

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

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



**Bc. Tereza, Javornická**

Genotypová analýza lidského cytomegaloviru u pacientů po alogenní transplantaci  
kmenových buněk krvetvorby

Genotypic analysis of human cytomegalovirus in the patients after allogeneic  
haematopoietic stem cell transplatation

Diplomová práce

Školitel: MUDr. Petr Hubáček Ph.D.

Praha, 2014

**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, 14.8.2014

Podpis

## **Poděkování**

Chtěla bych velmi poděkovat svému školiteli MUDr. Petru Hubáčkovi, Ph.D. za odborné vedení mé práce, všechny cenné rady, které mi poskytl, přátelský přístup a podporu. Dále bych ráda poděkovala celému kolektivu laboratoře, za příjemné pracovní prostředí.

Podpořeno grantem IGA MZ ČR NT/13691-4

## **Abstrakt**

U pacientů po alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk (HSCT) je lidský cytomegalovirus (CMV) jedním z nejzávažnějších virových patogenů. Jeho bližší určení by mohlo poskytnout informace o vlivu jednotlivých CMV genotypů na celkové přežití pacienta a některé závažné komplikace, jako je například reakce štěpu proti hostiteli (GvHD).

Tato diplomová práce se zabývá retrospektivní genetickou analýzou 1877 vzorků od pacientů transplantovaných na Klinice dětské hematologie a onkologie FN Motol a Ústavu hematologie a krevní transfúze od roku 2002. DNA z biologických vzorků (především plné krve) byla izolována kitem Qiagen Blood DNA Mini, případně Qiagen DNA Mini a ve vzorcích byla prospektivně detekována přítomnost CMV DNA. Vzorky byly následně uchovány při -20 °C. Genotypizace byla provedena pomocí real-time PCR technologie zaměřené na geny 2 strukturních proteinů glykoproteinu B a glykoproteinu H za použití sekvenčně specifických primerů a sond.

U 1343 vzorků (71,6 %) od 390 pacientů jsme prokázali infekci pouze jedním kmenem CMV, u 256 (13,6 %) vzorků od 113 pacientů jsme prokázali smíšenou infekci, způsobenou dvěma a více kmeny CMV. Nejčastěji prokázaný genotyp v „single“ infekci byl u dětských i dospělých pacientů gB1/gH2 detekovaný u 118 (28,4 %) pacientů. Nejčastěji prokázanou kombinací genotypů u smíšených infekcí byla kombinace gB1/gH1,2 detekovaná u 24 (15,8 %) pacientů.

## **Klíčová slova**

lidský cytomegalovirus, herpesvirus, genotyp, transplantace kmenových buněk  
krvetvorby, alogenní

## **Abstract**

In patients after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is a human cytomegalovirus (CMV) one of the most important viral pathogens. Its detailed characteristic could provide information about the impact of each CMV genotype on overall survival of the patient, and some serious complications, such as graft versus host disease (GvHD).

This thesis deals with retrospective genetic analysis of samples from 1877 patients transplanted at the Clinic of Pediatric Hematology and Oncology, University Hospital Motol and the Institute of Hematology and Blood Transfusion since 2002. DNA from biological samples (especially whole blood) was isolated kit Qiagen DNA Blood Mini or Qiagen DNA Mini and samples were prospectively detected presence of CMV DNA. Samples were subsequently stored at -20 °C. Genotyping was performed using real-time PCR technologies to the genes of 2 structural proteins glycoprotein B, glycoprotein H and using sequence specific primers and probes.

In 1343 samples (71.6%) from 390 patients there was only one strain of CMV; in 256 (13.6%) samples from 113 patients have detected mixed infection caused by two or more strains of CMV. The most common genotype demonstrated in "single" infection was in pediatric and adult patients gB1/gH2 detected in 118 (28.4%) patients. Most frequently detected combination of genotypes in mixed infections, the combination gB1/gH1,2 detected in 24 (15.8%) patients.

## **Keywords**

human cytomegalovirus, herpesvirus, genotype, haematopoietic stem cell transplantation, allogeneic

## **OBSAH**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>ÚVOD.....</b>   | <b>11</b> |
| <b>1 PŘEHLED LITERATURY .....</b>                              | <b>11</b> |
| 1.1 TRANSPLANTACE KMENOVÝCH BUNĚK KRVETVORBY .....             | 11        |
| 1.1.1 Syngenní transplantace .....                             | 11        |
| 1.1.2 Autologní transplantace .....                            | 11        |
| 1.1.3 Alogenní transplantace.....                              | 12        |
| 1.2 KOMPLIKACE HSCT .....                                      | 13        |
| 1.2.1 Časná fáze – Neutropenická fáze.....                     | 13        |
| 1.2.2 Střední fáze .....                                       | 14        |
| 1.2.3 Pozdní fáze.....   | 14        |
| 1.2.4 Virové infekce.....                                      | 15        |
| 1.3 HERPEŠVIRY .....   | 16        |
| 1.4 LIDSKÝ CYTOMEGALOVIRUS .....                               | 19        |
| 1.4.1 Struktura virionu .....                                  | 20        |
| 1.4.2 Genom.....   | 22        |
| 1.4.3 Glykoprotein B.....                                      | 24        |
| 1.4.4 Glykoprotein H .....                                     | 26        |
| 1.4.5 Biologické chování- ovlivňování imunitního systému ..... | 27        |
| 1.4.6 Léčba a rezistence .....                                 | 29        |
| <b>2 CÍLE.....</b>   | <b>31</b> |
| <b>3 MATERIÁL A METODY.....</b>                                | <b>32</b> |
| 3.1 SOUBOR PACIENTŮ.....                                       | 32        |
| 3.2 MATERIÁL A METODY .....                                    | 35        |
| 3.2.1 Klonování.....   | 35        |
| 3.2.2 Elektroforéza.....                                       | 39        |
| 3.2.3 Real-Time PCR.....                                       | 41        |
| 3.2.4 Statistické vyhodnocení .....                            | 46        |
| <b>4 VÝSLEDKY .....</b>  | <b>47</b> |
| 4.1 PŘÍPRAVA KALIBRAČNÍCH KŘIVEK .....                         | 47        |
| 4.2 GENOTYPIZACE.....  | 50        |
| <b>5 DISKUZE.....</b>  | <b>60</b> |
| <b>6 ZÁVĚR.....</b>  | <b>65</b> |
| <b>7 CITOVANÁ LITERATURA .....</b>                             | <b>66</b> |
| <b>8 PŘÍLOHY .....</b>   | <b>74</b> |

## SEZNAM ZKRATEK

**aa-** *Amino acid*- Aminokyselina

**AD-** *Antigenic domain*- Antigenní doména

**ACV-** *Aciclovir*

**aGvHD-** *Acute Graft- Versus- Host Disease*- Akutní reakce štěpu proti hostiteli

**ALL-** *Acute lymphoblastic leukemia*- Akutní lymfoblastická leukemie

**AML-** *Acute myeloid leukemia*- Akutní myeloidní leukémie

**AP-** *Assembly Protein*- Skládací (montážní) protein

**ASCT-** *Autologous Steam Cell Transplantation*- Autologní transplantace kmenových buněk

**BMT-** *Bone Marrow Transplantation*- Transplantace hematopoetických kmenových buněk z kostní dřeni

**CBT-** *Cord Blood Transplantation*- Transplantace kmenových buněk z pupečnickové krve

**CDV-** *Cidofovir*

**CLL-** *Chronic lymphocytic leukemia*- Chronická lymfocytární leukemie

**CML-** *Chronic myeloid leukemia*- Chronická myeloidní leukemie

**CMV-** *Human Cyomegalovirus*- Lidský cytomegalovirus

**C<sub>T</sub>**- *Threshold cycle*

**DNA-** *Deoxyribonucleic acid*- Deoxyribonukleová kyselina

**dNTP-** *Deoxyribonucleotide triphosphate*- Deoxyribonukleotid trifosfát

**E geny-** *Early genes*- Časné geny

**E. Coli -** *Escherichia Coli*

**EBV-** *Epstein-Barr virus*- Virus Epstein-Barrové

**FAM-** *6-Carboxyfluorescein*

**FOS-** *Forscarnet*

**gB-** *Glycoprotein B*- Glykoprotein B

**gC III-** *Glycoprotein complex III*- Glykoproteinový komplex III

**G-CSF-** *Granulocyte colony stimulating factor*- Granulocyty kolonie stimulující faktor

**GCV-** *Ganciclovir*

**gH-** *Glycoprotein H*- Glykoprotein H



**gL-** *Glycoprotein L*- Glykoprotein L

**gM-** *Glycoprotein M*- Glykoprotein M

**gN-** *Glycoprotein N*- Glykoprotein N

**gO-** *Glycoprotein O*- Glykoprotein O

**gp TRL10-** *Glycoprotein TRL10*- Glykoprotein TRL10

**gp48-** *Glycoprotein 48*- Glykoprotein 48

**GvHD-** *Graft- Versus- Host Disease*- Reakce štěpu proti hostiteli

**HHV-** *Human herpes virus*- Lidský herpesvirus

**HLA-** *Human Leucocyte Antigen*- Lidský leukocytární antigen

**HMWP-** *High molecular weight protein*- Protein o vysoké molekulové hmotnosti

**HSCT-** *Hematopoietic stem cell transplantation*- Transplantace hematopoetických kmenových buněk

**HSV-** *Herpes simplex virus*

**IE geny-** *Immediate- Early genes*- Bezprostředně časné geny

**IPTG -** *Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside*

**kDa-** *Kilodalton*

**KSHV-** *Kaposi's sarcoma virus*- Virus Kaposiho sarkomu

**L geny-** *Late genes*- Pozdní geny

**mCBP-** *Minor capsid binding protein*- Protein vázající mCP

**MCP-** *Major capsid protein*- Hlavní kapsidový protein

**mCP-** *Minor capsid protein*- Menší kapsidový protein

**MDS-** *Myelodysplastic syndrome*- Myelodysplastický syndrom

**MGB-** *Minor-groove-binder*

**MHC-** *Major histocompatibility complex*- Hlavní histokompatibilní komplex

**MIE-** *Major immediate early*- Hlavní bezprostředně časný protein

**MMUD-** *Mismatched Unrelated Donor*- HLA neshodný nepříbuzný dárc

**MSD-** *Matched Sibling Donor*- HLA shodný příbuzný dárc

**MUD-** *Matched Unrelated Donor*- HLA shodný nepříbuzný dárc

**NF- $\kappa$ B**- *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*- Jaderný transkripční faktor aktivující B buňky

**NIEPs**- *Non-infectious enveloped particles*- Neinfekční obalené virové částice

**NIH**- *National Institute of Health*- Národní institut zdraví

**NK buňky**- *Natural killer cell*- Přirození zabijáci

**ORF**- *Open reading frame*- Otevřený čtecí rámec

**PBPC**- *Peripheral Blood Progenitor Cells*- Progenitorové buňky z periferní krve

**PBSC**- *Peripheral Blood Stem Cells*- Kmenové buňky z periferní krve

**PCR**- *Polymerase chain reaction*- Polymerázová řetězová reakce

**PDGF $\alpha$** - *Platelet-derived growth factor*- Růstový faktor odvozený z krevních destiček

**pES**- *Pre- Engraftment Syndrom* - Syndrom před přihojením štěpu

**PORT**- *Portal protein*- Portálový protein

**R<sup>2</sup>**- *The correlation coefficient*- Korelační koeficient

**Real-time PCR**- *Real-time polymerase chain reaction*- Polymerázová řetězová reakce v reálném čase

**RNA**- *Ribonucleic acid*- Ribonukleová kyselina

**ROX**- *carboxy-X-rhodamine*

**SAA**- *Aplastic anemia*- Aplastická anémie

**SCID**- *Severe Combined Immunodeficiency Disease*- Těžká kombinovaná imunodeficienc

**SCP**- *The smallest capsid protein*- Nejmenší kapsidový protein

**TLR2**- *Toll-Like receptor 2*- Toll-Like receptor 2

**UL**- *Unique Long*- Unikátní dlouhá kódující oblast

**US**- *Unique Short*- Unikátní krátká kódující oblast

**VGCV**- *Valganciclovir*

**VZV**- *Varicella zoster virus*- Virus planých neštovic

**X-gal**- *5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside*

## ÚVOD

Lidský cytomegalovirus (CMV) je virus běžně se vyskytující v lidské populaci. Jedná se o největší herpetický virus, který je zároveň jedním ze 3 betaherpesvirů, které infikují člověka. Po primoinfekci, která u zdravých jedinců proběhne většinou bez výrazných klinických příznaků, zůstává celoživotně v latentní formě v buňkách myeloidní řady, ze které je schopen se opakovaně reaktivovat. U imunosuprimovaných pacientů nebo imunonaivních novorozenců může však CMV infekce způsobit celou řadu závažných a v některých případech i život ohrožujících onemocnění.

CMV infekce je stále jednou z nejzávažnějších komplikací vyskytujících se po transplantaci hematopoetických kmenových buněk (HSCT). Pacienti po prodělané alogenní HSCT jsou vzhledem k delší době imunodeficitu a pre-emptivnímu přístupu k terapii, který následuje po alogenní HSCT, výrazně rizikovější skupina pro vznik CMV infekce a nemoci než třeba pacienti po transplantaci solidních orgánů, kteří jsou často zajištěni profylaxí virostatiky. Také bylo zjištěno, že u pacientů po alogenní HSCT dochází k rozvoji CMV infekce výrazně častěji v důsledku reaktive latentního viru než v důsledku primoinfekce. Primoinfekce se vyvine přibližně u 30 % seronegativních příjemců, kdežto reaktive viru se vyskytuje zhruba u 80 % seropozitivních pacientů (Ljungman 2007). Cytomegalovirus, stejně jako všechny herpetické viry, je souputníkem svého hostitele po fylogeneticky velmi dlouhou dobu, a proto si byl schopen vyvinout celou řadu strategií, kterými dokáže svého hostitele ovládat. Tím že produkuje velké množství různých homologických proteinů, které napodobují funkci hostitelských proteinů, dokáže ovlivnit jak vrozenou tak získanou složku imunitního systému.

Studium lidského cytomegaloviru je celosvětově velmi důležité téma, protože pacientů po transplantacích, s HIV infekcí či novorozenců, kteří jsou ohroženi CMV infekcí, stále přibývá. Proto je naše práce zaměřena na detailnější popsání CMV infekce u jedné z těchto ohrožených skupin.

# 1 PŘEHLED LITERATURY

## 1.1 TRANSPLANTACE KMENOVÝCH BUNĚK KRVETVORBY

Transplantace hematopoetických kmenových buněk (*hematopoietic stem cell transplantation*, HSCT), dříve známá spíše jako transplantace kostní dřeně, je jedna z léčebných možností využívaných u pacientů s řadou maligních či nemaligních onemocnění. HSCT je transplantací kmenových buněk krvetvorby z jakéhokoli zdroje těchto buněk tedy jak z kostní dřeně (*Bone Marrow Transplantation*, BMT), tak z pupečnickové krve (*Cord Blood Transplantation*, CBT), stejně jako z progenitorových buněk z periferní krve (*Peripheral Blood Progenitor Cells*, PBPC, případně *Peripheral Blood Stem Cells*, PBSC). Buňky připravené k podání pacientovi se pak nazývají štěp. V případě PBSC jsou buňky získávány opakovanými aferézami kmenových buněk z periferní krve po předchozí stimulaci jejich vyplavování do periferního oběhu. Buňky jsou stimulovány buď hemopoetickými faktory (G-CSF – *granulocyte colony stimulating factor*) nebo tzv. primingem cytostatickou léčbou. Takto získané hematopoetické kmenové buňky od dárce (donora) jsou následně podány do periferního řečiště příjemce (recipienta). Podle dárce můžeme HSCT rozdělit do 3 základních skupin (Slováček *et al.* 2005).

### 1.1.1 Syngenní transplantace

O syngenní transplantaci hovoříme, pokud je dárce krvetvorných buněk jednovaječné, geneticky identické dvojče příjemce. Výhodou tohoto typu transplantace je, že genetická identita nevyvolává proces odhojení štěpu (Atkinson *et al.* 1998). Nevýhodou pak může být nedostatečná imunitní reakce proti nádorům, vedoucí k vyléčení jako např. u HSCT provedené pro leukémie.

### 1.1.2 Autologní transplantace

U autologní transplantace (*Autologous Stem Cell Transplantation*, ASCT) je zdrojem krvetvorných buněk sám příjemce. V případě maligního onemocnění, jsou pacientovi cytaferézou odebírány krvetvorné buňky v obdobích remise onemocnění.

Ty jsou konzervovány, následně zamrazeny a jsou uchovávány až do doby podání pacientovi. Díky tomu nese ASCT určité riziko kontaminace transplantátu nádorovými buňkami (Slováček *et al.* 2005). Nejčastější indikací k ASCT jsou zejména solidní nádorová onemocnění, při kterých je použita vysoko dávkovaná chemoterapie, která má za následek jak zničení nádoru, tak všech krvetvorných buněk v kostní dřeni, což by mělo pro pacienta fatální následky. Proto jsou před touto terapií nemocnému odebrány hematopoetické kmenové buňky, jak bylo zmíněno, po ukončení léčby pomocí cytostatik jsou pacientovi znovu podány ve formě štěpu (Tan *et al.* 2007, Banna *et al.* 2007). Typickými indikacemi, u nichž je prováděna ASCT, jsou solidní nádorová onemocnění jako například Hodgkinův lymfom ve druhé remisi, mnohočetný myelom, neuroblastom, karcinom prsu, malobuněčný karcinom plic, karcinom ovaria a další (Slováček, *et al.*, 2005).

### 1.1.3 Alogenní transplantace

Při alogenní HSCT jsou dárce a příjemcem dvě různé osoby. Dárce jsou vybíráni na základě shody mezi příjemcem a dárce v hlavních polymorfních lokusech HLA systému (*Human Leucocyte Antigen*, HLA). Jsou testovány lokusy A, B, Cw patřící do HLA I. třídy a lokusy DRB1 a DQB1 u HLA II. třídy. Ideální je shoda (10/10) ve všech těchto lokusech, nicméně shoda (8/8) v lokusech A, B, Cw a DRB1 je považována za kritickou. Proto můžeme alogenní transplantace rozdělit na příbuzenecké, kdy je dárce HLA shodný sourozenec nebo rodič (*Matched Sibling Donor*, MSD) a nepříbuzenecké, u kterých je zdrojem krvetvorných buněk buď HLA shodný nepříbuzný dárce (*Matched Unrelated Donor*, MUD) nebo HLA neshodný nepříbuzný dárce (*Mismatched Unrelated Donor*, MMUD). Pro transplantaci lze vybrat i dárce, který není plně kompatibilní, ale s mírou neshody rostou i komplikace spojené s HSCT. V některých případech se testuje i lokus DPB1, který není běžně součástí všech strategií pro výběr dárce (Shaw and Madrigal 2012). Byly provedeny studie, které porovnávali HLA identického příbuzného dárce a HLA kompatibilního nepříbuzného dárce se shodou 10/10. Woolfrey *et al.* provedli retrospektivní analýzu a nenašli žádné statisticky významné rozdíly mezi těmito dvěma skupinami v přežití, přežití bez známek onemocnění a úmrtnosti bez relapsu (Woolfrey *et al.* 2010).

Alogenní HSCT je nejčastěji indikována u maligních hematologických nádorových onemocnění, jako jsou akutní lymfoblastická leukemie (ALL), akutní

myeloidní leukémie (AML), chronická myeloidní leukemie (CML) nebo myelodysplastický syndrom (MDS). Dále je tento typ transplantace také využíván při léčbě nejrůznějších nenádorových onemocněních, jako jsou refrakterní těžká aplastická anémie (SAA) či mukopolysacharidózy (Hubáček 2008) nebo geneticky podmíněné imunodeficity například těžká kombinovaná imunodeficiencie (SCID), Chediakův-Higashiho syndrom, Kostmanův syndrom a další (Formánková 2009).

## **1.2 Komplikace HSCT**

Mezi nejčastější komplikace po alogenní HSCT patří reakce štěpu proti hostiteli (*Graft- Versus- Host Disease*, GvHD), relaps základního onemocnění a infekční komplikace (Hubáček 2008). Závažnost a výskyt komplikací po HSCT závisí na několika faktorech: na předtransplantačním přípravném režimu, během kterého dochází k zničení rychle se dělících buněk – tedy zejména zbytku nádorových buněk, progenitorových buněk kostní dřeně a buněk slizničního epitelu, což má za následek výskyt různých infekcí (Lee *et al.* 2008), dále na shodě HLA molekul mezi dárce a příjemcem, kdy platí, že s rostoucí neshodou roste riziko a závažnost komplikací (Horan *et al.* 2012). A v neposlední řadě hraje svou roli také věk pacienta (Jiang *et al.* 2013), typ štěpu (kostní dřeň, progenitorové buňky z periferní krve, pupečnicková krev), imunosupresivní terapie a další.

Období po HSCT můžeme z hlediska vzniku komplikací rozdělit do následujících fází:

### **1.2.1 Časná fáze – Neutropenická fáze**

Před přihojením štěpu (*Pre-engraftment*) – přibližně 0 – 30 dní po HSCT. Proces přihojení (*engraftment*) je definován jako absolutní počet neutrofilů vyšší než  $0,5 \cdot 10^9 / l$  po dobu dvou po sobě jdoucích dnů a je příznakem obnovení krvetvorby a funkce kostní dřeně po HSCT. Nejvýznamnější rizikové faktory během tohoto období jsou neutropenie a narušení anatomických bariér (poškození slizničního epitelu).

Hlavními patogeny v této fázi jsou gram pozitivní a gram negativní bakterie, *Candida spp.* a *Herpes simplex virus* (HSV). Během tohoto období se může vyskytnout pneumonie, zánět vedlejších nosních dutin, srdeční dysfunkce (Rovira *et al.* 2012). Další komplikací, která se může v této fázi vyskytnout je *Pre- Engraftment Syndrom* (pES),

který je charakterizovaný neinfekční horečkou a kožními vyrážkami podobnými kožním vyrážkám vyskytujícím se při GvHD. V některých případech může být doprovázen i zadržováním tekutin (Lee *et al.* 2008).

### 1.2.2 Střední fáze

Tato fáze začíná po přihojení štěpu (fáze *Post-engraftment*) a trvá přibližně od 30. do 100. dne po HSCT. Nejzávažnější možnou komplikací v tomto období je rozvoj akutní reakce štěpu proti hostiteli (aGvHD). Akutní GvHD nastane, když transplantované dárcovské T-lymfocyty rozpoznají rozdílné antigeny na buňkách příjemce a začnou na ně imunitně reagovat. Následkem toho dochází k poškození tkání různých orgánových systémů. Nejčastěji jsou postiženy kůže, játra a střevo. Podle závažnosti postižení různých tkání dělíme aGvHD do 4 stupňů. Akutní GvHD je významnou příčinou úmrtnosti pacientů po alogenní HSCT (Ball *and* Egeler 2008).

Infekce v této fázi způsobují hlavně viry (*Cytomegalovirus*, *Adenovirus*, *BK polyomavirus*, respirační viry) a mykotické patogeny, (*Candida spp.*, *Aspergillus spp.*). Infekce cytomegalovirem (CMV) je nejčastější infekční komplikace střední fáze (Rovira *et al.* 2012).

### 1.2.3 Pozdní fáze

Jako pozdní fáze se označuje období od 100. dne po transplantaci. Nejvýznamnější komplikací je chronická reakce štěpu proti hostiteli. K rozvoji chronické GvHD může dojít kdykoli po alogenní HSCT, nejčastěji se však vyskytuje během prvních 3 let. Chronická GvHD je závažná dlouhotrvající komplikace, která je léčena imunosupresí různé intenzity. Běžné klinické nálezy zahrnují změny na kůži, abnormální jaterní biochemii, zánět ústní sliznice a další. Extrémně vzácně se mohou vyskytovat i malé střevní obstrukce způsobené těžkou chronickou střevní GvHD (Yoon *et al.* 2012). V dnešní době je chronická GvHD klasifikována podle NIH (*National Institute of Health*) na základě poškození orgánů na lehkou, středně těžkou a těžkou formu (Filipovich *et al.* 2005).

Infekce, které se vyskytují v průběhu tohoto období, jsou spojeny s přítomností a závažností chronické GvHD a s ní spojenou vyšší imunosupresivní léčbou, která brání normálnímu obnovení buněčné a humorální imunity. Tyto infekce jsou způsobovány

opouzdřenými bakteriálními (*Streptococcus pneumoniae*, *Clostridium difficile*, *Mycobacterial infections*) virovými (*Cytomegalovirus*, *Varicella zoster virus*, *Herpes simplex virus*) i mykotickými patogeny (*Aspergillus spp.*) (Marr 2012).

V tabulce č. 1 jsou shrnuty příklady patogenů způsobující infekční komplikace po HSCT.

Tabulka č. 1 Patogeny zodpovědné za infekční komplikace po HSCT

| <b>Fáze</b>                 | <b>Časná fáze</b><br><i>0-30 dní po HSCT</i>                     | <b>Střední fáze</b><br><i>30-100 dní po HSCT</i>                               | <b>Pozdní fáze</b><br><i>&gt; 100 dní po HSCT</i>                                       |
|-----------------------------|--|--|---|
| <i>Rizikové faktory</i>     | Neutropenie, narušení anatomických bariér, ↓ T-buněk / ↓ B-buněk | ↓ T-buněk / ↓ B-buněk<br>Akutní GvHD a jeho léčba                              | ↓ T-buněk / ↓ B-buněk<br>Chronické GvHD a jeho léčba                                    |
| <i>Bakteriální patogeny</i> | Gram negativní bakterie<br>Gram pozitivní bakterie               | Gram negativní bakterie  | Opouzdřené bakterie   |
| <i>Mykotické patogeny</i>   | <i>Aspergillus spp.</i><br><i>Candida spp.</i>                   | <i>Aspergillus spp.</i><br><i>Candida spp.</i><br><i>Pneumocystis jiroveci</i> | <i>Aspergillus spp.</i><br><i>Pneumocystis jiroveci</i>                                 |
| <i>Virové patogeny</i>      | Herpes simplex virus   | Herpes simplex virus<br>Cytomegalovirus<br>Epstein Barr virus                  | Herpes simplex virus<br>Cytomegalovirus<br>Epstein Barr virus<br>Varicella zoster virus |

Převzato a upraveno z Tomblyn *et al.* 2009

#### 1.2.4 Virové infekce

U pacientů po HSCT jsou nejčastěji detekovány lidské herpetické viry, adenoviry a polyomaviry. Virové infekce se mohou vyskytnout v různých fázích po HSCT, avšak nejčastěji se objevují po přihojení štěpu. Jelikož v té době dochází k nárůstu počtu buněk, ve kterých se viry množí (především se jedná o CMV, HHV-6, EBV) a imunosupresivní terapie je velmi intenzivní. Z těchto důvodů se vyskytuje nejvíce virových komplikací v období mezi prvním až šestým měsícem po transplantaci. V pozdějším období se setkáváme s virovými komplikacemi převážně u pacientů, kteří



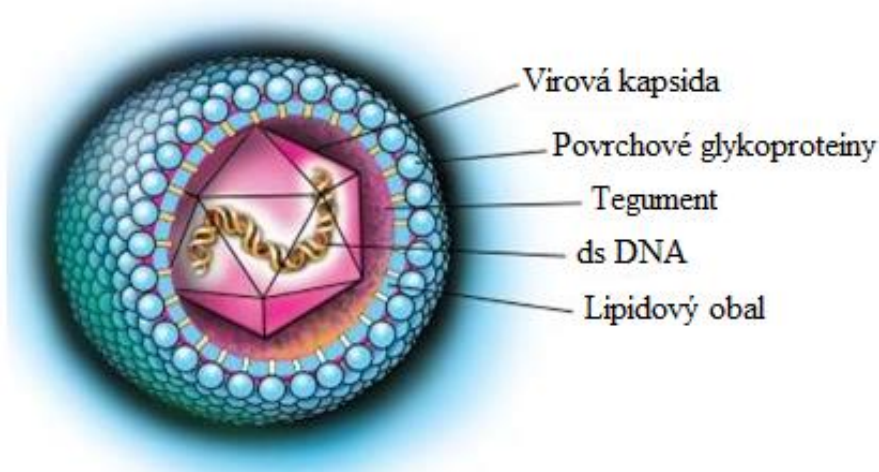
mají dlouhodobě vysokou imunosupresivní léčbu kvůli chronické GvHD. Další výskyt virových komplikací je spojen s obdobím po vysazení profylaxe acyklovirem (Hubáček 2008).

Viry, které způsobují komplikace po HSCT můžeme rozdělit na obvykle latentní a epizodické. Infekce způsobené epizodickými viry jsou spíše získány po expozici než, že by byly důsledkem reaktivace viru. Je důležité pochopit rozdíl virové patogeneze, protože to má vliv na druh použité preventivní strategie. Screening reaktivace spolu s preemtivní terapií a profylaxí seropozitivních příjemců hraje roli v prevenci infekcí způsobených latentními herpetickými viry jako je *Cytomegalovirus* (CMV), lidský herpetický virus 6 (*Human herpesvirus 6*, HHV-6), *Herpes Simplex virus* (HSV) a virus planých neštovic (*Varicella zoster virus*, VZV). Očkování bylo vyvinuto zejména pro zvýšení obranné odpovědi na infekce způsobené epizodickými viry, jako je například virus chřipky (Marr 2012).

### **1.3 HERPESVIRY**

Lidské herpetické viry jsou obvykle 100 – 200 nm velké obalené viry. Jejich genom je tvořen lineární dvouvláknovou deoxyribonukleovou kyselinou (dsDNA), která je obalena proteinovou kapsidou. Nukleokapsida má ikosahedrální symetrii a je tvořena 162 kapsomerami. Nad nukleokapsidou se nachází tzv. tegument, což je vrstva obsahující virem kódované proteiny. Protože se jedná o obalené viry, nachází se nad tegumentem ještě lipidový obal, který je tvořen membránou hostitelské buňky a obsahuje velké množství virových glykoproteinů. Struktura herpetických virů je znázorněna na obrázku č. 1.

Obrázek č. 1 Obecná struktura herpesviru



### Lidský cytomegalovirus

Převzato a upraveno z: <http://medicinabih.info/medicina/mikrobiologija/betaherpesvirinae/>  
6.4.2014

Všechny lidské herpetické viry mají tyto 4 společné znaky:

- a) Vysoký počet virem kódovaných proteinů, které se účastní metabolismu a syntézy nukleových kyselin, zpracování proteinů, ovlivňování imunitního systému hostitele a další.
- b) Syntéza nových virových DNA a skládání kapsid probíhá v jádře hostitelské buňky.
- c) Virová proliferace spojená se vznikem nových virových partikulí je pak vždy doprovázena destrukcí infikované buňky.
- d) Herpetické viry jsou schopné zůstat v latentním stavu ve svých přirozených hostitelských buňkách. V naprosté většině případů se genomová DNA latentního viru nachází v podobě uzavřených kruhových molekul v jádře buňky. Během latence viru je exprimována jen malá část genů, které udržují virovou DNA v této formě, avšak latentní genomy si zachovávají schopnost reaktivace, následné replikace a schopnost vyvolat onemocnění při reaktivaci. Latentní fáze se od chronické infekce odlišuje nepřítomností infekčních nově tvořených virových partikulí (Roizman *and* Pellett 2001). Ve vzácných případech se pak herpesvirová DNA může integrovat přímo do genomu hostitelské buňky.

Do rodiny *Herpesviridae* spadá několik významných lidských patogenů, patřících do 3 odlišných podčeledí: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* a *Gammaherpesvirinae*. Lidské patogeny se vyskytují ve všech třech podčeledích.

Z lidských patogenů se v podčeledi *Alphaherpesvirinae* vyskytují *Herpes simplex virus 1* (HSV-1, *Human herpes virus 1*, HHV-1), *Herpes simplex virus 2* (HSV-2, *Human herpes virus 2*, HHV-2) a virus planých neštovic (*Varicella zoster virus*, VZV, HHV-3). Jedná se o neurotropní viry, které napadají buňky periferního nervového systému a nastolují celoživotní latenci v neuronech periferních ganglií, přičemž může docházet i k jejich opakovaným reaktivacím. Primárními cílovými buňkami jsou slizniční a epitelální buňky (Smith 2012).

Do podčeledi *Betaherpesvirinae* se řadí tři hlavní rody *Cytomegalovirus*, *Muromegalovirus*, *Roseolovirus* a řada dalších virů, které nejsou přesně taxonomicky zařazeny. Lidské patogeny pak představují lidský cytomegalovirus (CMV, HHV-5) a lidské herpetické viry 6 a 7 (HHV-6A, HHV-6B a HHV-7). Společnými znaky pro *Betaherpesviry* je omezený okruh hostitelů, pomalý reprodukční cyklus a časté zvětšení infikovaných buněk (Davison and Bhella 2007). Primárními cílovými buňkami, ve kterých probíhá replikace viru a dochází k tvorbě infekčního virového potomstva, mohou být makrofágy, dendritické buňky, epitelální buňky, buňky hladkého svalstva, endotelové buňky a fibroblasty (pro cytomegaloviry) a T- lymfocyty pro HHV-6 a HHV-7. Místem latence jsou pro cytomegalovirus buňky kostní dřeně a CD34+ monocyty, pro HHV-6 to jsou progenitorové buňky kostní dřeně a pro HHV-7 to jsou T-lymfocyty (Miszczak *et al.* 2013).

Do podčeledi *Gammaherpesvirinae* se z lidských patogenů řadí virus Epstein-Barrové (EBV, HHV-4) a osmý lidský herpesvirus (HHV-8), dříve známý jako virus Kaposiho sarkomu (KSHV). *Gammaherpesviry* mohou infikovat různé typy buněk, nicméně nejčastějšími primárními cílovými buňkami jsou epitelální buňky a B-lymfocyty. Místem latence jsou B-lymfocyty. Primární infekce probíhá obvykle subklinicky, avšak dlouhodobá přítomnost těchto virů je spojována s rozvojem různých maligních onemocnění jako je například Burkittův lymfom nebo Kaposiho sarkom (Machiels *et al.* 2013).

## **1.4 LIDSKÝ CYTOMEGALOVIRUS**

Patří do čeledi *Herpesviridae*, podčeleď *Betaherpesvirinae*, rod *Cytomegalovirus*. Taxonomicky je označován jako – 5. lidský herpesvirus (*Human herpesvirus 5*, HHV-5). Promořenost populace se udává od 30 % do 90 % v různých částech světa. S vyšším věkem se zvyšuje seroprevalence v populaci (Staras *et al.* 2006). Lidský cytomegalovirus může být přenášen slinami, sexuálním kontaktem, přes placentu, kojením, krví nebo transplantací solidních orgánů či hematopoetických kmenových buněk.

Cytomegalovirus je běžný oportunní patogen, který se vyskytuje u zdravých jedinců zejména v latentním stavu. Primoinfekce probíhá většinou inaparentně, tedy bez větších jasných klinických příznaků. Ojedinele se mohou objevit horečka, vyrážka a syndrom infekční mononukleózy. U imunosuprimovaných pacientů po HSCT může dojít k reaktivaci viru a následně až vzniku CMV onemocnění. Reaktivace CMV je často charakterizována nevolností, horečkou, trombocytopenií a v případě rozvinutí CMV nemoci se může vyskytovat pneumonie, retinitida, encefalitida, hepatitida, gastroenteritida, případně kolitida a jiné poškození orgánů (Ljungman 2008). K reaktivaci CMV dochází u zhruba 30 % pacientů po HSCT (Walker *et al.* 2007).

CMV vstupuje do lidských buněk buď prostřednictvím přímé fúze nebo přes endocytickou dráhu. Virus se váže na buňky pomocí interakcí mezi virovými glykoproteiny (např. gB a gH) a povrchovými receptory (např.: PDGF $\alpha$ ), následuje fúze virového obalu s plazmatickou membránou hostitelské buňky a uvolnění nukleokapsidy do cytoplazmy. Tyto nukleokapsidy jsou transportovány do jádra, kde dochází k uvolnění virové DNA. To spouští expresi IE1 a IE2 genů (*Immediate- Early*, Bezprostředně časné geny). Virová replikace a zrání následuje po stimulaci virových syntetických funkcí. Proces zrání zahrnuje zabalení (enkapsidaci) replikované DNA do kapsid, které jsou poté přepravovány z jádra do cytoplazmy. K sekundárnímu obalení dochází v cytoplazmě na kompartmentech endoplazmatického retikula a medial-Golgi. Pak následuje dvoustupňové finální obalení viru a výstupní proces, který vede k uvolnění virionu exocytózou přes plazmatickou membránu (Grough and Khana 2009).

Po proběhlé primoinfekci CMV nastoluje celoživotní latenci, ze které je schopen se opakovaně reaktivovat a produkovat nové infekční virové partikule. Reaktivace z latentní infekce je klíčový krok patogeneze. Pochopení mechanismů latence

a reaktivace latentního viru je velmi podstatné pro omezení výskytu CMV nemocí. Byly navrženy 3 hypotézy, které mohou vést ke vzniku latence (Cheung *et al.* 2006).

- a) Po přichycení a vstupu virové partikule do hostitelské buňky může CMV přejít rovnou do latentní infekce bez de novo exprese virového genomu.
- b) Po vstupu do hostitelské buňky virus iniciuje produktivní infekci, která je ovšem předčasně ukončena což vede ke vzniku latentní infekce.
- c) Po vstupu virus exprimuje určitou skupinu virových genů, které nejsou spojeny s produktivní infekcí, ale které jsou nezbytně nutné pro úspěšné nastolení latence.

Při studiu latentní CMV infekce byla objevena řada virových transkriptů, které jsou přítomny v infikované buňce. Mimo jiné byly identifikovány s latencí asociované transkripty, které jsou antisense k oblasti genů UL81-82. Tyto transkripty jsou schopny inhibovat expresi UL 82 genu, jež kóduje pp71 protein, který za normálních okolností aktivuje transkripci virových IE genů a tím se podílí na iniciaci produktivní infekce (Bego *et al.* 2005, Cantrell *et al.* 2005).

Genomická virová DNA může být detekována v různých typech buněk od nezralých dendritických buněk, přes CD 34+ buňky kostní dřeně, monocyty, makrofágy a lymfocyty až po epiteliální buňky. Virus může vstoupit do buněk, ale represí transkripce hlavního IE promotoru je zabráněno produkci nových virionů. Aktivní virová replikace je přímo závislá na stavu diferenciaci hostitelské buňky. Což znamená, že do nediferencovaných buněk může CMV vstoupit, ale nemůže tam docházet k virové replikaci, tu umožňují pouze diferencované buňky. Nepermisivní buňky (ty, ve kterých nemůže docházet k aktivní replikaci viru) jsou však velmi důležité pro šíření viru po celém organismu hostitele (Grough *and* Khana 2009).

#### **1.4.1 Struktura virionu**

Viriony lidského cytomegaloviru mají typickou herpesvirovou strukturu. Zralá virová částice má v průměru 200- 300 nm. Nukleokapsida o průměru 125 nm vykazuje ikozahedrál ní symetrii a je složena ze 162 kapsomer. Kapsida je tvořena 5 hlavními proteiny. Hlavní kapsidový protein (*major capsid protein*, MCP) je kódovaný genem UL86 a skládá se do 150 hexonů a 12 pentonů. Každý hexon je tvořen 6 kopiemi a každý penton pak 5 kopiemi MCP. Dalšími kapsidovými proteiny jsou menší kapsidový protein (*minor capsid protein*, mCP) kódovaný genem UL85, protein vázající mCP

(*minor capsid binding protein*, mCBP) kódovaný genem UL46, nejmenší kapsidový protein (*the smallest capsid protein*, SCP) kódovaný geny UL48/49 a portálový protein (*portal protein*, PORT) kódovaný genem UL104. Dvě kopie mCP a jedna kopie mCBP tvoří tzv. triplexy, které jsou lokalizované mezi pentony a hexony. Monomery PORT se mohou skládat a vytvářet komplex portálu bez přítomnosti dalších virových proteinů. Portálový protein je využíván pro enkapsidaci virové DNA (Chen *et al.* 1999, Holzenburg *et al.* 2009).

Tegument je spojovací amorfni hmota, která se nachází mezi nukleokapsidou a obalem. Tvoří až 40 % celkové hmotnosti virionu. Obsahuje velké množství proteinů a virovou i hostitelskou RNA. Většina z těchto proteinů je fosforylována a vysoce imunogenní. Proteiny tegumentu lze rozdělit do dvou funkčních skupin. Do první skupiny patří strukturální proteiny, které hrají důležitou roli v sestavování nových virionů, účastní se obalování a vybalování virionu, transportu virového genomu do jádra a enkapsidace virové DNA. Proteiny druhé skupiny modulují buněčnou imunitní odpověď, mění hostitelský buněčný cyklus a optimalizují intracelulární prostředí buňky tak, aby bylo vhodné pro virovou replikaci (Knipe *and* Howley 2007). Pomocí kryo-elektronové tomografie můžeme tegument rozdělit do dvou dílčích oddílů. Vnitřní tegument se skládá z hustě zabalených proteinů kolem kapsidy. Jedná se převážně o proteiny pp150 a protein o vysoké molekulové hmotnosti (HMWP). Vnější tegument obsahuje součásti, které jsou volně uloženy v prostoru mezi vnitřním tegumentem a virovým obalem. Nejvýznamnějšími a nejhojněji zastoupenými proteiny tegumentu jsou pp65 a pp150 (Yu *et al.* 2011). Detekce antigenu pp65 je používána při testech antigenemie (Beckmann *et al.* 2011), zatímco detekce pp150 se používá při testování sér na přítomnost specifických protilátek (Jääskeläinen *et al.* 2009). Vysoký obsah proteinu pp65 je spojen se vznikem velkého množství denzních tělísek. Viriony z čerstvých klinických izolátů obsahují menší množství pp65 (Klages *et al.* 1989).

Obal virionu je tvořen lipidovou dvouvrstvou a obsahuje velké množství virem kódovaných transmembránových glykoproteinů. Glykoprotein B (gB), glykoprotein H (gH), glykoprotein M (gM), glykoprotein N (gN), glykoprotein L (gL), glykoprotein O (gO), glykoprotein 48 (gp48), glykoprotein TRL 10 (gp TRL10) a UL33 (Varnum *et al.* 2004). Těchto 9 virových glykoproteinů má zásadní vliv na vstup viru do buňky, jeho šíření z buňky do buňky a zrání nových virionů. Množství rozdílných glykoproteinových komplexů nacházejících se na obalu virionu může být příčinou širokého buněčného tropismu CMV (Zhou *et al.* 2013). Mutační analýzou bylo prokázáno, že narušení

otevřených čtecích rámců gB, gH, gL a gM má za následek neschopnost tvorby nového infekčního potomstva. Pouze gO je postradatelný pro růst CMV v kultivovaných fibroblastech (Hobom *et al.*, 2000).

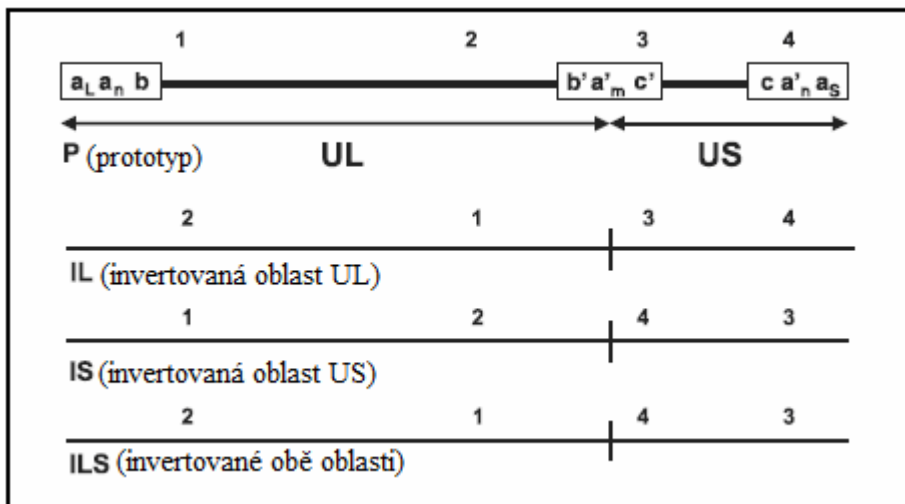
Všeobecně přijímaný model sestavení zralé virové partikule je následující: uvnitř jádra dochází k sestavení kapsidy a enkapsidaci virové DNA, na nukleokapsidu je navázáno několik proteinů tegumentu, které jsou lokalizovány v jádře. Komplex nukleokapsidy s proteiny pučí přes vnitřní jadernou membránu a tím získává obal, který fúzuje s vnější jadernou membránou. Dochází k uvolnění kapsidy z obalu a navázání dalších proteinů tegumentu, které jsou lokalizovány v cytoplazmě infikované buňky. Kapsida spolu s proteiny tegumentu získává definitivní (konečný) obal pučením přes membránu vakuol sekreční dráhy, které jsou odvozené od Golgiho aparátu a jsou určeny pro transport k plazmatické membráně. Tím vzniká zralý obalený virion (Homman-Loudiyi *et al.* 2003, Silva *et al.* 2005).

V buněčné kultuře infikované CMV dochází k tvorbě 3 různých virových částic. Kromě zralých infekčních virionů vznikají i neinfekční částice a denzní tělíška. Neinfekční obalené virové částice (NIEPs) jsou defektní partikule, které jsou složeny ze stejných proteinů jako infekční částice, ale postrádají virovou DNA. Navíc obsahují virový sestavovací protein (*Assembly Protein*, AP), který se nenachází ve zralých infekčních partikulích. Denzní tělíška jsou obalené částice neschopné replikace. Postrádají organizovanou nukleokapsidu a virovou DNA. Skládají se převážně z tegumentového proteinu pp65. Poměr zastoupení těchto 3 partikulí závisí na virovém kmeni (Varnum *et al.* 2004).

## 1.4.2 Genom

Cytomegalovirus je největším dosud známým lidským herpetickým virem. Jeho genom je tvořen dvouřetězcovou lineární molekulou DNA o velikosti zhruba 230 kbp. Skládá se ze dvou unikátních kódujících oblastí- dlouhé (*Unique Long*, UL) a krátké (*Unique Short*, US), které jsou ohraničeny vnějšími terminálními a vnitřními interními repetitivními sekvencemi. Díky těmto repetitivním úsekům může docházet ke vzniku 4 izomerních forem, které jsou uvedeny na obrázku č. 2 (Landolfo *et al.*, 2003).

Obrázek č. 2 Struktura čtyř izomerních forem genomu CMV



Převzato a upraveno z (Landolfo *et al.*, 2003).

Expres jednotlivých proteinů je časově koordinována a regulována. Díky této postupné expresi je možné geny CMV rozdělit do 3 kategorií:

- a) Bezprostředně časné geny – IE (*Immediate- Early*; někdy označované jako  $\alpha$ )  
 IE proteiny zahajují genovou expresi zhruba 1 hodinu po infekci bez de novo syntézy proteinů. Do skupiny IE proteinů se řadí hlavní IE protein (MIE) kódovaný geny UL122 a UL123 (IE1 a IE2) a pomocné proteiny kódované například geny UL36- 38, UL 115- 119, IRS1/TRS1 a US3. MIE proteiny se uplatňují buď samostatně nebo ve spolupráci s dalšími proteiny jako transaktivátory a autostimulátory virových genů a jsou nezbytně nutné pro transkripci dalších genů. Kromě toho, tyto proteiny mají velký vliv na fyziologii hostitelské buňky, protože regulují expresi velkého množství buněčných genů.
- b) Časné geny – E (Early)  
 Expres genů E (někdy označovaných jako  $\beta$ ) závisí na přítomnosti funkčních IE proteinů a je ovlivněna inhibitory virové DNA replikace. V závislosti na čase transkripce se dělí do dvou podtříd  $\beta$ 1 (E), které jsou přepisovány 4-8 hodin po infekci a  $\beta$ 2 geny (E-L), které jsou přepisovány 8-24 hodin po infekci. E geny kódují většinou nestrukturální proteiny, které jsou nezbytné pro replikaci virové DNA a transkripci pozdních genů (Landolfo *et al.*, 2003).
- c) Pozdní geny – L (Late)  
 Obecně přepis pozdních genů začíná více než 24 hodin po infekci a vyžaduje předchozí replikaci virové DNA. Nicméně proteiny kódované pozdními geny



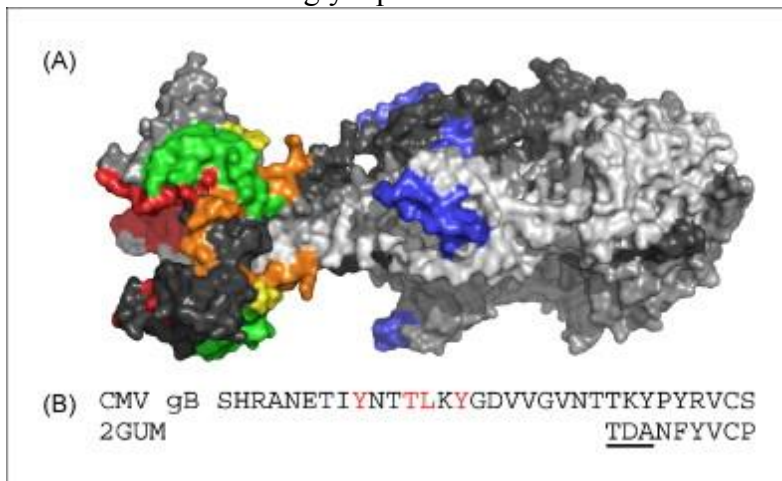
můžeme rozdělit také do dvou podtříd. Geny patřící do třídy  $\gamma 1$  (*leaky late*) jsou částečně exprimovány brzo po infekci, ale jsou výrazně stimulovány v pozdní době. Geny třídy  $\gamma 2$  jsou nazývány pravými pozdními geny (*true late*) a jsou exprimovány pouze po replikaci virové DNA. L geny kódují především strukturní proteiny, které hrají roli při skládání a morfogenezi nových virionů (Isomura and Stinski, 2013).

První kompletní sekvence genomu lidského cytomegaloviru byla publikována v roce 1990. Chee *et al.* sekvenovali laboratorní kmen AD169 a určili u něj 208 otevřených čtecích rámců (ORFs) (Chee *et al.* 1990). V následujících letech byly genomy CMV dále zkoumány a upravovány počty ORFů. Davison *et al.* došli k závěru, že AD169 kóduje 164 - 167 genů. Laboratorní kmeny, které jsou mnohonásobně pasážovány, se přizpůsobili růstu na lidských fibroblastech, a proto u nich můžeme pozorovat výrazné změny oproti divokým kmenům vyskytujícím se v populaci. Kódovací kapacita genomu lidského CMV není fixní a liší se u jednotlivých kmenů (Davison *et al.* 2003, Sijmons *et al.* 2014). Murphy *et al.* identifikovali, ve čtyřech různých kmenech (Toledo, FIX, PH a TR) z klinických izolátů, 252 konzervovaných ORFů, které mají potenciál kódovat protein (Murphy *et al.* 2003).

### 1.4.3 Glykoprotein B

Glykoprotein B (gB), kódovaný genem UL 55, je hlavní složkou virového obalu. Jedná se o heterodimer složený z transmembránové a povrchové podjednotky, které jsou spojeny disulfidickými můstky. Maturovaný gB vzniká z prekurzoru o vysoké molekulové hmotnosti (150 KDa, 906 aa), který je kotranslačně glykosylován na N-konci a je štěpen buněčnými endoproteázami furinového typu na gp55 a gp116. (Schečzik *et al.* 2001).

Obrázek č. 3 Struktura glykoproteinů B



Převzato z <http://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S187167840900079X-gr6.jpg> 10.4.2014

Glykoprotein B hraje klíčovou roli při vstupu viru do buňky. Součástí tohoto několikastupňového procesu je přichycení gB k povrchovým proteoglykanům (heparan-sulfátu) a následná interakce se specifickým receptorem (Compton *et al.* 1993). Je nepostradatelný pro vstup virionu a šíření z buňky do buňky, nicméně není nezbytně nutný pro přichycení virionu (Isaacson *and* Compton 2009). Společně s dalšími obalovými glykoproteiny zprostředkovává na pH nezávislou fúzi membrán, která je nezbytná pro endocytózu a tedy vstup viru do buňky (Compton *et al.* 1992, Tugizov *et al.* 1999). Zároveň je významným antigenem, proti kterému jsou mířeny specifické protilátky. Většina těchto protilátek nemá neutralizační aktivitu. Zatím bylo popsáno 5 antigenních domén. Ještě do nedávna se považovala antigenní doména 1 (*Antigenic domain 1*, AD1), za dominantní vazebné místo pro protilátky. Domény AD1 z klinických izolátů vykazují velmi malou sekvenční variabilitu. Mutace v nich mají za následek ztrátu reaktivity se specifickými monoklonálními protilátkami a nedochází k oligomerizaci gB. Což naznačuje, že AD1 je základní strukturní doména nutná pro správnou funkci gB (Britt *et al.* 2005). Nicméně nedávné studie popsali dosud neidentifikované antigenní domény 4 (AD 4) a 5 (AD 5). A prokázali, že AD 4 doména je cílem zhruba 90 % neutralizačních protilátek (Pöttsch *et al.* 2011). Podle Spindler *et al.* je YK epitop v AD 4 (tyrosin v poloze 364 a lysin v poloze 379) hlavním cílem pro AD 4 specifické neutralizační protilátky (Spindler *et al.* 2013). AD2 doména se nachází na N-konci povrchové podjednotky a je málo imunogenní (Lantto *et al.* 2003). Doména AD 3 je další lineární aminokyselinová sekvence, proti které jsou mířeny protilátky, nicméně tyto protilátky nejsou neutralizační (Kniess *et al.* 1991). Glykoprotein B společně

s glykoproteinem H jsou rozpoznávány TLR2 (*Toll-Like receptor 2*) a přímo interagují s heterodimerem TLR2 a TLR2/1, čímž se podílejí na aktivaci NF- $\kappa$ B. Tato interakce zároveň stimuluje produkci prozánětlivých cytokinů (Boehme *et al.* 2006).

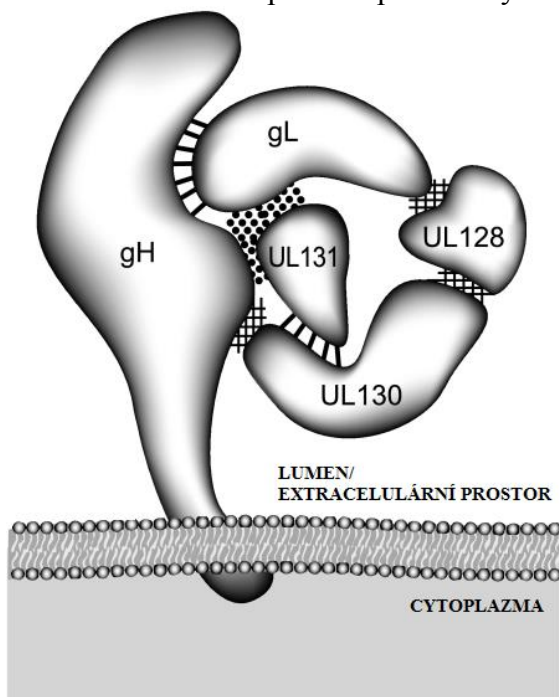
Gen kódující glykoprotein B je velmi konzervativní, i přesto jeho sekvence obsahuje oblasti s vysokou variabilitou. Substituce v imunoaktivní oblasti (384-717 aa) má za následek rozdělení glykoproteinu B do 4 genotypů označovaných gB1, gB2, gB3 a gB4 (Chou *et al.* 1991). Zastoupení jednotlivých genotypů je odlišné u různě imunosuprimovaných pacientů a může se částečně lišit u dětí a dospělých. V české populaci (testováno 53 pacientů po HSCT) byl nejčastěji detekovaný gB1 (33,3 %), gB2 (28,6 %), gB3 (18,1 %) a nejméně četný gB4 (7,4 %). Koinfekce více genotypy byla dosud popsána u přibližně 9,5 % pacientů (Roubalová *et al.* 2009). Jiné studie zabývající se genotypizací glykoproteinu B u pacientů po HSCT potvrzují, že nejhojněji se vyskytující genotyp je gB1, který detekovali v 39 % vzorků, druhým nejčastějším je gB2 (35 %), gB4 (14 %), nicméně jako nejméně četný genotyp uvádějí gB3 (6 %). Infekci způsobenou více než jedním genotypem prokázali v 6 % případů (Dieamant *et al.* 2013).

#### 1.4.4 Glykoprotein H

Glykoprotein H (gH), kódovaný genem UL 75 je součástí glykoproteinového komplexu III (gC III). Tento glykoproteinový komplex se na povrchu virionů nachází ve dvou variantách. První typ je tvořen heterodimerem gH/gL a glykoproteinem O (gO). Druhý typ se skládá opět z heterodimeru gH/gL a proteinů UL128, UL130 a UL131. Glykoproteinový komplex III hraje důležitou roli při vstupu viru do buňky a jeho následném šíření z buňky do buňky. Proteiny UL 128-131 se mohou nezávisle na sobě vázat na heterodimer gH/gL, nicméně vazba těchto proteinů může významně ovlivnit vazbu dalších proteinů. Pro tvorbu funkčních pentamerů musí docházet současně k vazbě UL128-131 na gH/gL (Ryckman *et al.* 2008). Proteiny UL128-131 a gO mají vliv na buněčný tropismus virového kmene. Zatímco první typ komplexu (gH/gL/gO) zprostředkovává infekci fibroblastů, druhý typ komplexu (gH/gL/UL128-131) je nezbytný pro šíření infekce v epiteliálních a endoteliálních buňkách. Laboratorní kmen AD169 je defektní a obsahuje různé mutace v genech UL128-131. Vytváří tedy pouze první variantu gCIII a může infikovat jen fibroblasty (Ryckman *et al.* 2010). Samostatný heterodimer gH/gL má vlastní fúzí aktivitu, je nezbytný pro fúzi buněčných

membrán a vytváření mnohojaderných syncytií (Kinzler *and* Comptom 2005). Pentamer gCIII je významným cílem neutralizačních protilátek (Freed *et al.* 2013).

Obrázek č. 4 Model protein- proteinových interakcí pentameru gCIII



Převzato a upraveno z Ryckman *et al.* 2008.

Glykoprotein H tvořený 742 aminokyselinami (aa) je vysoce konzervativní. Nejvíce variabilní je jeho N-koncová část (prvních 37 aa), zahrnující signální sekvenci. Ve zbytku molekuly jsou rozptýlené jednotlivé aa substituce. Glykoprotein H se rozděluje se do dvou genotypů: gH1 a gH2 (Chou 1992). Zastoupení jednotlivých genotypů se liší u pacientů s různými onemocněními. Guo *et al.* identifikovali jako dominantní genotyp gH1, který prokázali u zhruba 61 % klinických izolátů od dětských pacientů. Genotyp gH2 detekovali ve zhruba 39 % případů (Guo *et al.* 2013). Paradowska *et al.* genotypizovali gH u dětí se ztrátou sluchu. Glykoprotein H1 detekovali ve zhruba 33 %, gH2 ve zhruba 42 % případů a ve 25 % prokázali koinfekci způsobenou oběma genotypy (Paradowska *et al.* 2014).

#### 1.4.5 Biologické chování- ovlivňování imunitního systému

CMV vyvinul, podobně jako většina herpetických virů, celou řadu strategií, kterými dokáže rozvrátit imunitní dozor a obranu hostitelského organismu a to jak vrozené tak získané složky imunitního systému. Hlavní mechanismus se soustředí na

inhibici prezentace antigenů MHC I třídy. Účinná imunitní odpověď na CMV infekci je kriticky závislá na vytváření antigenních peptidů, které pak mohou být předkládány (prezentovány) v komplexu s molekulami třídy MHC I cytotoxickým T lymfocytům (Grough *and* Khana 2009). Během bezprostředně časně (IE) fáze CMV infekce je odpověď prostřednictvím cytotoxických T lymfocytů zaměřena proti antigenním peptidům odvozeným od 72 kDa velkého IE-1 transkripčního faktoru (Gilbert *et al.* 1993). Nicméně virový tegumentový fosfoprotein pp65, který má kinázovou aktivitu, může fosforylovat IE-1 protein, čímž selektivně blokuje zpracování a prezentaci od IE-1 odvozených antigenních peptidů přes MHC I dráhu a tím zabraňuje specifické odpovědi cytotoxických T lymfocytů. Kromě toho CMV kóduje 5 proteinů US2, US3, US6, US10 a US11, které výrazně blokují tvorbu a export MHC I proteinových komplexů (Grough *and* Khana 2009).

Antigenní prezentace přes dráhu MHC II třídy je také omezována a to buď prostřednictvím US2, který cílí molekuly DR $\alpha$  a DM $\alpha$  (patřící do skupiny molekul MHC II) pro degradaci v proteozomu (Tomazin *et al.* 1999) nebo přes proteiny exprimované v bezprostředně časně a časně fázi infekce, které interagují s INF  $\gamma$ , který normálně indukuje expresi molekul MHC II třídy (Miller *et al.* 1999).

Missing-self hypotéza tvrdí, že NK buňky (*Natural killer cell*) selektivně rozpoznávají a zabíjejí cíle, které nemají na svém povrchu vyjádřené vlastní MHC molekuly (Ljunggren *and* Karre 1990). Z toho vyplývá, že buňky infikované CMV, které mají omezenou možnost exprese a prezentace MHC molekul na svém povrchu by měli být přednostně rozpoznávány NK buňkami a lyzovány. Nicméně CMV si vyvinul množství obranných mechanismů, kterými chrání infikované buňky před rozpoznáním a lýzou indukovanou NK buňkami. Jedním z těchto mechanismů je produkce virových homologů MHC I molekul, které jsou vystavovány na povrchu infikované buňky a fungují jako návnada.

Lidský CMV také kóduje řadu dalších homologů s odlišnými funkcemi, které napodobují chování lidských proteinů, aby přesměřoval imunitní reakci. Jedním z nich je například produkt genu UL18, který se stejně jako MHC I molekuly váže na  $\beta$ 2-mikroglobulin, ale na rozdíl od nich vykazuje specifickou vazbu pouze s leukocytárním imunoglobulinovým receptorem 1, který se vyskytuje na monocytech a B lymfocytech. Další 4 virové geny UL33, UL78, US27 a US28 kódují homology sedmi transmembránových G proteinů asociovaných s receptory. CMV mimo jiné také kóduje

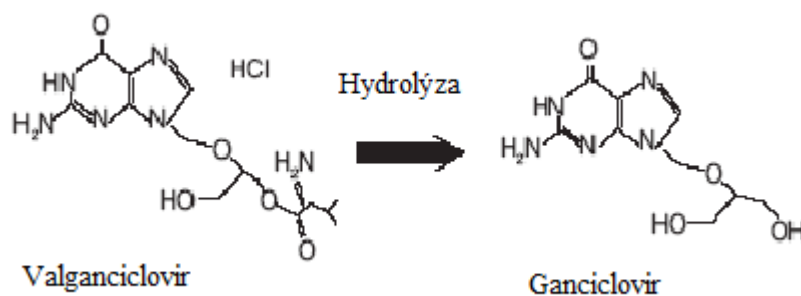
různé antiapoptotické proteiny, tak působí například produkty virových genů UL36 a UL37 (Grough *and* Khana 2009).

#### 1.4.6 Léčba a rezistence

Léčba CMV infekce u pacientů po HSCT se zakládá na podávání virostatik, které jsou většinou užívány intravenózně případně orálně. Nejužívanějším antivirotikem je ganciclovir případně valganciclovir (L-valyl ester gancicloviru). Dále lze k léčbě využít foscarnet, cidofovir a další. Léčba pomocí těchto antivirotik je sice specifická a účinná, ale je doprovázena řadou vedlejších účinků, z nichž nejzávažnějším je rozvoj rezistence.

Ganciclovir (GCV) a valganciclovir (VGCV), který je v buňce nejprve hydrolyzován na ganciclovir jsou nukleosidové analogy začleňované do virové DNA, blokují virovou DNA polymerázu a tím inhibují replikaci CMV. Jelikož nejsou tyto antivirotika podávány ve své účinné formě, je potřeba, aby byly v infikované buňce nejprve metabolizovány. Při prvním kroku jsou konvertovány virovou thymidinkinázou na monofosforylovanou formu a dále pomocí hostitelských buněčných kináz na difosforylovanou a následně na účinnou trifosforylovanou formu.

Obrázek č. 5 Schéma hydrolyzy valgancicloviru na ganciclovir

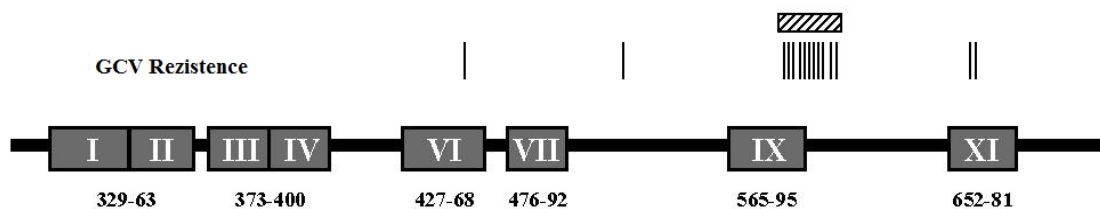


Převzato a upraveno z [http://www.medscape.com/content/2003/00/46/61/466160/466160\\_fig.html](http://www.medscape.com/content/2003/00/46/61/466160/466160_fig.html)  
12.8.2014

Mezi nejzávažnější vedlejší účinky se řadí myelosuprese (neutropenie a trombocytopenie), což má za následek častější rozvoj sekundárních bakteriálních a mykotických infekcí. Dalším závažným nežádoucím účinkem je rozvoj rezistence, která vzniká v genech pro virovou thymidinkinázou kódovanou genem UL97 a virovou DNA polymerázu kódovanou genem UL 54 (Patel *et al.* 2014, Sahoo *et al.* 2013). Bylo

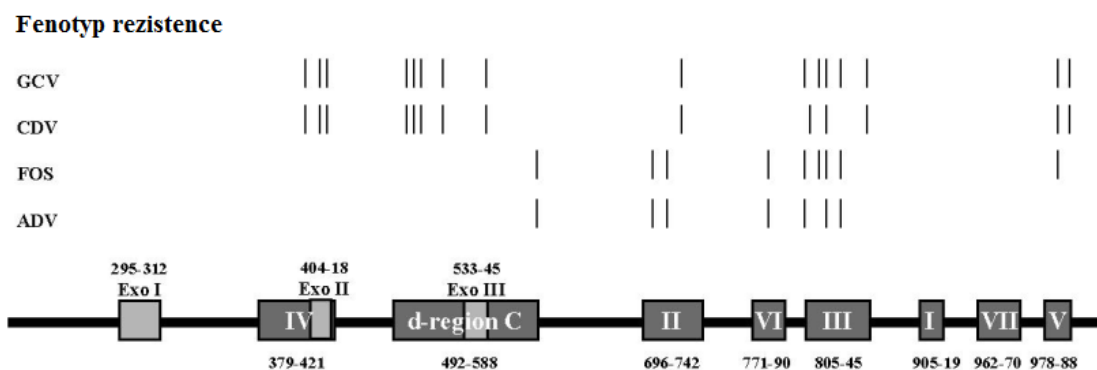
identifikováno množství mutací, které jsou spojovány s rezistencí. V případě rezistence na ganciclovir byly tyto mutace nejčastěji nalezeny v genu UL97 v kodónech 405 – 607. Lurain and Chou shrnuly 7 nejčastěji popisovaných mutací v genu UL97, které byly prokázány u více než 80 % klinických izolátů. Mutace v genu pro virovou DNA polymerázu nejsou tak časté u rezistencí na ganciclovir a valganciclovir, ale jsou popisovány u rezistencí na foscarnet (FOS), cidofovir (CDV) a aciclovir (ADV). V případě rezistence v genu UL54 mohou být mutace rozesety po celém genu, zvláště v doménách kódujících exonukleázovou a polymerázovou aktivitu (Lurain and Chou 2010). Oblasti, ve kterých se nejčastěji vyskytují mutace vedoucí k rezistenci na některé virostatikum, jsou zobrazeny na obrázcích č. 6 a 7.

Obrázek č. 6 Schéma nejčastějších mutací způsobujících rezistenci v genu pro virovou thymidinkinázu (UL 97)



Převzato a upraveno z Gilbert *et al.* 2002

Obrázek č. 7 Schéma nejčastějších mutací způsobujících rezistenci v genu pro virovou DNA polymerázu (UL 54)



Převzato a upraveno z Gilbert *et al.* 2002

## 2 CÍLE

- 1.) Optimalizovat detekci glykoproteinu B a glykoproteinu H pomocí real-time PCR pro použití v naší laboratoři.
- 2.) Provést genotypizaci vybraného souboru pacientů po transplantaci hematopoetických kmenových buněk a provést základní epidemiologické, případně klinické hodnocení dosažených výsledků.
- 3.) Vytvořit kalibrační křivky využitelné pro absolutní kvantifikaci.



### 3 MATERIÁL A METODY

#### 3.1 Soubor pacientů

Pacienti po transplantaci kmenových buněk krvetvorby byli monitorováni a byli jim pravidelně odebírány vzorky pro rutinní diagnostiku. DNA byla z biologických vzorků (převážně plná krev, ojediněle i tkáň atd.) izolována kitem Qiagen Blood DNA Mini, případně Qiagen DNA Mini Kit manuálně a od roku 2012 pak na přístroji QiaCube. Ve vzorcích byla prospektivně detekována CMV DNA metodou real-time PCR za použití sekvenčně specifických primerů publikovaných (a následně mírně modifikovaných) v práci Tanaka *et al.* 2000. Následně byly vzorky skladovány při -20 °C. Vzorky pro retrospektivní genotypizaci byly vybírány podle následujícího schématu uvedeného v tabulce č. 2. Do studie byly vzaty pouze pozitivní vzorky s prokázanou přítomností CMV DNA.

Tabulka č. 2 Schéma výběru vzorků pro genotypizaci

| Vzorek č. | Interval odběru biologického vzorku                |
|-----------|--|
| 1         | První pozitivní vzorek po transplantaci            |
| 2         | Vzorek odebraný přibližně po 30 dnech od 1. vzorku |
| 3         | Vzorek odebraný přibližně po 30 dnech od 2. vzorku |
| 4         | Vzorek odebraný přibližně po 30 dnech od 3. vzorku |
| 5         | Vzorek odebraný přibližně po 90 dnech od 4. vzorku |
| 6         | Vzorek odebraný přibližně po 90 dnech od 5. vzorku |
| 7         | Dále byly vybírány vzorky přibližně po 90 dnech    |

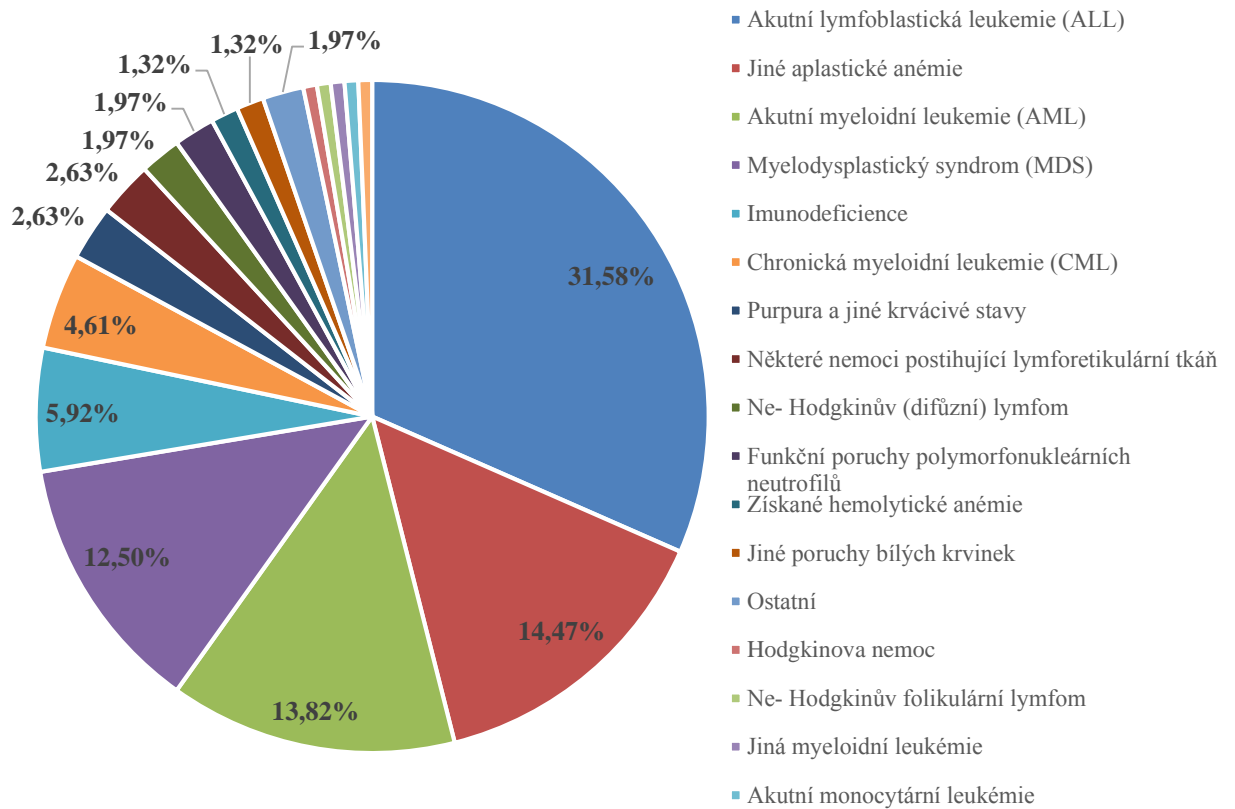
Soubor vyšetřovaných vzorků zahrnuje 1877 vzorků od 158 dětských a 384 dospělých pacientů transplantovaných na Klinice dětské hematologie a onkologie FN Motol a Ústavu hematologie a krevní transfúze od roku 2002 do prosince 2013. Pacienti byli indikováni k alogenní HSCT s rozdílnými diagnózami zejména hemato-onkologickými. U dětských pacientů byly nejčastěji diagnostikovány akutní lymfoblastická leukemie (ALL), akutní myeloidní leukemie (AML), aplastická anemie (SAA), myelodysplastický syndrom (MDS) nebo různé imunodeficity. U dospělých pacientů byly nejčastější indikací k HSCT akutní myeloidní leukemie (AML), myelodysplastický syndrom (MDS) akutní lymfoblastická leukemie (ALL) nebo

chronická myeloidní leukemie (CML). Jednotlivé diagnózy a jejich zastoupení jsou uvedeny v tabulce č. 3, frekvence nejčastějších diagnóz jsou pak znázorněny zvlášť pro dětské a dospělé pacienty v grafech č. 1 a 2.

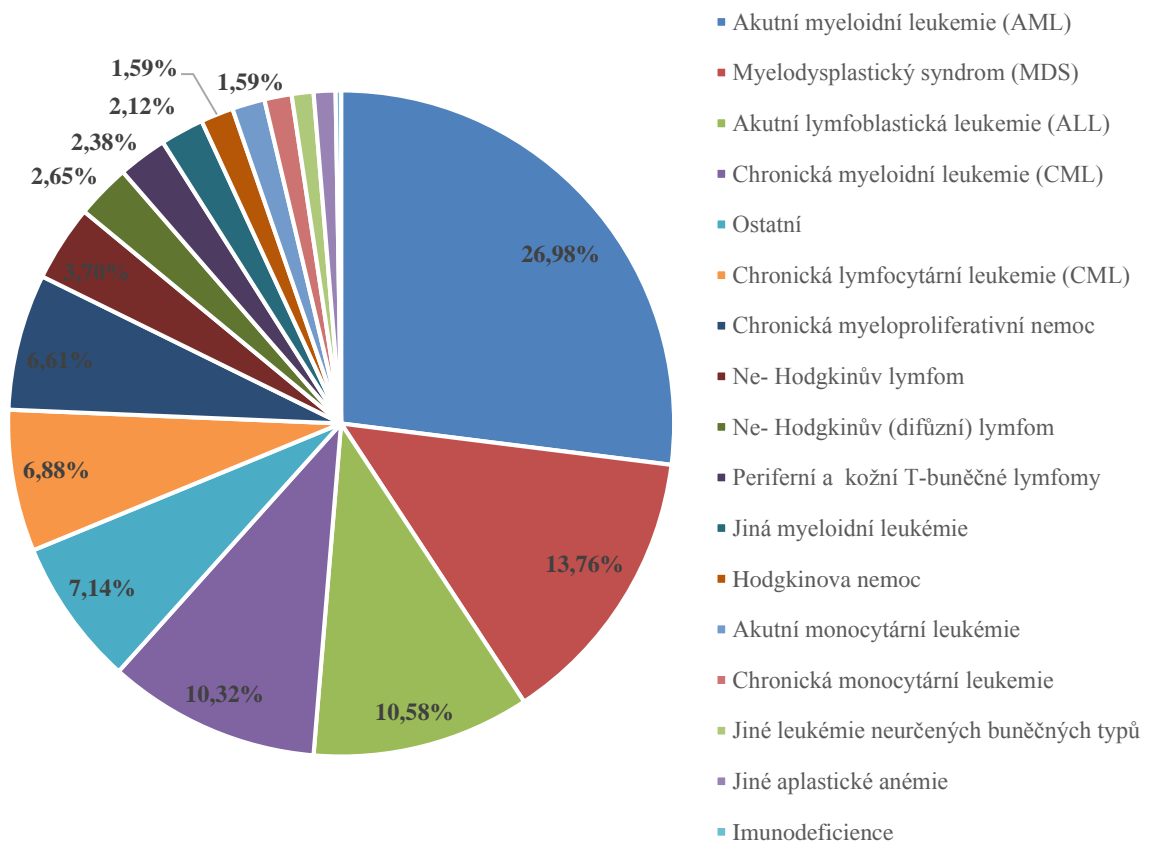
Tabulka č. 3 Indikace k HSCT

| Diagnóza   | Pacienti celkem | Děti       | Dospělí    |
|--|-----------------|------------|------------|
| Zhoubný novotvar měkká tkáň hlavy, obličeje a krku                             | 1               | 1          | 0          |
| Hodgkinova nemoc   | 7               | 1          | 6          |
| Ne- Hodgkinův folikulární lymfom   | 8               | 1          | 7          |
| Ne- Hodgkinův (difúzní) lymfom   | 13              | 3          | 10         |
| Periferní a kožní T-buněčné lymfomy  | 9               | 0          | 9          |
| Ne- Hodgkinův lymfom jiných a neurčených typů                                  | 7               | 0          | 7          |
| Mnohobuněčný myelom a plasmocytární novotvary                                  | 2               | 0          | 2          |
| Akutní lymfoblastická leukemie (ALL)   | 88              | 48         | 40         |
| Chronická lymfocytární leukemie (CLL)  | 26              | 0          | 26         |
| Lymfoidní leukémie z dospělých T buněk   | 2               | 0          | 2          |
| Akutní myeloidní leukemie (AML)  | 123             | 21         | 102        |
| Chronická myeloidní leukemie (CML)   | 46              | 7          | 39         |
| Jiná myeloidní leukémie  | 9               | 1          | 8          |
| Akutní monocytární leukémie  | 7               | 1          | 6          |
| Chronická monocytární leukemie   | 5               | 0          | 5          |
| Jiné leukémie neurčených buněčných typů  | 4               | 0          | 4          |
| Zhoubný novotvar mizní, krvetvorné a příbuzné tkáně, NS                        | 2               | 0          | 2          |
| Polycythaemia vera   | 1               | 0          | 1          |
| Myelodysplastický syndrom (MDS)  | 71              | 19         | 52         |
| Chronická myeloproliferativní nemoc  | 25              | 0          | 25         |
| Získané hemolytické anémie   | 3               | 2          | 1          |
| Jiné aplastické anémie (SAA)   | 26              | 22         | 4          |
| Jiné anémie  | 5               | 1          | 4          |
| Purpura a jiné krvácivé stavy  | 6               | 4          | 2          |
| Funkční poruchy polymorfonukleárních neutrofilů                                | 3               | 3          | 0          |
| Jiné poruchy bílých krvinek  | 4               | 2          | 2          |
| Nemoc krve a krvetvorných orgánů   | 3               | 0          | 3          |
| Některé nemoci postihující lymforetikulární tkáň a retikulohistocytární systém | 4               | 4          | 0          |
| Imunodeficiencie   | 10              | 9          | 1          |
| Ostatní  | 10              | 2          | 8          |
| <b>Celkem</b>  | <b>530</b>      | <b>152</b> | <b>378</b> |

Graf č. 1 Indikace k HSCT u dětských pacientů



Graf č. 2 Indikace k HSCT u dospělých pacientů



### 3.2 *Materiál a Metody*

Všechny použité reagensy, přístrojové vybavení a ostatní pomůcky jsou uvedeny v tabulkách č. 4 - 18 vždy pro každý metodický postup zvlášť.

#### 3.2.1 Klonování

Metody klonování jsme použili k přípravě kontrol pro vytvoření kalibračních křivek a použití absolutní kvantifikace real-time PCR. Jako templát pro vytvoření PCR produktů pro klonování byly použity vzorky pacientů, u kterých byla prokázána infekce daným genotypem. PCR reakce probíhala podle optimalizovaných podmínek (viz. kap. real-time PCR) s přidáním finální syntézy 10 minut při 72 °C.

#### Ligace

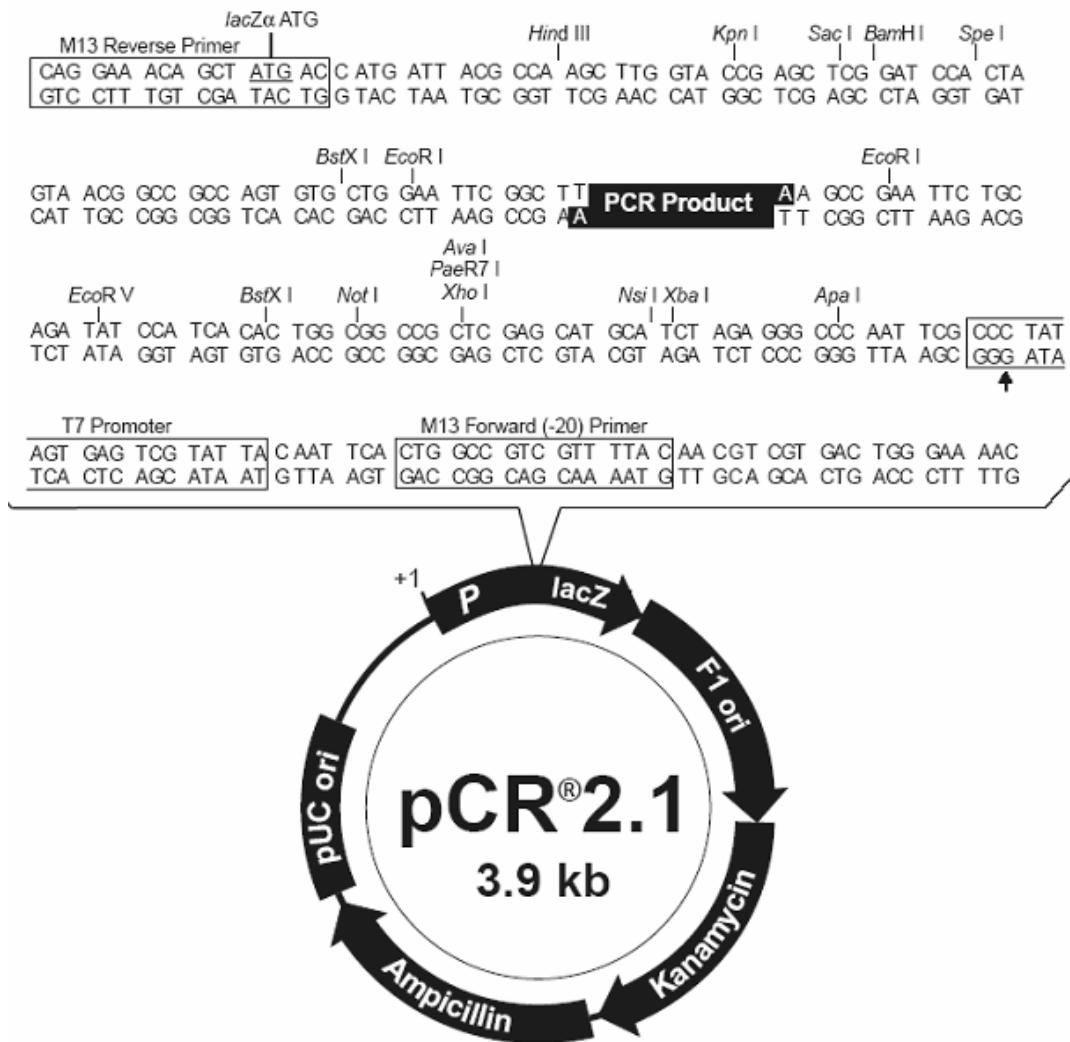
Pro klonování byl použit TA cloning kit (Invitrogen – Lifetechnologies). Ligační směs byla připravena na ledu podle doporučení výrobce do celkového objemu 10 µl viz tabulka č. 4. PCR produkty byly ligovány do vektoru pCR 2.1 znázorněného na obrázku č. 8.

Tabulka č. 4 Složení Ligační směsi

| Reagensie        | Objem |
|------------------|-------|
| H <sub>2</sub> O | 4 µl  |
| Ligační pufr 10x | 1 µl  |
| Vektor 25ng/ µl  | 2 µl  |
| T4 DNA ligáza    | 1 µl  |
| PCR produkt      | 2 µl  |

Ligační směs byla inkubována 20 minut při pokojové teplotě.

Obrázek č. 8 Mapa klonovacího vektoru pCR 2.1



Převzato z [http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcr2\\_1\\_map.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcr2_1_map.pdf) 2.8.2014  
 Mapa klonovacího vektoru pCR 2.1 s vyznačeným multiklonovacím místem v sekvenci kódující α podjednotku bakteriálního LacZ genu.

### Transformace

Před vlastní transformací byly připraveny selektivní plotny s agarem imMedia™ Growth Medium obsahujícím medium, agar, ampicillin (100 mg/ml), X-gal/IPTG (Invitrogen – Life technologies). Vždy se připravovaly 3 Petriho misky pro každou transformaci podle návodu výrobce. Byly použity směsi pro přípravu kultivačních ploten (výrobce). Obsah sáčku imMedia se rozmíchá s 200 ml H<sub>2</sub>O, přivede se v mikrovlnné troubě do krátkého varu a nalije na Petrino misky. Protože použité kompetentní buňky E.coli TOP10 (Invitroge – Life technologies) mají zeslabené stěny, pracovalo se s nimi, dle návodu výrobce, na ledu a pipetovali se ustříženou špičkou.

Ligační směs byla krátce centrifugována a zároveň se na ledu nechaly pozvolně rozmrazit kompetentní buňky (součást kitu). Do 50  $\mu$ l kompetentních buněk byly přidány 2  $\mu$ l ligační reakce, směs byla opatrně promíchána a inkubována 30 minut na ledu. Tepelný šok byl proveden při 42°C přesně 30 sekund a ihned poté bylo přidáno 250  $\mu$ l S.O.C media (Invitrogen – Life technologies) vytemperovaného na pokojovou teplotu. Buňky byly následně třepány 1 hodinu při 37 °C a 225 rpm. Na předem připravené selektivní plotny byly vyočkovány a sterilní hokejkou rozetřeny transformované buňky v objemech 200  $\mu$ l, 50  $\mu$ l a 10  $\mu$ l. Plotny se kultivovaly dnem vzhůru při 37 °C do druhého dne.

### **Selekce transformant**

Druhý den se plotny přemístili z termostatu (37 °C) do lednice a nechali se inkubovat 2-3 hodiny při 4 °C, aby se mohla plně rozvinout barva kolonií. V případě zaklonování prázdného vektoru, tedy vektoru bez PCR produktu se kolonie zbarvili modře, při zaklonování produktu pak bíle. Po jedné bílé kolonii bylo přeneseno do předem označených mikrozkmavek obsahujících přibližně 4 ml vyautoklávované tekuté půdy Terrific Broth (Invitrogen – Life technologies) s ampicilinem o koncentraci 100 mg/ml a 0,4% glycerolu a kolonie byly inkubovány přes noc při 37 °C a 250 rpm.

Zároveň byly mikrobiologické kličky, použité při přenesení kolonií, následně vytřepány v 1 ml vody a roztok byl použit pro kontrolu přítomnosti inzertu ve vektoru. Směs byla inkubována 10 minut při 95 °C a poté byly 2  $\mu$ l použity jako templát pro real-time PCR s detekcí pomocí sekvenčně specifických sond využívaných pro genotypizaci.

Použitý screening je využíván pro odlišení bakteriálních kolonií po ligaci. Bakterie nesoucí vektor s inzertem tvoří bílé kolonie a naopak bakterie nesoucí pouze prázdný inzert tvoří kolonie modré. Bakterie, které nepřijali žádný vektor, nepřežijí na kultivační plotně s obsahem ampicilinu. Tento screening je založen na principu  $\alpha$  komplementace, kdy vektor nese krátkou sekvenci laktóзовého operonu *E. Coli* kódující  $\alpha$  podjednotku LacZ genu a kompetentní bakterie *E. Coli* obsahuje zbylou část laktóзовého operonu. Ani jedna z těchto částí není schopná samostatně vytvářet funkční protein  $\beta$ - galaktosidázu. V sekvenci pro  $\alpha$  podjednotku LacZ genu (na vektoru) je vloženo multiklonovací místo, které nemění čtecí rámec, nicméně do tohoto místa se vkládá inzert. Proto jsou schopné tvořit funkční protein pouze bakterie, které přijaly

pouze vektor bez inzertu. Funkční  $\beta$ - galaktosidáza je schopna štěpit chromogenní substrát X-GAL, obsažený v plotnách, na produkt způsobující modré zbarvení kolonií.

### Izolace plazmidu

Plazmidy byly izolovány kitem QIAprep Spin Miniprep pomocí kolonek dle návodu výrobce (Qiagen). Buněčná kultura byla centrifugována 5 minut při 300 g. Po resuspendování peletu ve 250  $\mu$ l pufru P1 byla kultura přenesena do čisté mikrozkušavky, bylo přidáno 250  $\mu$ l P2 pufru a směs byla opatrně promíchána otáčením mikrozkušavky. Poté bylo přidáno 350  $\mu$ l pufru N3 a opatrně promícháno. Směs byla centrifugována 10 minut při 13 000 g. Supernatant byl přepipetován na QIAprep spin kolonku a centrifugován 45 sekund na 13 000 g. Následovalo promytí kolonky nejprve 0,5 ml PB pufru (centrifugace 45 sekund) a poté 0,75 ml PE pufru (centrifugace 45 sekund). Pro odstranění zbylé vody byla kolonka centrifugována 1 minutu. DNA byla eluována ze suché membránky 50  $\mu$ l EB pufru (10 mM Tris·Cl, pH 8.5) do čisté a označené mikrozkušavky.

### Kvantifikace plazmidu a příprava kalibračních křivek

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  $\mu$ g/ml). Čistota byla vypočítána z poměrů absorbancí při 260/280 nm.

Z naměřené koncentrace byl vypočten počet molekul v 1  $\mu$ l a dekadicky nařaděna kalibrační křivka. Pro kvantitativní real-time PCR byly používány koncentrace  $10^1$ -  $10^5$ . Naměřené koncentrace a výpočty jsou uvedeny v kapitole výsledky.

Tabulka č. 5 Přístrojové vybavení

| Přístroj                     | Výrobce            |
|------------------------------|--------------------|
| Laminární box                | Scie-Plas          |
| Vortex                       | IKA                |
| Centrifuga - Mini Spin       | Eppendorf          |
| Centrifuga - LMC 3000        | Biosan             |
| Real-Time PCR cycler - CFX96 | Bio-Rad            |
| Real-Time PCR cycler - 7500  | Applied Biosystems |
| Termostat                    |                    |
| Termoblok                    |                    |
| Spektrofotometr NanoDrop     | Thermo Scientific  |

Tabulka č. 6 Reagencie

| Reagencie  | Výrobce                        |
|--|--------------------------------|
| PCR H <sub>2</sub> O                             | B Braun                        |
| 10x pufr + MgCl <sub>2</sub> (15 mM)             | Qiagen                         |
| MgCl <sub>2</sub> (15 mM)                        | Qiagen                         |
| dNTP   | Sigma                          |
| ROX barvička (100 μM)                            | Invitrogen – Life technologies |
| Primery  | Metabio                        |
| Sondy  | Invitrogen – Life technologies |
| HotMaster polymeráza 5U/μl                       | Qiagen                         |
| Ligační pufr 10x                                 | Invitrogen – Life technologies |
| Vektor pCR 2.1                                   | Invitrogen – Life technologies |
| T4 DNA ligáza                                    | Invitrogen – Life technologies |
| imMedia™ Growth Medium                           | Invitrogen – Life technologies |
| S.O.C médium                                     | Invitrogen – Life technologies |
| Tekutá půda Terrific Broth                       | Invitrogen – Life technologies |
| Kit pro izolaci plazmidu – QIAprep Spin Miniprep | Qiagen                         |
| Kompetentní buňky E.coli TOP10                   | Invitrogen – Life technologies |

Tabulka c. 7 Pomůcky

| Pomůcky            |
|--------------------|
| Automatické pipety |
| Špičky             |
| Gumové rukavice    |
| Led                |
| Stojánky           |
| Mikrozkumavky      |
| Petriho misky      |
| Hokejky            |
| Kahan              |
| Kličky             |

### 3.2.2 Elektroforéza

Elektroforéza byla prováděna v 2% agarózovém gelu, k detekci bylo použito interkalační barvivo ethodium bromid. Pro identifikaci délky fragmentu byl používán 100 bp délkový marker. Navážka agarózy byla rozmíchána v odměřeném množství 1x TBE pufru a poté rozpuštěna v mikrovlnné troubě. Po ochlazení byl k rozvažené agaróze přidán 1 μl ethidium bromidu. Směs byla promíchána a ihned nalita do připravené formy s hřebínky, které slouží pro vytvoření příslušných jamek. Po ztuhnutí gelu byly hřebínky vyjmuty a do startovacích jamek napipetovány vzorky nebo délkový marker.



Bylo nanášeno 5  $\mu$ l délkového markeru nebo 5  $\mu$ l PCR produktu smíchaného s 1  $\mu$ l nanášecí barvičky (6x DNA Loading Dye). Elektroforéza probíhala v elektroforetické vaně 30 minut při konstantním napětí 100 V. DNA fragmenty byly identifikovány po přenesení gelu na UV-transluminátor. Pro digitalizaci byla použita kamera Kodak a software Kodak 1D verze 3.5.0.

Tabulka č. 8 Příprava agarózového gelu

| Reagencie       | Množství  |
|-----------------|-----------|
| Agaróza         | 0,5 g     |
| 1x TBE          | 25 ml     |
| Ethidium bromid | 1 $\mu$ l |

Tabulka č. 9 Přístrojové vybavení

| Přístroj                   | Výrobce                        |
|----------------------------|--------------------------------|
| Předvážka – EK – 120A      | A&D                            |
| Mikrovlnná trouba          | Whirpool                       |
| Elektroforéza              | Scie – Plas                    |
| Zdroj napětí – E835        | Consort                        |
| Transluminátor – TFX – 20M | Invitrogen – Life technologies |
| Kamera                     | Kodak                          |
| PC software                | Kodak 1D verze 3.5.0           |

Tabulka č. 10 Reagencie

| Reagencie                        | Výrobce           |
|----------------------------------|-------------------|
| Agaróza                          | Serva             |
| 1x TBE pufr                      | Lékárna FN Motol  |
| Ethidium bromid                  | Promega           |
| 6x DNA Loading Dye               | Thermo Scientific |
| 100 bp Ladder (60,8 ng/ $\mu$ l) | Thermo Scientific |

Tabulka č. 11 Pomůcky

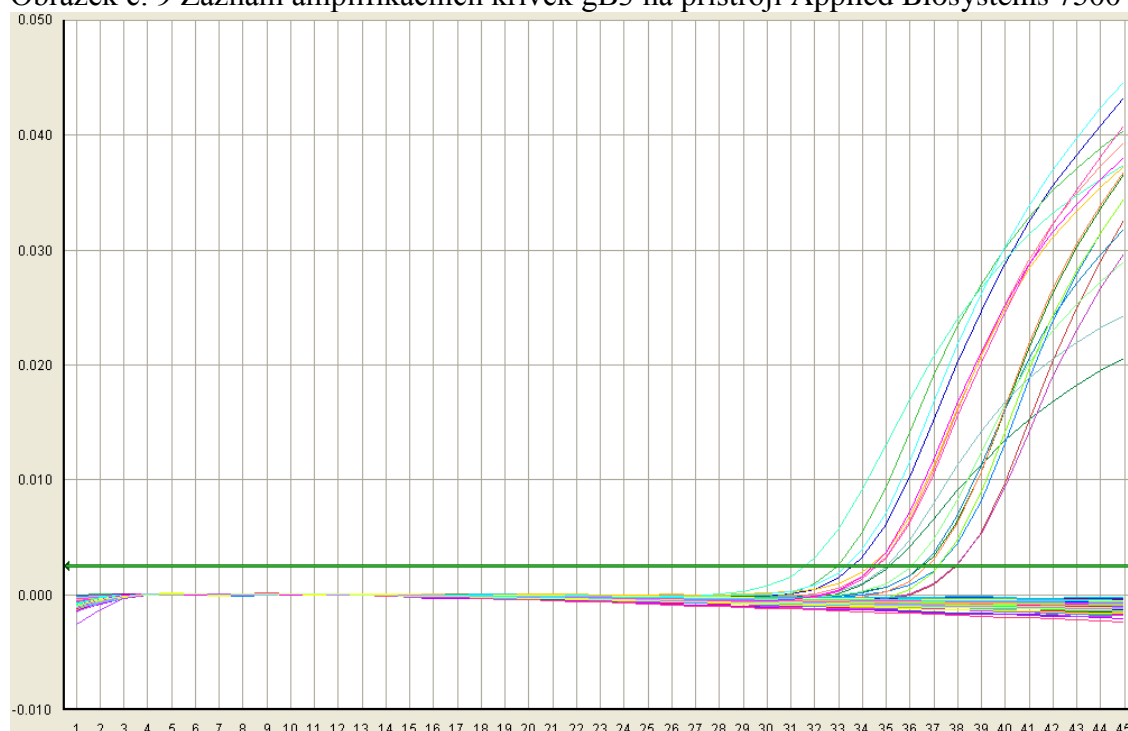
| Pomůcky             |
|---------------------|
| Erlenmeyerova baňka |
| Odměrný válec 50 ml |
| Lžička              |
| Gumové rukavice     |
| Automatické pipety  |
| Špičky 10 $\mu$ l   |

### 3.2.3 Real-Time PCR

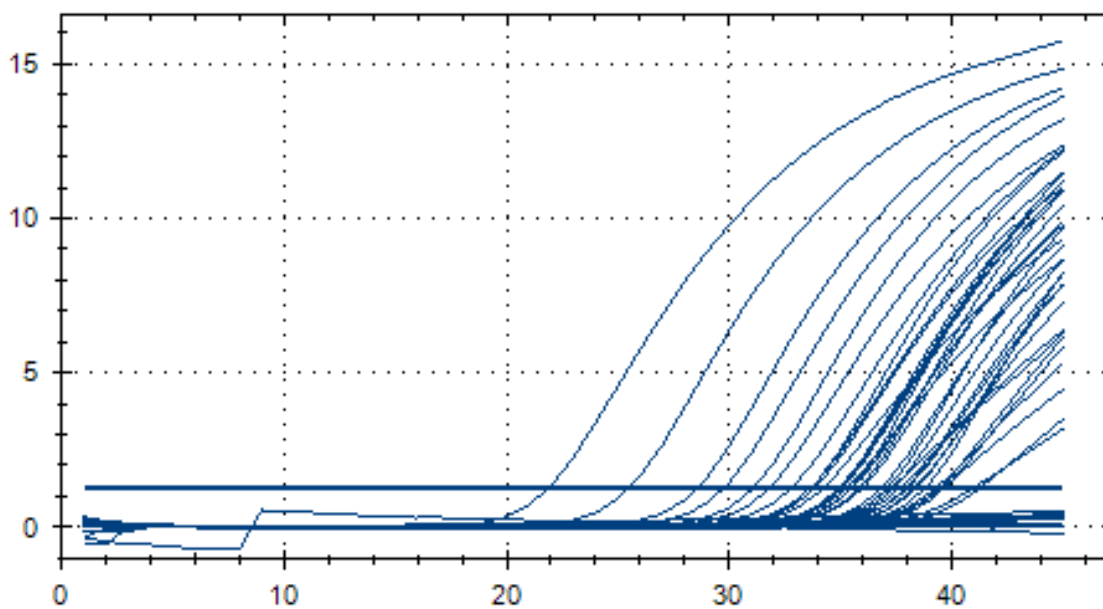
PCR v reálném čase je modifikace klasické PCR reakce, kde dochází ke kontinuálnímu sledování přírůstku DNA v každém cyklu. Nově syntetizovaná DNA může být detekována buď nespecificky pomocí interkalačních fluorescenčních barviv, jako je například SYBR Green, který se váže do malého žlábků ds DNA nebo pomocí fluorescenčně značených sekvenčně specifických sond, které hybridizují k ss DNA. V případě specifických sond dochází k uvolňování fluorescenčního signálu různými způsoby, v závislosti na typu sondy. Emise fluorescenčního záření je zachycena detektorem. Práh detekce neboli detekční limit je označován jako detekovatelné množství, když je zachycený fluorescenční signál dostatečně silný a protne základní linii (threshold). Threshold cycle ( $C_T$ ) je označován jako místo, kde amplifikační křivka protнула základní linii, jedná se o číslo cyklu, ve kterém byl překročen detekční limit. Real-time PCR lze využít také pro kvantitativní detekci a to buď relativní nebo absolutní. Při relativní kvantifikaci se porovnává  $C_T$  cílového genu s  $C_T$  referenčního genu (tzv. housekeeping genu) jehož exprese by měla být konstantní. Pro absolutní kvantifikaci je nutná příprava kalibrační křivky ze standardů o známé koncentraci a lze jí určit výchozí počet molekul DNA templátu.

Pro retrospektivní studii byly vybrány dva kandidátní geny – gen UL 55 (pro gB) a gen UL 75 (pro gH). Nejprve byly použity sekvenčně specifické primery a fluorescenčně značené sondy typu minor-groove-binder (MGB) publikované v článku Görzer *et al.* 2008. Podmínky PCR bylo nutné optimalizovat pro použití v naší laboratoři. Postupně jsme upravovali reakční podmínky tak, abychom dosáhli dostatečné specificity PCR reakce. Byla testována teplota nasedání primerů, koncentrace hořčnatých iontů a glycerolu v reakci atd. Po otestování vzorků jsme však zjistili zkříženou reaktivitu mezi genotypy gB1 a gB4, proto jsme se rozhodli všechny vzorky obsahující gB1 a gB4 přetestovat. Pro tyto dva genotypy jsme se pokusili navrhnout vlastní primery s ponecháním specifických sond. Primery byly navrženy pomocí softwarů Standard Nucleotide BLAST a Primer3Plus. Nepodařilo se nám dostatečně optimalizovat reakční podmínky pro gen gB1 a proto jsme dále použili podmínky (primery a sondy) publikované v článku Vries *et al.* 2011. Optimalizované reakční podmínky a složení master mixu pro všechny genotypy jsou uvedeny níže v tabulkách č. 17, 18 a 19, použité primery a sondy pak v tabulkách č. 14 a 15. Na obrázcích č. 9 a 10 jsou ukázány příklady amplifikačních křivek.

Obrázek č. 9 Záznam amplifikačních křivek gB3 na přístroji Applied Biosystems 7500



Obrázek č. 10 Záznam amplifikačních křivek gB1 na přístroji Bio-Rad CFX96



**Příprava dNTP mixu**

Z komerčně dodávaných zásobních roztoků jednotlivých dNTP o koncentraci 100 mM byl připraven pracovní dNTP mix ředěním uvedeném v tabulce č. 12.

Tabulka č. 12 Příprava primer mixu

| Reagencie                        | Objem ( $\mu$ l) |
|----------------------------------|------------------|
| dATP                             | 200 $\mu$ l      |
| dTTP                             | 200 $\mu$ l      |
| dCTP                             | 200 $\mu$ l      |
| dGTP                             | 200 $\mu$ l      |
| PCR H <sub>2</sub> O             | 3, 2 ml          |
| Výsledná koncentrace každého DTP | 5 mM             |

**Příprava primer mixu**

Komerčně dodané primery byly nejprve rozpuštěny v přesném objemu PCR H<sub>2</sub>O do koncentrace 100 mM podle pokynů výrobce. Z těchto zásobních roztoků byly připravovány primer mixy do koncentrace 20  $\mu$ M ředěním uvedeném v tabulce č. 13. Seznam použitých primerů je uveden v tabulce č. 14.

Tabulka č. 13 Příprava primer mixu

| Reagencie                            | Objem ( $\mu$ l) |
|--------------------------------------|------------------|
| Primer FORWARD                       | 90 $\mu$ l       |
| Primer REVERSE                       | 90 $\mu$ l       |
| PCR H <sub>2</sub> O                 | 270 $\mu$ l      |
| Výsledná koncentrace každého primeru | 20 $\mu$ M       |

Tabulka č. 14 Použité primery

| Gen   | Označení | Sekvence                                 |
|-------|----------|--|
| UL 55 | gB 1 F   | 5' - TCA CCA TTC CTC TCR TAC GAC - 3'    |
|       | gB 1 R   | 5' - CAC CAT GGC TGA CCG TTT GG - 3'     |
|       | gB 2 F   | 5' - TGT TCT GGC AAG GCA TCA - 3'        |
|       | gB 2 R   | 5' - AAC TGC AGC TGG GCG TA - 3'         |
|       | gB 3 F   | 5' - TTC TGG CAA GGT ATC AAG CA - 3'     |
|       | gB 3 R   | 5' - TGA ACT GCA GCT GAG CGT A - 3'      |
|       | gB 4 F   | 5' - TCG TGC AAC TTC TAC TCA TAA TG - 3' |
|       | gB 4 R   | 5' - CGT TAC GCG TTG AGA GGA GAT - 3'    |
| UL 75 | gH 1 F   | 5' - CAG CAG CTG AAG GCA CAA G - 3'      |
|       | gH 1 R   | 5' - CGA TCC CTT CCA GTC GTG T - 3'      |
|       | gH 2 F   | 5' - TGA CCG AAA CCC TGG AAA G - 3'      |
|       | gH 2 R   | 5' - GGG CTG TTC ACC TAG GCT GT - 3'     |

## Sondy

Zásobní roztoky sond o koncentraci 100 mM byly naředěny na pracovní koncentraci 10 mM. Pro genotypy gB2 a 3 a gH1 a 2 byly použity fluorescenčně značené minor-groove-binder (MGB) sondy pro genotypy gB1 a gB4 byly použity fluorescenčně značené sondy typu TaqMan. Jednotlivé použité sondy, fluorescenční barviva a jejich excitační a emisní vlnové délky jsou uvedeny v tabulkách č. 15 a 16.

Tabulka č. 15 Použité sondy

| Gen   | Označení | Sekvence   |
|-------|----------|--|
| UL 55 | gB1      | 5'- FAM - TCT GCT GCT CAY TCT CGA TCC GGT TC - BHQ - 1- 3'       |
|       | gB2      | 5'- VIC- TAT TGT CAC TCG TAC TTC TT - MGB - 3'                   |
|       | gB3      | 5'- FAM - TCG TAT TGC CCG TAC T - MGB - 3'                       |
|       | gB4 A    | 5'- IRD 700 - AAA CCA TAC TTC TCA TAC GAC GTC TGC TC - BHQ 2- 3' |
|       | gB4 B    | 5'- IRD 700 - AAG CCA TAT TTC TCG TAC AAC GTC TGC TC - BHQ 2- 3' |
| UL 75 | gH1      | 5'- FAM - CTG GGT CAG CAG CC - MGB - 3'                          |
|       | gH2      | 5'- VIC - CAC TTA CGC HCT GGT - MGB - 3'                         |

Tabulka č. 16 Přehled použitých fluorescenčních barviv

| Sonda | Fluorochrom | Vlnová délka - Excitace | Vlnová délka - Emise |
|-------|-------------|-------------------------|----------------------|
| gB1   | FAM         | 492 nm                  | 517 nm               |
| gB2   | VIC         | 538 nm                  | 554 nm               |
| gB3   | FAM         | 492 nm                  | 517 nm               |
| gB4 A | IRD 700     | 685 nm                  | 705 nm               |
| gB4 B | IRD 700     | 685 nm                  | 705 nm               |
| gH1   | FAM         | 492 nm                  | 517 nm               |
| gH2   | VIC         | 538 nm                  | 554 nm               |

## Postup real-time PCR

K přípravě master mixu byl používán kit HotStarTaq DNA polymerase od firmy Qiagen, dNTP mix, primer mix a sondy. Celkový objem jedné reakce byl 15 µl. Všechny reagentie byly před použitím řádně promíchány a centrifugovány. Master mix byl většinou připravován pro 100 reakcí, pokud nebyl spotřebován, byl zamražen a skladován při -20 °C. Do předem připravených a označených mikrozkušavek byly postupně napipetovány všechny složky, HotStart Taq polymeráza byla přidávána jako poslední. Složení master mixů je uvedeno v tabulkách č. 18 a 19. Master mix byl rozpipetován po 13 µl do mikrotitrační destičky (96 jamek) a poté byly přidány 2 µl templátové DNA.

Jako negativní kontrola byl používán master mix bez templátové DNA s 2 µl PCR H<sub>2</sub>O. Mikrotitrační destička byla jemně promíchána a centrifugována. Analýza běžela za optimalizovaných reakčních podmínek uvedených v tabulce č. 17 na přístrojích Applied Biosystems 7500 a Bio-Rad CFX96. Pro vyhodnocení výsledků byly použity softwary 7500 systém SDS software verze 1.4 a Bio-Rad CFX Manager verze 1.6.

Tabulka č. 17 Reakční podmínky

| Počet cyklů | Kroky                | Teplota (°C) | Čas (min) |
|-------------|----------------------|--------------|-----------|
| 1 x         | Počáteční denaturace | 95 °C        | 15: 00    |
| 45 x        | Denaturace           | 94 °C        | 0: 15     |
|             | Nasedání primerů     | 55 °C        | 0: 30     |
|             | Syntéza řetězce      | 72 °C        | 0: 35     |
| 1 x         | Konečná teplota      | 4 °C         | forever   |

Tabulka č. 18 Složení master mixů pro genotypy gB1,2,3 a gH1 a 2

| Reagencie                            | Objem (µl) | Výsledná koncentrace |
|--------------------------------------|------------|----------------------|
| PCR H <sub>2</sub> O                 | 8,815      |                      |
| 10x pufr + MgCl <sub>2</sub> (15 mM) | 1,5        | 1x                   |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM)            | 1,5        | 4,0 mM               |
| dNTP mix (5 mM)                      | 0,3        | 100 µM každý dNTP    |
| ROX barvička (100 µM)                | 0,15       | 1,0 µM               |
| Primery (R+F)                        | 0,375      | 500 nM každý         |
| Sonda                                | 0,3        | 200 nM               |
| HotMaster polymeráza<br>5U/µl        | 0,06       |                      |

Tabulka č. 19 Složení master mixu pro genotyp gB 4

| Reagencie                            | Objem (µl) | Výsledná koncentrace |
|--------------------------------------|------------|----------------------|
| PCR H <sub>2</sub> O                 | 8,515      |                      |
| 10x pufr + MgCl <sub>2</sub> (15 mM) | 1,5        | 1x                   |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM)            | 1,5        | 4,0 mM               |
| dNTP mix                             | 0,3        | 100 µM každý dNTP    |
| ROX barvička (100 µM)                | 0,15       | 1,0 µM               |
| Primery (R+F)                        | 0,375      | 500 nM každý         |
| Sonda A                              | 0,3        | 200 nM               |
| Sonda B                              | 0,3        | 200 nM               |
| HotMaster polymeráza<br>5U/µl        | 0,06       |                      |

Tabulka č. 20 Přístrojové vybavení

| Přístroj                             | Výrobce            |
|--------------------------------------|--------------------|
| Laminární box                        | Scie-Plas          |
| Vortex                               | IKA                |
| Centrifuga - Mini Spin               | Eppendorf          |
| Centrifuga - LMC 3000                | Biosan             |
| Real-Time PCR cycler - CFX96         | Bio-Rad            |
| Real-Time PCR cycler - 7500          | Applied Biosystems |
| PC software - CFX Manager verze 1.6. | Bio-Rad            |
| PC software - SDS software verze 1.4 | Applied Biosystems |

Tabulka č. 21 Reagencie

| Reagencie                            | Výrobce                        |
|--------------------------------------|--------------------------------|
| PCR H <sub>2</sub> O                 | B Braun                        |
| 10x pufr + MgCl <sub>2</sub> (15 mM) | Qiagen                         |
| MgCl <sub>2</sub> (15 mM)            | Qiagen                         |
| dNTP                                 | Sigma                          |
| ROX barvička (100 µM)                | Invitrogen – Life technologies |
| Primery                              | Metabio                        |
| Sondy                                | Invitrogen – Life technologies |
| HotMaster polymeráza 5U/µl           | Qiagen                         |

Tabulka č. 22 Pomůcky

| Pomůcky                         |
|---------------------------------|
| Automatické pipety              |
| Špičky                          |
| Mikrozkumavky Eppendorf         |
| Mikrozkumavky 0,2 µl            |
| Mikrotitrační destičky 96 jamek |
| Termofolie                      |
| Stojánky                        |

### 3.2.4 Statistické vyhodnocení

Získané výsledky měření byly statisticky hodnoceny spolu se základními klinickými daty pacientů. Pacienti podepsali informovaný souhlas s uchováváním jejich vzorků a pozdějším zpracováním pro klinické studie. Frekvence jednotlivých genotypů byly porovnávány zvláště u dětských a dospělých pacientů. Statistická analýza byla provedena v programu Microsoft Excel 2013 a R3.0.3.

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Příprava kalibračních křivek

Jako templátová DNA pro přípravu PCR produktů pro TA klonování byly použity pozitivní vzorky pacientů s prokázanou infekcí daným genotypem. Po ověření úspěšnosti klonování byly izolovány plazmidy nesoucí požadovaný inzert. Výsledky měření koncentrace a čistoty izolovaných plazmidů jsou uvedeny v tabulce č. 23. Pro výpočet čistoty DNA byl použit poměr absorbancí 260/280 nm, jehož hodnota by se u čistých vzorků měla nacházet v rozmezí 1,8 – 2,0. Všechny izolované DNA byly dostatečně čisté, a proto mohly být použity pro ředění kalibračních křivek bez dalších purifikačních kroků.

Tabulka č. 23 Výsledky měření izolovaných plazmidů

| Genotyp | Naměřená koncentrace (ng/μl) | Poměr absorbancí 260/280 nm | Počet molekul v 1 μl  |
|---------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| gB 1    | 292,4                        | 1,84                        | $6,772 \cdot 10^{10}$ |
| gB 2    | 291,8                        | 1,84                        | $6,759 \cdot 10^{10}$ |
| gB 3    | 272,4                        | 1,83                        | $6,309 \cdot 10^{10}$ |
| gB 4    | 239,4                        | 1,84                        | $5,545 \cdot 10^{10}$ |
| gH 1    | 214,0                        | 1,84                        | $4,957 \cdot 10^{10}$ |
| gH 2    | 239,1                        | 1,85                        | $5,538 \cdot 10^{10}$ |

Pomocí vzorce uvedeného níže byl stanoven počet molekul DNA v 1 μl vzorku. Váha jedné molekuly plazmidu je  $4,318 \cdot 10^{-18}$ .

Počet molekul v μl gB1 = naměřená koncentrace (g/μl)/ váha jedné molekuly plazmidu

Počet molekul v μl gB1 =  $(292,4 \cdot 10^{-9}) / 4,318 \cdot 10^{-18}$

Počet molekul v μl gB1 =  $6,772 \cdot 10^{10}$

Všechny vzorky byly nejprve naředěny na koncentraci  $1 \cdot 10^{10}/\mu\text{l}$  a poté ředěny dekadickou řadou až na koncentraci  $1 \cdot 10^1/\mu\text{l}$ . Postupy ředění jsou uvedeny v tabulce č. 24.



Tabulka č. 24 Ředění kalibračních křivek

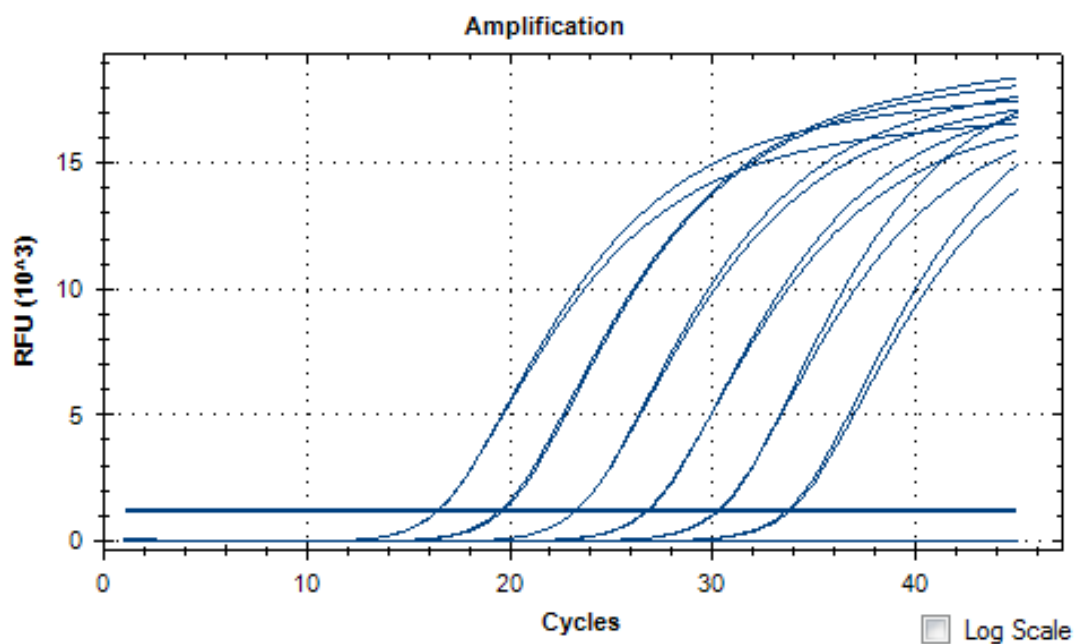
| Genotyp | Koncentrovaný plazmidu (μl) | H <sub>2</sub> O (μl) | Výsledná koncentrace    |
|---------|-----------------------------|-----------------------|-------------------------|
| gB 1    | 1,48                        | 8,52                  | 1. 10 <sup>10</sup> /μl |
| gB 2    | 1,48                        | 8,52                  | 1. 10 <sup>10</sup> /μl |
| gB 3    | 1,59                        | 8,41                  | 1. 10 <sup>10</sup> /μl |
| gB 4    | 1,83                        | 8,17                  | 1. 10 <sup>10</sup> /μl |
| gH 1    | 2,02                        | 8,98                  | 1. 10 <sup>10</sup> /μl |
| gH 2    | 1,81                        | 8,19                  | 1. 10 <sup>10</sup> /μl |

Úspěšnost ředění kalibračních křivek byla ověřena pomocí real-time PCR, analýza byla provedena v dubletu pro každou koncentraci. Pro sestavení kalibračních křivek byly použity koncentrace 10<sup>1</sup> – 10<sup>5</sup>. Korelační koeficienty, hodnoty efektivity a sklonu pro každou kalibrační křivku jsou uvedeny v tabulce č. 25. Příklad záznamu a amplifikačních křivek pro jednu kalibrační křivku jsou znázorněny na obrázcích č. 11 a 12. Spodní mez spolehlivosti esejí pak byla definována posledním bodem kalibrační křivky, tedy 10 kopiemi/μl.

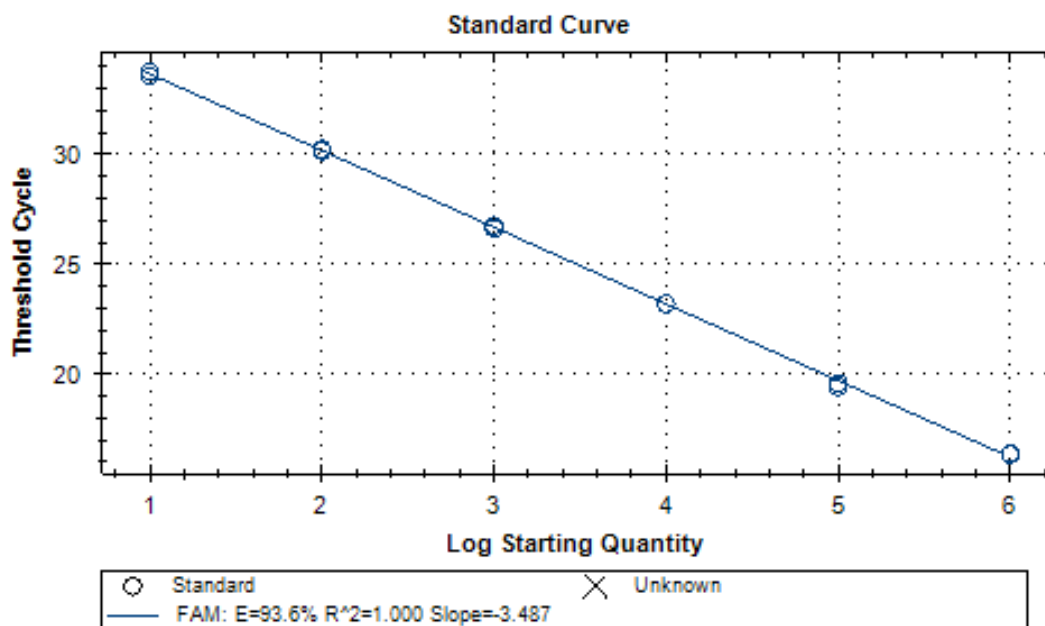
Tabulka č. 25 Specifikace kalibračních křivek

| Genotyp | Korelační koeficient R <sup>2</sup> (%) | Efektivita (%) | Sklon |
|---------|---|----------------|-------|
| gB 1    | 99,8 %                                  | 98,4 %         | 3,361 |
| gB 2    | 99,8 %                                  | 90,0 %         | 3,587 |
| gB 3    | 99,9 %                                  | 92,5 %         | 3,515 |
| gB 4    | 99,7 %                                  | 88,3 %         | 3,637 |
| gH 1    | 100 %                                   | 93,6 %         | 3,487 |
| gH 2    | 99,8 %                                  | 95,2 %         | 3,443 |

Obrázek č. 11 Amplifikační křivky- kalibrační křivka gH 1



Obrázek č. 12 Záznam kalibrační křivky gH 1



## 4.2 Genotypizace

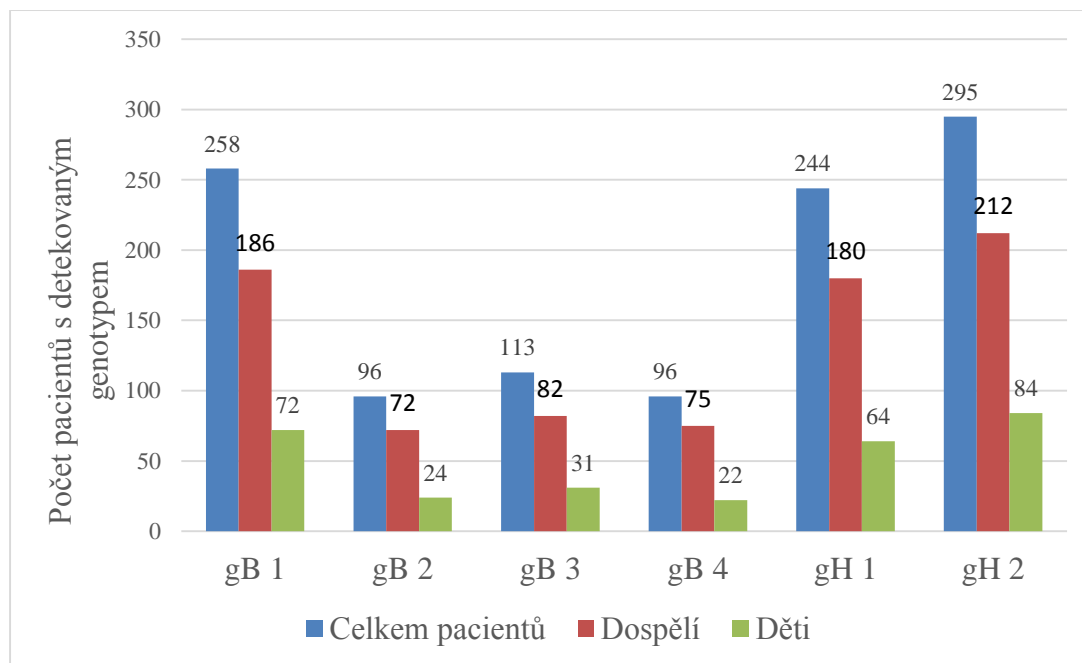
Protože je soubor testovaných vzorků velmi obsáhlý, není zde uvedena podrobná tabulka se všemi údaji.

Z glykoproteinu B byl celkově nejčastěji detekovaným genotypem gB1, který jsme prokázali u 258 pacientů (45,7 %), následoval gB3 prokázaný u 113 pacientů (20,1 %), nejméně častými byly gB4 a gB2, které byly shodně detekovány každý u 96 (17,1 %) pacientů. Z glykoproteinu H byl častěji detekovaný genotyp gH2, který byl prokázán u 295 pacientů (54,7 %), genotyp gH1 byl prokázán u 244 pacientů (45,3 %). Stejná tendence výskytu gB a gH byla zaznamenána jak ve vzorcích dětských tak i dospělých pacientů. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 26 a grafu č. 3

Tabulka č. 26 Zastoupení jednotlivých genotypů gB a gH

| Genotyp   | Celkem pacientů |       | Dospělí |       | Děti |       |
|-----------|-----------------|-------|---------|-------|------|-------|
| gB 1      | 258             | 45,7% | 186     | 44,8% | 72   | 48,3% |
| gB 2      | 96              | 17,1% | 72      | 17,3% | 24   | 16,1% |
| gB 3      | 113             | 20,1% | 82      | 19,8% | 31   | 20,8% |
| gB 4      | 96              | 17,1% | 75      | 18,1% | 22   | 14,8% |
| gH 1      | 244             | 45,3% | 180     | 45,9% | 64   | 43,2% |
| gH 2      | 295             | 54,7% | 212     | 54,1% | 84   | 56,8% |
| Celkem gB | 563             |       | 415     |       | 149  |       |
| Celkem gH | 539             |       | 392     |       | 148  |       |

Graf č. 3 Zastoupení jednotlivých genotypů gB a gH- počet pacientů

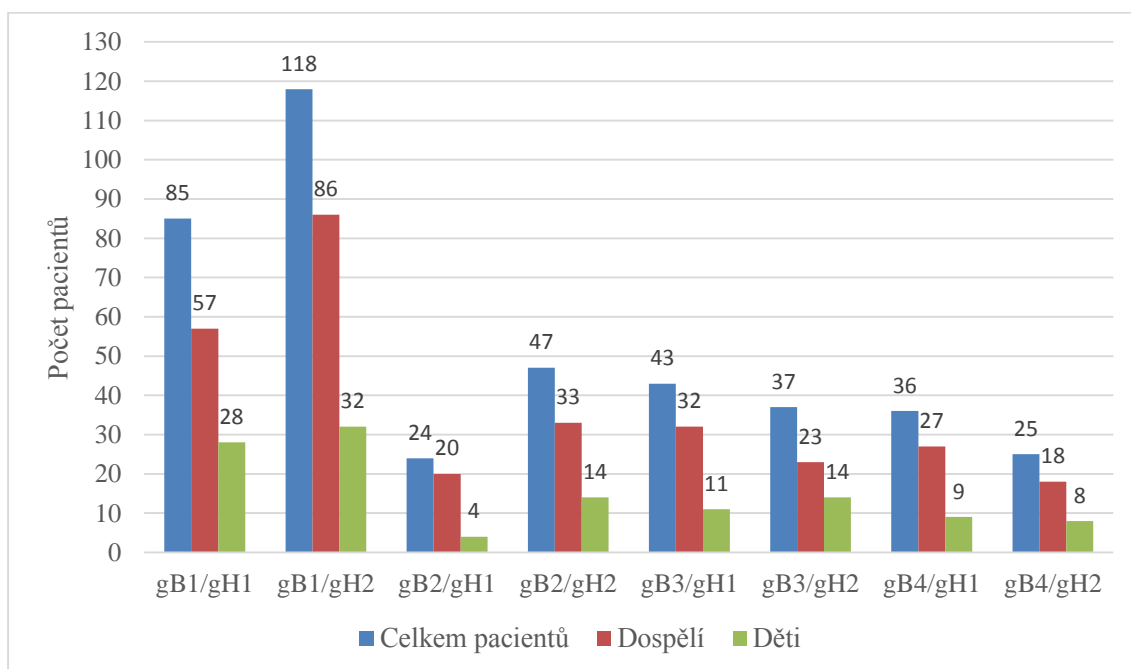


Mezi infekcemi způsobenými jedním genotypem CMV byl nejčastěji detekovaná kombinací genotypů gB1/gH2, který jsme prokázali ve 390 vzorcích od 86 (29,1 %) dospělých a 32 (26,7 %) dětských pacientů. Nejméně častou kombinací genotypů u dospělých pacientů pak byl gB4/gH2 detekovaný u 18 (6,1 %) pacientů a pro dětské pacienty gB2/gH1, který byl prokázán celkem u 4 (3,3 %) pacientů. Frekvence jednotlivých kombinací genotypů, které byly detekovány, jsou přehledně uvedeny v tabulce č. 27 a grafu č. 4

Tabulka č. 27 Četnost kombinací genotypů u infekcí způsobených jedním genotypem

| Genotyp       | Počet vzorků |               | Celkem pacientů |               | Dospělí    |               | Děti       |               |
|---------------|--------------|---------------|-----------------|---------------|------------|---------------|------------|---------------|
|               | absolutní    | relativní (%) | absolutní       | relativní (%) | absolutní  | relativní (%) | absolutní  | relativní (%) |
| gB1/gH1       | 296          | 22,0%         | 85              | 20,5%         | 57         | 19,3%         | 28         | 23,3%         |
| gB1/gH2       | 390          | 29,0%         | 118             | 28,4%         | 86         | 29,1%         | 32         | 26,7%         |
| gB2/gH1       | 66           | 4,9%          | 24              | 5,8%          | 20         | 6,8%          | 4          | 3,3%          |
| gB2/gH2       | 129          | 9,6%          | 47              | 11,3%         | 33         | 11,1%         | 14         | 11,7%         |
| gB3/gH1       | 173          | 12,9%         | 43              | 10,4%         | 32         | 10,8%         | 11         | 9,2%          |
| gB3/gH2       | 121          | 9,0%          | 37              | 8,9%          | 23         | 7,8%          | 14         | 11,7%         |
| gB4/gH1       | 93           | 6,9%          | 36              | 8,7%          | 27         | 9,1%          | 9          | 7,5%          |
| gB4/gH2       | 75           | 5,6%          | 25              | 6,0%          | 18         | 6,1%          | 8          | 6,7%          |
| <b>Celkem</b> | <b>1343</b>  | <b>100,0%</b> | <b>415</b>      | <b>100,0%</b> | <b>296</b> | <b>100,0%</b> | <b>120</b> | <b>100,0%</b> |

Graf č. 4 Četnost kombinací genotypů u infekcí způsobených jedním genotypem

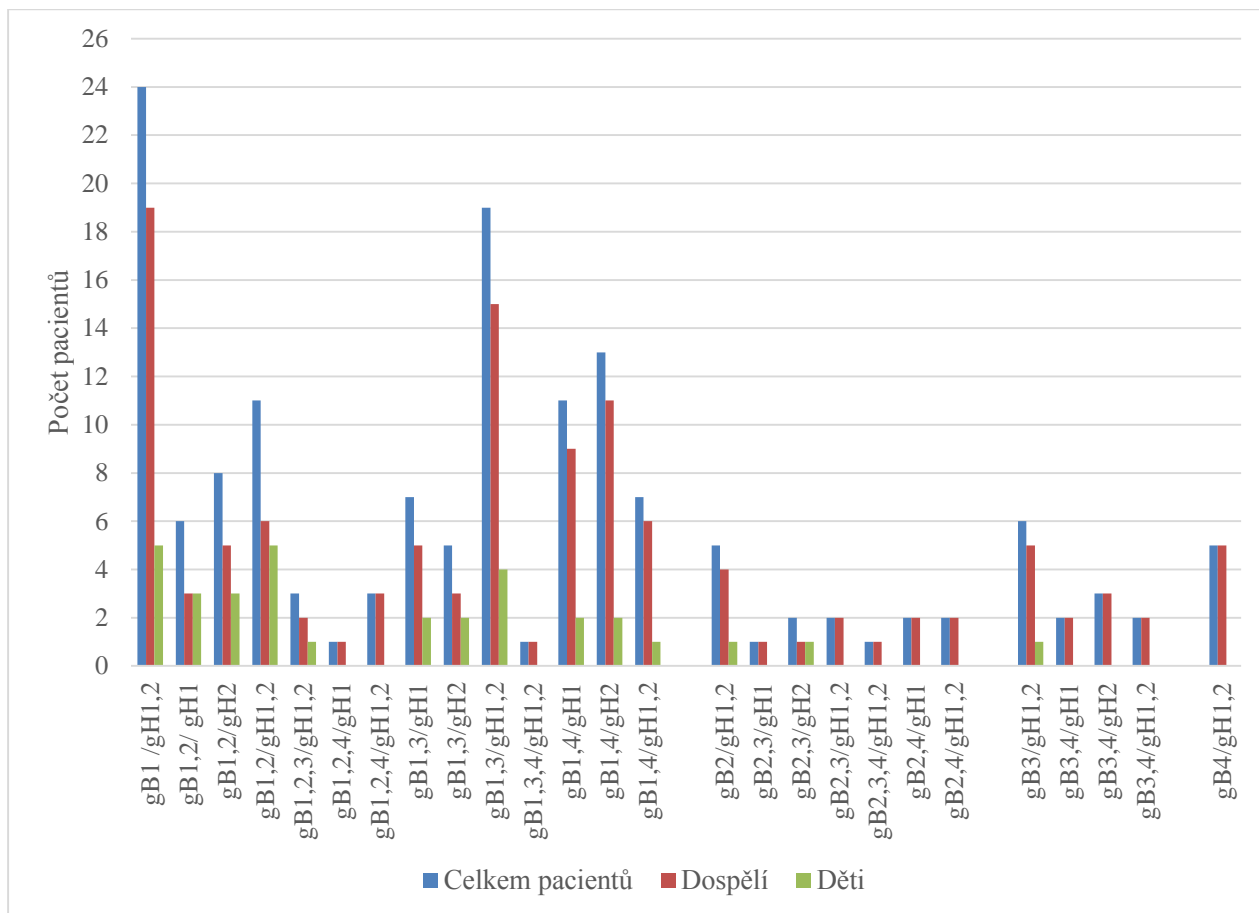


U infekcí způsobených dvěma a více genotypy CMV byl nejčastěji detekovanou kombinací genotypů u dospělých pacientů gB1/gH1,2, který byl prokázán u 19 (16,0 %) pacientů. Nejčtenější kombinace genotypů u dětských pacientů pak byly gB1/gH1,2 a gB1,2/gH1,2, které byly shodně nalezeny u 5 (15,2 %) dětských pacientů. Zatímco u dětských pacientů bylo prokázáno 14 různých kombinací genotypů, u dospělých pacientů byla zjištěna větší diverzita kombinací genotypů, celkem u nich bylo detekováno 25 různých kombinací. U 8 dospělých (9,2 %) a pouze 1 dětského pacienta jsme detekovali infekci třemi genotypy. Infekce 4 genotypy nebyla prokázána. Jednotlivé četnosti jsou přehledně uvedeny v tabulce č. 28 a grafu č. 5.

Tabulka č. 28 Četnost kombinací genotypů u smíšených infekcí

| Genotyp       | Počet vzorků |        | Celkem pacientů |        | Dospělí |        | Děti |        |
|---------------|--------------|--------|-----------------|--------|---------|--------|------|--------|
| gB1 /gH1,2    | 45           | 17,6%  | 24              | 15,8%  | 19      | 16,0%  | 5    | 15,2%  |
| gB1,2/ gH1    | 6            | 2,3%   | 6               | 3,9%   | 3       | 2,5%   | 3    | 9,1%   |
| gB1,2/gH2     | 19           | 7,4%   | 8               | 5,3%   | 5       | 4,2%   | 3    | 9,1%   |
| gB1,2/gH1,2   | 16           | 6,3%   | 11              | 7,2%   | 6       | 5,0%   | 5    | 15,2%  |
| gB1,2,3/gH1,2 | 3            | 1,2%   | 3               | 2,0%   | 2       | 1,7%   | 1    | 3,0%   |
| gB1,2,4/gH1   | 1            | 0,4%   | 1               | 0,7%   | 1       | 0,8%   | 0    | 0,0%   |
| gB1,2,4/gH1,2 | 4            | 1,6%   | 3               | 2,0%   | 3       | 2,5%   | 0    | 0,0%   |
| gB1,3/gH1     | 9            | 3,5%   | 7               | 4,6%   | 5       | 4,2%   | 2    | 6,1%   |
| gB1,3/gH2     | 5            | 2,0%   | 5               | 3,3%   | 3       | 2,5%   | 2    | 6,1%   |
| gB1,3/gH1,2   | 44           | 17,2%  | 19              | 12,5%  | 15      | 12,6%  | 4    | 12,1%  |
| gB1,3,4/gH1,2 | 2            | 0,8%   | 1               | 0,7%   | 1       | 0,8%   | 0    | 0,0%   |
| gB1,4/gH1     | 14           | 5,5%   | 11              | 7,2%   | 9       | 7,6%   | 2    | 6,1%   |
| gB1,4/gH2     | 19           | 7,4%   | 13              | 8,6%   | 11      | 9,2%   | 2    | 6,1%   |
| gB1,4/gH1,2   | 20           | 7,8%   | 7               | 4,6%   | 6       | 5,0%   | 1    | 3,0%   |
|               |              |        |                 |        |         |        |      |        |
| gB2/gH1,2     | 14           | 5,5%   | 5               | 3,3%   | 4       | 3,4%   | 1    | 3,0%   |
| gB2,3/gH1     | 1            | 0,4%   | 1               | 0,7%   | 1       | 0,8%   | 0    | 0,0%   |
| gB2,3/gH2     | 3            | 1,2%   | 2               | 1,3%   | 1       | 0,8%   | 1    | 3,0%   |
| gB2,3/gH1,2   | 2            | 0,8%   | 2               | 1,3%   | 2       | 1,7%   | 0    | 0,0%   |
| gB2,3,4/gH1,2 | 1            | 0,4%   | 1               | 0,7%   | 1       | 0,8%   | 0    | 0,0%   |
| gB2,4/gH1     | 2            | 0,8%   | 2               | 1,3%   | 2       | 1,7%   | 0    | 0,0%   |
| gB2,4/gH1,2   | 4            | 1,6%   | 2               | 1,3%   | 2       | 1,7%   | 0    | 0,0%   |
|               |              |        |                 |        |         |        |      |        |
| gB3/gH1,2     | 9            | 3,5%   | 6               | 3,9%   | 5       | 4,2%   | 1    | 3,0%   |
| gB3,4/gH1     | 3            | 1,2%   | 2               | 1,3%   | 2       | 1,7%   | 0    | 0,0%   |
| gB3,4/gH2     | 3            | 1,2%   | 3               | 2,0%   | 3       | 2,5%   | 0    | 0,0%   |
| gB3,4/gH1,2   | 2            | 0,8%   | 2               | 1,3%   | 2       | 1,7%   | 0    | 0,0%   |
|               |              |        |                 |        |         |        |      |        |
| gB4/gH1,2     | 5            | 2,0%   | 5               | 3,3%   | 5       | 4,2%   | 0    | 0,0%   |
| Celkem        | 256          | 100,0% | 152             | 100,0% | 119     | 100,0% | 33   | 100,0% |

Graf č. 5 Četnost kombinací genotypů u smíšených infekcí

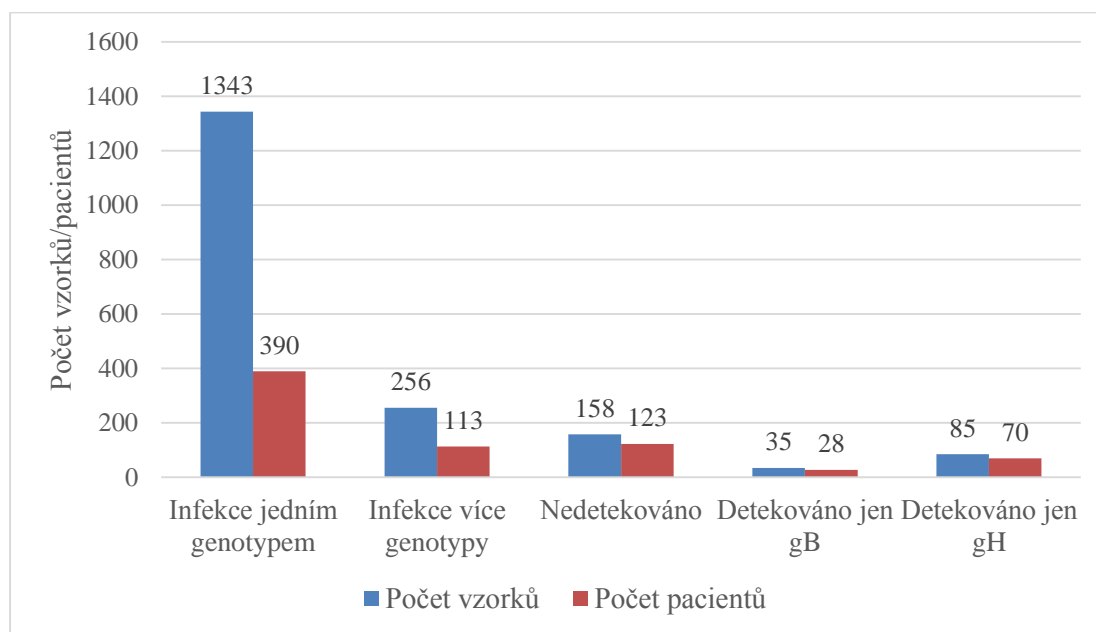


Ve studované populaci byla jednoznačně nejčastěji prokázána infekce způsobená pouze jedním genotypem CMV a to u 1343 vzorků (71,6 %) celkem od 390 pacientů, infekce vyvolaná dvěma či více genotypy CMV byla prokázána u 256 vzorků (13,6 %) od 113 pacientů. U 120 vzorků celkem od 89 pacientů se nám nepodařilo určit plný genotyp, z toho u 35 (1,9 %) vzorků nebyl určen glykoprotein H a u 85 (4,5 %) vzorků nebyl určen glykoprotein B. Z těchto vzorků mělo 107 (89,2 %) velmi nízkou hladinu prospektivně detekovaného CMV (pod 15 kopií/  $\mu$ l DNA). U 158 (8,4 %) vzorků od 123 pacientů jsme nebyli schopni určit ani jeden z testovaných genů. Z těchto nedetekovaných vzorků mělo 127 (80,4 %) hladinu prospektivně detekovaného CMV pod 15 kopií/  $\mu$ l DNA. Celkově jsme tedy byli schopni určit 85,2 % vzorků. Rozložení výsledků detekce vzorků je uvedeno v tabulce č. 29 grafu č. 6

Tabulka č. 29 Detekce CMV

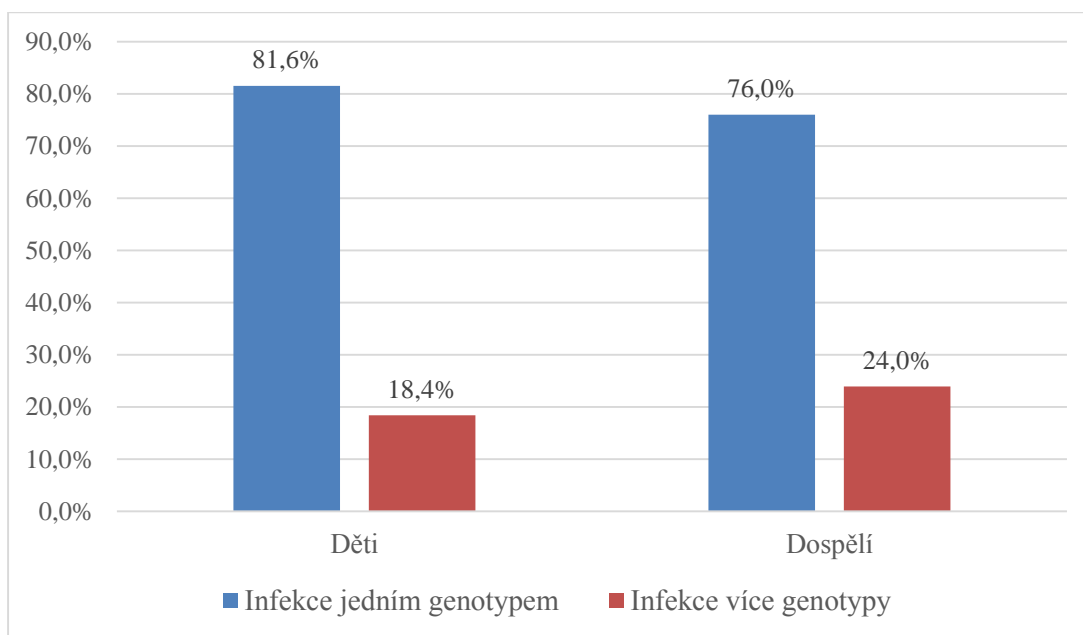
|                          | Celkem |          | Děti     |        |          | Dospělí |  |
|--------------------------|--------|----------|----------|--------|----------|---------|--|
|                          | Vzorky | Pacienti | Pacienti | Vzorky | Pacienti | Vzorky  |  |
| Celkem                   | 1877   |          | 542      | 645    | 384      | 1233    |  |
| Infekce jedním genotypem | 1343   | 71,6%    | 390      | 491    | 276      | 848     |  |
| Infekce více genotypy    | 256    | 13,6%    | 113      | 65     | 87       | 191     |  |
| Nedetekováno             | 158    | 8,4%     | 123      | 51     | 85       | 107     |  |
| Detekováno jen gB        | 35     | 1,9%     | 28       | 10     | 21       | 25      |  |
| Detekováno jen gH        | 85     | 4,5%     | 70       | 24     | 51       | 61      |  |

Graf č. 6 Detekce CMV



V souboru kompletně určených vzorků od dětských pacientů jsme detekovali infekci způsobenou pouze jedním genotypem CMV u 115 pacientů (81,6 %) a infekci způsobenou dvěma či více genotypy CMV u 26 (18,4 %) pacientů. U dospělých pacientů jsme zaznamenali mírný nárůst infekcí vyvolaných dvěma a více genotypy CMV tento rozdíl ovšem nebyl statisticky signifikantní. Smíšená infekce byla detekována u 87 (24,0 %) dospělých pacientů a infekce vyvolaná pouze jedním genotypem CMV u 276 (76,0 %) pacientů. Výsledky jsou zobrazeny v grafu č. 7.

Graf č. 7 Výskyt infekcí u dětských a dospělých pacientů



Z 26 dětských pacientů, u kterých byla prokázána infekce dvěma a více genotypy CMV, jsme 20 (77 %) pacientům detekovali stejné kombinace genotypů ve všech vzorcích, u 6 (23%) pacientů docházelo ke změnám a byly prokázány rozdílné kombinace genotypů v jednotlivých vzorcích. Z 87 dospělých pacientů jsme u 66 (76 %) pacientů nacházeli stejné kombinace genotypů a u 21 (24 %) pacientů jsme detekovali rozdílné kombinace genotypů v různých vzorcích. Přehledy pacientů s rozdílnými kombinacemi detekovaných genotypů jsou uvedeny v tabulkách č. 30 a 31. V tabulkách jsou uvedeny pouze příklady detekovaných genotypů nikoli všechny vzorky od daného pacienta.

Tabulka č. 30 Dětský pacienti a jejich rozdílné kombinace detekovaných genotypů

| Pacient číslo | Vzorek číslo | Den po transplantaci | Koncentrace (počet kopií CMV/ $\mu$ l DNA) | Genotyp       |
|---------------|--------------|----------------------|--|---------------|
| 1             | 1            | 28                   | 11   | gB1,3/gH1     |
|               | 2            | 58                   | 24   | gB1,3/gH1,2   |
| 2             | 1            | 77                   | 5  | gB1,2/gH1     |
|               | 2            | 132                  | 14   | gB1/gH1,2     |
| 3             | 1            | 97                   | 7959                                       | gB1,2,3/gH1,2 |
|               | 2            | 188                  | 190  | gB1,2/gH1,2   |
| 4             | 1            | 25                   | 38   | gB1,4/gH1,2   |
|               | 2            | 60                   | 17   | gB1/gH1,2     |
| 5             | 3            | 88                   | 341  | gB1,3/gH1,2   |
|               | 4            | 137                  | 13   | gB1,3/gH1     |
| 6             | 1            | 11                   | 14   | gB1,2/gH1     |
|               | 2            | 47                   | 127  | gB1,2/gH1,2   |



Tabulka č. 31 Dospělí pacienti a jejich rozdílné kombinace detekovaných genotypů

| Pacient   | vzorek | Den po transplantaci | Koncentrace (počet kopií CMV/ $\mu$ l DNA) | Genotyp       |
|-----------|--------|----------------------|--|---------------|
| <b>1</b>  | 1      | 147                  | 50   | gB3,4/gH1,2   |
|           | 2      | 168                  | 54   | gB2,3,4/gH1,2 |
| <b>2</b>  | 1      | 76                   | 7  | gB1,3/H1      |
|           | 2      | 108                  | 3416                                       | gB1,3,4/H1,2  |
| <b>3</b>  | 1      | 47                   | 115  | gB1,4/gH1,2   |
|           | 2      | 75                   | 1280                                       | gB1,4/gH2     |
|           | 3      | 132                  | 1001                                       | gB1,4/gH2     |
|           | 4      | 362                  | 12   | gB1,4/gH1,2   |
|           | 5      | 475                  | 22   | gB1/gH1,2     |
| <b>4</b>  | 1      | 70                   | 15   | gB1,2,3/gH1,2 |
|           | 2      | 97                   | 56   | gB2,3/gH1,2   |
| <b>5</b>  | 1      | 75                   | 7  | gB1,3/gH1     |
|           | 2      | 95                   | 369  | gB1,3/gH1,2   |
| <b>6</b>  | 1      | 60                   | 25   | gB1,4/gH1     |
|           | 2      | 130                  | 147  | gB1,3/gH1,2   |
| <b>7</b>  | 1      | 106                  | 8710                                       | gB1,3/gH1,2   |
|           | 2      | 165                  | 42   | gB1/gH1,2     |
| <b>8</b>  | 1      | 77                   | 181  | gB1,2,4/gH1   |
|           | 2      | 104                  | 59   | gB2,4/gH1     |
| <b>9</b>  | 1      | 62                   | 1030                                       | gB1,2,4/gH1,2 |
|           | 2      | 71                   | 119  | gB1,2/gH1,2   |
| <b>10</b> | 1      | 39                   | 16   | gB1,4/gH1     |
|           | 2      | 67                   | 1230                                       | gB1,3/gH1,2   |
| <b>11</b> | 1      | 32                   | 279  | gB1,4/gH1,2   |
|           | 2      | 59                   | 8  | gB4/gH1,2     |
| <b>12</b> | 1      | 33                   | 14   | gB1/gH1,2     |
|           | 2      | 54                   | 330  | gB1,2,3/gH1,2 |
|           | 3      | 89                   | 18   | gB1/gH1,2     |
|           | 4      | 117                  | 69   | gB2,4/gH1,2   |
|           | 5      | 138                  | 8  | gB1,3/gH1,2   |
| <b>13</b> | 1      | 53                   | 1820                                       | gB1/gH1,2     |
|           | 2      | 88                   | 3863                                       | gB1,4/gH1,2   |
|           | 3      | 109                  | 161  | gB1,4/gH1     |
| <b>14</b> | 1      | 48                   | 1190                                       | gB3/gH1,2     |
|           | 2      | 132                  | 3360                                       | gB3,4/gH1,2   |
|           | 3      | 160                  | 12   | gB3,4/gH1     |
|           | 4      | 223                  | 631  | gB1,3/gH1,2   |
| <b>15</b> | 1      | 40                   | 306  | gB1,3/gH1,2   |
|           | 2      | 47                   | 151  | gB3/gH1,2     |
| <b>16</b> | 1      | 26                   | 19   | gB1,2/gH2     |
|           | 2      | 54                   | 302  | gB1,2/gH1,2   |
| <b>17</b> | 1      | 61                   | 536  | gB1/gH1,2     |
|           | 2      | 96                   | 5  | gB4/gH1,2     |
|           | 3      | 102                  | 160  | gB1,4/gH1,2   |

|           |   |     |      |               |
|-----------|---|-----|------|---------------|
|           | 4 | 124 | 10   | gB1/gH1,2     |
| <b>18</b> | 1 | 46  | 17   | gB2/gH1,2     |
|           | 2 | 978 | 6    | gB1,3/gH1     |
| <b>19</b> | 1 | 97  | 45   | gB2,4/gH1,2   |
|           | 2 | 125 | 10   | gB1,2,4/gH1,2 |
|           | 3 | 168 | 3938 | gB1,2/gH1,2   |
|           | 4 | 195 | 12   | gB4/gH1,2     |
|           | 5 | 244 | 1000 | gB1,2/gH1,2   |
|           | 6 | 387 | 368  | gB1,2,4/gH1,2 |
|           | 7 | 510 | 25   | gB1,4/gH2     |
|           | 8 | 716 | 12   | gB2,4/gH1,2   |
| <b>20</b> | 1 | 67  | 1070 | gB1,4/gH1,2   |
|           | 2 | 151 | 23   | gB1/gH1,2     |
|           | 3 | 180 | 438  | gB1,4/gH1,2   |
|           | 4 | 252 | 953  | gB1/gH1,2     |
| <b>21</b> | 1 | 33  | 95   | gB1,2/gH2     |
|           | 2 | 181 | 35   | gB1,2/gH1,2   |

Pomocí logistické regrese jsme u dětských pacientů testovali vliv přítomnosti lidského cytomegaloviru a charakteristiky infekce ve smyslu infekcí způsobených pouze jedním genotypem a více genotypy na dlouhodobé přežití pacienta. Zatímco u infekcí vyvolaných jedním genotypem CMV jsme neprokázali negativní vliv na dlouhodobé přežití pacienta ( $p=0,779$ ;  $OR=1,081$ ;  $CI=0,61-1,85$ ) u infekcí způsobených více genotypy jsme prokázali negativní vliv na dlouhodobé přežití pacienta ( $p=0,025$ ;  $OR=2,681$ ;  $CI=1,14-6,34$ ). Dále jsme porovnávali soubor pacientů po HSCT, kterým nebyla prokázána infekce CMV se souborem pacientů po HSCT, u kterých byla prokázána přítomnost CMV, a zjistili jsme, že přítomnost CMV jako takového nemá vliv úmrtnost pacientů po HSCT ( $p=0,24$ ;  $OR=1,34$ ;  $CI=0,82-2,18$ ). Další statistické analýzy pro připravovanou publikaci stále probíhají.

U vybrané skupiny pacientů, kterým byla prokázána infekce způsobená dvěma či více genotypy CMV, byly testovány poměry zastoupení jednotlivých genotypů. Pro tuto analýzu byly připraveny kalibrační křivky, abychom byli schopni určit koncentraci jednotlivých genotypů. Celkem bylo testováno 31 vzorků od 17 pacientů. U pacientů od kterých jsme testovali více vzorků, jsme pozorovali dynamiku změn poměrů v čase. Ve všech případech kdy vzorek obsahoval genotyp gB3, byl tento genotyp jasně převažující bez ohledu na ostatní genotypy přítomné v témže vzorku. Ve většině případů (11 vzorků od 5 pacientů) kdy byl v jednom vzorku přítomen jak gB1 tak i gB4 byl převažujícím genotypem gB4, pouze u 2 vzorků od 2 pacientů byl převažoval gB1 nad gB4. U jednoho

pacienta (pacient číslo 16) jsme prokázali jasnou převahu gH2, který byl i původním genotypem před infekcí druhým kmenem CMV, ve všech vzorcích. U pacienta č. 17 jsme naopak prokázali ve všech vzorcích převahu gH1. Procentuální zastoupení jednotlivých genotypů obsažených ve vybraných vzorcích s prokázanou směsnou infekcí jsou uvedeny v tabulce č. 32.

Tabulka č. 32 Četnosti jednotlivých genotypů u vzorků obsahujících více genotypů

| Pacient | Vzorek | Den po HSCT | gB1    | gB2   | gB3   | gB4    | gH1    | gH2    | Koncentrace (počet kopií CMV/ $\mu$ l DNA) | Genotyp   |
|---------|--------|-------------|--------|-------|-------|--------|--------|--------|--|-----------|
| 1       | 1      | 139         |        |       | 63,0% | 37,0%  |        | 100,0% | 14   | B3,4/H2   |
| 2       | 1      | 66          | 91,2%  |       |       | 8,8%   |        | 100,0% | 52   | B1,4/H2   |
| 3       | 1      | 84          | 46,6%  |       |       | 53,4%  |        | 100,0% | 375  | B1,4/H2   |
|         | 2      | 112         | 3,8%   |       |       | 96,2%  |        | 100,0% | 14   | B1,4/H2   |
|         | 3      | 126         | 48,4%  |       |       | 51,6%  |        | 100,0% | 14   | B1,4/H2   |
| 4       | 1      | 194         | 1,6%   |       |       | 98,4%  | 100,0% |        | 489  | B1,4/H1,2 |
|         | 2      | 208         | 45,3%  |       |       | 54,7%  | 100,0% |        | 42   | B1,4/H1,2 |
|         | 3      | 250         | 36,7%  |       |       | 63,3%  | 100,0% |        | 315  | B1,4/H1,2 |
|         | 4      | 264         | 11,8%  |       |       | 88,2%  | 100,0% |        | 177  | B1,4/H1,2 |
| 5       | 1      | 88          | 36,4%  |       |       | 63,6%  |        | 100,0% | 306  | B1,4/H2   |
|         | 2      | 159         | 65,5%  |       |       | 34,5%  |        | 100,0% | 54   | B1,4/H2   |
| 6       | 1      | 77          | 81,3%  | 14,7% |       | 4,0%   | 100,0% |        | 181  | B1,2,4/H1 |
|         | 2      | 104         |        | 87,0% |       | 13,0%  | 100,0% |        | 59   | B2,4/H1   |
| 7       | 1      | 50          |        | 1,5%  | 98,5% |        |        | 100,0% | 4290                                       | B2,3/H2   |
| 8       | 1      | 54          |        | 13,3% | 86,7% |        |        | 100,0% | 55   | B2,3/H2   |
|         | 2      | 75          |        | 3,8%  | 96,2% |        |        | 100,0% | 993  | B2,3/H2   |
| 9       | 1      | 32          | 47,3%  |       | 52,7% |        |        | 100,0% | 55   | B1,3/H1,2 |
| 10      | 1      | 223         | 1,5%   |       | 98,5% |        |        | 100,0% | 631  | B1,3/H1,2 |
|         | 2      | 251         | 5,5%   |       | 94,5% |        |        | 100,0% | 273  | B1,3/H1,2 |
| 11      | 1      | 77          | 98,4%  | 1,6%  |       |        |        | 100,0% | 514  | B1,2/H2   |
| 12      | 1      | 2078        | 9,7%   |       |       | 90,3%  | 100,0% |        | 76   | B1,4/H1   |
| 13      | 1      | 53          | 38,1%  |       | 61,9% |        |        | 100,0% | 92   | B1,3/H2   |
| 14      | 1      | 33          | 40,2%  | 59,8% |       |        |        | 100,0% | 95   | B1,2/H2   |
| 15      | 1      | 11          | 76,1%  | 23,9% |       |        | 100,0% |        | 14   | B1,2/H1   |
|         | 2      | 47          | 97,2%  | 2,8%  |       |        |        | 100,0% | 127  | B1,2/H2   |
| 16      | 1      | 25          | 100,0% |       |       |        |        | 100,0% | 8  | B1/H2     |
|         | 2      | 32          | 48,8%  |       |       | 51,2%  | 21,7%  | 78,3%  | 279  | B1,4/H1,2 |
|         | 3      | 45          | 3,9%   |       |       | 96,1%  | 5,2%   | 94,8%  | 24   | B1,4/H1,2 |
|         | 4      | 59          |        |       |       | 100,0% | 32,8%  | 67,2%  | 8  | B4/H1,2   |
| 17      | 1      | 62          | 100,0% |       |       |        | 94,5%  | 5,5%   | 310  | B1/H1,2   |
|         | 2      | 69          | 100,0% |       |       |        | 96,1%  | 3,9%   | 59   | B1/H1,2   |

V rámci zavedení metody genotypizace CMV u pacientů po HSCT byly testovány i vzorky od kongenitálně infikovaných novorozenců a dětí mladších jednoho roku ve stejném období. Výsledky nejsou zahrnuty v této diplomové práci, ale jsou uvedeny v připravovaném článku, který je připojen v příloze č. 1.

## 5 DISKUZE

Genotypizace slouží k odlišení jednotlivých genotypů vyskytujících se v dané populaci. Pro rozlišení genotypů CMV je velmi často používána hlavní komponenta virového obalu- glykoprotein B, oproti tomu glykoprotein H se v publikacích zabývajících se genotypizací CMV vyskytuje jen zřídka, stejně tak je nedostatek studií, které se zabývají oběma genotypy současně (Görzer *et al.* 2010, Vries *et al.* 2011).

Některé práce potvrzují vliv infekcí způsobených dvěma či více genotypy CMV na prognózu pacienta. Pozorovali u nich vyšší virovou nálož a častější výskyt závažnějších klinických projevů (Coaquette *et al.* 2004, Pang *et al.* 2008) jiné studie to však nepotvrzují (Roubalová *et al.* 2010, Zawilińska *et al.* 2011). Naše výsledky jsou v souladu s pracemi (Coaquette *et al.* 2004, Pang *et al.* 2008), protože jsme potvrdili jednoznačný negativní vliv směsných infekcí na dlouhodobé přežívání pacienta. Frekvence záchytu infekcí způsobených dvěma a více genotypy se v jednotlivých pracích výrazně liší. Coaquette *et al.* 2004 ve své práci detekovali tyto infekce u 25,8 % dospělých imunosuprimovaných jedinců po transplantaci (soubor pacientů po SOT i HSCT) obdobně jako Xia *et al.* 2012, kteří je prokázali u 26,5 % pacientů po HSCT. Na rozdíl od práce Correia-Silvy (Correia-Silva *et al.* 2011), kteří detekovali směsné infekce u 46,0 % pacientů po HSCT nebo Dieamanta (Dieamant *et al.* 2013) kde došlo k záchytu směsných infekcí pouze u 6 % pacientů po HSCT. V naší práci jsme infekce způsobené dvěma a více genotypy CMV detekovali celkem u 18,4 % dětských pacientů a 24,0 % dospělých pacientů. Infekci způsobenou pouze jedním genotypem jsme prokázali u 81,6 % dětských pacientů a 76 % dospělých pacientů. Celkově jsme byli schopni určit oba testované geny u 85,2 % vzorků, což je nepatrně vyšší úspěšnost při porovnání např. s pracemi Bhattarakosol *et al.* 2007 nebo Vries *et al.* 2011. U 6,4 % vzorků se nám nepodařilo určit kompletní genotyp, z toho u 1,9 % vzorků jsme nebyli schopni určit glykoprotein H, u 4,5 % glykoprotein B. U 8,4 % vzorků jsme nedetekovali ani jeden z testovaných genů. Příčin může být několik 1) jedná se o retrospektivní studii, v níž se pracovalo se vzorky starými až 12 let, které byly skladovány pouze při -20 °C, a mohlo tedy dojít k degradaci DNA. 2) 80,4 % vzorků, ve kterých jsme nedetekovali ani jeden gen a 89,2 % vzorků, ve kterých jsme detekovali pouze gB nebo pouze gH má prospektivně naměřenou velmi nízkou hladinu CMV (pod 15 kopií/ μl DNA) a proto v rámci senzitivity eseje stejně jako možné degradaci DNA u těchto vzorků již nemusel být detekovatelný testovaný gen. 3) Dalším důvodem je i možnost výskytu mutace

v sekvenci pro použité primery nebo sondy, což ve své práci popisuje Sowmya *et al.* 2006. 4) V neposlední řadě musíme brát v úvahu i výskyt vzácnějších genotypových variant, které se vyskytují velmi zřídka. Tyto varianty glykoproteinu B poprvé popsal Chou *et al.* 1991. V naší práci bychom mohli uvažovat o 4 pacientech, u kterých se nám opakovaně nepodařilo detekovat ani jeden vzorek a zároveň prospektivně naměřené koncentrace CMV byly vyšší než 15 kopií/  $\mu$ l DNA. Bergallo *et al.* 2007 testovali kromě 4 základních genotypů glykoproteinu B i genotyp gB5, avšak autorům se nepodařilo prokázat ani jednoho pacienta s tímto vzácným genotypem. Oproti tomu Bhattarakosol *et al.* 2007 ve své práci popisují záchyt až 7 % pacientů, které nemohli zařadit ani do jednoho ze 4 běžně se vyskytujících genotypů gB.

Mnoho studií se snažilo prokázat souvislosti určitého genotypu CMV s průběhem a závažností infekce (Roubalová *et al.* 2009, Wu *et al.* 2009) nebo prokázat vztah určitých genotypů k buněčnému tropismu (Tarrago *et al.*, 2003) či popsat vliv genotypů na kinetiku rozpadu CMV po podání virostatik. Emery *et al.* 2012 prokázali, že gB1 má nejpomalejší kinetiku snížení kvantity CMV v první fázi po podání virostatik, naopak gB2 a gB4 vykazovali nejrychlejší ústup virové nálože. Ve druhé fázi odpovědi na léčbu však vliv genotypu již nepozorovali. Zároveň byly sledovány výskyty jednotlivých genotypů gB u různých rizikových skupin pacientů jako jsou pacienti po transplantacích, HIV- pozitivní jedinci či novorozenci (Roubalová *et al.* 2010). Některé studie potvrzují častější záchyt určitého genotypu gB u rozdílných skupin pacientů. Například u kongenitálně či perinatálně infikovaných novorozenců s poškozením jater byl opakovaně častěji detekován gB1 a zároveň se gB1 vyskytoval nejčastěji u dětí s vrozenou symptomatickou CMV nemocí (Zhang *et al.* 2011, Yu *et al.* 2007). Yan *et al.* 2008 častěji nacházeli genotyp gB3 u kongenitálně infikovaných novorozenců a popsali spojitost gB3 s vrozenou ztrátou sluchu. Naopak Vries *et al.* 2011 nepotvrdili častější zastoupení některého z genotypů u dětí se sluchovým postižením. U HIV- pozitivních pacientů byl nejčastěji detekovaným genotypem gB2, který Cunha *et al.* spojovali s horší prognózou pacienta (Cunha *et al.* 2011, Roubalová *et al.* 2010). Potvrdili jsme, že gB1 je obecně nejčastěji se vyskytující genotyp, jak je uváděno ve většině studií (Zhang *et al.* 2011, Xia *et al.* 2012, Dieamant *et al.* 2013 a další) včetně studie na českých pacientech (Roubalová *et al.* 2010). U dalších genotypů se už naše výsledky vždy neshodují, příčinou může být použití rozdílné metodiky pro genotypizaci (RFLP- které používali např.: González-Ramírez *et al.* 2012 oproti Real-time PCR- kterou používali např.: Vries *et al.* 2011) nebo ovlivnění výsledků velikostí

zkoumané skupiny pacientů, stejně jako rozdílná příčina imunosuprese (HIV- pozitivní oproti HSCT). Jako druhý nejběžnější genotyp jsme detekovali gB3 se záchytem u 20,1 % pacientů stejně jako Roubalová *et al.* 2010 (26,0 %) nebo Vries *et al.* 2011 (41%). Nejméně časté byly genotypy gB2 a gB4, detekované shodně každý u 17,1 % pacientů. Tento trend jsme pozorovali mezi dětskými i dospělými pacienty. Dieamant *et al.* 2013 určili u pacientů v Brazílii stejně jako my nejčtenější genotyp gB1, nicméně na rozdíl od nás jako druhý nejčtenější popisují gB2 (35,0 %), dále pak gB4 (14,0 %) a jako nejméně se vyskytující gB3, který detekovali v 6 % případů. Naše výsledky oproti tomu ukazují gB3 jako druhý nejběžnější a shodují se s dalšími pracemi prováděnými na Evropské populaci (Roubalová *et al.* 2010, Vries *et al.* 2011). Mohli bychom tedy soudit, že, mají-li různé genotypy různé vlivy, mohou se CMV infekce lišit i svým dopadem na pacienta v Jižní Americe od pacientů v Evropě.

U glykoproteinu H jsme nepatrně častěji detekovali genotyp gH2 (54,7 %), gH 1 byl prokázán u 45,3 % pacientů, což popisuje například i Paradowska, kteří detekovali gH2 u 42,1%, gH1 pak u 32,6% a směsnou infekci způsobenou oběma genotypy gH u 25,3% pacientů. Genotyp gH1 spojovali s vysokou virovou náloží a sensorineurální nedoslýchavostí. Naopak přítomnost genotypu gH2 spojovali se sníženým rizikem ztráty sluchu u kongenitálně a postnatálně infikovaných dětí (Paradowska *et al.* 2014). Naopak ve studii Guo *et al.* 2013 detekovali výrazně častěji genotyp gH1 (60,8 %), gH2 pak (39,2 %) a směsnou infekci způsobenou oběma genotypy gH nedetekovali ani v jednom případě.

V souboru pacientů, u kterých jsme prokázali infekci způsobenou pouze jedním genotypem CMV, byl nejčastěji detekovanou kombinací genotyp gB1/gH2, který jsme detekovali u 29,1 % dospělých a 26,7 % dětských pacientů. Nejméně zastoupenou kombinací pak byla pro dospělé pacienty kombinace gB4/gH2 detekovaná u (6,1 %) a pro dětské pacienty gB2/gH1(3,3 %). Naše výsledky se shodují s prací Görzer *et al.* 2010 u pacientů z Rakouska, kteří také nejčastěji prokázali genotyp gB1/gH2 a nejméně často genotyp gB4/gH2 a gB2/gH1. Neprokázali souvislost mezi konkrétním genotypem a vyšší virovou náloží, zaznamenali však signifikantně rozdílné zastoupení smíšených infekcí u primoinfekcí a reaktivací.

Ve skupině pacientů s prokázanou směsnou infekcí, způsobenou více než jedním genotypem jsme zaznamenali rozdíl v diverzitě kombinací genotypů u dětských a dospělých pacientů. Pokud bereme v úvahu pouze 4 hlavní genotypy gB a 2 genotypy gH je možné vytvořit maximálně 34 odlišných kombinací, ve kterých se vyskytují dva

a více genotypů současně. U dětských pacientů bylo prokázáno 14 (41,2 %) různých kombinací, zatímco u dospělých pacientů bylo zachyceno 25 (73,5 %) různých kombinací. To se shoduje také s frekvencí záchytu infekcí zahrnujících kombinaci 3 genotypů. U většiny pacientů jak dětských tak dospělých byla prokázána infekce pouze dvěma genotypy, nicméně u 9,2 % dospělých pacientů byla prokázána infekce 3 genotypy zároveň; u dětských pacientů byl pak zachycen pouze 1 pacient s infekcí třemi genotypy současně. Naše data se v tomto ohledu shodují s výsledky Vries *et al.* 2011, kteří infekci třemi genotypy detekovali u 8,0 % pacientů. To odpovídá názoru, že pacient se setkává s různými genotypy CMV po celý život a může docházet k infekcím dalším genotypem (Roizman *and* Pellett 2001).

U 6 dětských (23 %) a 21 dospělých (24 %) pacientů jsme prokázali v jednotlivých vzorcích rozdílné kombinace genotypů. V 5 případech dětských a 15 případech dospělých pacientů znamenala větší virová nálož kombinaci více genotypů. V některých případech se jednalo o vzorky odebrané dlouhou dobu po sobě (v případě pacienta č. 18 to bylo 932 dní) a mohlo tedy dojít k převaze jednoho genotypu. Což také popisuje Görzer *et al.* 2008, kteří ve své práci zaznamenali případy pacientů, u nichž se genotypy CMV vyvíjeli v čase s různými virovými náložemi. Také popsali výskyt jednoho dominantního a jednoho či více méně dominantních genotypů v jednom vzorku, kdy je možné, pozorovat jak dominantní genotyp „přeroste“ ostatní genotypy nebo méně dominantní genotyp dočasně vymizí a je pod detekčním limitem. Toto chování popsali zejména v případech, kdy se daný genotyp znovu objevil po léčbě ganciclovirem. Tento model dynamiky výskytu rozdílných kombinací genotypů v jednotlivých vzorcích lze předpokládat v případě, kdy jeden genotyp je wild type- citlivý na ganciclovir (GCV) a druhý genotyp nese mutaci kódující rezistenci ke gancicloviru. V tom případě pokud je pacient léčen GCV budeme schopni detekovat převahu rezistentního genotypu a naopak pokud pacient léčen není, můžeme zachytit oba genotypy, případně převahu wild typu. Jelikož mutace způsobující rezistenci může viru přidávat selektivní výhodu v případě přítomnosti selekčního tlaku, ale zároveň snižovat fitness (životaschopnost) v přirozených podmínkách bez selekčního tlaku.

V souboru vybraných pacientů, kterým byly testovány procentuální zastoupení jednotlivých genotypů ve vzorcích směsných infekcí, jsme pozorovali obdobné vztahy a dynamiky jednotlivých genotypů, které popsali Görzer *et al.* 2008 a jsou uvedeny výše. U pacienta č. 6 (z této skupiny) jsme nejprve detekovali infekci způsobenou genotypy gB1,2,4/gH1 s vyšším obsahem virové DNA, kde byl jednoznačně převažujícím



genotypem gB1, nicméně u následujícího vzorku, odebraného po 1 měsíci a nasazené virostatické léčbě jsme pozorovali snížení virové nálože o 2/3 doprovázené vymizením genotypu gB1 a genotyp gB2 se stal jasně převažujícím nad genotypem gB4.

## 6 ZÁVĚR

Real-time PCR metoda byla optimalizována pro použití v naší laboratoři k detekci genotypů gB1, gB2, gB3 a gB4 u glykoproteinu B a genotypů gH1 a gH2 u glykoproteinu H. Zároveň byly připraveny kalibrační křivky vhodné k použití pro kvantitativní analýzu poměrů daných genotypů u pacientů. V rámci diplomové práce bylo retrospektivně testováno 1877 vzorků od 542 pacientů po alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk. Mimo jiné se nám podařilo potvrdit negativní vliv infekcí způsobených dvěma a více genotypy na dlouhodobé přežívání pacientů.

Naše práce rozšiřuje znalosti o glykoproteinu B, glykoproteinu H a jejich vlivu na pacienty po transplantaci hematopoetických kmenových buněk a je v souladu s dalšími publikovanými studiemi, které byly prováděny na Evropské populaci. Nicméně infekce lidským cytomegalovirem stále zůstává jednou z nejzávažnějších komplikací po HSCT a proto je potřeba se mu i nadále věnovat. Další detailnější charakteristika CMV infekce a její analýzy mohou být v budoucnu přínosné pro zlepšení péče o rizikové skupiny pacientů, jako jsou pacienti po transplantacích, HIV pozitivní jedinci či kongenitálně infikovaní novorozenci.

V roce 2014 budou kompletní data prezentována na 17. ročníku European Society for Clinical Virology. Přijatý abstrakt je připojen v příloze č. 2.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NT/13691-4

## 7 Citovaná literatura

1. BALL, L. M., EGELER, R. M. Acute GvHD: pathogenesis and classification. *Bone Marrow Transplant*, 2008, vol. 41 Suppl 2, no. s. S58-64.
2. BANNA, G. L., SIMONELLI, M., SANTORO, A. High-dose chemotherapy followed by autologous hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of solid tumors in adults: a critical review. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2007, vol. 2, no. 1, s. 65-82.
3. BECKMANN, C., et al. Comparison of a UL111a real-time PCR and pp65 antigenemia for the detection of cytomegalovirus. *J Med Virol*, 2011, vol. 83, no. 12, s. 2143-2150.
4. BEGO, M., et al. Characterization of an antisense transcript spanning the UL81-82 locus of human cytomegalovirus. *J Virol*, 2005, vol. 79, no. 17, s. 11022-11034.
5. BERGALLO, M., et al. Human cytomegalovirus glycoprotein B genotyping from bronchoalveolar lavage specimens. *Can J Microbiol*, 2011, vol. 57, no. 4, s. 273-277.
6. BHATTARAKOSOL, P., CHANTARAARPHONKUN, S. Prevalence of human cytomegalovirus (HCMV) gB genotypes in Thai patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2007, vol. 38, no. 5, s. 835-840.
7. BOEHME, K. W., GUERRERO, M., COMPTON, T. Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells. *J Immunol*, 2006, vol. 177, no. 10, s. 7094-7102.
8. BRITT, W. J., et al. Antigenic domain 1 is required for oligomerization of human cytomegalovirus glycoprotein B. *J Virol*, 2005, vol. 79, no. 7, s. 4066-4079.
9. BROWN, J. C., NEWCOMB, W. W. Herpesvirus capsid assembly: insights from structural analysis. *Curr Opin Virol*, 2011, vol. 1, no. 2, s. 142-149.
10. CANTRELL, S. R., BRESNAHAN, W. A. Interaction between the human cytomegalovirus UL82 gene product (pp71) and hDaxx regulates immediate-early gene expression and viral replication. *J Virol*, 2005, vol. 79, no. 12, s. 7792-7802.
11. COAQUETTE, A., et al. Mixed cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis*, 2004, vol. 39, no. 2, s. 155-161.
12. COMPTON, T., NEPOMUCENO, R. R., NOWLIN, D. M. Human cytomegalovirus penetrates host cells by pH-independent fusion at the cell surface. *Virology*, 1992, vol. 191, no. 1, s. 387-395.

13. COMPTON, T., NOWLIN, D. M., COOPER, N. R. Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology*, 1993, vol. 193, no. 2, s. 834-841.
14. CORREIA-SILVA, J. F., et al. HCMV gB genotype and its association with cytokine levels in hematopoietic stem cell transplantation. *Oral Dis*, 2011, vol. 17, no. 5, s. 530-537.
15. CROUGH, T., KHANNA, R. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev*, 2009, vol. 22, no. 1, s. 76-98, Table of Contents.
16. CUNHA, A. A., et al. Evaluation of glycoprotein B genotypes and load of CMV infecting blood leukocytes on prognosis of AIDS patients. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 2011, vol. 53, no. 2, s. 82-88.
17. DAVISON, A. J., BHELLA., D. Human Herpesviruses; 2007.
18. DAVISON, A. J., et al. The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *J Gen Virol*, 2003, vol. 84, no. Pt 1, s. 17-28.
19. DE VRIES, J. J., et al. Rapid genotyping of cytomegalovirus in dried blood spots by multiplex real-time PCR assays targeting the envelope glycoprotein gB and gH genes. *J Clin Microbiol*, 2011, vol. 50, no. 2, s. 232-237.
20. DIEAMANT, D. C., et al. Cytomegalovirus (CMV) genotype in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *BMC Infect Dis*, 2013, vol. 13, no. s. 310.
21. EMERY, V. C., et al. Differential decay kinetics of human cytomegalovirus glycoprotein B genotypes following antiviral chemotherapy. *J Clin Virol*, 2012, vol. 54, no. 1, s. 56-60.
22. FILIPOVICH, A. H., et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2005, vol. 11, no. 12, s. 945-956.
23. GILBERT, C., BESTMAN-SMITH, J., BOIVIN, G. Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: clinical impacts and molecular mechanisms. *Drug Resist Updat*, 2002, vol. 5, no. 2, s. 88-114.
24. GILBERT, M. J., et al. Selective interference with class I major histocompatibility complex presentation of the major immediate-early protein following infection with human cytomegalovirus. *J Virol*, 1993, vol. 67, no. 6, s. 3461-3469.

25. GONZALEZ-RAMIREZ, J., et al. Cytomegalovirus gB genotype distribution in Mexican children undergoing allogeneic bone marrow transplantation. *Intervirology*, 2012, vol. 55, no., s. 318-320.
26. GORZER, I., et al. Virus load dynamics of individual CMV-genotypes in lung transplant recipients with mixed-genotype infections. *J Med Virol*, 2008, vol. 80, no. 8, s. 1405-1414.
27. GORZER, I., et al. Human cytomegalovirus (HCMV) genotype populations in immunocompetent individuals during primary HCMV infection. *J Clin Virol*, 2010, vol. 48, no. 2, s. 100-103.
28. GRINDE, B. Herpesviruses: latency and reactivation - viral strategies and host response. *J Oral Microbiol*, 2013, vol. 5, no. s.
29. GUO, S., et al. [Studies on genotype of human cytomegalovirus glycoprotein H from infantile clinical isolates]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*, 2013, vol. 51, no. 4, s. 260-264.
30. HOBOM, U., et al. Fast screening procedures for random transposon libraries of cloned herpesvirus genomes: mutational analysis of human cytomegalovirus envelope glycoprotein genes. *J Virol*, 2000, vol. 74, no. 17, s. 7720-7729.
31. HOLZENBURG, A., DITTMER, A., BOGNER, E. Assembly of monomeric human cytomegalovirus pUL104 into portal structures. *J Gen Virol*, 2009, vol. 90, no. Pt 10, s. 2381-2385.
32. HOMMAN-LOUDIYI, M., et al. Envelopment of human cytomegalovirus occurs by budding into Golgi-derived vacuole compartments positive for gB, Rab 3, trans-golgi network 46, and mannosidase II. *J Virol*, 2003, vol. 77, no. 5, s. 3191-3203.
33. HORAN, J., et al. Evaluation of HLA matching in unrelated hematopoietic stem cell transplantation for nonmalignant disorders. *Blood*, 2012, vol. 120, no. 14, s. 2918-2924.
34. CHEE, M. S., et al. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1990, vol. 154, no. s. 125-169.
35. CHEN, D. H., et al. Three-dimensional visualization of tegument/capsid interactions in the intact human cytomegalovirus. *Virology*, 1999, vol. 260, no. 1, s. 10-16.
36. CHEUNG, A. K., et al. Viral gene expression during the establishment of human cytomegalovirus latent infection in myeloid progenitor cells. *Blood*, 2006, vol. 108, no. 12, s. 3691-3699.
37. CHOU, S. Molecular epidemiology of envelope glycoprotein H of human cytomegalovirus. *J Infect Dis*, 1992, vol. 166, no. 3, s. 604-607.

38. CHOU, S. W., DENNISON, K. M. Analysis of interstrain variation in cytomegalovirus glycoprotein B sequences encoding neutralization-related epitopes. *J Infect Dis*, 1991, vol. 163, no. 6, s. 1229-1234.
39. ISAACSON, M. K., COMPTON, T. Human cytomegalovirus glycoprotein B is required for virus entry and cell-to-cell spread but not for virion attachment, assembly, or egress. *J Virol*, 2009, vol. 83, no. 8, s. 3891-3903.
40. ISOMURA, H., STINSKI, M. F. Coordination of late gene transcription of human cytomegalovirus with viral DNA synthesis: recombinant viruses as potential therapeutic vaccine candidates. *Expert Opin Ther Targets*, 2013, vol. 17, no. 2, s. 157-166.
41. JAASKELAINEN, A. J., et al. Serological microarray for detection of HSV-1, HSV-2, VZV, and CMV antibodies. *J Virol Methods*, 2009, vol. 160, no. 1-2, s. 167-171.
42. JIANG, H., et al. [Therapeutic efficacy of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children with chronic myelogenous leukemia]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*, 2013, vol. 15, no. 1, s. 19-24.
43. KINZLER, E. R., COMPTON, T. Characterization of human cytomegalovirus glycoprotein-induced cell-cell fusion. *J Virol*, 2005, vol. 79, no. 12, s. 7827-7837.
44. KLAGES, S., RUGER, B., JAHN, G. Multiplicity dependent expression of the predominant phosphoprotein pp65 of human cytomegalovirus. *Virus Res*, 1989, vol. 12, no. 2, s. 159-168.
45. KNISS, N., et al. Distribution of linear antigenic sites on glycoprotein gp55 of human cytomegalovirus. *J Virol*, 1991, vol. 65, no. 1, s. 138-146.
46. KNIPE, D. M., HOWLEY, P. M. *Fields virology* 5 th; 2007.
47. LANDOLFO, S., et al. The human cytomegalovirus. *Pharmacol Ther*, 2003, vol. 98, no. 3, s. 269-297.
48. LANTTO, J., FLETCHER, J. M., OHLIN, M. Binding characteristics determine the neutralizing potential of antibody fragments specific for antigenic domain 2 on glycoprotein B of human cytomegalovirus. *Virology*, 2003, vol. 305, no. 1, s. 201-209.
49. LEE, Y. H., et al. Pre-engraftment syndrome in hematopoietic stem cell transplantation. *J Korean Med Sci*, 2008, vol. 23, no. 1, s. 98-103.
50. LJUNGGREN, H. G., KARRE, K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*, 1990, vol. 11, no. 7, s. 237-244.

51. LJUNGMAN, P. CMV infections after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 2008, vol. 42 Suppl 1, no. s. S70-S72.
52. LJUNGMAN, P. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: Viral status. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 2007, vol. 20, no. 2, s. S209-S217.
53. LURAIN, N. S., CHOU, S. Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev*, 2010, vol. 23, no. 4, s. 689-712.
54. MACHIELS, B., et al. A gammaherpesvirus uses alternative splicing to regulate its tropism and its sensitivity to neutralization. *PLoS Pathog*, 2013, vol. 9, no. 10, s. e1003753.
55. MARR, K. A. Delayed opportunistic infections in hematopoietic stem cell transplantation patients: a surmountable challenge. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2012, vol. 2012, no. s. 265-270.
56. MILLER, D. M., et al. Human cytomegalovirus inhibits IFN-alpha-stimulated antiviral and immunoregulatory responses by blocking multiple levels of IFN-alpha signal transduction. *J Immunol*, 1999, vol. 162, no. 10, s. 6107-6113.
57. MISZCZAK, D., et al. [Herpesviruses survival strategies--latency and apoptosis]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2013, vol. 67, no. s. 276-287.
58. MURPHY, E., et al. Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, vol. 100, no. 25, s. 14976-14981.
59. PANG, X., HUMAR, A., PREIKSAITIS, J. K. Concurrent genotyping and quantitation of cytomegalovirus gB genotypes in solid-organ-transplant recipients by use of a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol*, 2008, vol. 46, no. 12, s. 4004-4010.
60. PARADOWSKA, E., et al. Cytomegalovirus glycoprotein H genotype distribution and the relationship with hearing loss in children. *J Med Virol*, 2014, vol. 86, no. 8, s. 1421-1427.
61. PATEL, S. J., et al. Resolution of Mild Ganciclovir-Resistant Cytomegalovirus Disease with Reduced-Dose Cidofovir and CMV-Hyperimmune Globulin. *J Transplant*, 2014, vol. 2014, no. s. 342319.
62. POTZSCH, S., et al. B cell repertoire analysis identifies new antigenic domains on glycoprotein B of human cytomegalovirus which are target of neutralizing antibodies. *PLoS Pathog*, 2011, vol. 7, no. 8, s. e1002172.
63. ROIZMAN, PELLETT. *Fields virology* 4th; 2001.

64. ROUBALOVA, K., et al. [Genotyping of viral glycoprotein B (gB) in hematopoietic stem cell transplant recipients with active cytomegalovirus infection: analysis of the impact of gB genotypes on the patients' outcome]. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*, 2010, vol. 59, no. 2, s. 92-99.
65. ROUBALOVA, K., et al. [Prevalence of glycoprotein B (gB) genotypes in the patients with high risk of symptomatic cytomegalovirus infection]. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*, 2009, vol. 58, no. 4, s. 148-153.
66. ROVIRA, M., MENSA, J., CARRERAS, E. Infections after HSCT: EMBT Handbook; 2012.
67. RYCKMAN, B. J., CHASE, M. C., JOHNSON, D. C. Human cytomegalovirus TR strain glycoprotein O acts as a chaperone promoting gH/gL incorporation into virions but is not present in virions. *J Virol*, 2010, vol. 84, no. 5, s. 2597-2609.
68. RYCKMAN, B. J., et al. Characterization of the human cytomegalovirus gH/gL/UL128-131 complex that mediates entry into epithelial and endothelial cells. *J Virol*, 2008, vol. 82, no. 1, s. 60-70.
69. SAHOO, M. K., et al. Detection of cytomegalovirus drug resistance mutations by next-generation sequencing. *J Clin Microbiol*, 2013, vol. 51, no. 11, s. 3700-3710.
70. SHAW, B. E., MADRIGAL, A. Immunogenetics of allogeneic HSCT: EMBT Handbook; 2012.
71. SCHEFFCZIK, H., et al. Multimerization potential of the cytoplasmic domain of the human cytomegalovirus glycoprotein B. *FEBS Lett*, 2001, vol. 506, no. 2, s. 113-116.
72. SIJMONS, S., et al. A method enabling high-throughput sequencing of human cytomegalovirus complete genomes from clinical isolates. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 4, s. e95501.
73. SILVA, M. C., SCHROER, J., SHENK, T. Human cytomegalovirus cell-to-cell spread in the absence of an essential assembly protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, vol. 102, no. 6, s. 2081-2086.
74. SMITH, G. Herpesvirus transport to the nervous system and back again. *Annu Rev Microbiol*, 2012, vol. 66, no. s. 153-176.
75. SPINDLER, N., et al. Characterization of a discontinuous neutralizing epitope on glycoprotein B of human cytomegalovirus. *J Virol*, 2013, vol. 87, no. 16, s. 8927-8939.
76. STARAS, S. A., et al. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994. *Clin Infect Dis*, 2006, vol. 43, no. 9, s. 1143-1151.



77. TAN, S. S., et al. Stem cell transplantation in Europe: trends and prospects. *Eur J Cancer*, 2007, vol. 43, no. 16, s. 2359-2365.
78. TARRAGO, D., QUEREDA, C., TENORIO, A. Different cytomegalovirus glycoprotein B genotype distribution in serum and cerebrospinal fluid specimens determined by a novel multiplex nested PCR. *J Clin Microbiol*, 2003, vol. 41, no. 7, s. 2872-2877.
79. TOMAZIN, R., et al. Cytomegalovirus US2 destroys two components of the MHC class II pathway, preventing recognition by CD4+ T cells. *Nat Med*, 1999, vol. 5, no. 9, s. 1039-1043.
80. TOMBLYN, M., et al. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2009, vol. 15, no. 10, s. 1143-1238.
81. TUGIZOV, S., et al. An acidic cluster in the cytosolic domain of human cytomegalovirus glycoprotein B is a signal for endocytosis from the plasma membrane. *J Virol*, 1999, vol. 73, no. 10, s. 8677-8688.
82. VARNUM, S. M., et al. Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J Virol*, 2004, vol. 78, no. 20, s. 10960-10966.
83. WALKER, C. M., et al. Cytomegalovirus infection after allogeneic transplantation: comparison of cord blood with peripheral blood and marrow graft sources. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2007, vol. 13, no. 9, s. 1106-1115.
84. WOOLFREY, A., et al. HLA-allele matched unrelated donors compared to HLA-matched sibling donors: role of cell source and disease risk category. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2010, vol. 16, no. 10, s. 1382-1387.
85. WU, X., et al. Cytomegalovirus glycoprotein B genotype in hematopoietic stem cell transplant patients from China. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2009, vol. 16, no. 5, s. 647-652.
86. XIA, C. S., et al. Human cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in Chinese hematopoietic stem cell transplant recipients. *Intervirology*, 2012, vol. 55, no. 5, s. 342-348.
87. YAN, H., et al. Genetic variations in the gB, UL144 and UL149 genes of human cytomegalovirus strains collected from congenitally and postnatally infected Japanese children. *Arch Virol*, 2008, vol. 153, no. 4, s. 667-674.
88. YOON, J. Y., et al. Chronic graft versus host disease with small bowel obstruction after unrelated hematopoietic stem cell transplantation in a patient with acute myeloid leukemia. *Korean J Hematol*, 2012, vol. 47, no. 2, s. 142-145.

89. YU, X., et al. Biochemical and structural characterization of the capsid-bound tegument proteins of human cytomegalovirus. *J Struct Biol*, 2011, vol. 174, no. 3, s. 451-460.
90. YU, Z. S., ZHENG, J. Y., WU, J. B. [Association between clinical manifestations of infants with human cytomegalovirus infection and glycoprotein B genotype]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2007, vol. 87, no. 4, s. 259-261.
91. ZAWILINSKA, B., et al. [UL55 genotype diversity of cytomegalovirus strains isolated from newborns and infants hospitalized in southern Poland]. *Przegl Epidemiol*, 2011, vol. 65, no. 3, s. 409-413.
92. ZHANG, M. G., et al. [Human cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in congenitally infected neonates]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*, 2011, vol. 25, no. 4, s. 262-264.
93. ZHOU, M., et al. Comparative analysis of gO isoforms reveals that strains of human cytomegalovirus differ in the ratio of gH/gL/gO and gH/gL/UL128-131 in the virion envelope. *J Virol*, 2013, vol. 87, no. 17, s. 9680-9690.

Internetové zdroje:

<http://medicinabih.info/medicina/mikrobiologija/betaherpesvirinae/> 6.4.2014

<http://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S187167840900079X-gr6.jpg> 10.4.2014

[http://www.medscape.com/content/2003/00/46/61/466160/466160\\_fig.html](http://www.medscape.com/content/2003/00/46/61/466160/466160_fig.html) 12.8.2014

[http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcr2\\_1\\_map.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcr2_1_map.pdf) 2.8.2014

## 8 Přílohy

Příloha č. 1- Připravovaný článek

### **Cytomegalovirus quantity and genotypes in infants bellow 1 year of age – a single centre experience**

Petr Hubacek<sup>1,2</sup>, Tereza Javornicka<sup>3</sup>, Jana Sumova<sup>1</sup>, Blanka Krausova<sup>1</sup>, Irena

Kasparovska<sup>1</sup>, Květa Bláhová<sup>4</sup>, Miloš Černý<sup>5</sup>, Miroslav Zajac<sup>1</sup>

1. Department of Medical Microbiology, Motol University Hospital, Prague, Czech Republic

2. Department of Paediatric Haematology and Oncology, 2<sup>nd</sup> Medical Faculty of Charles University and Motol University Hospital, Prague, Czech Republic

3. Faculty of Nature, Charles University, Prague, Czech Republic

4. Department of Paediatrics, 2<sup>nd</sup> Medical Faculty of Charles University and Motol University Hospital, Prague, Czech Republic

5. Neonatology Unit, Department of Gynaecology and Obsterics, Motol University Hospital, Prague, Czech Republic

Key words: cytomegalovirus, genotype

The study was performed in the Teaching Hospital Motol, Prague, Czech Republic

Running title: CMV in sucklings

Address for correspondence and reprints:

Petr Hubacek, M.D., Ph.D.

Department of Medical Microbiology

2<sup>nd</sup> Medical Faculty, Charles University in Prague, Motol University Hospital, Czech  
Republic

V Uvalu 84, Prague 5 - CZ 150 06 The Czech Republic,

Phone: +420 224 435 380 Fax: +420 224 435 352 E-

mail:petr.hubacek@lfmotol.cuni.cz

**Abstract:**

Cytomegalovirus (CMV) remains an important cause of congenital and early postnatal infections both symptomatic and asymptomatic leading occasionally to severe long term sequels such as sensorineural hearing loss, or visual impairment. We tested 592 samples from 95 neonates and infants below 1 yr of age at the time of the first sampling. Median quantity of CMV positive whole blood samples from 12 neonates was 6.42 CMV normalised viral copies (NVCs) and 6.50 NVCs in the rest of the positive infants (equals the median quantity of  $7.5 \times 10^3$ /ml in 9 neonates and median quantity  $8.5 \times 10^5$ /ml in 30 sucklings respectively). In the positive samples, CMV genotyping using gB and gH types was performed. At least one glycoprotein was detected in 77 patients (in 9 one glycoprotein only, 9 mixed strain infections and 59 patients with only one CMV strain detected).

***Introduction:***

Importance of human cytomegalovirus (CMV) in general population increases due to wider impact of CMV described both in immunocompetent and immunocompromised host. One of the major highlights of the CMV presently is the impact of the infection on developing fetus during the pregnancy, same as the unknown impact on the sucklings during the early post-natal infection. Recently, congenital CMV (cCMV) infection is described in about 0.5-1.0% of the living neonates[7, 8, 10]. Clinical symptoms described in cCMV are intrauterine growth retardation, prematurity, hepatopathy, splenomegaly, microcephaly, CNS calcifications, petechiae and pulmonary symptoms. The long term sequels of this infection are mainly sensorineural hearing loss, visual impairment, mental retardation, seizures and motoric dysfunction and rarely death. Unfortunately such clinical symptoms can be observed in about 10-20% of cases only; 80-90% of the infants with congenital CMV are born in term and asymptomatic[7, 8, 10]. Despite the frequency of long term sequels, especially progressive sensorineural hearing loss which can develop during first years of age, are observed in symptomatic children much more frequently (about 40-60%) comparing to about 10% in asymptomatic neonates, total numbers of children suffering of the sequels of cCMV is higher among the asymptomatic neonates[7, 8, 10]. Recent focus on cCMV is connected also with details of the CMV infection, such as different CMV genotypes, might be important for development of the sequels[3, 4, 9].

Therefore, we aimed on quantification and genotyping of CMV in the sucklings positive during testing in Virology laboratory of Motol University Hospital within the years 2002-2014.

***Patients and methods:***

We tested 69 whole blood and 30 urine samples from 17 neonates at the time of the first sample (median 4 days of age at the first sampling) and 387 whole blood and 64 urine samples from 78 sucklings below 1 year of age at the first sampling and 42 additional biological samples (most frequently CFS) from 17 children (4 neonates). All children (61 boys and 33 girls) were sampled due to clinical suspicion and possible symptoms of the CMV infection, including 4 children that were after allogeneic Haematopoietic stem cell transplantation. Urine samples were extracted using UltraClean Blood Spin DNA Isolation Kit (MoBio, Carlsbad, CA, USA) and whole blood samples were extracted using QiaAmp Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Quantitative real-time PCR detection of CMV was performed as published previously[6] at the time of sampling. Results were normalised to 10,000 human genome equivalents and expressed as normalized viral copies (NVCs) as published previously and as copies/ml of urine. Samples were subsequently stored at -20°C. After introduction of the genotyping assays discriminating the CMV genotypes by glycoprotein B and H (gB and gH) into 4 types of gB and 2 of gH, we tested the stored samples according the previously published assays[2, 5].

***Results:***

CMV was detected in 317 samples. Median quantity of CMV in 18 positive whole blood samples from 12 positive neonates was 6.42 CMV NVCs (range 2.24-376.65 NVCs) and 6.50 NVCs (range 0.19-13,095 NVCs) in the rest of the positive whole blood samples and children respectively. Calculating the CMV results to 1 ml of the whole blood sample shows the median quantity  $7.5 \times 10^3$ /ml (range  $5 \times 10^2$ - $8.1 \times 10^6$ ) in our patients.

CMV in urine was detected in 9 neonates with median quantity  $8.14 \times 10^6$ /ml (range  $1 \times 10^4$ - $5.6 \times 10^9$ ) and in 30 sucklings with median quantity  $8.5 \times 10^5$ /ml (range  $3.1 \times 10^3$ - $9.2 \times 10^8$ ). In 33 patients, we tested both whole blood and urine sample and in all patients both samples were positive. CMV was detected also in 3 samples of CSF from 2 neonates and 1 suckling with a quantity of ( $2 \times 10^3$  CMV/ml,  $5 \times 10^3$  CMV/ml and  $1.6 \times 10^6$  CMV/ml respectively). In one of these neonates, huge porencephalic cysts were detected 3 days after the delivery by magnetic resonance imaging (MRI) (Figure 1). Longest continual detection in case of cCMV was 355 days from the first positive sample in peripheral blood samples and 421 days in urine in the same patient; median of observed continuous CMV positivity among the patients with post natal infection was 625 days (range 13-989 days).

CMV genotypes were tested in 231 samples from presented patients and determined in 187 samples 11 neonates and 66 sucklings. In 9 patients, genotype of gB or gH was detected only and in 9 infants (1 neonate), infection with more than one CMV strain was detected. Most frequently detected genotypes were gB1gH2 in 14 children (1 neonate) and gB1gH1 in 13 children (1 neonate). Frequency of genotypes is shown in Table 1.



***Discussion:***

CMV infection among the neonates and young infants remains at the focus of the research[7, 8, 10]. Long term sequels are of major importance due to severe impairment of the hearing and visual ability, and likely also the other more distinct impacts of the cCMV on the brain.

Detected quantity of CMV is in agreement with the lower CMV quantities detected in peripheral blood and urine samples in neonates same as in transplant recipients described [1, 3, 6]. Long lasting shedding in the urine samples is also well described and our results confirm such observation in our cohort[1].

According to the data published by deVries et al., our result confirm the observation of higher frequency of gH2 detected among our patients, but different proportion of the gB types because we observed most frequently gB2 among the neonates and gB1 among the rest of the patients, we also did not observed higher proportion of the gB3[3].

Interestingly, even early detection of the CMV in the CSF and morphological abnormalities are not certain of severe clinical sequels. Girl presented in Figure 1 (having mixed CMV strain infection detecting the gB2,3 gH1 in the urine; only gB3 gH1 was detected in the CSF) was treated with ganciclovir 10 mg/kg/day in two doses for 3 weeks and in one year of age, there was no CMV attributable impairment observed and the psychomotorical development was almost as supposed to be too.

Our more or less epidemiological data further documents the complexity of CMV infection during the early life. It is certain, that more detailed studies aimed on impact and pathogenicity of different CMV strains and the biological characteristics are needed.

Support by grant of the Ministry of Health of the Czech Republic NT-13691.

**References:**

1. CANNON, M. J., HYDE, T. B., SCHMID, D. S. Review of cytomegalovirus shedding in bodily fluids and relevance to congenital cytomegalovirus infection. *Rev Med Virol*, 2011, vol. 21, no. 4, s. 240-255.
2. DE VRIES, J. J., et al. Cytomegalovirus DNA detection in dried blood spots and perilymphatic fluids from pediatric and adult cochlear implant recipients with prelingual deafness. *J Clin Virol*, 2012, vol. 56, no. 2, s. 113-117.
3. DE VRIES, J. J., et al. Rapid genotyping of cytomegalovirus in dried blood spots by multiplex real-time PCR assays targeting the envelope glycoprotein gB and gH genes. *J Clin Microbiol*, 2012, vol. 50, no. 2, s. 232-237.
4. GANDHOKE, I., et al. Glycoprotein B genotyping in congenital/perinatal Cytomegalovirus infection in symptomatic infants. *Indian Pediatr*, 2013, vol. 50, no. 7, s. 663-667.
5. GORZER, I., et al. Virus load dynamics of individual CMV-genotypes in lung transplant recipients with mixed-genotype infections. *J Med Virol*, 2008, vol. 80, no. 8, s. 1405-1414.
6. HUBACEK, P., et al. HHV-6 DNA throughout the tissues of two stem cell transplant patients with chromosomally integrated HHV-6 and fatal CMV pneumonitis. *Br J Haematol*, 2009, vol. 145, no. 3, s. 394-398.
7. LAZZAROTTO, T., et al. Diagnosis and prognosis of congenital CMV infection: A case report and review of the literature. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 2014, vol. 74, no. 244, s. 34-40.
8. MANICKLAL, S., et al. The "silent" global burden of congenital cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev*, 2013, vol. 26, no. 1, s. 86-102.
9. ROSS, S. A., et al. Mixed infection and strain diversity in congenital cytomegalovirus infection. *J Infect Dis*, 2011, vol. 204, no. 7, s. 1003-1007.

10. SWANSON, E. C., SCHLEISS, M. R. Congenital cytomegalovirus infection: new prospects for prevention and therapy. *Pediatr Clin North Am*, 2013, vol. 60, no. 2, s. 335-349.

**Figure 1.**

Porencephalic cysts shown in frontal brain indicated by the arrow on MRI at 3 days of age.



**Table 1.**

Frequency of different CMV genotypes in tested infants.

| <b>CMV genotype</b>                         | <b>No. of neonates (%)</b> | <b>No. of sucklings (%)</b> | <b>Total</b> |
|---|----------------------------|-----------------------------|--------------|
| <b><i>Single genotype</i></b>               |                            |                             |              |
| <i>gB1 gH1</i>                              | 1 (9.1%)                   | 12 (15.2%)                  | 13           |
| <i>gB1 gH2</i>                              | 1 (9.1%)                   | 13 (19.7%)                  | 14           |
| <i>gB2 gH1</i>                              | 2 (18.2%)                  | 2 (3.0%)                    | 4            |
| <i>gB2 gH2</i>                              | 3 (27.3%)                  | 6 (6.0%)                    | 9            |
| <i>gB3 gH1</i>                              | 1 (9.1%)                   | 5 (7.6%)                    | 6            |
| <i>gB3 gH2</i>                              | 0                          | 3 (4.5%)                    | 3            |
| <i>gB4 gH1</i>                              | 0                          | 7 (10.6%)                   | 7            |
| <i>gB4 gH2</i>                              | 2 (18.2%)                  | 1 (1.5%)                    | 3            |
| <b><i>Infection with more genotypes</i></b> |                            |                             |              |
| <i>gB1 gH1,2</i>                            | 0                          | 2 (2.0%)                    | 2            |
| <i>gB1,2,4 gH2</i>                          | 0                          | 1 (1.5%)                    | 1            |
| <i>gB1,4 gH1,2</i>                          | 0                          | 1 (1.5%)                    | 1            |
| <i>gB2,4 gH1,2</i>                          | 0                          | 1 (1.5%)                    | 1            |
| <i>gB2,3 gH1</i>                            | 1 (9.1%)                   | 0                           | 1            |
| <i>gB2,3 gH2</i>                            | 0                          | 2 (3.0%)                    | 2            |
| <i>gB3 gH1,2</i>                            | 0                          | 1 (1.5%)                    | 1            |
| <b><i>Detection of gB or gH only</i></b>    | 0                          | 9 (13.6%)                   | 9            |

Příloha č. 2. Abstrakt přijatý na 17. ročník European Society for Clinical Virology (2014)  
CMV genotypes in patients after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation.

Tereza Javornická<sup>1</sup>, Jana Šumová<sup>2</sup>, Irena Kašparovská<sup>2</sup>, P. Keslová<sup>3</sup>, M. Kouba<sup>4</sup>, M. Zajac<sup>2</sup>, M. Šťastná<sup>4</sup>, P. Sedláček<sup>3</sup>, P. Cetkovský<sup>4</sup>, P. Hubáček<sup>2,3</sup>

1. Faculty of Nature, Charles University, Prague
2. Department of Medical Microbiology, Motol University Hospital, Prague
3. Department of Paediatric Hematology and Oncology, 2<sup>nd</sup> Medical Faculty of Charles University and Motol University Hospital, Prague
4. Institute of Haematology and Blood Transfusion, Prague

#### Introduction:

Human cytomegalovirus is one of the most important viral pathogens in patients after haematopoietic stem cell transplantation (HSCT). Better characterisation of CMV infections might give us the informations about impact of different CMV genotypes on the prognosis of the patient, including survival, presence of severe complications or risk of development of resistance and so help for better patient's tailored therapy in the future. Genotyping was performed using UL55 gene (coding glycoprotein B) and UL74 gene (coding glycoprotein H).

#### Methods:

We genotyped 1697 CMV positive samples from 135 children and 332 adult patients after allogeneic HSCT at Department of Paediatric Haematology and Oncology of Motol University Hospital and Institute of Haematology and Blood Transfusion between January 2002 and January 2013. DNA was extracted using Qiagen QiaAmp DNA Blood Mini and DNA Mini Kits from biological samples (from whole blood and in minor cases from other biological tissues). Samples were primarily used for prospective CMV DNA testing and were subsequently stored at -20°C. Genotyping was performed using real-time PCR technology on Applied Biosystems 7500 and Bio-Rad CFX96 machines using specific primers and MGB-probes aimed at specific sequence of gB1-4 and gH1 and gH2 genotypes.

#### Results:

CMV genotype was detected 1213 samples from 116 children and 297 adult patients. A single CMV strain was detected in 1,021 (84.17 %) samples from 89 (76.72%) children and 200 (67.34%) adult patients. Mixed infection caused by two or more CMV strain was detected in another 192 samples (15.83 %) from 27 children and 97 adult patients. Most frequently detected genotypes in "single strain" infection were gB1gH2 (detected in 350 samples from 25 children and 69 adults) and gB1gH1 (detected in 250 samples from 23 children and 44 adults). Most frequently detected strains in "mixed strains" infections were gB1gH1gH2 (in 41 samples from 21 patients) and gB1gB3gH1gH2 (in 43 samples from 19 patients). Likely due to long lasting storage and slow DNA degradation or due to enormously low CMV quantity in the samples, we were not able to detect any CMV genotype in samples from 54 patients.

#### Conclusions:

Mixed CMV strain infections are quite frequent among patients after allogeneic HSCT patients with higher frequency among adult patients. Detailed analysis of clinical consequences of viral infections including CMV are necessary for better understanding of both direct and indirect impact of the CMV on the outcome of HSCT recipients. Supported by grant of Internal Grant Agency of Ministry of Health of Czech Republic NT/13691-4.