

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovateli povinen řádně ocitovat.



**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



**Bc. Kateřina Blagoevová**

Detekce lidských respiračních DNA virů ve vzorcích dýchacích cest u  
imunokompromitovaných pacientů

Detection of human respiratory DNA viruses in the respiratory tract  
samples of immunocompromised patients

Diplomová práce

Školitel: MUDr. Petr Hubáček, PhD.

Praha, 2015



**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 4. 5. 2015

.....  
Kateřina Blagoevová

## **Poděkování**

Ráda bych poděkoval hlavně svému školiteli MUDr. Petru Hubáčkovi, Ph.D. za jeho trpělivé a obětavé vedení při experimentální práci i během vlastního sepisování diplomové práce, za jeho cenné rady a připomínky a stále milý přístup. Dále bych zde ráda poděkovala kolektivu virologické laboratoře ve Fakultní nemocnici v Motole za pomoc a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině za velkou podporu během celého studia.

Práce vznikla za finanční podpory projektu Institucionální podpory FN Motol (MZ ČR – RVO, FN v Motole 00064203).

## **Abstrakt**

Onemocnění respiračního traktu patří k nejběžnějším onemocněním vyskytujícím se v dětské i dospělé populaci po celém světě. Nejčastěji je způsobováno viry. U zdravých imunokompetentních jedinců je průběh onemocnění způsobeného infekcí respiračních virů zpravidla bez větších komplikací. Jinak je tomu u imunokompromitovaných pacientů, jako jsou například pacienti po transplantacích, které i běžné infekce mohou ohrožovat na životě. Polyomaviry KI (KIPyV) a WU (WUPyV) a lidský bocavirus (HBoV) jsou nejčastěji detekovány v respiračních vzorcích od dětí s akutním respiračním onemocněním a u imunosuprimovaných pacientů, nicméně jejich patogenese je stále nejasná. V této práci bylo retrospektivně testováno na přítomnost KIPyV, WUPyV a HBoV pomocí kvantitativní real-time PCR 822 (745 od dospělých a 77 od dětí) vzorků z dýchacích cest od 380 (326 dospělých a 54 dětí) imunokompromitovaných pacientů a 84 vzorků periferní krve. Nejčastěji se vyskytoval HBoV (6,32 % pozitivních pacientů), dále KIPyV (5,79 % pozitivních pacientů) a WUPyV (0,53 % pozitivních pacientů). Pouze HBoV byl současně detekován i v několika vzorcích krve. Studie potvrdila výskyt polyomavirů WU a KI a lidského bocavirus v české populaci a to u dětských i dospělých imunosuprimovaných pacientů.

### **Klíčová slova:**

respirační virus, lidský bocavirus, HBoV, lidský polyomavirus KI, KIPyV, lidský polyomavirus WU, WUPyV, herpesvirus, transplantace, transplantace, imunokompromitovaný hostitel

## **Abstract**

Respiratory tract diseases are of the most common infectious diseases among both children and adult population all over the world. Viruses are the most frequent cause of respiratory diseases. In healthy immunocompetent individuals respiratory infection proceeds mostly without major complications. Immunocompromised hosts, for example patients after transplantation, are more susceptible to infection and even common infection may be life threatening for them. Human polyomaviruses KI (KIPyV) and WU (WUPyV) and human bocavirus (HBoV) are most frequently detected in the respiratory tract of patients with acute respiratory tract infection primarily in children and in immunosuppressed patients. However, clear causative link between presence of these viruses and the respiratory disease has not been established. In this retrospective study were tested by quantitative real-time PCR 822 (745 from adults and 77 from children) respiratory samples from 380 immunocompromised patients included 326 adults and 54 children. Viruses were also detected in the 84 peripheral blood samples. The most frequently detected virus was HBoV (6,32 % positive patients), followed by KIPyV (5,79 % positive patients) and WUPyV (0, 53 % positive patients). Only HBoV was detected in blood samples. The study confirmed the presence of KI and WU polyomaviruses and human bocavirus in the pediatric and adult immunosuppressed Czech population.

### **Key words:**

respiratory virus, human bocavirus, HBoV, human polyomavirus KI, KIPyV, human polyomavirus WU, WUPyV, herpesvirus, transplant, immunocompromised host



## Obsah

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 1       | Úvod .....  | 12 |
| 2       | Přehled literatury.....   | 14 |
| 2.1     | Respirační infekce.....   | 14 |
| 2.1.1   | Respirační viry .....   | 15 |
| 2.1.2   | Nové respirační viry .....  | 15 |
| 2.2     | Imunokompromitovaný pacient.....  | 17 |
| 2.3     | Transplantace plic.....   | 18 |
| 2.4     | Transplantace hematopoetických kmenových buněk .....                    | 22 |
| 2.5     | Lidský bocavirus .....  | 24 |
| 2.5.1   | Objevení lidského bocaviru .....  | 24 |
| 2.5.2   | Virologie.....  | 25 |
| 2.5.2.1 | Struktura .....   | 25 |
| 2.5.2.2 | Replikace.....  | 25 |
| 2.5.2.3 | Epizómy.....  | 26 |
| 2.5.3   | Patogeneze.....   | 26 |
| 2.5.4   | <i>In vitro</i> model .....   | 27 |
| 2.5.5   | Epidemiologie .....   | 27 |
| 2.5.6   | Klinický obraz.....   | 28 |
| 2.5.6.1 | Lidský bocavirus a onemocnění respiračního traktu.....                  | 28 |
| 2.5.6.2 | Lidský bocavirus a gastroenteritida .....                               | 30 |
| 2.5.6.3 | Imunosuprimovaní pacienti a HBoV infekce .....                          | 30 |
| 2.5.7   | Přenos .....  | 30 |
| 2.5.8   | Léčba a prevence .....  | 31 |
| 2.5.9   | Diagnostika .....   | 31 |
| 2.6     | Polyomaviry KI a WU .....   | 33 |
| 2.6.1   | Objevení polyomavirů KI a WU .....                                      | 33 |
| 2.6.2   | Virologie.....  | 34 |
| 2.6.3   | Epidemiologie a diagnostika.....  | 35 |
| 2.6.4   | Klinický obraz.....   | 37 |
| 2.6.4.1 | Imunokompetentní pacienti a infekce lidským polyomavirem KI a WU .....  | 38 |
| 2.6.4.2 | Imunokomprimovaní pacienti a infekce lidským polyomavirem KI a WU ..... | 38 |
| 2.6.5   | Léčba.....  | 39 |
| 3       | Cíle práce .....  | 40 |
| 4       | Materiál a metody .....   | 41 |
| 4.1     | Použitý biologický materiál .....                                       | 41 |
| 4.2     | Detekované respirační viry:.....  | 42 |
| 4.3     | Izolace DNA .....   | 43 |
| 4.4     | Primery a sondy .....   | 43 |
| 4.5     | Roztoky.....  | 44 |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 4.6     | Klonování DNA.....   | 44 |
| 4.7     | Detekce virů pomocí real-time PCR .....                              | 47 |
| 4.7.1   | Princip metody real-time PCR .....                                   | 47 |
| 4.7.2   | Sestrojení standardizačních křivek.....                              | 49 |
| 4.7.3   | Ředění primerů a sond.....   | 50 |
| 4.7.4   | Optimalizace real-time PCR .....                                     | 50 |
| 4.7.4   | Testování specifity a senzitivity reakce .....                       | 51 |
| 4.7.4.1 | Specifita .....  | 51 |
| 4.7.4.2 | Senzitivita .....  | 52 |
| 4.7.5   | Detekce respiračních virů.....                                       | 53 |
| 4.7.6   | Detekce respiračních virů v krvi.....                                | 53 |
| 4.8     | Rozřazení podtypů HBoV 1, HBoV 2, HBoV 3 a HBoV 4.....               | 54 |
| 4.8.1   | Agarózová gelová elektroforéza .....                                 | 57 |
| 5       | Výsledky .....   | 58 |
| 5.1     | Tvorba kalibračních křivek.....                                      | 58 |
| 5.2     | Detekovaný výskyt HBoV .....   | 59 |
| 5.3     | Detekovaný výskyt KIPyV .....  | 61 |
| 5.4     | Detekovaný výskyt WUPyV .....  | 63 |
| 5.5     | Detekce vzorků periferní krve na přítomnost HBoV, KIPyV, WUPyV ..... | 67 |
| 5.6     | Rozřazení HBoV podtypů 1, 2, 3 a 4 .....                             | 69 |
| 6       | Diskuze .....  | 70 |
| 7       | Souhrn .....   | 76 |
| 8       | Seznam použité literatury.....                                       | 77 |
| 9       | Přílohy .....  | 92 |

## Seznam zkratek

|           |   |
|-----------|---|
| ADV       | adenovirus  |
| BKPyV     | lidský polyomavirus BK                              |
| CMV       | cytomegalovirus                                     |
| EBV       | virus Epstein-Barrové                               |
| ETR       | aspirát z endotracheální kanyly                     |
| HBoV      | lidský bocavirus                                    |
| HBoV 1- 4 | podtypy lidského bocaviru 1- 4                      |
| HHV 6     | lidský herpes virus 6                               |
| HHV 7     | lidský herpesvirus 7                                |
| HSCT      | trasnplantace hematopoetických kmenových buněk      |
| HSV       | herpes simplex virus                                |
| JCPyV     | lidský polyomavirus JC                              |
| KIPyV     | lidský polyomavirus KI                              |
| MCPyV     | polyomavirus z Merkelových buněk                    |
| NP1, NS1  | nestrurní proteiny lidského bocaviru                |
| ORF       | otevřený čtecí rámec                                |
| TAg       | velký tumorogenní antigen polyomavirů               |
| tAg       | malý tumorogenní antigen polyomavirů                |
| TSPyV     | polyomavirus asociovaný s Trichodysplasia spinulosa |
| VP1       | strukturní protein virové kapsidy polyomavirů       |
| VP2       | strukturní protein virové kapsidy polyomavirů       |
| VZV       | varicella zoster                                    |
| WUPyV     | lidský polyomavirus WU                              |

# 1 Úvod

Lidské virové respirační patogeny jsou známy již řadu let. Tvoří velmi početnou skupinu lišící se například v morfologii virionu, typu nukleové kyseliny, ale také v míře závažnosti onemocnění. Průběh a závažnost onemocnění nezáleží pouze na viru samotném, ale i na imunitním systému hostitele. Zejména imunosuprimovaní nebo imunodeficientní jedinci, u kterých, už z jakéhokoliv důvodu, nefunguje správně imunitní systém, jsou znevýhodněni a mnohem více ohroženi než zdraví jedinci. Mezi i takto imunokompromitované pacienty patří, mimo jiné, také pacienti po transplantacích, či pacienti v těžkém klinickém stavu z různých příčin. Zatímco na horší funkci imunity u pacientů v těžkém klinickém stavu se podílí zejména metabolický stav pacienta, u pacientů po transplantacích je imunitní systém kvůli možné rejekci štěpu pod silnými dávkami imunosupresivních léků, které tlumí vlastní obranyschopnost organismu. Proto jsou takoví pacienti mnohem náchylnější k bakteriálním a virovými infekcím. Bakteriálním infekcím se relativně účinně předchází hygienickými opatřeními nebo podáváním širokého spektra antibiotik. Virové infekce jsou k léčbě obtížnější, jelikož na některé virové infekce nejsou žádná virostatika k dispozici nebo mají závažné vedlejší účinky. Mezi až života ohrožující virové infekce u takových pacientů pak patří i běžné virové infekce, které u zdravých lidí mají bezpříznakový nebo pouze lehký průběh. Tyto běžné viry mohou mít pro pacienta po transplantaci fatální následky. Jedinou cestou, jak toto nebezpečí snížit či eliminovat, je časná detekce viru a odpovídající terapie.

Tato diplomová práce se zabývá detekcí nově objevených respiračních virů u pacientů po transplantaci plic, hematopoetických kmenových buněk a menší skupiny imunokompromitovaných pacientů léčených chemoterapií v rámci onkologické léčby, či v závažném klinickém stavu s umělou plicní ventilací a jejich patogenní role. Konkrétně se jedná o lidský bocavirus z čeledi *Parvoviridae* a dva lidské polyomaviry KI a WU z čeledi *Polyomaviridae*. O všech třech zmíněných virech se i přes relativně četné vědecké publikace ví poměrně málo a to zejména co se týká jejich patogeneze a klinických symptomů, které vyvolávají. Dle dostupných informací infikují všechny věkové kategorie, převážně však dětskou populaci. U zdravých imunokompetentních

jedinců mají infekce pouze lehký či asymptomatický průběh bez závažnějších komplikací, na rozdíl od imunosuprimovaných pacientů, u kterých byl zaznamenán těžší průběh s častým výskytem pneumonií a to zejména u dětí. Ve výjimečných případech docházelo i k úmrtí pacienta. Nejčastěji jsou tyto viry detekovány v respiračním traktu, nicméně kvůli častým koinfekcím, vyskytující se zároveň s bocavirovou či polyomavirovou infekcí a jejich výskytu i u asymptomatických pacientů je patogenní vliv na hostitele stále polemizován a čeká na jasný průkaz. Tato práce se pokouší přispět k objasnění patogenese zmíněných virů a zároveň patří k prvním pracím informujícím o epidemiologii těchto virů u imunokomprimovaných pacientů v České republice.

## 2 Přehled literatury

### 2.1 Respirační infekce

Respirační infekce jsou onemocnění především sezonního charakteru postihující dětskou a dospělou populaci. Zahrnují jak lehká onemocnění, tak život ohrožující stavy. Převážná většina těchto infekcí je virového původu.

Onemocnění dýchacích cest se dělí podle místa postižení na onemocnění horních cest dýchacích a dolních cest dýchacích. Všeobecně platí, že závažnost se zvyšuje, čím více se infekce blíží dolním dýchacím cestám, tedy k plicím. Zaujímají významné postavení v souvislosti se svojí vysokou incidencí díky snadné cestě šíření probíhající vzdušnou cestou, přímým kontaktem nebo kapénkovou infekcí (kýčání, kašláni). Patří mezi nejčastější onemocnění lidí na celém světě, postihují všechny věkové kategorie a jsou nejčastější příčinou pracovní neschopnosti a absence dětí ve školním a předškolním zařízení. Pouze v ČR bývá ročně hlášeno 5-6 milionů těchto onemocnění. V průměru onemocní respirační infekcí dospělý člověk třikrát až pětkrát ročně, zatímco děti onemocní pětkrát až devětkrát za rok ([www.szu.cz](http://www.szu.cz)). Inkubační doba je krátká, zpravidla několika dnů. Často se označují jako nemoci z nachlazení, i když nemoci způsobují infekční agens, nikoli nízká teplota.

Původci infekcí dýchacích cest mohou být bakterie, mykotické organismy nebo viry. Nejčastěji napadají dýchací cesty viry, které způsobují lokální záněty jednotlivých orgánů, např. nosohltanu, středního ucha nebo průdušek. Méně časté jsou infekce způsobené bakteriemi, které často nasedají na virem poškozenou sliznici a tím komplikují probíhající virové onemocnění. Tato diplomová práce je zaměřena na respirační viry budu se tedy dále věnovat pouze virům.

### 2.1.1 Respirační viry

Dýchací trakt mohou infikovat jak RNA viry, tak DNA viry. Způsobují širokou škálu obtíží, kdy rozsah onemocnění závisí na určitém druhu viru, ale také na věku a stavu imunitního systému infikovaného jedince. Infekce způsobené respiračními viry mají společné vlastnosti zahrnující: krátkou inkubační dobu, přenos z člověka na člověka a schopnost vzniku epidemie v komunitách. Příkladem mohou být viry chřipky coby prototypy těchto virů, způsobující každoročně epidemie vedoucí ke zvýšenému počtu pneumonií, hospitalizací a úmrtnosti. Infekce jedinců jednotlivými respiračními viry závisí na lokální epidemické situaci a mění se v průběhu roku. Mezi nejčastější viry infikující člověka patří rhinoviry, adenoviry, koronaviry, lidský respirační syncytiální virus, influenza virus A a B a viry parainfluenzy.

U imunokompetentních pacientů způsobují respirační viry většinou pouze onemocnění horních cest dýchacích a tracheobronchiální oblasti. Léčba je zpravidla pouze symptomatická, a pokud se nevyskytnou komplikace, pacient ji zvládne sám, bez lékařského zásahu. Závažnější případy mohou vznikat u pacientů imunokompromitovaných. Zde je vyšší riziko rozšíření infekce do dolních dýchacích cest a následnému vzniku pneumonie. Vznik pneumonií způsobují běžné respirační viry u různých skupin imunokompromitovaných pacientů zahrnující pacienty po transplantaci orgánů, kostní dřeně, u pacientů po protinádorové chemoterapii nebo u pacientů s defekty imunity. Pokud dojde u těchto pacientů k rozvoji pneumonie, pak je respirační selhání časté a mortalita vysoká. U takových případů je nutné nasazení virostatik popřípadě antibiotik pokud se k virové infekci přidá i infekce bakteriální. (Rabella *et al.* 1999; Palmer *et al.* 1998; Whimbey *et al.* 1996; Matar *et al.* 1999; Whimbey *et al.* 1997).

### 2.1.2 Nové respirační viry

Diagnostika respiračních virových infekcí začala v roce 1933, kdy byl prvně objeven virus chřipky A, následně byly objeveny i další respirační viry: virus coxsackie (1948), echovirus (1951), adenovirus (1953), respirační syncytiální virus (RSV) (1956), rhinovirus (1956), virus parainfluenzy (1956) a koronavirus (1965).

V 90. letech 20. století se začala používat metoda polymerázové řetězové reakce (PCR, polymerase chain reaction) a díky ní byla objevena další škála lidských respiračních virů. V roce 2001 byl objeven lidský metapneumovirus , následoval objev nových koronavirů, lidského bocaviru (HBoV), lidského rhinoviru skupiny C a D a polyomavirů Karolinska Institutet (KIPyV) a Washington University (WUPyV) (Nishizawa *et al.* 1997; van den Hoogen *et al.* 2001; Drosten *et al.* 2003; van der Hoek *et al.* 2004; Allander *et al.* 2005; Gaynor *et al.* 2007; Lee *et al.* 2007a; Arden *et al.* 2010). Všechny tyto nové viry se vyskytují v celosvětovém měřítku a postihují všechny věkové kategorie. Nejčastěji se ale týkají dětí a imunokompromitovaných jedinců, u kterých mohou vyvolat fatální následky. Jsou známy i závažné epidemie v zařízeních dlouhodobé péče. Dosud není k dispozici žádná specifická léčba či očkování jednotlivých viróz, každopádně časný průkaz virového patogena je důležitý pro izolaci infikovaných pacientů v nemocnicích nebo v zařízeních dlouhodobé péče a tím zamezit další šíření infekce mezi pacienty (Louie *et al.* 2005; Hicks *et al.* 2006; Boivin *et al.* 2007; Omura *et al.* 2009).



## 2.2 Imunokompromitovaný pacient

Protože tato práce je zaměřená na detekci virů u imunokompromitovaného pacienta, je třeba, zmínit se o tom, v jakých skupinách můžeme zmíněného pacienta nalézt. Imunokompromitovaný pacient je obecně vystaven vyššímu riziku infekčních, často respiračních, komplikací. Důvodem je různý stupeň nefunkčnosti imunitního systému. Mimo stavů, u kterých je vliv na imunitní systém pacienta zcela zřejmý, jako jsou pacienti procházející léčbou maligního onemocnění s chemoterapií, či pacienti, kteří dostávají imunosupresivní léčbu pro své autoimunitní onemocnění je poměrně široká skupina pacientů, u nichž je horší funkce imunitního systému zpravidla přehlížena v rámci jiného interního onemocnění, jako je například cukrovka, případně v rámci jejich těžkého klinického stavu, který vede ke zhoršení metabolického stavu a tak ke zhoršení funkcí imunitního systému. Mezi takové pacienty patří často například pacienti na umělé plicní ventilaci.

Poslední skupinou pacientů, u kterých je známa vyšší vnímavost k infekcím, často virovým, jsou těhotné ženy a novorozenci a malé děti. Zatímco v prvním případě se jedná o fyziologické snížení reaktivity imunitního systému s ohledem na přežití vyvíjejícího se plodu, v druhém případě jde o nedostatečnou dozrálou imunitního systému, která se s věkem zlepšuje a která je, zejména v nejmenším věku, významně podporována přenesenými mateřskými protilátkami.

Většina pacientů v této práci však prošla transplantací plic, nebo hematopoetických kmenových buněk a proto se níže více zaměřím na tyto transplantace (Crowe *et al.* 2001, Bartáková *et al.* 2005, Gauri a Gant 2015).

## 2.3 Transplantace plic

První transplantace plic byla provedena v USA Dr. Jamesem Hardym v roce 1963. I přesto, že pacient zemřel po 18 dnech, byla tato transplantace velmi přínosná pro budoucí vývoj. Hardy tímto ukázal možné provedení a využitelnost této metody a tím rozšířil celosvětový zájem o transplantace.

Skutečný rozvoj této metody nastal po objevení cyklosporinu A. Tento objev se připisuje týmu vedeným profesorem Jeanem Borelem v roce 1970. Tato látka vykazovala silné imunosupresivní účinky a tím představovala zásadní převrat v transplantační medicíně (Borel 2002). Ke klinickému využití byl cyklosporin připraven až v roce 1978, kdy ho prvně na lidech testoval britský chirurg Sir Roy Y. Calne (Calne *et al.* 1979). Zavedení cyklosporinu do transplantologické praxe znamenalo zcela zásadní zlepšení krátkodobých a dlouhodobých výsledků, neboť významně poklesl počet rejekcí a došlo k prodloužení přežívání pacientů.

Dnes je transplantace plic zavedenou klinickou metodou, která pacientům s jinak nevléčitelným a většinou smrtelným onemocněním umožňuje dlouhodobé přežití a současně výrazné zlepšení kvality života. Je ale důležité si uvědomit, že transplantace je velmi rozsáhlý chirurgický zákrok, který sebou nese velká rizika. Než tedy dojde k rozhodnutí o zařazení pacienta na čekací listinu, musí být vyčerpány všechny možné dostupné léčby. Pacienti, kteří jsou doporučeni k operaci, jsou v konečném stádiu plicního onemocnění a zároveň riziko blízké smrti je vyšší než riziko z úmrtí po operaci. Navíc však jejich celkový zdravotní stav nesmí ohrozit dlouhodobý úspěch a přežití po náročné operaci. Je nutné si uvědomit, že ani po transplantaci nebude pacient žít „normální“ život, jelikož nastává zavazující režim, který zahrnuje doživotní imunosupresivní léčbu se všemi nežádoucími účinky, infekční komplikace, rejekce, cukrovku, pravidelné kontroly atd. (Orens *et al.* 2006).

Podstatou transplantace je chirurgický zákrok, který z těla příjemce odstraní plíce nemocné a nahradí je zdravými plícemi dárce. Transplantace plic se provádí jednostranná nebo oboustranná. U jednostranné se transplantuje pouze jedna plíce, je jednodušší a představuje pro pacienta menší zátěž a riziko. U oboustranné transplantace se transplantují plíce obě a provádí se

nejčastěji u opakovaných chronických zánětů. Výjimkou jsou dětští pacienti, zde je možná ještě náhrada plíce jedním lalokem od živého dárce, většinou od jednoho z rodičů (Orens *et al.* 2006).

Transplantace plic a nejenom plic není otázka pouze vyhovujícího příjemce, ale také dárce. Limitujícím faktorem u všech typů transplantací je nedostatek vhodných dárců a funkčních štěpů. Vhodným dárce plic rozumíme pacienta, u kterého byla prokázána smrt mozku, ale jeho plíce a ostatní orgány jsou zachovalé a zůstávají s pomocí intenzivní lékařské péče plně funkční. Dalším důležitým kritériem je velikost plic, která musí odpovídat příjemci a v neposlední řadě kompatibilita AB0 systému příjemce a dárce. Pokud vše souhlasí, můžeme hovořit o vhodném dárci orgánu. Po odběru plic je orgán naložen do speciálního ledového roztoku, ve kterém se převládá k příjemci. Tato doba, od vyjmutí po uložení, nesmí přesahovat dobu 6 hodin, jinak by se nezachovala správná funkce plic. Proto je důležité, aby byly všechny kroky velmi dobře zesynchronizované.

Po operaci následuje velice komplikovaná péče o pacienty, která patří mezi nejsložitější v intenzivní medicíně. Denně se provádí rentgeny plic, vyšetření hladiny imunosupresiv a další laboratorní testy včetně hemokultur a sérologického vyšetření přítomnosti virových či mykotických infekcí, neboť právě infekce jsou nejčastější příčinou morbidit a mortalit vyskytující se v období bezprostředně pooperačním. Po ukončení hospitalizace, která při optimálním průběhu trvá 3 – 4 týdny, jsou pacienti dále ambulantně sledováni v transplantačních centrech. K ambulantním kontrolám dochází z počátku každý týden, později každé 2-3 měsíce. Smyslem těchto kontrol je včas rozpoznat infekce, mimoplicní komplikace a tzv. rejekci, neboli „odmítnutí“, kdy imunitní systém příjemce usiluje o odhojení transplantované plíce, protože dárcovskou plíci rozeznává jako cizorodý materiál. Riziko rejekce a infekčních komplikací je velmi vysoké a udržet rovnováhu rizika těchto spolu souvisejících komplikací může být velmi obtížné a někdy neřešitelné (Lau *et al.* 2004). Mezi dvě hlavní pooperační komplikace způsobující úmrtí pacientů jsou uváděny bronchiolitidy a infekce. Obě tyto komplikace mohou být známkou neadekvátní imunosupresivní terapie, v případě rejekce nižší, v případě vyšší frekvence infekčních komplikací

naopak vyšší imunosupresivní terapie. Protože jsou však plíce vysoce imunogenní orgán, musí být imunosupresivní terapie zpravidla agresivnější, což vede k velkému utlumení imunitního systému a ke vzniku již zmíněných komplikací, které jsou pak příčinou zvýšené morbidity a mortality pacientů (Snell a Westall 2007).

. Ovšem jelikož jsou plíce vysoce imunogenní orgán, musí být imunosupresivní terapie agresivní, což vede k velkému utlumení imunitního systému a ke vzniku již zmíněných komplikací, které jsou pak příčinou zvýšené morbidity a mortality pacientů (Snell a Westall 2007). Infekce plic jsou vyvolávány spektrem patogenů zahrnující bakterie, viry, mykózy a protozoa. Tyto patogeny mohou být zaneseny dárcovským orgánem nebo získány až po operaci. V porovnání s transplantacemi jiných orgánů je riziko infekce po transplantaci plic vyšší a to z následujících důvodů. Dárci jsou před odběrem orgánu napojeni na umělou plicní ventilaci a po operaci jsou příjemci taktéž napojeni na plicní ventilaci a to déle než pacienti jiných transplantovaných orgánů, tím se zvyšuje možnost infekce dýchacích cest. Celkově lze říci, že plíce jsou jako jediný transplantovaný orgán trvale vystaveny vlivům vnějšího prostředí. Další faktory přispívající ke vzniku infekce jsou imunosupresivní léčba, denervace plic, oslabený kašlací reflex a zhoršená mukociliární clearance (odstraňování hlenu řasinkovým epitelem). Mezi nejčastější infekční komplikace patří bakteriální pneumonie, vyskytuje se asi u 10 % příjemců v prvním týdnu po transplantaci (Lischke *et al.* 2003).

Ročně se ve světě provádí asi 2 700 transplantací plic ve 150 specializovaných centrech, z toho asi 2/3 výkonů se provádí v USA, zbytek v Evropě a Austrálii (Trulock *et al.* 2003).

V České republice byl transplantační program zahájen pod vedením Prof. MUDr. Pavla Pafka, DrSc. koncem roku 1997 na 3. chirurgické klinice 1. LF UK ve FN Motol, Praha. V současnosti se v České republice provádí okolo 20 transplantací plic ročně, což jsou výsledky srovnatelné s ostatními vyspělými centry. Od počátku do současnosti bylo v České republice transplantováno celkem 204 pacientů (k 31. 5. 2013), z toho 61 % mužů a 39 % žen. Průměrný věk pacientů v době operace byl 47,2 roku, medián 50,28 roku. Statisticky

nemá pohlaví ani věk vliv na délku přežití pacienta po transplantaci. Jeden rok po transplantaci přežívá 77,8 % pacientů, 5 let přežívá 54,7 % a 33,5 % pacientů přežívá 10 let. Délka přežití se odvíjí zejména od základní diagnózy plicní choroby a také dle celkového stavu organismu. Podle statistiky potřebuje okolo 3-5 pacientů v ČR transplantaci plic na 1 milion obyvatel za rok, čekací doba je v průměru 12 – 18 měsíců. Bohužel až 80–90 % plic je nutno odmítnout pro špatnou funkci v době multiorgánového odběru, a to z důvodů, že využívaný koncept hodnocení funkce plic v České republice je značně nepřesný. Nicméně v posledních letech byla vyvinuta nová metoda normotermické *ex vivo* perfúze plic (EVLP), kdy plíce, které by byly dle dnešního konceptu vyhodnoceny jako nevhodné, mohou být *ex vivo* ventilované a perfundované a v případě zlepšení a stability funkce plic, doporučeny k transplantaci. Příprava programu EVLP v České republice byla již zahájena a v současnosti je připravena na klinické využití ([www.kst.cz](http://www.kst.cz); [www.uzis.cz](http://www.uzis.cz); [www.fnmotol.cz](http://www.fnmotol.cz)).

## 2.4 Transplantace hematopoetických kmenových buněk

Kostní dřeň je krvetvorná tkáň, která vytváří denně velké množství krvinek a krevních destiček. U dospělého člověka je rozložena v kostech osového skeletu: v těle obratlů, lebce, hrudní kosti, lopatkách, pánvi, žebrech a pažní a stehenní kosti (Pecka, 2002). Všechny krevní elementy jsou odvozené od pluripotentní hematopoetické kmenové buňky (Konrádová *et al.* 2000). Dělením kmenové buňky vznikají nové buňky a také tzv. multipotentní buňky, které se vyvíjejí v jednotlivé typy bílých a červených krvinek a krevních destiček (Dylevský *et al.* 2000).

K transplantaci hematopoetických kmenových buněk (HSCT) dochází u pacientů s maligním či nemaligním hematologickým onemocněním, které je jiným způsobem nevyléčitelné. Kmenové buňky jsou získávány z kostní dřeně pánevní kosti nebo z periferní či pupečnickové krve (Klener *et al.* 1999). Aplikují se nitrožilní cestou do krve příjemce a krevním oběhem se dokáží dostat do svých obvyklých míst v kostní dřeni, zde se usadit a začít se množit a vyžrávat v krevní buňky. Podle dárce lze transplantace kostní dřeně rozdělit na: syngenní, autologní a alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk.

U syngenní transplantace je dárce jednovaječné dvojče. Tento typ transplantace má výhodu v tom, že genetická identita nevyvolává odhojování štěpu. U autologní transplantace dochází k transplantaci vlastních kmenových buněk. Nejčastěji se provádí po vysoko dávkované chemoterapii, jelikož vysoké dávky chemoterapeutik vedou ke zničení zárodečných buněk v kostní dřeni pacienta. Kmenové buňky se odebírají od pacienta ještě před zahájením chemoterapie buď z krve, nebo z kostní dřeně a po skončení léčby se pacientovi intravenózně vracejí zpět, aby mohly znovu osídlit kostní dřeň a obnovit tvorbu krve, která byla zničena vysokodávkovanou chemoterapií. Dnes se tento postup zcela běžně užívá u vybraných nádorů krevního původu, jako je mnohočetný myelom, nádory mízních uzlin (lymfomy), některé typy leukémií (které nepostihly přímo základní kmenové buňky), ale i u řady tzv. solidních nádorů (určitá stadia rakoviny prsu, varlat, nádory dětského věku apod.). Přihojení vlastních krvetvorných buněk je u pacienta obvykle bezproblémové a

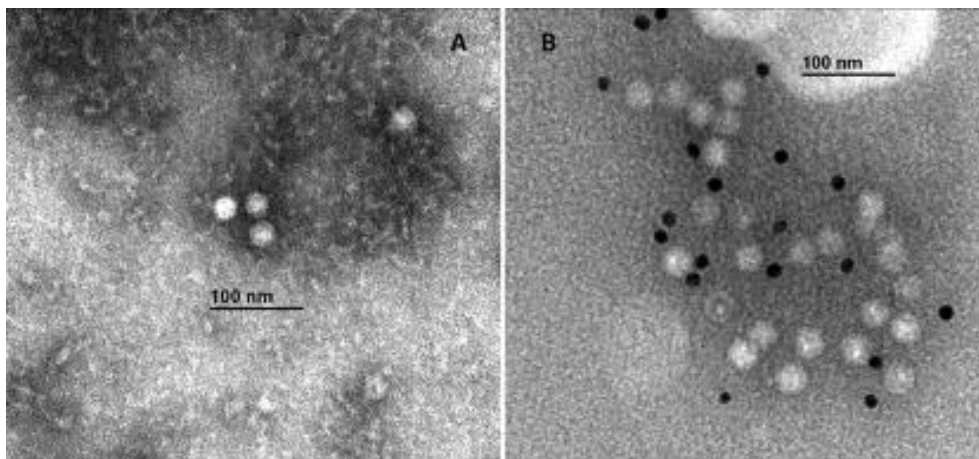
jde o jednodušší proceduru s kratším časem regenerace ve srovnání s transplantací alogenní (Vaňásek *et al.* 1996).

Alogenní transplantace buněk je převod krvetvorných buněk pacientovi od jiného zdravého člověka. Nejčastějším důvodem k alogenní transplantaci jsou některé typy leukémií, vážné krvetvorné útlumy (těžká aplastická anemie, myelodysplastický syndrom), těžké vrozené poruchy obranyschopnosti a látkové přeměny. Jde o složitější proceduru s následnou náročnou ambulantní léčbou. Základem je dostupný vhodný dárce dřeně, jehož HLA systém je kompatibilní s HLA systémem příjemce. Vhodný dárce se nejdříve hledá mezi rodinnými příslušníky, zejména sourozenci. Pokud je hledání v rodině neúspěšné, dochází k hledání dárce v českém nebo mezinárodním registru dárců krvetvorných buněk. Přivykání na cizí kostní dřeň je dlouhodobé a trvá řadu měsíců (Pittrová a Navrátilová, 2009).

## 2.5 Lidský bocavirus

### 2.5.1 Objevení lidského bocaviru

Dlouho dobu byly některé infekce respiračního traktu způsobené virem bez detekovatelného původce. Zlom nastal až s objevem lidského metapneumoviru v roce 2001 (van den Hoogen *et al.* 2001). Vědecká společnost se tak zaměřila na vývoj a zlepšení molekulárních detekčních metod, díky kterým bylo následně objeveno několik dalších virů. Jedním z nich byl i lidský bocavirus, který byl ve Švédsku objeven Tobiasem Allanderem v roce 2005. Prvně byl objeven v nasofaryngeálních vzorcích dětí s respiračním onemocněním (Allander *et al.* 2005). Byl to první virus objevený metodou „molecular virus screening“, speciální metodou vynalezenou k detekci neznámých virových sekvencí. Tato metoda je založena na náhodné amplifikaci, klonování, následným sekvenováním a bioinformačním zpracováním dat. Nově objevený virus byl sekvenčně podobný s virem z čeledi *Parvoviridae*, konkrétně s bovinním parvovirem a psím parvovirem 1. Svoje pojmenování „bocavirus“, dostal sloučením dvou příbuzných parvovirů („bovine“ a „canine“) (obrázek 1) (Allander *et al.* 2005).



Obrázek 1: Snímky HBoV z elektronového mikroskopu

A – snímek HBoV virionů izolovaných z nasofaryngeálního stěru

B – snímek HBoV virionů ve vzorku z nasofaryngeálního stěru kontaminovaným plazmou pacienta

Převzato z: Uršič *et al.* 2011



## 2.5.2 Virologie

### 2.5.2.1 Struktura

Lidský bocavirus patří do čeledi *Parvoviridae*, podčeledi *Parvovirinae* a rodu *Bocavirus*. Vyskytuje se ve 4 podtypech - HBoV 1, HBoV 2, HBoV 3 a HBoV 4. Je to malý neobalený DNA virus s ikosahedrální kapsidou podobnou kapsidám ostatních parvovirů, jako je například lidský parvovirus B19. (Gurda *et al.* 2010). Genom je lineární jednořetězcový, negativní polarity, o velikosti okolo 5kb. Obsahuje tři otevřené čtecí rámce (ORF). První ORF se nachází na 5'konci virové DNA a kóduje nestrukturní protein NS1, jehož funkce není zatím objasněna, ale pravděpodobně se podílí na replikaci viru a aktivaci transkripce virového genomu (Li *et al.* 2013). Následující ORF kóduje druhý nestrukturní protein NP1, který je unikátní pro rod Bocavirus a tak chybí u ostatních parvovirů (Schwartz *et al.* 2002). Pravděpodobně hraje důležitou roli při aktivaci transkripce a regulaci exprese zánětlivých cytokinů (Li *et al.* 2013). Třetí ORF se nachází na 3'konci DNA a kóduje dva strukturní proteiny virové kapsidy, VP1 a VP2. Podobnost proteinů VP1 a VP2 u lidského bocavirus a bocavirus psího a bovinního je 42 % a 43 % (Allander *et al.* 2005). Podtypy HBoV 2, 3 a 4 mají stejnou organizaci genomu jako HBoV 1 a sekvenčně se od HBoV 1 odlišují z 10 %-40 % (Kapoor *et al.* 2010).

Dle fylogenetických studií existuje na světě jen jedna linie HBoV, složená ze dvou mírně odlišných genotypů. Největší genetická variabilita byla pozorována u genů pro proteiny virové kapsidy VP1 a VP2, zatímco nejnižší variabilita byla pozorována u sekvencí genů pro nestrukturní proteiny NS1 a NP1 (Schildgen *et al.* 2008). Jeho přirozeným a pravděpodobně jediným hostitelem je člověk, protože dosud nebyly publikovány žádné studie, ve kterých by HBoV infikoval jiné savce.

### 2.5.2.2 Replikace

Replikace HBoV není zatím zcela známá, nicméně v poslední době se uvažuje nad dvěma možnými mechanismy replikace. První možný mechanismus replikace je tzv. "rolling hairpin", který se vyskytuje u většiny známých parvovirů (Lusebrink *et al.* 2011, Kapoor *et al.* 2011), druhou možností je replikace pomocí valivé kružnice („rolling circle“). Aby ale fungoval tento mechanismus je zapotřebí pomocný virus, který dokáže iniciovat replikaci.

Pomocnými viry mohou být herpesviry nebo polyomaviry, neboť obě tyto skupiny virů „pomáhají“ při replikaci Dependovirům, příbuzným virům z čeledi *Parvoviridae* neschopných se replikovat autonomně (Fisher a Mayor 1991, Thomson *et al.* 1994, Farkas *et al.* 2004, Geoffroy a Salvetti 2005, Alazard *et al.* 2009, Streiter *et al.* 2011). Jelikož je HBoV často detekován s dalšími viry, je tato možnost velmi pravděpodobná. Nicméně HBoV byl úspěšně kultivován v buněčných kulturách i bez pomoci jiného viru (Dijkman *et al.* 2009). Můžeme tedy usuzovat, že HBoV dokáže bez pomoci jiných virů infikovat hostitele, pokud ale dojde k infekci hostitele dalším virem je HBoV schopný změnit svoji replikační strategii (Streiter *et al.* 2011).

### **2.5.2.3 Epizómy**

V roce 2011 byla publikována první studie o výskytu genomu HBoV 1 a HBoV 3 v podobě cirkulárně uzavřených epizómů. Epizómy byly detekovány ve střevním epitelu u dětí s gastroenteritidou. Výskyt bocaviru v podobě epizómů poukazuje buď na mechanismus perzistence viru v infikované hostitelské buňce, nebo na meziprodukt replikace (Kapoor *et al.* 2011). Výskyt epizómů byl publikován i v dalších studiích z Číny (Zhao *et al.* 2012, Yang *et al.* 2012) a z USA (Li *et al.* 2013). Je tedy pravděpodobné, že se virus vyskytuje v této podobě v infikovaném hostiteli, kde nějakou dobu přetrvává. Tímto si můžeme vysvětlovat i časté nálezy viru u asymptomatických pacientů. Uvažuje se i možné reaktivaci těchto „spících“ genomů jinými viry, jelikož koinfekce jsou u HBoV pozitivních pacientů mnohem častější než u jiných respiračních a gastrointestinálních patogenů (Kesebir *et al.* 2006, Fry *et al.* 2007, Kantola *et al.* 2008).

### **2.5.3 Patogeneze**

V současné době máme málo informací ohledně patogenese lidského bocavirus. Hlavním důvodem je chybějící zvířecí model a častý výskyt HBoV s dalšími respiračními viry (Dijkman *et al.* 2009). Nicméně model jeho patogenity můžeme na základě výzkumů infikovaných buněčných kultur připodobnit modelu patogenese psího parvoviru, ten vstupuje do hostitele skrze respirační trakt, kde se množí, dostává se do krve a vstupuje do gastrointestinálního traktu prostřednictvím krevního řečiště nebo požitím. Viriony jsou dále šířeny kašláním nebo defekací (Tijssen 1999). Tento model

souhlasí s dosud známými informacemi ohledně patogenity HBoV. I přes nejasnou patogenitu tohoto viru se v současné době používají v klinické diagnostice komerční kity, které zahrnují kromě jiných virů i detekci HBoV.

#### **2.5.4 *In vitro* model**

Teprve v roce 2009 byl zaveden funkční *in vitro* model pro HBoV (Dijkman *et al.* 2009). Dříve byly používány buněčné kultury LLC-MK2 Hep-2, Vero, a MRC-5, ty však nebyly HBoV permissivní, tudíž se v nich virus nemnožil (Foulongne *et al.* 2006, Ma *et al.* 2006, Zhang *et al.* 2008). Dnes je virus kultivován v epitelových buňkách z dýchacích cest diferencovaných do pseudostratifikovaného epitelu lidského dýchacího systému. Tyto kultury je virus schopný infikovat a replikovat se uvnitř buněk (Dijkman *et al.* 2009). U infikovaných buněk dochází ke ztrátě povrchových řasinek, k rozrušení těsných spojů („tight junctions“) mezi buňkami a ke ztenčení epitelu v porovnání s neinfikovanými buněčnými kulturami (Deng *et al.* 2013). Tento *in vitro* model by mohl v budoucnu pomoci k objasnění mnohých nejasností týkajících se lidského bocavirus a jeho patogeneze.

#### **2.5.5 Epidemiologie**

Lidský bocavirus je jedním z nejčastějších patogenů vyskytujících se u respiračních a gastrointestinálních infekcí. Je detekován celosvětově u všech věkových kategoriích. HBoV 1 je nejčastěji detekován v respiračním traktu u pacientů s respiračním onemocněním a ve stolici u pacientů s gastroenteritidou. Dále byl detekován v duodenu (Streiter *et al.* 2011), vedlejších nosních dutinách (Falcone *et al.* 2011) a střevních biopsiích (Kapoor *et al.* 2011). HBoV 2, 3 a 4 jsou detekovány zejména ve stolici a jsou spojovány s gastroenteritidou (Arthur *et al.* 2009, Han *et al.* 2009, Kapoor *et al.* 2009, Shan *et al.* 2009, Chieochansin *et al.* 2010, Chow *et al.* 2010, Kapoor *et al.* 2010, Song *et al.* 2010, Santos *et al.* 2010, Kantola *et al.* 2010, Wang *et al.* 2011, Schildgen *et al.* 2012). HBoV2 je jako jediný z enterických bocavirů (HBoV 2, 3 a 4), detekován kromě vzorků stolice i ve vzorcích z nosohltanu (Han *et al.* 2009, Song *et al.* 2010).

Prevalence HBoV 1 se u pacientů s respiračními symptomy pohybuje okolo 2 % - 19 % pozitivních vzorků z respiračního traktu. HBoV 2, 3 a 4 jsou detekovány nejčastěji ve stolici, z toho nejčastěji je detekován HBoV 2 (21 % -

26 %), dále HBoV 3 (1 %) a nakonec HBoV 4 (0,6 %) (Allander *et al.* 2005, Arnold *et al.* 2006, Choi *et al.* 2006; Kesebir *et al.* 2006, Ma *et al.* 2006, Manning *et al.* 2006, Smuts a Hardie 2006, Allander *et al.* 2007b, Bastien *et al.* 2006, Fry *et al.* 2007, Maggi *et al.* 2007, Naghipour *et al.* 2007, Qu *et al.* 2007, Ghiotto *et al.* 2012). Infikování jsou především děti v průměrném věku od 6. měsíce života do 3 let s onemocněním horních a dolních cest dýchacích nebo s gastroenteritidou. Koinfekce HBoV s dalšími viry je velmi častá, až 83 % HBoV pozitivních vzorků z dýchacích cest a 100 % vzorků stolice je infikováno minimálně jedním dalším virem (Allander *et al.* 2005, Arthur *et al.* 2009, Han *et al.* 2009, Kapoor *et al.* 2010, Chow *et al.* 2010, Kantola *et al.* 2010, Santos *et al.* 2010, Jartti *et al.* 2012).

Séroprevalence je závislá na věku studované skupiny lidí. Nejnižší séroprevalence

5,6 % byla pozorována ve věkové skupině dětí starých 6-8měsíců. U dětí starších dvou let už dosahuje téměř 100 % (Kantola *et al.* 2011, Hustedt *et al.* 2012). Nízký výskyt viru a vysoká séropozitivita HBoV protilátek u dětí nad 2 roky naznačuje, že protilátky vzniklé při primární infekci v raném dětství chrání dítě před infekcí. Pozitivní titry protilátek byly detekovány i u dětí mladších 6 měsíců, tyto protilátky pravděpodobně získalo dítě od matky ještě prenatálně (Endo *et al.* 2007). Séroprevalence podtypů HBoV1, HBoV2, HBoV3 a HBoV4 je nejvyšší u HBoV1 a klesá směrem k HBoV4. (Kantola *et al.* 2011, Guo *et al.* 2012).

## **2.5.6 Klinický obraz**

### **2.5.6.1 Lidský bocavirus a onemocnění respiračního traktu**

I přesto, že bylo publikováno mnoho studií o lidském bocavirus, stále není stanovena asociace HBoV s onemocněním respiračního traktu. Jedním z důvodů je častý výskyt viru s dalšími respiračními patogeny. Nejčastěji s lidskými rhinoviry, adenoviry, lidskými respiračními syncytiálními viry nebo bakteriemi *Streptococcus* spp, *Mycoplasma pneumoniae* (Choi *et al.* 2006, Manning *et al.* 2006, Calvo *et al.* 2008, Martin *et al.* 2010, Jin *et al.* 2011, Liu *et al.* 2011). Jeho patogenita je tak díky častým ko-infekcím těžko odhadnutelná.

Kochovy postuláty zde aplikovat nemůžeme, jelikož nám chybí, již zmiňovaný, zvířecí model. Můžeme zde ale aplikovat pozměněné Kochovy postuláty vyvinuté pro molekulární diagnostiku Fredriksem a Relmanem v roce 1996 (Fredricks a Relman 1996). Kde HBoV splňuje zatím všechny testované kritéria, některé kritéria ale ještě čekají na testování (Allander 2008).

Jak už bylo zmíněno, HBoV se vyskytuje ve vzorcích z dýchacích cest u pacientů s akutním respiračním onemocněním, nemůžeme ale s jistotou říci, že je příčinou onemocnění, jelikož existují viry, které se vyskytují a přenášejí prostřednictvím dýchacího traktu, ale nezpůsobují žádné respirační obtíže. Přesto, je lidský bocavirus, zejména podtyp 1, uznáván jako virus velmi pravděpodobně způsobující onemocnění dýchacího traktu, v rozsahu od lehkého respiračního onemocnění po vážné pneumonie a bronchitidy (Sloots *et al.* 2006, Bastien *et al.* 2006, Foulongne *et al.* 2006). U akutního respiračního onemocnění detekujeme virus v respiračním traktu často ve vysokých kopiích ( $> 10^4$  kopií HBoV1 / ml aspirátu), a současně je virus detekovatelný i v krevním séru. Tyto kritéria pravděpodobně ukazují na právě probíhající akutní infekci (Allander *et al.* 2007b, Christensen *et al.* 2010, Vicente *et al.* 2007, Fry *et al.*, 2007). Byly publikovány studie, kde je HBoV 1 detekován i u asymptomatických pacientů (Kesebir *et al.* 2006; Allander *et al.* 2007b, Maggi *et al.* 2007, Longtin *et al.* 2008, von Linstow *et al.* 2008), důvodem proč je virus detekován i u asymptomatických pacientů je pravděpodobně jeho perzistence v podobě zmíněných epizómů. Jeho replikace je tudíž velmi nízká nebo žádná. V tomto případě, by bylo možné zachytit HBoV i u již zdravých asymptomatických pacientů (Kesebir *et al.* 2006, Fry *et al.* 2007, Kantola *et al.* 2008). Této hypotéze nasvědčuje i fakt, proč je HBoV1 detekován v respiračním traktu i 6 měsíců po odeznění symptomů, což je déle než u ostatních respiračních virů. U asymptomatických pacientů je HBoV1 detekován výhradně v nízkých virových kopiích (Regamey *et al.* 2007, Allander 2008, von Linstow *et al.* 2008, Martin *et al.* 2009, Martin *et al.* 2010, Blessing *et al.* 2009, Lehtoranta *et al.* 2012).

Klinicky odlišit akutní HBoV infekce od jiných respiračních infekcí není možné, protože mezi symptomy, které se nejčastěji vyskytují u osob, u kterých je detekována pouze infekce HBoV patří kašel, horečka, rinitida. Nejčastější

diagnózou u těchto pacientů je pak onemocnění horních cest dýchacích, pneumonie, bronchitida, bronchiolitida a akutní exacerbace astmatu, což jsou nejčastější diagnózy i u jiných respiračních virových infekcí např. u RSV infekce nebo u infekce lidským metapneumovirem (Weigl *et al.* 2003, Williams 2005, Wilkesmann *et al.* 2006). Zatím nebyly pozorovány žádné symptomy odlišující HBoV pozitivní pacienty od pacientů s jinou respirační infekcí. Hospitalizace HBoV pozitivních pacientů probíhá hlavně u dětských pacientů, u dospělých jen zřídka.

#### **2.5.6.2 Lidský bocavirus a gastroenteritida**

Lidský bocavirus je úzce příbuzný s psím a bovinním bocavirem. Tyto viry způsobují gastroenteritidu u zvířat, je tedy možné, že by lidský bocavirus mohl způsobovat gastroenteritidu u lidí. Několik studií popisuje výskyt viru, zejména podtypů 2, 3 a 4, ve vzorcích stolice u pacientů s gastroenteritidou, ale zatím žádná souvislost mezi infekcí a onemocněním nebyla prokázána (Arnold *et al.* 2006, Kesebir *et al.* 2006, Lee *et al.* 2007b, Maggi *et al.* 2007, Monteny *et al.* 2007, Neske *et al.* 2007, Vicente *et al.* 2007).

#### **2.5.6.3 Imunosuprimovaní pacienti a HBoV infekce**

Dosud málo studií bylo věnováno prevalenci a potenciální patogenitě HBoV u imunosuprimovaných či imunodeficitních pacientů (Arnold *et al.* 2006, Kupfer *et al.* 2006, Manning *et al.* 2006, Smuts *et al.* 2006). Nicméně je publikováno několik závažných případů infekce HBoV, jak u dětí, tak u dospělých, končících smrtí pacienta (Calvo *et al.* 2008, Sadeghi *et al.* 2013, Uršič *et al.* 2015).

#### **2.5.7 Přenos**

Způsob přenosu HBoV není znám, ale jelikož se jedná o respirační virus, předpokládá se přenos přímým stykem s nemocnými, vzdušnou cestou nebo nepřímo předměty, které nemocná osoba kontaminovala. Virus byl detekován i ve vzorcích stolice je tedy možný i přenos orofekální. Odolnost HBoV vůči desinfekčním prostředkům nebyla dosud testována, nicméně ostatní parvoviry se coby neobalené viry vyznačují velkou odolností. Teoreticky je možný i přenos z dárce na příjemce při akutní fázi infekce pomocí krevních transfuzí či

transplantovaných orgánů u možné perzistence HBoV, ale žádná studie zabývající se tímto způsobem přenosu nebyla publikována. (Allander *et al.* 2007a, Qu *et al.* 2007).

### **2.5.8 Léčba a prevence**

V současné době neexistuje žádná specifická antivirová léčba ani preventivní imunizace (Jartti *et al.* 2011). Léčba je pouze symptomatická a je analogická s léčbou jiných respiračních infekcí. Prevence je zaměřena zejména na omezení přenosu viru mezi pacienty. Nicméně, objevení tohoto viru a jeho detekce u pacientů by mohla snížit neodůvodněné a celkově neefektivní podávání antibiotik.

### **2.5.9 Diagnostika**

Diagnostika lidského bocavirus se provádí hlavně pomocí molekulárních laboratorních metod. Většina laboratoří v současné době používá in-house PCR a real-time PCR. Primery jsou navrhovány na nejvíce konzervativní místa genomu, což je, v případě HBoV, gen pro nestrukturní protein NS1. Ale protože je genetická variabilita HBoV velmi nízká, můžeme použít i primery zahrnující geny pro proteiny NP1, VP1 nebo VP2 (Schildgen *et al.* 2008). Následně můžeme sekvenovat DNA a rozdělit HBoV dle podtypů (Kantola *et al.* 2008, Söderlund-Venermo *et al.* 2009, Christensen *et al.* 2010). PCR se nejčastěji používá kvantitativní a to z toho důvodu, abychom byli schopni odlišit akutní infekci od asymptomatické virové perzistence. Pouhý pozitivní výsledek PCR bez kvantifikace je u toho viru, zejména u podtypu HBoV1, nedostačující, jelikož virus dokáže přetrvávat v hostiteli v nízkých kopiích i několik měsíců po uzdravení pacienta, zatím co vysoký výskyt viru ( $> 10^4$  kopií HBoV1 / ml aspirátu) v respiračním traktu obvykle koreluje s akutní infekcí (Allander *et al.* 2007a). Důležitá je i současná diagnostika vzorku séra, jelikož pouze u akutní infekce se virus vyskytuje, kromě dýchacích cest, i v krevním séru (Kantola *et al.* 2008, Martin *et al.* 2009, Söderlund-Venermo *et al.* 2009, Don *et al.* 2010, Hedman *et al.* 2010, Korppi *et al.* 2010, Bonvicini *et al.* 2011, Don *et al.* 2011). Doporučována je i současná detekce IgM protilátek (Söderlund-Venermo *et al.* 2009). HBoV 1 byl detekován ve vzorcích respiračního traktu i ve velmi vysokém množství (přes  $10^{10}$  kopií/ml aspirátu), ale ve většině studií obsahují

pozitivní vzorky menší počet virové DNA (Allander *et al.* 2007b, Neske *et al.* 2007).



## 2.6 Polyomaviry KI a WU

### 2.6.1 Objevení polyomavirů KI a WU

První lidský polyomavirus byl objeven v roce 1964 neurology Gabrielem Zu Rheinem a Samem Chouem. Virus byl objeven u pacienta s progresivní multifokální leukoencefalopatií pomocí elektronové mikroskopie, která byla v této době novou technologií (ZuRhein a Chou 1965). V jádrech oligodendrocytů byly objeveny neobalené virové partikule o velikosti přibližně 45nm. Izolovány byly až o 6 let později z tkáně mozku nemocného pacienta, jehož iniciály byly J. C. a po kterém byl i lidský polyomavirus pojmenován (JCPyV) (Padgett *et al.* 1971). Nezávisle na tomto objevu, byl ve stejném roce izolován ještě další lidský polyomavirus, BK vpolyomavirus (BKPyV), a to ze vzorku moče pacienta po transplantaci ledvin. I v tomto případě byl virus pojmenován dle iniciály pacienta, ze kterého byl prvně izolován (Gardner *et al.* 1971).

Téměř 40 let byly JCPyV a BKPyV jedinými známými polyomaviry infikující člověka. Zlom nastal v roce 2007, kdy, díky stále se zlepšujícím screeningovým metodám, bylo postupně objeveno 10 nových lidských polyomavirů. Dnes je známo dvanáct lidských polyomavirů. Mezi nově objevené lidské polyomaviry patří: lidský polyomavirus KI (Allander *et al.* 2007a), lidský polyomavirus WU (Gaynor *et al.* 2007), polyomavirus Merkelových buněk (MCPyV) (Feng *et al.* 2008), lidský polyomavirus 6 (HPyV6) (Schowalter *et al.* 2010), lidský polyomavirus 7 (HPyV7) (Schowalter *et al.* 2010), polyomavirus asociovaný s Trichodysplasia spinulosa (TSPyV) (van der Meijden *et al.* 2010), lidský polyomavirus 9 (HPyV9) (Scuda *et al.* 2011), lidský polyomavirus 10 (HPyV10) (Buck *et al.* 2012), Malawi polyomavirus (MWPyV) (Siebrasse *et al.* 2012) a Mexico polyomavirus (MXPpyV) (Yu *et al.* 2012). Společně s polyomaviry BK a JC je dnes známo dvanáct lidských polyomavirů.

Polyomaviry KI a WU byly objeveny v roce 2007. KIPyV byl objeven ve Švédsku na lékařské univerzitě Institut Karolinska, podle které dostal i pojmenování (Allander *et al.* 2007a). Polyomavirus WUPyV byl objeven v USA na Washingtonské univerzitě a taktéž byl pojmenován dle institutu, ve kterém byl prvně detekován (Gaynor *et al.* 2007). Oba viry byly izolovány

z nasofaryngeálních aspirátů od pacientů s respiračním onemocněním a zařazeny do čeledi *Polyomaviridae*. WUPyV a KIPyV jsou si sekvenčně podobní z 65% - 69%. Dle fylogenetických studií jsou si vzájemně podobnější než např. s BKPyV či JCPyV (Gaynor *et al.* 2007).

### 2.6.2 Virologie

Polyomaviry patří do čeledi *Polyomaviridae*. Tato čeleď vznikla roku 2000, kdy byla rozdělena čeleď *Papovaviridae* na *Polyomaviridae* a *Papillomaviridae* (Viscidi *et al.* 2006). Název *Polyomaviridae* je odvozen z řečtiny a znamená v překladu „mnoho nádorů“. Toto pojmenování vzniklo po inokulaci prvního objeveného polyomaviru, myšího polyomaviru, do nově narozených myší, u kterých inokulovaný virus způsobil četné nádory (Bodaghi *et al.* 2009). Čeleď *Polyomaviridae* je dále dělena na dva savčí rody, *Orthopolyomavirus* a *Wukipolyomavirus*, a jeden ptačí rod *Avipolyomavirus*. Do rodu *Wukipolyomavirus* patří nedávno objevené polyomaviry, lidský polyomavirus KI, lidský polyomavirus WU, lidský polyomavirus 6 a lidský polyomavirus 7. Do druhého savčího rodu *Orthopolyomavirus* patří zbývající dosud známé savčí polyomaviry (Johne *et al.* 2011).

Polyomaviry (PyV) jsou malé neobalené DNA viry s ikosahedrální kapsidou o velikosti přibližně 45nm. Genom je cirkulární dvouřetězcový stočený do superhelixu tzv. „supercoiling“ struktury o délce okolo 5kB. Kapsida se skládá ze tří kaspidových proteinů VP1, VP2 a VP3. Z toho na vnější straně virionu je vystavěna pouze molekula VP1, která interaguje s hostitelskou buňkou. Virový genom je rozdělen do tří oblastí - oblast s časnými geny, oblast s pozdními geny a nekódující regulační oblast (NCCR), která obsahuje promotory a enhancery a fyzicky od sebe odděluje oblast s časnými a pozdními geny. Časná kódující oblast je transkribována hned po vstupu viru hostitelské buňky (Ferenczy *et al.* 2012). Po translaci vzniká velký tumorogenní antigen (TAg) a malý tumorogenní antigen (tAg). Následně dochází k replikaci virové DNA a také k transkripci a translaci genů pozdní kódující oblasti, ze které vznikají tři kapsidové proteiny VP1, VP2 a VP3. Tumorogenní antigeny jsou regulační proteiny, které vyvazují onkosupresory Rb a p53. Tyto proteiny jsou hlavními regulátory buněčného cyklu a po jejich vyvázání se buňka může

posunout z G1 fáze do S fáze a replikovat se. Díky vlastnostem tumorogenních antigenů může vznikat nádorové onemocnění (Khalili *et al.* 2005).

### 2.6.3 Epidemiologie a diagnostika

Polyomaviry WU a KI se vyskytují celosvětově. Jejich prevalence se v respiračních vzorcích vyskytuje v rozmezí od 1 % - 16,4 % u WUPyV a od 0,5 % - 8 % u KIPyV (Ren *et al.* 2008, Mourez *et al.* 2009, Teramoto *et al.* 2011, Babakir-Mina *et al.* 2012). Kromě respiračních vzorků byly WUPyV a KIPyV detekovány i v dalších typech vzorků: ve stolici (Babakir-Mina *et al.* 2009a, Kantola *et al.* 2009, Mina *et al.* 2009, Mourez *et al.* 2009, Ren *et al.* 2009, Allander *et al.* 2007a), krvi (Barzon *et al.* 2009a, Bialasiewicz *et al.* 2009), plazmě (Miller *et al.* 2007, Babakir-Mina *et al.* 2009c, Babakir-Mina *et al.* 2010), séru (Miller *et al.* 2007), mozkomíšním moku (Barzon *et al.* 2009b), lymfoidní tkáni (Babakir-Mina *et al.* 2009b, Sharp *et al.* 2009, Kantola *et al.* 2009), moči (Allander *et al.* 2007a, Gaynor *et al.* 2007, Bialasiewicz *et al.* 2009), plicní tkáni (Babakir-Mina *et al.* 2009b, Teramoto *et al.* 2011) a v alveolárních makrofázích (Siebrasse *et al.* 2014).

Přenos viru probíhá pravděpodobně orofekální cestou (Babakir-Mina *et al.*, 2009a, b). Testovány byly i fetální vzorky, ale přenos infekce z matky na dítě nebyl prokázán (Sadeghi *et al.* 2010). Oba viry WUPyV i KIPyV byly detekovány nejčastěji ve vzorkách z respiračního traktu a ve vzorkách stolice u dětí a imunokomprimovaných pacientů (Abed *et al.* 2007, Allander *et al.* 2007a, Bialasiewicz *et al.* 2007, Gaynor *et al.* 2007, Han *et al.* 2007, Norja *et al.* 2007, Abedi *et al.* 2008, Babakir-Mina *et al.* 2008, Bialasiewicz *et al.* 2008, Foulongne *et al.* 2008, Kleines *et al.* 2008, Lin *et al.* 2008, Neske *et al.* 2008, Payungporn *et al.* 2008, Ren *et al.* 2008, Babakir-Mina *et al.* 2009a, Babakir-Mina *et al.* 2009b, Kantola *et al.* 2009, Mourez *et al.* 2009, Rao *et al.* 2011, Yuan *et al.* 2009, Teramoto *et al.* 2011).

Vzorky jsou testovány především pomocí PCR. U detekce polyomavirů je důležitá zejména senzitivita používané metody, proto se používá metoda real-time PCR, jelikož je citlivější než klasická konvenční jednobolová PCR (Lindau *et al.* 2009). Jedním z důležitých kroků je vybrat správný úsek DNA při navrhování primerů a sond pro real-time PCR. Bylo zjištěno, že primery a sondy

navrhované do oblasti genů pro malý T antigen a do regulačních oblastí jsou méně citlivé než primery a sondy navrhované do oblastí VP1 a VP2 genů (Bergallo *et al.* 2009). Výběr cílového místa tudíž může ovlivňovat výsledek a prevalenci u těchto virů. Vzhledem k tomu, že stále neznáme epidemiologii a klinický dopad těchto virů na lidskou populaci, je pro nás důležitá dostupnost vysoce citlivých a specifických metod jako real-time PCR, které nám pomůže získat spolehlivé údaje a přispěje k lepšímu pochopení patogenní role KIPyV a WUPyV.

Kvantitativní real-time PCR se běžně používá k monitorování virostatické terapie u pacientů s chronickým onemocněním nebo k monitorování virové reaktivace cytomegaloviru, viru Epstein-Barrové, lidského polyomaviru BK, adenovirů a dalších virů u pacientů po transplantaci (Ciotti *et al.* 2008, Paba *et al.* 2012, Paba *et al.* 2011, Campanini *et al.* 2007). Kvantitativní real-time PCR byla použita i pro definování patogenní role lidského respiračního syncytiálního viru a lidského bocaviru (Campanini *et al.* 2007, Allander *et al.* 2007b). Podobně byla vyvinuta i pro hodnocení patogenního potenciálu KIPyV a WUPyV. Studie se od sebe liší citlivostí metody a typem testovaného vzorku (Lindau *et al.* 2009, Bialasiewicz *et al.* 2007, Bergallo *et al.* 2009, Kleines *et al.* 2008, Kuypers *et al.* 2012, Rao *et al.* 2011).

V roce 2012 byla publikována prospektivní studie zahrnující 2 732 respiračních aspirátů od 22 pacientů nasbíraných během jednoho roku po transplantaci hematopoetických buněk. Incidence KIPyV a WUPyV byla 26 % a 8 %. U pozitivních pacientů byly pozorovány pískoty při dýchání (tzv. „wheezing“) a tvorba hlenu. Nicméně, žádná asociace virů s rejekcí štěpu, reaktivací cytomegaloviru, neutropenií (pokles počtu neutrofilních granulocytů pod fyziologickou mez), lymfopenií (snížený počet lymfocytů v krvi), hospitalizací či smrtí nebyla zaznamenána (Kuypers *et al.* 2012). Vzhledem k nedostatku přesvědčivých studií KIPyV a WUPyV jako respiračních patogenů, nejsou tyto polyomaviry rutině diagnostikovány v klinických laboratořích (Hirsch *et al.* 2013b).

Séroprevalence KIPyV a WUPyV byla stanovena pomocí ELISA testu. Séra pocházela od pacientů všech věkových kategorií a byla testována na

přítomnost protilátek proti kapsidovému proteinu VP1. Prevalence u dětské populace, ve věku od 1 roku do 5 let, dosahovala u KIPyV i WUPyV 45 % a ve věku od 10 let do 15 let kolem 60 % u KIPyV i WUPyV. U lidí starších 50 let dosahovala 71 % u WUPyV a kolem 50 % u KIPyV (Kean *et al.* 2009). Takto vysoké pozitivitu naznačují, že k primární infekci dochází již v dětství (Kean *et al.* 2009, Nguyen *et al.* 2009, Neske *et al.* 2010).

#### **2.6.4 Klinický obraz**

Asociace mezi polyomaviry a onemocněním byla prokázána jen u některých lidských polyomavirů. Jedním z nich je lidský BK polyomavirus. BKPyV způsobuje hemorhagickou cystitidu u pacientů po transplantaci hematopoetických buněk a BK-nefropatii u pacientů po transplantaci ledvin. Dále pak JC polyomavirus, který je původcem progresivní multifokální leukoencefalopatie u imunosuprimovaných pacientů jako jsou například HIV pozitivní pacienti. MC polyomavirus je spojen se vzácným, ale velmi agresivním kožním karcinomem Merkelových buněk, který se vyskytuje u starších lidí a imunokomprimovaných pacientů (Feng *et al.* 2008). TS polyomavirus je spojen se vzácným kožním onemocněním Trichodysplasia spinulosa, které bylo popsáno u imunosuprimovaných pacientů po orgánové transplantaci (van der Meijden *et al.* 2010). U polyomavirů KI a WU je asociace infekce s onemocněním stále polemizována. Jelikož se tyto viry vyskytují nejčastěji v respiračním traktu, domníváme se, že se jedná o respirační patogeny. Situaci ale komplikuje skutečnost, že WUPyV a KIPyV byly detekovány jak u asymptomatických pacientů, tak v přítomnosti jiného respiračního patogena. Přibližně 70 % vzorků pozitivních na WUPyV nebo KIPyV je detekováno s dalším respiračním patogenem (Han *et al.* 2007, Le *et al.* 2007, Bialasiewicz *et al.* 2008). Byly ale publikovány studie, ve kterých byly KIPyV nebo WUPyV jedinými detekovatelnými respiračními viry u pacientů s respiračními obtížemi. K nejčastějším klinickým příznakům patřil kašel, horečka, zhoršené dýchání a respirační selhání. Diagnostikována byla i bronchiolitida nebo bronchopneumonie (Abed *et al.* 2007, Han *et al.* 2007, Le *et al.* 2007, Foulongne *et al.* 2008, Neske *et al.* 2008, Yuan *et al.* 2008). Patogenní potenciál WUPyV a KIPyV je stále velkým otazníkem a v budoucnu vyžaduje rozsáhlejší studie. Velkým nedostatkem pro budoucí výzkum je chybějící zvířecí

model a buněčné kultury. Nalezení funkčního modelu buněčných kultur a zvířecího modelu by pomohlo k lepšímu porozumění těchto virů a jejich patogenní role v hostiteli.

#### **2.6.4.1 Imunokompetentní pacienti a infekce lidským polyomavirem KI a WU**

Polyomavirus KIPyV a WUPyV infikuje zejména dětskou část lidské populace. K primární infekci dochází dle sérologických studií již v raném dětství. Probíhá buď asymptomaticky, nebo s lehkými respiračními obtížemi. Dospělí imunokompetentní jedinci jsou infikováni jen výjimečně (Kean *et al.* 2009). Po primární infekci následuje celoživotní perzistence v těle hostitele. U BKPyV a JVPyV byla zjištěna perzistence v epitelálních buňkách močového traktu, zatímco KIPyV a WUPyV pravděpodobně přetrvávají v lymfatické tkáni, protože oba byly detekovány ve vzorcích tonsil (Babakir-Mina *et al.* 2009b).

#### **2.6.4.2 Imunokomprimovaní pacienti a infekce lidským polyomavirem KI a WU**

WUPyV a KIPyV jsou častěji detekovány ve vzorcích od imunokomprimovaných pacientů než od pacientů imunokompetentních. Například WUPyV byl detekován častěji v dýchacích sekretech u HIV-1 pozitivních dětí s akutní infekcí dolních cest dýchacích než u imunokompetentních dětí s akutní infekcí dolních cest dýchacích (Venter *et al.* 2009). Podobně i v jiné studii byl WUPyV detekován častěji u imunokomprimovaných dětí s respiračním onemocněním než u imunokompetentních a v některých případech byl jediný detekovatelný virus. Mohlo by se tedy jednat o respirační patogen (Le *et al.* 2007). Podobné studie byly publikovány i ohledně KIPyV, kde KIPyV byl detekován u pacientů po transplantaci hematopoetických buněk a podobně jako u WUPyV byl v některých případech jediný zjištěný patogen. Z toho vyplývá, že imunosuprese může mít za následek vyšší náchylnosti pacientů k infekci nebo reaktivaci virů (Babakir *et al.* 2013, Csoma *et al.* 2011, Motamedi *et al.* 2012, Kantola *et al.* 2009, Venter *et al.* 2009, Kuypers *et al.* 2012, Sharp *et al.* 2009). Zajímavé je, že u pacientů po transplantacích byla ve vzorcích detekována vyšší virová nálož než u pacientů jinak imunosuprimovaných či imunodeficitních. Imunosuprese po transplantacích by tedy mohla být rizikový faktor pro tyto infekce (Rao *et al.* 2011).

Přítomnost KIPyV a WUPyV byla testována u několika typů tkání. Častý výskyt a vysoké virové nálože byly změřeny v lymfoidní tkáni pacientů s AIDS (Sharp *et al.* 2009). Nicméně nebyla pozorována žádná korelace mezi přítomností KIPyV a WUPyV a množstvím CD4+ buněk (Babakir-Mina *et al.* 2010). Dále byly WUPyV a KIPyV detekovány v mozkové tkáni u HIV-1 pozitivních pacientů s progresivní multifokální leukoencefalopatií. Ale ani zde nebyla sledována žádná asociace mezi přítomnosti viru a histopatologickým nálezem (Barzon *et al.* 2009).

Můžeme se tedy domnívat, že polyomaviry KI a WU pravděpodobně patří mezi respirační patogeny, které u imunokomprimovaných pacientů za určitých, zatím neznámých, okolností způsobují respirační onemocnění, nicméně zatím nebyla publikována žádná studie dokazující jasnou souvislost infekce s respiračním onemocněním. K lepšímu porozumění patogeneze těchto dvou virů je zapotřebí rozsáhlá prospektivní studie zahrnující imunokompetentní i imunosuprimované pacienty s i bez respiračního onemocnění.

### **2.6.5 Léčba**

Prozatím není dostupná ani doporučená žádná léčba infekce KIPyV a WUPyV u imunosuprimovaných pacientů (Hirsch *et al.* 2013b). Nicméně vzhledem k podobnosti s polyomaviry BKV a JCV by zřejmě bylo možné léčit pacienty pomocí virostatik Cidofovir a Brancidofovir, které se podávají pacientům s BKV a JCV infekcí (Hirsch *et al.* 2013a, Rinaldo *et al.* 2013).

### 3 Cíle práce

- Detekovat a kvantifikovat lidský bocavirus, lidský polyomavirus KI a lidský polyomavirus WU v 822 vzorcích z respiračního traktu získaných od pacientů po transplantaci plic a hematopoetických buněk.
- Sestavit jednotnou statistiku výskytu zvolených respiračních virů u imunosuprimovaných pacientů v České republice a zhodnotit případný dopad infekce na pacienty.
- Získaná data porovnat s výsledky zahraničních studií



## 4 Materiál a metody

### 4.1 Použitý biologický materiál

K retrospektivní detekci HBoV, KIPyV a WUPyV bylo použito 822 vzorků (745 od dospělých a 77 od dětí) od 380 pacientů (326 dospělých a 54 dětí) z dýchacích cest (medián 1,5 vzorku na pacienta) a 84 vzorků krve. Vzorky byly získávány v rámci rutinní detekce Fakultní nemocnice Motol (Praha, Česká republika) a Ústavu hematologie a krevní transfúze (Praha, Česká republika) mezi roky 2004 - 2014. Vzorky byly opakovaně odebírány v různých časových intervalech od 277 pacientů po transplantacích plic a hematopoetických kmenových buněk a 103 ventilovaných pacientů Kliniky anesteziologie a resuscitace FN Motol. Používané vzorky byly z 38 % od žen a 62 % od mužů. Průměrný věk dospělých byl 48,9 let, medián 52 let (rozmezí 19 – 84 let). Průměrný věk dětí byl 6,8 let, medián 5,5 let (rozmezí 0,3 - 19 let).

Používané vzorky byly několika typů:

#### 1. Bronchoalveolární laváž (BAL)

BAL je diagnostické bronchoskopické vyšetření, během kterého se pacientovi do bronchu nejprve aplikuje a poté následně zpět aspiruje 150–300 ml fyziologického roztoku. Cílem tohoto vyšetření je získat bronchoalveolární tekutinu (BAT) z bronchů a nižších oblastí dýchacích cest (bronchioly, alveoly). Tato tekutina se dále vyšetřuje především na buněčné a nebuněčné složky. 79 % detekovaných vzorků bylo typu BAL.

#### 2. Aspirát z dýchacích cest, aspirát z endotracheální kanyly (ETR)

Tekutina odebraná z dýchacích cest pacienta. 21 % detekovaných vzorků bylo tohoto typu.

#### 3. Krev

Viry se detekovaly v 84 vzorcích krve pocházejících od infikovaných pacientů, u nichž byla virová nálož ve vzorku  $10^4$  kopií/ml a více. DNA byla získána z neseparované EDTA krve pomocí Qiagen DNA Blood Mini kitů.

## 4.2 Detekované respirační viry:

1. Lidský bocavirus (HBoV), čeleď *Parvoviridae*, podčeleď *Parvovirinae*, rod *Bocavirus*  
objevitel Tobias Allander, Švédsko  
sekvence - viz níže

2. Lidský polyomavirus KI (KIPyV), čeleď *Polyomaviridae*, rod *Wukipolyomavirus*

- objevitel Tobias Allander, Švédsko

- sekvence: KI polyomavirus např.: isolate CU-255; isolate Brisbane 003; isolate Brisbane 001; Stockholm 350; strain FZ52, isolate HN057

- Gene Bank Accession No.: např.: EU358766.1; KM085447.1; FJ754237.1; EF127908.1; EF655827.1; JN582333.1

3. Lidský polyomavirus WU (WUPyV), čeleď *Polyomaviridae*, rod *Wukipolyomavirus*

- objevitel Anne M. Gaynor, USA

- sekvence: WU Polyomavirus např.: strain S1; isolate HN111; isolate HN007; isolate HB037C, strain BJF5276; isolate NP360

- Gene Bank Accession No.: např.: EF444550.1; EU358768.1; FJ890981.1; GQ926977.1; GU296375.1; KC571693.1

HBoV pozitivní vzorky byly následně rozřazeny do čtyř podtypů, dle publikovaných sekvencí:

1. HBoV 1 NCBI Reference Sequence. NC\_007455.1
2. HBoV 2 NCBI Reference Sequence. NC\_012042.1
3. HBoV 3 NCBI Reference Sequence. NC\_012564.1
4. HBoV 4 NCBI Reference Sequence. NC\_012729.2

### 4.3 Izolace DNA

Extrakce DNA byla provedena u vzorků z respiračního traktu pomocí Ultra Clean Spin DNA isolation kitů (MoBio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA) a u vzorků krve pomocí QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN®, Hilden, Německo). Všechny extrakce proběhly podle instrukcí výrobce. Vzorky byly následně uchovány v -20 °C.

### 4.4 Primery a sondy

Primery použité k detekci virů HBoV 1 - 4, KIPyV a WUPyV ve vzorkách od pacientů, ke klonování virové DNA a primery pro nested PCR byly navrhovány v rámci diplomové práce pomocí volně dostupného programu:

Bioedit 7.2 (<http://bioedit.software.informer.com/7.2/>).

Primery k detekci HBoV 1 - 4 jsou degenerované z důvodů zachycení všech 4 podtypů HBoV jedním párem primerů, viz tabulka 1.

Sonda k detekci HBoV 1 je převzata z článku Esposito *et al.* 2008

Sonda k detekci HBoV 1 - 4 byla převzata z článku Kantola *et al.* 2010.

Sonda k detekci KIPyV byla navržena v laboratoři Ústavu lékařské mikrobiologie FN Motol, viz tabulka 1.

Sonda k detekci WUPyV byla navržena v laboratoři Ústavu lékařské mikrobiologie FN Motol, viz tabulka 1.

Tabulka 1.

Primery a sondy pro detekci a klonování virů HBoV, KIPyV, WUPyV

|                    | Sekvence                                    | Cílový gen   |
|--------------------|---|--------------|
| HBoV 1 – 4 forward | 5'- TCA GAC TGC ATC CGG TCT C – 3'          | NS1          |
| HBoV 1 – 4 reverse | 5'- CTC ACC ACR WGY GTG GAG CT – 3'         |              |
| Sonda HBoV         | 5'- CCA GAG ATG TTC ACT CGC CG - 3          |              |
| KIPyV forward      | 5'- TGA ACT GTG ACC ACC ACT CAT – 3'        | Agno protein |
| KIPyV reverse      | 5'- CAG GTT CGA GAC GAT GGC – 3'            |              |
| Sonda KIPyV        | 5'- CCA TTC ATG ACA AGG AAA GCG GTT CA – 3' |              |
| WUPyV forward      | 5'- CCA ATT AGC AGC CAC AAG GT – 3'         | Agno protein |
| WUPyV reverse      | 5'- TCC AGA TCC AGC AAT TGA TAG T – 3'      |              |
| Sonda WUPyV        | 5'- TGT TGT GAC ATC TCC AGT CGG G – 3'      |              |

R = A,G      W = A,T      Y = C,T

Ostatní používané primery a sondy jsou uvedeny u popisu jednotlivých metod.

## 4.5 Roztoky

Obecná chemie byla použita od firmy Qiagen® (Qiagen HotStar Polymerase – PCR pufr, MgCl<sub>2</sub>, polymeráza), glycerol a dNTP byly z roztoků dodávaných firmou Sigma, ROX-6 referenční barva (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA). Viz tabulka 2.

Tabulka 2.

Používané reagensie

| Reagensie                            | Výrobce                   |
|--------------------------------------|---------------------------|
| PCR H <sub>2</sub> O                 | B Braun                   |
| 10x pufr + MgCl <sub>2</sub> (15 mM) | QIAGEN®, Hilden, Německo  |
| MgCl <sub>2</sub> (15 mM)            | QIAGEN®, Hilden, Německo  |
| dNTP                                 | Sigma                     |
| ROX barvička (100 μM)                | Invitrogen™ Carlsbad, USA |
| Primery                              | Metabio                   |
| Sondy                                | Invitrogen™ Carlsbad, USA |
| HotMaster polymeráza 5U/μl           | QIAGEN®, Hilden, Německo  |

## 4.6 Klonování DNA

Klonováním DNA byly namnoženy bakteriální plazmidy s požadovaným úsekem virové DNA a následně naředěny kalibrační křivky, které byly použity ke kvantifikaci virové DNA ve vzorcích pacientů.

Postup:

### 1. PCR

Nejdříve byl požadovaný úsek virové DNA namnožen pomocí PCR na přístroji Applied Biosystem 7500 Real-Time PCR (Life Technologies™, USA). Použité primery a sonda viz tabulka 1. K namnožení virové DNA byly použity pozitivní kontroly. Pozitivní kontroly pocházely od infikovaných pacientů. V případě WUPyV a KIPyV se jednalo o vzorky získané od dr. Bialasiewiczze ze Sir Albert Sakzewski Virus Research Centre (Herston, Austrálie) a to sice izoláty WUPyV

– 8805 a KIPyV Brisbane 002. Pozitivní vzorek HBoV byl získán z pozitivního vzorku detekovaného CE certifikovaným kitem Anyplex RV16 firmy Seegene v Laboratoři virologie Ústavu lékařské mikrobiologie FN Motol. Reakční směs byla připravena dle tabulky 3. Teplotní profil byl použit dle tabulky 4 s několika rozdíly: finální extenze byla nastavena na 10 minut, cyklů bylo použito místo 45 pouze 30.

Tabulka 3.

Složení PCR reakční směsi pro jeden vzorek k detekci virů HBoV, KIPyV a WUPyV

| Složka                               | Množství pro jednu reakci |          |          |
|--------------------------------------|---------------------------|----------|----------|
|                                      | HBoV                      | KIPyV    | WUPyV    |
| PCR voda                             | 6,865 µl                  | 5,865 µl | 7,865 µl |
| Pufr 10x + MgCl <sub>2</sub> (15 mM) | 1,5 µl                    | 1,5 µl   | 1,5 µl   |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM)            | 2 µl                      | 3 µl     | 1 µl     |
| Glycerol 50%                         | 1,5 µl                    | 1,5 µl   | 1,5 µl   |
| dNTP (4x5 mM)                        | 0,3 µl                    | 0,3 µl   | 0,3 µl   |
| ROX barvička (100 µM)                | 0,1 µl                    | 0,1 µl   | 0,1 µl   |
| Primer mix (20 µM)                   | 0,375 µl                  | 0,375 µl | 0,375 µl |
| Sonda (10 µM)                        | 0,3 µl                    | 0,3 µl   | 0,3 µl   |
| HotStar DNA polymeráza (5U/ µl)      | 0,06 µl                   | 0,06 µl  | 0,06 µl  |
| DNA templát                          | 2 µl                      | 2 µl     | 2 µl     |
| Celkový objem                        | 15 µl                     | 15 µl    | 15 µl    |

Tabulka 4:

Teplotní profil real-time PCR pro přístroje Applied Biosystem 7500 a Biorad CFX96

| Proces              | Teplota | Čas       | Počet cyklů |
|---------------------|---------|-----------|-------------|
| aktivace polymerázy | 95 °C   | 15:00 min | 1 x         |
| denaturace          | 94 °C   | 0: 15 min | 45 x        |
| syntéza             | 60 °C   | 1:00 min  |             |

## 2. ligace DNA

Ligační směs se společně s PCR produkty připravila na ledu. Jako vektor byl použit plazmid CR 2.1. Klonovalo se pomocí TA cloning kitu (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA).

Ligační směs:

2 µl PCR směsi (DNA)

4 µl H<sub>2</sub>O

2 µl vektor pCR®2.1 (25 ng/µl) (Invitrogen™)

1 µl T4 DNA ligáza (Invitrogen™)

1  $\mu$ l ligační pufr 10X (Invitrogen™)

Ligační směs byla inkubována přes noc v termocykleru při 14 °C.

### 3. Transformace

2  $\mu$ l ligační směsi byly přidány do zkumavky s 50  $\mu$ l kompetentních buněk z TA cloning kitu. Buňky byly 30 minut inkubovány na ledu, poté byly na 30 sekund přemístěny do 42 °C teplého bloku a opět vráceny na led. Na konec bylo do směsi přidáno 250  $\mu$ l S.O.C. média (Invitrogen™) pokojové teploty. Bakterie byly následně kultivovány v 37 °C 1 hodinu v třepačce při 225 rpm.

### 4. Kultivace na agaru

Připravené bakterie byly vyočkovány v různém objemu (200  $\mu$ l, 50  $\mu$ l, 10  $\mu$ l) na tři pevné kultivační selekční agarové půdy (imMedia™ Growth Medium, agar, ampicillin, X-gal/IPTG, Life Technologies™ Czech Republic s.r.o., ČR), které byly předem připraveny dle návodu výrobce. Po zaschnutí a vsáknutí do agaru, byly misky hermeticky uzavřeny v sáčku a inkubovány přes noc při 37 °C. Druhý den byly misky přesunuty na 3 hodiny do lednice, aby se vyvinula barva kolonií na bílé a modré. Toto barevné rozlišení slouží k vyhodnocování transformace při klonování DNA. Lze takto odlišit kolonie bakterií, které obsahují a které neobsahují vloženou DNA v plazmidu. Zabarvení způsobuje gen lacZ přítomný ve vektorech, který kóduje tzv.  $\alpha$ -fragment  $\beta$ -galaktosidasy. Tento enzym dokáže štěpit umělý substrát, tzv. X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-galaktopyranosid), který je přítomen v agaru. Tento substrát je bezbarvý, ale jeho štěpením vzniká modrý produkt. Pro aktivitu enzymu jsou zapotřebí dva fragmenty, které dohromady vytváří funkční enzym. V kódující sekvenci se nachází multiklonovací místo. Pokud vložíme cizorodou DNA do tohoto místa, nedochází ke vzniku funkčního enzymu. Proto kolonie obsahující plazmid s vloženou cizorodou DNA budou bílé, zatímco kolonie s plazmidem bez cizorodé DNA modré.

### 5. Selektce transformant

Bílé kolonie byly přeočkovány do tekutého média (Terrific Broth, Sigma-Aldrich spol. s.r.o., ČR) a inkubovány v 37 °C přes noc v třepačce při 250 rpm.

## 6. Izolace plazmidu

Plazmid byl izolován pomocí komerčního kitu PureLink® HQ Mini Plasmid Purification Kit (Invitrogen™).

## 7. Kvantifikace plazmidu a kontrola jeho čistoty

Pomocí automatického spektrofotometru NanoDrop (ThermoScientific™) jsme stanovili koncentraci a čistotu vyizolované DNA. Koncentrace DNA byla měřena proti vodě při vlnové délce 260 nm, byl použit přepočítávací koeficient pro dsDNA (50 µg/ml). Čistota byla vypočítána z poměrů absorbancí při 260/280 nm.

Z naměřené koncentrace byl vypočten počet molekul v 1 µl a dekadicky naředěna kalibrační křivka. Pro kvantitativní real-time PCR byly používány koncentrace  $10^1 - 10^5$ . Naměřené koncentrace a výpočty jsou uvedeny v kapitole 5 Výsledky.

## 4.7 Detekce virů pomocí real-time PCR

### 4.7.1 Princip metody real-time PCR

K detekci klinických vzorků byla použita kvantitativní PCR metoda v „reálném čase“ tzv. real-time PCR. Tato metoda je založena na principu klasické PCR s tím rozdílem, že při klasické PCR je namnožený produkt detekován po proběhnutí reakce pomocí gelové elektroforézy, zatím co při real-time PCR je produkt detekován a měřen po každém cyklu. To umožňuje detekci produktu a zároveň kvantifikaci výchozího množství templátu. Existují dvě možnosti detekce – nepřímá (nespecifická) a přímá (cílově-specifická). Při nepřímé detekci jsou využívány fluorescenční barviva inkorporující se nespecificky do DNA (např. SYBR Green). Při přímé detekci se využívají fluorescenčně značené sondy, které se vážou specificky na sekvenci mezi oběma primery. V této práci byly použity dvojitě barvené hydrolyzační sondy tzv. TaqMan® sondy. Ty jsou značeny barvivou, tzv. reportéry, na 5'konci a na 3'konci mají navázaný zhášec, tzv. quencher. Zhášec absorbuje fluorescenci reportérového fluorochromu tak dlouho, dokud je sonda neporušená. Teprve po oddálení

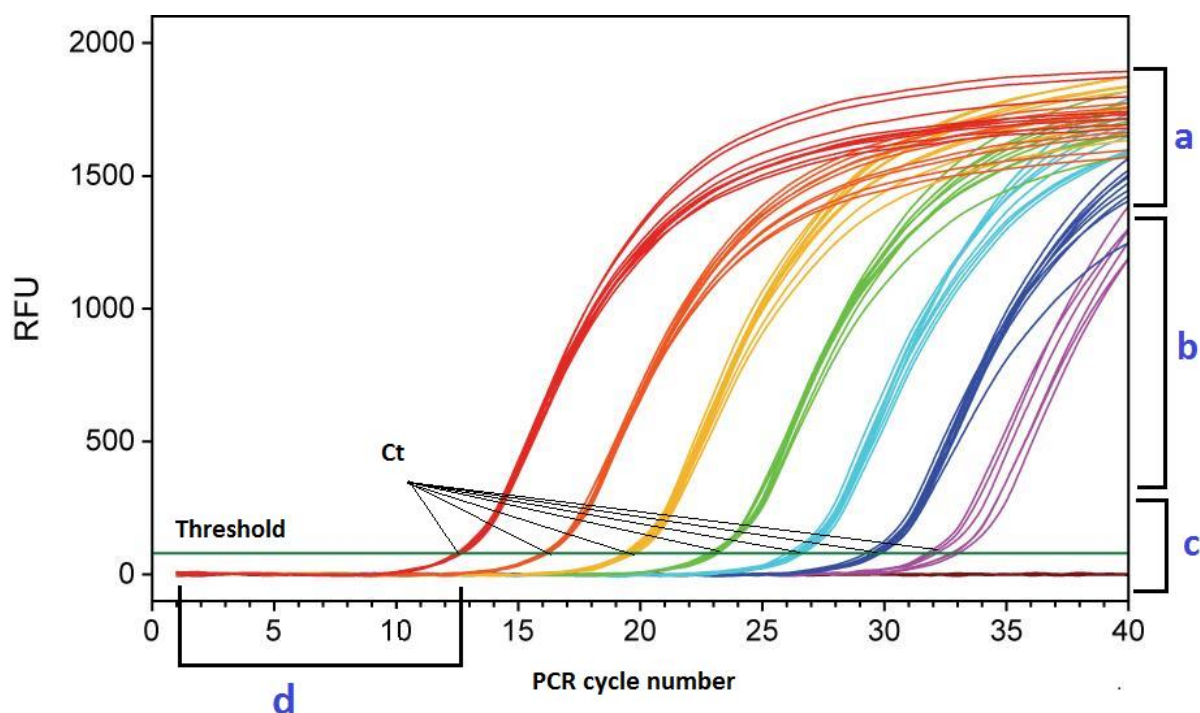
zhášeče a reportéru fluoreskuje reportér v očekávané barvě. K oddálení dojde při amplifikaci cílové sekvence DNA, kdy DNA polymeráza odstraní a hydrolyzuje sondu a oddálí tak od sebe zhášeč s reportérem. Následně dochází k uvolnění fluorescenční látky a k nárůstu fluorescence.

Uvolněná fluorescence je měřena na konci elongační fáze PCR fotooptickým systémem přístroje. Software pak vyhodnocuje zaznamenané hodnoty, podle kterých sestavuje amplifikační křivky. Amplifikační křivka má sigmoidní tvar a lze ji rozdělit na čtyři části: background fázi - amplifikováno cílové sekvence je zatím málo a fluorescence není detekovatelná; exponenciální fázi - množství fluorescence a tím pádem i amplifikovaného produktu exponenciálně roste; lineární fázi - množství produktu stoupá už pouze lineárně; plató fázi - dochází k vyčerpání komponent, dále nedochází ke zvyšování množství produktu, ani fluorescence. Amplifikační křivka je znázorněna na obrázku, viz Obrázek 2. Práh detekce vznikající fluorescence neboli threshold, je znázorňován horizontální přímkou a slouží k výpočtu hodnoty Ct (tzv. threshold cycle). Hodnota Ct je číslo cyklu, ve kterém byl překročen limit detekce. Nachází se v místě protnutí fluorescenčního prahu s amplifikační křivkou. Čím méně cyklů je potřeba k získání Ct hodnoty, tím větší množství sledované DNA je ve vzorku.

([www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/generaldocuments/cms\\_050330.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_050330.pdf))

V této práci byly použity sondy značené fluoroforem FAM® (6-karboxyfluorescein), který emituje záření ve vlnové délce 520 nm a zhášečem BlackHole Quencher® (BHQ-1®), který pohlcuje fluorescenční záření v rozmezí vlnové délky 480 – 580 nm.





Obrázek 2: Amplifikační křivky

a - plató fáze; b - lineární fáze; c - exponenciální fáze; d - background fáze

RFU - jednotky fluorescence; Ct - treshold cycle

Převzato z:

[www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/generaldocuments/cms\\_050330.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_050330.pdf)

#### 4.7.2 Sestrojení standardizačních křivek

Kvantifikace vzorků se provádí na základě kalibračních křivek, které jsou konstruovány dle známého množství DNA. Takto lze přesně kvantifikovat množství hledané DNA sekvence vzorku. Pokud tedy amplifikujeme vzorek o neznámé koncentraci společně se standardy o známé koncentraci, software dokáže pomocí kalibračních křivek vypočítat výchozí počet molekul ve vzorku. Pomocí kalibračních křivek tedy můžeme určit množství virové DNA v klinickém vzorku a to nám umožňuje zjistit význam hladin virových DNA se závažností vzniklých klinických symptomů.

Kalibrační křivky byly připraveny ředící řadou plazmidové DNA z pěti různých koncentrací plazmidu ( $10^5$  kopií / $\mu$ l,  $10^4$  kopií / $\mu$ l,  $10^3$  kopií / $\mu$ l,  $10^2$  kopií / $\mu$ l,  $10^1$  kopií / $\mu$ l). Tyto koncentrace byly testovány na přístrojích Applied Biosystem 7500 Real-Time PCR (Life Technologies™, USA) a CFX96 Touch Real-Time

PCR Detection (Detection (Bio-Rad, USA) s PCR směsí viz tabulka 3 a teplotním profilem viz tabulka 4. Následně byly naředěné plazmidy pipetovány do zkumavek po 50 µl a uchovávány při -20 °C.

#### 4.7.3 Ředění primerů a sond

Primery byly ředěny PCR H<sub>2</sub>O dle návodu výrobce na 100µM roztok. Primer mix vznikl naředěním 90 µl 100 µM primeru - forward, 90 µl 100 µM primeru - reverse a 270 µl PCR H<sub>2</sub>O. Výsledná koncentrace primer mixu byla 20 µM každého primeru. Primer mix byl následně pipetován do zkumavek po 100 µl a skladován při teplotě – 20 °C.

Sondy byly ředěny PCR H<sub>2</sub>O dle návodu výrobce do koncentrace 10 µM. Dále byly pipetovány do zkumavek po 100 µl a skladovány při teplotě – 20 °C.

#### 4.7.4 Optimalizace real-time PCR

Optimalizace PCR byla prováděna tak, aby hodnota sklonu standardizační křivky byla co nejbližší číslu -3,32, jelikož hodnota -3,32 značí 100% účinnost reakce. Účinnost reakce lze vypočítat ze sklonu standardizační křivky a vzorce:

$$E = (10^{(-1/\text{Slope})} - 1) * 100$$

Software dodaný s real-time PCR přístrojem tento výpočet umožňuje automaticky. Účinnost reakce by měla být co nejvyšší, tj. velmi blízká 100%. Pokud je účinnost výrazně nižší, snižuje se přesnost kvantifikace.

K optimalizaci real-time PCR byla naředěna standardizační křivka o koncentraci plazmidů: 10<sup>5</sup> kopií /µl, 10<sup>4</sup> kopií /µl, 10<sup>3</sup> kopií /µl, 10<sup>2</sup> kopií /µl, 10<sup>1</sup> kopií /µl. Standardní křivky plazmidů pro HBoV, KIPyV, WUPyV byly amplifikovány s teplotním profilem viz tabulka 4. PCR směs byla namíchána dle tabulky 3 a optimalizována v množství MgCl<sub>2</sub> a glycerolu.

1. PCR směs – 1 µl MgCl<sub>2</sub>/ vzorek
2. PCR směs – 2 µl MgCl<sub>2</sub>/ vzorek
3. PCR směs – 3 µl MgCl<sub>2</sub>/ vzorek
4. PCR směs – 1 µl MgCl<sub>2</sub>/ vzorek, bez glycerolu

Všechny tři křivky byly puštěny jak na přístroji CFX96 Touch Real-Time PCR Detection (Bio-Rad, USA), tak na přístroji Applied Biosystem 7500 Real-Time PCR (Life Technologies™, USA) z důvodů kontroly a možnosti záměny dostupných přístrojů.

Kalibrační křivka pro:

HBoV byla nejvíce konzistentní při použití směsi č. 2 na přístroji CFX96 Touch Real-Time PCR Detection.

KIPyV byla nejvíce konzistentní při použití směsi č. 3 na přístroji CFX96 Touch Real-Time PCR Detection.

WUPyV byla nejvíce konzistentní při použití směsi č. 1 na přístroji Applied Biosystem 7500 Real-Time PCR.

#### **4.7.4 Testování specifity a senzitivity reakce**

##### **4.7.4.1 Specifita**

Primery a sondy použité k detekci virů HBoV, KIPyV a WUPyV byly testovány, zda u nich nedochází k amplifikaci jiné než námi požadované virové DNA a tím k falešně pozitivním výsledkům. Specifita reakce byla ověřena pomocí již připravených pozitivních kontrol. Použité pozitivní kontroly pocházely od infikovaných pozitivních pacientů detekovaných na ÚLM a testovaných na přístroji Applied Biosystem 7300 Real-Time PCR (Life Technologies™, USA). Výjimkou byl polyomavirus SV40, který jsme pro testování získali v zaklonované podobě od dr. Šrollera z laboratoře experimentální virologie Ústavu hematologie a krevní transfúze v Praze. Specifita primerů a sond byla pro úplnost testována i se vzorkem lidské DNA. Vzorky s pozitivními kontrolami byly amplifikovány a analyzovány na přístrojích Applied Biosystem 7500 Real-Time PCR (Life Technologies™, Carlsbad, USA) a CFX96 Touch Real-Time PCR Detection (Bio-Rad, USA). Reakční směs byla použita dle tabulky 3 a teplotní profil dle tabulky 4

Použité pozitivní kontroly:

SV40, lidský polyomavirus WU, lidský polyomavirus KI, lidský polyomavirus BK, lidský polyomavirus JC, virus Epstein-Barrové, Varicella zoster virus, lidský herpesvirus 6, cytomegalovirus, parvovirus B19, herpes simplex 1, herpes simplex 2, lidský adenovirus skupin A-C

#### **4.7.4.2 Senzitivita**

Při testování senzitivity reakce bylo zjišťováno, jak nízké koncentrace viru je možné zachytit. Plazmidy byly naředěny od koncentrace  $10^5/\mu\text{l}$  do koncentrace  $10^2$  kopií  $/\mu\text{l}$ ,  $10^1$  kopií  $/\mu\text{l}$ , 5 kopií  $/\mu\text{l}$ , 2,5 kopií  $/\mu\text{l}$ , 1,25 kopií  $/\mu\text{l}$ , 0,6 kopií  $/\mu\text{l}$ , 0,3 kopií  $/\mu\text{l}$ . PCR směs byla namíchána dle tabulky 3. Do 96-jamkové optické real-time desky byla po řadách po 10 jamkách naplněna PCR reakční směs s příslušnou koncentrací plazmidu. První řada obsahovala reakční směs s plazmidem o koncentraci  $10^2$  kopií  $/\mu\text{l}$ , druhá řada reakční směs o koncentraci plazmidu  $10^1$  kopií  $/\mu\text{l}$  atd. až do koncentrace 0,3 kopie  $/\mu\text{l}$ . Tento postup byl proveden u všech tří virů, mikrotitrační desky obsahovaly vždy negativní kontrolu (PCR směs bez DNA) a byly puštěny na přístrojích Applied Biosystem 7500 Real-Time PCR a CFX96 Touch Real-Time PCR Detection. Teplotní protokol byl použit dle tabulky 4. Senzitivita byla stanovena na 10 kopií  $/\mu\text{l}$  DNA v reakci.

#### **4.7.5 Detekce respiračních virů**

Detekce virů pomocí real-time PCR byla prováděna na dvou přístrojích virologické laboratoře Fakultní nemocnice Motol:

Applied Biosystem 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies™, Carlsbad, USA)

CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, USA)

Použité primery a sondy k detekci respiračních virů jsou uvedeny výše (viz tabulka 1).

PCR reakční směs k detekci respiračních virů byla nanášena do 96-jamkové optické real-time desky (Bio-Rad, Hercules, USA). Jamka obsahovala 13  $\mu$ l PCR směsi a 2  $\mu$ l DNA vzorku, viz tabulka 3. 2  $\mu$ l DNA byly zvoleny z důvodů omezeného objemu biologického materiálu odebraného od pacientů. Každý vzorek byl vždy před použitím promíchán a centrifugován. V každém testovaném běhu byla vždy přítomna negativní kontrola a kalibrační křivka o koncentraci  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  kopií plazmidu/  $\mu$ l. Zbylé jamky byly obsazeny reakční směsí, která obsahovala vzorky od pacientů. Aby se snížila chyba v pipetování byly vzorky testovány v duplikátech. K namíchání PCR směsi byly používány chemikálie HotStarTaq® DNA Polymerase (QIAGEN®, Hilden, Německo). Teplotní profil pro průběh PRC reakce byl použit dle tabulky 4. Desky byly vždy před proběhnutím PCR reakce řádně centrifugovány na centrifuze Biosan LMC – 3000 (Biosan, Litva) po dobu 2 min, rychlostí 1000 rpm.

#### **4.7.6 Detekce respiračních virů v krvi**

U pacientů s vysokou virovou náloží ve vzorku ( $> 10^4$  kopií / ml vzorku) byla testována i odebraná periferní krev pro výskyt případné virémie. Vzorky krve byly testovány stejným způsobem, jako vzorky z respiračního traktu (viz kapitola Detekce respiračních virů).

## 4.8 Rozřazení podtypů HBoV 1, HBoV 2, HBoV 3 a HBoV 4

K rozřazení 27 HBoV pozitivních vzorků bylo použito několik metod:

### 1. real-time PCR

Všechny HBoV pozitivní vzorky byly rozřazovány do podtypů pomocí specifických primerů viz tabulka 5. Primery byly navrhovány tak, aby specificky reagovaly pouze s jedním daným podtypem HBoV. HBoV pozitivní vzorky byly nanášeny do 96-jamkových optických real-time desek (Bio-Rad, Hercules, USA) a testovány na přístroji CFX96 Touch Real-Time PCR Detection (Bio-Rad, Hercules, USA). Teplotní profil byl použit stejný jak při detekci HBoV, KIPyV a WUPyV (viz tabulka 4). Ponechána byla i PCR reakční směs (viz tabulka 3). Primery pro detekci podtypů HBoV 2, 3 a 4 byly navrhovány pomocí programu Bioedit 7. 2. viz tabulka 5. Výjimkou byly primery a sonda pro detekci HBoV 1, které byly použity ze zásob laboratoře lékařské mikrobiologie FN Motol.

Tabulka 5:

Primery a sonda k detekci podtypů HBoV 1, 2, 3, 4

|                  | Sekvence                                | Cílový gen |
|------------------|---|------------|
| HBoV 1- forward  | 5'- GGA AGA GAC ACT GGC AGA CAA - 3'    | NP1        |
| HBoV 1- reverse  | 5'- GGG TGT TCC TGA TGA TAT GAG C - 3'  |            |
| HBoV 1 - sonda   | 5'- CTG CGG CTC CTG CTC CTG TGA T - 3'  |            |
| HBoV 2 - forward | 5'- CGA GCA TAT ATC CTA TAT AAG CC - 3' | NS1        |
| HBoV 2 - reverse | 5'- ATA GTG TCA CTC ACC ACG TGC - 3'    |            |
| HBoV 3 - forward | 5'- CGA GCA TAT ACC CTA TAT AAA CG - 3' |            |
| HBoV 3 - reverse | 5'- TAA TTT GAC TCA CCA CCA GTC - 3'    |            |
| HBoV 4 - forward | 5'- TGA GCA TAT AGC CTA TAT AAA CC - 3' |            |
| HBoV 4 - reverse | 5'- ATA GTG TCA CTC ACC ACA AGC - 3'    |            |
| HBoV 1 - 4 sonda | 5'-CTG CGG CTC CTG CTC CTG TGA T-3'     |            |

### 2. Nested PCR

Nested PCR, tzv. zahráná PCR, je modifikace klasické PCR. Amplifikace probíhá dvoufázově za použití dvou párů různých primerů - vnitřních a vnějších. V první fázi je pomocí jedné dvojice primerů (vnějších) namnožena delší sekvence DNA. Získaný produkt je pak přenesen do nové reakční směsi, která obsahuje druhý pár (vnitřních) primerů. Tento pár primerů nasedá na PCR produkty amplifikované v první fázi PCR, produkty z druhé fáze jsou tedy kratší

než produkty z fáze první. Po skončení amplifikace se detekce amplifikované DNA provádí na gelové elektroforéze. K výhodám této techniky patří vysoká výtěžnost a specifita daná dvěma dvojicemi primerů. Nevýhodou je, že otvíráním zkumavek a přenosem vzorků po první fázi se zvyšuje riziko kontaminace.

Nested PCR byla prováděna v termocykleru Veriti Applied Biosystems (Life Technologies™, USA). Všechny HBoV pozitivní vzorky byly naneseny do zkumavek společně s PCR reakční směsí (viz tabulka 3) a vnějšími primery (viz tabulka 6). PCR reakce byla puštěna dle teplotního protokolu (viz tabulka 4). Po skončení první fáze amplifikace byly z každé zkumavky přeneseny 2 µl vzniklé směsi do nových zkumavek. Nové zkumavky obsahovaly PCR reakční směs, která byla identická se směsí z první fáze PCR, pouze místo vnějších primerů obsahovala primery vnitřní. Jako vnitřní primery byly použity čtyři různé páry primerů (tabulka 6). Každý pár byl specifický pouze k jednomu podtypu HBoV. Druhá fáze amplifikace se tudíž opakovala čtyřikrát a to vždy s jiným párem primerů. Teplotní protokol byl zachován z první fáze. Po skončení druhé fáze byly namnožené DNA amplicony detekovány na gelové elektroforéze.

Tabulka 6:

Primery pro nested PCR

|                  | Sekvence                             | Cílový gen |
|------------------|--------------------------------------|------------|
| Primery vnější   |                                      |            |
| HBoV - forward   | 5'- TCC WCG YTG YGA CAT HRT WK - 3'  | NS 1       |
| HBoV - reverse   | 5'- CRT CAG GTY TGC TGK AAG RWG - 3' |            |
| Primery vnitřní  |                                      |            |
| HBoV 1- forward  | 5'- GCT AGG AGA GAA AAA CTT AC - 3'  | NS 1       |
| HBoV 1- reverse  | 5'- CGC TCA GCC TTT TTT AGA GT - 3'  |            |
| HBoV 2 - forward | 5'- AAA TGG TTC AGA ACA TCT AC - 3'  |            |
| HBoV 2 - reverse | 5'- CGT TCA ATG CGC TTG AGG AG - 3'  |            |
| HBoV 3 - forward | 5'- GCT TGG GGA GAC AAA CCT AC - 3'  |            |
| HBoV 3 - reverse | 5'- CGC TCA GCT CGT TTT AAA GC - 3'  |            |
| HBoV 4 - forward | 5'- AAT TGG CTG AGA CTT TCT AC - 3'  |            |
| HBoV 4 - reverse | 5'- CGT TCA ATG CGT TTA AGT TC - 3'  |            |

W = A, T    Y = C, T    H = A, C, T    R = A, G    W = A, T    K = G, T

### 3. Nested PCR v kombinaci s touchdown (tzv. přistávací) PCR

V obou fázích nested PCR je používán teplotní protokol pro touchdown PCR. Touchdown PCR je modifikací klasické PCR vedoucí ke snížení nespecifické amplifikace. Využívá postupně se snižující se teploty nasedání primerů. V počátečních cyklech je teplota nasedání vysoká, čímž brání nespecifickému nasedání primerů, ale postupně se v dalších cyklech snižuje o 0,5 °C. Při dostatečně nízké teplotě dochází k nasedání primerů na specifická místa a vzniká PCR produkt. Ačkoliv se teplota nasedání primerů může v dalších cyklech ještě dále snižovat, specifický produkt, který vznikl v předcházejících cyklech, zajistí po zbytek reakce vznik pouze specifických produktů.

Tato metoda byla prováděna v termocykleru Veriti Applied Biosystems (Life Technologies™, USA). Všechny HBoV pozitivní vzorky byly nanесeny do zkumavek společně s PCR reakční směsí (viz tabulka 3) a vnějšími primery (viz tabulka 7). PCR reakce byla puštěna dle teplotního profilu (viz tabulka 8). Po skončení první fáze amplifikace byly z každé zkumavky přeneseny 2 µl vzniklé směsi do nových zkumavek. Nové zkumavky obsahovaly stejnou PCR reakční směs, jako v první fázi, pouze vnější primery byly vyměněny za primery vnitřní (tabulka 7). Po skončení druhé fáze byly namnožené DNA amplikony detekovány na gelové elektroforéze a výsledky confirmovány sekvenováním poslány k sekvenování na Ústavu lékařské genetiky 2. lékařské fakulty UK.

Tabulka 7:  
Primery pro nested PCR v kombinaci s touchdown PCR

|                 | Sekvence                             | Cílový gen |
|-----------------|--------------------------------------|------------|
| Primery vnější  |                                      | VP1/2      |
| HBoV - forward  | 5' - CGCCGTGGCTCCTGCTCT - 3'         |            |
| HBoV - reverse  | 5' - TGTTCGCCATCACAAAAGATGTG - 3'    |            |
| Primery vnitřní |                                      |            |
| HBoV - forward  | 5' - GGCTCCTGCTCTAGGAAATAAAGAG - 3'  |            |
| HBoV - reverse  | 5' - CCTGCTGTTAGGTCGTTGTTGTATGT - 3' |            |



Tabulka 8:

Teplotní protokol pro nested PCR v kombinaci s touchdown PCR

| Teplota          | Čas       | Počet cyklů |
|------------------|-----------|-------------|
| 1. fáze          |           |             |
| 95 °C            | 15:00 min | 1 x         |
| 95 °C            | 0:35 min  | 10 x        |
| 58 °C (- 0,5 °C) | 1:00 min  |             |
| 72 °C            | 1:00 min  |             |
| 95 °C            | 0:30 min  |             |
| 54 °C            | 0:45 min  | 30 x        |
| 72 °C            | 0:45 min  |             |
| 72 °C            | 10:00 min | 1 x         |
| 2. fáze          |           |             |
| 95 °C            | 15:00 min | 1 x         |
| 95 °C            | 0:35 min  | 10 x        |
| 60 °C (- 0,5 °C) | 1:00 min  |             |
| 72 °C            | 1:00 min  |             |
| 95 °C            | 0:30 min  | 30 x        |
| 58 °C            | 0:45 min  | 1 x         |
| 72 °C            | 0:45 min  | 1 x         |
| 72 °C            | 10:00 min | 1 x         |

#### 4.8.1 Agarózová gelová elektroforéza

Agarózová elektroforéza byla prováděna v 2 % (w/v) agarózovém gelu s použitím pufru TBE (50%). Gel byl připraven z: 0,5 g agarózy, 25 ml TBE pufru a po uvaření bylo přidáno interkalační barvivo ethidium bromid v množství 1 µl. Tekutý gel byl nalit do hranolu s hřebenem a po ztuhnutí byl vložen do elektroforetické nádoby s TBE pufrům. Do první jamky byl nanesen tzv. velikostní marker MassRuler™ DNA Ladders (Life Technologies™, USA) o definované velikosti jednotlivých fragmentů. Do zbylých jamek byly nanесeny vzorky smíchané s barvivem 6X MassRuler DNA Loading Dye (Life Technologies™, USA). Aparatura byla poté připojena ke zdroji jednosměrného elektrického proudu. Intenzita elektrického byla nastavena na 100 V, čas separace molekul byl 20 minut. Po uplynutí nastaveného času byl gel prohlédnut na UV transluminátoru, vyfocen, graficky zpracován programem Kodak® 1D Image Analysis Software a uchován k dokumentačním účelům.

TBE: (45mM kyselina boritá, 20mM Tris-HCl, 1mM EDTA-NaOH, pH 8)

## 5 Výsledky

### 5.1 Tvorba kalibračních křivek

Na spektrofotometru bylo změřeno množství DNA v ng/μl izolátu. Množství DNA bylo následně přepočteno na množství kopií/μl, dle následujícího výpočtu:

plazmid CR2.1 z TA cloning kitu obsahuje 3 920 bp

jeden bp = 650 D

1 mol o délce  $\approx 4\,000$  bp =  $4\,000$  bp \* 650 D =  $2,6 * 10^6$  g

1 molekula =  $2,6 * 10^6$  g /  $6,022 * 10^{23}$  g

$$\frac{X \text{ g}/\mu\text{l DNA}}{4,32 * 10^{-18} \text{ g}} = Y \text{ kopií}/\mu\text{l}$$

X = naměřené množství DNA izolátu v ng/μl

Y = vypočítané množství kopií/μl DNA

Tabulka 9:

Výsledky měření izolovaných plazmidů

|       | Naměřená koncentrace<br>(ng/ μl) | Poměr absorbancí<br>260/280 nm | Počet molekul v 1 μl |
|-------|----------------------------------|--------------------------------|----------------------|
| HBoV  | 20,3                             | 1,84                           | $4,702 * 10^9$       |
| KIPyV | 14                               | 1,84                           | $3,240 * 10^9$       |
| WUPyV | 272,3                            | 1,85                           | $6,303 * 10^{10}$    |

Pro výpočet čistoty DNA byl použit poměr absorbancí 260/280 nm. Jeho hodnota by se měla pohybovat u čistých vzorků v rozmezí 1,8 – 2,0. Použité plazmidy těmito hodnotám vyhovovaly a byly použity k tvorbě kalibračních křivek naředěním na  $1 * 10^9$  respektive  $1 * 10^{10}$  a následným dekadickým ředěním.

## 5.2 Detekovaný výskyt HBoV

Detekce vzorků z respiračního traktu:

Přítomnost HBoV byla prokázána u 27 z 822 testovaných vzorků (3,28 %) od 24 (6,32 %) pacientů (5 dětských a 19 dospělých). Medián detekované kvantity byl  $3,2 \times 10^4$ /ml ve vzorku (rozmezí  $5,0 \times 10^2$ /ml –  $1,58 \times 10^9$ /ml). U 59 % HBoV pozitivních vzorků se vyskytovala koinfekce ještě jiným virem. Viz tabulka 10.

| číslo vzorku | Číslo pacienta | Věk pacienta (roky) | Pohlaví | Diagnóza     | Typ transplantace | Typ vzorku | Virová nálož (množství kopií/ml) | Susp. infekční respirační onemocnění | Susp. infekční gastroenteritida | Koinfekce | EBV | CMV | VZV | HSV | HHV 6 | HHV 7 | ADV | Poznámka  |
|--------------|----------------|---------------------|---------|--------------|-------------------|------------|----------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|-----------|-----|-----|-----|-----|-------|-------|-----|---|
| 1            | 1              | 52                  | muž     | CHOPN        | plice             | BAL        | 9,2E+03                          | ne                                   | ne                              | ne        |     | 0   |     | 0   |       |       |     | Zemřel, zygomykóza a kombinace MRSA a CMV   |
| 2            | 2              | 51                  | muž     | AML          | H SCT             | BAL        | 2,3E+05                          | ano                                  | ne                              | ano       | +   | +   |     | 0   | 0     | 0     | 0   | Zemřel, Aspergillová pneumonie + CMV infekce                                      |
| 3            | 3              | 53                  | žena    | AML          | H SCT             | BAL        | 1,6E+04                          | ano                                  | ne                              | ne        | 0   | 0   | 0   | 0   | 0     | 0     | 0   | Zemřela, MOF, refrakterní GvHD, sepse E. faecalis, infekce A. fumigatus.          |
| 4            | 4              | 31                  | muž     | CML          | H SCT             | BAL        | 5,0E+02                          | ano                                  | ne                              | ne        | 0   | 0   | 0   | 0   | 0     | 0     | 0   | Zemřel, MOF, refrakterní septický stav, adenovirová infekce                       |
| 5            | 5              | 46                  | žena    | AML          | H SCT             | BAL        | 9,0E+04                          | ano                                  | ne                              | ano       | 0   | +   |     | 0   | 0     | 0     | 0   | Zemřela, respirační selhání, CMV infekce  |
| 6            | 6              | 10                  | muž     | ALL          | HO                | BAL        | 7,1E+01                          | ano                                  | ne                              | ano       | 0   | 0   |     | 0   | +     | 0     | 0   | Žije, v době detekce pozitivní detekce zygomykóz a H. influenzae v BAL            |
| 7            | 7              | 41                  | muž     | MDS          | H SCT             | BAL        | 3,5E+04                          | ano                                  | ne                              | ano       | 0   | 0   | 0   | 0   | 0     | +     | 0   | Zemřel, MOF, susp. Mykotická infekce C. glabrata, S. marcescens                   |
| 8            | 8              | 42                  | žena    | CF           | plice             | BAL        | 1,2E+05                          | ne                                   | ne                              | ano       |     | +   |     | 0   |       |       |     | Žije, v době detekce bez příznaků.  |
| 9            | 9              | 60                  | muž     | MDS          | H SCT             | aspirát    | 1,0E+04                          | ne                                   | ne                              | ne        |     | 0   |     | 0   |       |       |     | Zemřel, MOF, nevládnutelná sepse  |
| 10           | 10             | 22                  | muž     | ALL          | H SCT             | BAL        | 9,9E+03                          | ano                                  | ne                              | ne        | 0   | 0   | 0   | 0   | 0     | 0     | 0   | Zemřel, septický šok ; v době detekce plicní infekce C. glabrata a Ps. Aeruginosa |
| 11           | 11             | 2                   | žena    | LCH          | H SCT             | BAL        | 3,2E+04                          | ano                                  | ne                              | ano       | 0   | 0   | 0   | 0   | +     | +     | 0   | Žije, v době detekce pneumonie, bez jasně určeného patogenního agens              |
| 12           | 12             | 55                  | žena    | CHOPN        | plice             | BAL        | 4,4E+05                          | ne                                   | ne                              | ano       | 0   | +   |     | 0   |       |       |     | Žije, v době detekce bez příznaků-vyšetřován z důvodů protokolárního vyšetření.   |
| 13           | 12             | 55                  | žena    | CHOPN        | plice             | BAL        | 3,0E+04                          | ne                                   | ne                              | ano       | 0   | +   |     | 0   |       |       |     | Žije, v době detekce bez příznaků-vyšetřován z důvodů protokolárního vyšetření.   |
| 14           | 13             | 31                  | žena    | CF           | plice             | BAL        | 5,6E+04                          | ne                                   | ne                              | ano       | 0   | +   |     | 0   |       |       |     | Žije, v době detekce bez příznaků-vyšetřován z důvodů protokolárního vyšetření.   |
| 15           | 14             | 62                  | muž     | CHOPN        | plice             | BAL        | 2,0E+04                          | ano                                  | ne                              | ne        | 0   | 0   |     | 0   |       |       |     | Zemřel, mykotická infekce.  |
| 16           | 15             | 59                  | muž     | IMF          | H SCT             | aspirát    | 2,7E+05                          | ano                                  | ne                              | ano       | 0   | 0   | 0   | 0   | 0     |       | +   | Zemřel, MOF, sepse  |
| 17           | 15             | 59                  | muž     | IMF          | H SCT             | aspirát    | 1,9E+04                          | ano                                  | ne                              | ne        | 0   | 0   | 0   | 0   | 0     | 0     | 0   | Zemřel, MOF, sepse  |
| 18           | 16             | 50                  | žena    | LAM          | plice             | BAL        | 5,9E+03                          | ne                                   | ne                              | ne        | 0   | 0   |     | 0   |       |       |     | Zemřel, MOF, sepse Elizabethkingia meningoseptica.                                |
| 19           | 17             | 32                  | žena    | CF           | plice             | BAL        | 1,0E+04                          | ne                                   | ne                              | ne        | 0   | 0   |     | 0   |       |       |     | Žije, v době detekce bez příznaků-vyšetřován z důvodů protokolárního vyšetření.   |
| 20           | 18             | 45                  | muž     | Def. alfa1AT | plice             | BAL        | 1,2E+04                          | ne                                   | ne                              | ne        | 0   | 0   |     | 0   |       |       |     | Žije, v době detekce bez příznaků-vyšetřován z důvodů protokolárního vyšetření.   |
| 21           | 19             | 9                   | muž     | NHL          | HO                | aspirát    | 1,2E+08                          | ano                                  | ne                              | ano       | 0   | 0   | 0   | 0   | 0     | +     | 0   | Žije, v době detekce zahaleněn, atelektatické změny bazálně oboustranné           |
| 22           | 20             | 50                  | muž     | CHOPN        | plice             | BAL        | 1,9E+04                          | ne                                   | ne                              | ano       | +   | +   |     | 0   |       |       |     | Žije, v době detekce bez příznaků-vyšetřován z důvodů protokolárního vyšetření.   |
| 23           | 21             | 1                   | žena    | imunodeficit | KAR               | ETR        | 5,1E+08                          | ano                                  | ne                              | ano       | +   | 0   | 0   | 0   | +     |       | 0   | Žije, době detekce pneumocystová pneumonie  |
| 24           | 22             | 41                  | žena    | AML          | H SCT             | aspirát    | 4,6E+02                          | ne                                   | ne                              | ano       | 0   | +   |     | 0   |       |       |     | Zemřela, plicní toxicita ve spojení s CMV infekcí                                 |
| 25           | 22             | 41                  | žena    | AML          | H SCT             | aspirát    | 1,4E+04                          | ne                                   | ne                              | ano       | 0   | +   | 0   | 0   | 0     | +     | 0   | Zemřela, plicní toxicita ve spojení s CMV infekcí                                 |
| 26           | 23             | 1                   | muž     | DM           | KAR               | aspirát    | 5,1E+03                          | ano                                  | ne                              | ne        | 0   | 0   |     | 0   |       |       | 0   | Žije.   |
| 27           | 24             | 41                  | muž     | ALL          | H SCT             | aspirát    | 5,9E-04                          | ano                                  | ne                              | ano       | +   | +   | 0   | +   | 0     |       | +   | Zemřel, MOF   |

DM - dermatomyozitida AML - akutní myeloidní leukémie CML - chronická myeloidní leukémie ALL - akutní lymfoblastická leukémie LAM - lymfangioleiomyomatoza plic  
MDS - myelodysplastický syndrom CF - cystická fibróza LCH - histiocytóza z Langerhansových buněk IMF - idiopatická myelofibróza Def. alfa1AT - deficit alfa1AT  
HSCT - transplantace hematopoetických buněk CHOPN - chronická obstrukční plicní nemoc

Tabulka 10: Pacienti detekovaní na HBOv infekci

### **5.3 Detekovaný výskyt KIPyV**

Detekce vzorků z respiračního traktu:

KIPyV jsme detekovali v 35 vzorcích z 822 testovaných (4,26 %) od pocházely od 22 (5,79 %) pacientů (3 dětských a 19 dospělých). Medián detekované kvantity byl  $1,55 \times 10^5$ /ml vzorku (rozmezí  $2,89 \times 10^3$ /ml –  $1,89 \times 10^9$ /ml). U 51 % KIPyV pozitivních vzorků se vyskytovala koinfekce ještě jiným virem.

Viz tabulka 11.

| Číslo vzorku | Číslo pacienta | Věk pacienta (roky) | Pohlaví | Diagnóza     | Typ transplantace | Typ vzorku | Virová nálož (množství kopií/ml) | Respirační onemocnění | Koinfekce | EBV | CMV | VZV | HSV | HHV 6 | HHV 7 | ADV | Poznámka |  |
|--------------|----------------|---------------------|---------|--------------|-------------------|------------|----------------------------------|-----------------------|-----------|-----|-----|-----|-----|-------|-------|-----|----------|--|
| 1            | 1              | 8                   | žena    | MDS          | HSCT              | aspirát    | 3,3E+05                          | ano                   | ano       |     |     |     |     |       |       |     | +        | Zemřela, důvodem byl TTP/HUS; v době detekce pneumonie způsobené Pneumocystou jirovecii a adenoviry                |
| 2            | 2              | 61                  | muž     | CLL          | HSCT              | BAL        | 1,2E+05                          | ano                   | ne        | 0   | 0   | 0   | 0   | 0     |       |     | 0        | Zemřel, intersticiální CMV pneumonie   |
| 3            | 2              | 61                  | muž     | CLL          | HSCT              | BAL        | 5,0E+04                          | ano                   | ne        | 0   | 0   | 0   | 0   | 0     |       |     | 0        | Zemřel, intersticiální CMV pneumonie   |
| 4            | 3              | 11                  | muž     | ALL          | HO                | BAL        | 1,7E+05                          | ano                   | ano       | +   | 0   |     | 0   | +     | 0     | 0   | 0        | Žije, v době detekce hnisavá bronchopneumonie.   |
| 5            | 4              | 26                  | muž     | AML          | HSCT              | BAL        | 7,3E+05                          | ano                   | ne        |     |     |     |     |       |       |     | 0        | Žije, v době detekce oboustranná pneumonie.  |
| 6            | 5              | 61                  | žena    | AML          | HO                | BAL        | 7,6E+05                          | ano                   | ne        | 0   | 0   | 0   | 0   | 0     |       |     | 0        | Zemřela, MOF, sepse, intersticiální pneumonie.   |
| 7            | 6              | 36                  | muž     | AML          | HSCT              | aspirát    | 6,7E+03                          | ano                   | ne        |     | 0   |     |     |       |       |     |          | Zemřel, MOF, sepse v kombinaci s CMV infekcí.  |
| 8            | 7              | 16                  | žena    | AML          | HSCT              | BAL        | 1,9E+05                          | ano                   | ano       |     | +   |     |     | 0     |       |     | 0        | Zemřela, MOF, sepse P. aeruginosa v kombinaci s CMV infekcí.   |
| 9            | 7              | 16                  | žena    | AML          | HSCT              | aspirát    | 1,5E+06                          | ano                   | ano       |     | +   |     |     | +     |       |     | 0        | Zemřela, MOF, sepse P. aeruginosa v kombinaci s CMV infekcí.   |
| 10           | 8              | 54                  | žena    | CHOPN        | pľice             | BAL        | 6,6E+05                          | ne                    | ne        |     | 0   |     |     |       |       |     |          | Žije, v době detekce bez příznaků-vyšetřován z důvodů protokolárního vyšetření.                                    |
| 11           | 9              | 29                  | muž     | CF           | pľice             | BAL        | 4,4E+03                          | ne                    | ne        | 0   | 0   |     |     |       |       |     |          | Žije, v době detekce bez příznaků-vyšetřován z důvodů protokolárního vyšetření.                                    |
| 12           | 10             | 39                  | muž     | Def. alfa1AT | pľice             | BAL        | 3,4E+03                          | ne                    | ne        | 0   | 0   |     |     |       |       |     |          | Žije, v době detekce bronchitidy obliterans jako příznak rejekce.  |
| 13           | 11             | 48                  | žena    | MDS          | HSCT              | BAL        | 2,0E+06                          | ano                   | ano       | 0   | 0   | 0   | 0   | 0     | 0     | +   | 0        | Zemřela, MOF, rozpadová pneumonie s krvácením.   |
| 14           | 11             | 48                  | žena    | MDS          | HSCT              | aspirát    | 6,9E+05                          | ano                   | ne        | 0   | 0   |     |     |       |       |     |          | Zemřela, MOF, rozpadová pneumonie s krvácením.   |
| 15           | 12             | 52                  | žena    | AML          | HSCT              | BAL        | 1,9E+04                          | ano                   | ne        | 0   | 0   | 0   | 0   | 0     | 0     | 0   | 0        | Zemřela, refrakterní onemocnění s progresí; v době detekce pneumonie.  |
| 16           | 13             | 48                  | žena    | AML          | HSCT              | aspirát    | 8,5E+03                          | ano                   | ano       | 0   | +   | 0   | +   | 0     | 0     | 0   | 0        | Zemřela, MOF, bilaterální pneumonie susp. HSV v kombinaci s mykotickým onemocněním.                                |
| 17           | 13             | 48                  | žena    | AML          | HSCT              | aspirát    | 3,7E+03                          | ano                   | ne        | 0   | 0   | 0   | 0   | 0     | 0     | 0   | 0        | Zemřela, MOF, bilaterální pneumonie susp. HSV v kombinaci s mykotickým onemocněním.                                |
| 18           | 13             | 48                  | žena    | AML          | HSCT              | aspirát    | 6,5E+04                          | ano                   | ano       | 0   | +   | 0   | 0   | 0     | 0     | 0   | 0        | Zemřela, MOF, bilaterální pneumonie susp. HSV v kombinaci s mykotickým onemocněním.                                |
| 19           | 13             | 48                  | žena    | AML          | HSCT              | aspirát    | 2,9E+04                          | ano                   | ne        | 0   | 0   | 0   | 0   | 0     | 0     | 0   | 0        | Zemřela, MOF, bilaterální pneumonie susp. HSV v kombinaci s mykotickým onemocněním.                                |
| 20           | 14             | 55                  | muž     | ALL          | HSCT              | aspirát    | 6,2E+04                          | ano                   | ano       | 0   | +   | 0   | 0   | 0     | 0     | 0   | 0        | Zemřel, bilaterální pneumonie nejasné etiologie.   |
| 21           | 15             | 26                  | žena    | AML          | HSCT              | aspirát    | 1,8E+07                          | ne                    | ne        | 0   | 0   | 0   | 0   | 0     | 0     | 0   | 0        | Zemřela, MOF, refrakterní GvHD pravděpodobně kombinovaná s mikroangiopatií.  |
| 22           | 15             | 26                  | žena    | AML          | HSCT              | aspirát    | 2,9E+07                          | ne                    | ne        | 0   | 0   | 0   | 0   | 0     | 0     | 0   | 0        | Zemřela, MOF, refrakterní GvHD pravděpodobně kombinovaná s mikroangiopatií.  |
| 23           | 15             | 26                  | žena    | AML          | HSCT              | aspirát    | 1,1E+08                          | ne                    | ne        | 0   | 0   | 0   | 0   | 0     | 0     | 0   | 0        | Zemřela, MOF, refrakterní GvHD pravděpodobně kombinovaná s mikroangiopatií.  |
| 24           | 15             | 26                  | žena    | AML          | HSCT              | aspirát    | 1,9E+09                          | ne                    | ano       | 0   | +   | 0   | 0   | +     | +     | 0   | 0        | Zemřela, MOF, refrakterní GvHD pravděpodobně kombinovaná s mikroangiopatií.  |
| 25           | 16             | 62                  | muž     | ALL          | HSCT              | aspirát    | 1,6E+05                          | ano                   | ano       | 0   | 0   | 0   | 0   | +     | 0     | 0   | 0        | Zemřel, bilaterální pneumonie nejasné etiologie.   |
| 26           | 17             | 65                  | muž     | CHOPN        | pľice             | BAL        | 6,0E+04                          | ne                    | ne        | 0   | 0   |     |     |       |       |     |          | Zemřel na pneumonii (S. pneumoniae, H. Influenzae) v kombinaci s po-tx. komplikacemi; v době detekce bez příznaků  |
| 27           | 18             | 33                  | muž     | AML          | HSCT              | BAL        | 2,9E+03                          | ano                   | ano       | 0   | 0   | 0   | 0   | 0     | +     | +   | 0        | Žije, v době detekce pneumonie.  |
| 28           | 19             | 61                  | muž     | IMF          | HSCT              | aspirát    | 2,0E+04                          | ano                   | ano       | 0   | +   | 0   | 0   | 0     | 0     | +   | +        | Zemřel, bilaterální pneumonie nejasné etiologie.   |
| 29           | 20             | 48                  | muž     | CHOPN        | pľice             | BAL        | 3,4E+04                          | ne                    | ne        | 0   | 0   |     |     |       |       |     |          | Zemřel na pneumonii (E. faecium, B. cepacia); v době detekce bez příznaků-vyšetřován z důvodů protokol. vyšetření. |
| 30           | 20             | 49                  | muž     | CHOPN        | pľice             | BAL        | 9,6E+03                          | ano                   | ano       | +   | +   |     |     |       |       |     |          | Zemřel na pneumonii (E. faecium, B. cepacia); v době detekce pneumonie - kvasinková v kombinaci s virovou (EBV).   |
| 31           | 21             | 60                  | muž     | ALL          | HSCT              | aspirát    | 5,3E+05                          | ano                   | ano       | +   | 0   | 0   | 0   | +     | +     |     |          | Zemřel, pľicní a kardiální toxicita, případně infekční proces nejasné etiologie.                                   |
| 32           | 22             | 66                  | muž     | AML          | HSCT              | aspirát    | 3,0E+04                          | ano                   | ano       | +   | +   |     |     |       |       |     |          | Žije, v době detekce pneumonie.  |
| 33           | 20             | 50                  | muž     | CHOPN        | pľice             | BAL        | 7,7E+06                          | ne                    | ano       | +   | 0   | 0   | 0   | 0     | +     | 0   | 0        | Zemřel na pneumonii (E. faecium, B. cepacia); v době detekce zhoršení pľicních funkcí s rejekcí - fibróza.         |
| 34           | 20             | 50                  | muž     | CHOPN        | pľice             | BAL        | 2,3E+06                          | ne                    | ano       | +   | 0   | 0   | 0   | 0     | +     | +   |          | Zemřel na pneumonii (E. faecium, B. cepacia); v době detekce zhoršení pľicních funkcí s rejekcí - fibróza.         |
| 35           | 20             | 50                  | muž     | CHOPN        | pľice             | BAL        | 2,7E+06                          | ne                    | ano       | +   | 0   | 0   | 0   | 0     | +     | +   |          | Zemřel na pneumonii (E. faecium, B. cepacia); v době detekce zhoršení pľicních funkcí s rejekcí - fibróza.         |

DM - dermatomyozitída AML - akutní myeloidní leukémie CML - chronická myeloidní leukémie ALL - akutní lymfoblastická leukémie LAM - lymfangioleiomyomatoza pľic  
MDS - myelodysplastický syndrom CF - cystická fibróza LCH - histiocytóza z Langerhansových buněk IMF - idiopatická myelofibróza Def. alfa1AT - deficit alfa1AT  
HSCT - transplantace hematopoetických buněk CHOPN - chronická obstrukční pľicní nemoc

Tabulka 11: Pacienti detekovaní na KIPyV infekci

## 5.4 Detekovaný výskyt WUPyV

Detekce vzorků z respiračního traktu:

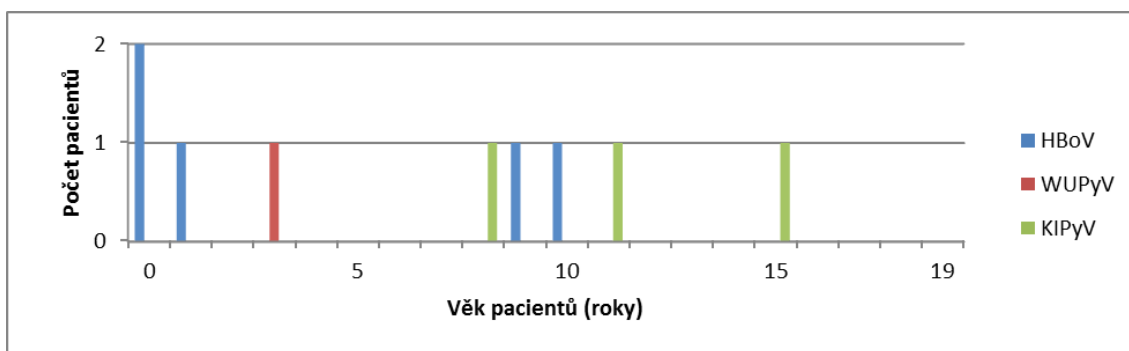
Přítomnost WUPyV byla prokázána u 2 z 822 testovaných vzorků (0,24 %) od 2 (0,53 %) dospělých pacientů s mediánem detekované kvantity  $4,49 \times 10^8$ /ml vzorku (rozmezí  $2,08 \times 10^4$ /ml –  $8,97 \times 10^8$ /ml). U jednoho pozitivního vzorku se vyskytovala koinfekce cytomegalovirem. U druhého vzorku nebyl z testovaných virů detekován žádný jiný kromě WUPyV.

| Číslo vzorku | Věk pacienta (roky) | Pohlaví | Typ transplantace | Diagnóza | Typ vzorku | Virová nálož (množství kopií/ml) | Respirační onemocnění | Koinfekce | EBV | CMV | VZV | HSV | HHV 6 | HHV 7 | ADV | Poznámka  |
|--------------|---------------------|---------|-------------------|----------|------------|----------------------------------|-----------------------|-----------|-----|-----|-----|-----|-------|-------|-----|---|
| 1            | 55                  | žena    | HSCT              | AML      | BAL        | 9,0E+08                          | ano                   | ano       | 0   | +   | 0   | 0   | 0     | 0     | 0   | Zemřela, chronická GvHD a susp. mykotická pneumonie |
| 2            | 31                  | muž     | HSCT              | ALL      | BAL        | 2,1E+04                          | ano                   | ne        | 0   | 0   | 0   | 0   | 0     |       |     | Žije, v době detekce bronchiolitis                  |

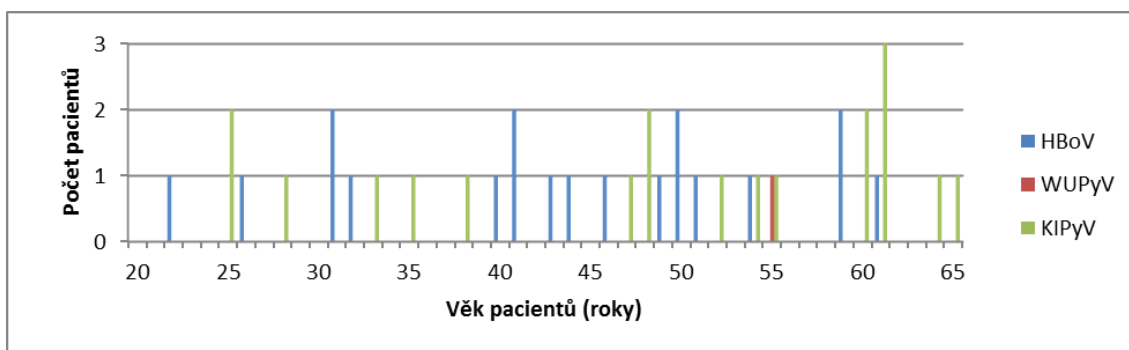
AML - akutní myeloidní leukémie    ALL - akutní lymfoblastická leukémie

Tabulka 12: Pacienti detekovaní na WUPyV infekce

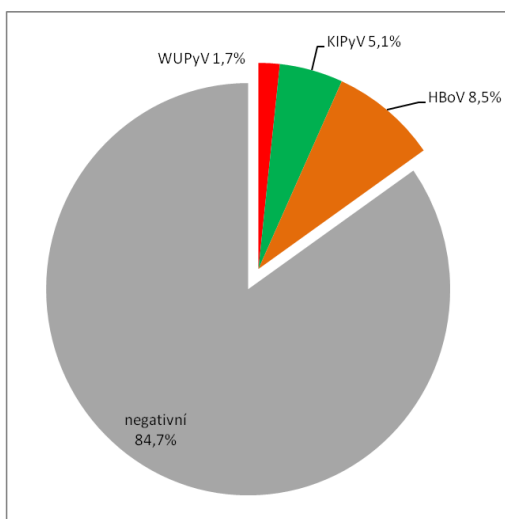




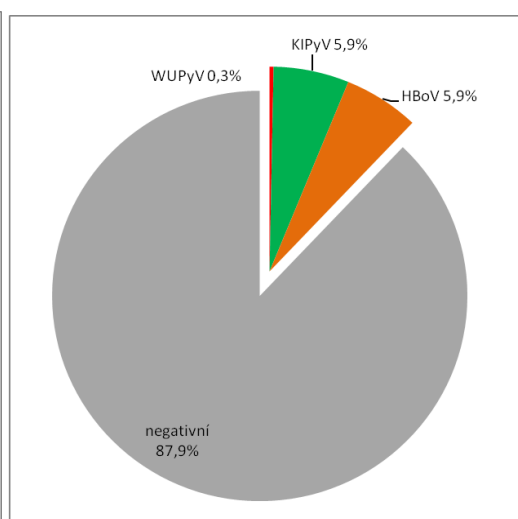
Graf 1: Výskyt virů v dětské populaci



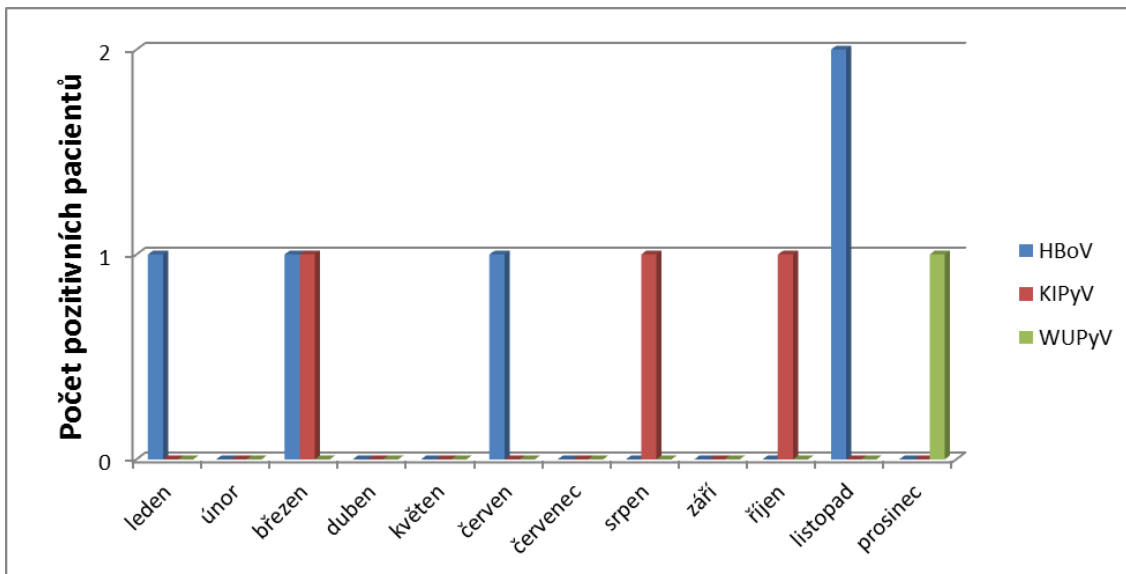
Graf 2: Výskyt virů v dospělé populaci



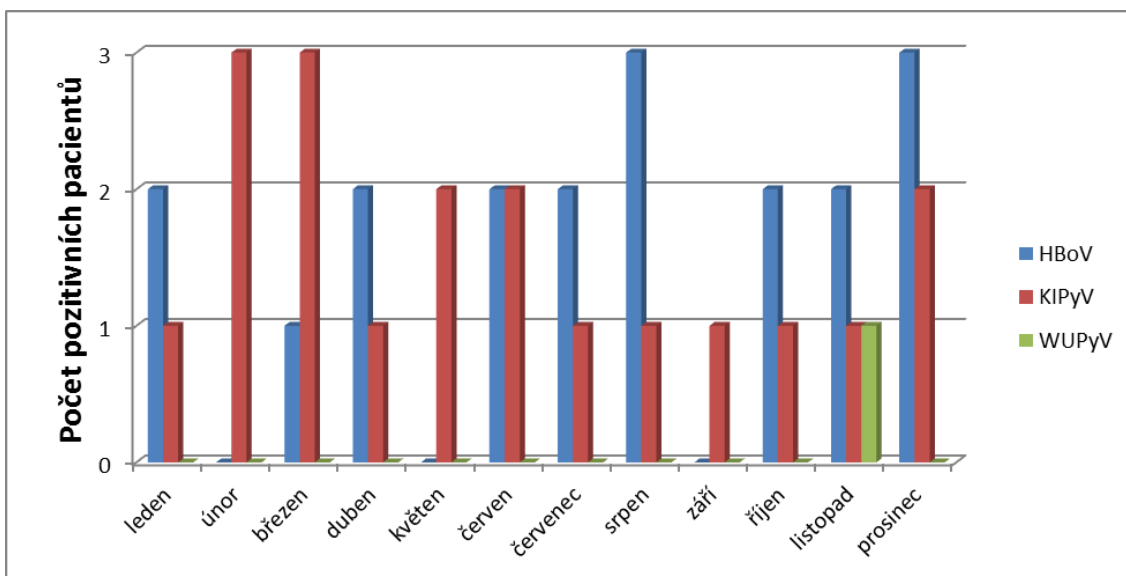
Graf 3: Výskyt virů v populaci dětí



Graf 4: Výskyt virů v populaci dospělých



Graf 3: Výskyt infikovaných dětských pacientů v průběhu roku



Graf: Výskyt infikovaných dospělých pacientů v průběhu roku

## 5.5 Detekce vzorků periferní krve na přítomnost HBoV, KIPyV, WUPyV

U pacientů, u nichž byl virus přítomen ve vysoké virové náloži ( $> 10^5$  kopií/ml) byla detekována i periferní krev z důvodů možného výskytu virémie. Testovány byly jak vzorky krve, které předcházely odběru vysoce infikovaného vzorku, tak vzorky krve, které následovaly po odběru vysoce infikovaného vzorku.

HBoV byl detekován u dvou pacientů v periferní krvi 2 pacientů. KIPyV a WUPyV nebyly v periferní krvi příslušných pacientů detekovány. Viz tabulka 13, 14, 15.

| vysoce infikované vzorky z respiračního traktu |            |                          | vzorky krve  |                  |                        |
|--|------------|--------------------------|--|------------------|------------------------|
| infekce  | typ vzorku | množství kopií/ml vzorku | den po(+)/před(-) odběrem vysoce infikovaného vzorku | virémie          | množství kopií/ml krve |
| HBoV   | aspirát    | 2,7E+05                  | - 19   | negativní        | -                      |
|  |            |                          | - 14   | negativní        | -                      |
|  |            |                          | - 6  | negativní        | -                      |
|  |            |                          | - 4  | negativní        | -                      |
|  |            |                          | + 1  | negativní        | -                      |
|  |            |                          | + 9  | negativní        | -                      |
|  |            |                          | + 16   | negativní        | -                      |
| HBoV   | BAL        | 4,4E+05                  | - 105  | negativní        | -                      |
|  |            |                          | - 51   | negativní        | -                      |
|  |            |                          | - 1  | negativní        | -                      |
|  |            |                          | <b>+ 18</b>  | <b>pozitivní</b> | <b>2,1E+04</b>         |
|  |            |                          | + 54   | negativní        | -                      |
| + 123  | negativní  | -                        |  |                  |                        |
| HBoV   | BAL        | 2,3E+05                  | <b>- 27</b>  | <b>pozitivní</b> | <b>9,3E+04</b>         |
|  |            |                          | <b>- 20</b>  | <b>pozitivní</b> | <b>1,5E+04</b>         |
|  |            |                          | - 13   | negativní        | -                      |
|  |            |                          | - 6  | negativní        | -                      |
| + 1  | negativní  | -                        |  |                  |                        |
| HBoV   | aspirát    | 5,1E+08                  | - 36   | negativní        | -                      |
|  |            |                          | - 29   | negativní        | -                      |
|  |            |                          | - 22   | negativní        | -                      |
|  |            |                          | - 14   | negativní        | -                      |
|  |            |                          | - 7  | negativní        | -                      |

Tabulka 13.: Vzorky krve testované na přítomnost HBoV

| vysoce infikované vzorky z respiračního traktu |            |                          | vzorky krve  |           |                        |
|--|------------|--------------------------|--|-----------|------------------------|
| infekce  | typ vzorku | množství kopií/ml vzorku | den po(+)/před(-)<br>odběrem vysoko<br>infikovaného vzorku | virémie   | množství kopií/ml krve |
| KIPyV  | BAL        | 7,3E+05                  | - 60   | negativní | -                      |
|  |            |                          | - 41   | negativní | -                      |
|  |            |                          | - 15   | negativní | -                      |
|  |            |                          | - 6  | negativní | -                      |
|  |            |                          | 0  | negativní | -                      |
|  |            |                          | + 7  | negativní | -                      |
|  |            |                          | + 13   | negativní | -                      |
| KIPyV  | BAL        | 2,0E+06                  | + 19   | negativní | -                      |
|  |            |                          | - 14   | negativní | -                      |
|  |            |                          | - 8  | negativní | -                      |
|  |            |                          | - 1  | negativní | -                      |
| KIPyV  | aspirát    | 6,9E+05                  | + 6  | negativní | -                      |
|  |            |                          | - 20   | negativní | -                      |
|  |            |                          | - 14   | negativní | -                      |
| KIPyV  | BAL        | 1,9E+05                  | - 7  | negativní | -                      |
|  |            |                          | - 1  | negativní | -                      |
|  |            |                          | + 44   | negativní | -                      |
|  |            |                          | + 49   | negativní | -                      |
| KIPyV  | aspirát    | 1,5E+06                  | - 21   | negativní | -                      |
|  |            |                          | - 13   | negativní | -                      |
|  |            |                          | - 7  | negativní | -                      |
|  |            |                          | - 1  | negativní | -                      |
|  |            |                          | + 44   | negativní | -                      |
| KIPyV  | aspirát    | 1,8E+07                  | + 49   | negativní | -                      |
|  |            |                          | - 28   | negativní | -                      |
|  |            |                          | - 20   | negativní | -                      |
|  |            |                          | - 14   | negativní | -                      |
|  |            |                          | - 7  | negativní | -                      |
|  |            |                          | 0  | negativní | -                      |
| KIPyV  | aspirát    | 2,9E+07                  | + 9  | negativní | -                      |
|  |            |                          | + 16   | negativní | -                      |
|  |            |                          | + 22   | negativní | -                      |
|  |            |                          | - 36   | negativní | -                      |
|  |            |                          | - 28   | negativní | -                      |
|  |            |                          | - 22   | negativní | -                      |
|  |            |                          | - 15   | negativní | -                      |
| KIPyV  | aspirát    | 1,1E+08                  | - 9  | negativní | -                      |
|  |            |                          | 0  | negativní | -                      |
|  |            |                          | + 7  | negativní | -                      |
|  |            |                          | + 14   | negativní | -                      |
|  |            |                          | - 42   | negativní | -                      |
|  |            |                          | - 34   | negativní | -                      |
|  |            |                          | - 28   | negativní | -                      |
| KIPyV  | aspirát    | 1,9E+09                  | - 21   | negativní | -                      |
|  |            |                          | - 15   | negativní | -                      |
|  |            |                          | - 6  | negativní | -                      |
|  |            |                          | + 1  | negativní | -                      |
|  |            |                          | + 8  | negativní | -                      |
|  |            |                          | - 50   | negativní | -                      |
| KIPyV  | BAL        | 7,7E+06                  | - 42   | negativní | -                      |
|  |            |                          | - 36   | negativní | -                      |
|  |            |                          | - 29   | negativní | -                      |
|  |            |                          | - 23   | negativní | -                      |
|  |            |                          | - 14   | negativní | -                      |
| KIPyV  | BAL        | 2,3E+06                  | - 7  | negativní | -                      |
|  |            |                          | 0  | negativní | -                      |
|  |            |                          | - 82   | negativní | -                      |
| KIPyV  | BAL        | 2,7E+06                  | - 73   | negativní | -                      |
|  |            |                          | - 56   | negativní | -                      |
|  |            |                          | - 91   | negativní | -                      |
| KIPyV  | BAL        | 2,7E+06                  | - 82   | negativní | -                      |
|  |            |                          | - 65   | negativní | -                      |
|  |            |                          | - 96   | negativní | -                      |
| KIPyV  | BAL        | 2,7E+06                  | - 87   | negativní | -                      |
|  |            |                          | - 70   | negativní | -                      |

Tabulka 14.: Vzorky krve testované na přítomnost KIPyV

| vysoce infikované vzorky z respiračního traktu |            |                          | vzorky krve  |                                     |                        |
|--|------------|--------------------------|--|-------------------------------------|------------------------|
| infekce  | typ vzorku | množství kopií/ml vzorku | den po(+)/před(-)<br>odběrem vysoko<br>infikovaného vzorku | virémie                             | množství kopií/ml krve |
| WUPyV  | BAL        | 9,0E+08                  | - 29<br>- 23<br>+ 8  | negativní<br>negativní<br>negativní | -<br>-<br>-            |

Tabulka 15.: Vzorky krve testované na přítomnost WUPyV

## 5.6 Rozřazení HBoV podtypů 1, 2, 3 a 4

Z 27 HBoV pozitivních vzorků se 11 vzorků podařilo zařadit. 6 z nich bylo typu HBoV 1, 4 pak HBoV 2 a jeden vzorek byl identifikován jako HBoV 3.

| číslo HBoV<br>poz. vzorku | číslo<br>pacienta | real-time<br>PCR | nested PCR | touchdown<br>PCR<br>sekvenování |
|---------------------------|-------------------|------------------|------------|---------------------------------|
| 1                         | 1                 |                  | 1          |                                 |
| 2                         | 2                 | 1                | 1          |                                 |
| 3                         | 3                 | 1                |            |                                 |
| 4                         | 4                 |                  |            |                                 |
| 5                         | 5                 |                  |            |                                 |
| 6                         | 6                 |                  |            |                                 |
| 7                         | 7                 |                  |            |                                 |
| 8                         | 8                 | 1                | 1          |                                 |
| 9                         | 9                 |                  | 2          |                                 |
| 10                        | 10                |                  |            |                                 |
| 11                        | 11                |                  |            |                                 |
| 12                        | 12                | 1                | 1          | 1                               |
| 13                        | 12                |                  |            |                                 |
| 14                        | 13                | 3                |            |                                 |
| 15                        | 14                | 2                | 2          |                                 |
| 16                        | 15                | 2                |            | 2                               |
| 17                        | 15                |                  |            |                                 |
| 18                        | 16                |                  |            |                                 |
| 19                        | 17                |                  |            |                                 |
| 20                        | 18                |                  |            |                                 |
| 21                        | 19                |                  | 1          | 1                               |
| 22                        | 20                |                  | 2          |                                 |
| 23                        | 21                |                  |            |                                 |
| 24                        | 22                |                  |            |                                 |
| 25                        | 22                |                  |            |                                 |
| 26                        | 23                |                  |            |                                 |
| 27                        | 24                |                  |            |                                 |

Tabulka 16: Detekce HBoV podtypů 1 – 4

## 6 Diskuze

Imunokompromitovaní pacienti, jako například pacienti po transplantacích, jsou ohroženi infekcemi mnohem více než zdraví pacienti.

V naší studii jsme lidský bocavirus detekovali u 27 (3,28 %) vzorků od 24 (6,32 %) pacientů. Pokud tato data srovnáme s výsledky z testování vzorků od symptomatických pacientů FN Motol získanými od ledna roku 2013 do května 2015 pomocí komerčního kitu Anyplex RV16 firmy Seegene detekujícího 16 respiračních DNA a RNA virů včetně HBoV, zjistíme, že v daném období bylo testováno 550 vzorků dolních dýchacích cest od 362 pacientů a HBoV byl detekován u 29 vzorků (5,3%) od 28 pacientů (7,7%). Mírně vyšší výskyt jak mezi vzorky, tak pacienty může souviset zejména se symptomatickou infekcí dýchacího traktu, která byla přítomna ve všech případech tohoto testování.

Při rozdělení na vzorky od dospělých a dětských pacientů, které se častěji vyskytují v dosud publikované literatuře, pak bylo mezi vzorky od dospělých pacientů pozitivních 22 (2,95%) vzorků od 19 (5,82%) pacientů, což je více než u dosud publikovaných studií, ve kterých se prevalence HBoV u imunosuprimovaných dospělých pacientů ve vzorcích typu BAL pohybuje v rozmezí 0 – 5 % (Costa *et al.* 2009, Miyakis *et al.* 2009, Müller *et al.* 2009, Chatzidimitriou *et al.* 2010, Garbino *et al.* 2015). Pacienti testovaní ve zmíněných publikacích byly však vždy symptomatictí, oproti pacientům v naší studii, kde se vyskytovali i pacienti u nichž se žádné respirační symptomy nevyskytovali a bronchoalveolární laváž podstoupili po transplantaci plic z protokolárních důvodů. Při pravidelných kontrolách bez ohledu na to, zda se u nich nějaké respirační symptomy vyskytují. U všech dalších testovaných pacientů, jako jsou například pacienti po HSCT, však byly vzorky získány jen při závažných respiračních komplikacích. Protože jsme HBoV detekovali i u asymptomatických pacientů, je možné, že tito asymptomatictí pacienti mohou navyšovat výsledné procento infikovaných pacientů v naší studii.

Při srovnání bocavirových infekcí u imunokompromitovaných a imunokompetentních dospělých, je výskyt u imunokompromitovaných pacientů

vyšší, jelikož výskyt bocavirových infekcí u imunokompetentních pacientů se pohybuje v rozmezí 0 % - 1,5 % (Maggi *et al.* 2007, Longtin *et al.* 2008), nutno ale podotknout, že množství studií věnovaným dospělým imunokompetentním jedincům jsou zatím velmi omezené. V naší studii je očekávaně záchyt viru u dospělých pacientů vyšší, neboť se jednalo o imunokompromitované pacienty.

Ze 77 testovaných dětských vzorků bylo 5 (6,49 %) vzorků pocházejících od 5 pacientů (9,26 %) infikováno HBoV. Zatím nejsou dostupná žádná data týkající se prevalence HBoV u dětských imunokompromitovaných pacientů. U imunokompetentních dětí s horním či dolním respiračním onemocněním je udáván výskyt viru v rozmezí 2 % – 19 % testovaných respiračních vzorků (Allander *et al.* 2005, Arden *et al.* 2006, Arnold *et al.* 2006, Bastien *et al.* 2006b, Foulonge *et al.* 2006a, Foulongne *et al.* 2006b, Sloots *et al.* 2006, Fry *et al.* 2007, Longtin *et al.* 2008, Jartti *et al.* 2012). Výskyt virů v naší studii souhlasí s publikovanými daty. Kvůli širokému popisovanému procentuálnímu rozmezí imunokompetentních HBoV pozitivních dětí nemůžeme jednoznačně určit, zda jsou či nejsou imunosuprimované děti k infekci HBoV náchylnější.

Procentuálním porovnáním však vychází vyšší záchytnost HBoV u dětí ve srovnání s dospělými pacienty (9,26% mezi dětskými pacienty oproti 5,82% pacientů dospělých). Tento vyšší záchyt popisují také další práce zaměřené na HBoV.

U infekcí lidského bocavirus jsou známy velmi časté koinfekce jinými patogeny. V této práci je 59 % HBoV pozitivních vzorků infikováno minimálně jedním z následujících virů: EBV, CMV, VZV, HSV, HHV 6, HHV 7, ADV. Literatura udává, že až 83 % HBoV pozitivních vzorků z respiračního traktu je infikováno ještě jiným patogenem (Jartti *et al.* 2012). Nižší výskyt koinfekcí u námi testovaných vzorků je dáno pravděpodobně tím, že ne všechny HBoV pozitivní vzorky byly testovány na všechny zmíněné viry a navíc v publikovaných studiích jsou HBoV pozitivní vzorky testovány především na častější respirační RNA a DNA viry. Tato skutečnost tedy může snižovat naše konečné procento vyskytujících se koinfekcí. Tento fakt podporuje i vyšší výskyt koinfekcí u HBoV pozitivních vzorků testovaných pomocí komerčního kitu pro 16 DNA a RNA virů, v rámci rutinní detekce v laboratoři Ústavu lékařské

mikrobiologie FN Motol (viz výše), kde je výskyt koinfekcí v HBoV pozitivních vzorcích 78%.

Abychom ověřili, zda se HBoV vyskytuje i v periferní krvi testovali jsme 84 vzorků periferní krve na přítomnost HBoV. Testovány byly vzorky krve, které byly odebrány časově blízko od vysoce pozitivního vzorku z respiračního traktu ( $>10^5$  kopií / ml vzorku). Dle publikovaných studií je virémie u HBoV popisována pouze u pacientů, u nichž právě probíhá akutní infekce a u nichž se virus vyskytuje v respiračních vzorcích ve vysokých kvantitách ( $>10^4$  kopií HBoV / ml vzorku) (Allander *et al.* 2007a). 23 vzorků krve bylo testovaných na přítomnost HBoV u 4 pacientů a virémie byla detekována pouze u 3 vzorků od 2 pacientů. Dva pacienti i přes vysokou virovou nálož v respiračním vzorku byly ve všech detekovaných vzorcích krve negativní. U jednoho z nich došlo v období náběru vysoce pozitivního vzorku k multiorgánovému selhání a k následnému úmrtí, můžeme tedy předpokládat, že virus se nestihl rozšířit do krevního oběhu, proto nemohl být detekován. U druhého pacienta, u něhož taktéž nebyla prokázána virémie, neexistují žádné vzorky krve následující po odběru vysoceinfikovaného respiračního vzorku, můžeme tedy předpokládat, podobně jako u předchozího pacienta, že ani zde se virus nestihl rozšířit do krevního oběhu. Pacientů, u nichž se virus v krvi vyskytoval, byla diagnostikována mykotická infekce plic, která narušuje plicní epitel a virus se tak může snadněji šířit do krve. Mimo biologických příčin toho, že jsme detekovali v periferní krvi HBoV u tak málo vzorků může být možná příčina také v technických rozdílech naší detekce a zmiňovaných publikací, stejně jako v retrospektivním testování a uchování našich vzorků. V případě popisovaných nízkých pozitivit totiž nelze vyloučit u dlouhodobě skladovaných vzorků vliv tohoto skladování i opakovaného rozmrazování a zamrazování vzorku v rámci práce na dalších projektech na nízké kvantitě virové nukleové kyseliny například v rámci rozpadu a degradace DNA. Dalším důvodem pak může být použití plné krve jako vstupního materiálu ve srovnání s většinou studií používajících k testování acelulární materiál.

Lidský bocavirus je často spojován s respiračním onemocněním, nicméně v této studii bylo 27 pozitivních vzorků pocházejících od 24 pacientů a pouze 3 pacienti trpěli respiračními obtížemi bez jasně určeného patogenního



agens. Na základě těchto výsledků tedy nemůžeme podpořit hypotézu lidského bocaviru jako patogena způsobujícího respirační onemocnění u lidí.

Jelikož se HBoV vyskytuje ve 4 podtypech, pokusili jsme se všech 27 HBoV pozitivních vzorků zařadit k odpovídajícímu podtypu. Bohužel se přes veškerou sanhu a použití více technik nepodařilo zařadit všechny HBoV pozitivní vzorky. Příčinou může být nízký počet kopií viru ve vzorcích, který se vyskytuje u nezařazených vzorků nebo možná degradace virové DNA, díky rozmrazování a zpětnému zamrazování testovaných vzorků. Z 11 zařazených vzorků bylo 6 vzorků typu 1, 4 vzorky typu 2, 1 vzorek typu 3 a žádný vzorek typu 4. Tento výsledek je v souladu s literaturou, neboť v respiračních vzorcích se vyskytuje nejčastěji podtyp 1 a 2. Podtyp 3 a 4 se v respiračních vzorcích vyskytuje jen vzácně (Koseki *et al.* 2012).

V případě lidských polyomavirů jsme KIPyV detekovali u 35 (4,26 %) vzorků pocházejících od 22 (5,79 %) pacientů (3 dětských a 19 dospělých) a WUPyV pak ve 2 (0,46 %) vzorcích od 2 (0,53 %) dospělých pacientů. Pozorovaná data souhlasí s dosud publikovanými studiemi, které popisují výskyt těchto virů ve vzorcích z respiračního traktu u imunosuprimovaných pacientů mezi 0,5 % - 8 % u KIPyV a 1 % - 16,4 % u WUPyV (Ren *et al.* 2008, Mourez *et al.* 2009, Teramoto *et al.* 2011, Babakir-Mina *et al.* 2012). Zejména u WUPyV jsme se s detekovanou prevalencí k dolní publikované hranici výskytu. Přestože jsou publikovány práce popisující frekvenci až 16,4% na vzorcích japonských pacientů coby nejvyšší výskyt viru, je na druhou stranu právě v asijské populaci pacientů z Číny popisována nejnižší frekvence výskytu 0.35%. Stejně tak v Evropské populaci se významně liší popisovaná frekvence výskytu mezi 0,75% a 0,9% ve studiích z Francie a Finska až k 4,9% ve studii z Německa u dětských pacientů. S ohledem na různý záchyt viru přímou detekcí se pak naše data jak typem vzorků, tak pacienty blíží studii na imunokompromitovaných pacientech z Francie (Mourez *et al.* 2009), ve které bylo vyšetřováno 265 vzorků dýchacích cest (154 nasofaryngeálních aspirátů a 111 BAL) od 200 pacientů s příznaky respiračního onemocnění ve věkové skupině s mediánem věku 46 let (rozmezí 3,6-85,3). WUPyV byl detekován u 2 vzorků od 2 pacientů (1%). S ohledem na velmi obdobné věkové rozložení pak

náš záchyt 0,46% pozitivních vzorků a 0,52% pacientů této hranici velmi blízko, zejména s ohledem na symptomy respirační infekce u všech testovaných pacientů. V případě KIPyV pak jak záchyt, tak výskyt mezi pacienty souhlasí s dosud publikovanými daty, včetně studií z evropských zemí jako jsou Francie 0,6%-6,5% pozitivních vzorků od až 8% pacientů (Mourez *et al.* 2009, Babakir-Mina *et al.* 2012), či Velká Británie s popisovaným výskytem 1,4-2,7% pozitivních vzorků od až 2,7% vyšetřovaných pacientů (Babakir-Mina *et al.* 2012).

U infekcí KIPyV a WUPyV jsou stejně jako u lidského bocavirus časté koinfekce jinými patogeny. Koinfekce s dalšími viry je popisována až u 70 % vzorků s detekovaným KIPyV nebo WUPyV (Han *et al.* 2007, Le *et al.* 2007, Bialasiewicz *et al.* 2008). V naší studii jsme detekovali koinfekci dalším virovým patogenem u 51 % KIPyV a 50% WUPyV pozitivních vzorků, ale jak už bylo řečeno, ne u všech pacientů pozitivních na polyomavirus KI a WU bylo detekováno všech 7 výše zmíněných virů, což může značně zkreslovat konečný výsledek.

Oba polyomaviry KI a WU se nejčastěji vyskytují ve vzorcích z respiračního traktu a tak jsou ve vzorcích krve či séra popisovány jen zřídka (Barzon *et al.* 2009b, Bialasiewicz *et al.* 2009). Nicméně existují publikace, uvádějící přítomnost virémie u zejména imunokomprimované pacienty, nejčastěji HIV pozitivní (Babakir-Mina *et al.* 2009c, Miller *et al.* 2009, Babakir-Mina *et al.* 2010, Csoma *et al.* 2011). Publikace, v kterých byly KIPyV a WUPyV detekovány v krvi uvádějí výskyt okolo 2,5 %. V této práci byla krev testována u 5 pacientů, u nichž byla virová nálož v respiračním vzorku  $10^4$  kopií KIPyV / ml vzorku a více. V naší kohortě pacientů, možná i proto, že v ní s téměř 100% jistotou žádný HIV pozitivní pacient není a tak se typ a hloubka imunosuprese odlišuje, nebyl v krvi u žádného pacienta WUPyV a KIPyV detekován.

Přestože je infekce KIPyV a WUPyV je asociována s výskytem pískotů při dýchání tzv. „wheezing“ a produkcí hlenu v dýchacích cestách, nemůžeme na základě dostupných dat tuto asociaci potvrdit, stejně tak jako jsme nezaznamenali asociaci těchto polyomavirů s s GvHD, reaktivací

cytomegaloviru, neutropenií, lymfopenií, hospitalizací či smrtí pacienta stejně jak je popisováno v literatuře (Kuypers *et al.* 2012).

## 7 Souhrn

Studie potvrdila výskyt polyomavirů KIPyV (5,79 %), WUPyV (0,53 %) a HBoV (6,32 %) i v české populaci a to u dětských i dospělých imunosuprimovaných pacientů. K bližšímu osvětlení jejich epidemiologie a patofyziologického účinku však bude třeba získat k testování větší skupinu pacientů a nejlépe v prospektivní studii získat data o co největším počtu virových agens v dýchacích cestách těchto pacientů.

Získaná data zaměřená na výskyt těchto virů u pacientů v ČR připravujeme k publikaci.

## 8 Seznam použité literatury

- Abed Y, Wang D, Boivin G. (2007): WU polyomavirus in children, Canada. *Emerg Infect Dis* 13:1939–1941.
- Abedi Kiasari B., Valley P.J., Corless C.E., Alhammadi M., Klapper P.E. (2008): Age related pattern of KI and WU polyomavirus infection. *J Clin- Virol*; 43:123–5.
- Alazard-Dany N., Nicolas A., Ploquin A., et al (2009): Definition of herpes simplex virus type 1 helper activities for adeno-associated virus early replication events. *PLoS Pathog*, 5:e1000340.
- Allander T., Tammi M. T., Eriksson M., Bjerkner A., Tiveljung-Lindell A, Andersson B. (2005): Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:12891– 12896
- Allander T., Andreasson K., Gupta S., Bjerkner A., Bogdanovic G., Persson M.A.A., et al. (2007a): Identification of a third human polyomavirus. *J Virol*;81:4130–6.
- Allander T., Jartti T., Gupta S., Niesters H. G., Lehtinen P., Osterback R., et al. (2007b): Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin Infect Dis*;44:904–10.
- Allander T. (2008): Human bocavirus, *Journal of Clinical Virology* 41; 29–33
- Arden K. E., Mackay I. M. (2010): Newly identified human rhinoviruses: molecular methods heat up the cold viruses. *Rev Med Virol*; 20:156–176.
- Arnold J. C., Singh K. K., Spector S. A., Sawyer M. H. (2006): Human bocavirus: prevalence and clinical spectrum at a children’s hospital. *Clin. Infect. Dis.* 43:283–288.
- Arthur J.L., Higgins G.D., Davidson G.P., Givney R.C., Ratcliff R.M. (2009): A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. *PLoS Pathogens*; 5: e1000391.
- Babakir-Mina M., Ciccozzi M., Dimonte S., Farchi F., Valdarchi C., Rezza G., et al. (2008): Identification of the novel KI polyomavirus in the respiratory tract of an Italian patient. *J Med Virol*; 80:2012–4.
- Babakir-Mina M., Ciccozzi M., Alteri C., Polchi P., Picardi A., Greco F., et al. (2009a): Excretion of the novel polyomaviruses KI and WU in the stool of patients with hematological disorders. *J Med Virol*; 81:1668–73
- Babakir-Mina M., Ciccozzi M., Bonifacio D., Bergallo M., Costa C., Cavallo R., et al.(2009b): Identification of the novel KI and WU polyomaviruses in human tonsils. *J Clin Virol*; 46:75–9.

- Babakir-Mina M., Ciccozzi M., Trento E., Perno C.F., Ciotti M. (2009c): KI and WU polyomaviruses in patients infected with HIV-1, Italy. *Emerg Infect Dis* 15:1323–5.
- Babakir-Mina M., Ciccozzi M., Farchi F., Bergallo M., Cavallo R., Adorno G., et al. (2010): KI and WU polyomaviruses and CD4+ cell counts in HIV-1- infected patients, Italy. *Emerg Infect Dis* ;16:1482–5.
- Babakir-Mina M., M. Ciccozzi, C.F. Perno, M. Ciotti. (2013) : The human polyomaviruses KI and WU: virological background and clinical implications, *Apmis* 121, 746–754.
- Barzon L., Squarzon L., Pacenti M., Scotton P.G., Palu G. (2009a): Detection of WU polyomavirus in cerebrospinal fluid specimen from a patient with AIDS and suspected progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Infect Dis* ; 200:314–5.
- Barzon L., Squarzon L., Militello V., Trevisan M., Palu G. (2009b): Human KI and WU polyomavirus infection in immunocompromised subjects. *J Clin Virol* ;45:370.
- Bastien N., Brandt K., Dust K., Ward D., Li Y. (2006): Human Bocavirus infection, Canada. *Emerg Infect Dis*, 12(5):848-850.
- Bergallo M., Terlizzi M. E., Astegiano S., Ciotti M., Babakir-Mina M., Perno C.F., et al. (2009): Real Time PCR TaqMan assays for detection of polyomaviruses KIV and WUV in clinical samples. *J Virol Methods*; 162:69–74.
- Bialasiewicz S., Whiley D.M., Lambert S.B., Wang D., Nissen M.D., Sloots T.P. (2007): A newly reported human polyomavirus, KI virus, is present in the respiratory tract of Australian children. *J Clin Virol*;40:15–8.
- Bialasiewicz S, Whiley DM, Lambert SB, Jacob K, Bletchly C, Wang D, et al. (2008): Presence of the newly discovered human polyomaviruses KI and WU in Australian patients with acute respiratory tract infection. *J Clin Virol*; 4:63–8.
- Bialasiewicz S, Whiley DM, Lambert SB, Nissen MD, Sloots TP. (2009): Detection of BK, JC, WU, or KI polyomaviruses in faecal, urine, blood, cerebrospinal fluid and respiratory samples. *J Clin Virol*; 45:249–54.
- Blessing K, Neske F, Herre U, Kreth HW, Weissbrich B. (2009): Prolonged detection of human bocavirus DNA in nasopharyngeal aspirates of children with respiratory tract disease. *Pediatr Infect Dis J*, 28:1018–1019.
- Bodaghi S, Comoli P, Bosch R, Azzi A, Gosert R, Leuenberger D, et al. (2009): Antibody responses to recombinant polyomavirus BK Large T and VP1 proteins in young kidney transplant patient. *J Clin Microbiol*; 47:2577–85.
- Boivin G, De Serres G, Hamelin ME, et al. (2007): An outbreak of severe respiratory tract infection due to human metapneumovirus in a longterm care facility. *Clin Infect Dis*; 44:1152–1158.

Bonvicini, F.; Manaresi, E.; Gentilomi, G.A.; Di Furio, F.; Zerbini, M.; Musiani, M.; Gallinella, G. (2011): Evidence of human bocavirus viremia in healthy blood donors. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 71, 460–462.

Borel JF. (2002): History of the discovery of cyclosporin and of its early pharmacological development. *Wien Klin Wochenschr.*; 114(12):433-7.

Buck CB, Phan GQ, Raiji MT, Murphy PM, McDermott DH, McBride AA. (2012): Complete genome sequence of a tenth human polyomavirus. *J Virol*; 86:10887.

Calne, R. Y., White, D. J., Thiru, S., Evans, D. B., McMaster, P., Dunn, D. C., Craddock, G. N., Pentlow, B. D. & Rolles, K. (1979): Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet*, 2 (8104-5): 1323-1327.

Calvo C., M.L. Garcí'a-Garcí'a, C. Blanco, M.J. Santos, F. Pozo, P. Pe´rez-Bren, I. Casas (2013): Human bocavirus infection in a neonatal intensive care unit, *Journal of Infection* (2008) 57, 269e271, Volume 51 Number 10

Campanini G, Percivalle E, Baldanti F, Rovida F, Bertaina A, Marchi A, et al. (2007): Human respiratory syncytial virus (hRSV) RNA quantification in nasopharyngeal secretions identifies the hRSV etiologic role in acute respiratory tract infections of hospitalized infants. *J Clin Virol*; 39:119–24..

Ciotti M, Marcuccilli F, Guenci T, Prignano MG, Perno CF. (2008): Evaluation of the Abbott RealTime HBV DNA assay and comparison to the Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan 48 assay in monitoring patients with chronic cases of hepatitis B. *J Clin Microbiol*; 46: 1517–9.

Csoma E., B. Meszaros, L. Asztalos, J. Konya, L. Gergely, (2011): Prevalence of WU and KI polyomaviruses in plasma, urine, and respiratory samples from renal transplant patients, *J. Med. Virol.* 83 1275–1278.

Deng Xuefeng, Ziyang Yan, Yong Luo, Jian Xu, Fang Cheng, Yi Li, John F. Engelhardt, Jianming Qiu, (2013): In Vitro Modeling of Human Bocavirus 1 Infection of Polarized Primary Human Airway Epithelia, Volume 87 Number 7 *Journal of Virology* p. 4097–4102

Dijkman R, Koekkoek SM, Molenkamp R, Schildgen O, van der Hoek L. (2009): Human bocavirus can be cultured in differentiated human airway epithelial cells. *J Virol*, 83:7739-48.

Don, M.; Soderlund-Venermo, M.; Valent, F.; Lahtinen, A.; Hedman, L.; Canciani, M.; Hedman, K.; Korppi, M. (2010): Serologically verified human bocavirus pneumonia in children. *Pediatr. Pulmonol*, 45, 120–126.

Don, M.; Soderlund-Venermo, M.; Hedman, K.; Ruuskanen, O.; Allander, T.; Korppi, M. (2011): Don't forget serum in the diagnosis of human bocavirus infection. *J. Infect. Dis.*, 203, 1031–1032; author reply 1032–1033.

Drosten C, Günther S, Preiser W, et al. (2003): Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*; 348:1967–1976.

Endo, R., N. Ishiguro, H. Kikuta, S. Teramoto, R. Shirkoohi, X. Ma, T. Ebihara, H. Ishiko, and T. Ariga. (2007): Seroepidemiology of human bocavirus in Hokkaido prefecture, Japan. *J. Clin. Microbiol.* 45:3218–3223.

Esposito S, Bosis S, Niesters HG, Tremolati E, Sabatini C, Porta A, Fossali E, Osterhaus AD, Principi N. Falcone, V.; Ridder, G.J.; Panning, M.; Bierbaum, S.; Neumann-Haefelin, D.; Huzly, D. (2011): Human bocavirus DNA in paranasal sinus mucosa. *Emerg. Infect. Dis.*, 17, 1564–1565.

Farkas SL, Zadori Z, Benko M, Essbauer S, Harrach B, Tijssen P. (2004): A parvovirus isolated from royal python (*Python regius*) is a member of the genus Dependovirus. *J Gen Virol*, 85:555-61.

Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. (2008): Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science*; 319:1096–100.

Ferenczy M. W., L. J. Marshall, C. D. Nelson et al. (2012): Molecular biology, epidemiology, and pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain, *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 25, no. 3, pp. 471–506

Fisher RE, Mayor HD. (1991): The evolution of defective and autonomous parvoviruses, *J Theor Biol.* 21;149(4):429-39.

Foulongne V, Rodiere M, Segondy M. (2006): Human Bocavirus in children. *Emerg Infect Dis*, 12(5):862-863.

Foulongne V, Brieu N, Jeziorski E, Chatain A, Rodiere M, Segondy M. (2008): KI and WU polyomaviruses in children, France. *Emerg Infect Dis* 14:523–525.

Fredricks DN, Relman DA. (1996): Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. *Clin Microbiol Rev*; 9:18–33.

Fry AM, Lu X, Chittaganpitch M, Peret T, Fischer J, Dowell SF, Anderson LJ, Erdman D, Olsen SJ. (2007): Human bocavirus: a novel parvovirus epidemiologically associated with pneumonia requiring hospitalization in Thailand. *J Infect Dis*; 195:1038–45

Gardner SD, AM Field, DV Coleman, B Hulme (1971): New human papovavirus (BK) isolated from urine after transplantation, *Lancet*, 1 pp. 1253–1257



- Gaynor AM, Nissenm D, Whiley DM, Mackay IM, Lambert SB, Wu G, et al. (2007): Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog*; 3:595–604.
- Geoffroy MC, Salvetti A. (2005): Helper functions required for wild type and recombinant adeno-associated virus growth. *Curr Gene Ther*, 5:265-71.
- Ghietto LM, Camara A, Zhou Y, Pedranti M, Ferreyra S, Frey T, Camara J, Adamo MP. (2012): High prevalence of human bocavirus 1 in infants with lower acute respiratory tract disease in Argentina, 2007–2009. *Braz J Infect Dis*, 16:38–44.
- Guo, L.; Wang, Y.; Zhou, H.; Wu, C.; Song, J.; Li, J.; Paranhos-Baccala, G.; Vernet, G.; Wang, J.; Hung, T. (2012): Differential seroprevalence of human bocavirus species 1-4 in Beijing, China. *PLoS One*, 7:e39644
- Gurda BL, Parent KN, Bladdek H, et al. (2010): Human bocavirus capsid structure: insights into the structural repertoire of the parvoviridae. *J Virol*, 84:5880–5889
- Han TH, Chung JY, Koo JW, Kim SW, Hwang ES. (2007): WU polyomavirus in children with acute lower respiratory tract infections, South Korea. *Emerg Infect Dis* 13:1766–1768.
- Han TH, Kim CH, Park SH, Kim EJ, Chung JY, Hwang ES. (2009): Detection of human bocavirus-2 in children with acute gastroenteritis in South Korea. *Archives of Virology*, 154: 1923–1927.
- Hardy JD. (1999 Feb-Mar): The first lung transplant in man (1963) and the first heart transplant in man (1964). *Transplant Proc.*,31(1-2):25-9.
- Hedman, L.; Soderlund-Venermo, M.; Jartti, T.; Ruuskanen, O.; Hedman, K. (2010): Dating of human bocavirus infection with protein-denaturing IgG-avidity assays—secondary immune activations are ubiquitous in immunocompetent adults. *J. Clin. Virol*, 48, 44–48.
- Hicks LA, Shepard CW, Britz PH, et al. (2006): Two outbreaks of severe respiratory disease in nursing homes associated with rhinovirus. *J Am Geriatr Soc*, 54:284–289
- Hirsch HH, Kardas P, Kranz D, Leboeuf C. (2013a): The human JC polyomavirus (JCPyV): virological background and clinical implications. *APMIS*. Aug;121(8):685-727.
- Hirsch HH, Martino R, Ward KN, Boeckh M, Einsele H, Ljungman P. (2013b): Fourth European conference on infections in leukaemia (ECIL-4): guidelines for diagnosis and treatment of human respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, metapneumovirus, rhinovirus, and coronavirus. *Clin Infect Dis*, 56:258–66.
- Hustedt, J.W.; Christie, C.; Hustedt, M.M.; Esposito, D.; Vazquez, M. (2012): Seroepidemiology of human bocavirus infection in Jamaica. *PLoS One*, 7: e38206.

- Chatzidimitriou D, Gavriilaki E, Sakellari I, Diza E. (2010): Hematopoietic cell transplantation and emerging viral infections. *J Med Virol.* 2010 Mar;82(3):528-38.
- Chieochansin T, Kapoor A, Delwart E, et al. (2009): Absence of detectable replication of human bocavirus species 2 in respiratory tract. *Emerging Infect Dis.*, 15:1503–1505
- Choi EH, Lee HJ, Kim SJ, Eun BW, Kim NH, Lee JA, Lee JH, Song EK, Kim SH, Park JY, Sung JY. (2006): The association of newly identified respiratory viruses with lower respiratory tract infections in Korean children, 2000–2005. *Clin Infect Dis*, 43:585–592.
- Chow BD, Ou Z, Esper FP. (2010): Newly recognized bocaviruses (HBoV, HBoV2) in children and adults with gastrointestinal illness in the United States. *Journal of Clinical Virology*, 47: 143–147.
- Christensen A, Nordbø SA, Krokstad S, et al. (2010): Human bocavirus in children: mono-detection, high viral load and viraemia are associated with respiratory tract infection. *J Clin Virol*, 49:158–162.
- Garbino J, Soccac PM, Aubert JD, Rochat T, Meylan P, Thomas Y, Tapparel C, Bridevaux PO, Kaiser L. (2015): Respiratory viruses in bronchoalveolar lavage: a hospital-based cohort study in adults. *Thorax*. May;64(5):399-404.
- Jartti, T.; Soderlund-Venermo, M.; Allander, T.; Vuorinen, T.; Hedman, K.; Ruuskanen, O. (2011): No efficacy of prednisolone in acute wheezing associated with human bocavirus infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 30: 521–523.
- Jartti Tuomas, Klaus Hedman, Laura Jartti, Olli Ruuskanen, Tobias Allander, Maria Söderlund-Venermo (2012): Human bocavirus—the first 5 years, *Rev. Med. Virol*, 22: 46–64, review
- Jin Y, Zhang RF, Xie ZP, Yan KL, Gao HC, Song JR, Yuan XH, Cheng WX, Hou YD, Duan ZJ. (2011): Newly identified respiratory viruses associated with acute lower respiratory tract infections in children in Lanzou, China, from 2006 to 2009. *Clin Microbiol Infect*, 18:74–80
- Johne R, Buck CB, Allander T, Atwood WJ, Garcea RL, Imperiale MJ, et al. (2011): Taxonomical developments in the family Polyomaviridae. *Arch Virol*, 156:1627–34.
- Kantola, K.; Hedman, L.; Allander, T.; Jartti, T.; Lehtinen, P.; Ruuskanen, O.; Hedman, K.; Soderlund-Venermo, M. (2008): Serodiagnosis of human bocavirus infection. *Clin. Infect. Dis.*, 46, 540–546.
- Kantola K, Sadeghi M, Lahtinen A, Koskenvuo M, Aaltonen L-M, M€ott€onen M, et al. (2009): Merkel cell polyomavirus DNA in tumor-free tonsillar tissues and upper respiratory tract samples: implications for respiratory transmission and latency. *J Clin Virol*, 45:292–5.

Kantola K., Sadeghi M., Antikainen J., Kirveskari J., Delwart E., Hedman K., Soderlund-Venermo M. (2010): Real-Time Quantitative PCR Detection of Four Human Bocaviruses; *Journal of Clinical Microbiology*, p. 4044–4050

Kantola K., Hedman L., Arthur J., Alibeto A., Delwart E., Jartti T., Ruuskanen O., Hedman K., Soderlund-Venermo M. (2011): Seroepidemiology of human bocaviruses 1-4. *J. Infect. Dis*, 204: 1403–1412.

Kapoor A, Slikas E, Simmonds P, et al. (2009): A newly identified bocavirus species in human stool. *Journal of Infectious Diseases*, 199: 196–200.

Kapoor A.; Hornig M.; Asokan A.; Williams B.; Henriquez J. A.; Lipkin W. I. (2011): Bocavirus episome in infected human tissue contains non-identical termini. *PLoS One*, 6: e21362

Kapoor A.; Simmonds P.; Slikas E.; Li L.; Bodhidatta L.; Sethabutr O.; Triki H.; Bahri O.; Oderinde B. S.; Baba M. M.; et al. (2010): Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections. *J. Infect. Dis*, 201: 1633–1643

Kean J. M., S. Rao, M. Wang and R. L. Garcea (2009): Seroepidemiology of human polyomaviruses, *PLoS Pathogens*, vol. 5, no. 3, Article ID e1000363

Kesebir, D., M. Vazquez, C. Weibel, E. D. Shapiro, D. Ferguson, M. L. Landry, and J. S. Kahn. (2006): Human bocavirus infection in young children in the United States: molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus. *J. Infect. Dis*. 194:1276–1282.

Khalili K., M. K. White, H. Sawa, K. Nagashima, and M. Safak (2005): The agnoprotein of polyomaviruses: a multifunctional auxiliary protein, *Journal of Cellular Physiology*, vol. 204, no. 1, pp. 1–7

Khamrin P., Malasao R., Chaimongkol N., Ukarapol N., Kongsricharoern T., Okitsu S., Hayakawa S., Ushijima H., Maneekarn N. (2012): Circulating of human bocavirus 1, 2, 3, and 4 in pediatric patients with acute gastroenteritis in Thailand. *Infect Genet Evol*. Apr;12(3):565-9.

Kleines M., Scheithauer S., Hengst M., Honnef D., Ritter K., Mühler E., et al. (2008): Low to medium WU-virus titers in young children with lower respiratory tract infections. *Intervirology*; 51:444–6.

Korppi M.; Jartti T.; Hedman K.; Soderlund-Venermo M. (2010): Serologic diagnosis of human bocavirus infection in children. *Pediatr. Infect. Dis. J*, 29: 387

Koseki N, Teramoto S, Kaiho M, Gomi-Endo R, Yoshioka M, Takahashi Y, Nakayama T, Sawada H, Konno M, Ushijima H, Kikuta H, Ariga T, Ishiguro N. (2012): Detection of human bocaviruses 1 to 4 from nasopharyngeal swab samples collected from patients with respiratory tract infections. *J Clin Microbiol*. Jun;50(6):2118-21

- Kuypers J., A.P. Campbell, K.A. Guthrie, N.L. Wright, J.A. Englund, L. Corey, et al., (2012): WU and KI polyomaviruses in respiratory samples from allogeneic hematopoietic cell transplant recipients, *Emerg. Infect. Dis.* 18: 1580–1588.
- Lau CL, Patterson GA, Palmer SM. (2004): Critical care aspects of lung transplantation. *J Intensive Care Med.*, 19(2):83-104.
- Le B.M., Demertzis L.M., Wu G., Tibbets R.J., Buller R., Arens M.Q., Gaynor A.M., Storch G.A., Wang D. (2007): Clinical and epidemiologic characterization of WU polyomavirus infection, St. Louis, Missouri. *Emerg Infect Dis*, 13:1936–1938.
- Lee W.M., Kiesner C., Pappas T., et al. (2007a): A diverse group of previously unrecognized human rhinoviruses are common causes of respiratory illnesses in infants. *PLoS ONE*; 2:e966.
- Lee, J. I., J. Y. Chung, T. H. Han, M. O. Song, and E. S. Hwang. (2007b): Detection of human bocavirus in children hospitalized because of acute gastroenteritis. *J. Infect. Dis.* 196:994–997.
- Lehtoranta L., Söderlund-Venermo M., Nokso- Koivisto J., et al. (2012): Human bocavirus in the nasopharynx of otitis-prone children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 76:206–211.
- Li L. Pesavento PA., Leutenegger CM., Estrada M., Coffey L.L. et al. (2013): A novel bocavirus in canine liver. *Virol J* 10: 54. doi: 10.1186/1743-422X-10-54.
- Lin F., Zheng M., Li H., Zheng C, Li X., Rao G., et al. (2008): WU polyomavirus in children with acute lower respiratory tract infections, China. *J Clin Virol*, 42:94–102.
- Lindau C., Tiveljung-Lindell A, Goh S, Ramqvist T, Allander T. (2009): A single-tube, realtime PCR assay for detection of the two newly characterized human KI and WU polyomaviruses. *J Clin Virol*, 44:24–6.
- Lischke R., Schützner J., Pafko P. (2003): Chirurgická léčba primární plicní hypertenze – transplantace plic, *Čas. Lék. čes.* 387-389
- Liu W.K., Chen D.H., Liu Q., Liang H.X., Yang Z.F., Qin S., Zhou R. (2011): Detection of human bocavirus from children and adults with acute respiratory tract illness in Guangzhou, southern China. *BMC Infect Dis*, 11:345.
- Longtin J., Bastien M., Gilca R., Leblanc E., de Serres G., Bergeron M.G., Boivin G. (2008): Human bocavirus infections in hospitalized children and adults. *Emerg Infect Dis*, 14:217–221.
- Louie JK, Yagi S, Nelson FA, et al. (2005): Rhinovirus outbreak in a long term care facility for elderly persons associated with unusually high mortality. *Clin Infect Dis*, 41:262–265.

- Lusebrink, J.; Schildgen, V.; Tillmann, R.L.; Wittleben, F.; Bohmer, A.; Muller, A.; Schildgen, O. (2011): Detection of head-to-tail DNA sequences of human bocavirus in clinical samples. *PLoS One*, 6: e19457.
- Ma, X., R. Endo, N. Ishiguro, T. Ebihara, H. Ishiko, T. Ariga, and H. Kikuta. (2006): Detection of human bocavirus in Japanese children with lower respiratory tract infections. *J. Clin. Microbiol.* 44:1132–1134.
- Maggi F., Andreoli E., Pifferi M., Meschi S., Rocchi J., Bendinelli M. (2007): Human bocavirus in Italian patients with respiratory diseases. *J Clin Virol*, 38:321–5.
- Manning A., V. Russell K. Eastick G. H. Leadbetter N., Hallam K., Templeton and P. Simmonds (2006): Epidemiological profile and clinical associations of human bocavirus and other human parvoviruses. *J. Infect. Dis.* 194:1283–1290.
- Martin E.T., Fairchok M.P., Kuypers J., Magaret A., Zerr D.M., Wald A., Englund J.A. (2010): Frequent and prolonged shedding of bocavirus in young children attending daycare. *J Infect Dis*, 201:1625–1632.
- Martin E.T.; Taylo, J.; Kuypers J.; Magaret A.; Wald A.; Zerr D.; Englund J.A. (2009): Detection of bocavirus in saliva of children with and without respiratory illness. *J. Clin. Microbiol*, 47, 4131–4132.
- Matar L.D., McAdams H.P., Palmer S.M., Howell D.N., Henshaw N.G., Davis R.D. et al. (1999): Respiratory viral infections in lung transplant recipients: Radiologic findings with clinical correlation. *Radiology*, 213:735-42.
- Miller M.A., Weibel C., Ferguson D., Landry M.L., Kahn J.S. (2009): WU polyomavirus in patients infected with HIV or Hepatitis C Virus, Connecticut, USA, 2007. *Emerg Infect Dis*, 15:1095–7.
- Miyakis S, van Hal SJ, Barratt J, Stark D, Marriott D, Harkness J. (2009): Absence of human Bocavirus in bronchoalveolar lavage fluid of lung transplant patients. *J Clin Virol.* Feb;44(2):179-80.
- Monteny, M., H. G. Niesters, H. A. Moll, and M. Y. Berger. (2007): Human bocavirus in febrile children, The Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 13:180– 182.
- Motamedi N., H. Mairhofer, H. Nitschko, G. Jager, U.H. Koszinowski (2012): The polyomaviruses WUPyV and KIPyV: a retrospective quantitative analysis in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation, *Virol. J.* 9, 209.
- Mourez T., Bergeron A., Ribaud P., Scieux C., Peffault de Latour R., Tazi A., et al. (2009): Polyomaviruses KI and WU in immunocompromised patients with respiratory disease. *Emerg Infect Dis*, 15:107–9.
- Müller A1, Klinkenberg D, Vehreschild J, Cornely O, Tillmann RL, Franzen C, Simon A, Schildgen O. (2009): Low prevalence of human metapneumovirus and human

- bocavirus in adult immunocompromised high risk patients suspected to suffer from Pneumocystis pneumonia. *J Infect.* Mar;58(3):227-31
- Naghipour M., L. E. Cuevas, T. Bakhshinejad, W. Dove, and C. A. Hart (2007): Human bocavirus in Iranian children with acute respiratory infections. *J. Med. Virol.* 79:539–543
- Neske F., Blessing K., Tollmann F., Schubert J., Rethwilm A., Kreth H.W., Weissbrich B. (2007): Real-time PCR for diagnosis of human bocavirus infections and phylogenetic analysis. *J Clin Microbiol*, 45:2116–22.
- Neske F., Blessing K., Ullrich F., Prottel A., Wolfgang Kreth H., Weissbrich B. (2008): WU polyomavirus infection in children, Germany. *Emerg Infect Dis* 14:680–681.
- Neske F., Prifert C., Scheiner B., Ewald M., Schubert J., Opitz A., et al. (2010): High prevalence of antibodies against polyomavirus WU, polyomavirus KI, and human bocavirus in German blood donors. *BMC Infect Dis*, 10:215.
- Nguyen N., Le B. M., Wang D. (2009): Serological evidence of frequent human infection by the WU and KI polyomaviruses. *Emerg Infect Dis*, 15:1199–205.
- Nishizawa T., Okamoto H., Konishi K., et al. (1997): A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun*, 241:92–97.
- Norja P., Ubbilos I., Templeton K., Simmonds P. (2007): No evidence for an association between infections with WU and KI polyomaviruses and respiratory disease. *J Clin Virol*, 40:307–11.
- Omura T., Iizuka S., Tabara K., et al. (2011): Detection of human metapneumovirus genomes during an outbreak of bronchitis and pneumonia in a geriatric care home in Shimane, Japan, in autumn 2009. *Jpn J Infect Dis*, 64:85–87.
- Orens J.P. (2006): International Guidelines for the Selection of Lung Transplant Candidates: 2006 Update-A Consensus Report From the Pulmonary Scientific Council of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant*, 25(7):745-55.
- Paba P., Fabeni L., Ciccozzi M., Perno C.F., Ciotti M. (2011): Performance evaluation of the COBAS/Taq- Man HIV-1 v2.0 in HIV-1 positive patients with low viral load: a comparative study. *J Virol Methods*, 173:399–402
- Paba P., Fabeni L., Perno C.F., Ciotti M. (2012): Performance evaluation of the Artus hepatitis C virus QS-RGQ assay. *J Virol Methods*, 179: 77–80.
- Padgett B.L., Walker D.L., Zu Rhein G.M., Eckropade R.J., Dessel B.H. (1971): Cultivation of papava-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy, *Lancet*, 1;1257-60.

- Palmer S.M., Henshaw N.G., Howell D.N., Miller S.E., Davis R.D., Tapson V.F. (1998): Community respiratory viral infection in adult lung transplant recipients, *Chest*, 113:944-50.
- Payungporn S., Chieochansin T., Thongmee C., Samransamruajkit R., Theamboonlers A., Poovorawan Y. (2008): Prevalence and molecular characterization of WU/KI polyomaviruses isolated from pediatric patients with respiratory disease in Thailand. *Virus Re*, 135:230–6.
- Qu, X. W., Z. J. Duan, Z. Y. Qi, Z. P. Xie, H. C. Gao, W. P. Liu, C. P. Huang, F. W. Peng, L. S. Zheng, and Y. D. Hou. (2007): Human bocavirus infection, People's Republic of China. *Emerg. Infect. Dis.* 13:165–168.
- Rabella N., et al. (1999): Conventional Respiratory Viruses Recovered from Immunocompromised Patients: Clinical Considerations; *Clinical Infectious Diseases*, 28:1043–8
- Rao S., R.L. Garcea, C.C. Robinson, E.A. Simoes (2011): WU and KI polyomavirus infections in pediatric hematology/oncology patients with acute respiratory tract illness, *J. Clin. Virol.* 52: 28–32.
- Regamey, N., U. Frey, C. Deffernez, P. Latzin, and L. Kaiser (2007): Isolation of human bocavirus from Swiss infants with respiratory infections. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 26:177–179.
- Ren L., Gonzalez R., Xie Z., Zhang J., Liu C., Li J., et al. (2008): WU and KI polyomavirus present in the respiratory tract of children, but not in immunocompetent adults. *J Clin Virol*, 43:330–3.
- Ren L., Gonzalez R., Xu X., Li J., Zhang J., Vernet G., et al. (2009): WU polyomavirus in fecal specimens of children with acute gastroenteritis, China. *Emerg Infect Dis*, 15:134–5.
- Rinaldo CH, Tylden GD, Sharma BN (2013): The human polyomavirus BK (BKPyV): virological background and clinical implications. *APMIS*. 2013 Aug;121(8):728-45
- Sadeghi M., Riipinen A., Väisänen E., Chen T., Kantola K., Surcel H.M., et al. (2010): Newly discovered KI, WU, and Merkel cell polyomaviruses: no evidence of mother-to-fetus transmission. *Virol J*, 7:251.
- Sadeghi M., Kalle K., Damian P., Finnegan J., McCaughey C., Hedman L., Söderlund-Venermo M., Hedman K.. (2013): Possible Involvement of Human Bocavirus 1 in the Death of a Middle-Aged Immunosuppressed Patient, *Journal of Clinical Microbiology* p. 3461–3463
- Santos N., Peret T.C., Humphrey C.D., et al. (2010): Human bocavirus species 2 and 3 in Brazil. *Journal of Clinical Virology*; 48: 127–130.

- Scuda N., Hofmann J., Calvignac-Spencer S., Ruprecht K., Liman P., Kuhn J., et al. (2011): A novel human polyomavirus closely related to the African green monkey-derived lymphotropic polyomavirus. *J Virol*, 85:4586–90.
- Shan T.L., Zhang W., Guo W., et al. (2009): The first detection of human bocavirus 2 infections in China. *Journal of Clinical Virology*, 46: 196–197.
- Sharp C.P., P. Norja, I. Anthony, J.E. Bell, P. Simmonds (2009): Reactivation and mutation of newly discovered WU, KI, and Merkel cell carcinoma polyomaviruses in immunosuppressed individuals, *J. Infect. Dis.* 199, 398–404.
- Schildgen O.; Muller A.; Allander T.; Mackay I.M.; Volz S.; Kupfer B.; Simon A. (2008): Human bocavirus: Passenger or pathogen in acute respiratory tract infections? *Clin. Microbiol. Rev.*, 21: 291–304.
- Schildgen O.; Qiu J.; Soderlund-Venermo M. (2012): Genomic features of the human bocaviruses. *Future Virol*, 7, 31–39.
- Schowalter R.M., Pastrana D.V., Pumphrey K.A., Moyer A.L., Buck C.B. (2010): Merkel Cell Polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. *Cell Host Microbe*, 7:509–15.
- Schwartz D., Green B., Carmichael L. E., and Parrish C. R. (2002): The canine minute virus (minute virus of canines) is a distinct parvovirus that is most similar to bovine parvovirus. *Virology* 302:219–223
- Siebrasse E. A., Reyes A., Lim E.S., Zhao G., Mkakosya R.S., Manary M.J., et al. (2012): Identification of MW polyomavirus, a novel polyomavirus in human stool. *J Virol*, 86:10321–6.
- Siebrasse E. A., Nguyen N. L., Smith C., Simmonds P., Wang D. (2014): Immunohistochemical detection of KI polyomavirus in lung and spleen, *Virology* 468-470, 178–184
- Sloots T.P., McErlean P., Speicher D.J., Arden K.E., Nissen M.D., Mackay I.M. (2006): Evidence of human coronavirus HKU1 and human bocavirus in Australian children. *J Clin Virol*, 35(1):99-102.
- Smuts H., Hardie D. (2006): Human bocavirus in hospitalized children, South Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 12:1457–1458.
- Snell G. I., Westal IG.P. (2007): Immunosuppression for lung transplantation: evidence to date. *Drugs.*, 67(11):1531-9
- Söderlund-Venermo M., Lahtinen A., Jartti T., et al. (2009): Clinical assessment and improved diagnosis of bocavirus-induced wheezing in children, Finland. *Emerging Infect Dis.*, 15:1423–1430.



Song J.R., Jin Y., Xie Z.P., et al. (2010): Novel human bocavirus in children with acute respiratory tract infection. *Emerging Infectious Diseases*, 16: 324–327.

Streiter M.; Malecki M.; Prokop A.; Schildgen V.; Lusebrink J.; Guggemos A.; Wisskirchen M.; Weiss M.; Cremer R.; Brockmann M.; et al. (2011): Does human bocavirus infection depend on helper viruses? A challenging case report. *Virology*, 8: 417.

Teramoto S., Kaiho M., Takano Y., Endo R., Kikuta H., Sawa H., et al. (2011): Detection of KI polyomavirus and WU polyomavirus DNA by real-time polymerase chain reaction in nasopharyngeal swabs and in normal lung and lung adenocarcinoma tissues. *Microbiol Immunol*, 55:525–30.

Thomson B. J., Weindler F.W., Gray D., Schwaab V., Heilbronn R. (1994): Human herpesvirus 6 (HHV-6) is a helper virus for adeno-associated virus type 2 (AAV-2) and the AAV-2 rep gene homologue in HHV-6 can mediate AAV- 2 DNA replication and regulate gene expression. *Virology*, 204:304-11.

Tijssen P. (1999): Molecular and structural basis of the evolution of parvovirus tropism. *Acta Vet. Hung*, 47, 379–394.

Trulock E.P., Edwards L.B., Taylor D.O., Boucek M.M., Mohacsi P.J., Keck B.M., Hertz M.I. (2003):The registry of the international society for heart and lung transplantation: twentieth official adult lung and heart-lung transplant report-2003. *J Heart Lung Transplant*, 22(6):625-35.

Uršič T., Uroš K., Kalan G., Petrovec M. (2015): Fatal human bocavirus infection in an 18-month-old child with chronic lung disease of prematurity, *The Pediatric Infectious Disease Journal*, Volume 34, Number 1

van der Hoek L., Pyrc K., Jebbink M.F., et al. (2004): Identification of a new human coronavirus. *Nat Med*, 10:368–373..

van den Hoogen, B.G.; de Jong, J.C.; Groen, J.; Kuiken, T.; de Groot, R.; Fouchier, R.A.; Osterhaus, A.D. (2001): A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat. Med.*, 7:719–724.

van der Meijden E., Janssens R.W.A., Lauber C., Bavinck J.N.B., Gorbalenya A.E., Feltkamp M.C.W. (2010): Discovery of a new human polyomavirus associated with Trichodysplasia Spinulosa in an immunocompromized patient. *PLoS Pathog*, 6:e1001024.

Venter M., Visser A., Lassauniere R. (2009): Human polyomaviruses, WU and KI in HIV exposed children with acute lower respiratory tract infections in hospitals in South Africa, *J. Clin. Virol.* 44: 230–234.

Vicente D., Cilla G, Montes M., Perez-Yarza E. G., Perez-Trallero E. (2007): Human bocavirus, a respiratory and enteric virus. *Emerg. Infect. Dis.* 13:636–637

- Viscidi R.P., Clayman B. (2006): Serological cross reactivity between polyomavirus capsids. *Adv Exp Med Biol*, 577:73–84.
- Volz S., Schildgen O., Klinkenberg D., Ditt V., Muller A., Tillmann R.L., Kupfer B., Bode U., Lentze M.J., Simon A. (2007): Prospective study of human bocavirus (hbov) infection in a pediatric university hospital in Germany 2005/2006. *J. Clin. Virol*, 40, 229–235.
- von Linstow M.L., Hogh M., Hogh B. (2008): Clinical and epidemiologic characteristics of human bocavirus in Danish infants: results from a prospective birth cohort study. *Pediatr Infect Dis J*, 27:897–902.
- Wang Y., Gonzalez R., Zhou H., et al. (2011): Detection of human bocavirus 3 in China. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*; 30: 799–805.
- Weigl J. A., Puppe W., Schmitt H. J. (2003): Can respiratory syncytial virus etiology be diagnosed clinically? A hospital-based case-control study in children under two years of age. *Eur. J. Epidemiol.* 18:431–439.
- Whimbey E., Champlin R. E., Couch R.B., Englund J.A., Goodrich J.M., Raad I. et al. (1996): Community respiratory virus infections among hospitalized adult bone marrow transplant recipients. *Clinical Infectious Diseases*, 22:778-82.
- Whimbey E., Englund J.A., Couch R.B. (1997): Community respiratory virus infection in immunocompromised patients with cancer. *The American Journal of Medicine*, 102:10-8.
- Wilkesmann A., O. Schildgen, A. M. Eis-Hubinger, T. Geikowski, T. Glatzel, M. J. Lentze, U. Bode, and A. Simon (2006): Human metapneumovirus infections cause similar symptoms and clinical severity as respiratory syncytial virus infections. *Eur. J. Pediatr.* 165:467–475.
- Williams J. V. (2005): The clinical presentation and outcomes of children infected with newly identified respiratory tract viruses. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 19:569–584
- Yang W. Z., Huang C.P., Duan Z.J. (2012): Identification and characterization of porcine bocavirus episomes. *Bing Xue Bao* 28: 418-423.
- Yu G., Greninger A.L., Isa P., Phan T.G., Martinez M.A., de la Luz Sanchez M., et al. (2012): Discovery of a novel polyomavirus in acute diarrheal samples from children. *PLoS ONE*, 7:e49449.
- Yuan X.H., Jin Y., Xie Z.P., Gao H.C., Xu Z.Q., Zheng L.S., Zhang R.F., Song J.R., Hou Y.D., Duan Z.J. (2008): Prevalence of human KI and WU polyomaviruses in children with acute respiratory tract infection in China. *J Clin Microbiol* 46:3522–3525.

Zhang, L. L., L. Y. Tang, Z. D. Xie, X. J. Tan, C. S. Li, A. L. Cui, Y. X. Ji, S. T. Xu, N. Y. Mao, W. B. Xu, and K. L. Shen (2008): Human bocavirus in children suffering from acute lower respiratory tract infection in Beijing Children's Hospital. *Chin. Med. J.* 121:1607–1610.

Zhao H., Zhao L., Sun Y., Qian Y., Liu .L et al. (2012): Detection of a bocavirus circular genome in fecal specimens from children with acute diarrhea in Beijing, China. *PLOS ONE* 7: e48980. doi:10.1371/ journal.pone.0048980.

ZuRhein G., Chou S.M. (1965): Particles resembling papova viruses in human cerebral demyelinating disease. *Science*, 148:1477-9

## 9 Přílohy

### DETEKCE POLYOMAVIRU WU A KI A LIDSKÉHO BOCAVIRU U PACIENTŮ PO TRANSPLANTACI HEMATOPOETICKÝCH KMENOVÝCH BUNĚK A TRANSPLANTACI PLIC

P-03

Blagojević K.<sup>(1)</sup>, Krausová B.<sup>(2)</sup>, Zajac M.<sup>(2)</sup>, Briksí A.<sup>(2)</sup>, Keslová P.<sup>(3)</sup>, Kouba M.<sup>(4)</sup>,  
Šimonek J.<sup>(5)</sup>, Sedláček P.<sup>(3)</sup>, Cetkovský P.<sup>(4)</sup>, Lischke R.<sup>(5)</sup>, Hubáček P.<sup>(2,3)</sup>

1 - studentka katedry genetiky a mikrobiologie, Přírodovědecká fakulta UK, Praha;

2 - Ústav lékařské mikrobiologie 2, LF UK a FN Motol, Praha; 3 - Klinika dětské

hematologie a onkologie 2, LF UK a FN Motol, Praha; 4 - Ústav hematologie a krevní

transfúze, Praha; 5 - chirurgická klinika I, LF UK a FN Motol, Praha

**Úvod:** Polyomaviry KI (KIPyV) a WU (WUPyV) byly objeveny v roce 2007 ve vzorcích z dýchacích cest od pacientů s respiračním onemocněním. Od této doby jsou KIPyV a WUPyV detekovány zejména u dětí s respiračním onemocněním a u imunosuprimovaných pacientů. Předpokládá se, že vyvolávají onemocnění dýchacího traktu s maximálním výskytem do 5% nemocných. Nicméně, KIPyV a WUPyV jsou detekovány i u osob bez respiračních symptomů. Lidský bocavirus (HBoV) je znám od roku 2005. Patří do čeledi Parvoviridae a vyskytuje se až u 20% pacientů s respiračním a GIT onemocněním. HBoV byl objeven i u asymptomatických pacientů a u pacientů s infekcí dalšími viry.

**Metody:** K retrospektivní detekci virů bylo použito 649 vzorků z dýchacích cest a tkání dýchacího traktu získaných mezi roky 2004-2013 od 35 dětí a 263 dospělých po transplantaci plic a hematopoetických kmenových buněk. Extrakce DNA byla provedena pomocí Ultra Clean Spin DNA isolation kitů firmy MoBio a vzorky byly následně uchovány v -20°C. Detekce byla provedena RQ-PCR pomocí plasmidové kalibrační křivky s cílovou sekvencí na přístrojích Applied Biosystem 7500 a Biorad CFX96.

**Výsledky:** Virus WUPyV byl detekován u 2 vzorků (0,3%) od 2 pacientů (1 dětský a 1 dospělý) s detekovanou kvantitou  $8,9 \times 10^9$ /ml a  $2,1 \times 10^7$ /ml. KIPyV byl pak detekován v 58 vzorcích (8,9%) od 42 pacientů (7 dětských a 35 dospělých) s mediánem detekované kvantity  $1,9 \times 10^5$ /ml vzorku (rozmezí  $1,5 \times 10^3$ /ml -  $4,25 \times 10^9$ /ml), HBoV pak v 28 vzorcích (4,3%) od 25 pacientů (3 dětských a 22 dospělých) s mediánem detekované kvantity  $3,2 \times 10^4$ /ml vzorku (rozmezí  $5,0 \times 10^2$ /ml -  $1,58 \times 10^9$ /ml). U 4 pacientů jsme pak detekovali příslušné viry také v časově blízkých vzorcích periferní krve. 9 pacientů v období jednoho měsíce po získání vzorku zemřelo. U dvou vzorků jsme detekovali zároveň přítomnost KIPyV a HBoV.

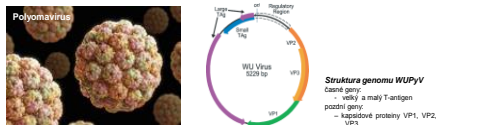
**Závěr:** Studie potvrdila výskyt polyomavirů WUPyV, KIPyV a HBoV i v české populaci a to u dětských i dospělých imunosuprimovaných pacientů. K bližšímu osvětlení jejich patofyziologického účinku však bude třeba, s ohledem na komplikovanost studovaných pacientů, získat k testování větší skupinu pacientů a nejlépe v prospektivní studii získat data o co největším počtu virových agens v dýchacích cestách těchto pacientů.

Práce je podpořena projektem institucionální podpory rozvoje výzkumné organizace 00064203 MZ ČR.

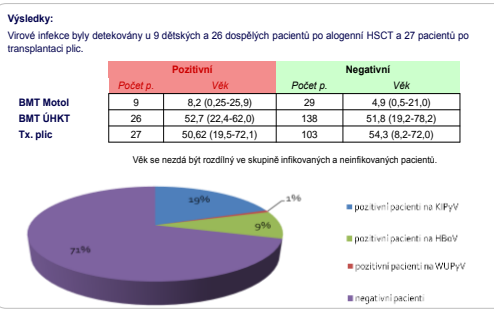
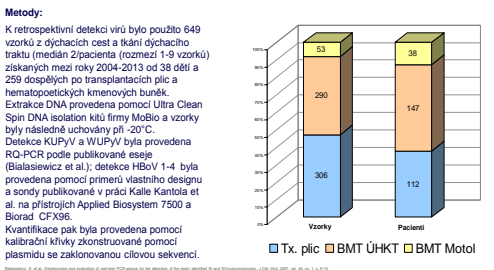
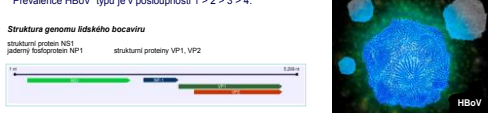
### Příloha 1:

Abstrakt prezentovaný na Hradeckých virologických dnech 2013: XVIII. Celostátní konference virologů 15. – 16. 10. 2013

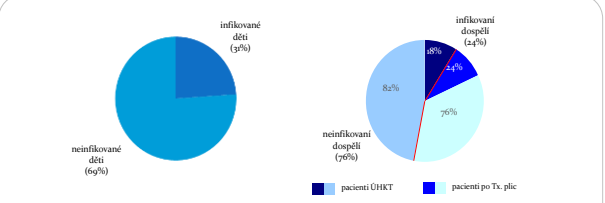
**Úvod:**  
**Polyomaviry KI (KIPyV) a WU (WUPyV)** byly objeveny v roce 2007 ve vzorcích z dýchacích cest od pacientů s respiračním onemocněním. KIPyV a WUPyV jsou pojmenovány podle institucí, kde byly objeveny (Karolinska Institute; Washington University).  
 Jde o neobalené cirkulární ds DNA viry z čeledi Polyomviridae, s velikostí genomu přibližně 5 kb. KIPyV a WUPyV jsou detekovány zejména u dětí s respiračním onemocněním a u imunosuprimovaných pacientů. Přenos se odehrává inhalací nebo kontaminovanými předměty.  
 Je pravděpodobně celoživotní persistence. Předpokládá se, že vyvolávají onemocnění dýchacího traktu s maximálním výskytem do 5% nemocných v běžné populaci; po HSCT jsou detekovány s výskytem přibližně 26% pro KIPyV a 8% u WUPyV. KIPyV a WUPyV jsou ovšem detekovány i u osob bez respiračních symptomů.



**Lidský bocavirus (HBoV)** byl popsán ve Švédsku v roce 2005 ve vzorcích z nosohltanu od asymptomatických pacientů a pacientů s infekcí dalšími viry. Patří do čeledi Parvoviridae a má s DNA o velikosti přibližně 5 kb a je podobný psím a boviním parvovirům z kmene Bocavirus. Vyskytuje se až u 20% pacientů s respiračním a GIT onemocněním - především u dětí. Detekován byl nicméně i u asymptomatických pacientů. Primární infekce probíhá v dětství do 6. roku věku. Býl detekován nejen ve vzorcích respirační tkáně a stolici, ale také v séru, tonsilách, slinách, moči. Přenos viru je neznámý - většina parvovirů se ale přenáší inhalací, kontaktem s infikovanou stolicí, sputem, nebo močí. Pravděpodobně může persistovat několik měsíců po infekci - ve sliznici, či lymfatické tkáni (např. tonsily).  
 V roce 2009-10 objeveny další typy HBoV, dnes HBoV1-4. HBoV-1 - je detekován ve všech věkových kategoriích, ale převážně u dětí s respiračním onemocněním HBoV 2-4 se vyskytuje převážně ve stolici, vzácněji i v respiračních vzorcích. S gastroenteritidou je asociovan zejména HBoV2.  
 Prevalence HBoV typů i v posloupnosti 1 > 2 > 3 > 4.

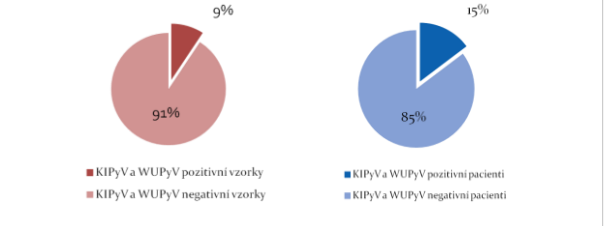


**Závěr:**  
 Studie potvrdila výskyt polyomavirů WUPyV (1%), KIPyV (19%) a HBoV (9%) i v české populaci a to u dětských i dospělých imunosuprimovaných pacientů. K bližšímu osvětlení jejich patofyziologického účinku však bude třeba, s ohledem na komplikovanost studovaných pacientů, získat k testování větší skupinu pacientů a nejlépe v prospektivní studii získat data o co největším počtu virových agens v dýchacích cestách těchto pacientů.

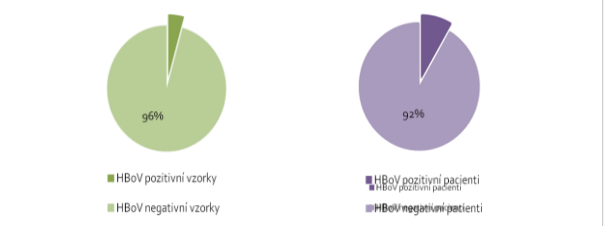


Výskyt virů není u dětské populace vyšší než u dospělých (Chi-kvadrát test p=0,336). U infikovaných dětí a dospělých byl detekován vždy jeden z virů.

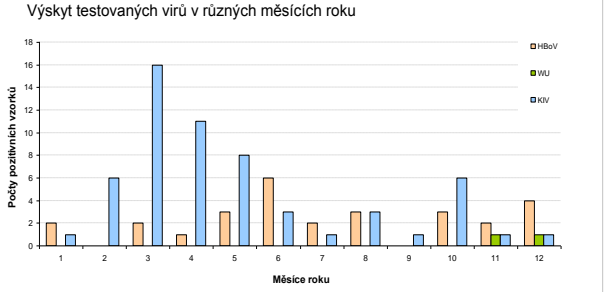
KIPyV byl detekován v 58 vzorcích (8,9%) od 42 pacientů (7 dětských (20%) a 35 dospělých (13,3%); medián detekované kvantity 1,9x10<sup>5</sup>/ml vzorku (rozmezí 1,5x10<sup>3</sup>/ml - 4,25x10<sup>7</sup>/ml). WUPyV byl detekován v 2 vzorcích (0,3%) od 2 pacientů (1 dětský a 1 dospělý) s detekovanou kvantitou 8,9x10<sup>3</sup>/ml a 2,1x10<sup>4</sup>/ml.



HBoV byl detekován v 28 vzorcích (4,3%) od 25 pacientů (3 dětských (8,5%) a 22 dospělých (8,4%) s mediánem detekované kvantity 3,2x10<sup>4</sup>/ml vzorku (rozmezí 5,0x10<sup>2</sup>/ml - 1,58x10<sup>9</sup>/ml).



U dvou vzorků jsme detekovali zároveň přítomnost KIPyV a HBoV.



Rozložení výskytu testovaných virů v průběhu roku naznačuje vyšší výskyt KIPyV v době od března do června, kdy je již detekce tradičních respiračních vir, které jsou zpravidla RNA, vzácnější. Výsledky však budeme ještě ověřovat a to zejména v nadcházející sezóně respiračních infekcí 2013-2014.