



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

**Výskyt lidských adenovirů v biologických vzorcích
dýchacích cest u pacientů FN Motol.**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ/

ZDRAVOTNÍ LABORANT

Autor: Veronika Nováková

Vedoucí práce: Mgr. Miroslav Zajac

České Budějovice 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem: Výskyt lidských adenovirů v biologických vzorcích dýchacích cest u pacientů FN Motol, jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské/diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské/diplomové práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské/diplomové práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 4. 8. 2020

Poděkování

Děkuji Mgr. Miroslavu Zajacovi za pomoc při vedení bakalářské práce. Mé poděkování patří též Ing. Aleši Briksímu za cenné rady, věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích. Také děkuji laboratoři molekulární genetiky profesora MUDr. Ondřeje Cinka, Ph.D. za pomoc při sekvenování. V neposlední řadě patří díky mým kolegyním, přátelům a rodině za veškerou podporu při studiu.

Výskyt lidských adenovirů v biologických vzorcích dýchacích cest u pacientů FN MOTOL

Abstrakt

Lidské adenoviry se vyskytují celosvětově a způsobují endemické a epidemické onemocnění. Adenovirové infekce jsou spojeny s vysokou morbiditou a mortalitou zejména u pediatrických příjemců krvetvorných kmenových buněk. Bakalářská práce se zabývá srovnáním komerční a in-house soupravy na detekci lidských adenovirů. Cílí na zlepšení diagnostiky adenovirových infekcí ve Fakultní nemocnici v Motole, především u imunokompromitovaných pacientů, kde je včasná a přesná diagnostika důležitá.

Teoretická část práce obsahuje charakteristiku adenovirů, jejich klinické projevy a nemoci a využití při experimentální léčbě. Praktická část práce je zaměřená na screening vzorků dýchacích cest pomocí kvantitativní in-house soupravy a její porovnání s dříve provedenou detekcí pomocí komerční soupravy AnyplexTM II RV16.

Přítomnost adenovirů byla testována v 1881 vzorcích od 1420 pacientů s příznaky respirační infekce pomocí real-time PCR. Celkem se adenovirus podařilo detekovat ve 187 vzorcích (9,9%) od 169 pacientů (11,9%). Sto vzorků (53,5%) bylo pozitivních oběma metodami, 26 (13,9%) jen pomocí komerční detekce a 61 (32,6%) pozitivních pouze in-house metodou. Adenoviry byly nejčastěji detekovány na Pediatrické klinice, Klinice dětské hematologie, dále také u dospělých imunosuprimovaných pacientů z III. chirurgické kliniky a Kliniky anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny. U všech pozitivních vzorků byla provedena následně sekvenace hypervariabilního úseku 1-6 hexonového genu přičemž reprezentativní sekvenci k identifikaci se nám podařilo získat u 70 vzorků. Nejčastěji byly detekovány genotypy C2 (25,7 %), A31 (24,3 %), B3 (15,7 %) a C1 (11,4 %). Z 26 vzorků pozitivních pouze soupravou AnyplexTM II RV16, se podařila sekvenace u 3 vzorků, které byly identifikovány jako genotyp B3, naopak v případě vzorků pozitivních pouze in-house soupravou bylo z 61 vzorků identifikováno 15 vzorků jako genotyp A31 a 3 vzorky jako AdV skupiny C.

Srovnání souprav ukazuje na nedostatečnou citlivost komerční soupravy AnyplexTM II RV16 pro detekci adenovirů.

Klíčová slova

Lidský adenovirus; DNA viry; hexon; real-time PCR; sekvenace

Detection of human adenoviruses from the respiratory samples from the patients of Motol University Hospital

Abstract

Human adenoviruses are world-wide pathogens causing endemic and epidemic outbreaks of disease. Adenoviral infections are related with high morbidity and mortality especially among the paediatric allogeneic haematopoietic stem cell recipients. Presented work is comparing the commercial and in-house assay for detection of the adenoviruses to improve the diagnostics of these viruses in Motol University Hospital, especially among the immunocompromised patients, in which is the rapid and precise detection highly important.

Theoretical part of work presents the characteristics of adenoviruses, clinical symptoms and diseases of the adenoviral infection, their use in the experimental therapy. Practical part is aiming the screening of the respiratory tract samples with quantitative in-house test and comparing of the results with previously performed detection by commercial Anyplex™ II RV16 test.

Detection of adenoviruses was performed in 1,881 samples from 1,420 patients with symptoms of respiratory tract infection by real-time PCR. In total, adenovirus was detected in 187 samples (9.9%) from 169 patients (11.9%). One hundred samples (53.5%) was positive by both methods, 26 (13.9%) with commercial detection only and 61 (32.6%) was positive only with in-house assay. Most frequently, adenoviruses were detected among the patients from Dept. of Paediatrics, Dept. of Paediatric Haematology and Oncology and from adult patients from 3rd Dept. of Surgery and Dept. of Anaesthesiology, resuscitation and intensive medicine. In all positive samples, subsequent sequence analysis of hypervariable part of 1-6 hexon gene was performed and representative sequence for identification was obtained in 70 samples. Most frequently detected adenovirus genotypes were C2 (25.7 %), A31 (24.3 %), B3 (15.7 %) a C1 (11.4 %). From 26 samples positive by Anyplex™ II RV16, only 3 samples were identified (all as genotype B3). Contrary, among 61 positive samples detected only with in-house assay, 15 samples were identified as genotype A31 and 3 as AdV from group C.

Our results shows the lower sensitivity of the commercial test in detection of adenoviruses.

Key words

Human adenovirus; DNA viruses; hexon; real-time PCR; sequencing

Obsah

1.1	Obecný úvod - viry	10
1.2	Obecný úvod - adenoviry	11
2.	Adenoviry	12
2.1	Klasifikace	12
2.2	Struktura virionu a nukleové kyseliny	13
2.3	Životní cyklus viru	16
2.4	Epidemiologie	17
2.5	Sterilizace	17
2.6	Klinické příznaky.....	17
2.6.1	Respirační infekce	17
2.6.2	Oční infekce	18
2.6.3	Genitourinární infekce	18
2.6.4	Gastrointestinální infekce	18
2.6.5	Infekce u imunokompromitovaných pacientů	18
2.7	Diagnostika	20
2.8	Terapie	20
2.9	Vakcína.....	21
2.10	Genová terapie	21
3.	Cíle práce a hypotézy	22
4.	Metodika.....	23
4.1	Pacienti	23
4.2	Izolace materiálu.....	23
4.3	Real-time PCR a amplifikace	23
4.3.1	Detekce pomocí soupravy Anyplex TM II RV16.....	23
4.3.2	Detekce pomocí in-house soupravy	25

4.4	<i>Sekvenace pozitivních PCR produktů</i>	26
4.5	<i>Agarózová elektroforéza</i>	29
4.6	<i>Přečištění PCR produktu</i>	30
4.7	<i>Amplifikace pro sekvenci</i>	30
4.8	<i>Přečištění sekvenačního produktu a sekvenace</i>	31
4.9	<i>Bioinformatická analýza</i>	32
5.	<i>Výsledky</i>	33
6.	<i>Diskuse</i>	36
7.	<i>Závěr</i>	39
8.	<i>Seznam literatury</i>	40
9.	<i>Seznam zkratk</i>	43

Úvod

1.1 Obecný úvod - viry

Viry jsou nebuněčná infekční agens, která se mohou reprodukovat pouze v živé buňce. Viry napadají všechny známé živé organismy od rostlin, hmyzu a živočichů po bakterie a archea. Viry doprovázejí lidstvo po celou dobu jeho existence. Za objevitele virů jsou považováni Rus Dmitrij Ivanovský a Holanďan Martinus Beijerinck. Ivanovský v roce 1892 filtroval přes bakteriální filtry extrakt listů tabáku nakažených virem tabákové mozaiky a zjistil, že si tento extrakt zachoval infekční vlastnosti i po bakteriální filtraci. V roce 1898 nezávisle zopakoval tento experiment Beijerinck, který dospěl k závěru, že zkoumaný virus je novým druhem infekčního agens, který označil *contagium vivum fluidum*, což znamená, že se jedná o živý, reprodukuující se organismus, který se liší od ostatních organismů. Löffler a Frosch stejným způsobem v roce 1898 prokázali nebakteriální, ale infekční původ slintavky a kulhavky. V dalších pokusech pak vědci prokázali, že viry se nedokáží rozmnožovat na živných půdách používaných pro kultivaci bakterií a že ke svému růstu potřebují živé buňky hostitelského organismu (Blaškovič, 1978; Campbell and Reece, 2008).

Viry se velmi liší svou velikostí, tvarem a symetrií. Jsou to infekční částice tvořené nukleovou kyselinou uzavřenou v bílkovinném obalu a v některých případech ještě obklopenou membránovým obalem. Jejich genom může sestávat z dvouřetězcové nebo jednořetězcové DNA nebo z dvouřetězcové nebo jednořetězcové RNA, v závislosti na druhu viru. Nejmenší viry mají jen čtyři geny, zatímco ty největší jich mají několik set až něco přes tisíc. Bílkovinná schránka, která obklopuje virový genom, se nazývá kapsida. Kapsidy jsou složeny z velkého množství bílkovinných podjednotek nazývaných kapsomery a mají dva základní typy symetrie - ikosahedrální a helikální (Campbell and Reece, 2008).

1.2 Obecný úvod - adenoviry

Lidské adenoviry (AdV) u běžné populace způsobují nejčastěji onemocnění dýchací soustavy od běžného nachlazení až po pneumonii. Ale jsou spojeny i s řadou jiných klinických projevů, včetně gastroenteritidy, hepatitidy, keratokonjunktivitidy, meningoencefalitidy, cystitidy a myokarditidy. Infekce AdV jsou snadno přenosné a v některých případech vysoce nakažlivé. U běžné populace jsou klinické průběhy obvykle mírné (Lion, 2014, 2019).

U imunokompromitovaných jedinců s poškozenou imunitní odpovědí mohou adenovirové infekce probíhat těžce a mohou být spojeny s vysokou morbiditou a mortalitou (Lion, 2014).

Pokroky v molekulárních a genetických metodách umožnily detekci, typizaci a monitorování adenovirových infekcí. AdV i nadále poskytují klinické výzvy týkající se diagnostiky a léčby. Roste počet typů AdV identifikovaných genomovou analýzou. S ohledem na klinický význam život ohrožujících onemocnění AdV u imunokompromitovaných pacientů je zapotřebí rychlých diagnostických postupů a vysoce účinných léčebných protokolů, které nemají významné vedlejší účinky (Lion, 2014).

2. Adenoviry

2.1 Klasifikace

AdV taxonomicky patří do čeledi Adenoviridae a rodu Mastadenovirus. Označení druhů závisí na několika charakteristikách jako je fylogenetická vzdálenost, organizace genomu (v oblasti E3, hexonu, pentonu a fiberu), složení nukleotidů, schopnost rekombinace, onkogenita u hlodavců, spektrum hostitelů, zkřížená neutralizace, počet regulačních genů a hemaglutinace. Dříve byly AdV identifikovány, charakterizovány a klasifikovány pomocí serologických neutralizačních a hemaglutinačně inhibičních testů, ale v poslední době tyto metody vytěsňuje genomová a bioinformatická analýza celého virového genomu (Lion, 2014; Ismail *et al.*, 2018).

AdV jsou klasicky rozděleny na základě serologických reakcí do sedmi druhů (A až G), s celkem 103 rozpoznávanými genotypy (Tab. 1) s celými genomovými sekvencemi v GenBank, včetně původních 51 „sérotypů“ - určených serologicky, které jsou nyní všechny plně sekvenovány. Viry patřící k jednotlivým druhům AdV vykazují vysokou vzájemnou podobnost na úrovni nukleotidů a běžně se rekombinují se členy jiných typů. Nové kmeny tedy mohou vznikat jak mutací, tak rekombinací dvou různých kmenů adenoviru (Rajčáni and Čiampor, 2006; Lion, 2014, 2019). Lidský adenovirový druh D (AdV-D) rekombinuje rychleji a častěji než ostatní druhy a z tohoto důvodu patří většina nově identifikovaných typů AdV na základě genomové analýzy do druhu D (Lion, 2014; Ismail *et al.*, 2018).

Tabulka 1. Současné spektrum známých AdV dle (Lion, 2014, 2019)

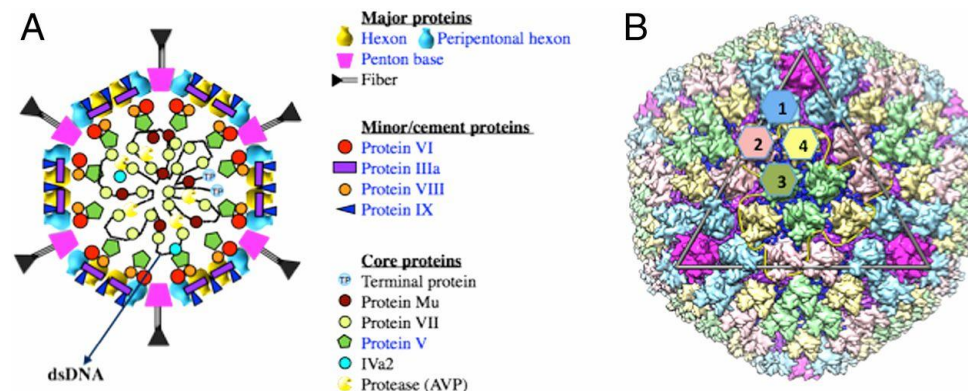
Skupina	Sérotypy/genotypy	Klinické projevy
A	12, 18, 31, 61	gastrointestinální, respirační a urogenitální onemocnění, meningoencefalitida
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50, 55, 56, 66, 68, 76-79	keratokonjunktivitida, respirační onemocnění, meningoencefalitida
C	1, 2, 5, 6, 57, 89	respirační onemocnění, hepatitida
D	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51, 53, 54, 56, 58-60, 63-65, 67, 69-75, 80-88, 90-103	gastrointestinální onemocnění, keratokonjunktivitida, meningoencefalitida
E	4	keratokonjunktivitida, respirační onemocnění
F	40, 41	gastrointestinální onemocnění
G	52	gastrointestinální onemocnění

2.2 Struktura virionu a nukleové kyseliny

Lidské adenoviry jsou neobalené DNA viry o průměru 70 až 100 nm. Vnější proteinový obal vytváří ikosaedr, který je tvořen 20 trojúhelníkovými plochami, 30 hranami a 12 vrcholy. Adenovirovou kapsidu tvoří nejméně 7 polypeptidů (proteiny II, III, IIIA, IV, VI, VIII, IX) (obr. 1). Základními proteiny kapsidu jsou hexon (protein II) a penton (protein III), ke kterému je připojen fiber (vláknitý výběžek - protein IV). Všechny tři hlavní kapsidové proteiny jsou imunogenní. Fazety kapsidy se skládají z 240 hexonů a 12 pentonů. Penton se vyskytuje v každém vrcholu kapsidy, ze kterého vyčnívá fiber (Burrell *et al.*, 2017; Pacesa *et al.*, 2017).

Fiber obsahuje tři strukturální domény: koncová část, tělo a kulovité zakončení. Koncová část je vazebným místem pro pentonovou bázi. Tělo fiberu má různé délky mezi typy AdV, což vede k různé flexibilitě vlákna a rozdílu v interakci s integriny hostitelských

buněk. Kulovité zakončení se váže na jeden z několika receptorů hostitelských buněk. Fiber zodpovídá za hemaglutinační vlastnosti.



Obrázek 1. Struktura a organizace lidského adenoviru

A: Schématické znázornění organizace kapsidových a jádrových proteinů v lidském adenoviru. Umístění různých proteinů je reprezentováno různými barevnými symboly a odpovídající názvy jsou zobrazeny vedle obrázku vpravo.

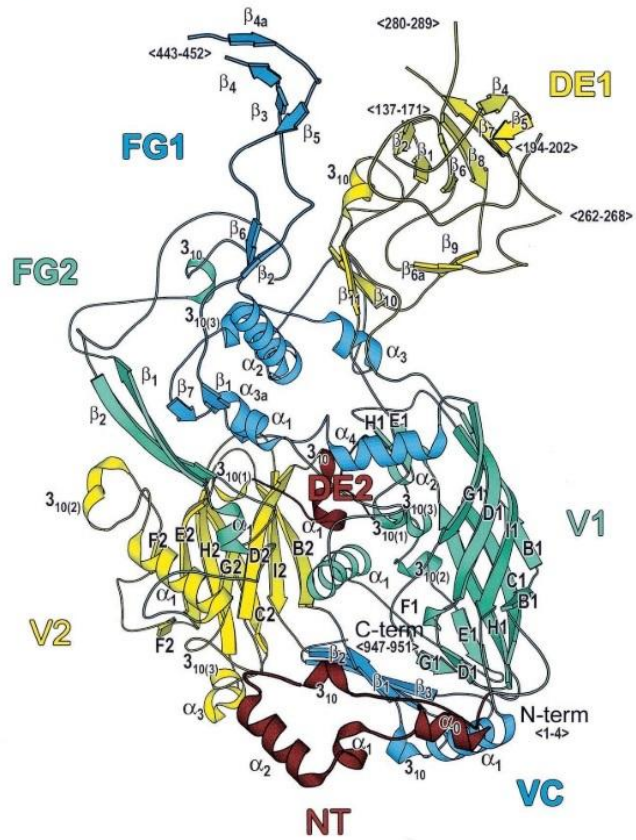
B: Celková organizace podjednotek hexonové a pentonové báze. Hexony(1-4) jsou barevně rozlišeny ve světle modré, růžové, zelené a khaki. Vrcholy pentonu jsou zobrazeny purpurově. Proteiny vnějšího obalu IIIa a IX jsou označeny fialově a modře. Obrys ikosaedrické fazety je znázorněn jako šedý trojúhelník. (Reddy and Nemerow, 2014)

Protein hexon tvoří trimér hexonových podjednotek (obr. 2), jejichž hypervariabilní oblasti (HVR) tvoří tři smyčky DE1, FG1 a FG2, které leží na vnější straně virionu a pokrývají téměř celý jeho vnější povrch. HVR tvoří 9 oblastí hexonového proteinu a 6 z nich se nachází na smyčce DE1, tři v úseku FG1 (Rux *et al.*, 2003). Sekvenování hypervariabilních oblastí hexonového genu se často používá k typizaci AdV. Sérologická klasifikace je založena na reakci protilátek proti hexonu a fiberu. (Lion, 2014).

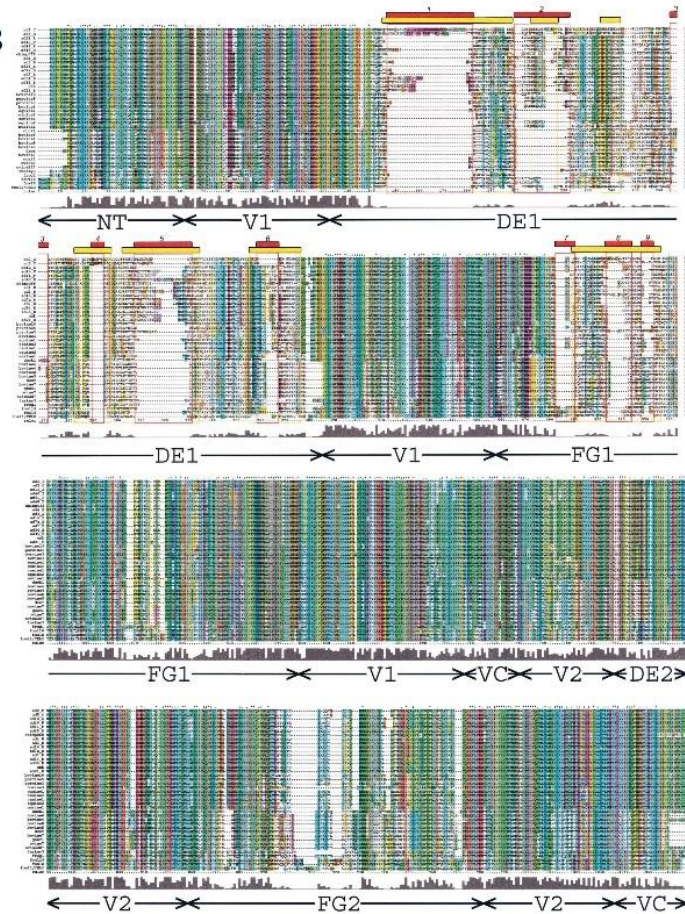
Menší kapsidové proteiny IIIa, VI, VIII a IX propůjčují stabilitu hexonové skořápce a celému virionu, podílejí se na penetraci do endosomů, transkripční aktivaci a jaderné reorganizaci (Rajčáni and Čiampor, 2006; Ismail *et al.*, 2018). Další proteiny v jádru kapsidy (proteiny V, VII, X a terminální protein) interagují s virovou DNA a napomáhají jejímu transportu do jádra infikované buňky (Lion, 2014).

Virová DNA je spojena se čtyřmi vnitřními jádrovými proteiny (Mu, VII, V a terminální protein), které jsou součástí iniciačního komplexu při replikaci (Rajčáni and Čiampor, 2006; Ismail *et al.*, 2018).

A



B



Obrázek 2. Struktura hexonu (Rux *et al.*, 2003)

A: Krystalografická struktura monomeru hexonu se smyčkami DE1, FG1 a FG2 tvořící vnější povrch virové kapsidy

B: Bioinformatická analýza hexonového proteinu s vyznačením hypervariabilních oblastí 1-9 (označeny červeně).

AdV obsahují dvouvláknovou lineární DNA o velikosti genomu v rozmezí od 34 do 38 kbp a nesoucí přibližně 40 genů. Všechny AdV sdílejí podobnou organizaci genomu, který je rozdělen na časně, střední a pozdní oblasti odpovídající infekčnímu cyklu viru a odrážejícímu transkripční vzory. Genom je organizovaný do 6 časných oblastí (E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4), které jsou zapotřebí při replikaci viru. E3 transkripční jednotka je vysoce divergentní mezi druhy AdV a také kóduje proteiny modulující imunitní reakci hostitele. Střední oblast (opožděná časná) obsahuje tři transkripční jednotky (IX, IVa2 a E2 late) a pozdní transkripční jednotka nakonec generuje pět pozdních mRNA (L1-L5), které se podílejí na produkci zralých virionů (Rajčáni and Čiampor, 2006; Burrell *et al.*, 2017).

2.3 Životní cyklus viru

Adenovirový fiber reaguje s řadou receptorů hostitelské buňky, což vede k přichycení viru a jeho průniku do buňky. Většina adenovirů se váže na receptor CAR (coxsackie a adenovirus receptor), který se vyskytuje na polarizovaných epiteliálních buňkách a na MCP (membrane cofactor protein) nebo CD46, které se vyskytují na různých buňkách hostitele. Většina adenovirů nevyužívá CAR a CD46 současně s výjimkou adenovirů skupiny D. Po navázání viru na receptor dochází k endocytóze zprostředkované integriny, následnému „vysvlečení“ (uncoating) viru s pomocí virových proteáz a k odstranění fiberů s pomocí kyselého pH v endozómu. Následuje transport částečně rozrušené kapsidy s pomocí mikrotubulů k jádru, kde se přichytí k jadernému póru NPC (nuclear pore complex). Vysvobozený virový genom proniká přes NPC do jádra buňky, kde je zahájena syntéza nové virové DNA. Ke složení virové kapsidy dochází v jádru a virus se uvolňuje z buňky její lýzou. Po lytické infekci může virus perzistovat v citlivých buňkách, zejména v lymfoidních orgánech jako jsou adenoidy, mandle a Peyerovy pláty (Ghebremedhin, 2014; Ryu, 2017; Khanal, 2018)

2.4 Epidemiologie

Adenoviry se vyskytují celosvětově a způsobují endemická i epidemická onemocnění. Endemický výskyt je celoroční, sezónní výskyt závisí na typu viru a populační skupině. Epidemie adenovirových respiračních nemocí jsou obvyklé v zimě a na podzim. Adenoviry se přenášejí přímým kontaktem, aerosolem z malých kapének, fekálně-orální cestou a někdy i vodou. Zhruba u 50 % nakažených probíhá infekce asymptomaticky. Pacienti s poškozenou T-buněčnou imunitou mají zvýšené riziko závažného průběhu adenovirových infekcí. Inkubační doba trvá průměrně 7-13 dní s rozpětím 2 až 21 dní (Richman, Whitley and Hayden, 2017).

2.5 Sterilizace

Protože jsou adenoviry neobalené viry, jsou odolné vůči mnoha dezinfekčním prostředkům. Ošetření povrchů alkoholickými roztoky (85 až 95%) po dobu nejméně 2 minut nebo chlornanem sodným po dobu 10 minut je účinné při inaktivaci viru. Účinná dekontaminace povrchů má zásadní význam, zejména na transplantačních jednotkách a jednotkách intenzivní péče, tak aby se zabránilo přenosu u imunosuprimovaných pacientů (Lion, 2014).

2.6 Klinické příznaky

Adenoviry vyvolávají celou řadu onemocnění. Primoinfekce adenovirů často probíhá bez charakteristických klinických příznaků (Burrell *et al.*, 2017).

2.6.1 Respirační infekce

Akutní respirační infekce se vyskytují zejména u malých dětí a jsou klinicky podobné infekcím způsobeným jinými respiračními viry. Dítě má kašel, překrvenou sliznici nosu a horečku, hrdlo je zaníceno a často dochází k exsudativní tonzilitidě, která se podobá streptokokové infekci skupiny A. Za tyto běžné infekce jsou zodpovědné nejčastěji

adenoviry 1 až 7, které jsou relativně triviální, s výjimkou případů, kdy dochází k zánětu středního ucha nebo pneumonii (Lynch and Kajon, 2016; Burrell *et al.*, 2017).

2.6.2 Oční infekce

Faryngokonjunktivální horečka se často vyskytuje v malých epidemiích, například v dětských letních táborech a je spojena s typy B3 a B7. Adenovirus E4 způsobil řadu nozokomiálních epidemií zánětu spojivek nebo faryngokonjunktivální horečky u nemocničního personálu. Závažnější oční infekcí je epidemická keratokonjunktivitida, která začíná jako folikulární konjunktivitida a postupně postihuje rohovku (keratitida). Často se vyskytuje jako epidemie způsobená adenoviry D8, D19 a D37. Adenovirus D37 je dnes převládající příčinou epidemické keratokonjunktivitidy (Lynch and Kajon, 2016; Burrell *et al.*, 2017).

2.6.3 Genitourinární infekce

Cervicitida a uretritida jsou běžnými projevy virové infekce adenovirem D37. Hemoragická cystitida, pozorovaná hlavně u mladých chlapců, je způsobena adenovirem B11 a vzácněji adenovirem B21. Adenoviry obvykle asymptomaticky perzistují v ledvinách a mohou se vylučovat v moči po dobu měsíců i roků. Toto je možné vidět zejména u příjemců transplantované ledviny (Lynch and Kajon, 2016; Burrell *et al.*, 2017).

2.6.4 Gastrointestinální infekce

Gastroenteritidy jsou nejčastěji vyvolávány u dětí adenovirem F40 a F41. U zdravých dětí mohou způsobit gastroenteritidu i další typy AdV (A31, D51, D58, G52). AdV jsou detekovány u 3-14 % stolic u dětí s gastroenteritidou. Ale řada adenovirů replikujících se v sliznici střeva i krku je vylučována asymptomaticky ve stolici po dobu týdnů až měsíců (Fong *et al.*, 2010; Burrell *et al.*, 2017).

2.6.5 Infekce u imunokompromitovaných pacientů

U dětí se závažným kombinovaným onemocněním imunitní nedostatečnosti mohou běžné adenoviry způsobovat vážné stavy (Tab. 2), jako je pneumonie nebo meningoencefalitida. U příjemců transplantátu, zejména u dětí po transplantaci kmenových buněk krvetvorby, a pacientů s AIDS patří mezi nejčastěji hlášené typy adenovirů typy A-C

(C1, C2, C5, A12, A31, B3, B11, B16, B34 a B35) se silnou převahou typu C ve většině případů. Může se u nich vyvinout vysoká horečka, pneumonie, hemoragická cystitida, encefalitida, hepatitida nebo nefritida. Pacienti s AIDS mohou také vylučovat ve stolici adenoviry 43 až 47 (Georgiev, 1997; Burrell *et al.*, 2017). Infekce ADV po transplantaci krvetvorných kmenových buněk (HSCT) se vyskytuje u 2–9 % dospělých a u 15–23 % pediatrických příjemců. Zejména u dětí, lékaři provádějí aktivní preventivní dohled PCR detekcí AdV v krvi a ve stolici. U symptomatického pacienta se provádí testování u větší škály vzorků, např. u vzorků dýchacích cest nebo moči (Lion, 2014; Burrell *et al.*, 2017; Cesaro *et al.*, 2018)

Tabulka 2. Přehled nejčastějších adenovirových onemocnění a hlavních sérotypů u imunokompetentních a imunokompromitovaných jedinců dle (Echavarría, 2008)

Klinické projevy	Hlavní sérotyp (y)					
	A	B	C	D	E	F
Onemocnění horních cest dýchacích		Všechny	Všechny			
Onemocnění dolních cest dýchacích		3, 7, 21			4	
Pertussis syndrom			5			
Akutní respirační onemocnění		7, 14, 21			4	
Akutní zánět spojivek		7	1, 2, 3		4	
Akutní hemoragická konjunktivitida		11				
Faryngokonjunktivální horečka		3, 7				
Epidemická keratokonjunktivitida				8, 19, 37		
Gastroenteritida						40, 41
Hemoragická cystitida		7, 11, 34, 35				
Hepatitida		3, 7	1, 2, 5			
Myokarditida		7, 21				
Meningoencefalitida		7	2, 5			
Pohlavní nemoci			2			
Diseminované onemocnění	31	11, 34, 35	1, 2, 5			40

2.7 Diagnostika

Diagnostická metoda závisí na typu onemocnění a získaném vzorku. Detekce viru svědčí pro adenovirovou infekci, ale nemusí nutně znamenat klinické onemocnění. Diagnostika adenovirových infekcí se primárně provádí přímými metodami. Ty zahrnují izolaci virové DNA a detekci specifického úseku DNA. Elektronová mikroskopie a celogenomové sekvenování není v klinických laboratořích běžně používáno. Nepřímá sérologická diagnostika je omezena v důsledku nedostatku citlivosti při nedostatečné produkci protilátek, zejména u imunokompromitovaných pacientů. Sérologické vyšetření by proto mělo být omezeno na epidemiologická šetření nebo na potvrzení asociace mezi detekcí viru a neobvyklými klinickými výsledky (Echavarría, 2008).

Pro přímou detekci viru se používají molekulární metody. V posledních letech vývoj a aplikace molekulárních metod s použitím amplifikace DNA pomocí PCR zvýšily citlivost a rychlost diagnostiky (Echavarría, 2008).

2.8 Terapie

Zatím neexistuje žádný antivirový lék, který byl schválen k léčbě AdV. Mezi aktuálně používaná antivirotika patří Cidofovir, analog cytosinového nukleotidu, který inhibuje DNA polymerázu. Nežádoucí účinky léčby zahrnují nefrotoxicitu, myelosupresi a uveitidu. Nedávno byl vyvinut antivirový lék brincidofovir, což je derivát cidofoviru, spojený s lipidy. Lipidová konjugace zlepšuje orální biologickou dostupnost a zvyšuje intracelulární koncentraci aktivního léčiva. Brincidofovir, na rozdíl od cidofoviru, není nefrotoxický (Hiwarkar *et al.*, 2017).

Důležité je poznamenat, že ne všichni pacienti s infekcemi AdV nebo virémií vyžadují léčbu. Prospektivní studie u příjemců transplantace orgánů nebo transplantace krvetvorných kmenových buněk používající PCR detekci viru v plasmě v pravidelných intervalech zjistily, že až 58 % pacientů bylo asymptomatických v době virémie (Lynch and Kajon, 2016).

2.9 Vakcína

V USA se v letech 1971-1999 používala živá perorální vakcína složená z adenovirových typů E4 a B7, která se podávala vojenskému personálu. Během této doby významně poklesl výskyt adenovirových infekcí ve vojenských kolektivech. V roce 2011 došlo k obnovení výroby této vakcíny. Bezpečnost a účinnost této vakcíny nebyla studována u běžné populace ani u lidí s oslabeným imunitním systémem a není schválena pro použití mimo armádu. V současné době není v České republice k dispozici žádná vakcína proti adenoviru (Burrell *et al.*, 2017; Richman, Whitley and Hayden, 2017).

2.10 Genová terapie

Genová terapie je experimentální léčba, která zahrnuje zavedení genetického materiálu do buněk člověka za účelem léčby nebo prevence onemocnění. Vědci studují genovou terapii řady onemocnění, jako například hemofilie, Parkinsonova choroba, rakovina. Gen může být dodán do buňky použitím nosiče zvaného jako vektor. Nejběžnějšími používanými typy vektorů jsou viry (Wickham, 2000; Genetherapy.net, 2019). Pro jejich schopnost infikovat mnoho typů buněk jsou adenoviry jedny z možných vektorů. Problémy mohou vznikat s preexistující nebo získanou antiadenovirovou imunitou. Konzervativní přístup k překonání této překážky spočívá v návrhu a použití adenovirových vektorů s modifikovanými hexony. Zdaleka nejběžnějším sérotypem vektorů založených na adenoviru pro lidskou genovou terapii je AdV C5 (Rux, Kuser and Burnett, 2003). Jejich virová DNA v hostitelské buňce vytváří tvar uzavřeného kruhu. Tato forma se neintegruje do chromozómu. Vložené geny můžeme umístit v oblasti E1, E3 nebo E4. Při vkládání cizorodých genů se obvykle postupuje tak, že dochází k částečné nebo úplné delecii původních virových genů. Nejčastěji se vkládají do oblasti E1, takže rekombinovaný adenovirus ztrácí schopnost aktivovat transkripci vlastních genů (Rajčáni and Čiampor, 2006). Adenoviry jsou tedy vysoce všestranné organismy se širokým spektrem klinických rolí a aplikací (Lion, 2014).

3. Cíle práce a hypotézy

1. Rešerše: Výskyt AdV u imunokompetentních a imunosuprimovaných pacientů.
2. Screening vzorků dýchacích cest na přítomnost AdV in-house soupravou.
3. Porovnání výsledků s již provedeným rutinním testováním pomocí soupravy Anyplex™ II RV16 od firmy Seegene.
4. Sekvence AdV z pozitivních izolátů.

4. Metodika

4.1 Pacienti

Byly použity vzorky izolátů nukleových kyselin z různých materiálů horních a dolních cest dýchacích (nazofaryngeální výtěr, bronchoalveolární laváž, sputum, aspirát) pacientů Fakultní nemocnice v Motole. Bylo použito 1881 vzorků z let 2013-2015, které byly po izolaci uloženy v mrazáku na -80 °C.

4.2 Izolace materiálu

Izolace nukleových kyselin byla provedena pomocí soupravy Seeprep12TM na extračním přístroji Seeprep12 od firmy Seegene podle návodu výrobce. K 530 μ l vzorku bylo přidáno 10 μ l proteinázy K a 10 μ l RV16 interní kontroly, extrakce nukleových kyseliny (NK) proběhla pomocí technologie magnetických partikulí a eluční objem izolované NK byl 60 μ l.

4.3 Real-time PCR a amplifikace

4.3.1 Detekce pomocí soupravy AnyplexTM II RV16

Již dříve provedená rutinní detekce vzorků proběhla pomocí komerční soupravy AnyplexTM II RV16 (RV16) od firmy Seegene využívající TOCETM technologii (Dae-Hoon, 2012; Jong-Yoon, 2012). Ihned po izolaci vzorku byla provedena reverzní transkripce pro detekci respiračních RNA virů ve vzorku. Na ledu bylo do mikrozkušavky s víčkem napipetováno 2 μ l Random Hexameru a 8 μ l NK izolovaného vzorku. Syntéza komplementární DNA (cDNA) pro real-time PCR proběhla dle teplotního protokolu uvedeného v (Tab. 3) na termocycleru Veriti 96 well od firmy Applied Biosystems.

Tabulka 3. Teplotní protokol reverzní transkripce soupravy AnyplexTM II RV16

teplota [°C]	čas	1 cyklus
25	5 min	
37	60 min	
95	2 min	

Přehled detekovaných virů komerční soupravou Anyplex™ II RV16 uvádí Tab. 4. AdV byly detekovány v panelu A pomocí sondy FAM. Bylo potřeba připravit dvě reakční směsi pro panel A a panel B (Tab. 5 a 6).

Tabulka 4. Přehled panelů multiplex PCR

Panel A	Panel B	Sonda
PIV4, AdV	MPV, HBoV	FAM
PIV1, PIV2, PIV3	CoV 229E, CoV NL63, CoV OC43	HEX
FluA, FluB, HRV	RSVA, RSVB, HEV	CAL Red 610
IC	IC	Quasar 670

Tabulka 5. Příprava master mixu pro panel A

	v 1 reakci [μl]
5x RV16 OM A	4
8 - mop	4
5x Anyplex PCR Master Mix	4

Tabulka 6. Příprava master mixu pro panel B

	v 1 reakci [μl]
5x RV16 OM B	4
8 - mop	4
5x Anyplex PCR Master Mix	4

Na ledu bylo napipetováno 12 μl PCR master mixu do 0,2ml PCR zkumavek. Do jedné master mix A a do druhé master mix B. K master mixu do obou zkumavek bylo přidáno 8 μl připravené cDNA. Byl použit teplotní program dle Tab. 7.

Tabulka 7. Teplotní protokol real-time PCR detekce soupravy Anyplex™ II RV16

	teplota [°C]	čas	
denaturace	95	15 min	50 cyklů
denaturace	95	30 s	
hybridizace	60	1 min	
syntéza	72	30 s	
	55	30 s	

4.3.2 Detekce pomocí in-house soupravy

Screening vzorků dýchacích cest na přítomnost AdV byl proveden pomocí in-house detekční soupravy, kde byla použita sada primerů a hybridizační sonda (Tab. 8) navržené dle Tiveljung-Lindell *et al.* (2009). Příprava master mixu je uvedena v (Tab. 9).

Tabulka 8. Použitá sada primerů

Název	orientace	sekvence (5' → 3')
Adenovirus-F	forward	GCCCCAGTGGTCTTACATGCACATC
Adenovirus-R	reverse	GCCACGGTGGGGTTTCTAAACTT
Sonda		HEX- TGCACCAGMCCSGGGCTAGGTAC- BHQ1

Tabulka 9. Master mix in-house souprava

	Finální konc.	v 1 reakci [μl]
H ₂ O		7,82
PCR pufr + MgCl ₂ (15mM)	1 x	1,5
MgCl ₂ (25mM)	1,6 + 1,5 mM	1
50% glycerol	5%	1,5
dNTP (4 x 5 mM)	100 μM	0,3
primer mix (20 μM)	666 nM	0,5
sonda (HEX) (10 μM)	200 nM	0,3
Qiagen HotMaster polymerase (5 U/μl)	0,0267 U/μl	0,08 (0,4U)

Z forwardového a reversového primeru o základní koncentraci 100 mM byl připraven primer mix v koncentraci 20 μ M dle Tab. 10

Tabulka 10. Příprava primer mixu

reagencie	objem (μ l)
forward primer	90
reverse primer	90
H ₂ O for injection	270

Na ledu do mikrozkušavky s víčkem bylo napipetováno 13 μ l master mixu a 2 μ l DNA templátu. Jako pozitivní kontroly byly použity AdV A31 o koncentraci 10 kopií na μ l a AdV C2 o koncentraci 100 kopií na μ l pocházející ze sbírek Ústavu lékařské mikrobiologie. Reakce PCR proběhla dle teplotního protokolu (Tab. 11) na termocycleru CFX96 od firmy Bio-Rad.

Tabulka 11. Teplotní protokol screening in-house souprava

	teplota [$^{\circ}$ C]	čas	
denaturace	95	15 min	50 cyklů
denaturace	94	15 s	
syntéza	60	1 min	

4.4 *Sekvence pozitivních PCR produktů*

1. kolo touchdown real-time PCR bylo provedeno pomocí in-house detekční soupravy, kde byla použita modifikovaná sada degenerovaných primerů (Tab. 12) dle Okada *et al.*, (2007) detekující HVR1-6 hexonového genu. Master mix pro polymerázovou řetězovou reakci byl připraven v poměru reagensů dle (Tab. 13)

Tabulka 12. Použitá sada primerů 1. kolo PCR

Název	Orientace	Sekvence (5' → 3')
Adhex-GT3F_AB	forward	CSGGNCAGGAYGCYTCGGARTA
Adhex-GT2R-new	reverse	CNCCCATRTTDCGTRCTRTT

Tabulka 13. Master mix pro 1. kolo touchdown real-time PCR in-house souprava

	Finální konc.	v 1 reakci [μl]
H ₂ O		8,14
PCR pufr + MgCl ₂ (15mM)	1 x	1,5
MgCl ₂ (25mM)	1,6 + 1,5 mM	1
50% glycerol	5%	1,5
dNTP (4 x 5 mM)	100 μM	0,3
primer mix (20 μM)	666 nM	0,5
Qiagen HotMaster poly (5 U/μl)	0,02 U/μl	0,06

Do reakce bylo pipetováno 2 μl DNA templátu a 13 μl master mixu. Reakce touchdown PCR byla provedena dle teplotního protokolu (Tab. 14) na termocykleru CFX96 od firmy Bio-Rad.

Tabulka 14. Teplotní protokol 1 kolo PCR

	teplota [°C]	čas	
denaturace	95	15 min	
denaturace	94	30 s	8 cyklů (každý cyklus pokles o 1 °C)
hybridizace	63 - 56	30 s	
syntéza	72	1 min	
denaturace	94	30 s	10 cyklů (každý cyklus pokles o 0,5 °C)
hybridizace	55 - 51	30 s	
syntéza	72	1 min	
denaturace	94	30 s	25 cyklů
hybridizace	50	30 s	
syntéza	72	1 min	
konec	72	10 min	

Správné délky fragmentů pozitivních vzorků byly ověřeny pomocí elektroforézy na agarózovém gelu a negativní a slabě pozitivní vzorky byly použity do druhého kola touchdown real-time PCR.

2. kolo touchdown real-time PCR bylo provedeno pomocí in-house detekční soupravy, kde byla použita modifikovaná sada degenerovaných primerů dle Okada *et al.* (2007) detekující HVR1-6 hexonového genu (Tab. 15). Master mix pro polymerázovou řetězovou reakci byl připraven dle Tab. 16.

Tabulka 15. Použitá sada primerů 2. kolo PCR

Název	Orientace	Sekvence (5' → 3')
Adhex-GT2F	forward	CACCCATGTTRCCWGTNCTGTT
Adhex-GT1R-new	reverse	TTRTCYCTRAANSCRATGTARTT

Tabulka 16. Master mix pro 2. kolo touchdown real-time PCR in-house souprava

	Finální konc.	v 1 reakci [μl]
H ₂ O		9,14
PCR pufr + MgCl ₂ (15mM)	1 x	1,5
MgCl ₂ (25mM)	1,6 + 1,5 mM	1
50% glycerol	5%	1,5
dNTP (4 x 5 mM)	100 μM	0,3
primer mix (20 μM)	666 nM	0,5
Qiagen HotMaster poly (5 U/μl)	0,02 U/μl	0,06 (0,3 U)

Do reakce byl použit 1 μl amplifikovaného vzorku z prvního kola PCR a 14 μl master mixu. Druhé kolo reakce PCR bylo provedeno dle teplotního protokolu (Tab. 17) na termocykleru CFX96 od firmy Bio-Rad.

Tabulka 17. Teplotní protokol 2 kolo PCR

	teplota [°C]	čas	
denaturace	95	15 min	
denaturace	94	30 s	8 cyklů
hybridizace	65 - 58	30 s	
syntéza	72	1 min	
			(každý cyklus pokles o 1 °C)
denaturace	94	30 s	10 cyklů
hybridizace	57 - 53	30 s	
syntéza	72	1 min	
			(každý cyklus pokles o 0,5 °C)
denaturace	94	30 s	20 cyklů
hybridizace	52	30 s	
syntéza	72	1 min	
konec	72	10 min	

4.5 Agarózová elektroforéza

Z prvního i druhého kola touchdown real-time PCR byly pozitivní produkty ověřeny elektroforézou na agarózovém gelu. PCR produkt v objemu 5 µl byl smíchan s 1 µl nášecí barvičky (6x DNA loading Dye od firmy Thermo Scientific™). Elektroforéza probíhala v elektroforetické vaně v ředěném 0,5x TBE pufru na 1,5 % agarosovém gelu (TopVision LE GQ Agarosa od firmy Fermentas) při konstantním napětí 150 V 35 minut. Při přípravě gelu byl jako fluorescenční látka pro detekci NK použit 1 µl ethidium bromidu. Amplifikován byl produkt přibližně o velikosti 1000 bp, velikost produktu záleží na konkrétním genotypu. Jako srovnávací vzorek byl nanesen DNA ladder (GeneRuler 100 bp DNA Ladder SM0241 od firmy Thermo Scientific™) obsahující fragmenty o známých molekulových hmotnostech. Pro digitalizaci výsledků byl použit dokumentační systém Quantum ST4 od firmy Vilber Lourmat.

4.6 Přečištění PCR produktu

Přečištění proběhlo na přístroji Biomek 3000, pomocí magnetických partikulí. V destičce bylo k 10 μ l PCR produktu přidáno 18 μ l AMPure (Agencourt AMPure XP od firmy Beckman Coulter). Proběhla inkubace 5 minut při pokojové teplotě a destička byla přenesena na magnetický stojánek. K imobilizaci partikulí byly potřeba 3 minuty, poté byl pipetou odsát supernatant. Partikule byly 2x promyty 200 μ l 75% ethanolem a vždy byl odsát supernatant. Proběhlo sušení 5 minut při pokojové teplotě, kde byl odpařen zbytek alkoholu. Destička byla vyjmuta z magnetického stojánku a bylo přidáno 40 μ l injekční vody. Takto přečištěný PCR produkt byl použit do sekvenační reakce.

4.7 Amplifikace pro sekvenci

Sekvenační reakce byla provedena pro každý primer zvlášť, tedy reverse i forward primer měl vlastní reakční směs. Do mikrozkušavky bylo napipetováno 2 μ l PCR produktu a 8 μ l mixu. Reakční směs byla připravena dle Tab. 18 a reakce byla puštěna dle sekvenačního protokolu (Tab. 19) na termocycleru Veriti 96 well od firmy Applied Biosystems.

Tabulka 18. Reakční směs pro sekvenační reakci

	v 1 reakci [μ l]
H ₂ O	5,43
5x sequencing buffer	1,75
Sekvenační směs BigDye Terminator 3.1	0,5
sekvenační primer (20 μ M)	0,313

Tabulka 19. Teplotní protokol pro sekvenační reakci

	teplota [°C]	čas	
denaturace	96	1 min	
denaturace	96	10 s	25 cyklů
hybridizace	55	5 s	
syntéza	60	4 min	
syntéza	72	7 min	

4.8 *Přečištění sekvenačního produktu a sekvenace*

Přečištění sekvenačního produktu proběhlo na přístroji Biomek 3000, pomocí magnetických partikulí. V destičce bylo k 10 μ l produktu sekvenační reakce přidáno 10 μ l CleanSEQ (Agencourt CleanSEQ od firmy Beckman Coulter) a 40 μ l 85% ethanolu. Destička byla přesunuta na magnetický stojánek. Byly potřeba 4 minuty k imobilizaci partikulí, poté byl pipetou odsát supernatant. Partikule byly 2x promyty 100 μ l 85% ethanolem a po inkubaci 1 minuta při pokojové teplotě byl vždy odsát supernatant. Proběhlo sušení 10 minut při pokojové teplotě, kde byl odpařen zbytek alkoholu. Destička byla sundána z magnetického stojánku a bylo přidáno 80 μ l 0,05 mM kyseliny ethylen-diamintetraoctové (EDTA), proběhla inkubace 5 minut při pokojové teplotě. Takto přečištěný sekvenační produkt byl použit k separaci na kapilární elektroforéze (16ti kapilárový sekvenátor abi 3130xl).

4.9 Bioinformatická analýza

Bioinformatická analýza byla provedena pomocí komerčního programu Geneious Prime (verze 2019.2.3, Biomatters Ltd.). Typizace byla prováděna pomocí identifikace hypervariabilních oblastí 1-6 v genu hexonu. Forwardové a reverzové sekvence AdV byly spojeny pomocí nástroje De Novo Assemble pomocí assembleru Geneious při nejvyšší senzitivitě. Sekvence byly manuálně revidovány a konsenzuální sekvence byly porovnávány s databází Národního centra pro biotechnologické informace NCBI pomocí nástroje Nucleotide Blast. Na základě podobnosti byl následně určen genotyp Adenoviru.

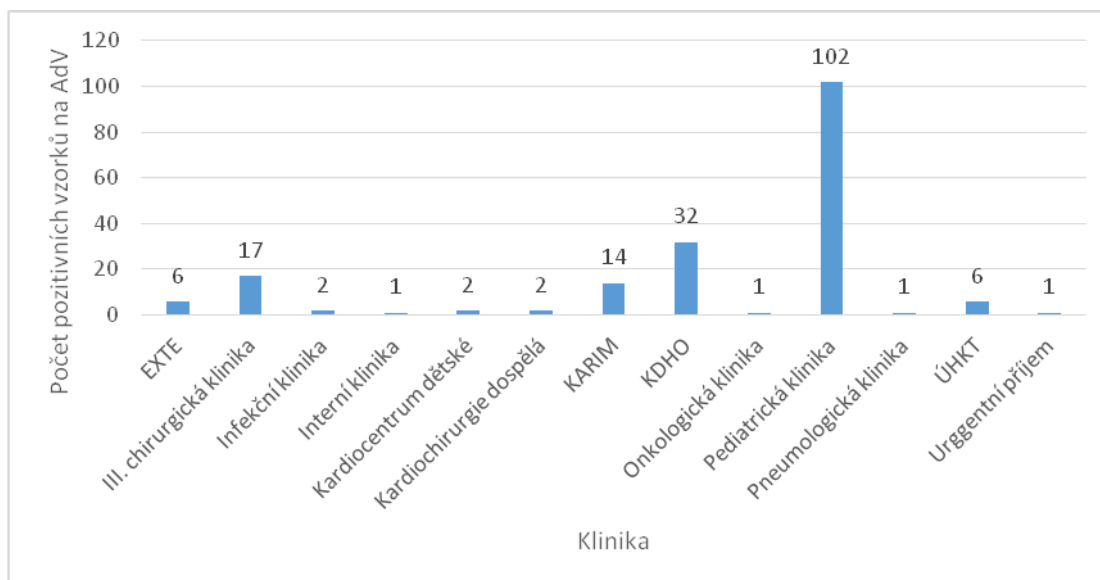
5. Výsledky

Pomocí kvantitativní in-house detekční soupravy bylo retrospektivně testováno 1881 vzorků od 1420 symptomatických pacientů na respirační infekce z let 2013-2015, průběžně vyšetřovaných soupravou Anyplex™ II RV16, a to včetně 80 vzorků inhibovaných při prvotní detekci komerční soupravou (4,25 % ze všech testovaných vzorků). Ze vzorků hodnocených komerční soupravou jako inhibované se u 5 z nich prokázala pozitivita adenoviru pomocí testované in-house soupravy. Porovnání testované in-house metody s komerční soupravou Anyplex™ II RV16 je prezentováno v tabulce (Tab. 20), ze které je patrné, že 1699 vzorků bylo negativních a 100 vzorků bylo pozitivních na adenovirus pomocí obou souprav. Ve 26 případech byla pozitivita AdV prokázána pouze soupravou Anyplex™ II RV16 a v 56 případech byla pozitivita AdV prokázána pouze in-house soupravou. Pro jednotlivé soupravy byla spočítána senzitivita a specifická testu, která činila pro Anyplex™ II RV16 64,1 % a 98,5 %, v případě in-house soupravy se jednalo o hodnoty 79,4 % a 96,8 %.

Tabulka 20. Porovnání detekčních souprav na AdV - původní detekční systém Anyplex™ II RV16 a in-house soupravy

		Anyplex™ II RV16		
in-house souprava		Pozitivní	Negativní	Celkem
	Pozitivní	100	56	156
	Negativní	26	1699	1725
	Celkem	126	1755	1881

Pozitivita adenovirů byla častěji detekována u dětí, a to zejména z Pediatrické kliniky (102 pozitivních vzorků), Kliniky dětské hematologie (32) a dále pak u dospělých imunosuprimovaných pacientů z III. chirurgické kliniky (17) a Kliniky anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny (14) (Obr. 3).



Obrázek 3. Výskyt pozitivních Adenovirů dle kliniky; EXTE – Externí stanice; KARIM – Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny; KDHO – Klinika dětské hematookologie; ÚHKT – Ústav hematologie a krevní transfuze

U všech 187 pozitivních vzorků od 169 pacientů, které vyšly pozitivní na AdV z Anyplex™ II RV16 a/nebo in-house soupravy, byla provedena amplifikace hypervariabilního úseku 1-6 hexonového genu. Reprezentativní sekvence byla získána od 70 vzorků, což představovalo úspěšnost sekvenování 37,4 %.

Podářilo se zachytit genotypy A31, B21, B3, C1, C2, C5, C6, D19 nebo D64, E4 a F41, přičemž nejčastěji byly detekovány genotypy C2 (25,7 %), A31 (24,3 %), B3 (15,7 %) a C1 (11,4 %). Z úspěšně sekvenovaných vzorků pozitivních pouze metodou RV16 byly všechny tři identifikovány jako AdV B3, v případě vzorků pozitivních pouze metodou in-house bylo 15 vzorků identifikováno jako AdV A31 a tři vzorky jako AdV skup. C (Tab. 21).

Záchyt jednotlivých genotypů AdV na jednotlivých klinikách udává (Tab. 22). Na pediatrické klinice byl nejčastěji detekován AdV skup. C (24 případů, 66,7 %). Na KDHO byl naopak nejčastěji detekován AdV A31 (12 případů, 60 %).

Tabulka 21. Záchyt jednotlivých genotypů AdV včetně porovnání detekčních souprav Anyplex™ II RV16 (RV16) a in-house (IH); + = pozitivní, - = negativní, i = inhibice

Genotyp AdV	RV16 + IH +	RV16 + IH -	RV16 -/i IH +	celkem	Procentuální zastoupení genotypů z úspěšně sekvenovaných vz.
A31	2		15	17	24,3%
B21	2			2	2,9%
B3	8	3		11	15,7%
C1	7		1	8	11,4%
C2	17		1	18	25,7%
C5	4		1	5	7,1%
C6	3			3	4,3%
D19 nebo D64	1			1	1,4%
E4	2			2	2,9%
F41	3			3	4,3%
celkem	49	3	18	70	

Tabulka 22. Výskyt genotypů adenovirů dle kliniky; EXTE – Externí stanice; KARIM – Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny; KDHO – Klinika dětské hematoonkologie

Klinika	A31	B21	B3	C1	C2	C5	C6	D19 NEBO D64	E4	F41
EXTE	1		2			1				
III. chirurgická klinika					3					
Infekční klinika	1								1	
Interní klinika		1								
KARIM	1	1			1					
KDHO	12		2	3		2				1
Pediatrická klinika	2		6	5	14	2	3	1	1	2
Pneumologická klinika			1							

6. Diskuse

Souprav pro testování adenovirů ze vzorků dýchacích cest existuje velké množství, ať už jako in-house metody nebo jako komerční soupravy. Čím dál tím častější je testování celé palety různých respiračních virových infekcí, v nichž nemohou chybět adenoviry.

Hlavním úskalím je však design souprav pro detekci adenovirů. Jelikož adenovirů existuje více jak 100 různých typů (Lion, 2019) řazených do sedmi různých skupin, najít vhodné konzervativní místo v jejich genomu může být dosti problematické. I proto je i v naší práci z uvedených přímerů patrné, že se pro tuto detekci používají tzv. degenerované primery, kdy na jednom místě mohou být při syntéze primeru, či sondy použity dva a více nukleotidů (viz. Tab. 8, 12 a 15). Tímto způsobem lze zlepšit citlivost pro detekci různých genotypů adenovirů. I tak je ale vhodné použité primery řádně otestovat na různých genotypech, což dnes, v rámci certifikačního procesu, zaměřeného zejména na procedurální správnost výroby a přípravy kitu, není vždy řádně provedeno.

I proto se může snadno stát, že různé soupravy nedokážou detekovat všechny známé sekvence a zaměřují se jen na určité z nich. Často se tak různé soupravy zaměřují jen na skupiny adenovirů způsobující respirační nebo gastrointestinální obtíže. Bohužel u většiny komerčních kitů, včetně testovaného je získání detailních informací od detekovaných genotypech adenovirů od výrobce často problematické a následný výčet teoreticky detekovatelných genotypů většinou nedostatečný. Protože však v rámci certifikačního procesu jsou splněny podmínky spojené se sledováním a doložením veškeré dokumentace, má valná většina souprav zaměřených na detekci adenovirů v návodu informaci zcela lakonickou a zavádí uživatele tím, že se detekují adenoviry, tedy v očích uživatele všechny adenovirové genotypy. V případě testované sady Anyplex[™] RV16 II jsme pozorovali i případ pacientky po transplantaci kmenových buněk krvetvorby, která na diseminovanou a symptomatickou adenovirovou infekci zemřela s obrovskou virovou náloží v periferní krvi a orgánech, ale komerční soupravou byla na detekci adenovirů negativní.

Výše uvedené je pak vidět i na dalších prezentovaných datech při porovnání soupravy Anyplex[™] II RV16 s in-house metodou detekce dle Tiveljung-Lindell *et al.* (2009) ukazuje značnou rozdílnost v detekci pozitivit, kdy 87 vzorků bylo pozitivních pouze jednou soupravou a druhou nikoliv, přičemž záchytnost adenovirů byla vyšší u in-house metody (161 AdV+ in-house versus 126 AdV+ RV16). In-house metoda vykazuje vyšší

citlivost i přes fakt, že se jednalo o retrospektivní testování dlouhodobě zamražených izolátů a mohlo docházet k postupné degradaci nukleové kyseliny.

Pouze od 37,4 % pozitivních vzorků na adenoviry byla získána reprezentativní sekvence. Důvodem nízké výtěžnosti je pravděpodobně slabá pozitivita AdV ve vyšetřovaném materiálu. Výsledky typizace adenovirů ze vzorků z dýchacích cest jsou až na výjimky ve shodě s publikovanými daty. Detekce skupin A, B, C a E je často popisována (Lion, 2014, 2019).

Průkaz adenoviru skupiny D u jednoho pacienta s akutním zánětem očnice, infektem horních cest dýchacích a průjmy koreluje s daty Nakamura *et al.* (2012) kde prokázali AdV D19 u pacientů s ketarokonjunktivitidou. Naše souprava typizuje adenoviry pouze na základě úseku hexonového genu, a proto není schopná od sebe odlišit typy AdV D19 od AdV D64, které sdílejí stejnou sekvenci hexonu. Navíc dle Zhou *et al.* (2012) původní typ AdV D19 charakterizovaný poprvé v roce 1955 nebyl asociován s infekcemi oka, oproti nově klasifikovanému AdV D64, jehož infekčnost byla testována v *in vitro* a *in vivo* modelech. Bez sekvenování jiného úseku DNA AdV nebo ještě lépe detailního celogenomového sekvenování našeho izolátu nelze přesně určit, o jaký přesný typ AdV se jedná.

Překvapivým nálezem byla detekce AdV F41 u 3 vzorků z dýchacích cest od třech pacientů. Tento typ se běžně přisuzuje gastrointestinálním potížím, nikoliv jako původce respiračních infekcí. U dvou pacientů byl ve zdravotnické dokumentaci dohledán rozvoj průjmů. Poprvé byl v literatuře popsán záchyt AdV F41 ze vzorku dýchacích cest ve studii Echavarría *et al.* (2006), která zmíněný gastrointestinální typ detekovala u dvou pacientů. Záchyt typu F41 zaznamenali ve své studii na 7921 vzorcích z nazofaryngeálních výtěrů i Sriwanna *et al.* (2013), a to konkrétně u 2 vzorků z 82 pozitivně testovaných na adenoviry. Alkhalaf, Guiver and Cooper (2013) prokázali pozitivitu AdV F41 z biopsií tonsil u jednoho pacienta. Z výše uvedených dat je patrné, že dogmatické dělení adenovirů na respirační a gastrointestinální typy neplatí a měly by být používány diagnostické nástroje, které postihnou i méně typické případy adenovirových infekcí.

Velkým problémem soupravy AnyplexTM II RV16 je fakt, že 15 vzorků pozitivních na AdV A31 pocházejících hlavně z Kliniky dětské hematologie bylo detekováno jako negativních. Tento typ se podílí na vzniku lokálních epidemií u pacientů po

transplantaci kostní dřeně s možnými fatálními následky při vzniku diseminované adenovirové nemoci (Hofmayer *et al.*, 2009). Leruez-Ville *et al.* (2006) popsala mezi lety 2002-2005 patnáct případů virémie adenovirů u pacientů po transplantaci kostní dřeně, přičemž u 7 případů byl detekován typ AdV A31. Z důvodu stejného místa, času (jaro až léto 2013) a výsledků typizace hexonového genu předpokládají, že šlo o nozokomiální infekci. Swartling *et al.* (2015) rovněž popisuje u své retrospektivní studie z let 2011-2012 rozvoj epidemie AdV A31 u devíti imunosuprimovaných pacientů. Nozokomiální epidemiologickou spojitost AdV A31 u třech imunosuprimovaných pacientů po transplantaci kostní dřeně uvádí ve své práci Margetts *et al.* (2018), kteří vzorky analyzovali pomocí celogenomového sekvenování. Jelikož ve Fakultní nemocnici v Motole existuje velké dětské transplantáčnické centrum, kde se provede ročně mezi 30-40 alogenními transplantacemi kostní dřeně, musí virologická laboratoř disponovat soupravou pro detekci co největší palety AdV, včetně AdV A31, což souprava AnyplexTM II RV16 nespĺňuje a v současné době již není pro rutinní diagnostiku respiračních virů využívána.

7. Závěr

Byl úspěšně proveden screening u 1881 zamražených nukleových kyselin ze vzorků dýchacích cest z let 2013-2015 u pacientů Fakultní nemocnice v Motole pomocí in-house soupravy. U pozitivních vzorků na AdV byla provedena sekvenace s výtěžností 37,4 %. Důvodem nízké výtěžnosti je pravděpodobně slabá pozitivita AdV ve vyšetřovaném materiálu. Srovnáním výsledků souprav in-house s komerční soupravou Anyplex™ II RV16 ukazuje na nedostatečnou citlivost komerční soupravy pro detekci AdV, hlavně typu AdV A31. V současné době Fakultní nemocnice v Motole pro rutinní vyšetření adenovirů soupravou Anyplex™ II RV16 ani testovanou in-house soupravu nevyužívá.

Příklad této komerční soupravy pak ale jasně ukazuje nutnost kritického myšlení při využívání komerčních souprav, kdy CE IVD certifikace nemusí nutně znamenat správnou detekci a může být pro další uvažování o péči o pacienta spíše zavádějící, než nápomocná.

8. Seznam literatury

- Alkhalaf, M. A., Guiver, M. and Cooper, R. J. (2013) 'Prevalence and quantitation of adenovirus DNA from human tonsil and adenoid tissues', *Journal of Medical Virology*, 85(11), pp. 1947–1954. doi: 10.1002/jmv.23678.
- Blaškovič, D. (1978) *Základy lékařské virologie*. Bratislava: Veda.
- Burrell, C. J. *et al.* (2017) 'Chapter 18 – Adenoviruses', *Fenner and White's Medical Virology*, pp. 263–271. doi: 10.1016/B978-0-12-375156-0.00018-7.
- Campbell, N. and Reece, J. (2008) *Biologie*. Computer Press (CPress).
- Cesaro, S. *et al.* (2018) 'A survey on incidence and management of adenovirus infection after allogeneic HSCT', *Bone Marrow Transplantation*. Nature Publishing Group, p. 1. doi: 10.1038/s41409-018-0421-0.
- Dae-Hoon, L. (2012) 'TOCE: Innovative Technology for High Multiplex Real-time PCR', *Seegene Bulletin 1*, 1, pp. 5–10.
- Echavarría, M. *et al.* (2006) 'Use of PCR To Demonstrate Presence of Adenovirus Species B, C, or F as Well as Coinfection with Two Adenovirus Species in Children with Flu-Like Symptoms', *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 44(2), pp. 625–627. doi: 10.1128/JCM.44.2.625-627.2006.
- Echavarría, M. (2008) 'Adenoviruses in immunocompromised hosts.', *Clinical microbiology reviews*. American Society for Microbiology (ASM), 21(4), pp. 704–15. doi: 10.1128/CMR.00052-07.
- Fong, T. T. *et al.* (2010) 'Quantitative detection of human adenoviruses in wastewater and combined sewer overflows influencing a Michigan river', *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology, 76(3), pp. 715–723. doi: 10.1128/AEM.01316-09.
- Genetherapynet (2019) [ONLINE]. Available at: <http://www.genetherapynet.com>.
- Georgiev, V. S. (1997) *Infectious Diseases in Immunocompromised Hosts*. Taylor & Francis (Handbooks in Pharmacology and Toxicology). Available at: <https://books.google.cz/books?id=73QOP6Xqh6EC>.
- Ghebremedhin, B. (2014) 'Human adenovirus: Viral pathogen with increasing importance.', *European journal of microbiology & immunology*. Akadémiai Kiadó, 4(1), pp. 26–33. doi: 10.1556/EuJMI.4.2014.1.2.
- Hiwarkar, P. *et al.* (2017) 'Brincidofovir is highly efficacious in controlling adenoviremia in pediatric recipients of hematopoietic cell transplant.', *Blood*. American Society of Hematology, 129(14), pp. 2033–2037. doi: 10.1182/blood-2016-11-749721.
- Hofmayer, S. *et al.* (2009) 'Unique sequence features of the human adenovirus 31 complete genomic sequence are conserved in clinical isolates', *BMC Genomics*. BioMed Central, 10, p. 557. doi: 10.1186/1471-2164-10-557.
- Ismail, A. M. *et al.* (2018) 'Adenoviromics: Mining the Human Adenovirus Species D

- Genome', *Frontiers in Microbiology*. Frontiers, 9, p. 2178. doi: 10.3389/fmicb.2018.02178.
- Jong-Yoon, C. (2012) 'High Multiples Molecular Diagnostics', *Seegene Bulletin*. Seoul, Republic of Korea, 1, pp. 1–4.
- Khanal, S. (2018) 'The Repertoire of Adenovirus in Human Disease : The Innocuous to the Deadly'. doi: 10.3390/biomedicines6010030.
- Leruez-Ville, M. *et al.* (2006) 'Description of an adenovirus A31 outbreak in a paediatric haematology unit', *Bone Marrow Transplantation*. Nature Publishing Group, 38(1), pp. 23–28. doi: 10.1038/sj.bmt.1705389.
- Lion, T. (2014) 'Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients.', *Clinical microbiology reviews*. American Society for Microbiology (ASM), 27(3), pp. 441–62. doi: 10.1128/CMR.00116-13.
- Lion, T. (2019) 'Adenovirus persistence , reactivation , and clinical management', 593, pp. 3571–3582. doi: 10.1002/1873-3468.13576.
- Lynch, J. and Kajon, A. (2016) 'Adenovirus: Epidemiology, Global Spread of Novel Serotypes, and Advances in Treatment and Prevention', *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. Thieme Medical Publishers, 37(04), pp. 586–602. doi: 10.1055/s-0036-1584923.
- Margetts, B. K. *et al.* (2018) 'Use of Whole-Genome Sequencing of Adenovirus in Immunocompromised Pediatric Patients to Identify Nosocomial Transmission and Mixed-Genotype Infection', *Clinical Adenovirus Genomics and Epidemiology • JID*. doi: 10.1093/infdis/jiy323.
- Nakamura, M. *et al.* (2012) 'Surveillance of Adenovirus D in patients with epidemic keratoconjunctivitis from Fukui Prefecture, Japan, 1995-2010', *Journal of Medical Virology*. John Wiley & Sons, Ltd, 84(1), pp. 81–86. doi: 10.1002/jmv.22252.
- Okada, M. *et al.* (2007) 'Detection and sequence-based typing of human adenoviruses using sensitive universal primer sets for the hexon gene', *Arch Virol*, 152, pp. 1–9. doi: 10.1007/s00705-006-0842-8.
- Pacesa, M. *et al.* (2017) 'Small-size recombinant adenoviral hexon protein fragments for the production of virus-type specific antibodies', *Virology Journal*. BioMed Central, 14(1), p. 158. doi: 10.1186/s12985-017-0822-5.
- Rajčáni, J. and Čiampor, F. (2006) *Lékarška virologia*. Bratislava: Veda.
- Reddy, V. S. and Nemerow, G. R. (2014) 'Structures and organization of adenovirus cement proteins provide insights into the role of capsid maturation in virus entry and infection', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 111(32), pp. 11715–11720. doi: 10.1073/pnas.1408462111.
- Richman, D. D., Whitley, R. J. and Hayden, F. G. (2017) *Clinical virology, 4th edition*. ASM Press. Washington .
- Rux, J. J., Kuser, P. R. and Burnett, R. M. (2003) 'Structural and Phylogenetic Analysis

of Adenovirus Hexons by Use of High-Resolution X-Ray Crystallographic, Molecular Modeling, and Sequence-Based Methods', *Journal of Virology*. American Society for Microbiology, 77(17), pp. 9553–9566. doi: 10.1128/jvi.77.17.9553-9566.2003.

Ryu, W.-S. (2017) *Molecular virology of human pathogenic viruses*. Academic Press.

Sriwana, P. *et al.* (2013) *Molecular characterization of human adenovirus infection in Thailand, 2009-2012*. doi: 10.1186/1743-422X-10-193.

Swartling, L. *et al.* (2015) 'Prolonged outbreak of adenovirus A31 in allogeneic stem cell transplant recipients', *Transplant Infectious Disease*. Blackwell Publishing Inc., 17(6), pp. 785–794. doi: 10.1111/tid.12443.

Tiveljung-Lindell, A. *et al.* (2009) 'Development and Implementation of a Molecular Diagnostic Platform for Daily Rapid Detection of 15 Respiratory Viruses', *Journal of Medical Virology*, 81, pp. 167–175. doi: 10.1002/jmv.21368.

Wickham, T. J. (2000) 'Targeting adenovirus', *Gene Therapy*. Nature Publishing Group, pp. 110–114. doi: 10.1038/sj.gt.3301115.

Zhou, X. *et al.* (2012) 'Analysis of human adenovirus type 19 associated with epidemic keratoconjunctivitis and its reclassification as adenovirus type 64', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, 53(6), pp. 2804–2811. doi: 10.1167/iovs.12-9656.

9. Seznam zkratek

AdV	Adenovirus
AIDS	Syndrom získané imunitní nedostatečnosti (Acquired Immune Deficiency Syndrome)
bp	páru bazí (base pair)
CAR	Coxsackie a adenovirový receptor (Coxsackie and adenovirus receptor)
cDNA	komplementární DNA (complementary DNA)
CoV	Coronavirus
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
Flu	Influenza virus
HBoV	Bocavirus
HEV	Enterovirus
HRV	Rhinovirus
HSCT	Transplantace krvetvorných kmenových buněk (Hematopoietic stem cell transplantation)
HVR	Hypervariabilní oblast (Hypervariable Region)
IC	Interní kontrola (Internal control)
kbp	páru kilobazí (kilobase pair)
MPV	Metapneumovirus
NCBI	Národní centrum pro biotechnologické informace (National Center for Biotechnology Information)
NK	Nukleová kyselina
PCR	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
PIV	Parainfluenza virus
RSV	Respirační syncytiální virus