT mezi těmito skupinami pacientů (medián 34 dnů u pacientů citlivých k léčbě vs. 27 dní u klinicky rezistentních,  $p = 0,13$ , resp. medián 31 vs. 42 dní,  $p = 0,08$ ). Také prvotní CMV nálož byla srovnatelná (1070 cp/ml pro klinicky rezistentní vs. 455 cp/ml,  $p = 0,073$ ). Kvartily uvedených hodnot viz tabulka č. 14 (Přílohy).

Čtyři pacienti byli klinicky rezistentní během první epizody CMV reaktivace, pět pacientů během druhé nebo třetí léčené epizody, virová rezistence se vyvinula ve druhé nebo třetí léčené reaktivaci.

Všichni nemocní se selháním léčby byli séropozitivní v předtransplantačním období ( $D^-/R^+$ ,  $D^+/R^+$ ). CMV genotypová rezistence byla prokázána pouze u transplantovaných se sérostatusem  $D^-/R^+$ . Vztah mezi séropozitivitou pacienta (tj. skupina  $D^-/R^+$  a  $D^+/R^+$ ) a ani

samotným rizikovým sérostatusem D<sup>-</sup>/R<sup>+</sup> a CMV rezistencí nebyl prokázán ( $p = 1$ , respektive  $p = 0,54$ ), což může být dáno velikostí souboru.

CMV nemoc vznikla častěji ve skupině pacientů s klinickou rezistencí (incidence 43 % vs. 10 %,  $p = 0,047$ ) i ve skupině pacientů s prokázanou mutací (incidence 67 % versus 11%,  $p = 0,047$ ) než u pacientů citlivých k léčbě.

Nebyl statisticky signifikantní rozdíl mezi pacienty odpovídajícími na léčbu oproti pacientům s klinickou rezistencí ve sledovaných faktorech: věk pacienta ani Karnofského skóre v době HSCT, počet CD34<sup>+</sup>/kg v graftu, dosažení kompletní remise před HSCT, plně HLA shodní dárci vs. neshodní dárci, použití thymoglobulinu nebo celotělového ozáření v rámci přípravného režimu, myeloablativní režim vs. režim s redukovanou intenzitou, incidence GVHD, nutnost celkové léčby kortikosteroidy pro GVHD, dosažení plného dárcovského chimérismu po HSCT, incidence relapsu základního onemocnění ( $p = 0,147$  až  $1,0$ ). Stejně tak nebyl v těchto faktorech signifikantní rozdíl ve skupině pacientů s prokázanou mutací viru vůči ostatním pacientům ( $p = 0,141$  až  $1,0$ ).

#### 4.4 Sekvenační analýza CMV DNA u pacientů s prokázanou virovou rezistencí podle Sangerovy metody a NGS

U pacienta č. 1 byla mutace L595F poprvé prokázána pomocí analýzy dle Sangerovy metody i pomocí NGS ve stejném vzorku kmenu CMV (mutovaný kmen byl přítomen v 16 % populace). Během následujících šesti měsíců bylo proporcionalní zastoupení mutované populace 62–99,4 %, viz tabulka č. 10 a graf č. 5 (Přílohy).

**Tabulka č. 10: Průkaz rezistentního kmenu CMV s mutací L595F pomocí analýzy dle Sangerovy metody a pomocí NGS**

Vzorek	Den od HSCT	CMV kvantita (cp/ml)	Výsledky	
			Průkaz analýzou dle Sangera	MiSeq Illumina
1	70	5 930	Ne	0 %
2	83	1 150	Ano	16 %
3	97	4 850	Ano	62 %
4	104	82 200	Ano	86 %
5	118	4 430	Ano	70 %
6	124	4 950	Ano	99 %
7	130	16 800	Ano	78 %
8	137	34 600	Ano	83 %
9	155	7 950	Ano	69 %
10	168	7 070	Ano	45 %
11	175	3 160	Ano	51 %
12	236	300	Ano	99 %
13	243	Negativní	---	---

Virová mutace M460I byla u pacienta č. 2 diagnostikována nejprve pomocí NGS, v následujícím vzorku o 7 dní později již byla tato mutace detekována i metodou dle Sangera (v tu dobu NGS prokázala 30,92 % mutované virové populace). Během následujících 5 měsíců byl poměr mutovaného a divokého kmenu v rozmezí 25–99,79 %, viz tabulka č. 11 a graf č. 6 (Přílohy).

**Tabulka č. 11: Průkaz rezistentního kmenu CMV s mutací M460I pomocí analýzy dle Sangerovy metody a pomocí NGS**

Vzorek	Den od HSCT	CMV kvantita (cp/ml)	Výsledky	
			Průkaz analýzou dle Sangera	MiSeq Illumina
1	84	41400	Ne	0 %
2	134	1 120	Ne	5 %
3	140	3 160	Ano	31 %
4	147	2 960	Ano	25 %
5	168	4 510	Ano	99 %
6	183	18 900	Ano	99 %
7	266	900	Ano	74 %
8	275	360	Ano	65 %
9	287	Negativní	---	---

U pacienta č. 3 s rezistentním kmenem CMV s mutací A594V bohužel nebyly k dispozici pro retrospektivní analýzu pomocí NGS všechny zmražené vzorky CMV DNA, a to včetně ze dne 160 po HSCT. Následující testování již prokazuje rezistentní populaci pomocí obou metod (31 % mutované subpopulace pomocí NGS) viz tabulka č. 12 a graf č. 7 (Přílohy).

**Tabulka č. 12: Průkaz rezistentního kmenu CMV s mutací L595F pomocí analýzy dle Sangerovy metody a pomocí NGS**

Vzorek	Den od HSCT	CMV kvantita (cp/ml)	Výsledky	
			Průkaz analýzou dle Sangerova	MiSeq Illumina
1	149	5830	Ne	0 %
2	160	660	Ne	Není k dispozici
3	168	1420	Ano	31 %
4	177	520	Ano	Není k dispozici
5	188	560	Ano	Není k dispozici
6	198	1250	Ano	99 %
7	212	490	Ano	99 %
8	226	Šedá zóna	---	---
9	240	Negativní	---	---



## 5. Diskuze

### 5.1 CMV reaktivace/primoinfekce po HSCT

Celkově v našem souboru došlo k CMV reaktivaci/primoinfekci u 69 % pacientů. To je o něco více než bývá uváděno v literatuře [24, 26, 113], což může být dáno tím, že přes 80 % pacientů v našem souboru tvořili riziková CMV séropozitivní recipienti, že v 86 % transplantací byla použita T deplece pomocí thymoglobulinu a že jako potransplantační prevence GVHD byl použit mykofenolát mofetil. To vše jsou faktory zvyšující incidenci CMV [26, 46, 123]. I přes vyšší průkaz CMV reaktivace/primoinfekce byl výskyt CMV nemoci nízký: 7 %, což je ve shodě s literárními údaji (5–25 %) [26, 87, 88]. Může to být dáno nastavením relativně nízkého cut-off virové nálože pro zahájení preemptivní terapie na našem pracovišti.

I v našem souboru bylo potvrzeno, že CMV sérostatus zůstává prediktorem CMV reaktivace/primoinfekce [26, 29, 31, 53, 68]. U pacientů s nejrizikovějším sérostatusem  $D^-/R^+$  byly oproti ostatním skupinám zaznamenány častější opakované CMV reaktivace, byl dosahován vyšší peak virémie a CMV mutované rezistentní kmeny se objevily pouze u pacientů s tímto sérostatusem. CMV nemoc se vyvinula u pouze séropozitivních recipientů. Podle očekávání nebyla ve skupině séronegativních nemocných se séronegativním příjemcem (sérostatus  $D^-/R^-$ ) zaznamenána žádná primoinfekce CMV. To odpovídá obecné stratifikaci pacientů na skupinu s nízkým rizikem  $D^-/R^-$ , se středním rizikem  $D^+/R^-$  (CMV infekce ve 20 až 30 %, CMV nemoc zřídka) a vysoce rizikovým sérostatusem  $D^-/R^+$  a  $D^+/R^+$  (CMV infekce až u 80 % pacientů, často progreduje v CMV nemoc, přičemž ve skupině  $D^-/R^+$  bývají závažné komplikace ještě častější [26, 44, 53, 68, 113]).

Přestože bylo do souboru zahrnuto 104 HSCT provedených na našem pracovišti během dvou a půl roku, pro multivariantní analýzu není tento počet hodnocených pacientů dostatečný (zejména v některých podskupinách) vzhledem k hodnotám koeficientu determinace i procenta správné klasifikace. Parametry statistického modelu nebyly podstatně zlepšeny ani pro homogennější skupinu pacientů s hematologickými malignitami, ani pro podskupinu pacientů s akutní myeloidní leukémií, tj. diagnózu, pro kterou byla na našem pracovišti provedena HSCT nejčastěji. Prezentované výsledky multivariantní analýzy ale mohou sloužit k popisu situace, i když zatím ne jako model, ze kterého by bylo možno predikovat riziko pro závisle proměnné veličiny.

Výsledky multivariantní analýzy ukázaly CMV sérostatus jako nejsilnější rizikový faktor rozvoje CMV infektu po HSCT. Malý, ale signifikantní vliv mělo Karnofského skóre pacientů v době HSCT; CMV DNAémie byla prokazována častěji u pacientů s vyšším Karnofského skóre. V univariantní analýze vyšel signifikantně i vliv věku: u mladších jedinců byla DNAémie prokazována častěji než u starších pacientů. V literatuře je uváděn jako rizikový faktor spíše vyšší věk [25, 30, 124]. Vysvětlení by mohlo být v častější CMV séropozitivitě dárců rostoucí s jejich věkem (zejména příbuzenských transplantací) [124]. Zda se na našich datech již mohla projevit nižší séroprevalence pozorovaná v posledních letech i v ČR, zůstává otázkou. Spíše se však na našem souboru mohl uplatnit fakt, že u mladších pacientů a/nebo pacientů s vyšším Karnofského skóre byla od začátku stanovení diagnózy vedena agresivnější terapie a že pravděpodobně byli již předtransplantačně ve vyšší imunopresi než pacienti starší a/nebo s nižším Karnofského skóre. To vše mohlo ovlivnit výskyt CMV po HSCT.

Kromě opakovaně prokazovaného vlivu CMV sérostatusu příjemce/dárce jako rizikového faktoru zvyšujícího incidenci CMV infektu po HSCT lze nalézt v jednotlivých pracích ještě další rizikové faktory: přítomnost reakce štěpu proti hostiteli po HSCT, neshoda dárce/příjemce v HLA systému, nepříbuzenský dárce, použití antithymocytárního globulinu, alemtuzumabu nebo celotělového ozáření v rámci přípravného režimu, použití režimu s redukovanou intenzitou, použití kostní dřeně nebo pupečnickové krve jako zdroje kmenových krvetvorných buněk [24–31, 68, 78]. Jednotlivé práce však nehodnotí vliv těchto faktorů shodně.

V našem souboru jsme u pacientů transplantovaných v myeloablativním režimu detekovali CMV DNAémii častěji než u pacientů po redukováném režimu, což bylo na hranici signifikance. Zde se však může projevit chyba II. druhu a při větším souboru by již tento výsledek byl patrně signifikantní. Opačný závěr, rizikovost redukováného režimu, publikoval George *et al.* [125]. Nicméně riziko reaktivace/primoinfekce v závislosti na myeloablativním vs. redukováném režimu zůstává nejasné a publikované výsledky jsou nejednotné [46, 123, 125], na čemž se může podílet různý výběr pacientů (jen vysoce rizikovní séropozitivní recipienti), různé přípravné režimy s různým zastoupením T deplece a podobně. Ljungman *et al.* [46] ve své přehledové práci z roku 2010 shrnuje, že koncem prvního roku po HSCT se riziko CMV infekce i nemoci u myeloablativních vs. redukováných režimů srovnává.

V literatuře je popsáno, že CMV zvyšuje incidenci GVHD [26, 29, 30]. Dokonce se předpokládá oboustranný vztah: na jedné straně CMV nemoc a virem indukované zánětlivé

prostředí může nadměrně stimulovat alloimunitní odpověď organismu a zvýšit tak riziko vzniku GVHD v zasaženém orgánu, na druhé straně vyšší imunosuprese při probíhající GVHD může vést k snazší reaktivaci latentního viru u CMV séropozitivních pacientů [28, 126]. V našem souboru jsme oproti očekávání nenalezli rozdíl v jednoroční incidenci CMV v závislosti na přítomnosti GVHD. Nicméně obdobný závěr prezentují i jiné práce [31, 68]. Naše výsledky mohlo ovlivnit to, že bylo počítáno pouze s přítomností (nebo nepřítomností) GVHD (tj. kumulativně pacienti s GVHD grade I–IV vč.) a jako její tíže byl hodnocen aspekt podání systémové léčby. V literatuře je často hodnocen vliv pouze akutní GVHD nebo GVHD vyššího stupně (grade II–IV) [30, 125, 127].

V současné éře efektivní antivirové terapie dávají data o vlivu CMV na mortalitu kontroverzní výsledky. V našem souboru nebyl rozdíl v jednoroční mortalitě pacientů s/bez CMV infektu. Stejný závěr byl publikován i jinými autory [55, 128–130]. To je v rozporu s velkou retrospektivní studií Green *et al.* [77], kde bylo dokumentováno, že jakákoliv CMV virémie zvyšuje riziko celkové mortality. Data z australské studie ukazují [26], že ze 123 pacientů s CMV zemřelo 8 pacientů na CMV nemoc a CMV reaktivace/primoinfekce zvyšovala mortalitu pacientů. V našem souboru došlo jen k jednomu úmrtí majícímu možnou příčinnou souvislost s CMV nemocí a těžkou enteritidou. Také další přehledy udávají vyšší mortalitu pacientů s CMV reaktivací/infektem, nemocí nebo u pacientů s pozdní CMV replikací [24, 31, 43, 127, 128]. Mortalita pacientů po HSCT s CMV nemocí je dána především CMV pneumonií [24, 44], jejíž výskyt je nyní v éře preemptivní terapie nižší, převazuje CMV gastroenterokolitida [44]. I v našem souboru byla CMV enterokolitida zdaleka nejčastější CMV nemocí. Prokázali jsme jen jednu susp. CMV pneumonii (vzhledem ke klinickému stavu pacientky nebyla možná plicní biopsie), ze které se pacientka vyléčila. Předpokládané horší přežití nemocných s CMV infekcí nemusí být dáno jen CMV nemocí, ale může být také ve spojitosti s „usnadněním“ vzniku ostatních bakteriálních a mykotických infekcí [46] daným imunosupresním vlivem CMV a/nebo virostatickou terapií, spojením CMV infektu a akutní GVHD apod. [23].

V meta-analýze zpracované skupinou při European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) [23] zahrnující přes 16 tisíc pacientů byla CMV séropozitivita příjemce a/nebo recipienta (vs. séronegativní dárce i příjemce) hodnocena jako negativní prediktor celkového přežití. Velké registry pracují se sérostatusem pacient/dárce lépe než s údajem o CMV reaktivaci/primoinfekci, který není v těchto registrech vždy dostupný. V našem souboru se mortalita jednotlivých sérostatusů vůči sobě nelišila ( $p = 0,7$  až  $1,0$ ). Může

to být dáno jednak relativně nízkým počtem našich pacientů, jednak proto, že mortalita v celém souboru přímo spojená s CMV byla nízká, a také tím, že pro hodnocení přežití byla stanovená doba sledování krátká. Doba sledování pacientů bez klinické rezistence CMV a bez prodělané CMV nemoci byla zvolena 1 rok od transplantace, přičemž jsme předpokládali, že po této době již CMV nebude mít signifikantní vliv na mortalitu, protože u nekomplikovaných pacientů je touto dobou již specifická T lymfocytární imunita rekonstituovaná a CMV bude pod kontrolou. Maximum výskytu CMV je v době do 100. dne po HSCT a převážná většina pozdní CMV infekce se projeví do prvního roku od HSCT [127]. Monitoring CMV nálože je běžně doporučován v období 6 až 12 měsíců po HSCT [7, 8]. V našem souboru byla u pacientů se závažnou GVHD, u pacientů s klinickou rezistencí CMV a u pacientů s opakovanými reaktivacemi CMV prodloužena doba sledování podle vyvíjejícího se klinického stavu (zpravidla na dobu 3 let).

V několika studiích bylo popsáno, že ve skupině pacientů s akutní myeloidní leukémií je při CMV reaktivaci/primoinfekci nižší riziko relapsu základního onemocnění [50, 69, 114, 131]. Jiné velké práce tento efekt neprokázaly, a dokonce popisují opačný trend: vyšší riziko relapsu s CMV infekcí nebo demonstrují vyšší riziko non-relapse mortality u pacientů s CMV infekcí [23, 28, 68, 70]. „Virus vs. leukemia“ efekt zůstává kontroverzní a na našem souboru se vliv CMV na nižší riziko relapsu neprokázal.

## 5.2 Podání thymoglobulinu 7,5 vs. 6 mg/kg v rámci přípravného režimu fludarabin/busulfan/thymoglobulin

U příjemců nepřibuzných nebo plně neshodných dárců je míra imunosuprese i riziko GVHD vyšší [24, 58]. Deplece T lymfocytů *in vivo* pomocí antithymocytárního globulinu je běžný postup, který redukuje výskyt akutní i chronické GVHD po nepřibuzných alogenních HSCT na jedné straně, ovšem nese s sebou riziko těžkých infekčních komplikací, včetně CMV, nebo riziko relapsu základního onemocnění [132, 133]. Optimální dávkování není stále jednoznačně určeno [132, 133] a jeho stanovení by mohlo napomoci zlepšit outcome u pacientů po HSCT. V této práci byly porovnány 2 kohorty pacientů se stejným transplantačním režimem (fludarabin/busulfan/thymoglobulin) s různým dávkování thymoglobulinu: 7,5 vs. 6 mg/kg.

Nezaznamenali jsme rozdíl v incidenci CMV DNAémie mezi skupinami pacientů s použitím TG v dávce 7,5 vs. 6 mg. To je ve shodě se studií z pekingského centra [134]. Pracoviště Ohio, USA publikovalo 2 studie [133, 135] s nejednotnými závěry stran incidence CMV. V těchto dvou studiích však byla uvažována různá hodnota CMV DNAémie jako signifikantní hladina virémie a byly hodnoceny výsledky v různých časových bodech od HSCT, což může vysvětlit rozdílné závěry stejného centra. Ve starší studii [135], která zahrnovala pacienty s jakoukoliv pozitivitou PCR (srovnatelně s našimi daty), prokázali po snížení dávkování antithymocytárního globulinu nižší riziko rozvoje závažných infekcí, včetně CMV. Jejich patientská kohorta však není zcela srovnatelná s naší, do americké studie byly zařazeni pouze pacienti s redukováným přípravným režimem, plná třetina pacientů byla séronegativní se séronegativním dárcem a většina pacientů byla transplantována ve shodě HLA 8/8.

Při vyšším dávkování antithymocytárního globulinu jsme CMV zaznamenali dříve po HSCT (medián 40 vs. 28 dní po HSCT), což bylo na hranici významnosti ( $p = 0,056$ ). Při zkušebním dodatečném rozšíření souboru o jednoho následující pacienta z ledna 2015 už tento rozdíl vycházel signifikantně (medián 40 vs. 28 dní,  $p = 0,043$ ). Dřívější průkaz CMV při vyšším dávkování TG může být pravděpodobně vysvětlen výraznější deplecí T lymfocytů. George *et al.* [125] pozoroval dřívější CMV reaktivaci/primoinfekci u pacientů, kteří dostali antithymocytární globulin nebo alemtuzumab v rámci redukováného přípravného režimu, překvapivě však nikoli u myeloablativních režimů. Liu *et al.* [132] popisuje, že vyšší dávkování antithymocytárního globulinu (10 vs. 6 mg/kg) vedlo k opoždění rekonstituce subpopulací lymfocytů ( $CD4^+$ ,  $CD4^+CD45RA^+$ ,  $CD4^+45RO^+$ ,  $CD4^-CD8^-$  a  $CD8^+CD28^+$ ). Celý mechanismus působení antithymocytárního globulinu není ještě přesně popsán, pravděpodobně ovlivňuje i další populace bílé řady, včetně dendritických buněk nebo NK buněk [136]. V době této práce

nebylo vyšetření subpopulací lymfocytů průtokovým cytometrem na našem pracovišti rutinně dostupné, proto bližší údaje o rekonstituci imunitního systému po HSCT chybí.

V našem souboru i přes snížení dávky TG ze 7,5 mg/kg na 6 mg/kg nebyl prokázán rozdíl na dosažení přihojení štěpu nebo dosažení plného dárcovského chimérismu, což je ve shodě s dalšími daty [110, 134, 135]. Při nižším dávkování nedošlo k nárůstu GVHD a nebyl rozdíl v přežití pacientů, což je ve shodě s výsledky další studie [133, 134]. Ayuk *et al.* [136] v retrospektivní analýze však ukazuje nižší dvouletou transplantační mortalitu při nižších dávkách jiného typu antithymocytárního globulinu, ATG-Fresenius (30 mg/kg), ve srovnání s vyšším dávkováním (60 mg/kg), kdy byla vyšší incidence fatálních infekčních komplikací. Tyto i naše výsledky ukazují, že snížení dávkování thymoglobulinu z 7,5 mg/kg na 6 mg/kg v rámci transplantačního přípravného režimu fludarabin/busulfan/thymoglobulin by mohlo přinést snížení toxicity léčby při zachování její účinnosti. Tento závěr je však třeba ještě ověřit dalším výzkumem.

### 5.3 Klinická a virová rezistence na ganciclovir

Incidence klinické rezistence byla v našem souboru transplantovaných pacientů 7 % (odpovídá 12 % pacientů s antivirovou léčbou) a mutace v oblasti UL97 byly prokázány ve 3 % (tj. v 5 % léčených pacientů). Tyto hodnoty jsou ve shodě s dalšími autory [48, 75, 76, 79, 104, 137]. Tato čísla ukazují, že příčina pomalé eliminace viru při léčbě je pravděpodobně i v našem případě častěji jiná než vznik mutace viru vedoucí k lékové rezistenci [96]. Tato pomalá eliminace viru je patrně způsobena nedostatečnou imunologickou kontrolou virové replikace při těžké imunosupresi (včetně podání thymoglobulinu nebo kombinované časné potransplantační imunosuprese), případně může být způsobena nedostatečnou koncentrací léků v cílových kompartmentech [27, 96].

Námi detekované mutace v kodonech M460I, A594V, L595F byly popsány ve spojení s rezistencí na ganciclovir [115–120]. Publikovaná data popisují mutace v této thymidinové kináze v 90 % ze všech GCV – rezistentních klinických izolátů CMV [22, 138]. Prokázali jsme pouze jednu mutaci u každého pacienta, což je ve shodě s jinými autory, vícečetné mutace (ať již v jedné oblasti, nebo v UL97 a UL54 zároveň) nebo zkrřížená rezistence bývá popisována méně často [138, 139]. Protože valganciclovir nebo ganciclovir byl podáván pro léčbu nejčastěji, vyskytly se v našem souboru pouze mutace spojené s tímto lékem. Důvodem může být i to, že léčba FOS trvala zpravidla kratší dobu než GCV a v našem souboru pacientů byla účinná, protože po jeho podání docházelo k rychlé eliminaci viru z organismu. Dále byla prokázána změna N510S v oblasti UL97. Pacient s tímto izolátem nesplnil kritéria pro selhání léčby, ale zaznamenali jsme u něj opakované reaktivace CMV (pětkrát během prvního roku po HSCT). Tento polymorfismus se v dřívějších pracích považoval za mutaci spojenou s nižší citlivostí viru na GCV [117, 140, 141], nicméně rekombinantní fenotypové testování toto neprokázalo [142].

Diagnóza klinické rezistence byla u pacientů s prokázanou virovou mutací stanovena po 90 dnech kumulativní léčby val/ganciclovirem v době 168 dní po HSCT. To je o něco později, než ve francouzské studii pacientů po transplantaci solidních orgánů a HSCT [45], která uvádí medián 145 dní. Gilbert a Boivin [22] ve své analýze tří studií u pacientů po transplantaci plic uvádějí průkaz virové rezistence po kumulativní délce léčby 79–100 dní, Shmueli *et al.* [79] u pacientů po haploidentické HSCT uvádí mírně kratší medián léčby (70 dní do vzniku mutace), naopak Lurain *et al.* [99] u pacientů po transplantaci solidních orgánů delší, 194 dní. Zde se jistě může projevit heterogenita patientských souborů – různé transplantované orgány, různé přípravné režimy, různý druh imunosupresivní léčby a nejednotné léčebné režimy CMV.

Pacienti po transplantaci solidních orgánů ze zmiňovaných studií byli také často zajištěni val/ganciclovirem profylakticky, což může vést k oddálení CMV replikace, a na druhou stranu může vést, dojde-li k proliferaci CMV, ke snadnějšímu vývoji virové rezistence.

Diagnóza klinické rezistence (tj. selhání léčby) byla u pacientů s prokázanou CMV genotypovou mutací stanovena později po HSCT než u pacientů se selháním léčby bez prokázané rezistentní mutace (medián 168 vs. 58 dní) a po delší kumulativní léčbě virostatiky (medián 90 vs. 16,5 dne kumulativní léčby VGCV/GCV). To může naznačovat, že u pacientů se selháním léčby virostatiky v časném potransplantačním období hraje roli spíše výrazná imunosuprese daná samotnou HSCT a následující duální imunosupresí. U pacientů, kde je selhání léčby způsobeno CMV mutací, může prodloužená terapie a vyšší virová nálož ovlivnit vznik a vývoj rezistentní frakce viru a přerůst původní divokou (citlivou) populaci viru.

Nemocní s klinickou rezistencí (selháním léčby) měli vyšší maximální kvantitu CMV v periferní krvi než pacienti citliví k léčbě (medián 41 400 vs. 4 160 cp/ml). Virová nálož v době převodu z úvodní na udržovací léčbu byla také vyšší (medián 1 305 vs. 437 cp/ml). To je ve shodě jak s očekáváním, tak i s publikovanými daty [45, 79, 96].

Na rozdíl od studie van den Beek *et al.* [96], kde je popsáno selhání léčebné odpovědi v 96 % případů (u 25 z 26 pacientů) již v první léčené epizodě CMV infektu, naši nemocní byli ve více než polovině případů vyšetřeni pro klinickou rezistenci až při dalších léčených epizodách CMV replikace. Van den Beek *et al.* [96] ale kromě toho, že pracuje s pacienty po HSCT s depletovanými T lymfocyty ve štěpu, používá jinou definici klinické rezistence, kde vychází z absolutních hodnot CMV nálože (více než 1000 kopií/ml po 2 týdnech léčby). My jsme vycházeli z definice, která zohledňuje trend poklesu nálože při léčbě. Proto je definice v uvedené studii „přísnější“ než definice použitá v této práci, což může vysvětlit selhání léčby u většiny jejich pacientů již během první epizody. Také Lurain *et al.* [99] ve své studii udává vznik virové rezistence po druhé a třetí léčené epizodě CMV.

Ačkoliv se rezistentní kmeny objevily pouze u pacientů se sérostatusem D<sup>-</sup>/R<sup>+</sup>, jednoznačný vliv sérostatusu na vznik rezistence nebyl potvrzen, což může být dáno velikostí souboru. Literárně je sérostatus D<sup>-</sup>/R<sup>+</sup> po HSCT rizikovější stran opakovaných CMV infekcí, virové replikace a jejich léčby, což zvyšuje riziko, že se vyvine virová mutace [63, 79, 143].

CMV nemoc vznikla častěji ve skupině pacientů s klinickou rezistencí než u pacientů citlivých k léčbě, u dvou pacientů s CMV nemocí byla prokázána CMV genotypová rezistence. Shmueli *et al.* [79] udává CMV rezistenci jako nezávislý prediktor pro rozvoj CMV nemoci ve



své kohortě pacientů po haploidentické HSCT. Na rozdíl od práce Luraina a spol. [99], který popsal, že minimálně polovina pacientů s CMV nemocí a prokázaně rezistentním virem zemřela na přímé následky této nemoci, naši pacienti s prokázanou mutací CMV nemoc překonali, byť u pacientky s CMV retinitidou došlo ke zhoršení vizu na postiženém oku. Boutolleau *et al.* [45], v jehož souboru byli pacienti jak po transplantaci solidních orgánů, tak po HSCT, nezaznamenal žádné úmrtí na CMV nemoc u 11 pacientů s rezistentním CMV. Rozdíly v jednotlivých souborech mohou být dány různými patientskými skupinami, stejně jako možným různým nastavením hranice pro zahájení antivirové terapie a odlišností léčebných režimů, protože v uvedených pracích nejsou přesně uvedena léčebná schémata (zejména pro GCV a FOS). Naše zkušenosti jsou výhradně od pacientů po HSCT.

V rámci tohoto projektu jsme se zaměřili i na vliv eventuálního suboptimálního dávkování virostatik [22, 27, 137]. Vzorky pro měření hladin GCV byly odebírány a uchovány pro retrospektivní analýzu. Ačkoliv byla metodika úspěšně vyzkoušena ve spolupráci s ostatními centry (FN Motol, Ústav hematologie a krevní transfúze Praha, FN Brno), nejedná se dosud o standardní testování a bohužel vzorky našich pacientů nebyly analyzovatelné, nejspíše kvůli preanalytické přípravě (pravděpodobně vlivem odběrového nebo transportního média).

V této práci jsme k průkazu virové rezistence vycházeli výlučně z techniky sekvenování a výsledky analýzy byly srovnány s literárně dokumentovanými mutacemi. Sangerovo testování bylo cíleno na oblasti kinázy UL97 a polymerázy UL54, které jsou s rezistencí spojeny nejčastěji (UL97: kodony 346–631, UL54: kodony 346–631 a kodony 653 až 997), a nemuseli jsme tak zachytit další vzácné nové mutace vedoucí k nižší senzitivitě CMV vůči virostatiku. Je proto možné, že v souboru byly nové vzácné polymorfismy, které ještě nebyly popsány a publikovány jako mutace vedoucí ke snížené citlivosti na GCV. Proto může být skutečný výskyt rezistentních mutací v našem souboru o něco vyšší. Metody fenotypové analýzy nejsou v České republice dostupné, a nemohli jsme tedy vzorky od klinicky rezistentních pacientů testovat i těmito metodami.

## 5.4 Sekvenační analýza metodou podle Sangera a NGS

Oproti očekávání byla prokázána mutovaná subpopulace CMV pomocí senzitivnější a nákladnější metody sekvenování nové generace pouze o maximálně jeden odběr dříve (odpovídá jednomu týdnu) než standardní metodou dle Sangera. V prvním případě byla mutace zachycena oběma metodami ve stejném vzorku (při 16% zastoupení mutanty). U druhého pacienta NGS odhalila 5% rezistentní subpopulaci viru o týden dříve než při rutinní sekvenaci dle Sangera. U třetího pacienta již nebylo k dispozici několik vzorků zamražené CMV DNA ke zpětnému testování pomocí NGS, vč. 160. dne po HSCT. Pokud by byla v tomto vzorku metodou NGS prokázána mutanta, zachytilo by toto testování NGS rezistenci CMV o jeden odběr dříve než dle Sangera, konkrétně o 8 dní dříve.

Retrospektivní výsledky testování NGS u všech tří pacientů ukazují nárůst a pozdější vysoké zastoupení mutované varianty kmene vůči divokému typu. Emery a Griffiths [144] ve své práci z roku 2000 na základě výsledků získaných od pacientů s AIDS ukázali pomocí matematických modelů, že účinnost *i.v.* GCV vůči divokému viru je 92% a při *p.o.* podávaném GCV je 47% (má horší biologickou dostupnost než VGCV [1]). Jeho účinnost u rezistentní mutanty byla jen 62 %, resp. 35 % (jako s typickým rezistentním kmenem je v této práci počítáno s mutantou L595F v oblasti UL97 a s dvojitou mutací v UL97 M460V + L595F). Při prodlouženém podávání GCV dochází k postupnému exponenciálnímu nárůstu dvou populací – divokého typu a rezistentní mutanty. Na základě údajů o replikační schopnosti mutanty L595F vytvořili matematický model nárůstu rezistentní frakce. Pokud je počítáno, že na začátku je rezistentní kmen zastoupen pouze 0,5% populací, pak po 21 denní terapii GCV vzroste asi trojnásobně, tj. pouze na cca 1,7 %. Pokud je však GCV podáván dlouhodobě, mutanta se dále replikuje, dochází k exponenciálnímu růstu a v den 145 léčby dosahuje rezistentní kmen 30 % populace a v den 150 již více než 90 %. V našem souboru došlo k projevu nárůstu nálože mutovaného viru po 49 až 124 dnech léčby, což naznačuje podobný princip i u našich pacientů.

Naše data umožňují sledovat vývoj mutace viru v čase, a je tedy možné zjistit, kdy přesně se daná mutace objevila a za jakou dobu se projevila klinicky. U pacienta č. 1 se jednalo o interval v délce 47 dní a u pacienta č. 2 o 34 dní, kdy byli nadále léčeni valganciclovirem a již se u nich vyvíjela rezistentní mutanta (viz tabulka č. 9). Tento interval je v předkládané práci dobou, kdy je trvale podávána léčba, při které může mutovaný a rezistentní virus přerůstat rychleji se replikující divokou (tj. citlivou) populaci viru, aniž by se ještě projevil klinicky. U třetího pacienta se diagnóza klinické rezistence shodovala s prvním záchytem mutovaného kmene CMV pomocí analýzy dle Sangera.

## Závěry

Tato disertační práce se zabývá sledováním CMV infektu u pacientů po HSCT. Byl sestaven, prostudován a sledován soubor nemocných s CMV infekcí, včetně záchytu pacientů s klinickou i virovou rezistencí na virostatika. Výsledky navazují a dále prohlubují dosavadní znalosti o této problematice, doplňují klinická data a popisují genotypy spojené s genotypovou rezistencí v našich podmínkách.

## Primární cíle práce – výsledky

Incidence CMV reaktivace/primoinfekce v našem souboru 104 provedených HSCT byla 69 %. Incidence klinické rezistence CMV byla 7 % (odpovídá 12 % pacientů s anti-CMV léčbou) a incidence virové rezistence byla 3 % (5 % léčených pacientů).

Snížení dávkování thymoglobulinu z 7,5 mg/kg na 6 mg/kg v rámci transplantačního přípravného režimu fludarabin/busulfan/thymoglobulin nemělo vliv na výskyt CMV reaktivace/primoinfekce po HSCT. S nižším dávkováním se projevil trend prodloužení doby do první detekce CMV po HSCT, výsledek byl na hraně statistické významnosti.

Tři ze sedmi případů klinické rezistence (selhání léčby) byly dány mutací virového kmene vedoucí k snížené citlivosti na virostatika. U zbývajících čtyř případů nebyla taková mutace prokázána.

Pomocí metody NGS u pacientů s prokázanou virovou rezistencí byla mutace prokázána o maximálně jeden odběr (odpovídá jednomu týdnu) dříve oproti standardní sekvenaci dle Sangerova.

## **Sekundární cíle práce – výsledky**

V našem souboru byly detekovány bodové mutace v kodonech v oblasti UL97 virové thymidin kinázy: M460I, A594V, L595F. Tyto kodony jsou v literatuře popsány jako mutace vedoucí ke snížené citlivosti kmene na ganciclovir. Nebyla detekována žádná mutace spojená s lékovou rezistencí ve virové polymeráze UL54.

Nebylo možné analyzovat, jakých plazmatických hladin GCV bylo dosaženo při podávání VGCV/GCV. Ačkoliv byla metoda měření vyzkoušena ve spolupráci s ostatními centry (FN Motol, Ústav hematologie a krevní transfúze Praha, FN Brno), nejedná se o dosud standardní testování a vzorky našich pacientů nebyly analyzovatelné, nejspíše v rámci preanalytické přípravy.

## **Hypotézy**

Ad 1)

Nebylo prokázáno, že přípravný transplantační režim fludarabin/busulfan/thymoglobulin s nižším dávkováním thymoglobulinu bude provázen nižším výskytem CMV.

Ad 2)

Prokázali jsme nízkou incidenci klinické i genotypicky dané rezistence CVM vůči podávaným virostatikům v našem souboru.

Ad 3)

Bylo prokázáno, že pouze část případů selhání léčby virostatiky byla podmíněna virovou mutací vedoucí ke snížené citlivosti na virostatika.

Ad 4)

NGS analýza prokáže procentuální zastoupení mutované subpopulace viru a má vyšší senzitivitu než metoda podle Sangera. U pacientů s prokázanou virovou rezistencí byla mutace prokázána o maximálně jeden odběr dříve oproti standardnímu sekvenování dle Sangera.

## Závěry pro praxi

Práce potvrzuje, že i v současné době je CMV sérostatus dárce/příjemce nejdůležitějším rizikovým faktorem pro CMV infekci po HSCT. U všech pacientů potenciálně směřujících k alogenní HSCT by měl být vyšetřen CMV sérostatus již v době diagnózy. Pokud je pacient CMV IgG negativní, měl by být transfundován přípravky od CMV negativních dárců, případně by měly být podávány transfúzní přípravky s velmi nízkým obsahem leukocytů (deleukotizované) ke snížení rizika přenosu viru. Pokud je to při dostupnosti kompatibilních dárců v HLA systému možné, měl by být pro CMV IgG negativního příjemce preferován CMV IgG negativní dárce a pro CMV IgG pozitivního pacienta CMV IgG pozitivní dárce.

V rámci snahy o snížení toxicity při zachování účinnosti je možné snížení dávkování thymoglobulinu z 7,5 mg/kg na 6 mg/kg v rámci transplantačního přípravného režimu fludarabin/busulfan/thymoglobulin. Takové snížení nevede k vyšší incidenci GVHD ani neovlivní riziko relapsu či celkovou mortalitu v prvním potransplantačním roce. V rámci IV. interní kliniky FNHK je pokračováno v podávání nižších dávek TG ve snaze o snížení toxicity léčby při zachování její účinnosti.

Naše data ukazují, že část případů selhání léčby CMV po HSCT je spojena s mutací virového kmene vedoucí k rezistenci na virostatika. Pacienti s prolongovaným podáváním virostatik a vysokou virovou náloží by měli být pečlivě monitorováni a mělo by být zváženo jejich převedení na intravenózní formu léčiv, protože naše data ukazují, že část případů selhání léčby je spojena s mutací virového kmene na virostatika. Pokud nedochází k uspokojivé odpovědi na léčbu, měla by být testována citlivost klinického izolátu na podávanou léčbu (v klinické praxi např. sekvenční analýzou dané oblasti genu).

NGS analýza dokáže kvantitativně vyjádřit zastoupení mutované subpopulace viru v klinickém izolátu. Je také citlivější a prokáže mutovaný kmen již od 5 % zastoupení. Při dostupnosti mražených vzorků CMV DNA dokáže v časové posloupnosti dokumentovat přesný vznik mutanty a její proporcionální zastoupení v čase, v závislosti na léčbě nebo imunitním stavu pacienta. Vzhledem k náročnosti této metody a bez významné klinické relevance získaných dat se v současné době jedná o metodu vhodnou spíše pro výzkum než do rutinní praxe.

## 6. Literatura

- [1] RILEY, H. D. History of the cytomegalovirus. *Southern Medical Journal*. 1997, **90**(2), 184–190. ISSN 0038-4348.
- [2] MAKKER, Jasbir, Bharat BAJANTRI, Sailaja SAKAM a Sridhar CHILIMURI. Cytomegalovirus related fatal duodenal diverticular bleeding: Case report and literature review. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 2016, **22**(31), 7166–7174. ISSN 1007-9327. Dostupné z: doi:10.3748/wjg.v22.i31.7166
- [3] HORÁČEK, Jiří. *Cytomegalovirus - jeho výskyt a význam v lidské populaci*. Hradec Králové, 1975. Kandidátská disertační práce. Univerzita Karlova v Praze. Lékařská fakulta. Lékařská mikrobiologie.
- [4] KOMATSU, Takashi E., Andreas PIKIS, Lisa K. NAEGER a Patrick R. HARRINGTON. Resistance of human cytomegalovirus to ganciclovir/valganciclovir: A comprehensive review of putative resistance pathways. *Antiviral Research* [online]. 2014, **101**, 12–25. ISSN 0166-3542. Dostupné z: doi:10.1016/j.antiviral.2013.10.011
- [5] SCHLEISS, Mark R. Developing a Vaccine against Congenital Cytomegalovirus (CMV) Infection: What Have We Learned from Animal Models? Where Should We Go Next? *Future virology* [online]. 2013, **8**(12), 1161–1182. ISSN 1746-0794. Dostupné z: doi:10.2217/fvl.13.106
- [6] MENDEZ, Julio C., Irene SIA G. a Carlos PAYA V. Human cytomegalovirus. In: Edwin H. LENNETTE a Thomas F. SMITH. *Laboratory Diagnosis of Viral Infections*. Third Edition. New York, USA: Marcel Dekker Inc., 1999, s. 361. – 372.
- [7] DIOVERTI, M. Veronica a Raymund R. RAZONABLE. Cytomegalovirus. *Microbiology Spectrum* [online]. 2016, **4**(4) [vid. 2018-10-08]. ISSN 2165-0497. Dostupné z: doi:10.1128/microbiolspec.DMIH2-0022-2015
- [8] DVOŘÁK, Jan. *Problematika cytomegalovirové infekce u transplantovaných pacientů*. Praha, 2010. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze. Přírodovědecká fakulta. Katedra genetiky a mikrobiologie.
- [9] KREJSEK, Jan. HHV-5, cytomegalovirus (CMV) určuje onkogenetické změny imunity zdravých lidí a je smrtící agens pro imunokompromitované pacienty. In: Jan KREJSEK, Ctirad ANDRÝS a Irena KRČMOVÁ. *Imunologie člověka*. Hradec Králové: Garamon s.r.o., 2016, s. 165–166.
- [10] GRIFFITHS, P D a J E GRUNDY. Molecular biology and immunology of cytomegalovirus. *Biochemical Journal*. 1987, **241**(2), 313–324. ISSN 0264-6021.
- [11] GOODRUM, Felicia. HUMAN CYTOMEGALOVIRUS LATENCY: Approaching the Gordian Knot. *Annual review of virology* [online]. 2016, **3**(1), 333–357. ISSN 2327-056X. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-virology-110615-042422
- [12] PAULUS, Christina a Michael NEVELS. The Human Cytomegalovirus Major Immediate-Early Proteins as Antagonists of Intrinsic and Innate Antiviral Host Responses. *Viruses* [online]. 2009, **1**(3), 760–779. ISSN 1999-4915. Dostupné z: doi:10.3390/v1030760
- [13] MARTY, Francisco M., Per LJUNGMAN, Roy F. CHEMALY, Johan MAERTENS, Sanjeet S. DADWAL, Rafael F. DUARTE, Shariq HAIDER, Andrew J. ULLMANN, Yuta KATAYAMA, Janice BROWN, Kathleen M. MULLANE, Michael BOECKH, Emily A. BLUMBERG, Hermann EINSELE,

- David R. SNYDMAN, Yoshinobu KANDA, Mark J. DINUBILE, Valerie L. TEAL, Hong WAN, Yoshihiko MURATA, Nicholas A. KARTSONIS, Randi Y. LEAVITT a Cyrus BADSHAH. Letermovir Prophylaxis for Cytomegalovirus in Hematopoietic-Cell Transplantation. *New England Journal of Medicine* [online]. 2017, **377**(25), 2433–2444. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa1706640
- [14] STÁTNÍ ÚSTAV PRO KONTROLU LÉČIV. *Prevymis 480MG TBL FLM 28X1. Souhrn údajů o přípravku* [online]. Praha: SÚKL, 2018 [vid. 2018-09-13]. Dostupné z: [http://www.ema.europa.eu/docs/cs\\_CZ/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/004536/WC500241678.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/cs_CZ/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/004536/WC500241678.pdf)
- [15] OLSSON, Jan, Eloise KOK, Rolf ADOLFSSON, Hugo LÖVHEIM a Fredrik ELGH. Herpes virus seroepidemiology in the adult Swedish population. *Immunity & Ageing* [online]. 2017, **14**(1), 10. ISSN 1742-4933. Dostupné z: doi:10.1186/s12979-017-0093-4
- [16] LEVINE, Hagai, Ran D. BALICER, Vladi ROZHAVSKI, Tamar HALPERIN, Michal SHREBERK, Nadav DAVIDOVITCH, Michael HUERTA-HARTAL a Omer E. ANKOL. Seroepidemiology of Epstein-Barr virus and cytomegalovirus among Israeli male young adults. *Annals of Epidemiology* [online]. 2012, **22**(11), 783–788. ISSN 1873-2585. Dostupné z: doi:10.1016/j.annepidem.2012.06.099
- [17] LANCINI, Daniel V., Helen M. FADDY, Sue ISMAY, Stuart CHESNEAU, Chris HOGAN a Robert L. FLOWER. Cytomegalovirus in Australian blood donors: seroepidemiology and seronegative red blood cell component inventories. *Transfusion* [online]. 2016, **56**(6 Pt 2), 1616–1621. ISSN 1537-2995. Dostupné z: doi:10.1111/trf.13459
- [18] ROUBALOVÁ, Kateřina a Jiří SEEMAN. Sérologický přehled protilátek proti herpetickým virům, CMV, EBV, VZV. *Zprávy CEM*. 1998, **7**(příloha 1), 29-31.
- [19] STEPANOVA, Vlasta a Miroslav FAJFR. Study of Cytomegalovirus Seroprevalence in the Czech Republic Population [Plakátové sdělení č. A-PP-010]. Noordwijkhout, Nizozemí. In: *16th International CMV and betaherpesvirinae workshop*. 2017.
- [20] JOHNSON, Julie, Brenna ANDERSON a Robert F. PASS. Prevention of maternal and congenital cytomegalovirus infection. *Clinical Obstetrics and Gynecology* [online]. 2012, **55**(2), 521–530. ISSN 1532-5520. Dostupné z: doi:10.1097/GRF.0b013e3182510b7b
- [21] DOSTÁL, Václav, Stanislav PLÍŠEK a Jiří HORÁČEK. DOSTÁL, Václav, Stanislav PLÍŠEK a Jiří Horáček, 2002. Cytomegalovirová infekce. Doporučené postupy pro praktické lékaře [online]. Praha: Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně. [Cit. 2018-09-13]. Dostupné z: [www.cls.cz/dokumenty2/os/t228.rtf](http://www.cls.cz/dokumenty2/os/t228.rtf). nedatováno.
- [22] GILBERT, C. a G. BOIVIN. Human Cytomegalovirus Resistance to Antiviral Drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2005, **49**(3), 873–883. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.49.3.873-883.2005
- [23] SCHMIDT-HIEBER, Martin, Myriam LABOPIN, Dietrich BEELEN, Liisa VOLIN, Gerhard EHNINGER, Jürgen FINKE, Gerard SOCIÉ, Rainer SCHWERDTFEGGER, Nicolaus KRÖGER, Arnold GANSER, Dietger NIEDERWIESER, Emmanuelle POLGE, Igor W. BLAU a Mohamad MOHTY. CMV serostatus still has an important prognostic impact in de novo acute leukemia patients after allogeneic stem cell transplantation: a report from the Acute Leukemia Working Party of EBMT. *Blood* [online]. 2013, **122**(19), 3359–3364. ISSN 0006-4971, 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2013-05-499830



- [24] LIN, Ren a Qifa LIU. Diagnosis and treatment of viral diseases in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Journal of Hematology & Oncology* [online]. 2013, **6**, 94. ISSN 1756-8722. Dostupné z: doi:10.1186/1756-8722-6-94
- [25] BHAT, Vivek, Amit JOSHI, Rahul SARODE a Preeti CHAVAN. Cytomegalovirus infection in the bone marrow transplant patient. *World Journal of Transplantation* [online]. 2015, **5**(4), 287–291. ISSN 2220-3230. Dostupné z: doi:10.5500/wjt.v5.i4.287
- [26] GEORGE, Biju, N. PATI, N. GILROY, M. RATNAMOHAN, G. HUANG, I. KERRIDGE, M. HERTZBERG, D. GOTTLIEB a K. BRADSTOCK. Pre-transplant cytomegalovirus (CMV) serostatus remains the most important determinant of CMV reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the era of surveillance and preemptive therapy. *Transplant Infectious Disease* [online]. 2010, **12**(4), 322–329. ISSN 1399-3062. Dostupné z: doi:10.1111/j.1399-3062.2010.00504.x
- [27] CHEVILLOTTE, Meike, Jens VON EINEM, Benjamin M. MEIER, Feng-Mao LIN, Hans A. KESTLER a Thomas MERTENS. A new tool linking human cytomegalovirus drug resistance mutations to resistance phenotypes. *Antiviral Research* [online]. 2010, **85**(2), 318–327. ISSN 1872-9096. Dostupné z: doi:10.1016/j.antiviral.2009.10.004
- [28] CHAN, Shawna T. a Aaron C. LOGAN. The clinical impact of cytomegalovirus infection following allogeneic hematopoietic cell transplantation: Why the quest for meaningful prophylaxis still matters. *Blood Reviews* [online]. 2017, **31**(3), 173–183. ISSN 0268-960X. Dostupné z: doi:10.1016/j.blre.2017.01.002
- [29] CAMARGO, Jose F., Erik KIMBLE, Rossana ROSA, Luis A. SHIMOSE, Maria X. BUENO, Nikeshan JEYAKUMAR, Michele I. MORRIS, Lilian M. ABBO, Jacques SIMKINS, Maritza C. ALENCAR, Cara BENJAMIN, Eric WIEDER, Antonio JIMENEZ, Amer BEITINJANEH, Mark GOODMAN, John J. BYRNES, Lazaros J. LEKAKIS, Denise PEREIRA a Krishna V. KOMANDURI. Impact of Cytomegalovirus Viral Load on Probability of Spontaneous Clearance and Response to Preemptive Therapy in Allogeneic Stem Cell Transplantation Recipients. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* [online]. 2018, **24**(4), 806–814. ISSN 1083-8791. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbmt.2017.11.038
- [30] LIN, Hsin-Chen, Shao-Min HAN, Wen-Li HWANG, Cheng-Wei CHOU, Kuang-Hsi CHANG, Zhi-Yuan SHI a Chieh-Lin JERRY TENG. Cytomegalovirus Infection and Treatment in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Retrospective Study from a Single Institution in an Endemic Area. *Turkish Journal of Hematology* [online]. 2017, **34**(2), 159–166. ISSN 1300-7777. Dostupné z: doi:10.4274/tjh.2016.0225
- [31] SOUSA, Hugo, David BOUTOLLEAU, Joana RIBEIRO, Ana L. TEIXEIRA, Carlos PINHO VAZ, Fernando CAMPILHO, Rosa BRANCA, António CAMPOS JR, Inês BALDAQUE a Rui MEDEIROS. Cytomegalovirus Infection in Patients Who Underwent Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Portugal: A Five-Year Retrospective Review. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* [online]. 2014, **20**(12), 1958–1967. ISSN 1083-8791. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbmt.2014.08.010
- [32] STAŇKOVÁ, Marie. Infekce vyvolané cytomegalovirem. In: Jiří BENEŠ. *Infekční lékařství*. Praha: Galen, 2009, s. 184–187. ISBN 978-80-7262-644-1.
- [33] ROUBALOVÁ, RNDr Kateřina. Laboratorní diagnostika herpetických virů. *Medicína pro praxi*. 2010, **7**(5), 241–244. ISSN 12148687, 18035310.

- [34] PANNUTI, C. S., L. S. VILAS BOAS, M. J. ANGELO, V. AMATO NETO, G. C. LEVI, J. S. DE MENDONCA a C. V. DE GODOY. Cytomegalovirus mononucleosis in children and adults: differences in clinical presentation. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 1985, **17**(2), 153–156. ISSN 0036-5548.
- [35] AMBROŽOVÁ, Helena. Infekční mononukleóza. *Pediatr. pro Praxi*. 2005, **5**, 244–246.
- [36] SEDLÁČEK, Petr, Petr HUBÁČEK, Michal KOUBA, Martina LENGEROVA, Petr CETKOVSKÝ, Pavel ŽÁK, Jiří MAYER a Zdeněk RÁČIL. CMV infekce u imunokompromitovaných, epidemiologie, rizikové faktory a klinické projevy. *Postgrad med*. 2013, **15**(4), 41–44.
- [37] REVELLO, Maria Grazia a Giuseppe GERNA. Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus, and newborn infant. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002, **15**(4), 680–715. ISSN 0893-8512.
- [38] MARSICO, Concetta a David W. KIMBERLIN. Congenital Cytomegalovirus infection: advances and challenges in diagnosis, prevention and treatment. *Italian Journal of Pediatrics* [online]. 2017, **43** [vid. 2018-07-24]. ISSN 1824-7288. Dostupné z: doi:10.1186/s13052-017-0358-8
- [39] PASS, Robert F., Karen B. FOWLER, Suresh B. BOPPANA, William J. BRITT a Sergio STAGNO. Congenital cytomegalovirus infection following first trimester maternal infection: Symptoms at birth and outcome. *Journal of Clinical Virology* [online]. 2006, **35**(2), CMV Special Section - neonatal infections, 216–220. ISSN 1386-6532. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcv.2005.09.015
- [40] HUI, Lisa a Gillian WOOD. Perinatal outcome after maternal primary cytomegalovirus infection in the first trimester: a practical update and counseling aid: Perinatal outcome after maternal CMV infection. *Prenatal Diagnosis* [online]. 2015, **35**(1), 1–7. ISSN 01973851. Dostupné z: doi:10.1002/pd.4497
- [41] FOWLER, K. B., S. STAGNO, R. F. PASS, W. J. BRITT, T. J. BOLL a C. A. ALFORD. The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *The New England Journal of Medicine* [online]. 1992, **326**(10), 663–667. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJM199203053261003
- [42] KRALICKOVA, Pavlina, Eva MALA, Doris VOKURKOVA, Irena KRCMOVA, Lenka PLISKOVA, Vlasta STEPANOVA, Vladimír BARTOS, Vladimír KOBLIZEK, Ilja TACHECI, Jan BURES, Jan BROZIK a Jiri LITZMAN. Cytomegalovirus disease in patients with common variable immunodeficiency: three case reports. *International Archives of Allergy and Immunology* [online]. 2014, **163**(1), 69–74. ISSN 1423-0097. Dostupné z: doi:10.1159/000355957
- [43] PRENTICE, H. G., E. GLUCKMAN, R. L. POWLES, P. LJUNGMAN, N. MILPIED, J. M. FERNANDEZ RAÑADA, F. MANDELLI, P. KHO, L. KENNEDY a A. R. BELL. Impact of long-term acyclovir on cytomegalovirus infection and survival after allogeneic bone marrow transplantation. European Acyclovir for CMV Prophylaxis Study Group. *Lancet (London, England)*. 1994, **343**(8900), 749–753. ISSN 0140-6736.
- [44] MORI, Takehiko a Jun KATO. Cytomegalovirus infection/disease after hematopoietic stem cell transplantation. *International Journal of Hematology* [online]. 2010, **91**(4), 588–595. ISSN 0925-5710, 1865-3774. Dostupné z: doi:10.1007/s12185-010-0569-x
- [45] BOUTOLLEAU, David, Claire DEBACK, Céline BRESSOLLETTE-BODIN, Shaida VARNOUS, Nathalie DHEDIN, Benoît BARROU, Jean-Paul VERNANT, Iradj GANDJBAKHCH, Berthe-Marie IMBERT-MARCILLE a Henri AGUT. Resistance pattern of cytomegalovirus (CMV) after oral

- valganciclovir therapy in transplant recipients at high-risk for CMV infection. *Antiviral Research* [online]. 2009, **81**(2), 174–179. ISSN 1872-9096. Dostupné z: doi:10.1016/j.antiviral.2008.11.003
- [46] LJUNGMAN, Per, Morgan HAKKI a Michael BOECKH. Cytomegalovirus in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Infectious Disease Clinics of North America* [online]. 2010, **24**(2), Infections in Transplant and Oncology Patients, 319–337. ISSN 0891-5520. Dostupné z: doi:10.1016/j.idc.2010.01.008
- [47] VEJRAŽKOVÁ, Eva, Petr HUBÁČEK, Radka KUTOVÁ, Lenka PLÍŠKOVÁ, Milan KOŠTÁL, Vlasta ŠTĚPÁNOVÁ, Alžběta ZAVŘELOVÁ, Jakub RADOCHA, Eva MALÁ a Pavel ŽÁK. Klinická rezistence lidského cytomegaloviru při léčbě gancyklovirem u pacientů po alogenní transplantaci hematopoetických buněk – zkušenosti jednoho centra. *Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie: Časopis Společnosti Pro Epidemiologii a Mikrobiologii České Lékařské Společnosti J.E. Purkyně*. 2015, **64**(3), 160–168. ISSN 1210-7913.
- [48] PATEL, N., L. D. SNYDER, A. FINLEN-COPELAND a S. M. PALMER. Is prevention the best treatment? CMV after lung transplantation. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* [online]. 2012, **12**(3), 539–544. ISSN 1600-6143. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03837.x
- [49] BOECKH, Michael. Complications, Diagnosis, Management, and Prevention of CMV Infections: Current and Future. *ASH Education Program Book* [online]. 2011, **2011**(1), 305–309. ISSN 1520-4391, 1520-4383. Dostupné z: doi:10.1182/asheducation-2011.1.305
- [50] GREEN, Margaret L., Wendy M. LEISENRING, Hu XIE, Roland B. WALTER, Marco MIELCAREK, Brenda M. SANDMAIER, Stanley R. RIDDELL a Michael BOECKH. CMV reactivation after allogeneic HCT and relapse risk: evidence for early protection in acute myeloid leukemia. *Blood* [online]. 2013, **122**(7), 1316–1324. ISSN 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2013-02-487074
- [51] BOIVIN, Guy, Nathalie GOYETTE, Christian GILBERT, Noel ROBERTS, Katherine MACEY, Carlos PAYA, Mark D. PESCOVITZ, Atul HUMAR, Ed DOMINGUEZ, Kenneth WASHBURN, Emily BLUMBERG, Barbara ALEXANDER, Richard FREEMAN, Nigel HEATON a Emma COVINGTON. Absence of cytomegalovirus-resistance mutations after valganciclovir prophylaxis, in a prospective multicenter study of solid-organ transplant recipients. *The Journal of Infectious Diseases* [online]. 2004, **189**(9), 1615–1618. ISSN 0022-1899. Dostupné z: doi:10.1086/382753
- [52] LJUNGMAN, Per, Paul GRIFFITHS a Carlos PAYA. Definitions of Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Recipients. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2002, **34**(8), 1094–1097. ISSN 1058-4838, 1537-6591. Dostupné z: doi:10.1086/339329
- [53] EMERY, Vincent, Mark ZUCKERMAN, Graham JACKSON, Celia AITKEN, Husam OSMAN, Anthony PAGLIUCA, Mike POTTER, Karl PEGGS, Andrew CLARK a the British Society of Blood and Marrow Transplantation and the UK Virology Network THE BRITISH COMMITTEE FOR STANDARDS IN HAEMATOLOGY. Management of cytomegalovirus infection in haemopoietic stem cell transplantation. *British Journal of Haematology* [online]. 2013, **162**(1), 25–39. ISSN 1365-2141. Dostupné z: doi:10.1111/bjh.12363
- [54] BHORADE, Sangeeta M., Nell S. LURAIN, Ashby JORDAN, Julie LEISCHNER, Jaime VILLANUEVA, Ramon DURAZO, Steve CREECH, Wickii T. VIGNESWARAN a Edward R. GARRITY.

- Emergence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus in lung transplant recipients. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* [online]. 2002, **21**(12), 1274–1282. ISSN 1053-2498, 1557-3117. Dostupné z: doi:10.1016/S1053-2498(02)00463-1
- [55] YONG, Michelle K., Michelle ANANDA-RAJAH, Paul U. CAMERON, C. Orla MORRISSEY, Andrew SPENCER, David RITCHIE, Allen C. CHENG, Sharon R. LEWIN a Monica SLAVIN. Cytomegalovirus Reactivation Is Associated with Increased Risk of Late-Onset Invasive Fungal Disease after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Multicenter Study in the Current Era of Viral Load Monitoring. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* [online]. 2017, **23**(11), 1961–1967. ISSN 1083-8791. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbmt.2017.07.025
- [56] LILLERI, Daniele, Chiara FORNARA, Antonella CHIESA, Daniela CALDERA, Emilio Paolo ALESSANDRINO a Giuseppe GERNA. Human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T-cell reconstitution in adult allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients and immune control of viral infection. *Haematologica* [online]. 2008, **93**(2), 248–256. ISSN 0390-6078, 1592-8721. Dostupné z: doi:10.3324/haematol.11912
- [57] LENGEROVA, Martina, Pavlína VOLFOVÁ a Zdeněk RÁČIL. Laboratorní diagnostika CMV infekce u nemocných s hematologickou malignitou. *Postgrad med.* 2013, **15**(4), 45–50.
- [58] GABANTI, Elisa, Daniele LILLERI, Francesco RIPAMONTI, Francesca BRUNO, Paola ZELINI, Milena FURIONE, Anna A. COLOMBO, Emilio P. ALESSANDRINO a Giuseppe GERNA. Reconstitution of Human Cytomegalovirus-Specific CD4+ T Cells is Critical for Control of Virus Reactivation in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients but Does Not Prevent Organ Infection. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* [online]. 2015, **21**(12), 2192–2202. ISSN 1083-8791. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbmt.2015.08.002
- [59] PELÁK, Ondřej, Jan STUCHLÝ, Ladislav KRÓL, Petr HUBÁČEK, Petra KESLOVÁ, Petr SEDLÁČEK, Renata FORMÁNKOVÁ, Jan STARÝ, Ondřej HRUŠÁK a Tomáš KALINA. Appearance of cytomegalovirus-specific T-cells predicts fast resolution of viremia post hematopoietic stem cell transplantation. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* [online]. 2017, **92**(5), 380–388. ISSN 1552-4957. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.b.21348
- [60] EMERY, V. C., A. V. COPE, E. F. BOWEN, D. GOR a P. D. GRIFFITHS. The dynamics of human cytomegalovirus replication in vivo. *The Journal of Experimental Medicine.* 1999, **190**(2), 177–182. ISSN 0022-1007.
- [61] KRÓL, L., J. STUCHLÝ, P. HUBÁČEK, P. KESLOVÁ, P. SEDLÁČEK, J. STARÝ, O. HRUŠÁK a T. KALINA. Signature profiles of CMV-specific T-cells in patients with CMV reactivation after hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplantation* [online]. 2011, **46**(8), 1089–1098. ISSN 1476-5365. Dostupné z: doi:10.1038/bmt.2010.261
- [62] PELÁK, Ondřej. *Výzkum účinné antivirové imunity po transplantaci.* Praha, 2012. Diplomová práce. Univerzita Karlova V Praze. Přírodovědecká fakulta. Biologie.
- [63] BOECKH, Michael a Per LJUNGMAN. How we treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients. *Blood* [online]. 2009, **113**(23), 5711–5719. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2008-10-143560
- [64] ARIZA-HEREDIA, Ella J., Lior NESHER a Roy F. CHEMALY. Cytomegalovirus diseases after hematopoietic stem cell transplantation: A mini-review. *Cancer Letters* [online]. 2014, **342**(1), 1–8. ISSN 0304-3835. Dostupné z: doi:10.1016/j.canlet.2013.09.004

- [65] HILAL, Talal, Stacey SLONE, Shawn PETERSON, Charles BODINE a Zartash GUL. Cytomegalovirus reactivation is associated with a lower rate of early relapse in myeloid malignancies independent of in-vivo T cell depletion strategy. *Leukemia Research* [online]. 2017, **57**, 37–44. ISSN 0145-2126. Dostupné z: doi:10.1016/j.leukres.2017.02.009
- [66] MARIOTTI, Jacopo, Francesco MAURA, Francesco SPINA, Luisa RONCARI, Anna DODERO, Lucia FARINA, Vittorio MONTEFUSCO, Cristiana CARNITI, Barbara SARINA, Francesca PATRIARCA, Alessandro RAMBALDI, Francesco ONIDA, Attilio OLIVIERI, Francesco ZALLIO a Paolo CORRADINI. Impact of Cytomegalovirus Replication and Cytomegalovirus Serostatus on the Outcome of Patients with B Cell Lymphoma after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* [online]. 2014, **20**(6), 885–890. ISSN 10838791. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbmt.2014.02.015
- [67] FOLEY, Bree, Sarah COOLEY, Michael R. VERNERIS, Michelle PITT, Julie CURTSINGER, Xianghua LUO, Sandra LOPEZ-VERGÈS, Lewis L. LANIER, Daniel WEISDORF a Jeffrey S. MILLER. Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C+ natural killer cells with potent function. *Blood* [online]. 2012, **119**(11), 2665–2674. ISSN 0006-4971, 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2011-10-386995
- [68] TEIRA, Pierre, Mino BATTIWALLA, Muthalagu RAMANATHAN, A. John BARRETT, Kwang Woo AHN, Min CHEN, Jaime S. GREEN, Ayman SAAD, Joseph H. ANTIN, Bipin N. SAVANI, Hillard M. LAZARUS, Matthew SEFTEL, Wael SABER, David MARKS, Mahmoud ALJURF, Maxim NORKIN, John R. WINGARD, Caroline A. LINDEMANS, Michael BOECKH, Marcie L. RICHES a Jeffery J. AULETTA. Early cytomegalovirus reactivation remains associated with increased transplant-related mortality in the current era: a CIBMTR analysis. *Blood* [online]. 2016, **127**(20), 2427–2438. ISSN 0006-4971, 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2015-11-679639
- [69] YOON, Jae-Ho, Seok LEE, Hee-Je KIM, Young-Woo JEON, Sung-Eun LEE, Byung-Sik CHO, Dong-Gun LEE, Ki-Seong EOM, Yoo-Jin KIM, Chang-Ki MIN, Seok-Goo CHO, Woo-Sung MIN a Jong Wook LEE. Impact of cytomegalovirus reactivation on relapse and survival in patients with acute leukemia who received allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in first remission. *Oncotarget* [online]. 2016, **7**(13), 17230–17241. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.7347
- [70] LJUNGMAN, Per. CMV update. Final slide set. In: *7th European Conference on Infection in Leukaemia* [online]. Přednáška. Francie: Mercure Sophia Antipolis. 23. srpen 2017 [vid. 2018-02-12]. Dostupné z: <http://www.ecil-leukaemia.com/telechargements/ECIL%207%20CMV%20final%20slides.pdf>
- [71] GRISWOLD, W. R. A quantitative relationship between antibody affinity and antibody avidity. *Immunological Investigations*. 1987, **16**(2), 97–106. ISSN 0882-0139.
- [72] KREJSEK, Jan a Otakar KOPECKÝ. B lymfocyty a protilátková imunita. In: *Klinická imunologie*. Hradec Králové: Nucleus, 2004, s. 241–270.
- [73] FRYER, Jacqueline F., Alan B. HEATH, Philip D. MINOR a COLLABORATIVE STUDY GROUP. A collaborative study to establish the 1st WHO International Standard for human cytomegalovirus for nucleic acid amplification technology. *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization* [online]. 2016, **44**(4), 242–251. ISSN 1095-8320. Dostupné z: doi:10.1016/j.biologicals.2016.04.005
- [74] ZAVRELOVA, Alzbeta, Jakub RADOCHA, Lenka PLISKOVA, Pavla PATEROVA, Eva VEJRAZKOVA, Jiri CYRANY, Filip GABALEC, Miroslav PODHOLA a Pavel ZAK. Detection of cytomegalovirus

- DNA in fecal samples as a method for CMV enterocolitis diagnosis after allogeneic stem cell transplantation. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* [online]. 2018. ISSN 1213-8118. Dostupné z: doi:10.5507/bp.2018.023
- [75] GILBERT, C., J. ROY, R. BELANGER, R. DELAGE, C. BELIVEAU, C. DEMERS a G. BOIVIN. Lack of Emergence of Cytomegalovirus UL97 Mutations Conferring Ganciclovir (GCV) Resistance following Preemptive GCV Therapy in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2001, **45**(12), 3669–3671. ISSN 0066-4804, 1098-6596. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.45.12.3669-3671.2001
- [76] NICHOLS, W. Garrett, Lawrence COREY, Ted GOOLEY, W. Lawrence DREW, Richard MINER, Meei-Li HUANG, Chris DAVIS a Michael BOECKH. Rising pp65 antigenemia during preemptive anticytomegalovirus therapy after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: risk factors, correlation with DNA load, and outcomes. *Blood*. 2001, **97**(4), 867–874. ISSN 0006-4971, 1528-0020.
- [77] GREEN, Margaret L, Wendy LEISENRING, Hu XIE, T Christopher MAST, Yadong CUI, Brenda M SANDMAIER, Mohamed L SORROR, Sonia GOYAL, Sezen ÖZKÖK, Jessica YI, Farah SAHOO, Louise E KIMBALL, Keith R JEROME, Morgan A MARKS a Michael BOECKH. Cytomegalovirus viral load and mortality after haemopoietic stem cell transplantation in the era of pre-emptive therapy: a retrospective cohort study. *The Lancet Haematology* [online]. 2016, **3**(3), e119–e127. ISSN 2352-3026. Dostupné z: doi:10.1016/S2352-3026(15)00289-6
- [78] CHEN, Kaiwen, Matthew P. CHENG, Sarah P. HAMMOND, Hermann EINSELE a Francisco M. MARTY. Antiviral prophylaxis for cytomegalovirus infection in allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood Advances* [online]. 2018, **2**(16), 2159–2175. ISSN 2473-9529, 2473-9537. Dostupné z: doi:10.1182/bloodadvances.2018016493
- [79] SHMUELI, Einat, Reuven OR, Michael Y. SHAPIRA, Igor B. RESNICK, Orit CAPLAN, Tali BDOLAH-ABRAM a Dana G. WOLF. High Rate of Cytomegalovirus Drug Resistance Among Patients Receiving Preemptive Antiviral Treatment After Haploidentical Stem Cell Transplantation. *Journal of Infectious Diseases* [online]. 2014, **209**(4), 557–561. ISSN 0022-1899, 1537-6613. Dostupné z: doi:10.1093/infdis/jit475
- [80] ROZSYPAL, Hanuš. Chemoterapie infekcí vyvolaných cytomegalovirem. *Remedia*. 2002, **12**(5), 339–342.
- [81] MARFORI, Jennifer E., Maurice M. EXNER, Gail I. MAROUSEK, Sunwen CHOU a W. Lawrence DREW. Development of new cytomegalovirus UL97 and DNA polymerase mutations conferring drug resistance after valganciclovir therapy in allogeneic stem cell recipients. *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology* [online]. 2007, **38**(2), 120–125. ISSN 1386-6532. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcv.2006.11.005
- [82] SEDLÁČEK, Petr, Michal KOUBA, Petr HUBÁČEK, Ester MEJSTŘÍKOVÁ, Martina LENGEROVA, Mariana HRIČINOVÁ, Jan HABER, Júlia HORÁKOVÁ, Pavel ŽÁK, Melanie CERMANOVÁ, Alžběta ZAVŘELOVÁ, Petr CETKOVSKÝ, Ľuboš DRGOŇA, Peter MÚDRÝ, Jaroslav ŠTĚRBA, Barbora ŽIAKOVÁ, Jiří MAYER a Zdeněk RÁČIL. Doporučení odborníků pro prevenci a terapii CMV infekce u hematologických pacientů. Doporučení odborníků s podporou CELL. *Postgraduální medicína*. 2013, **15**(4), 56–57. ISSN 1212-4184.

- [83] O'BRIEN, M. Shea, Kylie C. MARKOVICH, Dean SELLESETH, Alexa V. DEVITA, Phiroze SETHNA a Brian G. GENTRY. In vitro evaluation of current and novel antivirals in combination against human cytomegalovirus. *Antiviral Research* [online]. 2018, **158**, 255–263. ISSN 0166-3542. Dostupné z: doi:10.1016/j.antiviral.2018.08.015
- [84] NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK. *NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines). Prevention and Treatment of Cancer-Related Infections. Version 1.2019* [online]. Pennsylvania: NCCN, 2018 [vid. 2018-12-06]. Dostupné z: [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/infections.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/infections.pdf)
- [85] ONG, Shin-Yeu, Ha-Thi-Thu TRUONG, Colin Phipps DIONG, Yeh-Ching LINN, Aloysius Yew-Leng HO, Yeow-Tee GOH a William Ying-Khee HWANG. Use of Valacyclovir for the treatment of cytomegalovirus antigenemia after hematopoietic stem cell transplantation. *BMC Hematology* [online]. 2015, **15** [vid. 2018-12-21]. ISSN 2052-1839. Dostupné z: doi:10.1186/s12878-015-0028-2
- [86] KRONFLI, Nadine a Shariq HAIDER. Management of cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: A review of novel pharmacologic and cellular therapies. *Official Journal of the Association of Medical Microbiology and Infectious Disease Canada* [online]. 2017 [vid. 2018-09-17]. Dostupné z: doi:10.3138/jammi.2.1.005
- [87] MARTY, Francisco M., Per LJUNGMAN, Genovefa A. PAPANICOLAOU, Drew J. WINSTON, Roy F. CHEMALY, Lynne STRASFELD, Jo-Anne H. YOUNG, Tulio RODRIGUEZ, Johan MAERTENS, Michael SCHMITT, Hermann EINSELE, Augustin FERRANT, Jeffrey H. LIPTON, Stephen A. VILLANO, Hongzi CHEN, Michael BOECKH a MARIBAVIR 1263-300 CLINICAL STUDY GROUP. Maribavir prophylaxis for prevention of cytomegalovirus disease in recipients of allogeneic stem-cell transplants: a phase 3, double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *The Lancet. Infectious Diseases* [online]. 2011, **11**(4), 284–292. ISSN 1474-4457. Dostupné z: doi:10.1016/S1473-3099(11)70024-X
- [88] FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *Cytomegalovirus in Transplantation: Developing Drugs to Treat or Prevent Disease. Guidance for Industry*. [online]. Rockville, MD: FDA, 2018 [vid. 2018-09-13]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM608059.pdf>
- [89] SHIRE. *Shire Receives FDA Breakthrough Therapy Designation for Maribavir, an Investigational Treatment for Cytomegalovirus (CMV) Infection in Transplant Patients* [online]. Ireland: Shire, 2018 [vid. 2018-09-24]. Dostupné z: <https://www.shire.com/newsroom/2018/january/ftmwc>
- [90] AVERY, R. K., B. J. BOLWELL, B. YEN-LIEBERMAN, N. LURAIN, W. J. WALDMAN, D. L. LONGWORTH, A. J. TAEGER, S. B. MOSSAD, D. KOHN, J. R. LONG, J. CURTIS, M. KALAYCIO, B. POHLMAN a J. W. WILLIAMS. Use of leflunomide in an allogeneic bone marrow transplant recipient with refractory cytomegalovirus infection. *Bone Marrow Transplantation* [online]. 2004, **34**(12), 1071–1075. ISSN 1476-5365. Dostupné z: doi:10.1038/sj.bmt.1704694
- [91] WALDMAN, W. James, Deborah A. KNIGHT, Leonard BLINDER, JiKun SHEN, Nell S. LURAIN, Daniel M. MILLER, Daniel D. SEDMAK, James W. WILLIAMS a Anita S.-F. CHONG. Inhibition of Cytomegalovirus in vitro and in vivo by the Experimental Immunosuppressive Agent Leflunomide. *Intervirology* [online]. 1999, **42**(5–6), 412–418. ISSN 0300-5526, 1423-0100. Dostupné z: doi:10.1159/000053979

- [92] EL CHAER, Firas, Nobuyoshi MORI, Dimpay SHAH, Nora OLIVER, Emily WANG, Anna JAN, Vi DOAN, Frank TVERDEK, Jean TAYAR, Ella ARIZA-HEREDIA a Roy F. CHEMALY. Adjuvant and salvage therapy with leflunomide for recalcitrant cytomegalovirus infections in hematopoietic cell transplantation recipients: A case series. *Antiviral Research* [online]. 2016, **135**, 91–96. ISSN 1872-9096. Dostupné z: doi:10.1016/j.antiviral.2016.08.027
- [93] SHAPIRA, Michael Y., Igor B. RESNICK, Sunwen CHOU, Avidan U. NEUMANN, Nell S. LURAIN, Thomas STAMMINGER, Orit CAPLAN, Niveen SALEH, Thomas EFFERTH, Manfred MARSCHALL a Dana G. WOLF. Artesunate as a Potent Antiviral Agent in a Patient with Late Drug-Resistant Cytomegalovirus Infection after Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2008, **46**(9), 1455–1457. ISSN 1058-4838. Dostupné z: doi:10.1086/587106
- [94] STUEHLER, C., G. STÜSSI, J. HALTER, J. NOWAKOWSKA, A. SCHIBLI, M. BATTEGAY, J. DIRKS, J. PASSWEG, D. HEIM, A. ROVO, C. KALBERER, C. BUCHER, M. WEISSER, A. DUMOULIN, H.H. HIRSCH a N. KHANNA. Combination therapy for multidrug-resistant cytomegalovirus disease. *Transplant Infectious Disease* [online]. 2015, **17**(5), 751–755. ISSN 13982273. Dostupné z: doi:10.1111/tid.12435
- [95] KOUBA, Michal a Petr HUBÁČEK. Léčba a profylaxe CMV infekce/reaktivace. *Postgrad med.* 2013, **15**(4), 51–55. ISSN 1212-4184.
- [96] VAN DER BEEK, Martha T., Erik W. A. F. MARIJT, Ann C. T. M. VOSSSEN, Caroline S. VAN DER BLIJ-DE BROUWER, Ron WOLTERBEEK, Constantijn J. M. HALKES, Eric C. J. CLAAS a Aloys C. M. KROES. Failure of pre-emptive treatment of cytomegalovirus infections and antiviral resistance in stem cell transplant recipients. *Antiviral Therapy* [online]. 2012, **17**(1), 45–51. ISSN 2040-2058. Dostupné z: doi:10.3851/IMP1899
- [97] VEJRAZKOVA, Eva, Lenka PLISKOVA, Petr HUBACEK, Milan KOSTAL, Alzbeta ZAVRELOVA, Jakub RADOCHA, Radka KUTOVA, Vlasta STEPANOVA a Pavel ZAK. Clinical and genotypic CMV drug resistance in HSCT recipients: a single center epidemiological and clinical data. *Bone Marrow Transplantation* [online]. 2019, **54**(1), 146–149. ISSN 1476-5365. Dostupné z: doi:10.1038/s41409-018-0257-7
- [98] HANTZ, Sébastien, Françoise GARNIER-GEOFFROY, Marie-Christine MAZERON, Isabelle GARRIGUE, Pierre MERVILLE, Catherine MENGELLE, Lionel ROSTAING, Franck SAINT MARCOUX, Marie ESSIG, Jean-Philippe REROLLE, Sébastien COTIN, Raphaëlle GERMI, Sylvie PILLET, Yvon LEBRANCHU, Pascal TURLURE, Sophie ALAIN a FRENCH CMV RESISTANCE SURVEY STUDY GROUP. Drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients: a French cohort study. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2010, **65**(12), 2628–2640. ISSN 1460-2091. Dostupné z: doi:10.1093/jac/dkq368
- [99] LURAIN, Nell S., Sangeeta M. BHORADE, Kenneth J. PURSELL, Robin K. AVERY, Vijay V. YELDANDI, Carlos M. ISADA, Emmanuel S. ROBERT, Debra J. KOHN, Max Q. ARENS, Edward R. GARRITY, Alan J. TAEGER, Martin G. MULLEN, Kathleen M. TODD, James W. BREMER a Belinda YEN-LIEBERMAN. Analysis and Characterization of Antiviral Drug-Resistant Cytomegalovirus Isolates from Solid Organ Transplant Recipients. *The Journal of Infectious Diseases* [online]. 2002, **186**(6), 760–768. ISSN 0022-1899. Dostupné z: doi:10.1086/342844
- [100] CHOU, Sunwen, Laura C. VAN WECHSEL, Heather M. LICHY a Gail I. MAROUSEK. Phenotyping of Cytomegalovirus Drug Resistance Mutations by Using Recombinant Viruses Incorporating a Reporter Gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2005, **49**(7), 2710–2715. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.49.7.2710-2715.2005



- [101] GORDON, Emily. *Treatment of Ganciclovir - Resistant Cytomegalovirus in Adult Solid Organ Transplant Recipients. Caught Between a Rock and a Hard Place?* [online]. Texas: University of Texas, 2013 [vid. 2014-05-05]. Dostupné z: <http://sites.utexas.edu/pharmacotherapy-rounds/files/2015/09/gordon11-01-13.pdf>
- [102] VOLFOVA, Pavlina, Martina LENGEROVA, Jana LOCHMANOVA, Dana DVORAKOVA, Dita RICNA, Martina PALACKOVA, Barbora WEINBERGEROVA, Jiri MAYER a Zdenek RACIL. Detecting human cytomegalovirus drug resistant mutations and monitoring the emergence of resistant strains using real-time PCR. *Journal of Clinical Virology* [online]. 2014, **61**(2), 270–274. ISSN 1386-6532, 1873-5967. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcv.2014.07.008
- [103] SAHOO, Malaya K., Martina I. LEFTEROVA, Fumiko YAMAMOTO, Jesse J. WAGGONER, Sunwen CHOU, Susan P. HOLMES, Matthew W. ANDERSON a Benjamin A. PINSKY. Detection of Cytomegalovirus Drug Resistance Mutations by Next-Generation Sequencing. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2013, **51**(11), 3700–3710. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.01605-13
- [104] PSOHLAVEC, Jiří, Miroslav FÖRSTL, Jiří HORÁČEK, Lenka PLÍŠKOVÁ, Zbyněk VESELSKÝ a Petr FIXA. Možnosti rychlého průkazu ganciclovir rezistentních kmenů lidského cytomegaloviru (HCMV, CMV) u pacientů po transplantaci ledviny. Detekce bodových mutací v UL97 genu HCMV spojených s rezistencí vůči gancicloviru. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2005, **18**(2), 70–74.
- [105] FAJFR, Miroslav a Vlasta ŠTĚPÁNOVÁ. Herpesviry a rezistence k antivirotické terapii. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2017, **31**(2), 27–30. ISSN 1212-7973.
- [106] SCHUBERT, Axel. Emergence of drug-resistant cytomegalovirus (CMV) in immunosuppressed patients. In: *AREVIR-GenaFor-Meeting* [online]. Přednáška. Spolková republika Německo: Kolín. 5. září 2017 [vid. 2018-09-14]. Dostupné z: [https://www.genafor.org/arevir2017/presentation/1/Axel\\_Schubert\\_AREVIR\\_2017.pdf](https://www.genafor.org/arevir2017/presentation/1/Axel_Schubert_AREVIR_2017.pdf)
- [107] PERKINS, Janelle, Teresa FIELD, Jongphil KIM, Mohamed A. KHARFAN-DABAJA, Hugo FERNANDEZ, Ernesto AYALA, Lia PEREZ, Mian XU, Melissa ALSINA, Leonel OCHOA, Daniel SULLIVAN, William JANSSEN a Claudio ANASETTI. A randomized phase II trial comparing tacrolimus and mycophenolate mofetil to tacrolimus and methotrexate for acute graft-versus-host disease prophylaxis. *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* [online]. 2010, **16**(7), 937–947. ISSN 1523-6536. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbmt.2010.01.010
- [108] STANFORD UNIVERZITY SCHOOL OF MEDICINE. *Grading Staging Report - Acute GVHD of the Skin - Surgical Pathology Criteria* [online]. California: Stanford University School of Medicine, nedatováno [vid. 2018-02-03]. Dostupné z: <http://surpathcriteria.stanford.edu/transplant/skinacutegvhd/grading.html>
- [109] VEJRAŽKOVÁ, Eva, Petr HUBÁČEK, Lenka PLÍŠKOVÁ, Milan KOŠTÁL, Alžběta ZAVŘELOVÁ, Vlasta ŠTĚPÁNOVÁ a Pavel ŽÁK. Reduction of Thymoglobuline from 7.5 mg/kg to 6 mg/kg in conditioning regimen extended time to the first cytomegalovirus detection after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie: Časopis Společnosti Pro Epidemiologii a Mikrobiologii České Lékařské Společnosti J.E. Purkyně*. 2019, **67**(2), přijato, v tisku.
- [110] MEIJER, Ellen, Jan J. CORNELISSEN, Bob LÖWENBERG a Leo F. VERDONCK. Antithymocytoglobulin as prophylaxis of graft failure and graft-versus-host disease in

- recipients of partially T-cell-depleted grafts from matched unrelated donors: a dose-finding study. *Experimental Hematology*. 2003, **31**(11), 1026–1030. ISSN 0301-472X.
- [111] MOHTY, Mohamad, Andrea BACIGALUPO, Faouzi SALIBA, Andreas ZUCKERMANN, Emmanuel MORELON a Yvon LEBRANCHU. New Directions for Rabbit Antithymocyte Globulin (Thymoglobulin®) in Solid Organ Transplants, Stem Cell Transplants and Autoimmunity. *Drugs* [online]. 2014, **74**(14), 1605–1634. ISSN 0012-6667. Dostupné z: doi:10.1007/s40265-014-0277-6
- [112] SCOTT, G. M., M. A. ISAACS, F. ZENG, A. M. KESSON a W. D. RAWLINSON. Cytomegalovirus antiviral resistance associated with treatment induced UL97 (protein kinase) and UL54 (DNA polymerase) mutations. *Journal of Medical Virology* [online]. 2004, **74**(1), 85–93. ISSN 0146-6615. Dostupné z: doi:10.1002/jmv.20150
- [113] NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK. *NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines). Prevention and Treatment of Cancer-Related Infections. Version 2.2014* [online]. Pennsylvania: NCCN, 2014 [vid. 2014-12-12]. Dostupné z: <http://file.trsgo.org/userfiles/file/NCCN%20Cancer-Related%20Infections%20Guideline%202015.pdf>
- [114] RUUTU, Tapani. Engraftment. In: *European Group for Blood and Marrow Transplantation 2011* [online]. Francie: Paříž. 6. duben 2011 [vid. 2016-06-02]. Dostupné z: <https://portal.ebmt.org/Contents/Resources/Library/Slidebank/Documents/EBMT%202011%20SC%20Slide%20Bank/1439%20Ruutu.pdf>
- [115] CHOU, Sunwen, S. GUENTZEL, K. R. MICHELS, R. C. MINER a W. L. DREW. Frequency of UL97 phosphotransferase mutations related to ganciclovir resistance in clinical cytomegalovirus isolates. *The Journal of Infectious Diseases*. 1995, **172**(1), 239–242. ISSN 0022-1899.
- [116] BALDANTI, Fausto, M R UNDERWOOD, S C STANAT, K K BIRON, S CHOU, A SARASINI, E SILINI a G GERNA. Single amino acid changes in the DNA polymerase confer foscarnet resistance and slow-growth phenotype, while mutations in the UL97-encoded phosphotransferase confer ganciclovir resistance in three double-resistant human cytomegalovirus strains recovered from patients with AIDS. *Journal of Virology*. 1996, **70**(3), 1390–1395. ISSN 0022-538X.
- [117] ERICE, Alejo, N. BORRELL, W. LI, W. J. MILLER a H. H. BALFOUR. Ganciclovir susceptibilities and analysis of UL97 region in cytomegalovirus (CMV) isolates from bone marrow recipients with CMV disease after antiviral prophylaxis. *The Journal of Infectious Diseases*. 1998, **178**(2), 531–534. ISSN 0022-1899.
- [118] SMITH, I. L., J. M. CHERRINGTON, R. E. JILES, M. D. FULLER, W. R. FREEMAN a S. A. SPECTOR. High-level resistance of cytomegalovirus to ganciclovir is associated with alterations in both the UL97 and DNA polymerase genes. *The Journal of Infectious Diseases*. 1997, **176**(1), 69–77. ISSN 0022-1899.
- [119] CHOU, Sunwen, A. ERICE, M. C. JORDAN, G. M. VERCELLOTTI, K. R. MICHELS, C. L. TALARICO, S. C. STANAT a K. K. BIRON. Analysis of the UL97 phosphotransferase coding sequence in clinical cytomegalovirus isolates and identification of mutations conferring ganciclovir resistance. *The Journal of Infectious Diseases*. 1995, **171**(3), 576–583. ISSN 0022-1899.
- [120] WOLF, Dana G., I L SMITH, D J LEE, W R FREEMAN, M FLORES-AGUILAR a S A SPECTOR. Mutations in human cytomegalovirus UL97 gene confer clinical resistance to ganciclovir and

can be detected directly in patient plasma. *Journal of Clinical Investigation*. 1995, **95**(1), 257–263. ISSN 0021-9738.

- [121] FILIPOVICH, Alexandra H., Daniel WEISDORF, Steven PAVLETIC, Gerard SOCIE, John R. WINGARD, Stephanie J. LEE, Paul MARTIN, Jason CHIEN, Donna PRZEPIORKA, Daniel COURIEL, Edward W. COWEN, Patricia DINNDORF, Ann FARRELL, Robert HARTZMAN, Jean HENSLEE-DOWNEY, David JACOBSON, George MCDONALD, Barbara MITTLEMAN, J. Douglas RIZZO, Michael ROBINSON, Mark SCHUBERT, Kirk SCHULTZ, Howard SHULMAN, Maria TURNER, Georgia VOGELSANG a Mary E. D. FLOWERS. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. Diagnosis and Staging Working Group Report. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* [online]. 2005, **11**(12), 945–956. ISSN 1083-8791, 1523-6536. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbmt.2005.09.004
- [122] SULLIVAN, Keith M. Graft vs. host disease. In: Karl G. BLUME, Stephen J. FORMAN a Frederick APPELBAUM, ed. *Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation*. Third ed. Malden, MA: Blackwell Publishing, 2004, s. 635–664.
- [123] NACHBAUR, David, Clara LARCHER, Brigitte KIRCHER, Günther EIBL, Walter NUSSBAUMER, Eberhard GUNSILIUS, Margot HAUN, Kurt GRÜNEWALD a Günther GASTL. Risk for cytomegalovirus infection following reduced intensity allogeneic stem cell transplantation. *Annals of Hematology* [online]. 2003, **82**(10), 621–627. ISSN 0939-5555, 1432-0584. Dostupné z: doi:10.1007/s00277-003-0706-1
- [124] DE LA CÁMARA, Rafael. CMV in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases* [online]. 2016, **8**(1) [vid. 2018-09-29]. ISSN 2035-3006. Dostupné z: doi:10.4084/MJHID.2016.031
- [125] GEORGE, Biju, I. KERRIDGE, N. GILROY, G. HUANG, M. HERTZBERG, D. GOTTLIEB a K. BRADSTOCK. Fludarabine-based reduced intensity conditioning transplants have a higher incidence of cytomegalovirus reactivation compared with myeloablative transplants. *Bone Marrow Transplantation* [online]. 2010, **45**(5), 849–855. ISSN 0268-3369. Dostupné z: doi:10.1038/bmt.2009.273
- [126] BHUTANI, Divaya, Gregory DYSON, Richard MANASA, Abhinav DEOL, Voravit RATANATHARATHORN, Lois AYASH, Muneer ABIDI, Lawrence G. LUM, Zaid AL-KADHIMI a Joseph P. UBERTI. Incidence, risk factors, and outcome of cytomegalovirus viremia and gastroenteritis in patients with gastrointestinal graft-versus-host disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* [online]. 2015, **21**(1), 159–164. ISSN 1523-6536. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbmt.2014.10.004
- [127] ROWE JULIE, GRIM SHELEE A., PEACE DAVID, LAI CATHERINE, SWEISS KAREN, LAYDEN JENNIFER E. a CLARK NINA M. The significance of cytomegalovirus viremia at day 100 or more following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clinical Transplantation* [online]. 2013, **27**(4), 510–516. ISSN 0902-0063. Dostupné z: doi:10.1111/ctr.12128
- [128] LJUNGMAN, Per, Lena PEREZ-BERCOFF, Jerker JONSSON, Gayane AVETISYAN, Elda SPARRELID, Johan ASCHAN, Lisbeth BARKHOLT, Kajsa LARSSON, Jacek WINIARSKI, Zhibing YUN a Olle RINGDÉN. Risk factors for the development of cytomegalovirus disease after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2006, **91**(1), 78–83. ISSN 1592-8721.

- [129] VERDUYN LUNEL, Frans M., Reinier RAYMAKERS, Anette VAN DIJK, Lotte VAN DER WAGEN, Monique C. MINNEMA a Jurgen KUBALL. Cytomegalovirus Status and the Outcome of T Cell–Replete Reduced-Intensity Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* [online]. 2016, **22**(10), 1883–1887. ISSN 1083-8791. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbmt.2016.07.009
- [130] FURUNO, Jon P., Miriam R. ELMAN, Brie N. NOBLE, Lynne STRASFELD, Gregory B. TALLMAN a Jessina C. MCGREGOR. Incidence and Outcomes of Cytomegalovirus (CMV) Infection among Hematopoietic Stem Cell Transplant (HSCT) Recipients. *Open Forum Infectious Diseases* [online]. 2017, **4**(suppl\_1), S731–S732. Dostupné z: doi:10.1093/ofid/ofx163.1972
- [131] HILAL, Talal, Shawn PETERSON, Charles BODINE, Stacey A. SLONE, Gerhard HILDEBRANDT a Zartash GUL. Evaluation of cytomegalovirus (CMV) reactivation, relapse, and survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) using two T cell depletion strategies. *Journal of Clinical Oncology* [online]. 2016, **34**(15\_suppl), 7047–7047. ISSN 0732-183X. Dostupné z: doi:10.1200/JCO.2016.34.15\_suppl.7047
- [132] LIU, Jiangying, Lan-Ping XU, Zhilei BIAN, Ying-Jun CHANG, Yu WANG, Xiao-Hui ZHANG a Xiao-Jun HUANG. Differential impact of two doses of antithymocyte globulin conditioning on lymphocyte recovery upon haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Journal of Translational Medicine* [online]. 2015, **13** [vid. 2016-10-22]. ISSN 1479-5876. Dostupné z: doi:10.1186/s12967-015-0748-x
- [133] SALEM, Galena, Amy S. RUPPERT, Patrick ELDER, Craig C. HOFMEISTER, Don M. BENSON, Sam PENZA, Leslie ANDRITSOS, Rebecca KLISOVIC, Sumithira VASU, William BLUM, Steven M DEVINE, Samantha JAGLOWSKI a Yvonne A. EFEBERA. Lower Dose of Antithymocyte Globulin (ATG) does not increase Graft-vs-Host Disease (GVHD) in Patients Undergoing Reduced-Intensity Conditioning (RIC) Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant (allo HSCT). *Leukemia & lymphoma* [online]. 2015, **56**(4), 1058–1065. ISSN 1042-8194. Dostupné z: doi:10.3109/10428194.2014.956314
- [134] WANG, Y., H. X. FU, D. H. LIU, L. P. XU, X. H. ZHANG, Y.-J. CHANG, Y.-H. CHEN, F.-R. WANG, Y.-Q. SUN, F.-F. TANG, K.-Y. LIU a X.-J. HUANG. Influence of two different doses of antithymocyte globulin in patients with standard-risk disease following haploidentical transplantation: a randomized trial. *Bone Marrow Transplantation* [online]. 2014, **49**(3), 426–433. ISSN 1476-5365. Dostupné z: doi:10.1038/bmt.2013.191
- [135] HAMADANI, Mehdi, William BLUM, Gary PHILLIPS, Patrick ELDER, Leslie ANDRITSOS, Craig HOFMEISTER, Lynn O'DONNELL, Rebecca KLISOVIC, Sam PENZA, Ramiro GARZON, David KRUGH, Thomas LIN, Thomas BECHTEL, Don M. BENSON, John C. BYRD, Guido MARCUCCI a Steven M. DEVINE. Improved Nonrelapse Mortality and Infection Rate with Lower Dose of Antithymocyte Globulin in Patients Undergoing Reduced-Intensity Conditioning Allogeneic Transplantation for Hematologic Malignancies. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* [online]. 2009, **15**(11), 1422–1430. ISSN 1083-8791. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbmt.2009.07.006
- [136] AYUK, Francis, Galina DIYACHENKO, Tatjana ZABELINA, Christine WOLSCHKE, Boris FEHSE, Ulrike BACHER, Rudolf ERTTMANN, Nicolaus KRÖGER a Axel R. ZANDER. Comparison of Two Doses of Antithymocyte Globulin in Patients Undergoing Matched Unrelated Donor Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* [online]. 2008, **14**(8), 913–919. ISSN 1083-8791. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbmt.2008.05.023

- [137] LENGEROVÁ, Martina, Pavlína VOLFOVA a Zdeněk RÁČIL. Laboratorní diagnostika CMV infekce u nemocných s hematologickou malignitou. *Postgrad med.* 2013, **15**(4), 45–50.
- [138] GÖHRING, Katharina, Dana WOLF, Wolfgang BETHGE, Elfriede MIKELER, Christoph FAUL, Wichard VOGEL, Matthias C. VÖHRINGER, Gerhard JAHN a Klaus HAMPRECHT. Dynamics of coexisting HCMV-UL97 and UL54 drug-resistance associated mutations in patients after haematopoietic cell transplantation. *Journal of Clinical Virology* [online]. 2013, **57**(1), 43–49. ISSN 1386-6532. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcv.2013.01.003
- [139] KLEIBOEKER, Steve, J. NUTT, B. SCHINDEL, J. DANNEHL a J. HESTER. Cytomegalovirus antiviral resistance: characterization of results from clinical specimens. *Transplant Infectious Disease* [online]. 2014, **16**(4), 561–567. ISSN 1399-3062. Dostupné z: doi:10.1111/tid.12241
- [140] BACHMANN, Robert, K. HAMPRECHT, J. LANGE, R. LADURNER, S. NADALIN, G. JAHN, A. KÖNIGSRAINER a A. HEININGER. Successful ganciclovir treatment of primary cytomegalovirus infection containing the UL97 mutation N510S in an intestinal graft recipient. *Infection* [online]. 2013, **41**(4), 875–879. ISSN 0300-8126, 1439-0973. Dostupné z: doi:10.1007/s15010-013-0458-3
- [141] CASTOR, Jared, Linda COOK, Lawrence COREY a Keith R. JEROME. Rapid detection directly from patient serum samples of human cytomegalovirus UL97 mutations conferring ganciclovir resistance. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2007, **45**(8), 2681–2683. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.00526-07
- [142] CHOU, Sunwen. Recombinant phenotyping of cytomegalovirus UL97 kinase sequence variants for ganciclovir resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2010, **54**(6), 2371–2378. ISSN 1098-6596. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.00186-10
- [143] CAMPOS, Ana Bela, Joana RIBEIRO, David BOUTOLLEAU a Hugo SOUSA. Human cytomegalovirus antiviral drug resistance in hematopoietic stem cell transplantation: current state of the art. *Reviews in Medical Virology* [online]. 2016, **26**(3), 161–182. ISSN 1099-1654. Dostupné z: doi:10.1002/rmv.1873
- [144] EMERY, Vincent C. a Paul D. GRIFFITHS. Prediction of cytomegalovirus load and resistance patterns after antiviral chemotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000, **97**(14), 8039–8044. ISSN 0027-8424.

## 7. Přílohy

**Tabulka č. 13: Kvartily hodnot uvedených v tabulkách**

	Minimum	Dolní kvartil	Medián	Horní kvartil	Maximum
Tabulka č. 1: Charakteristika souboru nemocných					
Věk pacientů v době HSCT (roky)	22	40	55	61,25	72
Karnofského skóre pacientů v době HSCT (%)	20	70	80	90	100
Tabulka č. 2: Provedené HSCT – charakteristika					
Věk dárce v době HSCT	18	25	30	39,25	65
Množství CD34 <sup>+</sup> x 10 <sup>6</sup> /kg ve štěpu	1,18	5,35	6,95	8,33	12,3
Tabulka č. 3: Charakteristika skupin pacientů podle dávky TG 7,5 vs. 6 mg/kg					
Věk pacientů v době HSCT – TG 7,5 mg/kg (roky)	22	37,5	56	61	69
Věk pacientů v době HSCT – TG 6 mg/kg (roky)	23	43	60	64	72
Karnofského skóre v době HSCT – TG 7,5 mg/kg (%)	20	60	80	90	100
Karnofského skóre v době HSCT – TG 6 mg/kg (%)	30	70	80	90	100
Věk dárce v době HSCT – TG 7,5 mg/kg (roky)	18	25	28	35	47
Věk dárce v době HSCT – TG 6 mg/kg (roky)	18	25	29	34	53
Množství CD34 <sup>+</sup> x 10 <sup>6</sup> /kg ve štěpu – TG 7,5 mg/kg	1,68	6	7	8,19	11
Množství CD34 <sup>+</sup> x 10 <sup>6</sup> /kg ve štěpu – TG 6 mg/kg	2,04	5	6,5	8,08	10,9

Tabulka č. 7: Podání thymoglobulinu v dávkování 7,5mg/kg vs. 6 mg/kg – parametry CMV					
Doba do 1. CMV detekce – TG 7,5 mg/kg (počet dní od HSCT)	1	20	27,5	34,25	87
Doba do 1. CMV detekce – TG 6 mg/kg (počet dní od HSCT)	19	27	40	49	342
Počáteční CMV nálož – TG 7,5 mg/kg (cp/ml periferní krve)	120	286,25	455	912,5	7530
Počáteční CMV nálož – TG 6 mg/kg (cp/ml periferní krve)	105	277,5	455	1090	3090
Maximální virová nálož CMV – TG 7,5 mg/kg (cp/ml periferní krve)	120	1542,5	4655	13275	874000
Maximální virová nálož CMV – TG 6 mg/kg (cp/ml periferní krve)	165	1120	3140	7990	59800
Doba do zahájení virostatické terapie – TG 7,5 mg/kg (počet dní od HSCT)	15	29	35,5	42	51
Doba do zahájení virostatické terapie – TG 6 mg/kg (počet dní od HSCT)	23	34,5	42	50,5	125
Kumulativní léčba virostatiky – TG 7,5 mg/kg (počet dní podávání virostatik)	1	27	50	62,25	245
Kumulativní léčba virostatiky – TG 6 mg/kg (počet dní podávání virostatik)	14	22	37	62,75	109
Tabulka č. 8: Podání thymoglobulinu v dávkování 7,5mg/kg vs. 6 mg/kg a klinická data					
Den dosažení kompletního dárcovského chimérismu – TG 7,5 mg/kg (den po HSCT)	22	27,75	31	50,5	341
Den dosažení kompletního dárcovského chimérismu – TG 6 mg/kg (den po HSCT)	26	28	34	69,75	246
Den příhojení*: leukocyty > 1x10 <sup>9</sup> /l – TG 7,5 mg/kg (den po HSCT)	9	11	13	16	33
Den příhojení*: leukocyty > 1x10 <sup>9</sup> /l – TG 6 mg/kg (den po HSCT)	8	12	14	19	26

Den přihojení*: Absolutní počet neutrofilů > 0,5x10 <sup>9</sup> /l – TG 7,5 mg/kg (den po HSCT)	10	13	15	20	33
Den přihojení *: Absolutní počet neutrofilů > 0,5x10 <sup>9</sup> /l – TG 6 mg/kg (den po HSCT)	10	13	16	19,5	26
Den přihojení *: trombocyty > 20x10 <sup>9</sup> /l – TG 7,5 mg/kg (den po HSCT)	12	14,75	16,5	20	27
Den přihojení *: trombocyty > 20x10 <sup>9</sup> /l – TG 6 mg/kg (den po HSCT)	12	15	16	20	62

\* Definováno podle European Group for Blood and Marrow Transplantation [114]



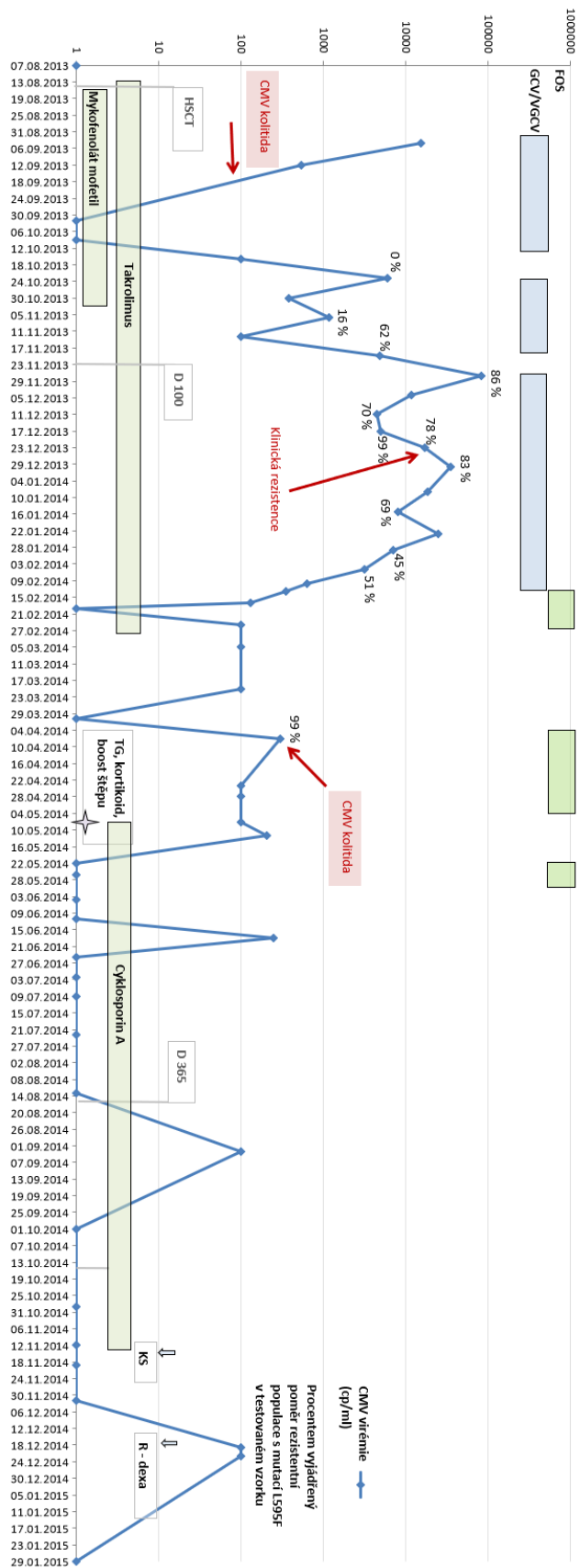
**Tabulka č. 14: Kvartily hodnot uvedených v textu části 4.**

	<b>Minimu m</b>	<b>Dolní kvarti l</b>	<b>Mediá n</b>	<b>Horní kvartil</b>	<b>Maximu m</b>
<b>4.1 CMV reaktivace/primoinfekce a její léčba</b>					
Maximální hodnoty CMV DNAémie během 1. roku po HSCT u skupiny D <sup>-</sup> /R <sup>+</sup> (cp/ml)	325	2 582,5	4 770	11 772,5	1 130 000
Maximální hodnoty CMV DNAémie během 1. roku po HSCT u skupiny D <sup>+</sup> /R <sup>+</sup> (cp/ml)	110	309	1 615	6 080	874 000
Maximální hodnoty CMV DNAémie během 1. roku po HSCT u skupiny D <sup>+</sup> /R <sup>-</sup> (cp/ml)	325	767,5	1 032,5	1 700	3 350
Věk pacientů v době HSCT, kteří měli CMV reaktivaci/primoinfekci během 1. roku po HSCT (roky)	22	37,75	51,5	61	72
Věk pacientů v době HSCT, u kterých nebyla CMV primoinfekce/reaktivace prokázána během 1. roku po HSCT (roky)	33	53	59	62,25	69
Karnofského skóre pacientů v době HSCT, kteří měli CMV reaktivaci/primoinfekci během 1. roku po HSCT (%)	40	70	80	90	100
Karnofského skóre pacientů v době HSCT, u kterých nebyla CMV primoinfekce/reaktivace prokázána během 1. roku po HSCT (%)	40	60	75	90	100
Karnofského skóre pacientů transplantovaných v kompletní remisi základního onemocnění v době HSCT (%)	50	70	80	90	100
Karnofského skóre pacientů, u kterých nebylo dosaženo kompletní remise základního onemocnění v době HSCT (%)	20	57,5	70	90	100
Karnofského skóre pacientů transplantovaných myeloablativním přípravým režimem (%)	40	80	90	90	100

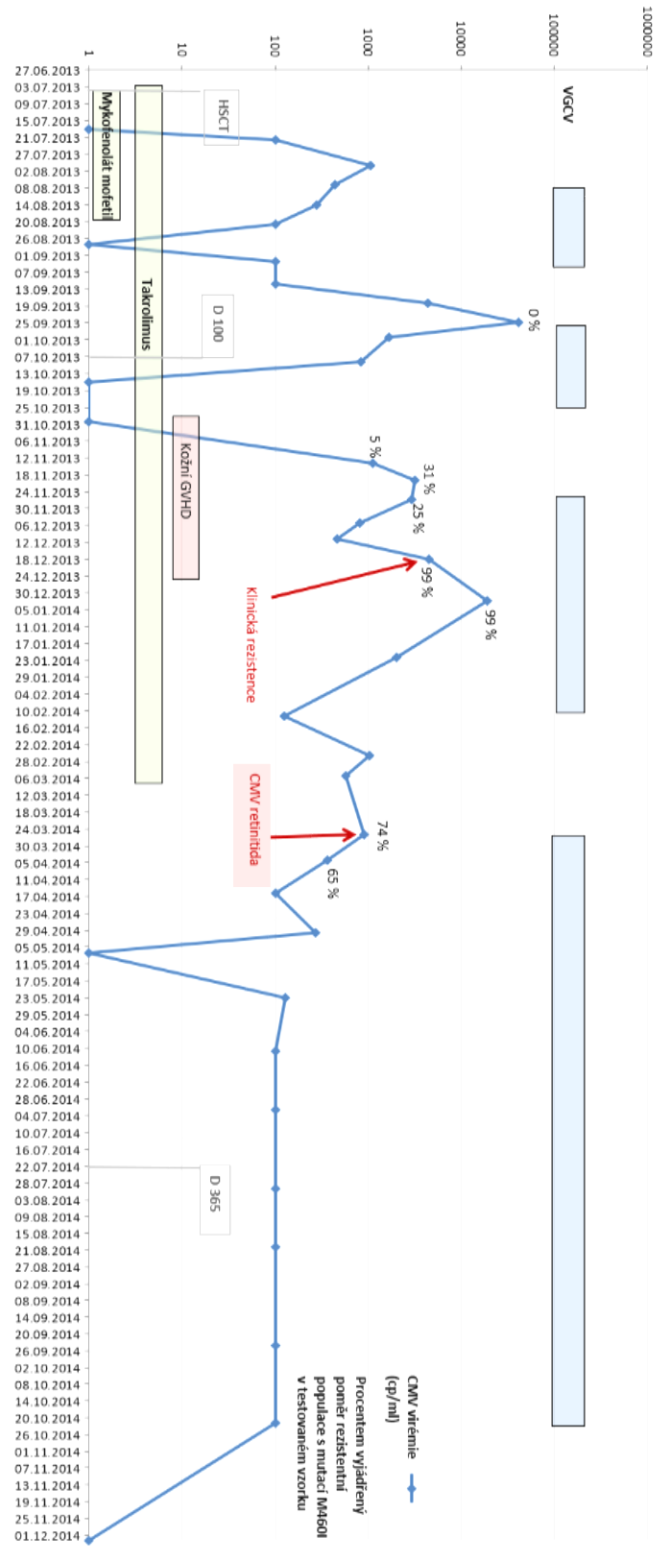
Karnofského skóre pacientů transplantovaných přípravným režimem s redukovanou intenzitou (%)	20	60	70	85	100
Maximální hodnoty CMV DNAémie během 1. roku po HSCT u pacientů, u kterých se vyvinula CMV nemoc (cp/ml)	110	930	3 280	6 750	1 130 000
Maximální hodnoty CMV DNAémie během 1. roku po HSCT u pacientů, bez CMV nemoci (cp/ml)	2 490	3 760	12 400	51 600	874 000
4.4 Klinická a virová rezistence na ganciclovir					
Kumulativní doba léčby u pacientů s klinickou rezistencí (počet dní)	39	66,5	97	155,5	245
Kumulativní doba léčby u pacientů citlivých k léčbě (počet dní)	1	22	39	63	142
Maximální kvantita CMV v periferní krvi u pacientů s klinickou rezistencí (cp/ml)	7 660	27 400	41 500	478 100	1 130 000
Maximální kvantita CMV v periferní krvi u pacientů citlivých k léčbě (cp/ml)	252	1 810	1 460	7 990	148 000
CMV DNAémie v době převodu z úvodní na udržovací léčbu u pacientů s klinickou rezistencí (cp/ml)	700	852,5	1 305	2 605	178 000
CMV DNAémie v době převodu z úvodní na udržovací léčbu u pacientů citlivých k léčbě (cp/ml)	130	251,25	437	1 068,75	5 690
Doba do 1. CMV detekce u pacientů s klinickou rezistencí k léčbě (počet dní od HSCT)	15	19	27	29	47
Doba do 1. CMV detekce u pacientů citlivých k léčbě (počet dní od HSCT)	1	22	34	41	295

Doba do zahájení virostatické terapie u pacientů s klinickou rezistencí (počet dní od HSCT)	19	25	31	41	48
Doba do zahájení virostatické terapie u pacientů citlivých k léčbě (počet dní od HSCT)	15	34,5	42	50	329
Počáteční CMV nálož u pacientů s klinickou rezistencí (cp/ml periferní krve)	225	515	1 070	5 260	15 200
Počáteční CMV nálož u pacientů citlivých k léčbě (cp/ml periferní krve)	105	222,5	455	1 090	7 530

**Graf. č. 5. Vývoj CMV virémie u pacienta č. 1 s prokázanou virovou mutací L595F vedoucí k rezistenci na VGCV**



**Graf č. 6. Vývoj CMV virémie u pacienta č. 2 s prokázanou virovou mutací M460I vedoucí k rezistenci na VGCV**



**Graf. č.7. Vývoj CMV virémie u pacienta č. 3 s prokázanou virovou mutací A594V vedoucí k rezistenci na VGCV**

