

Univerzita Karlova v Praze

1. Lékařská fakulta

Autoreferát dizertační práce



Název:

**BK-polyomavirová infekce u pacientů po kombinované
transplantaci ledviny a pankreatu**

Autor: MUDr. Martina Mindlová

Datum: 2011

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: 02 – Biologie a patologie buňky

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Milan Elleder, DrSc.

Školící pracoviště: Laboratoř Langerhansových ostrůvků IKEM

Klinika diabetologie IKEM

Vídeňská 1958/9, 140 21 Praha 4

Školitel: Prof. MUDr. František Saudek, DrSc.

Dizertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna

k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Abstrakt

Úvod. Cílem práce bylo zavedení vyšetřovací metody BK virémie, verifikace její přesnosti, zjištění prevalence a rizikových faktorů BKV replikace a analýza průběhu a terapeutických přístupů BKV infekce a BKVN u pacientů po kombinované transplantaci ledviny a pankreatu (SPK) za účelem zavedení systematického skríníngu.

Metody. Výsledky BK virémie stanovené nově zavedenou metodou Affigene® PCR v IKEM a dle PCR protokolu Virologického centra, Basilej byly porovnány. Poté bylo vyšetřeno 183 SPK příjemců ke stanovení prevalence BK virémie, virurie a BKVN a zhodnoceny rizikové faktory replikace BKV. Retrospektivně proběhlo hodnocení výsledků retransplantace po selhání štěpu na podkladě BKVN.

Výsledky. Ze 100 vzorků analyzovaných dle Affigene® BKV tender a Transplantační virologie, Basilej PCR protokolů byla shoda obou metod 95%, $Rho = 0,946$, 95% CI: 0.920 – 0.963, $P < 0,0001$, Bland–Altman plot analýza: bias Basilej PCR protokol/Affigene® BKV tender: -0,1 (průměr) [± 1.96 SD: -1,6 – 1,3] pro obě metody. Point prevalence byla analyzována u 183 pacientů; Virurie detekována u 17,3 %, virémie u 3.8% pacientů. Pozitivní virurie $>10^7$ kopií/mL zjištěna u 3,7% pacientů, pozitivní virémie $>10^4$ u 1,6% pacientů současně s pozitivní virurií. BKVN zjištěna u 0,5% pacientů. Trvání diabetu před SPK (OR 5.24, 95% CI (1.22-22.6), $p = 0.028$) a opožděný nástup funkce štěpu ledviny (OR 3.38, 95% CI (1.38-8.24), $p = 0.0085$) jsou nezávislé rizikové faktory BKV replikace.

Shrnutí. Affigene® PCR protokol zavedený v IKEM ke stanovení BK virémie je kvalitní metoda srovnatelná s výsledky PCR metody Virologického centra, Basilej. Prevalence pozitivní BK virémie, virurie i BKVN u SPK příjemců v našem centru je velmi nízká. Trvání diabetu před SPK a opožděný nástup funkce štěpu ledviny jsou nezávislé rizikové faktory BKV replikace. Retransplantace ledviny po selhání na podkladě BKVN je metodou volby.

Klíčová slova. Polyomavirus BK, Kombinovaná transplantace ledviny a pankreatu, kvantitativní real-time PCR, prevalence, rizikové faktory, retransplantace

Abstract

Introduction. The aim of the study was to introduce a new BKV PCR protocol in our centre and to verify its accuracy as well as to assess the prevalence, risk factors of BK virus replication, course of BKV infection and therapeutic approaches in simultaneous pancreas and kidney (SPK) recipients in order to design a screening protocol.

Methods. The results analysed by both Affigene® and Transplantation Virology, Basel PCR protocols were compared. Thereafter 183 SPK patients were examined to assess the prevalence of BK viremia, viruria and BKVN and to identify the risk factors of BKV replication. The cases of retransplantation after a graft loss due to BKVN were retrospectively described.

Results. 100 of results were analysed according to the Affigene® and Transplantation Virology, Basel PCR protocols with the accordance of 95%, $Rho = 0,946$, 95% CI: 0.920 – 0.963, $P < 0,0001$, Bland–Altman plot analyses: bias Basel PCR protocol/Affigene® BKV trender: -0,1 (mean) [± 1.96 SD: -1,6 – 1,3] for both methods. Point-prevalence was assessed in 183 patients; Viruria found in 17,3 %, viremia in 3.8% of patients. High-level viruria $>10^7$ copies/mL detected in 3,7% of patients, high-level virémia $>10^4$ in 1,6% of patients simultaneously with high-level viruria. BKVN was found in 0,5% of patients. Diabetes duration before SPK (OR 5.24, 95% CI (1.22-22.6), $p = 0.028$) and delayed graft function (OR 3.38, 95% CI (1.38-8.24), $p = 0.0085$) were independent risk factors of BKV replication.

Conclusion. The Affigene® PCR protocol newly introduced in our centre is a high-quality and fully comparable method with the Transplantation Virology, Basel PCR protocol. Prevalence of high-level BK viremia, viruria and BKVN were low in our centre. Diabetes duration before SPK and delayed graft function were independent risk factors of BKV replication. Kidney retransplantation after a graft loss due to BKVN is a relevant therapeutic option.

Key words. Polyomavirus BK, simultaneous pancreas and kidney transplantation, quantitative real-time PCR, prevalence, risk factors, retransplantation

Obsah

1.	Úvod.....	7
1.1	Zařazení a struktura polyomavirů, nitrobuňčné mechanismy produktivní polyomavirové infekce	7
1.1.1	Taxonomie polyomavirů, epidemiologie BKV v obecné populaci, BKV nemoc a struktura polyomavirů.....	7
1.1.2	Průnik polyomavirů do buňky a jejich nitrobuňčný transport....	8
1.1.3	Děje probíhající v endoplazmatickém retikulu a vstup virové DNA do jádra.....	9
1.1.4	Replikace polyomavirové DNA a transkripce virových proteinů	10
1.1.5	„Assembly“, maturace a uvolnění nových virionů	10
1.2	BKVN po transplantaci ledviny	10
1.2.1	Prevalence BKVN a rizikové faktory replikace BKV	10
1.2.2	Diagnostické metody BKVN	11
1.2.2.1	Exfoliativní cytologie moči.....	11
1.2.2.2	Kvantitativní real-time PCR	11
1.2.2.3	Biopsie štěpu ledviny	12
1.2.3	Terapie BKVN.....	12
1.3	BKVN po transplantaci ledviny a pankreatu	13
2	Cíle dizertační práce.....	14
3	Studie 1. Porovnání real-time PCR metody zavedené v IKEM (Affigene® BKV trender) s PCR protokolem prováděným v laboratoři Transplantační virologie, Institut pro lékařskou mikrobiologii, Basilej.....	15
3.1	Úvod a hypotéza.....	15
3.2	Metodika	15
3.2.1	Vyšetření BK-virémie v IKEM (affigene® BKV trender PCR protokol).....	16
3.2.1.1	Extrakce DNA ze vzorku.....	16
3.2.1.2	Provedení kvantitativní real-time PCR.....	16

3.2.2	PCR protokol laboratoře Transplantační virologie, Institut pro lékařskou mikrobiologii, Basilej	17
3.3	Statistická analýza	17
3.4	Výsledky	17
3.5	Diskuse a závěry	19
4	Studie 2. Stanovení prevalence a testování rizikových faktorů replikace BKV u pacientů po kombinované transplantaci ledviny a pankreatu	20
4.1	Úvod a hypotéza.....	20
4.2	Metodika	20
4.2.1	Provedení studie.....	20
4.2.2	Imunosupresivní terapie.....	21
4.3	Statistická analýza	21
4.4	Výsledky	21
4.5	Diskuse a závěry	23
5	Studie 3. Retransplantace ledviny po selhání štěpu na podkladě BKVN: efektivní terapeutický postup u pacientů po kombinované transplantaci ledviny a pankreatu (SPK).....	24
5.1	Úvod a hypotéza.....	24
5.2	Metodika	24
5.3	Výsledky	24
5.4	Diskuse a závěry	26
6	Závěrečné shrnutí	27
7	Použitá literatura	28
8	Seznam publikací.....	33
8.1	Publikace týkající se tématu dizertační práce.....	33
8.1.1	Články	33
8.1.2	Přednášky a postery na kongresech a sympóziích	33
8.2	Publikace, které přímo nesouvisí s tématem dizertační práce	35
8.2.1	Články	35
8.2.2	Přednášky a postery na kongresech a sympóziích	35

1. Úvod

Výzkum polyomavirových infekcí jde ruku v ruce s transplantačním programem, kdy vzhledem k imunosupresivní terapii výrazně narůstá výskyt oportunních infekcí obecně.

BK-polyomavirová nemoc se nejčastěji projevuje jako intersticiální nefritis štěpu ledviny, proto většina doposud zveřejněných prací publikovala data o pacientech po transplantaci ledviny. Vzhledem ke specifické problematice a relativně nízkému počtu pacientů po kombinované transplantaci ledviny a pankreatu v jednotlivých centrech bylo o BKV infekci u této populace pacientů doposud publikováno velmi omezené množství informací.

Rozhodli jsme se proto zavést diagnostickou metodu BKV infekce v našem centru a následně provést prospektivní studii věnovanou frekvenci výskytu BKV infekce, rizikovým faktorům, terapii BKV nemoci, problematice re-transplantace štěpu po selhání na podkladě BK virové nefropatie a v neposlední řadě navržení skriningového programu BK virémie u pacientů po transplantaci ledviny a pankreatu.

1.1 Zařazení a struktura polyomavirů, nitrobuněčné mechanismy produktivní polyomavirové infekce

1.1.1 Taxonomie polyomavirů, epidemiologie BKV v obecné populaci, BKV nemoc a struktura polyomavirů

Polyomaviry patří mezi papovaviridae společně s lidským papilomavirem, dle Baltimorské klasifikace je řadíme do skupiny I (viry s ds-DNA genomem). K zástupcům rodu polyomavirus patří BK virus, JC virus, dále Simian virus (SV40), myší polyomavirus (mPyV) a další. Zástupci rodiny polyomavirů vykazují přísnou druhovou i tkáňovou specifitu pokud jde o produktivní (lytickou) formu infekce, ale mohou indukovat maligní transformaci buněk i u druhů a tkání, které nejsou permissivní pro jejich replikaci (1).

BK virus je v prostředí běžně rozšířen, séropozitivitu vykazuje více než 80% dospělé populace (1) (2) (3). U pacientů s vrozenou nebo získanou poruchou funkce nebo počtu CD4 a/nebo CD8 pozitivních T-lymfocytů

dochází k nárůstu replikace BK viru (BKV infekce) a k orgánovému poškození (BKV nemoc). Mezi nejčastější projevy BKV nemoci patří BK-virová intersticiální nefritis transplantované ledviny (BKVN) s klinickým obrazem asymptomatického zhoršení funkce štěpu (2). K dalším projevům BKV nemoci patří stenóza ureteru nebo striktura uretry u příjemců štěpu ledviny (1) (2) (4), dále pak hemoragická cystitis u pacientů po transplantaci hematopoetických kmenových buněk (2) (5) a u HIV pozitivních (2).

Virion BKV je neobalený, kapsida má tvar dvacetistěnu (ikosahedr), který měří v průměru 45µm. Obsahuje dvouvláknovou cirkulární DNA o velikosti 5130 párů bazí (bp) (6). Genom BKV lze na základě funkce jednotlivých genů a čase jejich exprese rozdělit na region regulační, časný a pozdní. V regulačním regionu se nachází promotor, enhancer a replikační počátek. Regulační region obsahuje sekvence, které se slouží jako vazebná místa hormonů (např. glukokortikoidů, progesteronu, estrogenů) (7). Dále následují geny časné fáze, které kódují mimo jiné „Large Tumor antigen (LT-Ag)“, „small T-Ag“ a tzv. agnoprotein. T-antigen je nukleární fosfoprotein, který se váže se na replikační počátek, má DNA helikázovou aktivitu, aktivuje DNA-polymerázu hostitelské buňky a replikační protein A a interaguje s topoisomerázou I. T-antigen zasahuje do regulace buněčného cyklu interakcí s produkty tumor-supresorových genů a má významný onkogenní potenciál (8). Geny pozdní fáze kódují kapsidové proteiny (VP 1,2,3). Polyomaviry nekódují vlastní DNA polymerázu a jejich replikace tudíž závisí na enzymové výbavě hostitelské buňky (2) (6) (8).

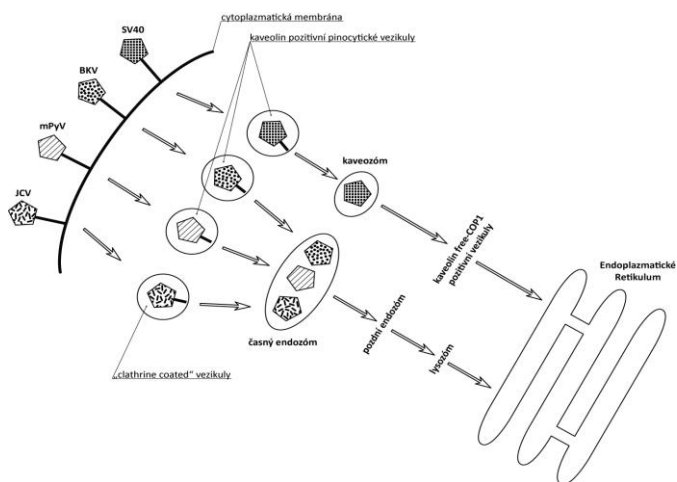
1.1.2 Průnik polyomavirů do buňky a jejich nitrobuňčný transport

Vstup viru do buňky je schématicky rozdělen do tří fází: adsorpce, penetrace a „uncoating“. Pro úspěšnou adsorpci vyžaduje BK virus přítomnost sialové kyseliny (resp. sialylovaných oligosacharidů) (9) (10) (11), které jsou součástí gangliosidů GD1b a GT1b na povrchu cytoplasmatické membrány hostitelské buňky. Po navázání virionu na příslušné receptory dojde ke konformačním změnám receptorů i kapsidových proteinů. Tyto děje aktivují fúzi membrán, čímž je umožněna penetrace virionu do buňky (10).

Mechanismus transportu z buněčného povrchu do endoplasmatického retikula (ER) probíhá mechanismem caveolární endocytózy. Virion je internalizován v komplexu s gangliosidovým receptorem a poté v caveolin-pozitivních pinocytických vezikulách po reorganizaci aktinových filament za pomoci mikrotubulů transportován do endolysozomálního kompartmentu a

poté do ER. Nízké pH uvnitř endolysozomu zajišťuje konformační změny VP proteinů, které usnadní následující konformační změny VP proteinů v ER nutné pro penetraci z ER do cytosolu (12) (13). Produktivní infekce buňky lidskými JC a BK viry také vyžaduje nízké pH endolysozomálního kompartmentu (14) (15), což implikuje, že endolysozom je rovněž součástí jejich nitrobuněčného směřování. Naproti tomu průběh infekce virem SV40 nezávisí na hodnotě pH endolysozomu (14). Předpokládá se proto, že SV40 je po internalizaci transportován do pH neutrálního kaveozómu a poté prostřednictvím kaveolin-free COP1 pozitivních vezikul do ER (16) (Obr. 1).

Obr. 1. Schéma transportu polyomavírů v buňce (dle (9))



1.1.3 Děje probíhající v endoplazmatickém retikulu a vstup virové DNA do jádra

V ER proběhne parciální „uncoating“. Celý proces v ER začíná změnou konformace kapsidových proteinů, která je na molekulární úrovni dána interakcí VP1 s ERp29 proteinem, což způsobí oslabení vazeb mezi VP proteiny, destabilizaci virionu a jeho snadný průnik zpět do cytosolu (17), kde signální sekvence pro transport do jádra (nuclear localization signals-NLS), která je součástí VP1, jej nasměruje do jádra cestou jaderných porů (9) (10).

1.1.4 Replikace polyomavirové DNA a transkripce virových proteinů

Bezprostředně po průniku polyomavirové DNA do jádra začíná transkripce časného regionu polyomavirového genomu, tj. i genů kódujících „large tumor antigen“ (TAG). Replikace virové DNA je zahájena v okamžiku, kdy TAG interaguje s počátkem replikace SV40 (SV40 origin of replication-ori). Jakmile byla replikace zahájena, nastane tzv. „polymerázový switch“ a polprim je nahrazena replikačním faktorem C (RFC), proliferating-cell nukleárním antigenem (PCNA) a DNA polymerázou- δ . Strukturální proteiny (VP1, VP2 a VP3) jsou syntetizovány v pozdním stádiu virové infekce a využívají k tomu proteosyntetický aparát v cytoplasmě hostitelské buňky. Vytvořené VP proteiny jsou poté importovány do jádra (18).

1.1.5 „Assembly“, maturace a uvolnění nových virionů

Základní paradigma kompletování (assembly) virové partikule se týká krystalizace VP podjednotek na základě fyzikálně-chemických interakcí mezi jednotlivými strukturálními proteiny. Jejich uspořádání není geneticky kódováno. Během maturace virionu jsou nukleozómy redistribuovány okolo virového minichromozómu. Správná redistribuce VP proteinů okolo příslušného chromatinu je zajištěna existencí tzv. „packaging signálu“ (19). Závěrečná lyze buňky a uvolnění nových virionů je řízena expresí proteinu VP4 (20).

1.2 BKVN po transplantaci ledviny

1.2.1 Prevalence BKVN a rizikové faktory replikace BKV

Prevalence BKVN u pacientů po transplantaci ledviny dosahuje v některých centrech 1-10%. Většina případů BKVN je diagnostikována během prvního roku od transplantace (21) (22). U 30-80% pacientů s prokázanou BKVN dochází k progresivnímu zhoršování funkce štěpu a k jeho selhání (21) (22) (23) (24).

K hlavním rizikovým faktorům replikace BK viru patří imunosupresivní terapie, konkrétně podání antilymfocytárních preparátů k terapii akutní kortikorezistentní rejekce (24). Z imunosupresivních preparátů užívaných dlouhodobě je nejrizikovější kombinace tacrolimus/mykofenolát mofetil (MMF). Kromě imunosupresivní terapie patří k rizikovým faktorům dále vyšší věk, mužské pohlaví, bělošské etnikum, diabetes mellitus, negativní sérostatus před transplantací, vyšší počet HLA neshod mezi dárce a příjemcem, epizoda akutní rejekce a její léčba v prvním roce po transplantaci (25) a studená ischémie štěpu delší než 24 hodin (26).

1.2.2 Diagnostické metody BKVN

Z diagnostických metod se k průkazu replikace BK viru nejčastěji **v klinické praxi** používají následující:

1.2.2.1 *Exfoliativní cytologie moči*

Jedná se o cytologické vyšetření moči, kdy po fixaci ve formaldehydu a centrifugaci se vzorek barví dle Papanicolaou. Ve světelném mikroskopu lze pozorovat tzv. decoy buňky, což jsou epitelie distálních tubulů a/nebo urotelie se zvětšeným, nepravidelným, hyperchromním jádrem, jenž je vyplněno basofilními inkluzemi, které jsou obklopené chromatinem. Jádro má často až „vezikulární“ vzhled a mívá po obvodu projasnění – tzv. „halo“. Obraz nepravidelností jádra implikuje nádorové změny. Tato metoda je semikvantitativní a hodí se ke skríninku rizikových pacientů. Pozitivní prediktivní hodnota vyšetření pro BKVN je však pouze 29% (25).

1.2.2.2 *Kvantitativní real-time PCR*

Kvantitativní real-time PCR je molekulárně-biologická metoda, která slouží k enzymatické replikaci DNA. Touto metodou lze prokázat a kvantifikovat počet kopií DNA BK viru v plasmě a v moči. Jedná se o cyklickou reakci, díky které je možno amplifikovat určitý vybraný úsek molekuly DNA. Nejprve je nutné provést extrakci DNA ze vzorku poté PCR samotnou. Cykly PCR sestávají ze tří kroků: denaturace DNA, navázání primerů (annealing) a polymerizace.

Pro kvantifikaci počtu kopií DNA se využívá principu nárůstu intenzity fluorescence během reakce označením sondy látkou s fluorescenční aktivitou (fluorofor) a přítomností tzv. zhášече (quencher), což je látka, která akceptuje energii fluoroforu. „Zhášení“ fluorescence lze docílit několika způsoby. Nejčastěji jde o metodu, kdy fluorofor je připojen na 3' - a zhášеч na 5'-konec sondy. Excitovaný fluorofor předává energii zhášечи, který fluoreskuje na jiné vlnové délce než fluorofor (tzv. FRET - Fluorescence Resonance Energy Transfer). Při vazbě sondy na komplementární sekvenci DNA se aktivuje Taq polymeráza, která začíná sondu štěpit od 5'-konce. Díky její 5'-3' exonukleázové aktivitě dochází k oddělení fluoroforu a zhášече a intenzita fluorescence fluoroforu exponenciálně vzrůstá (27) (28).

Výsledkem je stanovení BK virémie a virurie. Negativní prediktivní hodnota PCR vyšetření pro BKVN je 98%, pozitivní prediktivní hodnota pro BKVN je pro virémii 60% a pro virurii 30-40% (25). Virémie nad 10^4 kopií/ml je asociována se signifikantně vyšším rizikem nálezu BKVN v biopsii (22).

1.2.2.3 Biopsie štěpu ledviny

Biopsie štěpu ledviny je zlatý standard v diagnostice BKNV. Vzorky jsou zpracovány parafinovou technikou, tkáňové řezy jsou pak barveny podle protokolu laboratoře IKEM (PAS, Giemsa, CAB, sirius red s elastikou, hematoxylin eosin, AFOG, PASM). Histologický obraz BKNV charakterizují cytopatické změny epitelů renálních tubulů. Infikované buňky, v nichž probíhá replikace BKV mají zvětšené jádro s vezikulárními basofilními inkluzemi. Tento obraz je způsoben akumulací nově vznikajících virionů. Pro diferenciální diagnostiku polyomavírové a cytomegalovírové (CMV) infekce se používají imunohistochemické metody (detekce SV40T antigenu), v IKEM konkrétně imunoperoxidázová technika (29).

Dle přítomnosti cytopatologických změn, intersticiálního zánětlivého infiltrátu, atrofie tubulárního epitelu a stupně fibrózy intersticia se popisují dle Drachenbergové jednotlivá stádia BKNV (A, B, C) (30). Ani biopsie štěpu ledviny není 100% diagnostická metoda vzhledem fokální povaze lézí. Pro klinické hodnocení byly proto navrženy termíny: "possible BKNV" při opakovaně pozitivní BK-virurii, "presumptive BKNV" při persistující pozitivní virémii a „definitive BKNV" při bioptickém průkazu BKNV (31).

1.2.3 Terapie BKNV

Úhelným kamenem léčby BKNV je redukce imunosupresivní terapie. Z mnoha kombinací (tab.1) snižování dávek, záměny či vysazení jednotlivých preparátů se jako nejúčinnější postup ukazuje změna tacrolimu na cyklosporin A (CyA) nebo snížení dávky tacrolimu tak, aby sérová hladina byla méně než 6ng/ml a současně vysazení MMF (25).

Tab. 1
Léčba BKNV modifikací imunosupresivní terapie

Výměna	Snižování dávky	Vysazení dosavadní IS a přechod na duální terapii:
tacrolimus → CyA (hladina 100-150 ng/ml)	tacrolimus (hladina ≤ 6ng/ml)	CyA/prednison
MMF → azathioprin (dávka ≤ 100mg/d)	MMF (dávka ≤ 1g/d)	tacrolimus/prednison
tacrolimus → sirolimus (hladina ≤ 6ng/ml)	CyA (hladina ≤ 100-150ng/ml)	sirolimus prednison
MMF → sirolimus (hladina ≤ 6ng/ml)		MMF/prednison
MMF → leflunomid		

Upraveno dle (25)

Kromě úpravy imunosupresivní terapie byly testovány i antivirové preparáty, které účinně inhibovaly replikaci BKV ve studiích in vitro. Do širšího klinického použití se dostaly cidofovir a leflunomid. Hodnoceno bylo

i podávání imunoglobulinů (IVIG) a chinolonů. Recentní práce založená na metaanalýze výsledků studií podávání cidofoviru a leflunomidu však ukazuje, že léčba cidofovirem nebo leflunomidem při současné redukci dávek imunosupresivní terapie nevede ve srovnání se samotnou redukcí dávek imunosuprese k významně nižším ztrátám funkce štěpu na podkladě BKVN (32).

I přes léčbu však u 30-80% jedinců s prokázanou BKVN dojde k selhání funkce štěpu (21) (22) (23) (24). Vzhledem k poznatku, že u většiny pacientů virurie (a pozitivita decoy buněk) o 4 týdny (medián) předcházela BK virémií a o 12 týdnů BKVN (25), byly provedeny studie, kdy imunosuprese byla redukována již v okamžiku průkazu persistující BK virémie (tj., „presumptive“ BKVN) před rozvojem BKVN – tzv. **preemptivní redukce imunosuprese**. Výsledky jsou podstatně povzbudivější, protože došlo téměř u všech pacientů s "presumptive BKVN" po redukci dávek imunosupresivní terapie k poklesu BK virémie bez rozvoje BKVN (33) (34) (35).

Léčba BKV infekce již v okamžiku vzestupu BK virémie nebo virurie vyžaduje zavedení pravidelného skríníngu rizikových pacientů. Byly navrženy v podstatě dva přístupy: monitorovat virurii (popřípadě přítomnost decoy buněk) každé 3 měsíce první dva roky po transplantaci anebo vždy při zhoršení funkce štěpu (25) nebo sledování BK virémie (36), protože vyšetření virémie má vyšší pozitivní prediktivní hodnotu pro BKVN (60%), zatímco samotná virurie pouhých 30-40% (24) (25).

Retransplantace po selhání štěpu na podkladě BKVN je metodou volby (37).

1.3 BKVN po transplantaci ledviny a pankreatu

Incidence, prevalence a průběh BKV infekce u pacientů po kombinované transplantaci ledviny a pankreatu (SPK) jsou daleko méně prostudované než je tomu u příjemců ledviny samotné. Incidence pozitivní replikace BKV (virémie a virurie) u SPK příjemců byla 26-28% (38) (39), zatímco incidence BKVN se u této skupiny pacientů pohybuje v rozmezí 2.9-15% (38) (40) (41). Rozvoj BKVN u SPK příjemců se také zdá být pozdější (medián 18 měsíců, rozsah 12-20 měsíců) (38) (40) (41) ve srovnání s příjemci samotné ledviny.

U SPK příjemců je oproti pacientům po transplantaci samotné ledviny několik odlišností, které je nutné brát v úvahu: i přes doporučení recentních studií redukovat imunosupresivní terapii v okamžiku persistující virémie

musíme brát ohled na funkční pankreas a riziko akutní rejekce štěpu pankreatu po redukcí imunosuprese. SPK příjemcům je častěji podávána imunosupresivní indukce (ATG, monoklonální protilátky), což je nutné vzít do úvahy při hodnocení rizikových faktorů BKV replikace. V dlouhodobé imunosupresivní terapii se u SPK pacientů snažíme vyhnout podávání kortikoidů vzhledem k jejich diabetogennímu účinku. Dlouhodobé podávání kortikoidů je velmi pravděpodobně jeden z nejdůležitějších rizikových faktorů rozvoje BKVN. Skríníng replikace BKV založený na detekci decoy buněk může být problematický u pacientů s drenáží exokrinního vývodu pankreatu na močový měchýř (42). Vzhledem k pozdějšímu rozvoji BKVN u SPK příjemců by mělo být zvaženo prodloužení skríníngu minimálně na 24 měsíců.

2 Cíle dizertační práce

Cílem mé práce bylo:

1. Zavedení vyšetřovací metody BK-virémie v IKEM pro klinické použití a verifikace přesnosti této metody porovnáním výsledků laboratoře IKEM s výsledky vyšetření provedených laboratoří prof. Hirsche (Div. Molecular Diagnostics, Clinical & Transplantation Virology, Institute for Medical Microbiology, Basel, Switzerland).
2. Stanovení prevalence a incidence BK-virémie a BKVN v populaci diabetických příjemců po kombinované transplantaci ledviny a pankreatu (SPK) a testování rizikových faktorů replikace BK-viru v této populační skupině.
3. Posouzení, zda re-transplantace ledviny po selhání štěpu na podkladě BKVN je u SPK příjemců vhodným terapeutickým přístupem z hlediska možného vlivu na funkci štěpu pankreatu a zhodnocení rizika rekurence BKVN u těchto pacientů.

3 Studie 1

Porovnání real-time PCR metody zavedené v IKEM (Affigene® BKV trender) s PCR protokolem prováděným v laboratoři Transplantační virologie, Institut pro lékařskou mikrobiologii, Basilej

3.1 Úvod a hypotéza

Výsledky jednotlivých PCR metod se mohou podstatně lišit. Doposud nebyla navržena žádná standardní metoda závazná pro laboratorní klinickou praxi. Pokud však chceme výsledky používat při rozhodování o léčebném postupu, neměly by se výsledky jednotlivých metod v klinicky relevantním rozmezí lišit o více než $1.0 \log_{10}$ (43). S ohledem na tento požadavek jsme porovnávali výsledky BK-virémie získané analýzou dle Affigene® BKV PCR protokolu zavedeným v IKEM pro rutinní diagnostiku BKV infekce s výsledky BK-virémie vyšetřeními dle PCR protokolu virologického centra v Basileji, který byl tímto centrem vyvinut a jehož výsledky sehrály hlavní úlohu při stanovování terapeuticky relevantních referenčních hodnot BK-virémie a BK-virurie. Při signifikantní korelaci výsledků vyšetření jednoho biologického vzorku oběma metodami bude potvrzena spolehlivost metody vyšetření BK-virémie v našem centru.

3.2 Metodika

Vzorky plasmu a séra odebrané ve stejnou dobu pacientům po kombinované transplantaci ledviny a pankreatu byly vyšetřeny pomocí metody kvantitativní real time (q-RT) PCR na přítomnost BKV DNA v laboratoři IKEM a v laboratoři Transplantační virologie, Basilej (Div. Molecular Diagnostics, Clinical & Transplantation Virology, Institute for Medical Microbiology, Basel, Switzerland). Při počtu kopií BKV DNA/ml $< 10^3$ byl vzorek posuzován jako negativní, 10^3 - 10^4 kopií/ml jako hraniční a $> 10^4$ kopií/ml jako pozitivní (25). Po provedení PCR analýzy metodou Affigene a po obdržení výsledků z laboratoře v Basileji jsem porovnála výsledky celkem 100 měření. Pacienti s nenulovými hodnotami BK-virémie byli vyšetřováni opakovaně.

3.2.1 Vyšetření BK-virémie v IKEM (affigene® BKV trender PCR protokol)

Po odebrání cca. 8ml krve do zkumavky na separaci séra (konkrétně Becton-Dickinson SST®/SST II® Plastové zkumavky Vacutainer) byl vzorek centrifugován (1500g, 20min) a zamražen na -20°C. Po nashromáždění dostatečného množství vzorků k otevření analytické soupravy jsem provedla stanovení BK-virémie.

3.2.1.1 Extrakce DNA ze vzorku

DNA byla extrahována z 200 µl séra dle uživatelské příručky Affigene® BKV trender. Souprava affigene® DNA extraction obsahuje: Lysis buffer 1, Lysis buffer 2, Proteinázu K, pufr Proteinázy K, vymývací roztoky Wash 1 a Wash 2, Eluent, Spin columns (vazebné kolonky) a (sběrové zkumavky) collection tubes. Jednotlivé kroky sestávaly z následujících fází: přípravy reagensií, lyze bezbuněčných vzorků, vazby na kolonku a vymytí DNA a závěrečné eluce DNA do 60 µl. Připravené vzorky byly uchovány při teplotě -20 °C do provedení analýzy.

3.2.1.2 Provedení kvantitativní real-time PCR

Bezprostředně před použitím byly všechny reagentie i vzorky zcela rozmrazeny (přibližně 20 minut při pokojové teplotě) a promíchány na vortexu. Součástí analytické soupravy je kontrolní sada a detekční sada. Kontrolní sada obsahuje pozitivní kontrolu (DNA IC Carrier, tj. pufráčnický roztok obsahující neinfekční syntetickou DNA s IC sekvencemi a poly(A)-RNA) (vnitřní kontrola), která byla použita již při extrakci DNA, dále negativní kontrolu (DNA NTC) a 2 kalibrátory (BKV trender High, BKV trender Low). Součástí detekční sady jsou BKV trender Master mix (MMx) - tj. tlumicí roztok obsahující nukleotidy, primery/sondu, UDG a DNA polymerázu (Taq-polymeráza), roztok MgCl₂ (Mg16) a směšovací zkumavku pro přípravu pracovní matice. Jednotlivé kroky sestávaly z následujících fází: Přípravy pracovní matice, přípravy zkumavek k PCR reakci, amplifikace DNA a její kvantifikace.

Amplifikace DNA proběhla v cycleru Rotor-Gene™ 3000/6000 za následujících reakčních podmínek: první reakční cyklus 5min 37°C, 5min. 95°C., dalších 45 cyklů 30s 95°C a 60s 60°C, závěrečný krok 1min na 40°C, reakční objem 50 µl.

3.2.2 PCR protokol laboratoře Transplantační virologie, Institut pro lékařskou mikrobiologii, Basilej

Vzorek plasmy (cca. 8ml) odebraný do zkumavky na separaci plasmy (EDTA VACUETTE[®]) byl centrifugován (1500g, 20min) a supernatant zamražen při -20°C. Po nashromáždění dostatečného množství vzorků byly zamražené vzorky na suchém ledu odeslány do Basileje k analýze.

DNA byla extrahována ze 400μl vzorku. Analýza proběhla za použití real-time PCR fluorescent probe-based assay:

primer 1: AGCAGGCAAGGGTTCTATTACTAAAT;

primer 2: GAAGCAACAGCAGATTCTCAACA;

sonda: AAGACCCTAAAGACTTTCCTCTGATCTACACCAGTTT

značená 6-carboxyfluoresceinem na 5' konci a 6-carboxytetramethylrhodaminem na 3' konci v cycleru ABI PRISM[®] 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystems za následujících reakčních podmínek: 1 cyklus při 50°C 2 min, 1 cyklus při 95°C 15 min a 45 cyklů: denaturace při 94°C 15s, annealing a detekce při 56°C 30s, extenze 76°C 30s, reakční objem 50μl. Kvantitativní lineární rozsah pro tuto metodu je 10¹-10⁷ kopií/reakci (21) (44).

3.3 Statistická analýza

Pro porovnání výsledků dvou metod byl použit Spearmanův rank-korelační statistický test, počítán pomocí (*Wessa, P. (2010), Free Statistics Software, Office for Research Development and Education, version 1.1.23-r6, URL <http://www.wessa.net/>*) a Bland-Altman plot (*MedCalc software Belgium, verze 11.1.1.0*).

3.4 Výsledky

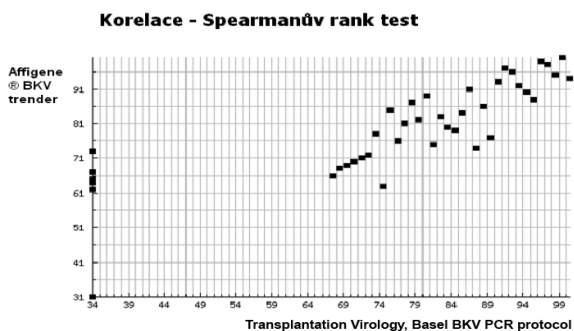
Ze 100 vzorků séra a plasmy odebraných ve stejnou dobu analyzovaných následně podle Affigene[®] BKV trender a Transplantační virologie, Basilej real-time PCR protokolů bylo 67 vzorků negativních, 3 hraniční a 25 pozitivních oběma metodami. Shoda obou metod byla 95% (Tab. 2).

Tabulka 2. Srovnání počtu negativních, hraničních a pozitivních výsledků měřených oběma metodami

	Transplantační virologie, Basilej PCR protokol (Plasma)	Affigene® BKV trender (Sérum)	Shoda obou metod
Negativní	69	67	67
Hraniční	3	8	3
Pozitivní	28	25	25
Celkem	100	100	95

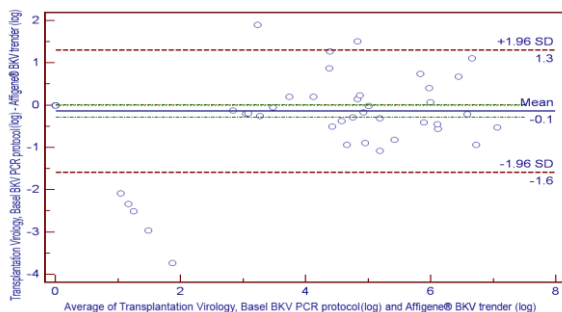
Spearmanův korelační koeficient (Rho) byl použit pro porovnání párových hodnot, z nichž alespoň jedna byla nenulová, s výsledkem signifikantní korelace: Rho = 0,946, 95% interval spolehlivosti (CI): 0.920 – 0.963, P<0,0001 (Graf 1).

Graf 1. Korelace párových hodnot kopií BKV v séru a v plasmě (n=34)
 Porovnání výsledků BK-virémie vyšetřované v séru a plasmě pomocí Affigene® BKV trender a metody vyvinuté laboratoří Transplantační virologie, Basilej. Jednotlivé body v grafu reprezentují korelaci výsledků jednotlivých měření, kde aspoň jeden výsledek z dané dvojice měření byl nenulový.



Bland–Altman plot analýza rovněž neprokázala signifikantní rozdíl mezi oběma metodami (bias Transplantační virologie, Basilej PCR protokol/Affigene® BKV trender: -0,1 (průměr) [± 1.96 SD: -1,6 – 1,3]) pro obě metody (Graf 2).

Graf 2. Bland-Altman plot Osa x zobrazuje průměr hodnot BK-virémie získané oběma metodami (log kopií BKV), osa y pak ukazuje rozdíl mezi výsledky BK-virémie získanými oběma metodami (log kopií BKV). Horizontální linie označuje průměr rozdílů (plná modrá čára) a plus nebo minus 1,96 směrodatné odchylky (SD) rozdílů (hnědé přerušované linie). S výsledným log kopií BKV je nadále počítáno jako s přirozeným číslem, proto jsou možné i záporné hodnoty.



3.5 Diskuse a závěry

Oba protokoly byly podobné co se týče složení použitých reagentů, amplifikačních programů, detekce a kvantifikace vyšetřované DNA. Metoda používaná v Basileji je dle autorů podobná komerčně dostupnému Taq-Man® Applied Biosystems BKV PCR protokolu (44). V naší studii byla prokázána vysoká míra korelace počtu kopií BK viru vyšetřované výše zmíněnými metodami s hodnotou korelačního koeficientu (Rho) = 0,946 při 95% intervalu spolehlivosti (CI): 0.920 – 0.963. Ani analýza dle Bland-Altmana neprokázala výraznější diskrepance výsledků obou metod. Nově zavedená metoda je tedy svými výsledky plně srovnatelná s výsledky analýzy provedené v laboratoři Transplantační virologie v Basileji.

4 Studie 2

Stanovení prevalence a testování rizikových faktorů replikace BKV u pacientů po kombinované transplantaci ledviny a pankreatu.

4.1 Úvod a hypotéza

Na rozdíl od příjemců ledviny je BKV infekci a BKVN u pacientů po kombinované transplantaci ledviny a pankreatu (SPK) věnováno podstatně méně publikací (38) (40) (41) a data ohledně incidence, prevalence a rizikových faktorů jsou nekoherentní. SPK příjemci se v mnoha ohledech liší od nediabetických pacientů po transplantaci ledviny. Data pocházejí převážně z retrospektivních studií a údaje se mezi jednotlivými centry velmi liší. Navíc v žádné z těchto studií nebyla věnována pozornost výskytu a časovému průběhu BK-virémie a virurie, což jsou klíčové informace pro návrh skíningového protokolu. Vzhledem k těmto skutečnostem jsme provedli průřezovou, prospektivní studii replikační aktivity BK viru v moči a plasmě a analyzovali jsme rizikové faktory BKV replikace a BKVN u SPK příjemců léčených v našem centru.

4.2 Metodika

4.2.1 Provedení studie

Do studie byli zařazeni všichni pacienti s alespoň jedním funkčním štěpem, kteří podstoupili SPK v Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM) v Praze v období 12/1985-03/2008 (n=205; u 179 pacientů fungovaly oba štěpy, 21 pacientům fungoval pouze štěp ledviny a 5 pacientů bylo dialyzováno s funkčním štěpem pankreatu). Pacienti po re-transplantaci ledviny (n=19) a/nebo pankreatu (n=3) byli ze studie vyřazeni. Vzorek moči a krve byl získán od zbývajících 183 pacientů při rutinní laboratorní kontrole. Počet kopií BKV v moči a plasmě/séru byl kvantifikován pomocí real-time PCR metody popsané ve studii 1, stanovení virurie probíhalo pouze v laboratoři Transplantační virologie, Basilej. Počet kopií $<10^3$ /mL byl posuzován jako negativní v obou vzorcích, virémie 10^3 - 10^4 kopií/mL jako hraniční a $>10^4$ jako pozitivní. Virová nálož BKV v moči 10^3 - 10^7 byla posuzována jako hraniční a nad 10^7 kopií/mL jako pozitivní nález. Pacienti s jakoukoli nenulovou hodnotou BK-virémie a/nebo virurie byli znovu vyšetřeni po 4-13 měsících, jejich klinický stav a hodnota sérového kreatininu byly znovu stanoveny po 6 měsících. Virémie i virurie $> 10^3$

kopii/mL byly hodnoceny jako pozitivní replikace BKV. Při opakovaně pozitivním nálezů BK-virémie byla provedena biopsie štěpu ledviny s barvením na SV40 antigen. Pacienti, kteří byli iniciálně negativní v plasmě i v moči, byli znovu vyšetřeni cca. po jednom roce.

4.2.2 Imunosupresivní terapie

Protokoly dlouhodobé imunosupresivní terapie (IS) byly celkem 3: v *prvním období* (1987-1998) byli pacienti léčeni kombinací cyklosporin A (CyA) s azathioprinem nebo mykofenolát mofetilem (MMF) a steroidy. V *druhém období* (1998-2002) byli pacienti léčeni kombinací CyA/MMF nebo tacrolimus (Tac)/MMF, steroidy byly vysazeny nejpozději 6 měsíců od SPK, dle protokolu studie EURO SPK 001 (45). Ve *třetím období* (2002-2007) IS terapie zahrnovala tacrolimus buď s MMF nebo se sirolimem s vysazením steroid do 6 týdnů od SPK dle protokolu studie EURO SPK 002 (46).

4.3 Statistická analýza

Identifikovali jsme pacienty s BKV pozitivitou v plasmě a/nebo v moči a na základě tohoto výsledku jsme spočítali průřezovou prevalenci (cross-sectional point-prevalence). Rizikové faktory BKV replikace byly analyzovány pro skupinu pacientů transplantovaných v období po 23.11.1998, kdy začal být v našem centru podáván tacrolimus. Univariátní analýza byla provedena pomocí Mann-Whitney testování pro spojitá data a chí-kvadrát test nebo Fischerův exact test pro kategorická data. Faktory asociované s BKVN dle již publikovaných studií a/nebo korelující signifikantně s pozitivní BKV-replikací ve výsledcích univariátní analýzy ($p < 0,10$) byly testovány v multivariátním modelu logistické regresní analýzy. Nezávisle proměnnou veličinou byla přítomnost BK-virémie a/nebo virurie. BMDP statistický software (BMDP Statistical Software, Inc., UCLA, Los Angeles, CA, USA) byl použit pro všechny statistické výpočty.

4.4 Výsledky

Prevalence BKV-replikace ("point prevalence") byla analyzována u 183 pacientů, kteří byli 49 (medián, rozsah 1-250) měsíců od SPK (Tabulka 3). Vzorek moči nebyl získán od 21 pacientů. Virurie byla detekována u 28 pacientů (17,3 %; medián počtu BKV DNA kopií v moči $1,16E+04$ /mL; rozsah ($1,42E+03$ - $5,0E+08$)), virémie byla zjištěna u 7 pacientů (3,8%; medián počtu BKV DNA kopií v plasmě $1,46E+03$ /mL; rozsah ($1,1E+03$ - $6,0E+06$)). Všichni pacienti s pozitivní virémií ($n=7$) měli rovněž pozitivní virurii. Pozitivní virurie $>10^7$ kopií/mL byla detekována u 6 pacientů (3,7%;

počet kopií BKV DNA v moči 7.81E+07/mL; rozsah (1,04E+07 – 5.17E+08)). Virémie $>10^4$ byla pozorována u 3 pacientů (1,6%; 1,6E+04, 5,76E+05 a 5,6E+06 kopií/mL), současně s vysoce pozitivní virurií (5,6E+07, $>1,0E+08$ a 5,2E+08 kopií/mL).

Iniciálně negativní pacienti v plasmě i v moči (n=129) byli re-testováni po 15 měsících (medián), rozsah (8-20 měsíců). Změna směrem k BK-pozitivitě byla zaznamenána u 12 pacientů (což by odpovídalo hodnotě „Incidence-rate“ 0,074 na paciento/rok). Všichni pacienti kromě jednoho měli pouze hraniční BKV replikaci v moči a negativní v plasmě, jeden měl hraniční počet BKV DNA v plasmě a u jednoho byla potvrzena vysoce pozitivní BK-virurie při negativním nálezu v plasmě. U žádného z těchto pacientů nedošlo k rozvoji BKNV.

Tab. 3. Demografická data pacientů a výsledky průřezové prevalenční studie

Počet pacientů	183
Muži/ ženy	101/82
Věk(roky)	43±8.6
Trvání diabetu (roky)	27±7.9
Doba od SPK(měsíce)	49 (1 - 250)*
Nezávislost na inzulinu	159 (87%)
Kreatinin (μmol/L)	129 (66-500#)*
Plazma	
Pozitivní BKV replikace (n)	7 (3.8%)
Kopie/mL	1.46E+03 (1.1E+03 - 6.0E+06)*
Vysoce-pozitivní replikace (n)	3 (1.6%)
Hraniční replikace (n)	4 (2.2%)
Moč	
Pozitivní BKV replikace (n)	28 (17.3%)^
Kopie/mL	1.16E+04 (1.42E+03 - 5.0E+08)*
Vysoce-pozitivní replikace (n)	6 (3.7%)^
Hraniční replikace (n)	22 (13.6%)^
BKNV (n) (potvrzená biopsií)	1 (0.5%)

Hodnoty jsou průměr ± SD

* medián (rozsah)

pro 5 dialyzovaných pacientů byla hodnota kreatininu 500 μmol/L

^ Vzorek moči nebyl k dispozici od 21 pacientů

SPK – Kombinovaná transplantace ledviny a pankreatu

BKV - polyomavirus BK

BKNV - polyomavirus BK-associated nephropathy

Rizikové faktory BKV replikace byly analyzovány u 135 pacientů. Posuzovali jsme věk, trvání diabetu, trvání dialýzy před transplantací, dobu studené ischemie štěpu ledviny, celkový počet neshod v HLA, čas nástupu funkce štěpu (méně vs. déle než 3 dny od SPK), dobu od transplantace, iniciální IS (Tac vs. CyA), nutnost antirejekční terapie, IS v době odběru vzorků (Tac vs.

CyA) a hodnotu sérového kreatininu v čase studie. V univariantní analýze vyšel signifikantní rozdíl mezi BKV-pozitivní vs. BKV-negativní skupinou ve 3 veličinách (trvání diabetu a dialýzy před transplantací a opožděný nástup funkce štěpu ledviny) (Tabulka 4), pouze trvání diabetu před SPK (OR 5.24, 95% CI (1.22-22.6), $p=0.028$) a opožděný nástup funkce štěpu ledviny (OR 3.38, 95% CI (1.38-8.24), $p=0.0085$) však byly v multivariantní analýze nezávisle asociovány s replikací BKV.

Tabulka 4. Charakteristiky BKV-pozitivních a BKV-negativních pacientů

n=135	BKV pozitivní (n=36)	BKV negativní (n=99)	Hodnota - P
Muži/ženy	19/17	59/40	0.478
Věk (roky)	44±8.5	42±8.4	0.186
Trvání diabetu (roky)	28.8±8.2	25.8±7.5	0.044
Trvání dialýzy (més.)	13.8±15	8.1±10.7	0.026
Studená ischémie (hod.)	11.3±4.1	10.5±3.5	0.399
Počet HLA neshod	5±1	4.7±1	0.128
Opožděný/okamžitý nástup funkce štěpu (n)	14/22	18/81	0.012
Doba od SPK (més.)	47(2-96)**	43(0.6-106)**	0.516
Iniciální imunosuprese (n)			
Tac/CyA	26/10	55/44	0.081
Antirejéční terapie (n)	2/34	15/84	0.233
Imunosuprese v době studie(n)			
Tac/CyA	27/9	62/37	0.18
Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	118 (60 – 500)** 1 patient on dialysis	126 (69 – 500) ** 2 patients on dialysis	0.913

Data jsou průměr ± směrodatná odchylka

* více než 3 dny

**medián (rozsah)

Tac = tacrolimus; CyA = cyklosporin A

4.5 Diskuse a závěry

Při porovnání našich výsledků s výsledky průřezových studií u pacientů po transplantaci ledviny vyšly u našich pacientů srovnatelná četnost i hodnoty BK virurie, ale nižší výskyt i hodnoty BK virémie (26) (47) (48). Nízká prevalence pozitivní BKV replikace i BKVN v naší studii může ukazovat i na její snižující se výskyt v SPK populaci. Pokud se tento trend potvrdí, měly by být ozřejměny příčiny tohoto příznivého vývoje. Z mnoha zkoumaných faktorů, které ovlivňují riziko replikace BKV, přicházejí v úvahu zejména změny v cílových hladinách dlouhodobé imunosupresivní terapie a ústup od dlouhodobého podávání kortikoidů. Tato studie je jedna z mála, která prospektivním způsobem analyzuje četnost BK-virurie a virémie u pacientů po kombinované transplantaci ledviny a pankreatu v jednom

transplantačním centru. Prevalence (resp. “point – prevalence”) vysoce pozitivní BK-virurie, virémie (“presumptive BKVN”) a biopticky prokázané BKVN byly velmi nízké. Jako nezávislé rizikové faktory BKV replikace byly pomocí multivariantní analýzy identifikovány dva parametry, a to trvání diabetu mellitu prvního typu před transplantací a opožděný nástup funkce štěpu ledviny.

5 Studie 3

Retransplantace ledviny po selhání štěpu na podkladě BKVN: efektivní terapeutický postup u pacientů po kombinované transplantaci ledviny a pankreatu (SPK).

5.1 Úvod a hypotéza

Retransplantace ledviny (reTx) po selhání na podkladě BKVN se nabízí jako metoda volby, nicméně vzhledem k nízkým počtům těchto pacientů v jednotlivých centrech je publikováno o této populační skupině velmi málo údajů a některé otázky týkající se této specifické problematiky zůstávají nezodpovězeny (37) (49). K hlavním problémům patří, zda je nutné provést pre-emptivní nefrektomii před plánovanou reTx a nebo spíše redukovat dávku IS terapie za účelem snížení replikace BKV, či zda je nutné po reTx upravit IS léčbu. Tyto otázky jsou ještě naléhavější v případě SPK příjemců, kde při zachované funkci štěpu pankreatu nepřípadá v úvahu výraznější redukce IS po selhání ledviny. Dostupné informace jsou většinou retrospektivní analýzy charakteru kazuistik (37) (50) (51). Cílem naší práce bylo popsat zkušenosti našeho centra s reTx ledviny po slehání funkce na podkladě BKVN u čtyř SPK příjemců.

5.2 Metodika

Provedli jsme retrospektivní zhodnocení pěti případů retransplantace ledviny (reTx) u čtyř pacientů s diabetem mellitem 1. typu (M/Ž 2/2, věk medián (rozsah) 36 (27-52) let, trvání diabetu 22 (17-26) let), kteří podstoupili SPK v IKEM v období 1999-2002. Demografické a klinické charakteristiky první transplantace a reTx jsou shrnuty v tabulkách 5 a 6.

5.3 Výsledky

BKVN byla biopticky verifikována 20 (8-22) měsíců od SPK a ve většině případů byla diagnostikována ve stádiu B (52). I přes úpravy IS terapie u všech pacientů (tj. snížení dávky, vysazení MMF a převod pacienta na

terapii sirolimem v jednom případě a přechod z CyA na azathioprin u dalšího pacienta) a podávání cidofoviru u jednoho pacienta (40 mg - 0,54mg/kg každé 2 týdny), došlo u všech pacientů k selhání štěpu za 29 (23-39) měsíců po SPK a 13 (1-23) měsíců od potvrzení diagnózy BKNV. Po celou dobu klinického sledování nebylo zaznamenáno zhoršení funkce štěpu pankreatu a všichni pacienti zůstali nezávislí na inzulinu.

Všichni pacienti podstoupili reTx ledviny 36 (27-63) měsíců od SPK. Pacienti 1 a 4 byli retransplantováni před zahájením dialyzační terapie a graftektomie byla provedena až v jedné době s reTx. U pacientů 2 a 3 byla provedena pre-emptivní nefrektomie a byli dialyzováni 9 a 18 měsíců před reTx. U pacienta 1 BKNV rekurovala 6 měsíců a k selhání nového štěpu došlo 1 rok po první reTx i přes změnu IS terapie (redukce dávky tacrolimu, převod z MMF na sirolimus, vysazení prednisonu). Po selhání byla provedena pre-emptivní nefrektomie druhého štěpu, pacient byl dialyzován a až po určité době byla provedena druhá reTx (Tabulka 5).

Tabulka 5. Demografické a klinické charakteristiky SPK pacientů s BKNV

Pacient č.	Pohlaví	Trvání diabetu (roky)	Věk v době SPK (roky)	Iničiální IS	Antirejéčnická terapie	Doba od SPK do diagnózy BKNV (měs.)	Stádium BKNV v době diagnózy	Léčba BKNV	Doba od diagnózy BKNV do selhání štěpu nebo reTx (měs)	Trvání dialyzační léčby (měs)	Preemptivní NE (měs před reTx)	Doba do reTx (měs)
1 (SPK)	M	21	35	Tac, MMF	3.75g MP	21	B	Red IS	6	0	0	27
1 (první reTx)				Tac, MMF, Prednison	1.5g MP	6	B	Převod MMF/ Siro, Red Tac, vysazení Prednisonu	6	25	15	37
2	Ž	23	52	Tac, Siro	0	22	A	Red IS	1	17	9	40
3	M	26	37	CyA, MMF	0.5g MP, 1.8g ATG	20	B	Převod MMF/ Siro, CyA/Aza, Aza/Prednison	19	24	18	63
4	Ž	17	27	Tac, MMF	0	8	B	Red IS	23	0	0	31
medián (rozsa)		22(17-26)	36(27-52)			21(8-22)*			13(1-23)*			36(27-63)*

MP: methylprednisolon, ATG: antithymocytární globulin,

Tac: tacrolimus, MMF: mykofenolát mofetil, CyA: cyklosporin A, Aza: azathioprine, Siro: sirolimus, IS: imunosuprese, Red: redukce, NE: nefrektomie, reTx: retransplantace ledviny, měs.: měsíce

* Období po první reTx u pacienta 1 není uvedeno

Všichni pacienti byli k datu 30/09/2007 nezávislí na inzulinu a bez potřeby dialyzační léčby. Klinické a laboratorní charakteristiky pacientů po reTx jsou shrnuty v tabulce 6. Doba sledování je 30 (9-55) měsíců od poslední reTx. Dlouhodobá IS terapie je u většiny pacientů založena na kombinaci tacrolimu/sirolimu; pacient 1 je léčen kombinací CyA/MMF. U pacienta 4 byla zjištěna vysoce pozitivní BK-virurie a níže pozitivní BK-virémie, ostatní byli BKV DNA negativní.

Tabulka 6. Klinické a laboratorní parametry po retransplantaci ledviny

Pacient č.	IS po reTx	P-kreatinin (μmol/l) v době studie	BK virémie (kopie/mL)	BK virurie (kopie/mL)	Doba sledování od reTx (més.)
1 (Druhá reTx)	CyA, MMF	140	<10E+03	9,07E+03	39
2	Tac, Siro	128	<10E+03	<10E+03	20
3	Tac, Siro	211*	<10E+03	<10E+03	9
4	Tac, Siro	195	7,60E+03	1,30E+08	55
medián (rozsah)					30 (9-55)

CyA: cyklosporin A, MMF: mykofenolát mofetil, Siro: sirolimus, Tac: tacrolimus

*Opožděný nástup funkce štěpu u pacienta 3 na podkladě akutní tubulární nekrózy

5.4 Diskuse a závěry

Po retransplantaci ledviny při selhání funkce štěpu na podkladě BKNV je nutné počítat s potenciálním rizikem rekurence. Dle konsensu mezinárodního shromáždění expertů (25) by retransplantace neměla proběhnout v období aktivní replikace BKV. Poklesu počtu kopií BKV DNA lze dosáhnout redukcí nebo úplným vysazením IS terapie společně s podáváním antivirotik nebo pre-emptivní ureteronefektomií selhaného štěpu. U SPK příjemců lze s ohledem na funkční štěp pankreatu uvažovat pouze o druhé možnosti. Potenciální rizika vyplývající z dalšího chirurgického výkonu jsou vyvažována benefitem pre-emptivní nefrektomie v podobě velmi rychlého poklesu virémie, neboť dle studie Funka et al. (53) dochází po odstranění selhaného štěpu k poklesu BK-virémie v řádu hodin k nulovým hodnotám. Naše výsledky poskytují v porovnání se sděleními z ostatních center relativně extenzivní zkušenosti doposud publikované. Vzhledem k nízkému počtu pacientů nelze provést statistickou analýzu, nicméně ani naše pozorování nepodporuje pre-emptivní retransplantaci v období aktivní BKV replikace. Tento postup selhal u pacienta 1 (došlo k rekurenci). V druhém případě pre-emptivní reTx (pacient 4) byla u tohoto pacienta v době studie přítomná hraniční virémie, pozitivní virurie a zhoršená funkce štěpu (tabulka 6) i když ani v jedné ze dvou biopsiích provedených 6 a 30 měsíců po reTx nebyla diagnostikována BKNV (v obou případech byly SV40T negativní).

Retransplantace ledviny po selhání štěpu na podkladě BKNV je metodou volby i u SPK příjemců. Naše výsledky ukazují na nutnost redukce replikační

aktivity BKV před retransplantací. Snížení replikační aktivity lze docílit skrze redukcí IS terapie a/nebo pre-emptivní ureteronefrektomií selhaného štěpu. V případě SPK příjemců je s ohledem na zachovanou funkci štěpu pankreatu ureteronefrektomie metodou volby.

6 Závěrečné shrnutí

Problematika BKV infekce u pacientů po transplantaci ledviny a pankreatu je doposud málo prozkoumaná, nicméně ani při relativně malém počtu pacientů, u kterých byla v naší studii pozitivita BK viru diagnostikována, není rozhodně zanedbatelná. Včasným terapeutickým zásahem lze totiž zabránit ztrátě funkce ledvinného štěpu při minimálním riziku vzniku akutní rejekce štěpu pankreatu. Po selhání štěpu ledviny na podkladě BKVN je re-transplantace metodou volby.

Přínosem mé práce bylo zavedení diagnostické metody BK virémie v našem centru a ověření její přesnosti, čímž mohly proběhnout následující fáze studie, tj. zjištění prevalence BKV infekce u SPK příjemců, analýza rizikových faktorů a terapeutických přístupů u BKV-pozitivních pacientů.

Vzhledem k přínosu včasné redukce imunosuprese již ve fázi vzestupu BK-virémie nejlépe před rozvojem BKVN jsem rovněž zavedla v našem centru skrínigový program BK-virémie u SPK příjemců, který vychází z doporučení panelu expertů pro příjemce samotné ledviny (25).

7 Použitá literatura

1. **Jiang M, Abend J.R., Johnson S.F., Imperiale M.J.** The role of polyomaviruses in human disease. *Virology*. 2009, 384:266-273.
2. **Hirsch H.H., Steiger J.** Polyomavirus BK. *Lancet infectious diseases* . 2003, 3:611-623.
3. **Egli A, Infanti L, Dumoulin A, et al.** 199(6):837-46. Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *J Infect Dis.* . 2009, 199(6):837-46.
4. **Chang CY, Gangji A, Chorneyko K, Kapoor A.** Urological manifestations of BK polyomavirus in renal transplant recipients. *Can J Urol*. 2005, 12(5):2829-36.
5. **Dropulic LK, Jones RJ.** Polyomavirus BK infection in blood and marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2008, 41(1):11-8.
6. **Moens U, Rekvig OP.** Molecular biology of BK virus and clinical and basic aspects of BK virus renal infection. [autor knihy] Stoner GL Khalili K. *Human polyomaviruses: molecular and clinical perspectives*. New York : Wiley-Liss, 2001, stránky 215-26.
7. **Moens U, Subramaniam N, Johansen B, Johansen T, Traavik T.** A steroid hormone response unit in the late leader of the noncoding control region of the human polyomavirus BK confers enhanced host cell permissivity. *J Virol*. 1994, 68(4):2398-408.
8. **Fioriti D, Videtta M, Mischitelli M, et al.** The human polyomavirus BK: Potential role in cancer. *J Cell Physiol*. 2005, 204(2):402-6.
9. **Sapp M, Day PM.** Structure, attachment and entry of polyoma- and papillomaviruses. *Virology*. 2009, 384(2):400-9.
10. **Neu U, Stehle T, Atwood WJ.** The Polyomaviridae: Contributions of virus structure to our understanding of virus receptors and infectious entry. *Virology*. 2009, 384(2):389-99.
11. **Low JA, Magnuson B, Tsai B, Imperiale MJ.** Identification of gangliosides GD1b and GT1b as receptors for BK virus. *J Virol*. 2006, 80(3):1361-6.
12. **Magnuson B, Rainey EK, Benjamin T, et al.** ERp29 triggers a conformational change in polyomavirus to stimulate membrane binding. *Mol Cell*. 2005, 20; 289–300.

13. **Rainey-Barger EK, Magnuson B, Tsai B.** A chaperone-activated nonenveloped virus perforates the physiologically relevant endoplasmic reticulum membrane. *J Virol.* 2007, 81;12996–13004.
14. **Ashok A, Atwood WJ.** Contrasting roles of endosomal pH and the cytoskeleton in infection of human glial cells by JC virus and simian virus 40. *J Virol.* 2003, 77:1347–1356.
15. **Eash S, Atwood WJ.** Involvement of cytoskeletal components in BK virus infectious entry. *J Virol.* 2005, 79:11734–11741.
16. **Pelmans L, Kartenbeck J, Helenius A.** Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol.* 2001, 3:473–483.
17. **Hebert DN, Molinari M.** In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiol Rev.* 2007, 87(4):1377–408.
18. **Wright CM, Seguin SP, Fewell SW, et al.** Inhibition of Simian Virus 40 replication by targeting the molecular chaperone function and ATPase activity of T antigen. *Virus Res.* 2009, 141(1):71-80.
19. **Dalyot-Herman N, Ben-nun-Shaul O, Gordon-Shaag A, Oppenheim A.** The simian virus 40 packaging signal sequence is composed of redundant DNA elements which are partly interchangeable. *J Mol Biol.* 1996, 259(1):69-80.
20. **Daniels R, Sadowicz D, Hebert DN.** A very late viral protein triggers the lytic release of SV40. *PLoS Pathog.* 2007, 3(7):e98.
21. **Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M, et al.** Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N Engl J Med.* 2002, 347(7):488-96.
22. **Hariharan, S.** BK virus nephritis after renal transplantation. *Kidney Int.* 2006, 69(4):655-62.
23. **Vasudev B, Hariharan S, Hussain SA, et al.** BK virus nephritis: risk factors, timing, and outcome in renal transplant recipients. *Kidney Int.* 2005, 68(4):1834-9.
24. **Wiseman, AC.** Polyomavirus Nephropathy: A Current Perspective and Clinical Considerations. *Am J Kidney Dis.* 2009, 54(1):131-42.
25. **Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg CB, et al.** Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation.* 2005, 79(10):1277-86.

26. **Bressollette-Bodin C, Coste-Burel M, Hourmant M, et al.** A prospective longitudinal study of BK virus infection in 104 renal transplant recipients. *Am J Transplant.* 2005, 5(8):1926-33.
27. **Pfaffl, M.W.** Quantification strategies in real-time PCR. *The real-time PCR Encyclopaedia A-Z of quantitative PCR.* La Jolla : International University Line, 2004, stránky 87-120.
28. **Vandesompele, J.** eurogentec.com. *qPCR guide.* [Online] [Citace: 17. Nov 2010.] <http://www.eurogentec.com/uploads/GRT-QQPCR-BOOKLET-0604-V2.pdf>.
29. **Honsová E, Lodererová A, Lácha J, Voska L, Housa D, Bouček P.** Aktuality v nefrologii. *Polyomavírová infekce ledviných štěpů (BK virus nefropatie).* [Online] 01. 03 2003. [Citace: 20. 11 2010.] www.tigis.cz/AVN/AVN303/06.htm. 9(3).
30. **Drachenberg CB, Papadimitriou JC.** Polyomavirus-associated nephropathy: update in diagnosis. *Transpl Infect Dis.* 2006, 8(2):68-75.
31. **Hirsch HH, Drachenberg CB, Steiger J, Ramos E.** Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: critical issues of screening and management. *Adv Exp Med Biol.* 2006, 577:160-73.
32. **Johnston O, Jaswal D, Gill JS, et al.** Treatment of Polyomavirus Infection in Kidney Transplant Recipients: A Systematic Review. *Transplantation.* 2010, 89(9):1057-70.
33. **Brennan DC, Agha I, Bohl DL, et al.** Incidence of BK with tacrolimus versus cyclosporine and impact of preemptive immunosuppression reduction. *Am J Transplant.* 2005, 5(3):582-94.
34. **Ramos E, Drachenberg CB, Wali R, Hirsch HH.** The decade of polyomavirus BK-associated nephropathy: state of affairs. *Transplantation.* 2009, 87(5):621-30.
35. **Ginevri F, Azzi A, Hirsch HH, et al.** Prospective Monitoring of Polyomavirus BK Replication and Impact of Pre-Emptive Intervention in Pediatric Kidney Recipients. *Am J Transplant.* 2007, 7(12):2727-35.
36. **Randhawa P, Brennan DC.** BK virus infection in transplant recipients: an overview and update. *Am J Transplant.* 2006, 6(9):2000-5.
37. **Ramos E, Vincenti F, Lu WX, et al.** Retransplantation in patients with graft loss caused by polyoma virus nephropathy. *Transplantation.* 2004, 77:131.
38. **Gupta G, Shapiro R, Thai N, et al.** Low incidence of BK virus nephropathy after simultaneous kidney pancreas transplantation. *Transplantation.* 2006, 82:382.

39. **Razonable RR, Brown RA, Humar A, et al.** A longitudinal molecular surveillance study of human polyomavirus viremia in heart, kidney, liver, and pancreas transplant patients. *J Infect Dis.* 2005, 192(8):1349-54.
40. **Lipshutz GS, Mahanty H, Feng S, et al.** BKV in simultaneous pancreas/kidney transplant recipients: A leading cause of renal graft loss in first 2 years post-transplant. *Am J Transplant.* 2005, 5:366.
41. **Trofe J, Gaber LW, Stratta RJ, et al.** Polyomavirus in kidney and kidney/pancreas transplant recipients. *Transpl Infect Dis.* 2003, 5:21.
42. **Lard LR, van der Boog PJ, Veselic M, et al.** A pitfall in screening with decoy cells after simultaneous pancreas kidney transplantation. *Clin Transplant.* 2008, 22(6):833-6.
43. **Hoffman NG, Cook L, Atienza EE, Limaye AP, Jerome KR.** Marked variability of BK virus load measurement using quantitative real-time PCR among commonly used assays. *J Clin Microbiol.* 2008, 46(8):2671-80.
44. **Hirsch H.H., Mohaupt M, Klimkait T.** Prospective Monitoring of BK Virus Load after Discontinuing Sirolimus Treatment in a Renal Transplant Patient with BK Virus Nephropathy. *J Infect Dis.* 2001, 184:1497-8.
45. **Saudek F, Malaise J, Boucek P, Adamec M, EUROSPK Study Group.** Efficacy and safety of tacrolimus compared with cyclosporin microemulsion in primary SPK transplantation: 3-year results of the Euro-SPK 001 trial. *Nephrol Dial Transplant.* 2005, 20 (Suppl 2):3.
46. **Margreiter R, Malaise J, Pratschke J, et al.** Sirolimus versus mycophenolate mofetil in tacrolimus based primary simultaneous pancreas-kidney (SPK) transplantation: 6-months results of a multicenter trial. *Am J Transplant.* 2006, 6 (Suppl 2):105.
47. **Viscount HB, Eid AJ, Espy MJ, et al.** Polyomavirus polymerase chain reaction as a surrogate marker of polyomavirus-associated nephropathy. *Transplantation.* 2007, 84:340.
48. **Yeo FE, Yuan CM, Swanson SJ, et al.** The prevalence of BK polyomavirus infection in outpatient kidney transplant recipients followed in a single center. *Clin Transplant.* 2008, 22:532.
49. **Hirsch HH, Ramos E.** Retransplantation after polyomavirus-associated nephropathy: Just do it? *Am J Transplant.* 2006, 6:7-9.

50. **Womer KL, Meier-Kriesche HU, Patton PR, et al.** Preemptive retransplantation for BK virus nephropathy: successful outcome despite active viremia. *Am J Transplant.* 2006, 6(1):209-13.
51. **Al Jedai AH, Honaker MR, Trofe J, et al.** Renal allograft loss as the result of polyomavirus interstitial nephritis after simultaneous kidney-pancreas transplantation: Results with kidney retransplantation. *Transplantation.* 2003, 75:490–494.
52. **Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Hirsch HH, et al.** Histological patterns of polyomavirus nephropathy: Correlation with graft outcome and viral load. *Am J Transplant.* 2004, 4:2082–2092.
53. **Funk GA, Steiger J, Hirsch HH.** Rapid dynamics of polyomavirus type BK in renal transplant recipients. *J Infect Dis.* 2006, 193(1):80-7.

8 Seznam publikací

8.1 Publikace týkající se tématu dizertační práce

8.1.1 Články

1. **Mindlova M**, Boucek P, Saudek F, Jedinakova T, Voska L, Honsova E, Lipar K, Adamec M, Hirsch HH. **Kidney retransplantation following graft loss to polyoma virus-associated nephropathy: an effective treatment option in simultaneous pancreas and kidney transplant recipients.** Transpl Int. 2008 Apr;21(4):353-6. IF 2008: 3,115
2. **Mindlova M**, Boucek P, Saudek F, Skibova J, Jedinakova T, Lipar K, Adamec M, Hirsch HH. **Prevalence and risk factors of polyomavirus-BK replication in simultaneous pancreas/kidney transplant recipients from a single transplant center.** Clin Transplant – přijato k publikaci 5.4.2011.

IF 2009: 2.004

8.1.2 Přednášky a postery na kongresech a sympóziích

1. **PREVALENCE OF BK-VIREMIA AND VIRURIA IN SIMULTANEOUS PANCREAS/KIDNEY TRANSPLANT (SPK) RECIPIENTS.**
Mindlova M, Boucek P, Saudek F, Jedinakova T, Voska L, Honsova E, Lipar K, Adamec M, Hirsch HH.
13 th Congress of the European Society for Organ Transplantation, 30 September - 3 October 2007, Prague, Czech Republic, Poster presentation
2. **RETRANSPLANTATION FOR POLYOMAVIRUS-ASSOCIATED NEPHROPATHY IN SIMULTANEOUS PANCREAS/KIDNEY TRANSPLANT (SPK) RECIPIENTS: A SINGLE CENTRE EXPERIENCE.**
Boucek P, **Mindlova M**, Saudek F, Jedinakova T, Voska L, Honsova E, Lipar K, Adamec M, Hirsch HH.
CTS-IPITA-IXA 2007 Joint Conference, September 15 - 20, 2007, Minneapolis, MN.
Poster presentation
3. **PREVALENCE OF BK-VIREMIA AND VIRURIA IN SIMULTANEOUS PANCREAS/KIDNEY TRANSPLANT (SPK) RECIPIENTS.**
Boucek P, **Mindlova M**, Saudek F, Jedinakova T, Voska L, Honsova E, Lipar K, Adamec M, Hirsch HH.
CTS-IPITA-IXA 2007 Joint Conference, September 15 - 20, 2007, Minneapolis, MN.
Poster presentation

4. **PREVALENCE OF BK-VIREMIA AND VIRURIA IN SIMULTANEOUS PANCREAS/KIDNEY TRANSPLANT (SPK) RECIPIENTS.**
Boucek P, **Mindlova M**, Saudek F, Jedinakova T, Voska L, Honsova E, Lipar K, Adamec M, Hirsch HH.
XXII. Congress of the International Transplant Society, 10-14 August 2008, Sydney, Australia.
Oral presentation

5. **NÍZKÁ PREVALENCE A INCIDENCE BK-VIRÉMIE A VIRURIE U PACIENTŮ PO KOMBINOVANÉ TRANSPLANTACI LEDVINY A PANKREATU V IKEM.**
Mindlova M, Boucek P, Saudek F, Jedinakova T, Voska L, Honsova E, Lipar K, Adamec M, Hirsch HH. II. Českosloveský transplantační kongres, 10.-12.9.2008, Starý Smokovec, přednáška

6. **LOW PREVALENCE OF BK-VIREMIA AND VIRURIA IN SIMULTANEOUS PANCREAS/KIDNEY TRANSPLANT RECIPIENTS IN A SIGLE CENTRE.**
Mindlova M, Boucek P, Saudek F, Jedinakova T, Voska L, Honsova E, Lipar K, Adamec M, Hirsch HH. 28th Workshop of the AIDPIT Study Group, January 25-27, 2009, congresspark igls, Innsbruck- Igls, Austria, Poster presentation

7. **BK virus infection in simultaneous pancreas-kidney transplant recipients.**
Boucek P, **Mindlova M**, Saudek F, Skibova J, Jedinakova T, Lipar K, Adamec M, Hirsch H. Joint Meeting of the International-Pancreas-and-Islet-Transplant-Association/International Xenotransplantation-Association. Venice, ITALY, OCT 12-16, 2009, poster presentation

8.2 Publikace, které přímo nesouvisejí s tématem dizertační práce

8.2.1 Články

1. Koblas T, Zacharovová K, Berková Z, **Mindlová M**, Girman P, Dovolilová E, Karasová L, Saudek F. **Isolation and characterization of human CXCR4-positive pancreatic cells**. Folia Biol (Praha). 2007;53(1):13-22. IF 2007: 1,140
2. **MINDLOVÁ M, SAUDEK F. Autonomní selhání způsobené recidivujícími hypoglykémiemi, jeho klinické hodnocení a terapie**. Prakt. Lék. 2007, 87, No. 1, pp. 52-57
3. Saudek F., Girman P., Kříž J., Berková Z., Zacharovová K., Koblas T., Pektorová L., Vávrová E., **Mindlová M.**, Habart D., Peregrin J., Lipár K., Oliverius M., Dovolilová E., Číhalová E., Bobek V. **Léčba diabetu transplantací izolovaných Langerhansových ostrůvků**. Čas. Lék. čes., 2011, 150, pp. 49-55.

8.2.2 Přednášky a postery na kongresech a sympóziích

1. **Izolace a charakterizace CXCR-4 pozitivních pankreatických buněk**. Koblas T., Zacharovová K., Girman P., Berková Z., **Mindlová M.**, Kříž J., Dovolilová E., Saudek F. I.československý transplantační kongres, 16.-18.11. 2006, Brno, Poster
2. **ULTRASTRUKTURNÍ ANALÝZA ZNAČENÍ POTKANÍCH LANGERHANSOVÝCH OSTRŮVKŮ SUPERPARAMAGNETICKÝMI PARTIKULEMI**. Zacharovová K., Berková Z., Koblas T., Girman P., **Mindlová M.**, Kříž J., Dovolilová E., Vancová M., Nebesářová J., Saudek F. I.československý transplantační kongres, 16.-18.11. 2006, Brno, Poster
3. **Ultrastructural analysis of islets labelling with superparamagnetic particles**. K.Zacharovova, Z. Berkova, T. Koblas, L. Pektorova, **M. Mindlova**, P. Girman, J. Kriz, E. Dovolilova, M. Vancova, J. Nebesarova, F. Saudek. 26th Workshop of the AIDPIT Study Group, 1st European Diabetes Technology and Transplantation Meeting, 4.- 6.2.2007, Montpellier, France, poster presentation

4. **Islet and pancreas transplantation alone: one center short-term results.**
Girman, P., **Mindlova, M.**, Berkova, Z., Koblas, T., Zacharovova, K., Pektorova, L., Dovolilova, E., Vavrova, E., Koznarova, R., Bobek, V., Adamec, M., Lipar, K., Saudek, F.
44th Annual Meeting of the EASD European Association for the Study of Diabetes. Rome, Italy, 7-11 September 2008
5. **Transplantace Langerhansových ostrůvků v IKEM - technika izolace**
Dovolilová E., Girman P., Berková Z., Zacharovová K., Koblas T., Pektorová L., **Mindlová M.**, Vávrová E., Bobek V., Saudek F.
II.Československý transplantační kongres, 10.-12.9.2008, Starý Smokovec, poster
6. **Transplantace Langerhansových ostrůvků**
Bobek V., Girman P., Zacharovová K., Koblas T., Berková Z., Pektorová L., Dovolilová E., Vávrová E., **Mindlová M.**, Saudek F.
II.Československý transplantační kongres, 10.-12.9.2008, Starý Smokovec, poster
7. **Post-transplant processing of superparamagnetic iron nanoparticles used for islet labeling and MR detection.** Zacharovova K, Berkova Z, Herynek V, Girman P, Koblas T, Pektorova L, **Mindlova M**, Vavrova E, Vancova M, Nebesarova J, Dovolilova E, Bobek V, Saudek F.
Joint Meeting of the International-Pancreas-and-Islet-Transplant-Association/International-Xenotransplantation-Association, Venice, ITALY, OCT 12-16, 2009 , poster presentation
8. **TRANSPLANTACE LANGERHANSOVÝCH OSTRŮVKŮ V IKEM.**
Dovolilová E., Girman P., Kříž J., Berková Z., Zacharovová K., Koblas T., Pektorová L., **Mindlová M.**, Vávrová E., Bobek V., Habart D., Saudek F.
III. československý transplantační kongres, Špindlerův mlýn, 16.-18.9.2010, přednáška
9. **PŘÍPADOVÁ STUDIE PACIENTA S LABILNÍM DIABETES MELLITUS 1. TYPU LÉČENÉHO TRANSPLANTACÍ LANGERHANSOVÝCH OSTRŮVKŮ**
Bobek V., Kříž J., Girman P., Dovolilová E., Číhalová E., Berková Z., Vávrová E., Pektorová L., **Mindlová M.**, Saudek F.
III. československý transplantační kongres, Špindlerův mlýn, 16.-18.9.2010, přednáška