

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Hradci Králové

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

Eva Vejražková

Autoreferát disertační práce
Doktorský studijní program: Vnitřní nemoci

Hradec Králové

2019

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu Vnitřní nemoci na Katedře interních oborů Lékařské fakulty v Hradci Králové.

Autor: MUDr. Eva Vejražková, IV. interní hematologická klinika, LF HK a FN HK

Školitel: doc. MUDr. Pavel Žák Ph.D., IV. interní hematologická klinika, LF HK a FN HK

Školitel konzultant: MUDr. Petr Hubáček, Ph.D., Ústav lékařské mikrobiologie a Klinika dětské hematologie a onkologie, UK, 2. LF a FN Motol

Oponenti:

Obhajoba se bude konat před Komisí pro obhajoby OR dne
..... v od hod.

Tato práce vznikla za podpory grantu IGA MZ ČR (NT 13691-4/2012).

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy, Šimkova 870, 500 03 Hradec Králové (tel. 495 816 134).

prof. MUDr. Jan Bureš, CSc.

Předseda komise pro obhajoby disertačních prací
v doktorském studijním programu Vnitřní nemoci
Garant studijního programu

1. Souhrn	4
2. Summary	5
3. Úvod do problematiky.....	6
4. Cíle disertační práce.....	10
5. Soubor nemocných, metodika, statistická analýza a metodika	11
5.1.1 Podskupina pacientů v přípravném transplantačním režimu fludarabin/ busulfan/thymoglobulin s dávkováním thymoglobulinu 7,5 vs. 6 mg/kg	11
5.2 Detekce CMV infekce a sekvenční analýza	11
3.4 Schéma léčby CMV	12
3.5 Statistická analýza	12
6. Vlastní výsledky	14
6.1 CMV reaktivace/primoinfekce a její léčba.....	14
6.2 Podání thymoglobulinu 7,5 vs. 6 mg/kg v rámci přípravného režimu fludarabin/busulfan/thymoglobulin	18
6.3 Klinická a virová rezistence na ganciclovir.....	20
6.4 Sekvenční analýza CMV DNA u pacientů s prokázanou virovou rezistencí podle Sangerovy metody a NGS	23
7. Diskuse.....	25
7.1 CMV reaktivace/primoinfekce po HSCT	25
7.2 Podání thymoglobulinu 7,5 vs. 6 mg/kg v rámci přípravného režimu fludarabin/busulfan/thymoglobulin	26
7.3 Klinická a virová rezistence na ganciclovir.....	26
7.4 Sekvenční analýza metodou podle Sangera a NGS	28
8. Závěry.....	28
9. Použitá literatura.....	30
10. Přehled publikační činnosti autora	42

1. Souhrn

Úvod: Preemptivní antivirová specifická terapie snížila mortalitu i morbiditu spojenou s infekcí lidským cytomegalovirem (CMV) u pacientů po transplantaci hematopoetických buněk (HSCT). Nicméně i přes preemptivní terapii dochází ke vzplanutí CMV nemoci stejně jako k nárůstu pozdní CMV nemoci i vzniku virové rezistence. Vznik rezistence na podávaná virostatika je stále relativně málo prozkoumanou komplikací léčby CMV u pacientů po HSCT.

Cílem práce bylo stanovit četnost výskytu CMV primoinfekce/reaktivace během 1. roku po HSCT u pacientů ve Fakultní nemocnici Hradec Králové (FNHK). Byl analyzován vliv nižšího dávkování králičího antithymocytárního globulinu použitého v rámci transplantačního přípravného režimu na výskyt CMV infekce, reakce štěpu proti hostiteli (GVHD), relapsu základního onemocnění a vliv na mortalitu po HSCT. Cílem práce bylo dále stanovit incidenci klinické i genotypové rezistence viru na podávaná virostatika v podmínkách FNHK a byl hledán vztah mezi klinickou rezistencí CMV (selháním léčby) a virovou rezistencí podmíněnou genotypicky. U pacientů s prokázanou virovou rezistencí byly porovnány metody sekvenční analýzy podle Sanger a se Sekvenováním nové generace (NGS).

Soubor nemocných a metodika: Do prospektivního sledování bylo zařazeno 101 pacientů (47 žen a 54 mužů) IV. interní hematologické kliniky FNHK, u kterých byla provedena v časovém rozmezí od 06/2012 do 12/2014 alogenní HSCT. CMV DNAémie byla monitorována pomocí kvantitativní real-time PCR, průkaz CMV ve tkáni byl prováděn metodou imunohistochemie. Sekvenční analýza genů UL97 a UL54 byla prováděna 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. Byla provedena sekvenční analýza genů UL97 a UL54, získané sekvence byly srovnávány s referenčním kmenem a následně porovnány s databází literárně popsanych mutací. Při průkazu virové rezistence bylo prováděno porovnání metodiky podle Sanger a NGS.

Výsledky: Incidence CMV reaktivace/primoinfekce v našem souboru byla 69 %. Snížení dávkování thymoglobulinu z 7,5 mg/kg na 6 mg/kg v rámci transplantačního přípravného režimu fludarabin/busulfan/thymoglobulin nemělo signifikantní vliv na CMV infekci. Také nevedlo k vyšší incidenci GVHD ani k vyššímu riziku relapsu či mortalitě v prvním potransplantačním roce. Incidence klinické rezistence CMV byla 7 % (odpovídá 12 % pacientů s anti-CMV léčbou) a incidence virové rezistence byla 3 % (5 % léčených pacientů). Tři případy klinické rezistence byly podmíněny mutací CMV ve virové thymidinové kináze UL97 (L595F, M460I, A594V). U pacientů s prokázanou virovou rezistencí byla mutace prokázána pomocí NGS metody o maximálně jeden odběr dříve oproti standardní sekvenaci dle Sanger.

Závěr: Mírná redukce dávek thymoglobulinu v rámci transplantačního přípravného nevedla k vyšší incidenci GVHD ani neovlivnila riziko relapsu či celkovou mortalitu v prvním potransplantačním roce a je tedy cestou ke snížení toxicity léčby při zachování její účinnosti.

Pacienti s prolongovaným podáváním virostatik a s vysokou virovou náloží by měli být pečlivě monitorováni a při diagnóze klinické rezistence by měla 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. Nicméně, 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.

2. Summary

Human Cytomegalovirus Infection in Patients after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation

Introduction: Specific anti-cytomegalovirus (CMV) treatment reduces CMV-related morbidity and mortality in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) but carries a risk of viral resistance. The viral resistance after HSCT treatment is still a relatively unexplored phenomenon.

The aim of the study was to determine the incidence of CMV infection in patients within one year after HSCT in our centre. The goal was also to analyse CMV infection data, incidence of graft-versus-host disease and other clinical endpoints by comparing two patients' cohorts that were administered two different Thymoglobuline Genzyme (TG) doses as part of the HSCT conditioning regimen. Incidence of treatment failure cases and viral CMV drug resistance were also to be determined. Two methods of sequence analysis (Sanger and Next-Generation Sequencing, NGS) were compared in cases of proven viral resistance.

Patients cohort and methods: The study included 101 adult patients after allogeneic HSCT for haematological diseases treated between July 2012 and December 2014 at the Hradec Kralove University Hospital, Czech Republic. CMV DNAemia was determined by quantitative real-time PCR, the diagnosis of CMV disease was confirmed by immunohistochemistry. UL97 and UL54 gene analysis were performed retrospectively in cases of treatment failure diagnoses (defined as the viral load increase $> 1 \log_{10}$ after at least 2 weeks of antiviral therapy). The results were compared with reference CMV strain and compared to previously published polymorphism and mutation data. Both Sanger and NGS sequence analyses were performed in cases of proven viral resistance.

Results: Incidence of CMV primoinfection/reactivation was 69%. Mild Thymoglobuline dose reduction from 7,5 mg/kg to 6 mg/kg as a part of the fludarabine/busulfan/TG conditioning regimen did not significantly influence CMV infection data. No impact of TG dose reduction on incidence of graft-versus-host-disease, relapse of underlying disease or mortality within first year after transplantation were observed. Treatment failure was observed in 7% of patients (i.e. 12% of patients treated by antiviral therapy), viral resistance was proven in 3% (5% of patients with anti-CMV therapy). Three cases of treatment failure diagnoses were caused by CMV UL97 mutation coding resistance (L595F, M460I, A594V). For patients with proven resistance, the mutation was confirmed by NGS up to one week prior to the standard sequencing using the Sanger method.

Conclusions: The mild ATG dose reduction in the fludarabine/busulfan/TG conditioning regimen had no impact on incidence of graft-versus-host-disease, relapse of underlying disease, or mortality within first year after transplantation. Therefore, such reduction can allow for lower toxicity of conditioning regimen, while keeping the performance.

Patients with prolonged antiviral therapy and high viral load should be monitored closely, testing of viral susceptibility should be performed when the response to antiviral therapy is not satisfactory. A portion of such treatment failure cases can be linked to viral resistant mutations.

Thanks to increased sensitivity, the NGS analysis can prove mutated gene in smaller ratios than Sanger and can also provide quantitative measures. However, Sanger is more viable in clinical praxis due to higher workload requirements for NGS.

3. Úvod do problematiky

První popis buňky infikované lidským cytomegalovirem (CMV) přinesl již v 80. letech 19. století německý profesor patologie Hugo Ribbert [1]. 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, 2]. Jako druhý v Evropě v r. 1966 izoloval tento virus na buněčné kultuře lidských embryonálních fibroblastů MUDr. Jirí Horáček s kolektivem ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové (FNHK) [2]. 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.

Lidský cytomegalovirus (nebo též lidský herpesvirus 5, HHV-5) je DNA virus řazený do čeledi *Herpesviridae*, podčeledi *Betaherpesvirinae* [3, 4]. CMV patří mezi nejrozšířenější lidské viry se séroprevalencí 40 až 100 % v dospělém věku v závislosti na geografické a socioekonomické situaci [5–8]. Incidence CMV infekce je po transplantaci krvetvorných kmenových buněk (HSCT) ovlivněna především 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 % [9].

Pro CMV je charakteristický široký buněčný tropismus, je schopen infikovat v podstatě jakýkoliv typ lidské buňky [10, 11]. 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 [10]. 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 [5]. Primoinfekce je u imunokompetentního jedince zpravidla asymptomatická [12]. Pokud se manifestuje, pak nejčastěji pod obrazem syndromu infekční mononukleózy [12]. Infekce CMV je hlavním etiologickým agens intrauterinních infekcí [12–14], v nejtěžších případech manifestovaným mj. těžkým neurologickým postižením až úmrtím plodu [15, 16]. Závažné projevy CMV nemoci jsou spojeny s imunokompromitovanými pacienty, včetně nemocných po HSCT [9]. Před zavedením virostatické terapie byla infekce CMV jednou z hlavních příčin úmrtí transplantovaných pacientů [17–22]. Nicméně u pacientů po HSCT, u kterých se vyvine CMV pneumonie, je mortalita stále vysoká [19]. 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. [23–26]. 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 [9, 27–30].

Laboratorní diagnostika se u imunokompetentních pacientů opírá o nepřímý průkaz infekce, a to o sérologické vyšetření. Mimo stanovení sérostatusu CMV (CMV IgG) před HSCT se u hematologických pacientů vzhledem k imunosupresi a omezené schopnosti tvořit protilátky standardně používají metody přímého průkazu CMV. V současné době je základní metodou průkazu probíhající CMV infekce u těchto pacientů metoda real-time PCR (PCR v reálném čase). Ta detekuje CMV DNA a umožňuje stanovit virovou nálož v krvi či jiných tělních tekutinách, nebo prokázat CMV DNA v tkáních [27, 31]. 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. 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 [26, 27].

CMV profylaxe a léčba

S dostupností profylaktické a preemptivní léčby virostatiky se mortalita i morbidita spojená s CMV infekcí snížila [19, 23]. Profylaktické podávání běžně dostupného valgancicloviru/gancicloviru všem pacientům v prvních měsících po HSCT se vzhledem k myelotoxicitě a vyššímu riziku rozvoje virové rezistence nepoužívá [32, 33]. Na základě velké retrospektivní studie Green *et al.* [34] 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 [35]. Preemptivní terapie znamená včasné podání specifické léčby u rizikových pacientů s dokumentovanou CMV replikací, ještě před klinickými projevy infektu [35]. Preemptivní terapie se opírá především o citlivé PCR metody a v současnosti je standardním přístupem k prevenci CMV nemoci u pacientů po HSCT. Nicméně i přes preemptivní terapii dochází ke vzplanutí CMV nemoci stejně jako k nárůstu pozdní CMV nemoci i virové rezistence [19, 36].

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) [9, 17, 31]. V první linii léčby je nejčastěji používán GCV [9, 19, 31, 37], pro profylaktickou a preemptivní terapii pak stále více VGCV [19, 38, 39]. FOS a CID jsou vzhledem k toxicitě léčby zpravidla léky druhé volby [9, 19]. Všechny tři léky působí jako inhibitory virové DNA polymerázy (kódované genem UL54) [9, 17, 31]. GCV musí být ke svému účinku 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 [9, 40]. Foscarnet je naopak přímý inhibitor virové polymerázy působící jako pyrofosfátový analog [9].

Letermovir je nový lék, který je u séropozitivních pacientů schválený k profylaxi reaktivace a rozvoji CMV nemoci v časném potransplantačním období [35, 41]. 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 zrání virionu [41, 42]. Výzkum probíhá i v oblasti vývoje očkovací látky [43, 44], v rámci pasivní imunoterapie je vyvíjena monoklonální protilátka proti CMV [43]. V experimentech a klinických studiích je již delší dobu testován adoptivní transfer CMV specifických T lymfocytů [43–45].

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 [17, 46, 47].

V roce 2017 byl uveřejněn návrh definice klinické rezistence podle doporučení pracovní skupiny ECIL – The European Conference on Infections in Leukemia [48]. 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 jejich projevů i přes řádně vedenou specifickou virostatickou léčbu trvající alespoň 2 týdny.

Pro definování skutečné virové rezistence je nezbytná přesná charakteristika virového kmene, která vychází 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 [9, 17]. 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. Tyto metody zůstávají zásadní pro verifikaci a určení míry rezistence u nově popsaných mutací virového genomu, které jsou testovány pomocí rekombinantních virů [9, 17, 31, 49, 50]. Genotypová rezistence je prokázána molekulárně-biologickými metodami, tj. průkazem mutace, dříve literárně dokumentované. Testování rezistence metodou sekvenační analýzy je nyní metodou první volby [17]. Vzhledem k dostupným lékům a mechanismu jejich působení jsou testovány oblasti virového genu UL97 a UL54 [17, 31]. 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 % [31]. Pro rychlou detekci a screening mutací lze použít metody se štěpením PCR produktů restrikčními enzymy, analýzu polymorfismu délky restrikčních fragmentů, případně specifickou PCR s primery a sondami navrženými přímo pro detekci určité mutace [31, 51]. 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 [52].

Rezistence viru na GCV je v 85 až 95 % způsobena mutací v genu UL97, která alteruje terciární strukturu vazebného místa léku [53], což způsobuje nižší hladinu monofosforylovaného GCV. To následně vede k nižší hladině GCV-trifosfátu, který inhibuje virovou DNA polymerázu [9, 17, 31]. 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 [9, 54]. 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 [36]. Na buněčných kulturách byly prokázány kmeny viru s mutacemi v oblasti UL56 vedoucí ke snížené citlivosti k letermoviru [41].

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 [31, 36, 51, 53]. Rizikové faktory vzniku rezistence viru nejsou u pacientů po HSCT stále zcela objasněné [46]; nejčastěji jsou jmenovány dlouhotrvající expozice léku [17, 20, 21, 38, 54], vysoká virová nálož [20, 54] a suboptimální hladiny léku [20, 21]. V jednotlivých studiích bývají také uvedeny vysoké dávky virostatik a výrazná imunoprese pacienta [21, 31, 54], haploidentická HSCT

[36], opakované epizody CMV replikace v průběhu virostatické léčby a negativní CMV sérostatus dárce se séropozitivním příjemcem štěpu (D^-/R^+) [21]. Tyto situace mohou přímo vést k nedostatečně kontrolované replikaci viru během virostatické léčby [9, 31, 36].

4. Cíle disertační 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 sekvenační 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 Sangera.

5. Soubor nemocných, metodika, statistická analýza a metodika

Získávání dat a vzorků bylo provedeno jednak 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), jednak retrospektivně (sekvenční analýza kmenů CMV u pacientů suspektně rezistentních k léčbě a měření plazmatických hladin GCV u pacientů léčených VGCV/GCV).

5.1 Soubor nemocných

Do sledování bylo zařazeno 101 pacientů (47 žen a 54 mužů) IV. interní hematologické kliniky FNHK, u kterých byla provedena v časovém rozmezí od 06/2012 do 12/2014 alogenní HSCT. U tří z nich byla indikována 2. HSCT pro odhojení štěpu a relaps nemoci. Doba sledování byla alespoň 1 rok po HSCT při nekomplikovaném průběhu, pro pacienty s opakovanými reaktivacemi CMV a pro pacienty s klinickou rezistencí pak alespoň 2 roky. Věkový medián pacientů byl 55 let. Nejčastější malignita v souboru byla akutní myeloidní leukémie (44 % pacientů) a akutní lymfoblastická leukémie (17 %).

U 79 % transplantací byl použit přípravný režim kombinující fludarabin a busulfan, buď s podáním thymoglobulinu, či bez něho. Dárce byl v 19 % případů HLA identický sourozenec, v 55 % případů nepříbuzný plně shodný dárce v HLA systému a v 26 % nepříbuzný neshodný dárce (9/10 nebo 8/10). Imunosupresivní léčba byla podávána v kombinaci takrolimus a mykofenolát mofetil podle institucionální praxe (popsáno jinde [55]).

U všech pacientů po HSCT byla podávána profylaxe podle institucionální praxe; trimetoprimem/sulfametoxazol, aciklovir a flukonazol. Délka profylaxe byla upravována podle přítomnosti reakce štěpu proti hostiteli (GVHD) a při imunosupresivní terapii.

Při průkazu GVHD (definováno jinde [56]) byla zahájena léčba methylprednisolonem. U kortikorezistentních forem nemoci byla zahájena léčba druhé linie: podání nízkodávkovaného metotrexátu, cyklosporin A, sirolimus, fotoforézy.

5.1.1 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 v kombinaci s busulfanem [57]. 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 [58, 59]. Obě kohorty pacientů se v žádném sledovaném parametru se od sebe nelišily ($p = 0,12 - 1$).

5.2 Detekce CMV infekce a sekvenční analýza

Pro účely této práce byl průkaz CMV DNAémie pomocí PCR, nebo průkaz CMV nemoci uvažován jako „CMV infekt“ 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. Definice CMV nemoci jsou přehledně uvedeny v práci Ljungmana z r. 2002 [26].

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 plné nesrážlivé periferní krve, 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. 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. 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).

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.

Sekvenační analýza genů UL97 a UL54 byla provedena u všech pacientů suspektně rezistentních k léčbě. Za klinickou rezistencí byl považován stav, kdy po minimálně 2 týdnech řádně vedené antivirové terapie došlo k nárůstu CMV nálože alespoň o jeden řád [48]. 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 pomocí Sequencer Applied Biosystems 3130/3130x (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA, [60]). Získané sekvence byly srovnávány s referenčním kmenem CMV AD 169, GenBank č. FJ527563.1 a následně porovnány s databází literárně popsanych mutací [17]. Při průkazu virové rezistence 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).

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. Léčba FOS byla preferována při závažnější formě cytopenie. Při terapii CMV nemoci byl podán GCV nebo FOS [61].

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)

a programovacího jazyka Python (www.python.org). Datové grafy byly zpracovány pomocí programu Microsoft Excel a programovacího jazyka Python.

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.

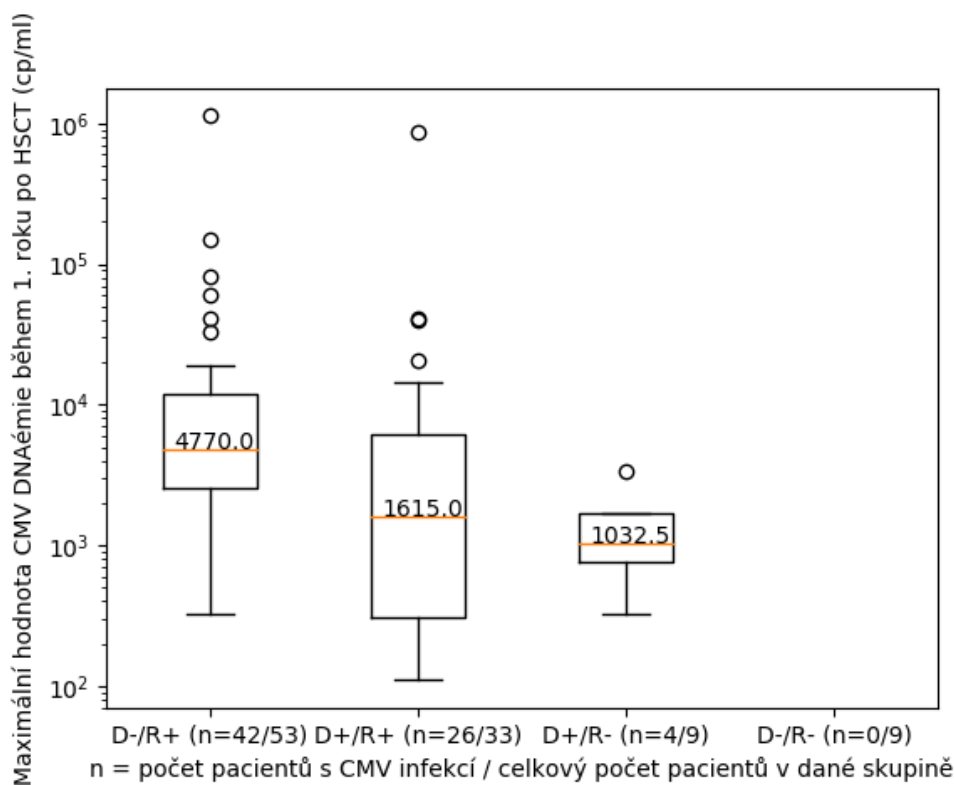
Tato práce byla schválena Etickou komisí FNHK, č.j. 201704 S02P a 201808 S24P.

6. Vlastní výsledky

6.1 CMV reaktivace/primoinfekce a její léčba

DNAémie pomocí PCR byla prokázána u 72 pacientů (69 %) 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 % ($p = 0,03$). 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^+ , $p = 0,02$). 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 (D^-/R^+ , vs. D^+/R^+ a vs. D^+/R^- , $p = 0,02$ obě skupiny), viz graf č. 1. V jednorochní celkové mortalitě (22-34 %) nebyl rozdíl mezi jednotlivými sérostatusy ($p \geq 0,6$).

Graf č. 1: U pacientů s CMV sérostatusem D^-/R^+ byly detekovány nejvyšší hladiny DNAémie po HSCT (mezi skupinou pacientů se sérostatusy D^+/R^+ a D^+/R^- nebyl signifikantní rozdíl, $p = 0,604$)



Pacienti, u nichž byl CMV infekce prokázán, byli oproti pacientům bez CMV mladší (medián 51,5 vs. 59 let, $p = 0,02$) a měli vyšší Karnofského skóre (80 % vs. 75 %, $p = 0,03$). 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 %, $p < 0,01$). Stejně tak pacienti transplantovaní v myeloablativním režimu (90 % Karnofského skóre vs. 70 % Karnofského skóre u pacientů transplantovaných redukováným režimem, $p < 0,01$).

Na základě multivariantské analýzy pro incidenci CMV zůstaly jako nezávislé rizikové faktory Karnofského skóre v době HSCT a CMV sérostatus příjemce/dárce, viz tabulka č. 1.

Tabulka č. 1: Výsledky multivariantské analýzy pro CMV reaktivaci/primoinfekci

Incidence CMV po HSCT
Analyzované nezávislé rizikové faktory: <ul style="list-style-type: none">- věk v době HSCT- Karnofského skóre v době HSCT- stav nemoci – kompletní remise před HSCT dosažena (ano/ne)- typ HSCT (plně shodný nepříbuzenský/neshodný nepříbuzenský/shodný sourozenecký dárce krvetvorných kmenových buněk)- plná HLA shoda dárce/příjemce 10/10 (ano/ne)- intenzita režimu (myeloablativní vs. redukovaný)- CMV sérostatus dárce/příjemce- počet CD34⁺ x 10⁶/kg ve štěpu- přítomnost GVDH (ano/ne)
Multivariantská analýza pro CMV séropozitivitu (tj. pro D⁻/R⁺, D⁺/R⁺, D⁻/R⁻, n = 95), signifikantní výsledky – faktory zvyšující riziko CMV reaktivace/primoinfekce: Karnofského skóre v době HSCT: OR 1,05, 95 % CI 1,01–1,08, p = 0,00063 CMV sérostatus: Séropozitivita příjemce (tj. D ⁻ /R ⁺ , D ⁺ /R ⁺) oproti D ⁺ /R ⁻ : OR 5,93, 95 % CI 1,31–26,92, p = 0,0215 Koeficient determinace R ² použitého modelu: 0,27, procento správné klasifikace 75,8 %.

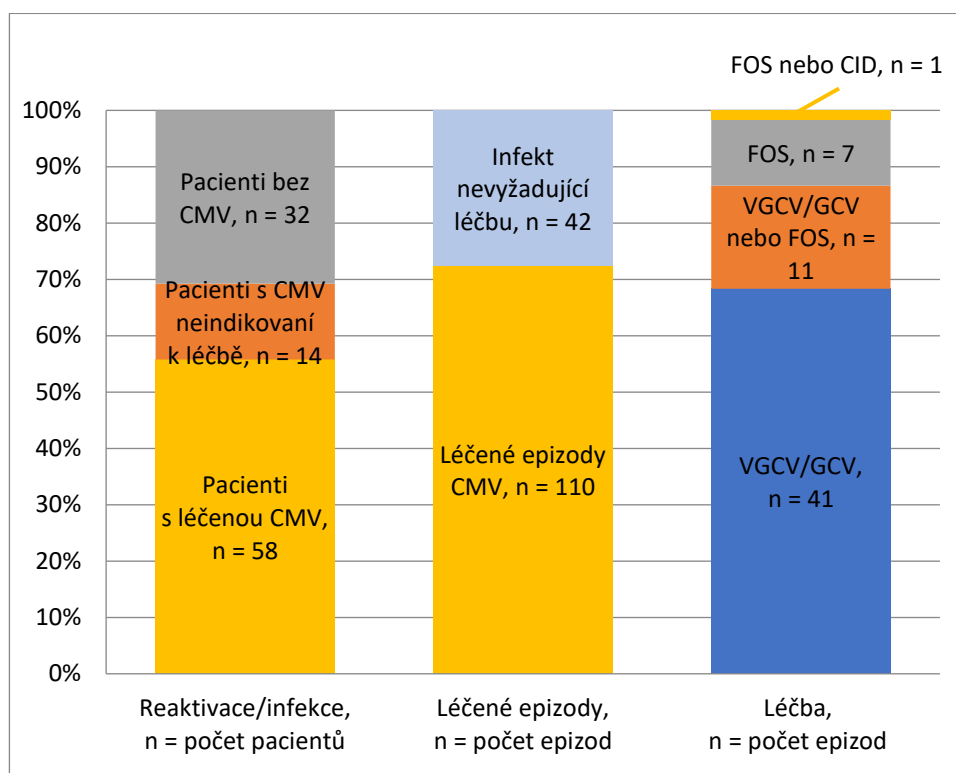
U pacientů transplantovaných v myeloablativním přípravném režimu byla CMV DNAémie prokázána častěji (81 %) než v redukovaném přípravném režimu (62 %), což je na hranici signifikance (p = 0,053). Stejně tak u pacientů transplantovaných v kompletní remisi (CMV DNAémie u 79 %) oproti pacientům, u kterých nebyla kompletní remise před HSCT dosažena (CMV DNAémie u 61 %, p = 0,055).

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⁺ x 10⁶/kg ve štěpu, ani podle přítomnosti GVHD či její systémové kortikoterapie (p ≥ 0,1).

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 = 0,2).

Preemptivní léčba CMV byla zahájena ve 110 epizodách CMV infekce u 58 pacientů, viz graf č. 2.

Graf č. 2: Léčba CMV infektu v prvním roce po HSCT



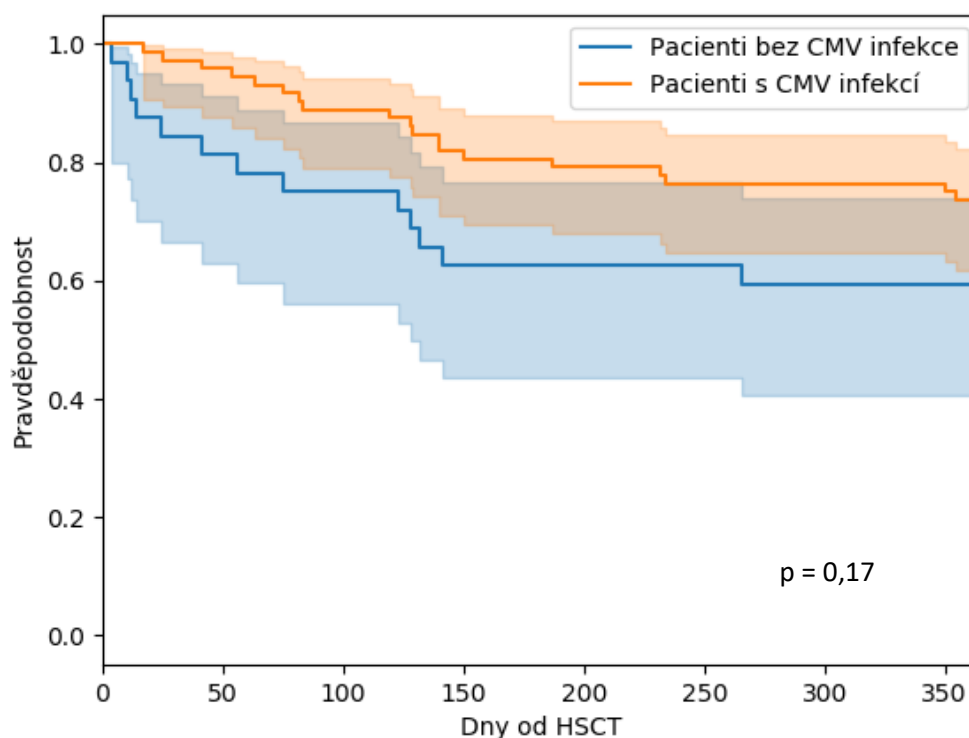
U pacientů transplantovaných v přípravném režimu s redukovanou intenzitou byla antivirová léčba podána častěji (léčba byla podána u 90 % pacientů s CMV infektem) než u pacientů transplantovaných myeloablativním režimem (léčeno 70 % pacientů s reaktivací/primoinfekcí, $p = 0,04$).

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 ($p = 0,6$), ani na případné kvantitě DNAémie v době převodu ($p = 0,1$).

CMV nemoc [26] 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). 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, $p = 0,0198$).

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 ($p = 0,2$), viz graf č. 3. To, zda bylo nutné podat virostatickou terapii či nikoliv (v případě nízkých kvantit CMV), také nemělo vliv na jednorozční celkovou mortalitu ($p = 0,5$). Vliv CMV infektu na jednorozční mortalitu nebyl potvrzen ani multivariantní analýzou logistické regrese, viz tabulka č. 2. V souboru nedošlo k úmrtí v jednoznačné 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. 3 Kaplan–Meierova křivka celkového jednoletého přežití pacientů s/bez CMV primoinfekce/reaktivace



Tabulka č. 2: Výsledky multivariantní analýzy pro celkovou jednoletou mortalitu

Jednoletá celková mortalita
<p>Analyzované nezávislé rizikové faktory:</p> <ul style="list-style-type: none"> - pohlaví pacienta - věk v době HSCT - Karnofského skóre v době HSCT - stav nemoci – kompletní remise před HSCT dosažena (ano/ne) - typ HSCT (plně shodný nepřibuzenský/neshodný nepřibuzenský/shodný sourozenecký dárce krvetvorných kmenových buněk) - plná HLA shoda dárce/příjemce 10/10 (ano/ne) - intenzita režimu (myeloablativní vs. redukovaný přípravný transplantační režim) - CMV sérostatus dárce/příjemce - počet CD34⁺ x 10⁶/kg ve štěpu - přítomnost GVDH (ano/ne) - systémová kortikoterapie pro GVHD (ano/ne) - relaps/progrese (ano/ne) - dosažení kompletního chimérismu (ano/ne) - dosažení přihojení v leukocytech, neutrofilech, trombocytech (ano/ne) (podle [62]) - reaktivace/primoinfekce CMV (ano/ne) - klinická rezistence CMV (ano/ne) - CMV nemoc (ano/ne) - léčba reaktivace/primoinfekce CMV (ano/ne) - přítomnost mutovaného rezistentního kmene CMV (ano/ne) - opakovaná reaktivace CMV (ano/ne) - nutnost opakované léčby CMV reaktivace/primoinfekce (ano/ne)

Multivariantní analýza pro celkovou jednoroční mortalitu (n = 101), signifikantní výsledek – faktory snižující mortalitu:

Karnofského skóre v době HSCT: OR 0,95, 95 % CI 0,92–0,98, p = 0,00091

Dosažení kompletního chimérismu: OR 0,042, 95 % CI 0,012–0,143, p = 0

Koeficient determinace R² použitého modelu: 0,60, procento správné klasifikace 81,2 %.

6.2 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, na hranici statistické významnosti (p = 0,056), viz tabulka č. 3.

Tabulka č. 3: 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, p
Průkaz CMV reaktivace/primoinfekce (% pacientů)	56	73	0,18
Doba do 1. CMV detekce (počet dní od HSCT, medián)	D +28	D +40	0,056
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 [26] (% pacientů)	14,8	5,4	0,23

Nižší dávkování thymoglobulinu nevedlo k vyšší incidenci GVHD ani vyššímu riziku relapsu či mortalitě v prvním potransplantačním roce ($p \geq 0,1$). Nebylo ovlivněno dosažení kompletního dárcovského chimérismu ani engraftment po HSCT ($p \geq 0,3$), blíže tabulka č. 4.

Tabulka č. 4: 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 $> 1 \times 10^9/l$ (den po HSCT, medián)	D +13,5* ²	D +14* ³	0,45
Den příhojení *: Absolutní počet neutrofilů $> 0,5 \times 10^9/l$ (den po HSCT, medián)	D +16* ²	D +16* ³	0,90
Den příhojení *: trombocyty $> 20 \times 10^9/l$ (den po HSCT, medián)	D +16* ⁴	D +16* ³	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 (úmrť z jakékoliv příčiny bez předchozí relapse/progrese onemocnění, %)	26	22	0,17

* Definováno podle European Group for Blood and Marrow Transplantation [62]

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

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

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

6.3 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 sekvenační 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 [63–68]. 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. 5.

Tabulka č. 5: 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 ⁻ /R ⁺	D ⁻ /R ⁺	D ⁻ /R ⁺
Přihojení* ¹ : leukocyty > 1 x 10 ⁹ /l, neutrofily > 0,5 x 10 ⁹ /l, trombocyty > 20 x 10 ⁹ /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* ²	Ano (kožní) akutní, grade 1* ³
Klinický outcome	Zemřel D +504 (příčina: sepse, pneumonie)	Sledování ukončeno 3 roky po HSCT: Karnofského skóre: 100 %	Sledování ukončeno 3 roky po HSCT, Karnofského skóre: 100 %

*¹ Definováno podle European Group for Blood and Marrow Transplantation [62]

*² Jen s mírným postižením (bez významného omezení běžné denní činnosti) [69, 70]

*³ Vakuolární degenerace epidermálních buněk bazální a suprabazální vrstvy (nespecifické pro GVDH) [56]

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. 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, $p = 0,004$) a měli vyšší maximální kvantitu CMV v periferní krvi (medián 41500 vs. 4160 cp/ml, $p \leq 0,01$). Virová nálož v době převodu z úvodní na udržovací léčbu byla také vyšší (medián 1305 vs. 437 cp/ml, $p = 0,02$). 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, $p = 0,1$, 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, $p = 0,073$).

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^-/R^+ 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 $CD34^+/kg$ 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).

6.4 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, blíže viz tabulka č. 6.

Tabulka č. 6: 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 Sagera	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 byla tato mutace prokázána i dle Sangerovy metody, viz tab. č. 7.

Tabulka č. 7: 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 Sangerovy metody	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, viz tabulka č. 8.

Tabulka č. 8: 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 Sangerovy metody	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	---	---

7. Diskuse

7.1 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 [61, 71, 72], 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 [21, 72, 73]. I přes vyšší průkaz CMV reaktivace/primoinfekce byl výskyt CMV nemoci nízký: 7 %, což je ve shodě s literárními údaji (5–25 %) [72, 74, 75]. 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 [28, 72, 76–78]. 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 [19, 28, 61, 72, 78]).

Přestože bylo do souboru zahrnuto 104 HSCT provedených na našem pracovišti během dvou a půl roku, pro multivariální analýzu není tento počet hodnocených pacientů dostatečný (zejména v některých podskupinách) vzhledem k hodnotám koeficientu determinace i procenta správné klasifikace. Presentované výsledky multivariální 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 multivariální 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 univariální 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 [11, 79, 80]. Vysvětlení by mohlo být v častější CMV séropozitivitě dárců rostoucí s jejich věkem (zejména příbuzenských transplantací) [79]. 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.

V literatuře je popsáno, že CMV zvyšuje incidenci GVHD [72, 76, 80]. V našem souboru jsme oproti očekávání nenalezli rozdíl v jednoroční incidenci CMV v závislosti na přítomnosti GVHD. Nicméně obdobný závěr prezentují i jiné práce [77, 78]. Naše výsledky mohlo ovlivnit to, že bylo počítáno pouze s přítomností (nebo nepřítomností) GVHD a jako její tíže byl hodnocen aspekt podání systémové léčby. V literatuře je často hodnocen vliv pouze akutní GVHD nebo GVHD vyššího stupně [80–82].

V současné době 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 [30, 83–85]. To je v rozporu s velkou retrospektivní studií Green *et al.* [34], kde bylo dokumentováno, že jakákoliv CMV virémie zvyšuje riziko celkové mortality. 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 [21] daným imunosupresním vlivem CMV a/nebo virostatickou terapií, spojením CMV infektu a akutní GVHD apod. [86].

V několika studiích bylo popsáno, že ve skupině pacientů s akutní myeloidní leukémií je při CMV reaktivaci/primoinfekci nižší riziko relapsu základního onemocnění [24, 62, 87, 88]. 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 [43, 48, 78, 86]. „Virus vs. leukemia“ efekt zůstává kontroverzní a na našem souboru se vliv CMV na nižší riziko relapsu neprokázal.

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

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, nebo riziko relapsu základního onemocnění [89, 90]. Optimální dávkování není stále jednoznačně určeno [89, 90] 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 [91]. Při vyšším dávkování TG jsme CMV zaznamenali dříve po HSCT (medián 40 vs. 28 dní po HSCT, $p = 0,056$). Při zkušebním dodatečném rozšíření souboru o jednoho následujícího pacienta z ledna 2015 už tento rozdíl vycházel signifikantně (medián 40 vs. 28 dní, $p = 0,043$). Vyšší dávkování ATG vede pravděpodobně k opoždění rekonstituce subpopulací lymfocytů a ovlivňuje i další populace bílé řady [89, 92]. 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 přijetí štěpu, na dosažení plného dárcovského chimérismu, nedošlo k nárůstu GVHD a nebyl rozdíl v přežití pacientů. To je ve shodě s dalšími daty [58, 90, 91, 93]. Tyto výsledky ukazují, že snížení dávkování TG z 7,5 mg/kg na 6 mg/kg v rámci přípravného režimu fludarabin/busulfan/thymoglobulin by mohlo přinést snížení toxicity léčby při zachování její účinnosti. Tento závěr je však třeba ještě ověřit dalším výzkumem.

7.3 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 [23, 32, 33, 36, 53, 94]. 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 [46]. Tato pomalá eliminace viru je patrně způsobena nedostatečnou imunologickou kontrolou virové replikace

při těžké imunosupresi, případně může být způsobena nedostatečnou koncentrací léků v cílových kompartmentech [17, 46].

Námi detekované mutace v kodonech M460I, A594V, L595F byly popsány ve spojení s rezistencí na ganciclovir [63–68]. Publikovaná data popisují mutace v této thymidinové kináze v 90 % ze všech GCV – rezistentních klinických izolátů CMV [9, 95]. 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 zkřížená rezistence bývá popisována méně často [95, 96].

Diagnóza klinické rezistence byla u pacientů s prokázanou virovou mutací stanovena po 90 dnech kumulativní léčby val/ganciclovirem v době 168 dní po HSCT. V literatuře se podle jednotlivých prací uvádí široké rozmezí mediánu léčby 70 – 194 dní [9, 20, 36, 49]. Vzhledem k nízké incidenci virové rezistence se však jedná o značně heterogenní patientské soubory – různé transplantované orgány, různé přípravné režimy, různý druh imunosupresivní léčby a nejednotné léčebné režimy CMV. Pacienti po transplantaci solidních orgánů 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 a po delší kumulativní léčbě virostatiky. 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 prolongovaná 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. U pacientů s klinickou rezistencí byla také častější CMV nemoc a virová nálož v době převodu z úvodní na udržovací léčbu byla také vyšší. To je ve shodě jak s očekáváním, tak i s publikovanými daty [20, 36, 46].

Ačkoliv se rezistentní kmeny objevily pouze u pacientů se sérostatusem D⁻/R⁺, jednoznačný vliv sérostatusu na vznik rezistence nebyl potvrzen, což může být dáno velikostí souboru. Literárně je sérostatus D⁻/R⁺ po HSCT rizikovější stran opakovaných CMV infekcí, virové replikace a jejich léčby, což zvyšuje riziko, že se vyvine virová mutace [36, 97, 98].

V rámci tohoto projektu jsme se zaměřili i na vliv eventuálního suboptimálního dávkování virostatik [9, 17, 94]. 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 oblastí nejčastěji spojených s rezistencí a výsledky analýzy byly srovnány s literárně dokumentovanými mutacemi. Nemuseli jsme tak zachytit vzácné nové mutace vedoucí k nižší senzitivitě CMV vůči virostatiku. 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.

7.4 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.

Emery a Griffiths [99] pomocí matematických modelů prokázali exponenciální nárůst dvou populací viru při prolongovaném podávání GCV. Retrospektivní výsledky testování NGS u všech tří pacientů ukazují takový nárůst a pozdější vysoké zastoupení mutované varianty kmene vůči divokému typu.

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. 5). Tento interval je v předkládané práci dobou, kdy je trvale podávána léčba, při které může mutovaný a rezistentní virus přerůst rychleji se replikující divokou (tj. citlivou) populací 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.

8. 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 reaktive/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 reaktive/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 Sangera.

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 prokázala procentuální zastoupení mutované subpopulace viru a měla 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 deleukotizované transfúzní přípravky 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 dárců a pro CMV IgG pozitivního pacienta CMV IgG pozitivní dárců.

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. sekvenační 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.

9. Použitá literatura

- [1] RILEY, H. D. History of the cytomegalovirus. *Southern Medical Journal*. 1997, **90**(2), 184–190. ISSN 0038-4348.
- [2] HORÁČEK, Jiří. *Cytomegalovirus - jeho výskyt a význam v lidské populaci*. Hradec Králové, 1975. Kandidátská disertační práce. Univerzita Karlova v Praze. Lékařská fakulta. Lékařská mikrobiologie.
- [3] 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.
- [4] 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
- [5] 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
- [6] 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
- [7] 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
- [8] 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
- [9] 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
- [10] STAŇKOVÁ, Marie. Infekce vyvolané cytomegalovirem. In: Jiří BENEŠ. *Infekční lékařství*. Praha: Galen, 2009, s. 184–187. ISBN 978-80-7262-644-1.
- [11] 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
- [12] 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. nedatováno.

- [13] 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.
- [14] 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
- [15] 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
- [16] 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
- [17] 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
- [18] 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.
- [19] 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
- [20] 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
- [21] 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
- [22] VEJRAŽKOVÁ, Eva, Petr HUBÁČEK, Radka KUTOVÁ, Lenka PLÍŠKOVÁ, Milan KOŠŤÁL, 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.

- [23] 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
- [24] 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
- [25] 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
- [26] 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
- [27] 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
- [28] 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
- [29] 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
- [30] 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
- [31] LENGEROVA, Martina, Pavlína VOLFOVÁ a Zdeněk RÁČIL. Laboratorní diagnostika CMV infekce u nemocných s hematologickou malignitou. *Postgrad med.* 2013, **15**(4), 45–50.
- [32] 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
- [33] 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.
- [34] 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
- [35] 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
- [36] 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
- [37] ROZSYPAL, Hanuš. Chemoterapie infekcí vyvolaných cytomegalovirem. *Remedia.* 2002, **12**(5), 339–342.
- [38] 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
- [39] SEDLÁČEK, Petr, Michal KOUBA, Petr HUBÁČEK, Ester MEJSTŘÍKOVÁ, Martina LENGEROVA, Mariana HRIČINOVÁ, Jan HABER, Júlia HORÁKOVÁ, Pavel ŽÁK, Melanie CERMANOVÁ, Alžběta ZAVŘELOVÁ, Petr CETKOVSKÝ, Luboš

- 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.
- [40] 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
- [41] 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
- [42] 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/NEJMoal706640
- [43] 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
- [44] 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
- [45] KOUBA, Michal a Petr HUBÁČEK. Léčba a profylaxe CMV infekce/reaktivace. *Postgrad med*. 2013, **15**(4), 51–55. ISSN 1212-4184.
- [46] 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
- [47] 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

- [48] 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>
- [49] 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. TAEGE, 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
- [50] 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
- [51] 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
- [52] 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
- [53] 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.
- [54] 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>
- [55] PERKINS, Janelle, Teresa FIELD, Jongphil KIM, Mohamed A. KHARFAN-DABAHA, 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

- [56] STANFORD UNIVERZITY SCHOOL OF MEDICINE. *Grading Staging Report - Acute GVHD of the Skin - Surgical Pathology Criteria* [online]. California: Stanford Univerzity School of Medicine, nedatováno [vid. 2018-02-03]. Dostupné z: <http://surgpathcriteria.stanford.edu/transplant/skinacutegvhd/grading.html>
- [57] VEJRAŽKOVÁ, Eva, Petr HUBÁČEK, Lenka PLÍSKOVA, 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 allogenic 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.
- [58] MEIJER, Ellen, Jan J. CORNELISSEN, Bob LÖWENBERG a Leo F. VERDONCK. Antithymocyteglobulin 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.
- [59] 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
- [60] 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
- [61] 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>
- [62] 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>
- [63] 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.
- [64] 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.

- [65] 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.
- [66] 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.
- [67] 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.
- [68] 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.
- [69] 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
- [70] 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.
- [71] 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
- [72] 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
- [73] 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
- [74] 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
- [75] 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>
- [76] 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
- [77] 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
- [78] TEIRA, Pierre, Minoo 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
- [79] 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

- [80] 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
- [81] 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
- [82] ROWE JULIE, GRIM SHELLEE 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
- [83] 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.
- [84] 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
- [85] 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
- [86] SCHMIDT-HIEBER, Martin, Myriam LABOPIN, Dietrich BEELEN, Liisa VOLIN, Gerhard EHNINGER, Jürgen FINKE, Gerard SOCIÉ, Rainer SCHWERDTFEGER, 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
- [87] 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

- [88] 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
- [89] 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
- [90] 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
- [91] 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
- [92] 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
- [93] 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
- [94] LENGEROVÁ, Martina, Pavlina VOLFOVA a Zdeněk RÁČIL. Laboratorní diagnostika CMV infekce u nemocných s hematologickou malignitou. *Postgrad med.* 2013, **15**(4), 45–50.
- [95] 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
- [96] 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
- [97] 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
- [98] 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
- [99] 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.

10. Přehled publikační činnosti autora

a) původní vědecké práce v impaktovaném časopise

VEJRAŽKOVÁ, Eva, Lenka PLISKOVÁ, Petr HUBACEK, Milan KOSTAL, Alzbeta ZAVRELOVÁ, Jakub RADOCHA, Radka KUTOVA, Vlasta STEPANOVA, Pavel ZAK. Clinical and genotypic CMV drug resistance in HSCT recipients: a single center epidemiological and clinical data. *Bone Marrow Transplantation*, 2019, **54**(1): 146-149. IF=4.497

VEJRAŽKOVÁ, Eva, Petr HUBÁČEK, Radka KUTOVÁ, Lenka PLÍŠKOVÁ, Milan KOŠŤÁL, Vlasta ŠTĚPÁNOVÁ, Alžběta ZAVŘELOVÁ, Jakub RADOCHA, Eva MALÁ, Pavel ŽÁK. Klinická rezistence lidského cytomegaloviru při léčbě gancyklovirem u pacientů po alogenní transplantaci hematopoetických buněk - zkušenosti jednoho centra. *Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie*, 2015, **64**(3), 160-168. ISSN 1210-7913. IF=0.373

VEJRAŽKOVÁ, Eva, Petr HUBÁČEK, Lenka PLÍŠKOVÁ, Milan KOŠŤÁL, Alžběta ZAVŘELOVÁ, Vlasta ŠTĚPÁNOVÁ, 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 allogenic haematopoietic stem cell transplantation. *Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie*, 2019, **67**(2), přijato, v tisku. IF=0.373

ZAK, Pavel a **VEJRAŽKOVA, Eva**, Alzbeta ZAVRELOVA, Lenka PLISKOVA, Lenka RYSKOVA, Petr HUBACEK, Vlasta STEPANOVA, Milan KOSTAL, Vladimír KOBLIZEK, Pavla PATEROVA, Jakub RADOCHA. BAL Fluid Analysis in the Identification of Infectious Agents in Patients with Hematological Malignancies and Pulmonary Infiltrates. *Folia Microbiologica*, 2019, přijato, v tisku. IF=1.311

ZAVRELOVA, Alzbeta, Jakub RADOCHA, Lenka PLISKOVA, Pavla PATEROVA, **Eva VEJRAŽKOVA**, Jiri CYRANY, Filip GABALEC, Miroslav PODHOLA a Pavel ZAK. Detection of cytomegalovirus DNA in fecal samples in the diagnosis of enterocolitis after allogeneic stem cell transplantation. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* [online]. 2018, **162**(3), 227–231. ISSN 1213-8118. Dostupné z: doi:10.5507/bp.2018.023 IF = 1.087

ŠTĚPÁNOVÁ, Vlasta, Lenka PLÍŠKOVÁ, Michaela KUBIŠOVÁ, **Eva ŠTĚPÁNOVÁ**, Radka BOLEHOVSKÁ, Vanda BOŠŤÍKOVÁ, Michaela SVOBODOVÁ. Využití testů avidity IgG protilátek v diagnostice cytomegalovirové infekce. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*, 2011, **60**(3), 115-120. ISSN 1210-7913. IF=0.373

b) ostatní práce v impaktovaném časopise (především přehledové, metodické, kazuistické)

KOSTAL, Milan, Milan BLAHA, Miriam LANSKA, Marie KOSTALOVA, Vladimír BLAHA, **Eva STEPANOVA**, Jaroslav MALY. Beneficial Effect of Plasma Exchange in the Treatment of Toxic Epidermal Necrolysis: A series of Four Cases. *Journal of Clinical Apheresis*, 2012, **27**(4), 215-220. ISSN 0733-2459. IF= 1.835

c) původní vědecké práce v recenzovaném neimpaktovaném časopise

ZAVŘELOVÁ, Alžběta, Jakub RADOCHA, Melanie CERMANOVA, **Eva ŠTĚPÁNOVÁ**, Pavla Paterová, Pavel ŽÁK. Specifika cílené antibiotické léčby u hematoonkologicky nemocných. *Postgraduální medicína*, 2011, **13**(5), 30-34. ISSN: 1212-4184

RYŠKA, Pavel, Vladimír MAJSNAR, Václav MÁLEK, Tomáš KVASNIČKA, Jiří JANDURA, **Eva ŠTĚPÁNOVÁ**, Jana HRUBEŠOVÁ, Svatopluk ŘEHÁK. Použití perkutánní

vertebroplastiky u pacientů s mnohočetným myelomem - zkušenosti jednoho centra. *Onkologie*, 2011, **5**(3), 155-159. ISSN 1802-4475.

MALÁ, Eva, **Eva VEJRAŽKOVÁ**, Jana BIELMEIEROVÁ, Martin JINDRA, Milan VOŠMIK, Jakub NOVOSAD, Luboš SOBOTKA. Dlouhodobé sledování nutričního, klinického stavu a kvality života u nemocných s rakovinou hlavy a krku. *Klinická onkologie*, 2015, **28**(3), 200-214. ISSN 0862-495X.

MALÁ, Eva, **Eva VEJRAŽKOVÁ**, Milan VOŠMIK, Jakub NOVOSAD, Luboš SOBOTKA. Kvalita života nemocných s rakovinou hlavy a krku ve tříletém sledování nutriční ambulanci. *Otorinolaryngologie a foniatrie*, 2016, **65**(1), 9-16. ISSN 1210-7867.

MALÁ, Eva, **Eva VEJRAŽKOVÁ**, Milan VOŠMIK, Jakub NOVOSAD, Luboš SOBOTKA. Analýza přežití tříletého sledování nemocných s rakovinou hlavy a krku. *Klinická onkologie*, 2016, **29**(1), 39-51. ISSN 0862-495X.

d) ostatní práce v recenzovaném neimpaktovaném časopise

ŠTĚPÁNOVÁ, Eva, Pavel ŽÁK, Vlasta ŠTĚPÁNOVÁ, Pavel RYŠKA. Lidský metapneumovirus. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*, 2010, **16**(4), 124-129. ISSN 1211-264X.

KOSTAL, Milan, Pavel ZAK, **Eva VEJRAŽKOVÁ**, Melanie CERMANOVÁ, Petra BELOHLAVKOVÁ, Alzbeta ZAVRELOVA, Filip VRBACKY, Tomas ROZKOS, Marketa NOVA. Case 2-2012: a 57-year-old woman with post-transplant lymphoproliferative disorder after allogeneic stem cell transplantation for primary myelofibrosis. *Acta Medica (Hradec Králové)*, 2012, **55**(3), 142-145. ISSN 1211-4286.

CERMANOVÁ, Melanie, Naděžda MALLÁTOVÁ, Pavel ŽÁK, Petr SEDLÁČEK, Luboš DRGOŇA, Iva KOČMANOVÁ, Martina LENGEROVÁ, Jakub RADOCHA, Petr CETKOVSKÝ, Jan HABER, Peter MÚDRY, Jaroslav ŠTĚRBA, Barbora ŽIAKOVÁ, **Eva VEJRAŽKOVÁ**, Jiří MAYER, Zdeněk RÁČIL. Diagnostika, léčba a profylaxe pneumocystové pneumonie u hematologických nemocných. Doporučení odborníků s podporou CELL. *Postgraduální medicína*, 2013, **15**(suppl. 4), 38-40. ISSN 1212-4184.

CERMANOVÁ, Melanie, **Eva VEJRAŽKOVÁ**, Pavel ŽÁK. Léčba pneumocystové pneumonie u hematologických nemocných. *Postgraduální medicína*, 2013, **15**(suppl. 4), 28-34. ISSN: 1212-4184.

e) přednášky, plakátová sdělení na odborných setkáních

Přednášky

VEJRAŽKOVÁ, Eva. Interaktivní kazuistika - venózního trombembolismus v graviditě. Regionální hematologický seminář, Mladé Buky 2012

VEJRAŽKOVÁ, Eva, Petr Dulíček. Profylaxe venózního trombembolismu v graviditě. Regionální hematologický seminář, Mladé Buky 2012

ŠTĚPÁNOVÁ, Eva, Pavel ŽÁK, Lenka PLÍŠKOVÁ, Vlasta Štěpánová a Miroslav PODHOLA. Průkaz cytomegalovirové infekce. 12. symposium miniinvazivních metod ve vnitřním lékařství, Hrubá Skála 2011

ŠTĚPÁNOVÁ, Eva. Kazuistika – patologie krevních destiček. Regionální hematologický seminář, Mladé Buky 2010

ŠTĚPÁNOVÁ, Eva, Pavel ŽÁK, Lenka PLÍŠKOVÁ, Radka BOLEHOVSKÁ a Vlasta Štěpánová. Lidský metapneumovirus u pacientů s hematologickým onemocněním. Hradecké virologické dny, 2009

Plakátová sdělení

VEJRAZKOVA, Eva, Vlasta STEPANOVA, Lenka PLISKOVA, Petr HUBACEK Milan KOSTAL, Alžběta ZAVRELOVA, Jakub RADOCHA, Radka KUTOVA, Pavel ZAK. Human Cytomegalovirus ganciclovir treatment failure and UL97 phosphotransferase resistant mutation in adult allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. XVIIIth Annual meeting of the European Society for Clinical Virology, Edinburgh, 9. - 12. 9. 2015

PLISKOVA, Lenka, Radka KUTOVA, Vlasta STEPANOVA, **Eva VEJRAZKOVA.** Sequence analysis (Sanger and NGS) in the detection of 2 mutations of CMV causing the resistance to ganciclovir – Comparison of two methods. XVIIIth Annual meeting of the European Society for Clinical Virology, Edinburgh, 9. - 12. 9. 2015

HUBACEK, Petr, Michal KOUBA, David BOUTOLLEAU, Lenka PLISKOVA, **Eva VEJRAZKOVA,** Petra KESLOVA, Petr SEDLACEK, Petr CETKOVSKY. CMV resistance in patients after allogeneic haematopoietic stem cell Transplantation. 41st Annual Meeting of the European Society for Blood and Marrow Transplantation, Istanbul, 22.-25.3.2015

STEPANOVA, Vlasta, Lenka PLISKOVA, Michaela KUBISOVA, **Eva STEPANOVA,** Radka BOLEHOVSKA, Michaela SVOBODOVA. Evaluation of CMV IgG avidity testing using different methods. XIth Annual meeting of the European Society for Clinical Virology, Madeira, 21. - 24. 9. 2011

BLÁHA, Milan, Vlasta ŠTĚPÁNOVÁ, Pavel ŽÁK, Martin BLAŽEK, Ladislav JEBAVÝ, **Eva ŠTĚPÁNOVÁ,** Pavel MĚŘIČKA Stanislav FILIP, Renata ZIMOVÁ Ilona FÁTOROVÁ, Jaroslav MALÝ. Safety precautions against infections transmission during stem cell transplantation. XXII. Olomoucké hematologické dny, Olomouc, 30.5.2008.