

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Zemědělské biotechnologie

Katedra: Genetiky a speciální produkce rostlinné

Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Laboratorní vyšetření herpetických infekcí (EBV, CMV) u pacientů  
Nemocnice České Budějovice, a.s.**

Vedoucí diplomové práce: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Konzultantka diplomové práce: RNDr. Pavlína Tinavská, Ph.D.

Autor diplomové práce: Bc. Lenka Chaloupková

České Budějovice, 2020

# JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

## Zemědělská fakulta

Akademický rok: 2018/2019

### ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Lenka CHALOUPKOVÁ  
Osobní číslo: Z18047  
Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství  
Studijní obor: Zemědělské biotechnologie  
Téma práce: Laboratorní vyšetření herpetických infekcí (EBV, CMV) u pacientů Nemocnice České Budějovice, a.s.  
Zadávací katedra: Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

#### Zásady pro vypracování

Úvod: Cílem práce bude porovnání tří rutinních vyšetření diagnosticky cílených na průkaz EBV nebo CMV infekce – sérologické, molekulární a na úrovni buněčné imunity.

Literární přehled: herpetické infekce – EBV, CMV; rutinní diagnostika – sérologie, specifické protilátky, molekulární metody (PCR), imunofluorescence, ELISA; doplňková v rámci diferenciální diagnostiky – buněčná imunita (imunofenotypizace – FACS).

Materiál a metody: metodika sérologie, imunofluorescence, ELISA, PCR, FACS.

Výsledky: Zhodnocení souhrnu pacientů za období 2017 – 2019.

Diskuse: porovnání vlastních výsledků s literárními údaji, posouzení možností praktického uplatnění dosažených výsledků, poznatků a doporučení.

Uplatnění diferenciální diagnostiky.

Závěr: Přehledné shrnutí nejdůležitějších poznatků, závěrů a doporučení, vyplývajících z řešené problematiky.

Seznam použité literatury: V abecedním řazení podle ČSN 01 01 97 „Bibliografická citace“.

Obsah: Uvedení stran jednotlivých kapitol práce.

Rozsah grafických prací: obrázky, grafy, tabulky dokumentující získané výsledky.

Rozsah pracovní zprávy: 45 – 50 stran  
Rozsah grafických prací: 10 – 15 stran  
Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

KREJSEK, Jan a Otakar KOPECKÝ. Klinická imunologie. Hradec Králové: Nucleus HK, 2004. ISBN 80-86225-50-X.  
BARTUŇKOVÁ, Jiřina a Milan PAULÍK. Vyšetřovací metody v imunologii. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3533-7.  
JORDE L. B.. Medical Genetics, 5. vydání, Elsevier – Health Sciences Division. 2015.  
CELER V., CELER V. ml. Obecná virologie. Nucleus HK. 2010.

Vedoucí diplomové práce: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.  
Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

Konzultant diplomové práce: RNDr. Pavlína Tinavská, Ph.D.  
Nemocnice České Budějovice, a.s.

Datum zadání diplomové práce: 25. února 2019  
Termín odevzdání diplomové práce: 15. dubna 2020

V Českých Budějovicích dne 25. února 2019

JIHOČESKÁ UNIVERZITA <sup>®</sup>  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA  
studijní oddělení  
Studentská 1688, 370 05 České Budějovice

  
\_\_\_\_\_  
prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.  
děkan

L.S.

  
\_\_\_\_\_  
prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.  
vedoucí katedry

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci s názvem „*Laboratorní vyšetření herpetických infekcí (EBV, CMV) u pacientů Nemocnice České Budějovice, a.s.*“ 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 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 kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

.....

## **Poděkování**

Děkuji prof. Ing. Vladislavovi Čurnovi, Ph.D. za cenné rady a věcné připomínky při vypracování mé diplomové práce. Zvláštní poděkování patří RNDr. Pavlíně Tinavské, Ph.D. za odborné vedení, za čas, trpělivost, ochotu a vstřícnost, které vzniku této práce věnovala.

# **Laboratorní vyšetření herpetických infekcí (EBV, CMV) u pacientů Nemocnice České Budějovice, a.s.**

## **Abstrakt**

Významnými zástupci herpes virů, které patří strukturně mezi nejsložitější virová agens a jímž je vystavena celá lidská populace, jsou virus Epstein-Barr (EBV) a cytomegalovirus (CMV).

Virus EBV je ubikvitárním agens, infikující více než 90% lidské populace. Primární infekce EBV probíhá v dětství většinou asymptomaticky, v adolescenci nebo v období časně dospělosti pak probíhá pod obrazem infekční mononukleózy. Také cytomegalovirus se v lidské populaci šíří po celém světě. Míra séroprevalence dosahuje v různých oblastech v závislosti na socioekonomických podmínkách 50 - 100 %.

Data byla získána vyšetřením buněčné imunity metodou průtokové cytometrie a byla porovnána s výsledky dalších dvou stanovených metod – sérologické a molekulárně biologické u pacientů vyšetřených v období 2017 – 2019 na Pracovišti imunologie a v Laboratoři molekulární biologie a genetiky Nemocnice České Budějovice, a.s.

Z výsledků jasně vyplývá, že akutní infekce EBV způsobuje charakteristické změny ve většině sledovaných parametrů buněčné imunity (lymfocyty, B lymfocyty, poměr CD4/CD8 T lymfocytů, aktivace T lymfocytů) a aktivuje neutrofilní granulocyty ke zvýšené expresi zánětlivého markeru CD64 na svém povrchu.

Vedle sérologických a molekulárně biologických metod může být vyšetření buněčné imunity více než užitečné v diferenciálně – diagnostické rozvaze některých onemocnění jako je např. uzlinový syndrom, kdy je potřeba odlišit infekční původ od možné malignity.

## **Klíčová slova**

Virus Epstein-Barr (EBV); cytomegalovirus (CMV); infekční mononukleóza (IM); sérologie; polymerázová řetězová reakce (PCR); buněčná imunita

# **Laboratory examination of herpetic infections (EBV, CMV) in patients of the Hospital České Budějovice, a.s.**

## **Abstract**

Epstein-Barr virus (EBV) and cytomegalovirus (CMV) are important representatives of herpes viruses, which are structurally among the most complex viral agents to which the entire human population is exposed.

EBV is a ubiquitous agent that infects more than 90% of the human population. Primary infections of EBV are usually asymptomatic in childhood, followed by infectious mononucleosis in adolescence or early adulthood. Cytomegalovirus also spreads throughout the human population. The serological prevalence rate is 50-100% in different areas depending on socio-economic conditions.

The data were obtained by examination of cellular immunity by the flow cytometry method and were compared with the results of two other established methods - serological and molecular biology in patients examined in the period 2017-2019 at the Department of Immunology and Laboratory of Molecular Biology and Genetics, Hospital České Budějovice, a.s.

The results clearly show that acute EBV infection causes characteristic changes in most of the cellular immunity parameters studied (lymphocytes, B lymphocytes, CD4/CD8 T lymphocyte ratio, T lymphocyte activation) and activates neutrophil granulocytes to overexpress the inflammatory marker CD64 on its surface.

In addition to serological and molecular biological methods, the examination of cellular immunity may be more than useful in the differential-diagnostic balance of some diseases such as nodal syndrome, where it is necessary to distinguish infectious origin from possible malignancy.

## **Key words**

Epstein - Barr Virus (EBV); cytomegalovirus (CMV); infectious mononucleosis (IM); serology; polymerase chain reaction (PCR), cellular immunity

## Obsah

1. Úvod.....	10
2. Literární přehled .....	12
2.1 Základní charakteristika virů.....	12
2.1.1 Struktura virů .....	12
2.1.2 Morfogeneze a interakce virus - buňka .....	13
2.2 Charakteristika herpetických virů .....	14
2.3 Viry a imunitní systém člověka.....	16
2.3.1 Základní charakteristika imunitního systému.....	17
2.3.1.1 Nespecifické a specifické imunitní mechanismy .....	17
2.3.2 Viry a imunitní odpověď .....	18
2.3.2.1 Virová infekce, mechanismy obranného zánětu.....	20
2.4 Virus Epstein-Barr.....	30
2.4.1 Struktura viru .....	30
2.4.2 Replikace EBV .....	31
2.4.3 Patogeneze EBV .....	32
2.4.3.1 Primární infekce .....	32
2.4.3.2 Perzistující infekce.....	33
2.4.4 Imunitní odpověď na EBV .....	36
2.4.5 Klinické příznaky EBV .....	37
2.4.6 Diagnostika EBV .....	39
2.5 Cytomegalovirus (CMV) .....	40
2.5.1 Epidemiologie a přenos CMV .....	40
2.5.2 Klinické příznaky CMV .....	41
2.5.3 Patogeneze CMV .....	42
2.5.4 Imunitní odpověď na CMV .....	42
2.5.5 Diagnostika CMV .....	43
2.6 Metodické otázky diagnostiky herpesvirů .....	44
3. Hypotézy a cíle diplomové práce.....	53
4. Metodika.....	54
5. Výsledky.....	64
6. Diskuse .....	72



7. Závěr .....	77
Přehled použité literatury a zdrojů.....	78
Přílohy .....	83

# 1. Úvod

Herpetické viry mají schopnost dlouhodobě skrytě přetrvávat v organismu hostitele, tedy navodit perzistentní infekci provázenou obdobími latence a reaktivace. Primární i reaktivované herpesvirové infekce mohou být buď asymptomatické, nebo mohou mít za následek onemocnění různého stupně závažnosti. Výsledek závisí na součinnosti mezi konkrétním virem a jeho hostitelem a především na imunitním stavu hostitele (Carter a Saunders, 2013).

Herpetické viry patří do čeledi *Herpesviridae* a v současné době zahrnují osm zástupců napadajících člověka: virus Epsteina a Barrové (EBV), cytomegalovirus (CMV), virus herpes simplex typu 1 a 2 (HSV1 a HSV2), lidský herpesvirus 6,7 a 8 (HHV6, HHV7 a HHV8) a virus varicella zoster (VZV). Schopnost navodit celoživotní perzistentní infekci je jejich společnou charakteristikou. Střídání fází latence a reaktivace spojené s asymptomatickým vylučováním viru do tělních sekretů je důsledkem nekontrolovatelného šíření herpetických virů v populaci a vysokým stupněm promořenosti většinou z nich. Imunita zprostředkovaná buňkami je nezbytná při kontrole infekce herpesvirem. Většina infekcí u imunokompetentních jedinců probíhá bezpříznakově. Naopak u imunodeficitních jedinců patří mezi nejnebezpečnější oportunní patogeny mající tendenci k chronicitě a generalizaci (Carter a Saunders, 2013; Greenwood et al., 2012).

Diagnostika herpetických infekcí je vzhledem k možnosti celoživotní perzistentní infekce komplikovaná. Používají se nepřímé metody založené na průkazu specifických protilátek nebo přímé metody průkazu přítomnosti virového materiálu v klinických vzorcích. Při sérologickém vyšetření je nezbytné odlišit protilátky mající anamnestický charakter od protilátek souvisejících s akutní infekcí (Krejsek a Kopecký, 2004).

Virus Epsteina-Barrové (EBV), na který je tato práce zaměřena především, patří mezi běžné viry, s nimiž se setká téměř každý člověk. Uvádí se, že anamnestické protilátky proti EBV jsou detekovatelné u více než 90% světové populace. Zdrojem nákazy je nemocný člověk nebo přenašeč viru. Virus se vylučuje slinami a přenáší se zejména přímým kontaktem. Většina nálezů probíhá u malých dětí inaparentně, v pozdějším věku často u mladistvých probíhá nemoc pod obrazem infekční mononukleózy (Hůlek a Urbánek, 2018). Virus se množí na sliznici orofaryngu v epitelových buňkách B lymfocytů. Infekce B lymfocytů vede k jejich

„imortalizaci“ a v *in vitro* podmínkách k ustavení lymfoblastoidních buněčných linií s neomezenou schopností růstu. Nejtypičtějším projevem je infekční mononukleóza (IM), která je EBV vyvolána asi v 80% případů. Ve zbylých 20% se na vzniku infekční mononukleózy podílí mimo jiné také cytomegalovirus (CMV), o kterém je v práci také krátce pojednáno (Roháčová, 2005). Charakteristickými symptomy IM jsou horečka, tonzylofaryngitida, lymfadenopatie, hepatosplenomegalie a zvýšený počet aktivovaných T lymfocytů. Rané séroepidemiologické a molekulární studie také zdůraznily asociaci mezi infekcí EBV a nasofaryngeálním karcinomem (NPC). Avšak pro tento nádor, stejně jako pro Burkittův lymfom (BL), nepůsobí EBV jako jediný etiologický agens, ale je pravděpodobně jedním z potřebných kofaktorů ve vývoji tumorů (Zuckerman et al., 2004).

Vyšetření EBV infekce je jedním ze základních vyšetření v diferenciálně diagnostickém panelu pro odlišení etiologie tonsilitidy, uzlinového syndromu či hepatopatie. U infekce vyvolané CMV nejsou pozitivní heterofilní protilátky, diagnóza se ověřuje sérologicky specifickým testem na CMV. Při diferenciální diagnostice uzlinového syndromu je zapotřebí vyloučit toxoplazmózu, ale i oralglandulární formu tularémie, rubeolu a v neposlední řadě také malignitu (tumor, lymfom). Při hepatopatii bez krčního nálezu je zapotřebí vyloučit i některou z infekčních hepatitid (Roháčová, 2005).

Široká škála laboratorních metod může významně přispět k diagnóze herpetických virů. Volba vhodné vyšetřovací metody závisí na klinických příznacích infekce i na typu vyšetřovaného pacienta. Pro všechny laboratorní vyšetřovací metody herpetických infekcí platí, že výsledek vyšetření pacienta je možné interpretovat pouze v kontextu s ostatními laboratorními a klinickými nálezy.

Předkládaná práce doplňuje současné vyšetřovací metody, jakými jsou sérologické testy specifických protilátek a přímý průkaz patogenu, o metodu vyšetření buněčné imunity, která hraje zásadní úlohu při odpovědi a obraně organismu na EBV infekci. Virus EBV totiž způsobuje typické změny v obrazu buněčné imunity, které jsou odrazem nejen patogeneze, ale zejména odpovědi imunitního systému infikovaného jedince.

## 2. Literární přehled

### 2.1 Základní charakteristika virů

Viry patří mezi nejmenší infekční agens, které vykazují vlastnosti živého organismu, tedy jsou schopny množení. Zároveň se jedná o obligátně intracelulární organismy, které ke svému množení potřebují aparát hostitelské buňky. Mezi znaky společné všem virům patří, že: nerostou na živných půdách a nejsou citlivé na antibiotika, obsahují vždy jen jeden typ nukleové kyseliny (RNA nebo DNA), nemnoží se dělením, ale syntézou svých složek hostitelskou buňkou. Virová nukleová kyselina obsahuje informaci pro syntézu jak strukturálních proteinů, tak i proteinů zodpovědných za replikaci viru. Tedy přesto, že je virus sám o sobě neživý, obsahuje funkční geny kódující syntézu vlastních proteinů v živé hostitelské buňce. Viry mohou infikovat téměř všechny formy života, včetně obratlovců, bezobratlých, hub, rostlin, bakterií a dokonce i velkých virů (Korsman et al., 2012; Rajčáni a Čiampor, 2006).

#### 2.1.1 Struktura virů

Základní infekční částice viru je známa jako **virion**. V nejjednodušších virech se skládá z nukleové kyseliny a obklopujícího proteinového obalu – **kapsidy**. Kapsida je složena z morfologických jednotek - **kapsomer**, které jsou sestaveny z virových proteinů. V závislosti na uspořádání těchto proteinů mohou mít kapsomery sférický, válcový nebo prstencový vzhled. **Nukleokapsid** je kombinace nukleové kyseliny a kapsidu. Uspořádání kapsomer kolem nukleové kyseliny určuje symetrii virionu. Nejčastějšími typy jsou **helikoidální** a **ikosaedrická** struktura. Viry s ikosaedrickou symetrií mají tuhou strukturu a pod elektronovým mikroskopem mají charakteristický šestiúhelníkový obrys. Velikost virionů se značně liší, od 25 do 300 nm (Ryu, 2017).

Nejběžnějšími typy nukleových kyselin u lidských virů jsou jednovláknová RNA a dvouvláknová DNA. Množství nukleové kyseliny ve virionech je pro konkrétní virus konstantní (Ryu, 2017).

## 2.1.2 Morfogeneze a interakce virus - buňka

Viry jsou zcela závislé na buňkách, které infikují, a to pro získání energie, metabolických meziproduktů a většiny enzymů potřebných pro jejich replikaci. S pokroky v technikách molekulární virologie, krystalografie a modelování, spolu s klasickými metodami elektronové mikroskopie, titrace a biochemických analýz, bylo možné studovat interakce virus – buňka na sofistikované úrovni. Základní typy interakcí virů s buňkami jsou popsány níže (viz tabulka č. 1) (Greenwood et al., 2012).

Tabulka č. 1: Základní typy interakcí vir – buňka

Typ infekce	Popis
<b>Cytocidní produktivní infekce, lytická</b>	Kompletní replikace virů, buňka hyne
<b>Produktivní infekce</b>	Bez cytocidních změn, kompletní replikace virů, po jejich uvolnění se hostitelská buňka zotaví
<b>Perzistentní infekce</b>	Trvalá tvorba virových částic, buňka se nepoškodí a dále se dělí, virus přechází do dceřiné buňky
<b>Abortivní infekce</b>	Virus proniká do buňky, vznik pouze některých složek virionu a ne kompletně zralých částic. Transformace interakce virus-buňka →změny vlastností buněk a poruchy regulace buněčného dělení a růstu
<b>Neproduktivní infekce (latence)</b>	Přetrvávání virového genomu bez produkce infekčních částic, minimální exprese virových genů

Převzato a upraveno dle Rajčáni a Čiampor (, 2006).

Po infekci virem lze prostřednictvím morfologických metod, jakými jsou světelná a elektronová mikroskopie, zjistit v hostitelské buňce řetězec změn. Nejdůležitějšími fázemi morfogeneze jsou:

- **Adsorpce**, tedy přichycení viru na buněčnou membránu, se uskutečňuje různými formami interakcí mezi povrchovými strukturami virionu a receptory na plazmatické membráně buňky.
- **Penetrance**, proniknutí viru do buňky. Proces, při kterém se virus prostřednictvím endocytózy dostává dovnitř buňky, ale stále ještě zůstává oddělen plazmatickou membránou od okolní cytoplazmy.
- **Uncoating** – proces rozrušení membránového obalu viru, resp. jeho nukleokapsidu s cílem uvolnit virový genom do buňky.
- **Replikace** virového genomu a **exprese** virových genů. Období nejméně výrazných morfologických změn v infikovaných buňkách.
- **Skladba** virových částic (assembly). Transport strukturních proteinů viru na místa v infikované buňce, kde se začínají skládat nové virové částice.
- **Maturace** – dozrávání virových částic.
- **Uvolňování** virových částic (release). Permeabilizace buněčných membrán a uvolnění virů do mezibuněčných prostor.

Všechny stupně morfogeneze jsou ve skutečnosti velmi plynulým procesem představujícím kontinuální replikační cyklus virů. Délka replikačního cyklu i morfogeneze je pro jednotlivé viry rozdílná (Greenwood et al., 2012; Rajčáni a Čiampor, 2006).

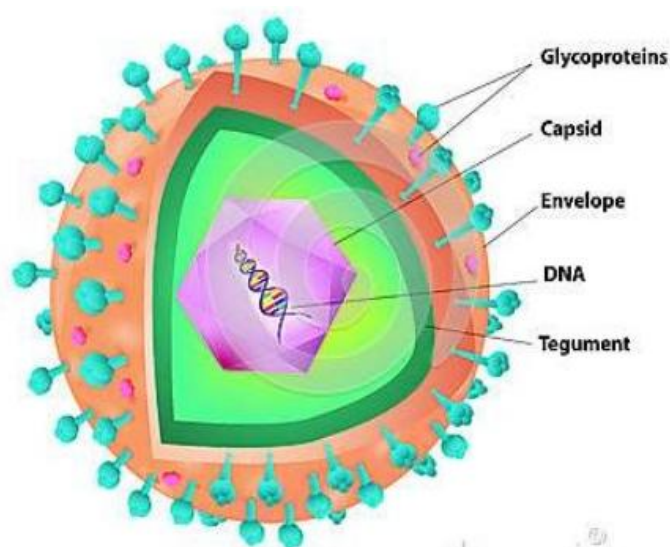
## 2.2 Charakteristika herpetických virů

**Herpetické viry** neboli **herpesviry** patří do velké čeledi *Herpesviridae*, ve které bylo do dnešního dne identifikováno více než 130 druhů. Tyto viry byly nalezeny téměř u všech druhů, včetně teplokrevných a chladnokrevných druhů obratlovců a bezobratlých (Zuckerman et al., 2004).

Společnými znaky herpesvirů jsou: velký genom tvořený dvouvláknovou dsDNA (double-stranded DNA) s molekulovou hmotností 80-150 milionů Da (Dalton), kódující až 200 proteinů. Jedná se o poměrně velké obalené viry sférického tvaru. Samotná bílkovinná kapsida o průměru 100-110 nm je tvořena 162 kapsomerami. Uvnitř kapsidy je stočená jediná molekula dvouvláknové DNA. Z virového obalu ční množství glykoproteinových hrotů, které poskytují významné antigenní determinanty, které odlišují jednotlivé členy této čeledi.

Mezi nukleokapsidou a vnějším obalem je amorfni elektronově hustá mezivrstva, tegument (viz obr. č. 1). Předpokládá se, že má uspořádanou strukturu a obsahuje proteiny, které jsou důležité pro virus při řízení hostitelských funkcí, bezprostředně po proniknutí do hostitelské buňky (Rajčáni a Čiampor, 2006; Zuckerman et al., 2004).

Kromě produktivní replikace, mohou viry po napadení přirozeného hostitele vytvořit latentní infekci, která přetrvává po celý život hostitele. V latentním stavu je exprimována pouze malá podmnožina virových genů (Zuckerman et al., 2004).



**Obr. č. 1:** Struktura herpesviru (Převzato z: [www.dreamstime.com](http://www.dreamstime.com)).

Čeleď *Herpesviridae* se dělí do tří podčeledí – *Alpha-*, *Beta-* a *Gammaherpesvirinae*. Tato klasifikace byla vytvořena ještě před tím, než byla známa sekvence DNA jednotlivých členů *Herpesviridae*. Každá podčeleď je dále rozdělena na několik rodů (viz tabulka č. 2) (Rajčáni a Čiampor, 2006; Zuckerman, 2004). Podčeleď *Alphaherpesvirinae* se vyznačuje variabilním rozsahem hostitelů, krátkým reprodukčním cyklem, rychlým šířením z buňky na buňku, účinným ničením infikovaných buněk a v patogenezi se *in vitro* uplatňuje šíření podél nervů, nejčastěji uvnitř axonů. Podčeleď *Betaherpesvirinae* má omezený rozsah hostitelů, dlouhý reprodukční cyklus a pomalé uvolňování z infikovaných buněk. V hostiteli přetrvávají v latentní formě, a to v lymfatických buňkách, vývodných slinných žlázách a v ledvinách. Pro podčeleď *Gammaherpesvirinae* je typický dlouhý reprodukční cyklus, pomalé uvolňování z hostitelských buněk,

*in vitro* replikace v lymfoblastoidních buňkách a *in vivo* replikace a latence v T a B lymfocytech (Arvin et al., 2007, Greenwood et al., 2012).

**Tabulka č. 2: Rozdělení herpetických virů**

Čeleď	Podčeleď	Rod	Druh, zástupce
<i>Herpesviridae</i>	<i>Alphaherpesvirinae</i>	<i>Simplexvirus</i>	<i>Human herpesvirus 1</i> <i>Human herpesvirus 2</i>
		<i>Varicellovirus</i>	<i>Human herpesvirus 3</i>
	<i>Betaherpesvirinae</i>	<i>Cytomegalovirus</i>	<i>Human herpesvirus 5</i> ( <i>Human cytomegalovirus</i> )
		<i>Muromegalovirus</i>	<i>Murid herpesvirus 1</i>
		<i>Roseolovirus</i>	<i>Human herpesvirus 6</i> <i>Human herpesvirus 7</i>
	<i>Gammaherpesvirinae</i>	<i>Lymphocryptovirus</i>	<i>Human herpesvirus 4</i> ( <i>Epstein-Barr virus</i> )
		<i>Rhadinovirus</i>	<i>Human herpesvirus 8</i>

Upraveno dle Arvin et al. (, 2007)

## 2.3 Viry a imunitní systém člověka

Člověk a viry mají společnou dlouhou evoluční historii, během které je tento vztah vzájemně ovlivňoval. Výsledkem je individuální imunitní reaktivita jednotlivých lidí. Viry, jakožto významný selekční nástroj, ovlivnily genovou výbavu současné lidské populace (Krejsek et al., 2016). Koevoluce člověka a virů se v genomu člověka zřetelně projevila velkým množstvím sekvencí, které jsou s největší pravděpodobností virového původu. Význam některých z nich byl již odhalen, ovšem u většiny doposud není znám. Evoluční vzájemnost působila také v opačném směru, takže například ve skupině strukturně nejsložitějších virů, lidských herpesvirů, lze v jejich genomu nalézt geny, které byly nepochybně získány z lidského genetického materiálu, a které konkrétní virus využívá pro zajištění mechanismu úniku imunitnímu dozoru (Krejsek a Kopecký, 2004).

Individuální imunitní reaktivita se v ontogenetickém vývoji mění a pro její fyziologický vývoj je přirozená expozice virovým podnětům nezbytná.



Především v období po narození, kojeneckém, batolecím období a v raném dětství, jsou přirozeně probíhající infekce virovými agens nezbytné pro „vyzrání“ fyziologické imunitní reaktivity. Časně promoření většinou patogenních virů probíhá buď inaparentně, nebo jako mírně probíhající infekční onemocnění a imunitní systém moduluje obranný zánět k nastavení homeostatických regulací a k tvorbě imunitní paměti, kterou potom jedinec využije při příštím setkání s patogenním virem (Krejsek et al., 2016).

### **2.3.1 Základní charakteristika imunitního systému**

Imunitní systém lze popsat jako soustavu, která společně s dalšími tělními systémy, především pak neuroendokrinní soustavou, je schopna identifikovat nežádoucí změny ve vnějším i vnitřním prostředí a jejímž hlavním cílem je udržení podmínek stálého vnitřního prostředí, tedy homeostázy. Prostřednictvím různých receptorů má možnost přijímat podněty, které je pak schopna kvantitativně i kvalitativně vyhodnotit a reagovat na ně. Ve spolupráci s nervovou a endokrinní soustavou vytváří integrující informační systém, který je funkčně i strukturně provázán a je tak velmi malá pravděpodobnost existence podnětů, které by nebyly touto integrovanou soustavou identifikovány (Krejsek a Kopecký, 2004). Naproti tomu abnormální imunitní reakce způsobují mnoho zánětlivých onemocnění se závažnou morbiditou a úmrtností. Imunitní odpověď je mimo jiné také hlavní překážkou úspěchu transplantace orgánů (Abbas et al., 2016).

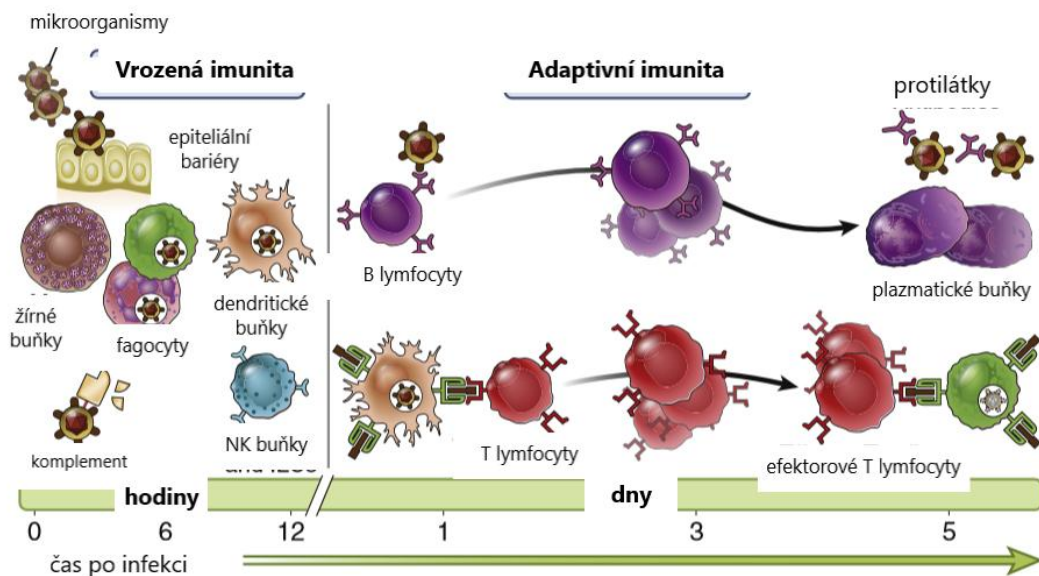
Z evolučního hlediska lze imunitní systém rozdělit na dvě základní skupiny imunitních mechanismů, a sice na nespecifické (neadaptivní) a antigeně specifické (adaptivní) (viz obr. č. 2) (Hořejší a Bartůňková, 2009).

#### **2.3.1.1 Nespecifické a specifické imunitní mechanismy**

**Nespecifické mechanismy**, nazývané také **neadaptivní**, **vrozené**, jsou fylogeneticky původní složkou imunity. Jsou tvořeny buněčnými a humorálními složkami. Buněčné složky jsou reprezentovány polymorfonukleárními leukocyty (granulocyty), monocyty, makrofágy a dendritickými buňkami. Humorální složky tvoří komplementový systém a proteiny akutní fáze. Nespecifické složky imunity

reagují na přítomnost cizorodé látky rychle a na rozdíl od specifických složek nemají tzv. imunologickou paměť (Hořejší a Bartůňková, 2009). Součástí vrozené imunity jsou také přirozené obranné bariéry, především epitelové a kožní povrchy, typické svou relativně rychlou obnovou. Podstatná je také úloha přirozené mikrobioty a působení sekrečních protilátek třídy IgA, které specificky interagují s virovými antigeny (Lochmanová, 2014).

**Specifické, adaptivní mechanismy** jsou evolučně mladší větví imunity a reagují na každou cizorodou strukturu prostřednictvím vysoce specifických molekul a aktivují se až po setkání s daným antigenem. Antigenem se rozumí látka, která je schopna vyvolat imunitní reakci. Stejně jako nespecifické mechanismy jsou i tyto tvořeny buněčnými (T a B lymfocyty) a humorálními (protilátky) složkami. Pro specifickou imunitu je také charakteristická tzv. imunologická paměť a k rozvoji imunitní reakce dochází až po několika dnech či týdnech (Hořejší a Bartůňková, 2009).



**Obr. č. 2:** Základní mechanismy vrozené a adaptivní imunity

(Převzato a upraveno dle: Abbas et al., 2016).

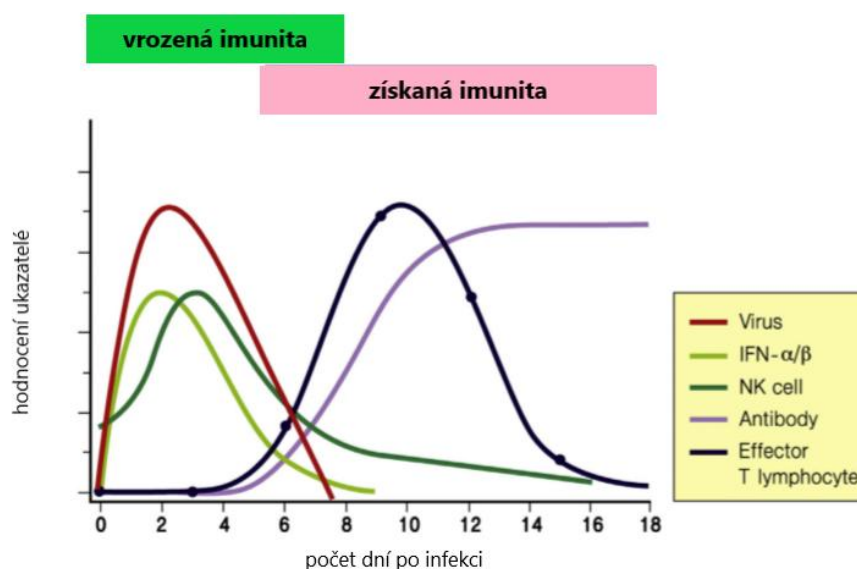
### 2.3.2 Viry a imunitní odpověď

Reakce hostitele na napadající virus závisí na vlastnostech infekčního agens a také na tom, kde se s ním setkává. V mnoha případech jsou virové infekce

subklinické, tedy bez příznaků. Jednotlivé mechanismy obrany hostitele spolupracují, aby chránily jednotlivce před viry a eliminovaly je v případě infekce. V některých případech může mít imunitní odpověď vyvolaná viry imunopatologické důsledky (Greenwood et al., 2012). Viry využívají některé funkčně významné molekuly na buňkách imunitního systému pro vstup do hostitelské buňky (například povrchové struktury viru chřipky se vážou na kyselinu sialovou, virus EBV vstupuje do organismu prostřednictvím membránové molekuly CD21 vyjádřené na B lymfocytech atd.). V buňkách imunitního systému se pak skrytě množí a jejich prostřednictvím jsou v těle šířeny. Virová infekce indukuje komplexní imunitní odpověď vedoucí ke vzniku imunologické paměti (Punt et al., 2019).

Viry jsou schopny infikovat prakticky všechny buňky těla. Především pak buňky epitelového a endotelového původu, buňky imunitního systému, především lymfoidní buňky a makrofágy a také nervové buňky. Podmínkou nutnou pro vstup viru do permissivní buňky (buňka umožňující pomnožení viru) je exprese membránových receptorů, které interagují s určitými definovanými molekulárními strukturami viru. Vlastní vstup do buňky probíhá různými membránovými mechanismy (viz tabulka č. 1, str. 13) (Krejsek a Kopecký, 2004).

Komplexní imunitní odpověď na virovou infekci zahrnuje vrozenou imunitu, která nastupuje bezprostředně po infekci a adaptivní imunitu, která nastupuje později, až v době, kdy je vrozená imunitní reakce oslabena (viz obr. č. 3) (Ryu, 2017).



**Obr. č. 3:** Časové průběhy vrozené a adaptivní imunity (Převzato a upraveno dle: Ryu, 2017).

### **2.3.2.1 Virová infekce, mechanismy obranného zánětu**

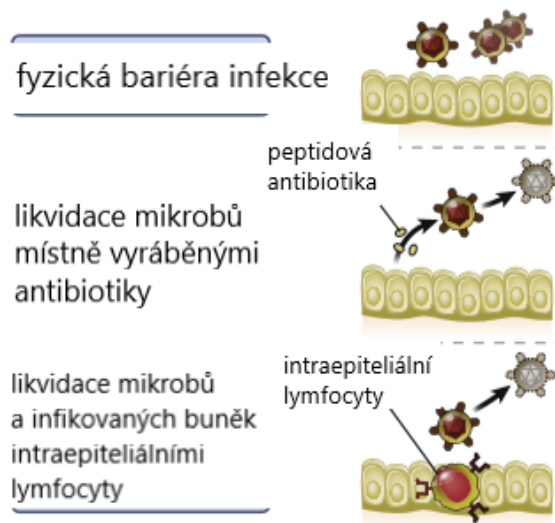
Virové infekce indukují v člověku komplexní reakci, obranný zánět, jehož součástí je i imunitní odpověď. Potenciál patogenních virů unikat rozmanitými mechanismy z dosahu obranného zánětu, ovlivňuje schopnost člověka efektivně reagovat na virovou infekci. Patogeneze virových infekcí je zásadně ovlivněna skutečností, že jediným místem replikace virů je živá buňka. Lidské tělo si vytvořilo řadu mechanismů, kterými je schopno zabránit samotné infekci buňky nebo omezit replikaci virů v buňce (Krejsek et al., 2016).

#### **I. obranná linie**

První obranná linie zahrnuje, stručně řečeno, přirozené obranné bariéry, které ještě nemají imunologickou povahu. Řadí se mezi ně především epitelové a kožní povrchy, charakteristické svou relativně rychlou obnovou z kmenových buněk epitelu. Díky tomu není mikrobu většinou dopřáno dost času na to, aby na epitelové vrstvy adheroval a pronikal přes ně do podslizničních kompartmentů těla. Látky produkované povrchovými strukturami, stejně jako látky ve slinách a slzách mají antiinfekční vlastnosti. Významná je také úloha přirozené mikrobioty, která především svojí fyziologickou aktivitou zesiluje komplexně bariérové funkce epitelových struktur. Sekreční protilátky třídy IgA, které specificky interagují s virovými antigeny, spektrum obranných bariér doplňují. Výsledkem je blokování funkčních aktivit virů, jejich agregace a následné odstranění. Většina virových infekcí tuto první obrannou linii nepřekročí, a tak není nutné zapojovat následující obranné prvky (Korsman et al., 2012; Krejsek et al., 2016).

#### **II. obranná linie**

V případě překonání fyziologických obranných bariér dochází k interakci viru s buněčnými elementy. Jedná se především o epitelové struktury vystylající dýchací, trávicí nebo močopohlavní trakt. Na této úrovni dochází k první vlně tvorby prostředků s antivirovými vlastnostmi, kterými jsou interferony. Podstatná je zde opět rychlá obnova epitelových struktur. Ty buňky, které jsou poškozené virovou infekcí, jsou rychle nahrazeny (viz obr. č. 4) (Krejsek et al., 2016).

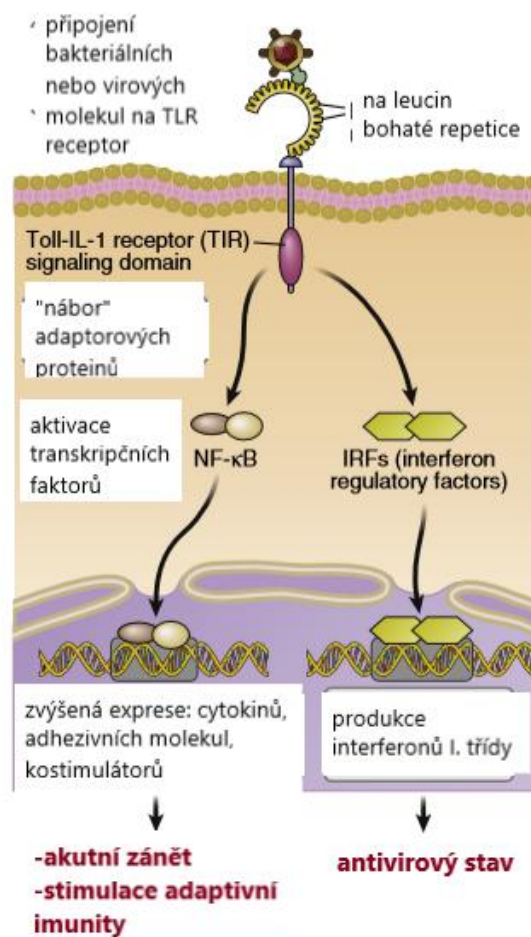


**Obr. č. 4:** Funkce epitelu vrozené imunity. (Převzato a upraveno dle: Abbas et al., 2016)

### III. obranná linie

V této fázi obrany jde o zapojení mechanismů **vrozené imunity**, jejichž aktivace určuje charakteristiky obranného zánětu vyvolaného virovou infekcí. Receptory přirozené imunity identifikují vzory **PAMP** (pathogen-associated molecular patterns, s patogenem asociované molekulové vzory) patogenních virů. Tyto receptory se označují jako **PRR** (Pathogen Recognition Receptor). Exprese PRR receptorů není klonální, tedy takovéto receptory vyjádřené buňkami stejného typu (např. makrofágy), mají identickou specifitu. (Lochmanová, 2014) Molekulové vzory PAMP lze charakterizovat jako mozaiky povrchových a nitrobuněčných molekul mikroorganismů a jejich identifikace buňkami přirozené imunity zajistí prakticky okamžitou reakci. Vzory PAMP jsou součástí pouze mikroorganismů a nevyskytují se v hostiteli. A dále představují pro mikroorganismy struktury, které jsou esenciální pro jejich životní funkce (Abbas et al., 2016). Vrozený imunitní systém také rozpoznává molekuly, které jsou uvolňovány z poškozených nebo nekrotizujících buněk. Takové molekuly se nazývají **DAMP** (damage-associated molecular patterns). Reakce na molekuly DAMP slouží k eliminaci poškozených buněk a k zahájení procesu obnovy tkáně, což může být důsledkem virové infekce epitelových buněk (Krejsek et al., 2016). Velmi důležité jsou **receptory** skupiny **TLR** (Toll-like receptor; odvozené od receptoru Toll, poprvé popsáno u octomilky) (viz obr. č. 5). Tyto receptory rozpoznávají celou řadu chemických struktur charakteristických pro různé patogeny

– lipopolysacharidy, lipoproteiny, prokaryotické a virové nukleové kyseliny a další. Některé z těchto receptorů mohou být stimulovány také endogenními ligandy, tedy molekulami organismu vlastními, které slouží podobně jako PAMP, jako „signály nebezpečí“. Některé TLR receptory jsou lokalizovány na buněčném povrchu, jiné v intracelulárních membránách. Aktivací těchto receptorů dochází k expresi prozánětlivých cytokinů (např. IL-1, IL-6, TNF, IL-8) a některých adhezivních a kostimulačních receptorů na povrchu antigen prezentujících buněk (APC) (Flint et al., 2015). Mezi nejdůležitější transkripční faktory aktivované TLR patří členové rodiny jaderných faktorů  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), které podporují expresi různých cytokinů a endotelových adhezivních molekul a interferonové regulační faktory (IRF), které stimulují produkci antivirových cytokinů, interferonů I. typu. (Abbas et al., 2016).

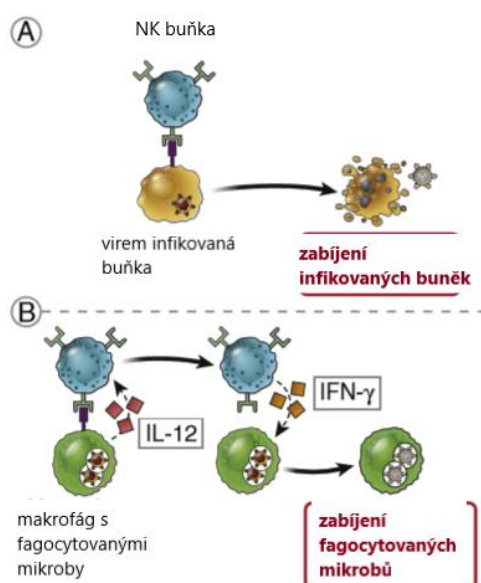


**Obr. č. 5:** Signální funkce Toll-like receptorů (TLR) (Převzato a upraveno dle: Abbas et al., 2016).

Z buněčných složek přirozené imunity se na obraně proti virům významně podílí **dendritické buňky** (DC), které jsou zároveň považovány za nejúčinnější antigen prezentující buňky (APC). DC představují spojující článek mezi antigenně nespecifickou a antigenně specifickou částí imunitního systému. Jsou totiž velmi snadno infikovatelné virovými agens, která využívají rozmanité povrchové molekuly těchto buněk ke svému vlastnímu vstupu do buňky. V organismu jsou ve formě zralé i nezralé (Hořejší a Bartůňková, 2009). **Nezralé formy DC** jsou strategicky rozmístěny v tkáních, které jsou na rozhraní organismu a okolního prostředí, což zvyšuje pravděpodobnost setkání s invadujícím mikroorganismem. V případě, že v organismu není přítomna infekce, pohlcují průběžně odumřelé buňky zdravých tkání a molekuly rozpuštěné v mezibuněčné tekutině. Takovéto pohlcené vlastní molekuly zpracují a jejich fragmenty vystaví v komplexu s MHC proteiny na svém povrchu. Specifické T lymfocyty nejsou tímto kontaktem aktivovány. Jsou buď zcela utlumeny, nebo se z nich tvoří tzv. regulační T lymfocyty. **Zralými** se dendritické buňky stávají po rozpoznání podnětu, který představuje pro organismus nebezpečí (patogenní mikroorganismy, vlastní nekrotické buňky). Tato aktivace vede k diferenciaci (maturaci) dendritických buněk. Přesunují se z tkání do lymfatických uzlin a jiných sekundárních lymfatických orgánů, ztrácejí schopnost pohlcovat částice z okolí a mění se na účinné APC. Pouze zralé DC jsou schopny aktivovat naivní T lymfocyty, tedy takové, které se doposud neseťkaly s antigenem. Dendritické buňky jsou tedy schopné rozvinout jak cytotoxickou reaktivitu T lymfocytů, tak podnítit regulační působení pomocných T lymfocytů, což se v důsledku projeví jako tvorba specifických protivirových protilátek (Krejsek a Kopecký, 2004; Flint et al., 2015).

Na antiinfekční imunitě zaměřené především proti virům a mikroorganismům se schopností intracelulárního parazitismu se významně podílí **přirozeně cytotoxické buňky**. Jedná se o heterogenní buněčnou populaci, jejíž nejvýznamnější složkou jsou **NK buňky (natural killer)**. Druhou nejvýznamnější populací jsou tzv. **NKT lymfocyty** (Krejsek a Kopecký, 2004). NK buňky se morfologicky jeví jako velké granulární lymfocyty. Od T lymfocytů se liší tím, že nemají na svém povrchu vyjádřen receptor TcR. Naopak charakteristický je pro ně znak CD56 nebo CD16 (Lochmanová, 2014). Mají schopnost usmrcovat nádorově změněné nebo virem infikované buňky, přičemž rozlišují tyto abnormální buňky od buněk normálních. K jejich odlišení

využívají NK buňky řadu membránových receptorů. Ty lze rozdělit do dvou skupin, a to na receptory, které po vazbě s odpovídajícím ligandem na terčové buňce, přinášejí pro NK buňku aktivační podněty. Tyto receptory se označují jako KAR (Killer Activating Receptors). Druhá skupina receptorů poskytuje NK buňkám po interakci s odpovídajícími ligandy inhibiční signály. Tyto receptory se označují jako KIR (Killer Inhibitory Receptors) (Krejsek a Kopecký, 2004). Identifikace terčové buňky a následná lytická reakce je výsledkem vyhodnocení všech aktivačních a inhibičních signálů. K plnému rozvinutí funkční aktivity vyžadují NK buňky signály zprostředkované cytokiny. Nejsilnější aktivační podněty představuje působení  $\text{INF}\gamma$  a dále cytokiny tvořené T lymfocyty, např. IL-2. Mechanismy cytotoxického působení NK buněk jsou zajišťovány pomocí membránově vázaných i nitrobuněčných molekul. NK buňky jsou charakterizovány přítomností nitrobuněčných granulí obsahující bílkoviny označované jako perforiny. Ty jsou cíleně sekretovány do mezibuněčného prostoru mezi NK buňkou a terčovou buňkou. Výsledkem je tvorba otvorů – porů v cytoplazmatické membráně terčové buňky, čímž se buňka osmoticky hroutí a dále dochází ke vstupu dalších komponent granulí NK buněk, granzymů. Granzymy rozkládají nitrobuněčné terče ve virem infikované buňce a vykazují kaspázovou aktivitu. Druhý typ cytotoxického působení NK buněk je zprostředkován několika receptory, které strukturně patří do rodiny receptorů pro  $\text{TNF}\alpha$  a nervový růstový faktor (NGFR). Těmito receptory je v terčové buňce indukován proces apoptózy (Lochmanová, 2014; Krejsek et al., 2016). Funkci NK buněk popisuje obr. č. 6.



**Obr. č. 6:** Funkce NK buněk. **A** - NK buňky zabíjí hostitelské buňky infikované intracelulárními mikroby, čímž eliminují rezervoáry infekce. **B** - NK buňky reagují na interleukin 12 (IL-12) produkovaný makrofágy a vylučují  $\text{INF}\gamma$ , který aktivuje makrofágy, aby eliminoval fagocytované mikroby (Převzato a upraveno dle: Abbas et al., 2016).

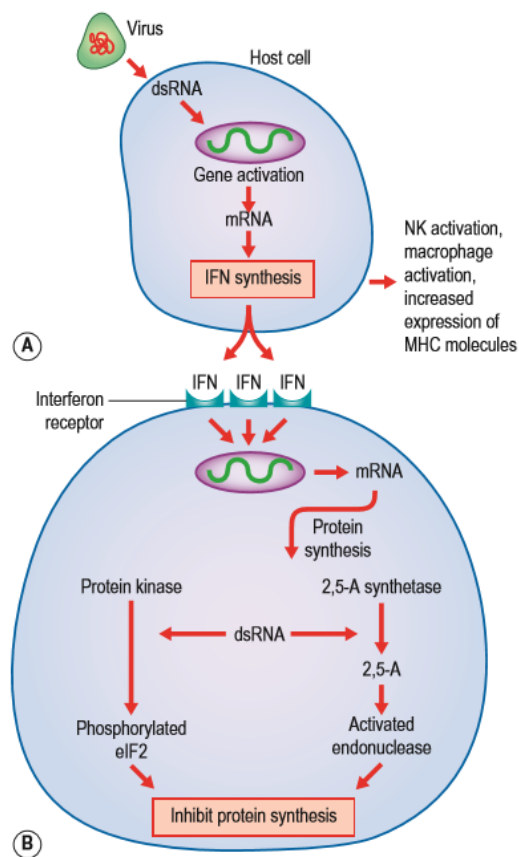


Z humorálních složek přirozené imunity má nejvýraznější protivirový potenciál **interferonový systém**, který vyvolává indukci širokého spektra antivirových proteinů. Buňka infikovaná virem se stává vydatným zdrojem interferonů. Interferony byly objeveny v roce 1957 a dělí se do tří základních skupin, označovaných jako třídy. Třídy I a III si jsou svými základními charakteristikami velmi podobné. **Interferony I. třídy** jsou obecně efektorově odpovědný za obranu proti virům. **Interferony II. třídy**, zahrnují pouze **INF $\gamma$** . Ten je také zapojen do obrany proti virovým patogenům. Interferony I. a III. třídy jsou tvořeny všemi buňkami lidského těla. INF $\gamma$  je produkován velmi omezeným spektrem buněčných elementů s původem v imunitní soustavě (Lochmanová, 2014; Ryu, 2017).

Interferony indukují antivirový stav infikované buňky prostřednictvím vazby na specifické receptory. Interferony působí nejen na buňky infikované virem, ale také na okolní buňky a další důležitou funkcí je jejich nespecifičnost, tzn., že interferon produkován určitým virem může blokovat infekci jiných nepříbuzných virů. Tato nízká specifičnost je charakteristickým znakem vrozené imunity na rozdíl od imunity adaptivní (Ryu, 2017). Stručně lze shrnout, že působením interferonů z infikovaných buněk, dochází k indukci syntézy 2', 5', oligoadenylát syntetázy, která za spotřeby ATP (adenosintrifosfát) tvoří 2', 5', oligoadenyláty. Ty poté aktivují RNAázu L, která je schopná rozkládat virové ribonukleové kyseliny. Po vazbě interferonu na receptor je dále indukována syntéza proteinové kinázy PKR, která v přítomnosti virové RNA fosforyluje elongační faktor II (EIF<sub>2</sub>). Tímto krokem je zabráněno translaci virové mRNA, čímž je inhibována syntéza virových proteinů (viz obr. č. 7) (Greenwood et al., 2012; Ryu, 2017).

Kromě přímého protivirového účinku mají interferony I. typu také výrazné imunomodulační působení. Mění expresi molekul MHC I. třídy a podporují tak funkci NK buněk. Výrazně vyšší imunomodulační potenciál má INF $\gamma$ , který zesiluje funkce Th1 populace T lymfocytů a zvyšuje expresi molekul MHC II. třídy (Krejsek a Kopecký, 2004).

**Komplement** může pomoci v neutralizačním procesu opsonizací viru nebo přímo lýzou obalených virů. V některých případech může komplement sám inaktivovat viry (Greenwood et al., 2012).



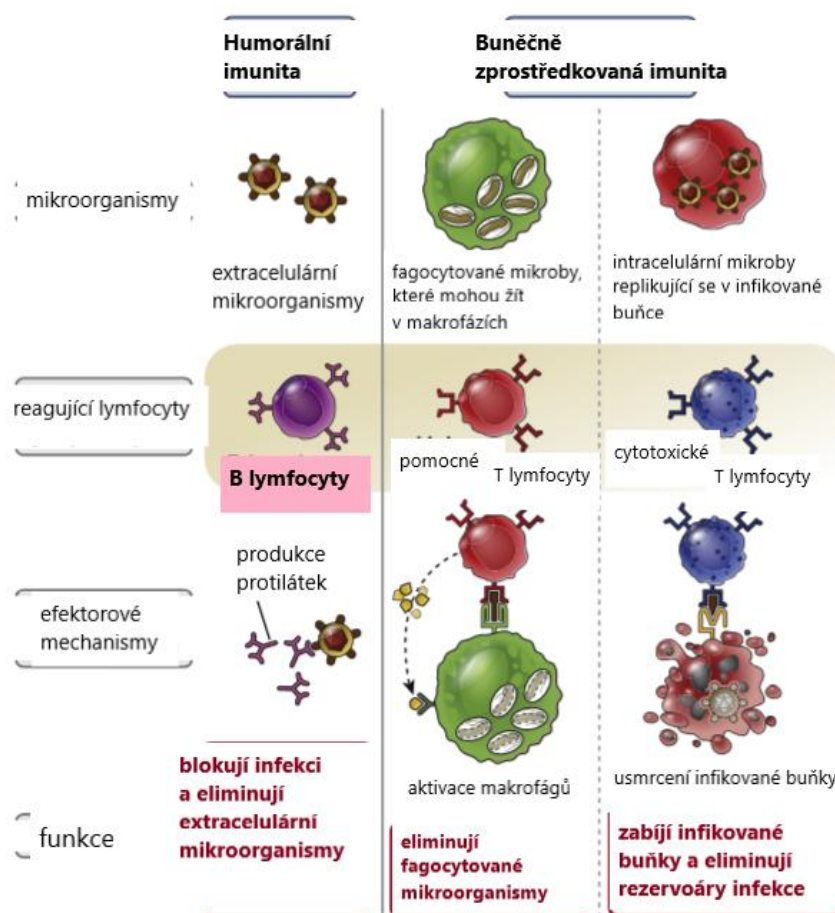
**Obr. č. 7:** **A** – mechanismy indukce syntézy interferonu ( $\text{INF}\alpha$  a  $\text{INF}\beta$ ); **B** – produkce rezistence na virovou infekci (Převzato z: Greenwood, 2012).

#### IV. obranná linie

V uvozovkách čtvrtou obrannou linií představuje **specifická (adaptivní) imunita**. Lze říci, že zatímco přirozené bariéry a vrozená imunita zachycují první nápor patogenních virů, specifická imunita získává potřebný čas k rozvinutí svého protivirového potenciálu. Její aktivity přitom určuje právě vrozená imunita. Specifická imunita se rovněž skládá z **humorálních** (založené na protilátkách) a **buněčně zprostředkovaných** (založené hlavně na T lymfocytech) mechanismů (viz obr. č. 8) (Krejsek et al., 2016). Fáze specifické imunitní odpovědi popisuje obr. č. 9 (str. 29).

Do jaké míry je adaptivní imunita ovlivněna imunitou vrozenou? Právě role dendritických buněk (viz. výše) odráží tuto intimitu a představuje spojující článek mezi antigenně nespecifickou a antigenně specifickou částí imunitního systému. Prostřednictvím dendritických buněk, je poměrně rychle dosaženo klonální expanze T lymfocytů specifických pro virové antigeny (Ryu, 2017). Navíc je pro T lymfocyty podstatné, že vlivem antigenních podnětů a kontextu rozpoznávání,

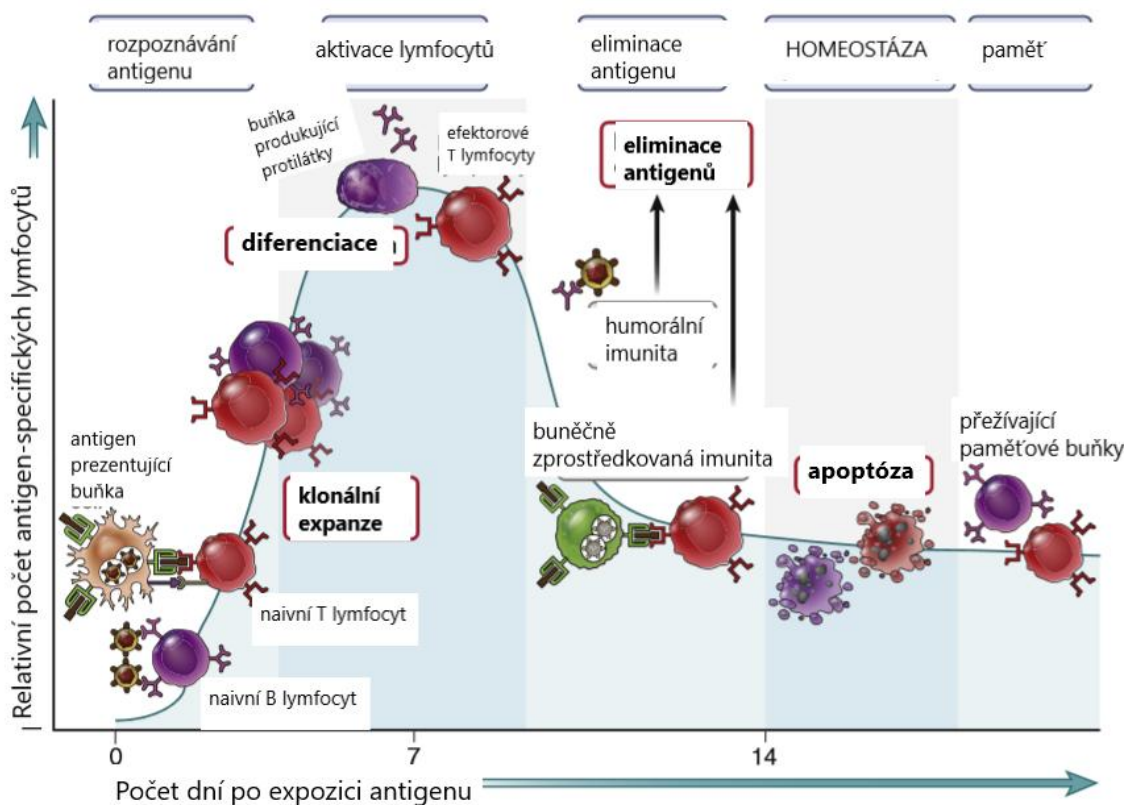
kteří jim zajišťují dendritické buňky předkládající antigenní fragmenty virového původu, dochází k funkční polarizaci subpopulace Th0 do subpopulace Th1. Ta pak tvorbou  $\text{INF}\gamma$ , IL-2 a vybraného spektra chemokinů stimuluje aktivity cytotoxických T lymfocytů ( $T_C$ ) (Lochmanová, 2014). Většina  $T_C$  lymfocytů má receptor, který se váže na fragmenty viru umístěného na molekule MHC I. třídy. Tyto T lymfocyty mají na svém povrchu molekulu **CD8**. Jakmile  $T_C$  lymfocyty rozpoznají infikovanou buňku, uvolní molekuly, které indukují apoptózu (Punt et al., 2019). Pro efektivní aktivaci těchto cytotoxických buněk jsou také zapotřebí pomocné T lymfocyty ( $T_H$  – helper). Jsou rozeznávány dva typy  $T_H$  buněk. Th1 buňky směřují imunitní odpověď na buněčně zprostředkovanou odpověď, ke které obvykle dochází v případě virových nebo jiných intracelulárních infekcí. Th2 buňky směřují imunitní odpověď na humorální a zejména antiparazitární odpověď (Flint et al., 2015).



**Obr. č. 8:** Typy adaptivní imunity. Humorální imunita je zastoupena B lymfocyty produkujícími protilátkami, které eliminují extracelulární mikroorganismy. Buněčná imunita, zastoupená  $T_H$  a  $T_C$  lymfocyty, eliminuje fagocytované mikroorganismy a infikované buňky (Převzato a upraveno dle: Abbas et al., 2016).

Destrukce buněk infikovaných virem je důležitým mechanismem eradikace viru z hostitele. **Protilátka** může neutralizovat volné viriony, ale jakmile viriony proniknou do buňky, je použit jiný mechanismus pro odstranění infikovaných buněk. Existuje několik způsobů, kterými mohou protilátky chránit hostitele proti virovým složkám. Protilátky nemohou vstoupit do buněk, a proto jsou neúčinné vůči latentním virům a těm, které se šíří přímo z buňky do buňky. Vážou se ale na extracelulární virové epitopy. Tyto epitopy mohou být na intaktních virionech nebo na povrchu infikovaných buněk. Vazba protilátky na volný virus může inhibovat řadu procesů nezbytných pro replikaci viru. Mohou blokovat vazbu na membránu hostitelské buňky, a tak zastavit adhezi a pronikání viru do buňky. Protilátky IgG a IgM mají tuto důležitou funkci v plazmě a tělních tekutinách a protilátky IgA mohou neutralizovat viry podobným mechanismem na mukózních površích. Protilátka může také fungovat ve stádiích po proniknutí viru do buňky (Korsman et al., 2012). Proces rozrušení membránového obalu viru spojený s uvolněním virové nukleové kyseliny do cytoplazmy, může být inhibován, pokud je virion pokrytý protilátkou. Protilátka může také způsobit opsonizaci virových částic a tím omezit jejich šíření a usnadnit jejich fagocytózu (Greenwood et al., 2012; Ryu, 2017).

Zkušenost, kterou T a B lymfocytární systém získá při obraně proti konkrétnímu virovému agens, je následně uložena v podobě paměťových T a B lymfocytů. Tato imunitní paměť určuje schopnost lidského organismu vyrovnat se infekčnímu tlaku virových agens a umožňuje jeho přežití (Krejsek et al., 2016).



**Obr. č. 9:** Fáze specifické imunitní odpovědi. Adaptivní imunitní odpověď sestává z různých fází; první tři jsou rozpoznávání antigenu, aktivace lymfocytů a eliminace antigenu. Dále reakce klesá, protože antigenem stimulované lymfocyty hynou apoptózou, obnovuje se rovnovážný vztah – homeostáza a antigen-specifické buňky jsou zodpovědné za vznik imunitní paměti. Doba trvání každé fáze se může lišit v různých imunitních reakcích (Převzato a upraveno dle Abbas et al., 2016).

## 2.4 Virus Epstein-Barr

Virus Epstein-Barr (EBV) známý též jako lidský herpesvirus 4 (HHV- 4) byl původně identifikován v buněčných liniích pocházejících z nádoru vyskytujícího se u afrických dětí. Tento nádor lymfoidních buněk popsán D. Burkittem je dodnes znám jako Burkittův lymfom (BL). Burkitt analýzou epidemiologie nemoci zjistil, že jde o infekční onemocnění pravděpodobně virové povahy, a že přenašečem by mohli být komáři. Geografický výskyt nádoru korespondoval s oblastmi s vysokým výskytem malárie, v klimatických podmínkách, v nichž se může komár nesoucí malárii rozmnožovat. Epstein a jeho spolupracovníci zjistili technikou elektronové mikroskopie, že buňky nádoru (BL) obsahovaly v jádře kapsidy herpesviru. Od té doby séroepidemiologické studie ukázaly, že virus je všudypřítomný agens, séropozitivita se zvyšuje s věkem ve všech komunitách, takže více než 90 % dospělých na celém světě je séropozitivních. Důležité bylo zjištění, že séra pacientů s infekční mononukleózou (IM) reagují s lymfoidními buňkami derivovanými z BL (Zuckerman et al., 2004).

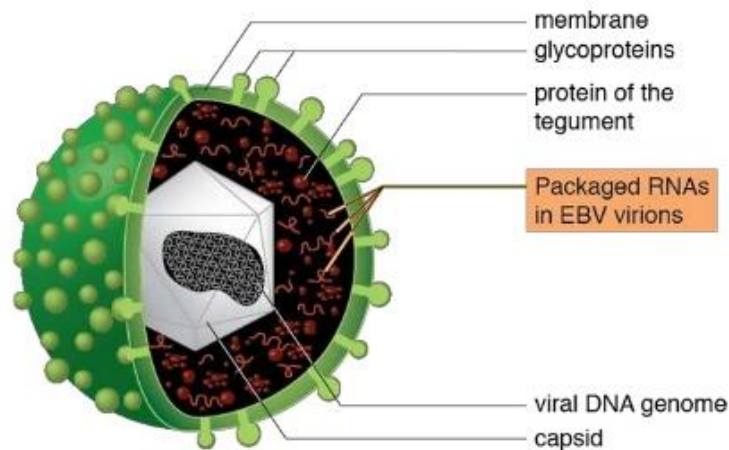
Rané séroepidemiologické a molekulární studie také zdůraznily asociaci mezi infekcí EBV a nasofaryngeálním karcinomem (NPC). Avšak pro tento nádor, stejně jako pro Burkittův lymfom, nepůsobí EBV jako jediný etiologický agens, ale je pravděpodobně jedním z potřebných kofaktorů ve vývoji tumoru. Od svého objevu byl EBV spojen s řadou dalších lymfoidních a epitelálních nádorů (Zuckerman et al., 2004; Hůlek a Urbánek, 2018).

### 2.4.1 Struktura viru

EBV je DNA virus patřící do čeledi *Herpesviridae*, podčeledi *Gammaherpesvirinae* a rodu *Lymphocryptovirus*. Jedná se o velký virus s molekulovou hmotností  $100 \times 10^6$  Da. Centrální nukleová kyselina virionu je obklopena ikosaedrální kapsidou, která sestává ze 162 trojúhelníkových kapsomer s celkovým průměrem 110 nm. Celý virion je obklopen vnějším nepravidelně tvarovaným lipoproteinovým obalem s průměrem 150-200 nm. Mezi kapsidou a obalem se nachází amorfní vrstva proteinů – tegument. Obal je složen z několika různých glykoproteinů, z nichž nejvýznamnější

je gp350/220, produkt genu BLLF1, který se váže na receptor CD21 na povrchu B lymfocytů (Rajčáni a Čiampor, 2006; Zuckerman et al., 2004).

Uvnitř virionu je dsDNA o délce 172 kb kódující okolo 100 čtecích rámců. Genom má dvě koncové (TR) a čtyři inertní repetice (IR1 – IR4), které jej dělí na 5 jedinečných úseků (viz obr. č. 10) (Mahy a Van Regenmortel, 2008).



**Obr. č. 10:** Epstein – Barr virus (HHV 4) (Převzato z: aurametrix.weebly.com).

Byly definovány dva kmeny EBV – typ 1 a typ 2 (případně A a B), které se liší v oblastech kódujících provirové latentní proteiny. Typy nevykazují žádné zvláštní zeměpisné omezení ani specifickou asociaci s chorobou, ale v západních zemích se typ 1 vyskytuje častěji než typ 2. Variance v rámci typů se vyskytují v počtu opakujících se sekvencí v každém vnitřním opakování, což umožňuje definovat specifické izoláty podle velikosti jejich latentních genů nebo jejich produktů. Analýza těchto genů pak může být použita v epidemiologických studiích ke sledování přenosu viru v rámci rodin nebo populací. (Zuckerman et al., 2004).

## 2.4.2 Replikace EBV

Úplný replikační (produktivní nebo lytický) cyklus EBV může pobíhat v určitých diferencovaných epiteliálních buňkách. B lymfocyt je hlavní a esenciální buňka infikovaná připojením virového obalového glykoproteinu gp350/220 k receptorům CD21 exprimovaným na zralých klidových B lymfocytech (Becker a Darai, 1992). Infekce B lymfocytů virem EBV je v podstatě neproduktivní.

Vyvolává patologickou vnitrobuněčnou signalizaci směřující k aktivaci genů, podílejících se na syntéze imunoglobulinů (Greenwood et al., 2012).

V neproduktivní (latentní) podobě EBV perzistuje v klidových paměťových B lymfocytech. V latentním stádiu je exprimováno pouze 10 genů EBV, což brání účinnému rozpoznání infikovaných buněk imunitnímu systému a jeho cytotoxickým T lymfocytům. Variabilní počet EBV genů je exprimován v různých formách latence. Jedná se především o geny kódující jeden nebo více ze šesti jaderných antigenů EBV (EBNA leader protein (LP), 1, 2, 3a-c) a dva latentní membránové proteiny (LMP 1 a LMP 2). Podle počtu exprimovaných proteinů se rozlišují formy latence (I, II a III). Na přítomnost LMP (Latent Membrane Protein) na povrchu B lymfocytů v období primární infekce reagují T lymfocyty tvorbou atypických mononukleárních buněk (De Paschale a Clerici, 2012). Po překonání infekční mononukleózy je běžná latence typu I, při které se exprimuje pouze protein EBNA 1. EBNA 1 se váže na DNA a zajišťuje, že genom EBV se udržuje v B lymfocytech v cirkulární episomální podobě. Také je jediným latentním proteinem exprimovaným ve všech typech nádorů spojených s EBV. EBNA 2 zvyšuje expresi proteinů LMP-1 a LMP-2. Protein LMP-1 je virovým onkogenem podporujícím proliferaci B lymfocytů. Protein LMP-2 brání reaktivaci EBV z latentní formy. Latence zahrnuje různé vzorce exprese těchto latentních virových proteinů (Greenwood et al., 2012; Mahy a Van Regenmortel, 2008).

Produktivní replikace viru probíhá v dlaždicovém nerohovatějším epitelu nosohltanu a mandlí. Na tyto buňky se virus adsorbuje prostřednictvím svých glykoproteinů gp85, gp25 a gp42 (Rajčáni a Čiampor, 2006).

## **2.4.3 Patogeneze EBV**

### **2.4.3.1 Primární infekce**

Částice EB viru infikují jak epitelové buňky, tak B lymfocyty. Infekce začíná v epiteliálních buňkách, obvykle v mukózním epitelu v orofaryngeální dutině, což jsou místa pro vylučování virových částic. Orální epitel a tkáň mandlí jsou bohaté na lymfoidní buňky a poskytují ideální prostředí pro další fázi infekce. Po produktivní infekci epitelových buněk mohou uvolněné částice infikovat



B lymfocyty, ve kterých může modifikovaný transkripční program vést ke vzniku latentní infekce. Virový genom DNA existuje jako cirkulární, samoreplikující se epizom v jádře B lymfocytů. Tento epizom je spojen s nukleozomy a podléhá progresivní metylaci na zbytcích CpG ostrůvků. Když jsou latentně infikované B lymfocyty ve styku s epitelovými buňkami, virus může být reaktivován, což vede k produkci potomstva částic, které mohou infikovat epitelové buňky. Infekční částice se vylučují převážně ve slinách, ale bylo zaznamenáno také vylučování z plic a cervikálního epitelu (Flint et al., 2015; Mahy a Van Regenmortel, 2008).

#### 2.4.3.2 Perzistující infekce

Jak latentně infikované, tak produktivně infikované B lymfocyty cirkulují mezi aktivovanými, virově specifickými cytotoxickými T lymfocyty v krvi infikovaných jedinců a protilátky specifické pro virové proteiny jsou zde hojné. To, jak je latence udržována v B lymfocytech v souvislosti s aktivní imunitní odpovědí, je zásadní pro klinický vývoj infikovaného jedince (Flint et al., 2015).

Děti a dospívající jsou obvykle infikováni po orálním styku (odtud „kissing disease“). Akutní infekce vyžaduje expresi většiny virových genů a rychle tak stimuluje silnou imunitní odpověď. Šíření infekce do B lymfocytů u imunokompetentních jedinců indukuje infikované buňky, aby se rozdělily, což posílí imunitní a cytokinovou odpověď. Výsledné onemocnění se nazývá infekční mononukleóza (IM). Následující imunitní odpověď ničí většinu infikovaných buněk, ale přibližně 1 z 100 000 přežije (Flint et al., 2015). Ty přetrvávají jako malé neproliferující paměťové B lymfocyty, které produkují pouze latentní membránový protein LMP-2A mRNA. Jsou udržovány v lymfoidních orgánech a kostní dřeni. Tyto buňky neprodukují koaktivátorový receptor B7, a proto nejsou rozpoznávány nebo eliminovány cytotoxickými T lymfocyty (Flint et al., 2015; Mahy a Van Regenmortel, 2008).

Při kultivaci periferních krvinek infikovaného jedince stimuluje růstové faktory v médiu proliferaci latentně infikovaných B lymfocytů, zatímco neinfikované buňky umírají. Důležité je si uvědomit, že tyto kultivované „immortalizované“ B lymfocyty (lymfoblasty) nejsou stejné jako latentně infikované buňky, cirkulující *in vivo*. Tvoří ale nejlépe pochopený model latentní infekce EBV.

Tyto immortalizované lymfoblasty syntetizují soubor nejméně 10 virových proteinů, včetně 6 jaderných proteinů (nazývaných EBNA), tří virových membránových proteinů (LMP), malých molekul RNA nazývaných EBER-1 a EBER-2 a alespoň 20 microRNA. Podle virových genových produktů syntetizovaných v infikovaných B lymfocytech (nazývaných latence I až III) lze rozlišit alespoň tři odlišné fenotypy nebo programy. Syntéza odlišných sad virových proteinů a RNA i typů latence jsou také spojeny s konkrétními nemocemi spojenými s EBV (viz tabulka č. 3) (Flint et al., 2015; Mahy a Van Regenmortel, 2008; Ryu, 2017).

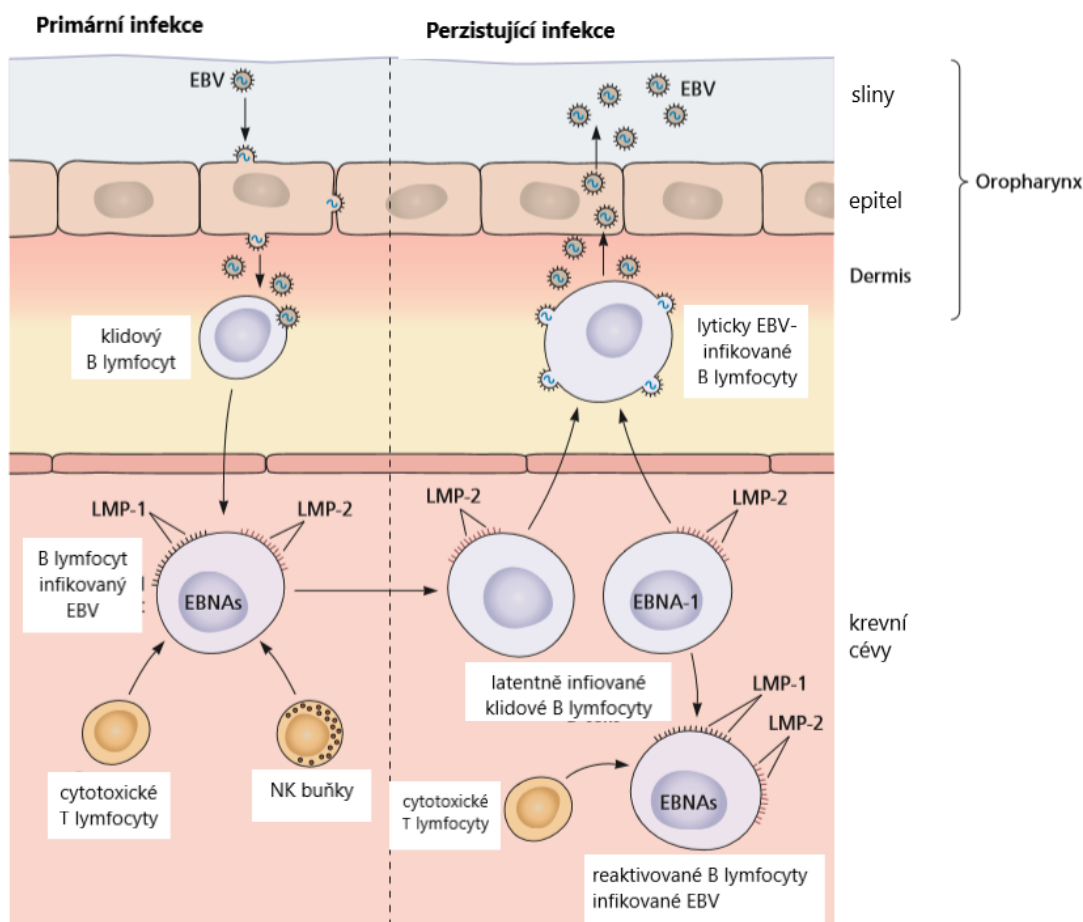
**Tabulka č. 3:** Typy latence – Epstein-Barr virus

Typ latence	Exprimované geny viru	Onemocnění
0	Žádné	žádné
I	LMP-2A/EBNA-1	Burkittův lymfom
II	EBNA-1, LMP-1, LMP-2A, -2B	Hodgkinův lymfom, nasofaryngeální karcinom
III	EBNA-1, -2, -3, -4, -5, -6, LMP-1, -2A, -2B	infekční mononukleóza, AIDS-související imunoblastický B lymfom

Převzato a upraveno dle Flint et al. (, 2015).

Složitá kolekce různých fenotypů B lymfocytů je nejlépe pochopitelná v kontextu jejich normální biologie. Aby mohly vstoupit do klidového stavu a stát se paměťovou buňkou, musí neinfikované B lymfocyty navázat svůj příbuzný antigen a obdržet pomocné signály od pomocných ( $T_H$ ) T lymfocytů v zárodečných centrech lymfoidní tkáně. Během latentní infekce napodobují virové proteiny LMP-1 a LMP-2a všechny tyto kroky, takže infikovaný B lymfocyt se může diferencovat v paměťovou buňku v nepřítomnosti vnějších podnětů. Ačkoliv imunokompetentní jedinci udržují cytotoxické T lymfocyty namířené proti mnoha virovým proteinům syntetizovaným v latentně infikovaných B lymfocytech, tyto buňky nejsou eliminovány. Některé virové proteiny, jako je LMP-1, inhibují apoptózu nebo imunitní rozpoznávání latentně infikovaných buněk. Kromě toho proteiny EBNA-1 nejsou prezentovány T lymfocytům. Když se změní rovnováha mezi proliferací latentně infikovaných B lymfocytů a imunitní odpovědí, která je eliminuje

(např. po imunosupresi), mohou imortalizované B lymfocyty tvořit lymfomy (viz obr. č. 11) (Flint et al., 2015; Mahy a Van Regenmortel, 2008).



**Obr. č. 11:** Epstein-Barr virus – primární a perzistující infekce. Převzato a upraveno dle: Flint et al. (, 2015)

**Primární infekce** – EBV infikuje epitelové buňky v orofaryngu (např. mandle). Virové částice pak mohou infikovat klidové B lymfocyty v lymfoidní tkáni. Virem infikované B lymfocyty produkují latentní virové proteiny a RNA (např. LMP-1 a LMP-2) a jsou stimulovány ke vstupu do mitózy a proliferaci. Latentně infikované buňky jsou napadeny NK buňkami a cytotoxickými T lymfocyty.

**Perzistující infekce** – většina infikovaných B lymfocytů je usmrcena jako výsledek vrozené imunitní obrany, ale několik (přibližně 1 z 100 000) přetrvává v krvi jako malé, neproliferující paměťové B lymfocyty, které syntetizují pouze LMP-2A mRNA. Tyto paměťové B lymfocyty jsou pravděpodobně dlouhodobou rezervou EBV *in vivo* a zdrojem infekce při kultivaci. Omezená imunitní odpověď na tyto infikované B lymfocyty vede k samovolné proliferaci, infekční mononukleóze nebo neomezené proliferaci (polyklonální lymfom B lymfocytů). Když jsou stimulovány nebo produkovány v kultuře, virové proteiny potřebné pro replikaci a udržování virového genomu, jsou znovu produkovány. Některé latentně infikované přenosy B lymfocytů do lymfoidních tkání v blízkosti epitelových buněk v orofaryngu vedou ke stimulaci B lymfocytů a k produkci částic schopných infikovat a replikovat se v epiteliálních buňkách. Virové částice jsou produkovány a přenášeny do slin pro přenos na jiného hostitele.

#### 2.4.4 Imunitní odpověď na EBV

EBV vyvolává humorální i buněčnou imunitní odpověď u infikovaných hostitelů. Primární infekce EBV je spojena s rychlým nástupem protilátek proti replikačním antigenům, jako je virový kapsidový antigen (VCA), časný antigen (EA) a membránový antigen (MA; gp350/220) s pozdější sérologickou reakcí na proteiny EBNA (De Paschale a Clerici, 2012). U infekční mononukleózy jsou tyto reakce přehnané a jsou doprovázeny autoprotilátkami, jako je revmatoidní faktor a také heterofilní protilátkovou odpovědí namířenou proti antigenům na povrchu ovčích erytrocytů. Tyto protilátky jsou výsledkem EBV-indukované aktivity polyklonálních B lymfocytů. V chronickém asymptomatickém virovém přenašeči se nacházejí protilátky proti VCA, MA a EBNA, jejichž titry zůstávají pozoruhodně stabilní. Z těchto protilátek jsou zvláště důležité protilátky proti MA, protože mají schopnost neutralizovat virus a mohou také zprostředkovat buněčnou cytotoxicitu závislou na protilátkách. Hladiny těchto EBV specifických protilátek jsou zvýšené u různých onemocnění spojených s EBV (Mahy a Van Regenmortel, 2008).

Stejně jako u jiných perzistujících virů hraje buněčná imunita důležitou roli při kontrole EBV infekce. Primární infekce EBV vyvolává robustní buněčnou imunitní odpověď a lymfocytóza pozorovaná u infekční mononukleózy je důsledkem hyperexpanze cytotoxických CD8 T lymfocytů reaktivních proti latentním i lytickým virovým antigenům. Tyto reaktivity jsou následně udržovány na vysoké úrovni v paměťových CD8 T lymfocytech. Reakce CD4 T lymfocytů specifická pro EBV také přispívá k regulaci infekce EBV a spolu s odpovědí CD8 se jeví jako důležitá, protože brání neomezené proliferaci B lymfocytů infikovaných EBV. Tedy zhoršení odpovědi T lymfocytů, buď imunosupresivní léčbou, nebo infekcí HIV, je odpovědné za vývoj polyklonálních lymfoproliferací, které mohou postupovat přímo k monoklonálním non-Hodgkinovým lymfomům. Tyto léze mohou být kontrolovány adoptivní terapií s EBV specifickými T lymfocyty. Růst a přežití Burkittova lymfomu (BL), nasofaryngeálního karcinomu (NPC) a Hodgkinova lymfomu (HL) u imunokompetentních jedinců znamená, že nádorové buňky se mohou vyhnout sledování T lymfocytů specifických pro EBV. Toho může být dosaženo restrikcí exprese EBV latentního genu na ty virové proteiny, které nejsou účinně rozpoznávány T buněčnými odpověďmi anebo „downregulací“ molekul cílových buněk pro imunitní rozpoznávání, jako je hlavní histokompatibilní

komplex (MHC) I. třídy a zařízení pro zpracování antigenu (Mahy a Van Regenmortel, 2008).

## 2.4.5 Klinické příznaky EBV

- **Infekční mononukleóza (IM)**

Pod názvem infekční mononukleóza se nejčastěji rozumí manifestní primoinfekce herpetickým virem Epstein-Barrové, jakožto nejdůležitějším etiologickým agens. Během inkubační doby, která trvá zhruba 4 až 6 týdnů, dochází k primárnímu pomnožení viru v epiteliálních buňkách nosohltanu a v B lymfocytech tonsil a krčních mízních uzlin. Proliferace B lymfocytů postupně vede k infiltraci dalších lymfatických tkání, především sleziny a jater a k rozvoji infekční mononukleózy. Syndrom IM může být vyvolán cytomegalovirem (CMV), vzácně dalšími agens jako adenoviry, HIV, HHV6 či *Toxoplasma gondii* (Ambrožová, 2005; Bednář et al., 1996; Hurt a Tamaro, 2007).

Zdrojem onemocnění je nemocný jedinec nebo přenašeč viru. Onemocnění se manifestuje horečkou, faryngitidou, tonsilitidou a zvětšením mízních uzlin. Typická je silná malátnost (syndrom únavy), slezina bývá zvětšená, infiltrovaná lymfoidními buňkami, nechutenství a poruchy trávení jsou známkami poruch jaterních funkcí (Balfour et al., 2015). Typický je krevní obraz, jehož změny jsou vyvolány působením viru na B lymfocyty. Asi v 90 % případů bývá přítomna leukocytóza, v diferenciálním rozpočtu převažují lymfocyty a monocyty nad neutrofilů. Imunitní systém reaguje na proliferaci transformovaných B lymfocytů aktivací a klonální proliferací cytotoxických a supresorových T lymfocytů. Právě tyto buňky jsou v průběhu rozvinuté IM ve zvýšeném počtu lymfocytů nejvíce zastoupeny. Primární infekce může vzácně vést k rozvoji hemolytické anemie, encefalitidy, myelitidy, radikulitidy, či intersticiální pneumonii, a to i bez klinického obrazu IM (Bednář et al., 1996; Ambrožová, 2005).

Syndrom **chronické infekční mononukleózy** se může u některých jedinců rozvinout po akutním onemocnění, kdy dochází k častým opakovaným reaktivacím latentní infekce EBV. Klinickými příznaky jsou v tomto případě faryngitida, syndrom chronické únavy, lymfadenopatie, bolesti v kloubech aj. (Bednář et al., 1996).

- **Lymfoproliferativní syndrom vázaný na chromozom X**  
(XLP, chromosome X linked lymphoproliferation)

Někdy vzniká u jedinců bez zjevného imunologického defektu, častěji pak u osob s geneticky podmíněnou imunodeficiencí, vázanou na X chromozom. V tomto případě je průběh infekce velmi těžký a často fatální. Infekce EBV může vyústit do tří stavů – těžkou až fatální infekční mononukleózu, lymfoproliferativní syndrom anebo dysimunoglobulinemií až hypogamaglobulinemií. Vzácněji se syndrom manifestuje jako aplastická anémie nebo vaskulitida. Je zde snižena odpověď  $T_H$  lymfocytů, naopak převažuje proliferace  $T_C$  lymfocytů a polyklonální aktivace B lymfocytů (Modrow et al., 2010; Rajčáni a Čiampor, 2006).

- **Burkittův lymfom (BL)**

Jedná se o nádor lymfatických uzlin, vyskytující se endemicky v oblastech rovníkové Afriky a Nové Guineje jakožto nejčastější typ zhoubných nádorů u dětí. Jeho výskyt koreluje s výskytem malárie. Nádorové buňky mají znaky B lymfocytů. Nádor je monoklonální. Na rozdíl od jiných EBV-asociovaných lymfomů zde nejsou vyjádřeny membránové proteiny (LMP) podmiňující stav latentní infekce. Klinicky se projevuje výrazným zvětšením lymfatických uzlin a sleziny, poškozením kostní dřeně a tymu, hepatitidou a myokarditidou. Patogeneze je charakteristická translokacemi chromozomů 8/14, 8/22 a případně 2/8 (Modrow et al., 2010; Rajčáni a Čiampor, 2006).

- **Nasofaryngeální karcinom (NPC)**

Nádor nosohltanu, u něhož se předpokládá etiologická souvislost s infekcí EBV. Vyskytuje se na celém světě, zvláště pak v jižní Číně a jihovýchodní Asii. Ve všech buňkách tohoto typu nádoru jsou přítomny genomy EBV, EBNA1 a LMP. Průvodním znakem nádoru jsou vysoké hladiny IgG a IgA proti virovému kapsidovému antigenu a proti D komponentě časného antigenu (EA) (Bednář et al., 1996; Rajčáni a Čiampor, 2006).

- **Hodgkinův lymfom (HL)**

Pro souvislost s latentní infekcí EBV svědčí vyšší titry protilátek k EBV antigenům u infikovaných osob ještě před propuknutím onemocnění. V nádorové populaci Reed-Sternbergových buněk byla téměř u poloviny nemocných prokázána virová DNA i RNA a EBV asociované antigeny (Bednář et al., 1996).

## **2.4.6 Diagnostika EBV**

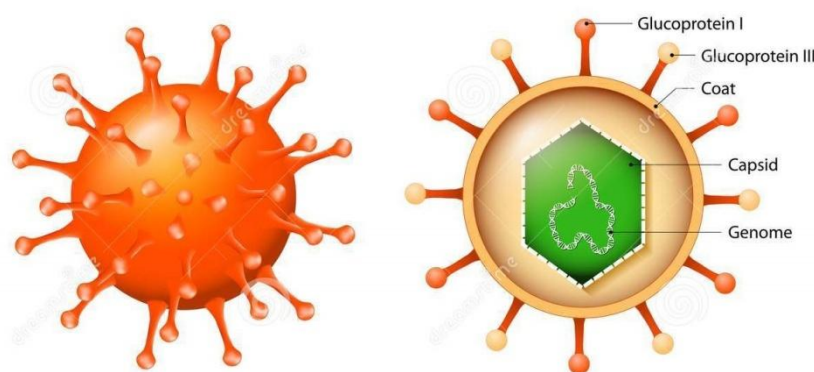
Spektrum testů protilátek zahrnuje jak nespecifické testy (test heterofilních protilátek), tak i testy specifické pro EBV, které kromě molekulárních metod zahrnují metody s různými substráty, antigeny a různými interpretačními kritérii (Hess, 2004). Strategie diagnostiky se liší mezi imunokompromitovanými a imunokompetentními jedinci vzhledem k odlišným terapeutickým zásahům. Protože je u imunokompromitovaných jedinců doba intervence kritickým faktorem, musí diagnostická metoda splňovat určitá kritéria – včasná detekce replikace EBV a vysoká pozitivní prediktivní hodnota pro dané onemocnění umožní preventivní terapii. Metody přímé detekce tak splňují především tento profil. Naproti tomu u imunokompetentních jedinců je klíčovou otázkou detekce nebo vyloučení primární infekce, reinfekce, latentní či žádné infekce EBV (Hess, 2004).

Průkaz infekce EBV je postaven především na detekci přítomnosti specifických protilátek proti jednotlivým antigenům viru, a to imunochemickými technikami, zvláště ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) a imunofluorescencí. Tyto metody plně nahradily v minulosti používaný nespecifický test, tzv. Paul-Bunnellovu sérologickou reakci, která prokazovala přítomnost aglutininů, které byly schopny aglutinovat heterologní např. koňské nebo ovčí erythrocyty (Prashant et al., 2018). Průkazem specifických protilátek proti vhodně vybraným antigenům EBV lze nejen prokázat infekci, ale také vyhodnotit zda se jedná o primoinfekci či reaktivaci EBV. Genom EBV lze také stanovit pomocí PCR (Krejsek a Kopecký, 2004). Vzhledem k tomu, že buněčná imunita hraje důležitou roli při kontrole EBV infekce, je také toto vyšetření významnou součástí diagnostiky této infekce.

V metodice této práce je stručně popsáno spektrum metod prováděných na Pracovišti imunologie a v Laboratoři molekulární biologie a genetiky Nemocnice České Budějovice, a.s. využívaných pro detekci EBV infekce.

## 2.5 Cytomegalovirus (CMV)

Cytomegalovirus, též známý jako lidský herpesvirus 5 (HHV-5), je DNA virus, největší z rodiny herpetických virů. Patří do čeledi *Herpesviridae* a podčeledi *Betaherpesvirinae*. Morfologie viru, způsob replikace a citlivost k fyzikálním a chemickým vlivům se neliší od ostatních herpesvirů. Centrální jádro obsahující dvouvláknovou virovou DNA je obklopeno kapsidou složenou ze 162 kapsomer. Nukleokapsida je obklopena tegumentem, jehož součástí je fosfoprotein, označovaný jako pp65. Právě postavení pp65 v obranném zánětu proti CMV hraje zásadní roli. Jeho detekce je zároveň využívána pro identifikaci reaktivace CMV infekce. Vnější strukturu tvoří lipidová dvojvrstva se zakotvenými obalovými glykoproteiny, které jsou hlavními terči neutralizačních protilátek (viz obr. č. 12) (Korsman et al., 2012; Krejsek et al., 2016).



Obr. č. 12: Struktura CMV (Převzato z: [www.dreamstime.com](http://www.dreamstime.com)).

### 2.5.1 Epidemiologie a přenos CMV

CMV existuje v několika druhových variantách, přičemž každý druh infikuje výhradně svého hostitele. Lidský cytomegalovirus infikuje pouze člověka. V populaci se vyskytuje jako heterogenní směs kmenů, které jsou si ale antigenně velmi podobné a sérologicky se nedají rozlišit. Séroepidemiologické studie dokazují, že cytomegalovirus se v lidské populaci šíří po celém světě. Míra séroprevalence dosahuje v různých oblastech v závislosti na socioekonomických podmínkách 50 - 100 % (Bednář et al., 1996; Modrow et al., 2010).



Pro přenos viru je nutný těsný kontakt mezi osobami. Infikované osoby vylučují virus téměř do všech sekretů a tělních tekutin – slin, moči, stolice, mléka, plodové vody, krve. Virus se nachází také v sekretu děložního hrdla a spermatu, tedy i pohlavní styk je zdrojem infekce. Přenos je možný také prostřednictvím orgánových transplantátů a krevními deriváty. Infekce kojenců a malých dětí jsou často způsobeny mateřským mlékem po narození, protože téměř všechny séropozitivní matky reaktivují cytomegaloviry během kojení a vylučují je do mléka (Modrow et al., 2010; Zuckerman et al., 2004).

Virus může být přenášen jakoukoliv cestou během primární infekce, reinfekce nebo reaktivace. K primární infekci dochází v jakémkoliv věku a většinou probíhá inaparentně. Po překonání nákazy není virus z organismu hostitele eradikován, nýbrž v něm latentně perzistuje po zbytek života. Příležitostně se CMV ze svého latentního stavu reaktivuje (v podmínkách imunosuprese) a tyto reaktivace jsou důležité pro horizontální i vertikální přenos viru (Korsman et al., 2012; Zuckerman et al., 2004).

## 2.5.2 Klinické příznaky CMV

Inkubační doba při primoinfekci se pohybuje v rozmezí čtyř až osmi týdnů, při reaktivaci je o něco kratší. U imunokompetentních jedinců probíhá primární infekce většinou asymptomaticky, může se objevit horečka s lymfocytózou. Primární infekce u adolescentů a dospělých bývá spojována s příznaky infekční mononukleózy (IM), ovšem s tím rozdílem, že tato, na rozdíl od IM vyvolané EBV, není provázena vznikem heterofilních protilátek a také počet atypických lymfocytů v oběhu je nižší (Bednář et al., 1996; Rajčáni a Čiampor, 2006).

Intrauterinní infekce CMV může vést k úmrtí plodu nebo vzniku kongenitálních malformací projevujících se např. mikrocefalií, hepatosplenomegalií, chorioretinitidou, periventrikulární kalcifikací a jinými příznaky. „*Jindy je infekce plodu asymptomatická a je spojena s dlouhodobým vylučováním viru v postnatálním období*“ (Bednář et al., 1996). V pozdějším období se může projevit např. duševní retardací, hluchotou. Vyšší pravděpodobnost transplacentárního přenosu nastává v případě primární nákazy matky v časném stadiu gravidity (Bednář et al., 1996; Rajčáni a Čiampor, 2006).

Perinatální infekce novorozence může nastat během porodu (přítomnost CMV ve vaginálním sekretu) nebo mateřským mlékem. Často probíhá asymptomaticky. Někdy, zejména u nedonošených dětí, se vyvine intersticiální pneumonie (Rajčáni a Čiampor, 2006).

U imunosupresivních pacientů patří hepatitida, chorioretinitida, gastrointestinální ulcerace a kolitida s bolestí a průjmem a encefalitida k běžně pozorovaným komplikacím. Intersticiální pneumonie patří mezi nejčastější příčiny úmrtí pacientů s AIDS a pacientů po transplantaci. Cytomegaloviry tedy hrají důležitou roli u pacientů po transplantaci při primárních infekcích i při reaktivacích a i přes léčbu způsobují stále vysokou míru úmrtí (Modrow et al., 2010).

### **2.5.3 Patogeneze CMV**

Cytomegaloviry se nachází v mnoha orgánech, zejména pak ve slinných žlázách, ledvinách a nadledvinách. Virová DNA může být detekována také v patohistologicky normálních buňkách myokardu, v játrech, slezině, plicích, kostní dřeni. Virus může být přítomen volně v krvi nebo vázán na buňky, včetně endoteliálních buněk a granulocytů. Virus pravděpodobně přetrvává v mnoha orgánech v latentní formě. Šíření cytomegalovirové infekce je do značné míry ovlivněno funkčním stavem imunitního systému. U jedinců s imunodeficiencí je nutné rozlišovat mezi primárními infekcemi a reaktivacemi (Modrow et al., 2010; Rajčáni a Čiampor, 2006).

### **2.5.4 Imunitní odpověď na CMV**

Na cytomegalovirovou infekci reagují vrozené imunitní mechanismy tvorbou interferonů I. a III. třídy, aktivací komplementu a NK buněk. Poté nastupuje adaptivní imunita, kdy jednoznačně nejdůležitější roli hrají cytotoxické T lymfocyty. Dendritické buňky identifikují CMV pomocí TLR receptorů (Toll-like receptor) Zpracovávají antigenní struktury viru, které následně prezentují T lymfocytármímu systému. Pomocné T lymfocyty (CD4) rozpoznávají fosfoprotein pp65 a některé obalové glykoproteiny. Prostřednictvím cytokinů reagují preferenčním vyzráváním do subpopulace Th1, která zajistí podporu cytotoxické aktivity CD 8 T lymfocytů. Subpopulace Th2 stimuluje protilátkovou odpověď B lymfocytů specifických

pro antigeny CMV. Výsledkem je tvorba neutralizačních protilátek proti obalovým glykoproteinům a matrixovým proteinům, aktivace komplementového systému, zabránění přichycení a penetrace CMV a diseminace infekce. Ani protilátková, ani buněčná imunitní odpověď ale nedokáže zabránit reaktivaci latentní infekce (Krejsek et al., 2016; Modrow et al., 2010).

CMV se dokáže imunitní odpovědi účinně bránit, přičemž používá různé mechanismy. Jednou z možností je inhibice cytotoxické aktivity T lymfocytů, dosažené útlumem exprese příslušných terčových antigenů prezentovaných infikovanou buňkou nebo snížením exprese MHC I molekul. Je známo několik genů lidského CMV (např. US2, US3, US6, US11, UL83), které jsou aktivovány během časné fáze replikace a jejichž produkty různým způsobem brzdí prezentaci virových peptidů MHC I molekulami. Blokováním transmembránové signalizační dráhy pro  $\text{INF}\gamma$ , blokuje CMV interferonem gama indukovanou expresi MHC II na makrofázích a omezuje tak stimulaci CD4 T lymfocytů. Protilátková odpověď je modifikována tvorbou virového Fc receptoru, který váže a tím zneškodňuje všechny čtyři podtřídy IgG. CMV se také dokáže bránit vrozeným imunitním reakcím – tvoří nefunkční homology MHC I molekul, kterými oklamává NK buňky a také snižuje aktivitu komplementu (Arvin et al., 2007; Krejsek et al., 2016; Rajčáni a Čiampor, 2006).

### **2.5.5 Diagnostika CMV**

Význam diagnostiky CMV narůstá v souvislosti s rozšiřováním transplantačních programů a s přibývajícím počtem osob s imunodeficitem. Laboratorní diagnostika je detailně propracována. Intravitam je průkaz infekce CMV založen na kultivaci, průkazu genetické informace cytomegaloviru technikami PCR a dále na průkazu antigenů CMV nebo specifických protilátek namířených proti antigenům CMV. Všechny tyto vyšetřovací postupy jsou vhodné k průkazu viru v různých biologických vzorcích (Krejsek a Kopecký, 2004).

Zavedení průkazu antigenu pp65 bylo zásadním krokem v rychlé diagnostice CMV. Protein pp65, který je součástí tegumentu, je tvořen ve velkém množství infikovanými buňkami. V periferní krvi, kam proniká po destrukci buněk, je absorbován granulocyty. Právě tento nález je důkazem aktivní replikace CMV v průběhu viremie. K průkazu se používají imunofluorescenční techniky, je ale třeba

vyhodnotit velké množství leukocytů (několik desítek tisíc), a proto je výhodnější využít průtokovou cytometrii (Modrow et al., 2010).

Metoda PCR pro průkaz genomu CMV se využívá k detekci časných stadií CMV viremie. Důležité je ale mít na paměti možnost amplifikace latentně přítomného CMV. Z toho důvodu je daleko vyšší prediktivní hodnota negativního průkazu CMV technikou PCR v porovnání s pozitivním nálezem (Krejsek a Kopecký, 2004).

## 2.6 Metodické otázky diagnostiky herpesvirů

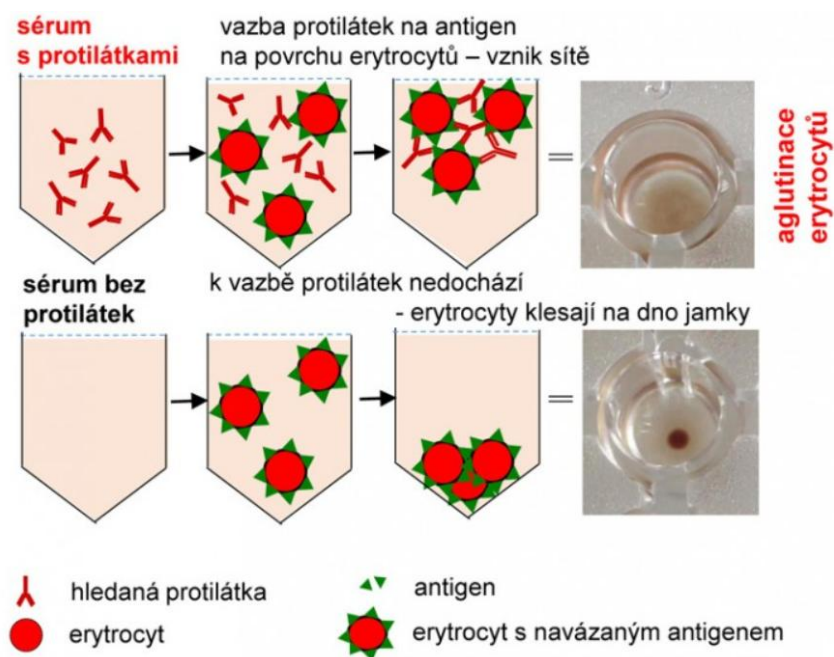
Vzhledem k tomu, že herpetické viry mají schopnost navodit u svého hostitele celoživotní perzistentní infekci, provázenou obdobími latence a reaktivace, přináší s sebou laboratorní diagnostika určitá úskalí. Důsledkem většinou asymptomatického vylučování viru do tělních sekretů je nekontrolovatelné šíření herpesvirů v populaci. Infekce je kontrolována imunitním systémem, především buněčnou imunitou. Pro diagnostiku jsou k dispozici nepřímé diagnostické metody, založené na průkazu specifických protilátek a metody přímého průkazu přítomnosti virového materiálu v klinických vzorcích (Roubalová, 2010).

Diagnostika EBV spočívá ve využití nepřímých (heterofilní protilátky, imunofluorescence, ELISA) a přímých (PCR) metod. Mezi nově používané metody pak patří vyšetření buněčné imunity a s ní spojená metoda průtokové cytometrie, která má právě v případě akutní infekce EBV specifický obraz. Před samotnou charakteristikou jednotlivých metod, je důležité zmínit, že společným znakem imunologických laboratorních metod (a to nejen metod humorální ale i některé buněčné imunity) je **reakce antigen – protilátka** (Bartůňková a Paulík, 2005).

Společným rysem **metod nepřímého průkazu** je využití vyšetření, které neodhalí přímo původce onemocnění, ale specifickou odpověď organismu na infekci. Touto odpovědí je v naprosté většině případů tvorba specifických protilátek. Podle principu detekce se metody průkazu protilátek dělí na metody s přímou nebo nepřímou detekcí a na ty, které využívají značené protilátky (Nohýnková, 2017).

Detekce **heterofilních protilátek** (tzv. **Paul-Bunnellova reakce -PB**) patří mezi metody s nepřímou detekcí. Principem metody je aglutinace, resp. hemaglutinace (viz obr. č. 13). Hemaglutinace je založena na vazbě protilátek

přítomných v séru na antigeny původce navázaných na povrchu červených krvinek. Pokud jsou ve vyšetřovaném séru přítomny protilátky specifické pro dané antigeny, dojde k jejich navázání na antigeny na povrchu erytrocytů. Tím se vytvoří vzájemně provázaná síť, která zachytí erytrocyty a zabrání tak jejich přirozenému klesání na dno jamky. Počet zachycených krvinek je přímo úměrný množství protilátek ve vyšetřovaném séru. V případě, že v séru nejsou žádné protilátky, klesají všechny krvinky gravitační silou na dno jamky, kde vytváří dobře viditelnou peletu (tečku) (Lochmanová, 2014; Tankeshwar, 2014).

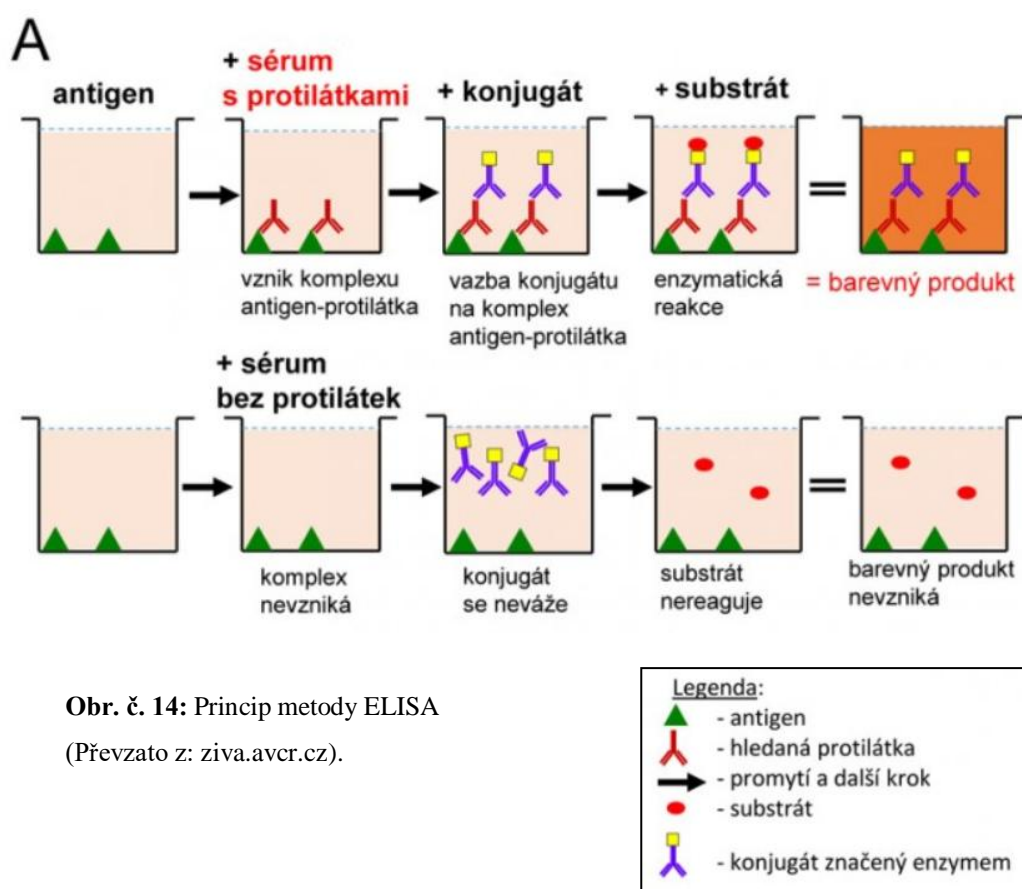


Obr. č. 13: Princip hemaglutinace (Převzato z: ziva.avcr.cz).

Mezi metody, které využívají značené protilátky, a které výrazně zvyšují citlivost imunoanalytických přístupů, patří kromě RIA (z ang. radioimmunoassay) také **FIA** (fluoroimmunoassay) a **EIA** (enzyme immunoassay) (Nohýnková, 2017).

**Imunofluorescence** je metoda založená na vizualizaci imunokomplexu pomocí antigenu či protilátky značené fluorescenčním barvivem (fluorochromem). Fluorochromy po excitaci světlem určité vlnové délky vyzáří viditelné světlo, které je prokazováno (Lochmanová, 2014). Nejčastěji používaným je FITC (Fluorescein IsoThioCyanát), jehož absorpční maximum je v rozmezí 490 až 495 nm, a který emituje světlo o vlnové délce cca 520 nm v zelené oblasti (Bartůňková a Poulík, 2005).

K průkazu specifických protilátek se nejčastěji používají **imunoenzymatické metody – EIA**, a to metoda **ELISA** (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), která se řadí do heterogenních nekompetitivních enzymových imunoanalýz. Jde o dvoustupňovou techniku, při níž je jedna složka reakce (antigen nebo protilátka) navázána na pevný nosič. Princip reakce popisuje obr. č. 14. Výsledná barevná reakce se odečítá nejčastěji fotometricky měřením absorbance, která je přímo úměrná množství hledané specifické protilátky (Lochmanová, 2014).

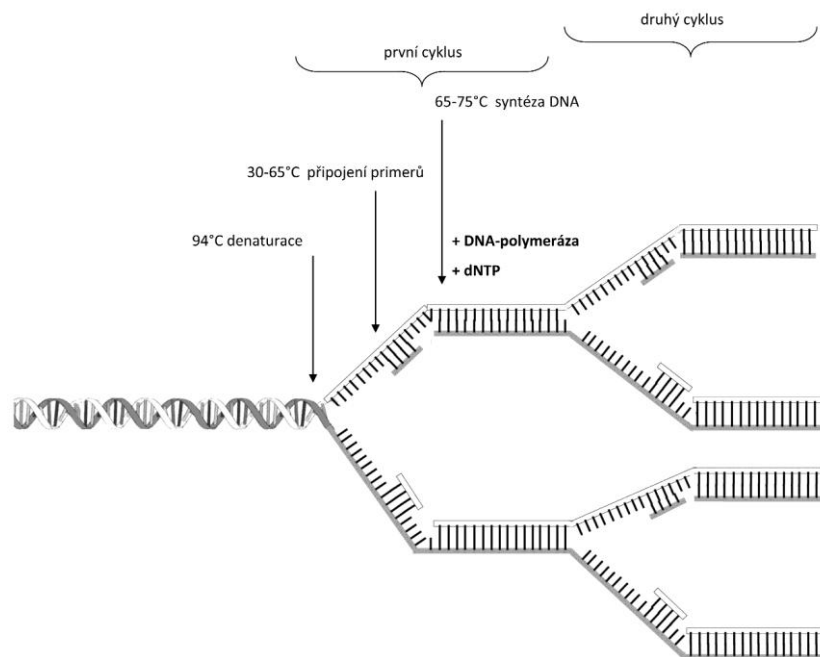


**Obr. č. 14:** Princip metody ELISA  
(Převzato z: ziva.avcr.cz).

Naproti tomu u **metod přímého průkazu** rozumíme přímým průkazem záchyt původce onemocnění (viru, bakterie, parazita...) nebo jeho složek (antigenů nebo nukleových kyselin) v klinickém materiálu. K těmto metodám patří především mikroskopie, kultivace, metody průkazu RNA/DNA a metody průkazu antigenu (Votava, 2005).

K průkazu přítomnosti nukleové kyseliny virových částic se nejčastěji používají dvě metody - **PCR (Polymerase chain reaction)** a **Real-Time PCR** (PCR v reálném čase). Metoda PCR výrazně ovlivnila diagnostiku virů, jelikož umožňuje jejich záchyt při velmi nízkém titru (Ryu, 2017).

Obecný princip PCR reakce popisuje obr. č. 15. Reakce probíhá v termocykleru, což je zařízení, ve kterém se v naprogramovaných časových intervalech cyklicky mění teplota. Základem je opakovaná řízená denaturace dvojvláknové DNA při vysoké teplotě a opětovná renaturace po jejím snížení se specifickými oligonukleotidy, které jsou v reakční směsi v nadbytku při současném zachování komplementarity bází. Tyto oligonukleotidy slouží následně jako primery pro syntézu nového řetězce. Primery obsahují sekvence komplementární k cílové oblasti DNA a umožňují specifickou amplifikaci. Amplifikace DNA probíhá v opakujících se cyklech, které mají tři kroky: denaturace, nasednutí primerů a syntéza DNA. Samotnou syntézu provádí termostabilní DNA polymeráza, izolovaná nejčastěji z bakterie *Thermus aquaticus*, odtud označení Taq polymeráza. Opakování cyklů denaturace a syntézy vede k rychlému namnožení cílové sekvence DNA. Po každém cyklu dojde ke zdvojnásobení počtu kopií úseku mezi nasednutými primery (Staněk, 2013; Šmarda, 2005).



Obr. č. 15: Princip PCR reakce (Převzato z: [www.prolekare.cz](http://www.prolekare.cz)).

Kvantitativní PCR neboli **Real Time PCR** (qRT-PCR) je metoda založená na principu klasické PCR, která umožňuje kvantifikaci sledovaného úseku DNA. Využívá speciálního cykleru, který v průběhu PCR kontinuálně zaznamenává množství DNA, a to v průběhu každého cyklu. Detekce množství DNA je umožněna

přítomností fluorescenčního substrátu. Fluorescence je vyzařována substrátem až po jeho navázání na DNA, tedy nikoliv volným substrátem (Samadikuchaksaraei, 2016). Obecně platí, že detekce je založena na záznamu množství uvolněné fluorescence, které odpovídá množství vzniklého produktu, který je zaznamenáván ve formě amplifikační křivky. Kvantifikace se provádí prostřednictvím matematické analýzy těchto křivek (Lachmanová, 2014; Staněk, 2013).

Metody přímého průkazu se používají pro detekce EBV a CMV v klinickém materiálu. Přímý průkaz EBV je možný pouze pomocí diagnostiky DNA. Přímá diagnostika cytomegalovirových infekcí je možná také kultivací na tkáňových kulturách, ale vzhledem k závažnosti systémových infekcí způsobených těmito viry a nutnosti rychlé diagnostiky a v případě CMV zahájení léčby je včasný přímý průkaz virové DNA v klinickém materiálu nezbytný.

## **Vyšetření buněčné imunity**

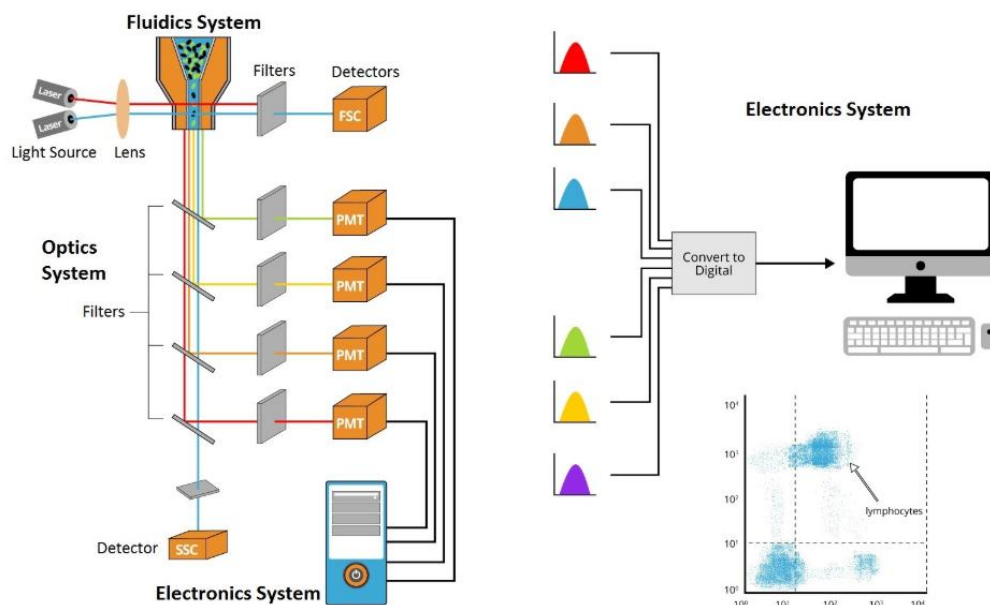
### **Průtoková cytometrie**

Průtoková cytometrie je laboratorní metodou, typem přímé imunofluorescence, která umožňuje kvalitativní a kvantitativní analýzu fyzikálních (optických) a chemických (fluorescenčních) vlastností jednotlivé buňky případně jiných částic (jadérka, mikroorganismy, chromozomy aj.) v suspenzi. (Marinov, 2008) V klinické praxi jsou nejčastějším materiálem k analýze krev, kostní dřeň, bronchoalveolární lavážní tekutiny, mozkomíšní mok a buněčné suspenze získané punkcí tělních dutin. U krve se využívá nesrážlivá krev, která se zpracovává tzv. lyzační technikou (Roubalová, 2012).

## **ZÁKLADNÍ KOMPONENTY PRŮTOKOVÉHO CYTOMETRU**

Kompletní schéma průtokové cytometrie zobrazuje obr. č. 16. Mezi základní komponenty patří fluidický, optický a elektronický systém.

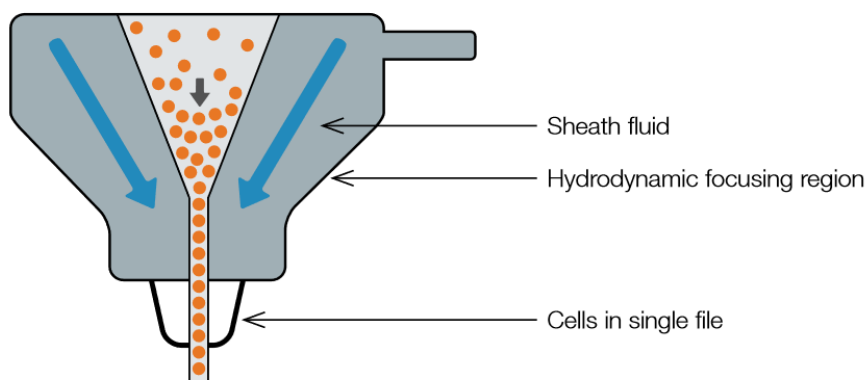




Obr. č. 16: Schéma průtokové cytometrie (Převzato z: www.bosterbio.com).

## 1. Fluidický systém

Nutnou podmínkou pro provedení analýzy je průtok částic jednotlivě za sebou. Pomocí fluidního systému je zajištěn transport částic, které jsou vstříkovány do unášecí tekutiny malým otvorem. Systém fluidiky se v podstatě skládá z centrálního kanálu, kterým je vzorek vstříkován, a uzavřeného vnějšího pouzdra, obsahujícího rychlejší proudící kapalinu. Většina přístrojů používá tzv. laminární průtokový systém zamezující vzniku turbulencí uvnitř kyvety, a který směřuje buňky do centrálního proudu vzorku. Ideální pozice jednotlivých částic je kontrolována **hydrodynamickou isofokusací** nosné kapaliny (viz obr. č. 17) (Macey, 2007).



Obr. č. 17: Princip hydrodynamické fokusace (Převzato z: bio-rad-antibodies.com).

## 2. Optický systém

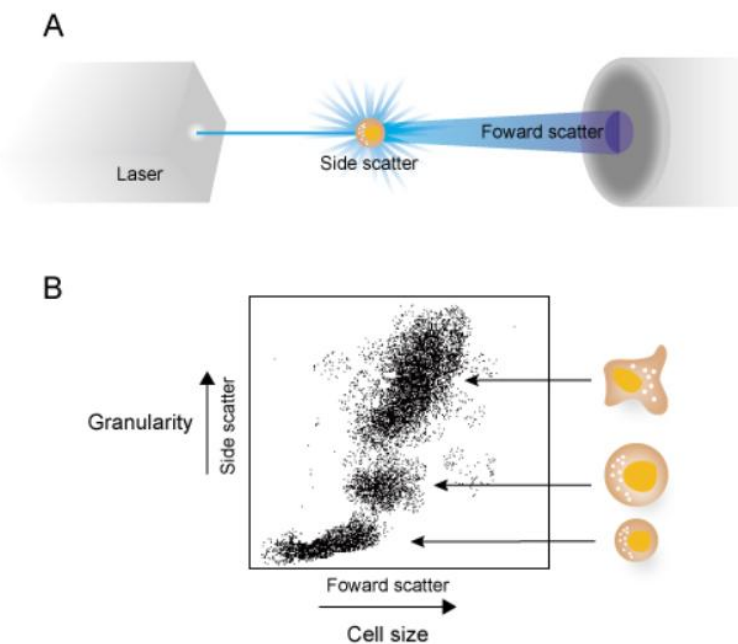
Po hydrodynamické fokusaci se buňky pohybují v jednom souboru do optického systému. Optický systém se skládá ze systému excitační optiky, sestávající ze zdroje záření (laser, UV lampa) a systému optických členů, které transportují a zaostřují paprsek do bodu měření. (Goetz et al., 2018). Nejběžněji používanými světelnými zdroji v moderní průtokové cytometrii jsou lasery. Na základě rozptýleného a fluorescenčního světla lze získat informace o velikosti, tvaru, granularitě těchto částic a intenzitě fluorescence (Roubalová, 2012). Sběrná optika sestává ze soustavy čoček, zrcadel a filtrů. Čočky usměrňují fotony emitovaného záření, zrcadla a filtry rozdělují světelné paprsky na příslušné detektory. Fluorescence emitovaná jednotlivými fluorochromy je detekována pomocí specifických fluorescenčních kanálů (Goetz et al., 2018; Watson, 2004) .

## 3. Elektronický systém

Signál vzniklý interakcí analyzovaných částic s fotony je detekován v závislosti na jeho intenzitě. Lineárně rozptýlené záření, které dopadá na detektor (fotodiodu) umístěný v ose dopadajícího paprsku (20° od osy laserového paprsku) se nazývá *forward scatter channel* (FSC). Intenzita tohoto signálu je vysoká a poskytuje informaci o **velikosti částic**. Čím větší je rozptyl světla, tím větší je částice (Bakke, 2001).

Bočně rozptýlené záření, jehož intenzita je nižší, a které zachycuje fotonka s násobičem (PMT), dopadá na detektor umístěný kolmo na osu dopadajícího paprsku a nazývá se *side scatter channel* (SSC). Jeho intenzita poskytuje informaci o **vnitřní struktuře** (granularitě) **buněk** (Bakke, 2001).

FSC i SSC jsou unikátními hodnotami pro každou částici a umožňují tak identifikaci a charakterizaci částic v heterogenním vzorku (viz obr. č. 18).



**Obr. č. 18:** Forward scatter vs. side scatter. Individuální buňky jsou rozděleny podle velikosti a granularity uvnitř heterogenní populace buněk (Převzato z: www.creative-diagnostics.com).

Elektronický systém převádí emisní spektra na digitální signály, které počítač analyzuje pomocí softwaru. Signály získané z optiky jsou převedeny na elektrické impulzy a zesíleny fotonásobičem. Zesílení se provádí lineárně nebo logaritmičtě (Watson, 2004).

Impulz z fotonásobiče je přenesen na „Peak-hold“ obvod, který změří nejvyšší napětí a udržuje ho, dokud není impulz převeden do analogicko-digitálního převaděče (ADC *Analog-to-Digital Converter*). Ten slouží k převedení výsledku do digitální podoby, tedy na číslo. Délka doby převodu v ADC je od 10 do 50  $\mu$ s. Následně jsou data z ADC převedena do počítače, zobrazena na grafech a uložena (Shapiro, 2003; Watson, 2004). Každý impulz se nazývá „*event*“ (událost) a ukládá se jako datový soubor v LIST MODE FILE. Zde jsou data připravena k další analýze (Eckschlager et al., 1999).

Data z průtokové cytometrie lze zobrazovat formou jednoparametrových histogramů, kde je na ose x vynesena intenzita signálu a na ose y množství buněk. Dále formou dvouparametrových histogramů, ve kterých je na ose x vynesena intenzita jednoho a na ose y intenzita druhého signálu a množství buněk je znázorněno hustotou bodů (tzv. dot-plot histogram) nebo hustotou čar připomínající vrstevnice na mapě (tzv. contour-plot histogram).

Většina komerčních přístrojů také umožňuje zobrazení trojrozměrných grafů (Marinov, 2008). Jedna z důležitých priorit v průtokové cytometrii je možnost selektivní analýzy a zobrazování konkrétní cílové populace – elektronické ohraničení (*gating*). Gaty nebo regiony (oblasti) představují graficky nebo matematicky ohraničenou oblast částic vybraných k další analýze (Goetz et al., 2018).

### 3. Hypotézy a cíle diplomové práce

#### Hypotézy

1. U pacientů s EBV infekcí dochází ke snížení relativních počtů CD19<sup>+</sup> B lymfocytů ve srovnání s pacienty s uzlinovým syndromem jiného původu.
2. U pacientů s EBV infekcí je pozorován výrazně snížený IRI (imunoregulační index) se současnou aktivací CD3<sup>+</sup> HLADR<sup>+</sup> T lymfocytů.
3. U pacientů s EBV infekcí je zánětlivý marker CD64 na neutrofilních granulocytech pozitivní (> 65%, > MFI 2,6).

#### Cíle

1. Stanovit počet pacientů s uzlinovým syndromem, kteří byli v období 2017 – 2019 vyšetřeni na Pracovišti imunologie LKCHI Nemocnice České Budějovice, a.s. a definovat počet laboratorně pozitivních pacientů na akutní infekci EBV.
2. Zjistit u kolika těchto pacientů s akutní EBV infekcí byla hodnocena přítomnost viru EBV v krvi a plazmě pomocí PCR a zároveň buněčná imunita metodou průtokové cytometrie. Určit podíl pacientů s akutní EBV v rámci diagnostiky uzlinového syndromu (sledované diagnózy L040, R590, R599).
3. Vyhodnotit jednotlivé parametry buněčné imunity u pacientů s akutní EBV infekcí ve srovnání s kontrolní skupinou pacientů negativních na EBV v rámci diagnostiky uzlinového syndromu.

## 4. Metodika

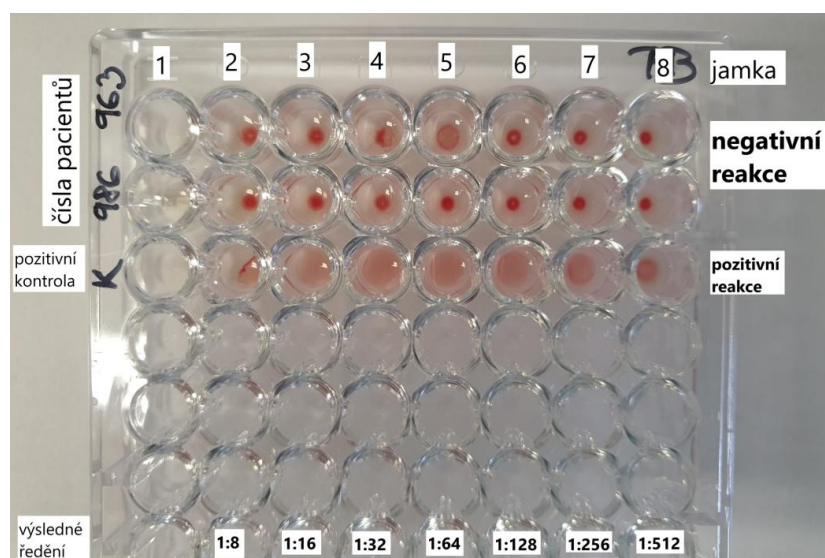
Metodika této práce je založena na stručné charakterizaci nepřímých (heterofilní protilátky, imunofluorescence, ELISA) a přímých (PCR) metod, používaných k diagnostice EBV infekce a prováděných na Pracovišti imunologie (LKCHI) a v Laboratoři molekulární biologie a genetiky Nemocnice České Budějovice, a.s. Pozornost je potom věnována především vyšetření buněčné imunity a s tím spojené metodě průtokové cytometrie, která má právě v případě akutní infekce EBV virem specifický obraz. **Nezbytnou součástí metodiky byl i sběr dat a jejich následné vyhodnocení. Data byla získána z Pracoviště imunologie a Laboratoře molekulární biologie a genetiky Nemocnice České Budějovice, a.s.**

### Nepřímá diagnostika EBV

- **Heterofilní protilátky**

Heterofilní protilátky byly poprvé popsány Paulem a Bunnellem. Paul-Bunnellova reakce spočívá v průkazu těchto protilátek, které se objevují během akutní fáze onemocnění téměř u 90% nemocných s EBV mononukleózou (Ambrožová, 2005).

Také na Pracovišti Imunologie Nemocnice České Budějovice, a.s. je Paul-Bunnellova reakce stále součástí diagnostiky EBV. K jejímu provedení se používají beraní erythrocyty dodávané firmou DULAB s.r.o. Reakce probíhá v mikrotitračních destičkách firmy GAMA. Vyšetřovaná séra jsou den předem inaktivována ve vodní lázni po dobu 30 minut při 56°C. Následující den je do označené mikrotitrační destičky nepipetován hemaglutinační pufr (25 µl), patientská séra (25 µl do první jamky pod sebe) a pozitivní kontrola (25 µl). Následuje titrace po řádcích (po 25 µl). Jako poslední je nepipetována suspenze beraních erythrocytů (25 µl do všech jamek kromě prvního sloupce). Posledním krokem je inkubace po dobu 2 hodin při pokojové teplotě. Při hodnocení reakce se zjišťuje tzv. titr protilátek, resp. výsledné ředění, kterým se vyjadřuje množství protilátek v krvi pacienta (viz obr. č. 19).

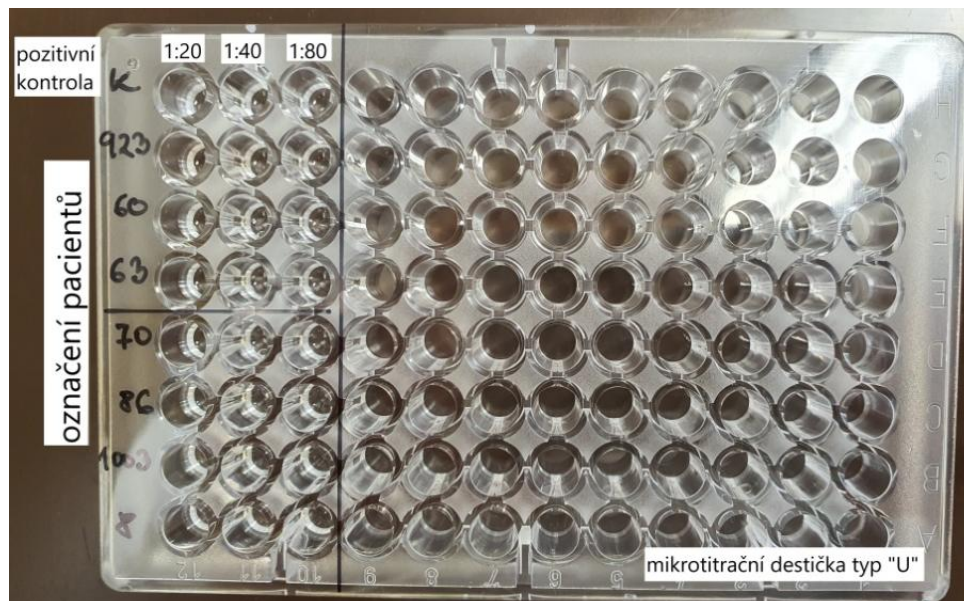


Obr. č. 19: Paul-Bunnellova reakce (Foto: Lenka Chaloupková).

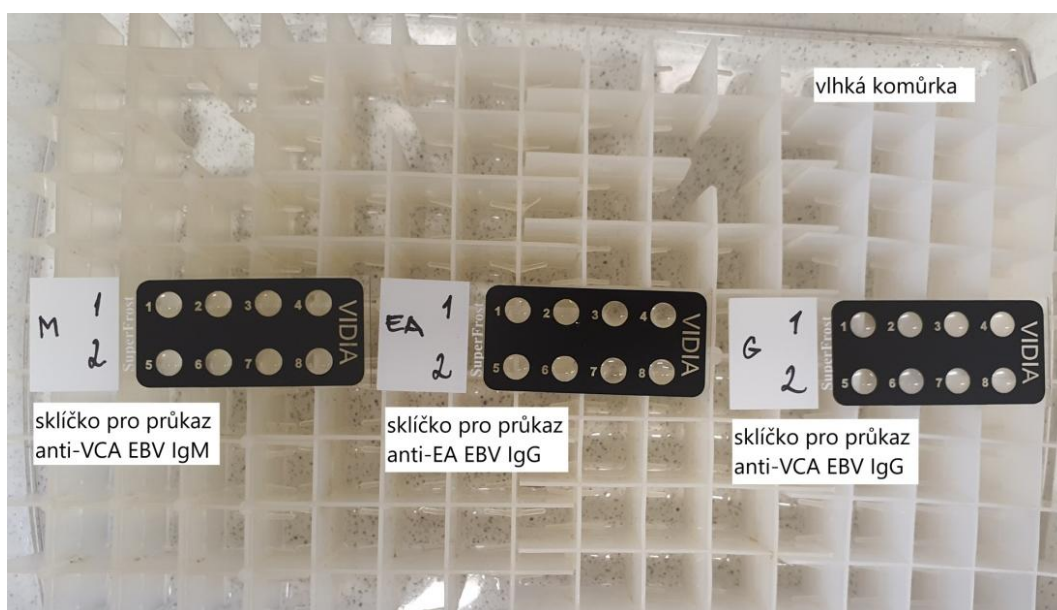
- **Imunofluorescenční analýza**

K průkazu kapsidového antigenu **VCA EBV** v třídách **IgM** a **IgG** a průkazu časného antigenu **EA EBV** používá Pracoviště Imunologie Nemocnice České Budějovice, a.s. **IF-VIDITEST** od firmy VIDIA spol. s.r.o. Souprava slouží pro imunofluorescenční detekci IgM a IgG protilátek proti zmíněným antigenům.

**Princip testu:** V případě detekce kapsidového antigenu (VCA) ve třídě IgM a IgG je latentně infikována lidská lymfomová linie buněk P3HR-1. V určitém procentu populace těchto buněk dochází ke spontánní aktivaci produktivní replikace viru. Tyto buňky obsahují antigeny virové kapsidy (VCA). V případě detekce časného antigenu (EA) je EBV latentně infikována lidská lymfomová linie buněk Raji a za fyziologických podmínek u ní nedochází ke tvorbě EA. Určitými chemickými látkami lze u části populace buněk indukovat zahájení abortivní replikace viru, která začíná syntézou EA. V obou případech jsou z indukovaných buněk připraveny nátěry, které jsou vhodným způsobem fixovány. Na VCA nebo EA, který je obsažený v těchto buňkách se v nepřímém fluorescenčním testu naváží lidské protilátky proti VCA nebo EA, pokud jsou přítomny v testovaném séru. Komplex antigenu a protilátky se následně zviditelní navázáním protilátky proti lidskému IgM nebo IgG označené FITC konjugátem. Tento komplex je pak detekován pomocí fluorescenčního mikroskopu (Vidia, 2020). Pracovní postup zobrazují obrázky č. 20, 21, 22 a 23.



**Obr. č. 20:** Mikrotitrační destička s napipetovanými a naředěnými patientskými séry společně s pozitivní kontrolou (Foto: Lenka Chaloupková).



**Obr. č. 21:** Sklíčka s napipetovanými patientskými séry a pozitivní kontrolou umístěná ve vlhké komůrce (Foto: Lenka Chaloupková).





**Obr. č. 22:** Proplachování sklíček v kyvetě s PBS. 1x v PBS a 3x ve vodě. První proplach po 60 minutách inkubace s napipetovanými séry a druhý proplach po 60 minutách s napipetovaným konjugátem (Foto: Lenka Chaloupková).

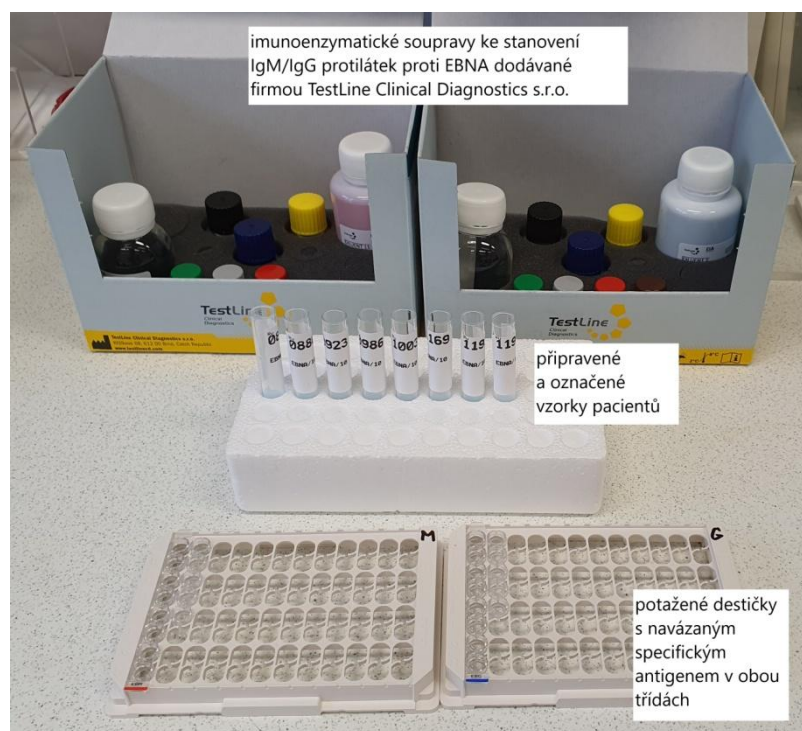


**Obr. č. 23:** Zamontovaná sklíčka připravená ke čtení (Foto: Lenka Chaloupková).

### **Imunoenzymatické metody**

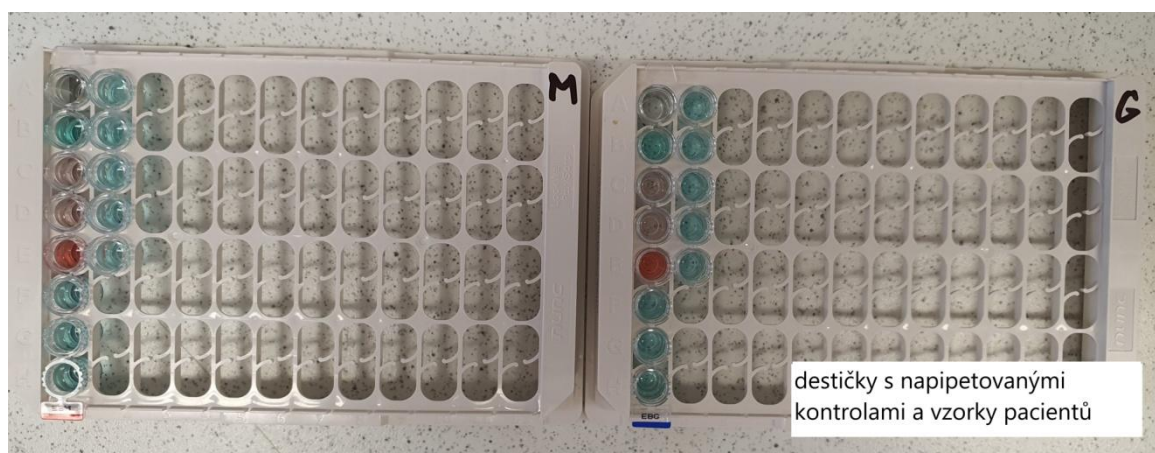
Poslední metodou nepřímé diagnostiky EBV používanou na Pracovišti imunologie Nemocnice České Budějovice, a.s. je imunoenzymatická souprava ke stanovení IgM/IgG protilátek proti nukleárnímu antigenu viru Epsteina-Barrové v lidském séru nebo plazmě. Souprava je dodávána firmou TestLine Clinical Diagnostics s.r.o. (viz obr. č. 24)

Protilátky anti-EBNA-1 třídy IgM jsou detekovatelné v průběhu akutní fáze primoinfekce několik týdnů až měsíců a tvoří se i při reaktivaci. Protilátky třídy IgG se objevují s větším časovým odstupem a jsou detekovatelné po celý život. Dlouhodobá absence IgG protilátek u infikovaných osob může indikovat imunodeficit.

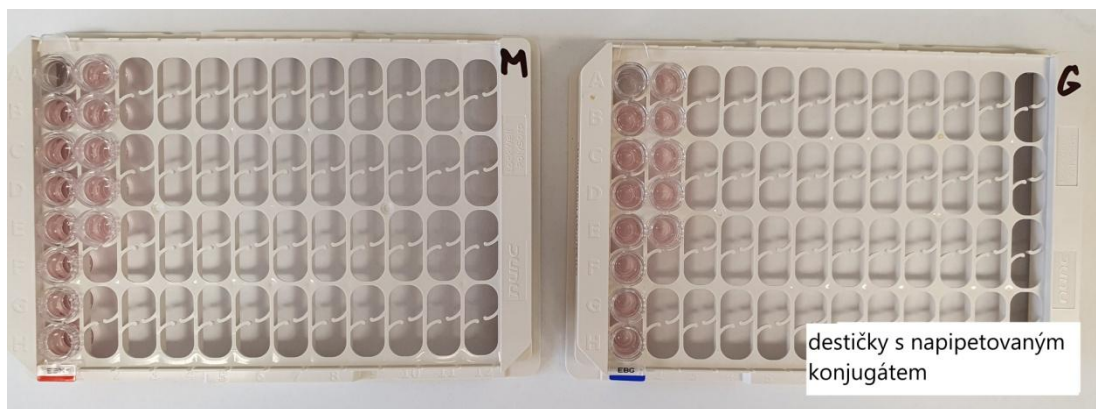


**Obr. č. 24:** Imunoenzymatické soupravy ke stanovení IgM/IgG protilátek proti EBNA v lidském séru nebo plazmě dodávané firmou TestLine Clinical Diagnostics s.r.o. (Foto: Lenka Chaloupková).

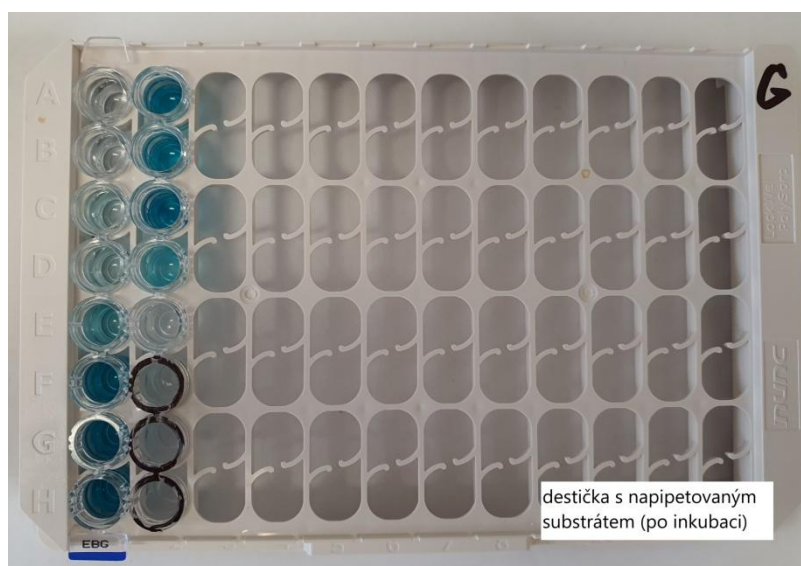
Souprava umožňuje detekci specifických protilátek třídy IgM/IgG ve vzorku metodou EIA. Součástí soupravy je potažená destička s navázaným specifickým antigenem v obou třídách, ředící roztok, promývací roztok, pozitivní a negativní kontrola, CUT-OFF (roztok obsahující specifické lidské protilátky v hraniční koncentraci), konjugát (roztok obsahující zvířecí imunoglobulin proti lidskému IgM/IgG značený peroxidázou), substrát (TMB – jednosložkový substrátový roztok obsahující TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a zastavovací roztok (roztok kyseliny). Metodu znázorňují obrázky č. 25, 26, 27, 28.



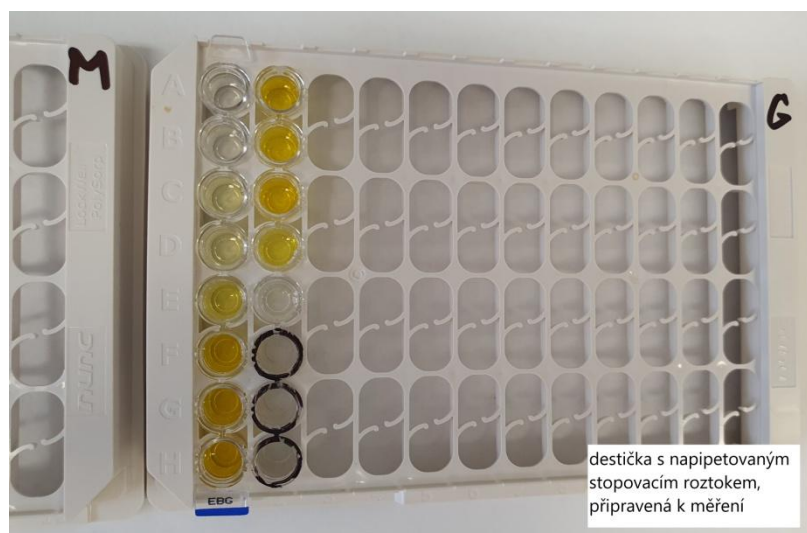
**Obr. č. 25:** Destičky s nepipetovanými kontrolami a vzorky pacientů (Foto: Lenka Chaloupková)



**Obr. č. 26:** Destičky s nepipetovaným konjugátem (Foto: Lenka Chaloupková).



**Obr. č. 27:** Destička s nepipetovaným substrátem (Foto: Lenka Chaloupková).



**Obr. č. 28:** Destička s nepipetovaným stopovacím roztokem připravená k měření (Foto: Lenka Chaloupková).

## Přímá diagnostika EBV, CMV

Kvalitativní stanovení EBV v klinickém materiálu metodou PCR a kvalitativní stanovení DNA CMV metodou Real-Time PCR je realizováno v Laboratoři molekulární biologie a genetiky Nemocnice České Budějovice, a.s.

K detekci EBV i CMV je používán systém Real Time PCR - TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assays firmy Applied Biosystems. Pomocí specifických primerů a specifických fluorescenčních sond dochází k amplifikaci specifického úseku DNA a bezprostřední detekci ampliconu ve fluorescenčním kanálu Cycling Green přístroje Rotor-Gene Q.

Detekce se provádí ze sterilně odebraných materiálů jako je např. likvor, s<sup>t</sup>ěr z ložisek a sliznic, sputum, BAL, punktáty, tkáň a krev. Pro detekci EBV i CMV z krve je vyžadována pouze nesrážlivá krev s <sup>p</sup>řídavkem EDTA. Krev je po přijetí do laboratoře inkubována ve vertikální poloze cca 30 min. Poté je odebrán vzorek horní frakce s leukocyty (min 200  $\mu$ l do 1,5 ml zkumavek označených jménem a identifikačním číslem pacienta). Zbytek vzorku je centrifugován při 2 500 x g a plazma je odebrána rovněž do 1,5 ml zkumavek označených jménem a identifikačním číslem pacienta. Vzorky jsou uchovány v mrazáku až do doby izolace DNA. Vlastní amplifikace a detekce probíhá na přístroji Rotor-Gene Q.

### Reakční schéma:

95°C 5 min	} 40x	detekce probíhá v kanálu Green a Yellow
95°C 15 sec		
60°C 60 sec		

Přístroj Rotor-Gene Q pomocí Rotor-Gene Q software zaznamenává přítomnost amplifikované virové DNA na základě detekce fluorescenčního signálu. Odečet fluorescence pro cílovou DNA je prováděn v kanále Green a pro interní kontrolu v kanále Yellow. Pokud je fluorescence detekována pouze v kanále Green nebo v obou kanálech je výsledek vyhodnocen jako pozitivní. Pokud je fluorescence detekována pouze v kanále Yellow, je vzorek vyhodnocen jako negativní. Pokud je fluorescence detekována, je výsledek vyhodnocen jako pozitivní. Pokud není fluorescence detekována v žádném z kanálů, pak není možné vzorek z důvodu inhibice PCR hodnotit.

Ve výsledcích diplomové práce byla použita data pouze z krve a plazmy, které jsou hodnoceny v případě positivity za průkaz akutní infekce.

## Vyšetření buněčné imunity

Postup vyšetření buněčné imunity u pacienta na Pracovišti imunologie Nemocnice České Budějovice probíhá ve sledu několika kroků. U každého pacienta je vyšetřen základní panel (označen jako T16 + DR) buněčné imunity. U některých pacientů potom navíc zánětlivý marker CD64 na CD16 pozitivních granulocytech (CD64/16, K<sup>-</sup>) (viz obr. č. 29). Nesrážlivá periferní krev (50μl) je značena koktejlem monoklonálních protilátek (viz tab. č. 4) od firmy Beckman Coulter (BC). Po nabarvení je provedena lýze v lyzační stanici TQ Prep firmy BC (viz obr. č. 30), která pracuje na základě chemické lýzy pomocí kyseliny mravenčí a dalších roztoků (viz tab. č. 5) V případě základního panelu následuje měření na tří-laserových průtokových cytometrech Navios a Navios Ex od firmy BC (viz obr. č. 31) v protokolu pro základní imunofenotypizaci. V případě vyšetření zánětlivého markeru CD64/CD16 následuje po lýze přidání roztoku PBS, centrifugace po dobu 4 minut, slítí a přidání 1 ml PBS. Poté opět měření na zmiňovaných cytometrech v protokolu pro zánětlivý marker. Data jsou následně v obou případech vyhodnocena softwarem Kaluza od firmy BC (viz příloha č. 1, obr. č. 34-53).

**Tabulka č. 4:** Schéma použitých monoklonálních protilátek při vyšetření buněčné imunity.

<b>ZÁKLADNÍ PANEL T16/DR</b>	
<b>T16 (10μl)</b>	<b>DR (5μl)</b>
Monoklonální protilátky <sup>fluorochrom</sup>	
TETRACHROM <sup>CD45FITC/CD56PE/CD19ECD/CD3PC5</sup>	CD3 <sup>FITC</sup> /DR <sup>PE</sup>
CD16 <sup>PE</sup>	CD5 <sup>PC5</sup>
CD4 <sup>A-AF750</sup>	CD19 <sup>A-AF750</sup>
CD8 <sup>PC7</sup>	
<b>ZÁNĚTLIVÝ MARKER CD64/16</b>	
Monoklonální protilátky <sup>fluorochrom</sup>	
Izotypová kontrola (K <sup>-</sup> ) – IgG1(mouse) <sup>FITC</sup> / IgG2a (mouse) <sup>PE</sup> (5μl)	
CD64 <sup>FITC</sup> /CD16 <sup>PE</sup> (10μl)	

## Výpočet pro $MFI_{index}$ (Groselj-Grenc et al., 2008)

$MFI$  = střední hodnota intenzity fluorescence (mean fluorescence intensity)

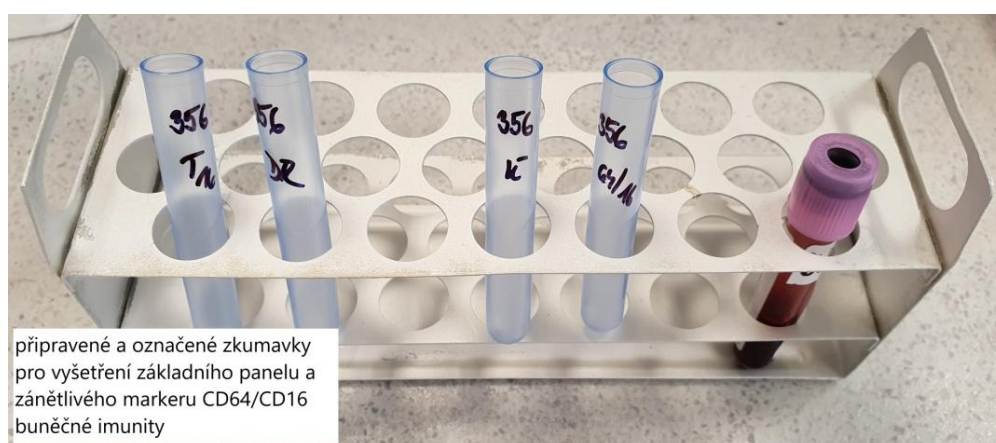
$MFI_{64/16}$  = střední hodnota intenzity fluorescence v FL1 kanálu pro FITC u  $CD64^+$  granulocytů

$MFI_{K^-}$  = střední hodnota intenzity fluorescence v FL kanálu pro FITC u izotopové kontroly

$$MFI_{index} = \frac{(MFI_{64/16}) - (MFI_{K^-})}{K^-}$$

**Tabulka č. 5:** Roztoky používané pro chemickou lýzu buněk v lyzační stanici TQ Prep

Roztok A (vlastní příprava)	1,4 ml kys.mravenčí + 1l destilované H <sub>2</sub> O
Roztok B (připravuje lékárna Nemocnice ČB, a.s.)	Natrium carbonicum sicc. Natrium chloratum Natrium sulfas sicc. Aqua purificata
Roztok C (připravuje lékárna Nemocnice ČB, a.s.)	Pufir PBS Paraformaldehyd

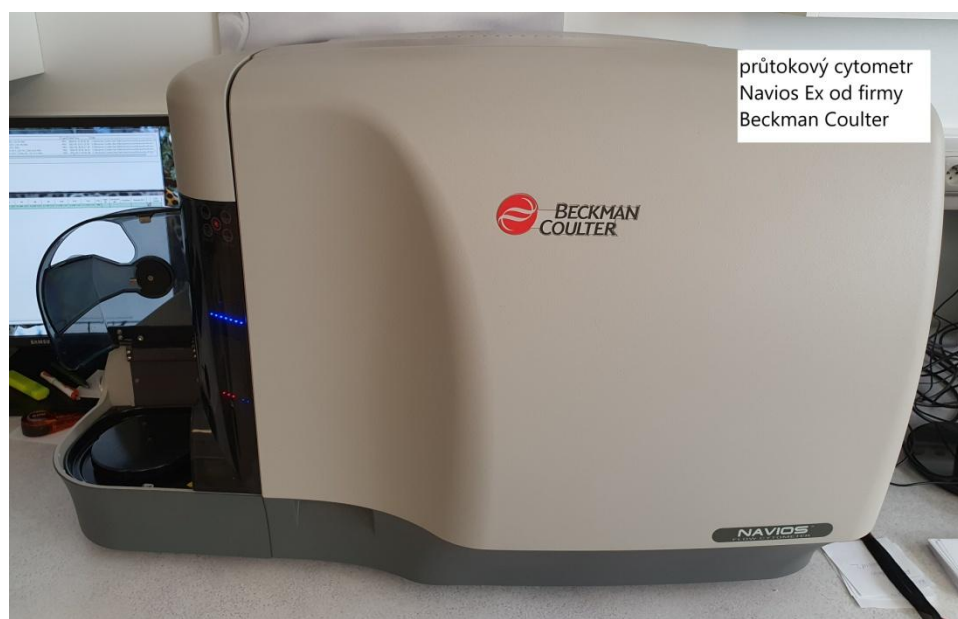


**Obr. č. 29:** Vyšetření základního panelu a zánětlivého markeru CD64/CD16 buněčné imunity

(Foto: Lenka Chaloupková).



**Obr. č. 30:** Lyzační stanice TQ Prep od firmy Beckman Coulter (Foto: Lenka Chaloupková).



**Obr. č. 31:** Tří-laserový průtokový cytometr Navios Ex od firmy Beckman Coulter (Foto: Lenka Chaloupková).

## 5. Výsledky

Ve sledovaném období 2017 – 2019 bylo na Pracovišti imunologie Nemocnice České Budějovice, a.s. vyšetřeno celkově 4602 pacientů na přítomnost specifických protilátek proti viru Epsteina-Barrové, resp. proti kapsidovému antigenu (VCA) a/nebo jadernému antigenu (EBNA) ve třídě IgM a IgG a časnému antigenu (EA) ve třídě IgG. Vyšetření heterofilních protilátek bylo lékaři indikováno u méně než 1350 pacientů (29%), nejčastěji u dětí (0 – 15 let). Z tohoto důvodu nebylo toto vyšetření zahrnuto do kritérií pro určení laboratorní pozitivity pacientů na EBV. Z výsledků však vyplývá, že přítomnost heterofilních protilátek byla detekována u pacientů s IgM protilátkami proti VCA a/nebo IgG proti VCA a současně proti EA.

Na základě definovaných kritérií byli vybráni **laboratorně** pozitivní pacienti s akutní infekcí EBV, resp. CMV. Jako laboratorně pozitivní byli považováni pacienti, u nichž ve dvou ze tří sledovaných metod – sérologie, hodnocení buněčné imunity (BI) a PCR byla zjištěna pozitivita. Pro sérologickou metodu byla požadována přítomnost protilátek ve třídě IgM proti antigenům VCA a/nebo EBNA, resp. přítomnost protilátek ve třídě IgM i IgG proti CMV. U buněčné imunity byly hodnoceny následující parametry: relativní počet lymfocytů (%), relativní zastoupení CD19<sup>+</sup> B lymfocytů (%), poměr CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T lymfocytů, tzn. imunoregulační index (IRI), aktivované CD3<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup> T lymfocyty (%) a zánětlivý marker CD64/CD16 na granulocytech (v % a MFI<sub>index</sub>). Specifická změna alespoň čtyř z těchto pěti parametrů byla hodnocena jako pozitivní nález. To znamená, že u těchto pacientů byla zjištěna přítomnost vyššího relativního počtu lymfocytů (> 40%), sníženého relativního počtu B lymfocytů (< 8%), snížený IRI (< 1), vyšší procento aktivovaných T lymfocytů (> 5%) anebo pozitivní nález zánětlivého markeru CD64/CD16 ( $\geq 65\%$  a  $MFI_{index} \geq 2,6$ ). Referenční meze pro relativní počty lymfocytů a jejich subpopulací včetně IRI byly přejaty z (Comans-Bitter et al., 1997). Pro vyšetření pomocí PCR byl požadován pozitivní nález DNA (EBV, CMV) v krvi a současně v plazmě pacienta (viz tab. č. 6).



**Tab. č. 6:** Kritéria určení pozitivity pro jednotlivé sledované metody.

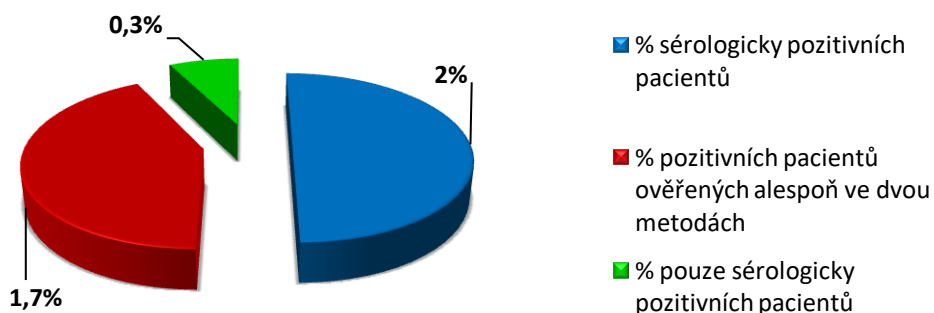
<b>Metoda</b>	<b>Akutní infekce EBV</b>	<b>Akutní infekce CMV</b>
<b>Sérologie</b>	Přítomnost pozitivních protilátek proti VCA a/nebo EBNA ve třídě IgM.	Přítomnost pozitivních protilátek proti CMV ve třídě IgM i IgG.
<b>Buněčná imunita</b>	Změna alespoň čtyř z pěti sledovaných parametrů (↑% lymfocytů, ↓% B lymfocytů, ↓ IRI, ↑% aktivovaných CD3 <sup>+</sup> HLADR <sup>+</sup> T lymfocytů, pozitivní zánětlivý marker CD64/CD16).	
<b>PCR</b>	Pozitivní nález DNA v krvi a současně v plazmě.	

Z celkového počtu sérologicky vyšetřených pacientů v tomto období bylo na základě výše definovaných kritérií vyhodnoceno 93 pacientů (2%) jako pozitivních s akutní infekcí EBV, resp. CMV. Z toho 77 pacientů (1,7%) splnilo požadavek pozitivity ve dvou ze tří sledovaných metod (sérologie, buněčná imunita, PCR) a 16 vyšetřených pacientů (0,3%) tento požadavek nesplnilo a z tohoto důvodu nebyli zařazeni do dalšího hodnocení (viz tab. č. 7 a graf. č. 1).

**Tab. č. 7:** Zastoupení laboratorně pozitivních pacientů z celkového počtu vyšetřených pacientů.

<b>Zastoupení laboratorně pozitivních pacientů</b>	<b>četnosti</b>	<b>procenta</b>
Počet sérologicky pozitivních pacientů	93	2%
Počet pozitivních pacientů ověřených alespoň ve dvou metodách	77	1,7%
Počet pouze sérologicky pozitivních pacientů	16	0,3%
Celkový počet sérologicky vyšetřených pacientů	4602	100%

**Graf č. 1:** Procentuální vyjádření laboratorně pozitivních pacientů z celkového počtu vyšetřených pacientů.

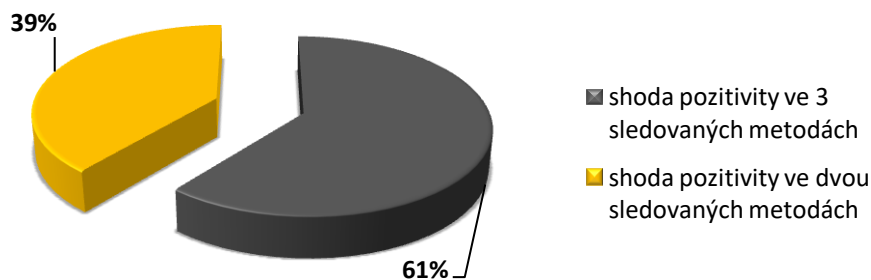


Dále byla hodnocena skupina 77 pacientů, u kterých byla jasně laboratorně definována pozitivita akutní EBV/CMV infekce alespoň dvěma sledovanými metodami, 47 pacientů (61%) se shodovalo v pozitivitě ve všech třech metodách a 30 pacientů (39%) mělo shodu ve dvou metodách (viz tab. č. 8 a graf. č. 2). Bylo zjištěno, že 60 pacientů (78%) je EBV pozitivních, 11 pacientů (14%) je CMV pozitivních a 6 pacientů (8%) vykazovalo souběh obou infekcí (viz tab. č. 9 a graf. č. 3).

**Tab. č. 8:** Počet pacientů ve sledovaných metodách.

Celkový počet pozitivních pacientů	Shoda positivity ve třech sledovaných metodách	Shoda positivity ve dvou sledovaných metodách
77	47 (61%)	30 (39%)

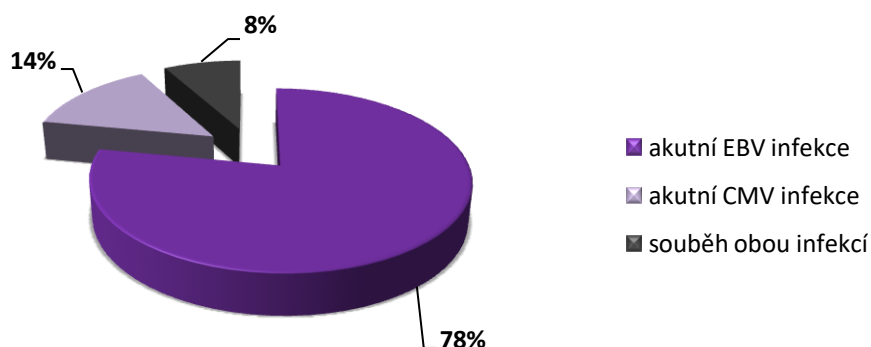
**Graf č. 2:** Procentuální vyjádření pacientů ve sledovaných metodách.



**Tab. č. 9:** Počet pacientů s určenou infekcí.

Celkový počet pozitivních pacientů	Akutní EBV infekce	Akutní CMV infekce	Souběh EBV/CMV infekce
77	60 (78%)	11 (14%)	6 (8%)

**Graf č. 3:** Procentuální zastoupení pacientů s určenou infekcí.



V souboru celkově 77 laboratorně pozitivních pacientů byla hodnocena buněčná imunita (viz tab. č. 10) a byla sledována změna alespoň čtyř parametrů z pěti výše definovaných. U 64 pacientů (83,1%) byla definována specifická změna ve všech pěti sledovaných parametrech, u 69 pacientů (89,6%) byla splněna kritéria positivity buněčné imunity ve čtyřech jejích sledovaných parametrech. Zbylých 8 pacientů (10,4%) nespĺnilo kritéria změny buněčné imunity alespoň ve čtyřech parametrech, ale jejich pozitivita byla definována na základě výsledků sérologického vyšetření a zároveň vyšetření přítomnosti DNA pomocí PCR (viz. tab. č. 11).

**Tab. č. 10:** Zhodnocení jednotlivých parametrů BI u všech 77 laboratorně pozitivních pacientů.

Jednotlivé parametry buněčné imunity		Počet pacientů	Počet pacientů v %
% lymfocytů	< 20%	2	2,6
	20 – 40%	1	1,3
	<b>&gt; 40%</b>	<b>74</b>	<b>96,1</b>
CD19 <sup>+</sup> B lymfocyty	< 8%	71	92,2
	≥ 8%	6	7,8

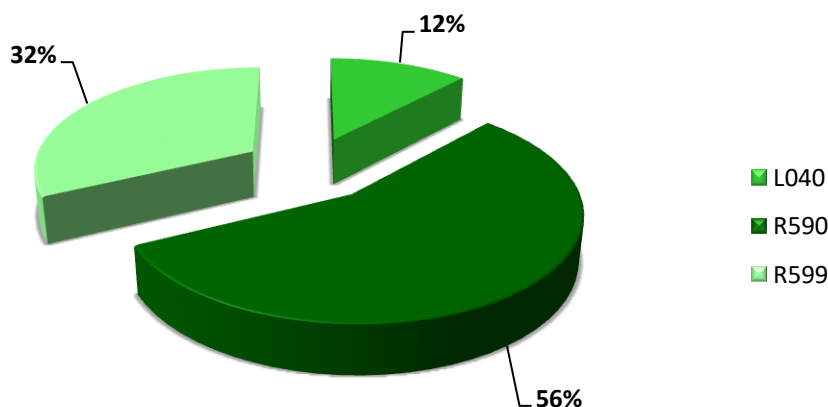
CD3 <sup>+</sup> HLADR <sup>+</sup> T lymfocyty	> 5%	75	97,4
	≤ 5%	2	2,6
IRI	< 1	73	94,8
	≥ 1	4	5,2
CD64/CD16	≥ 65%	69	89,6
	< 65%	4	5,2
MFI <sub>index</sub>	≥ 2,6%	69	89,6
	< 2,6%	4	5,2
CD64/CD16 současně s MFI <sub>index</sub>	≥ 65% a ≥ 2,6%	69	89,6

**Tab. č. 11:** Splnění parametrů buněčné imunity

Celkový počet pacientů	Shoda pozitivity v 5 parametrech BI	Shoda pozitivity ve 4 parametrech BI	Neshoda pozitivity v parametrech BI
77	64 (83,1%)	69 (89,6%)	8 (10,4%)

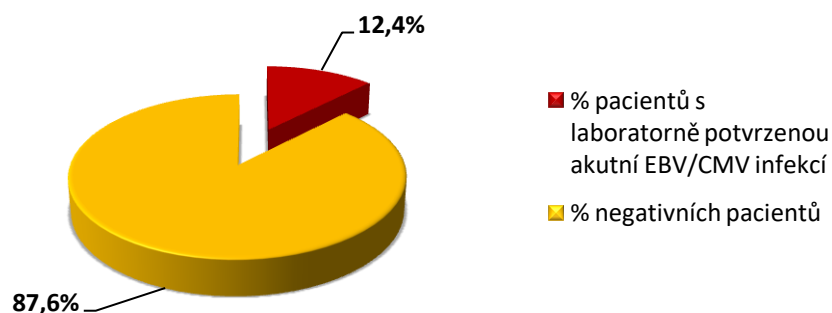
V rámci námi vybrané skupiny pacientů s uzlinovým syndromem (diagnóza L040 – Akutní lymfadenitida obličeje hlavy a krku, R590 – Lokalizované zvětšení mízních uzlin, R599 – Zvětšené mízní uzliny) bylo testováno 242 pacientů na přítomnost specifických protilátek (viz graf č. 5). Současně u všech těchto pacientů byla v rámci diferenciálně – diagnostické rozvahy vyšetřena buněčná imunita. U 66 těchto pacientů (27,3%) bylo rovněž indikováno vyšetření PCR.

**Graf č. 5:** Procentuální zastoupení jednotlivých diagnóz v rámci uzlinového syndromu.



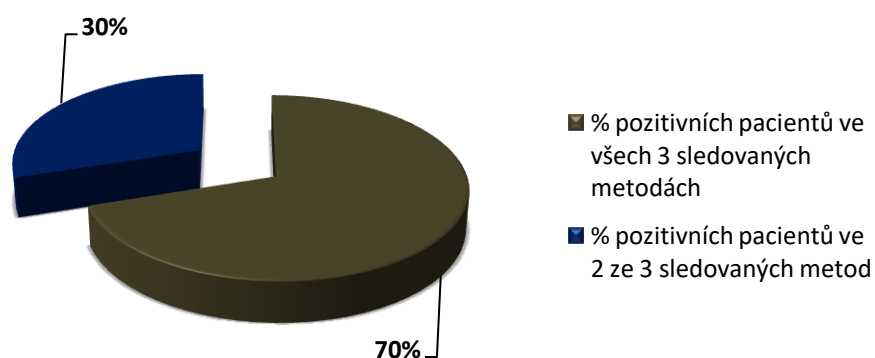
U 30 pacientů (12,4%) s uzlinovým syndromem byla laboratorně potvrzena akutní infekce EBV, resp. CMV. 212 pacientů (87,6%) bylo určeno jako laboratorně negativních - nesplnilo podmínku positivity alespoň ve dvou sledovaných metodách (viz graf č. 6).

**Graf č. 6:** Procentuální zastoupení pacientů s laboratorně potvrzenou akutní EBV/CMV infekcí a negativních pacientů.

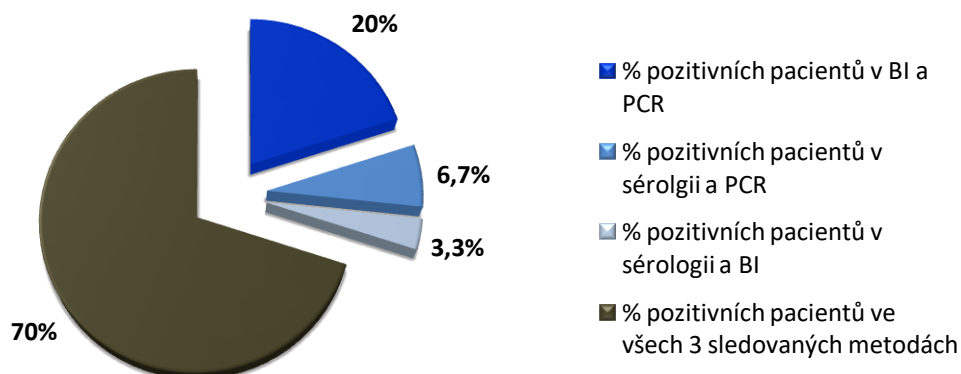


U 30 laboratorně pozitivních pacientů na EBV/CMV infekci ve skupině s uzlinovým syndromem byla u 28 pacientů (93,3%) stanovena přítomnost DNA virů EBV/CMV pomocí PCR. Ve všech třech sledovaných metodách (sérologie, buněčná imunita, PCR) bylo pozitivních 21 pacientů (70,0%), 9 pacientů (30,0%) bylo pozitivních ve dvou ze tří sledovaných metod (viz graf č. 7) - z toho 6 pacientů (20,0%) bylo pozitivních v BI a PCR, 2 pacienti (6,7%) měli pozitivní sérologii a PCR a 1 pacient (3,3%) byl pozitivní v BI a sérologii (viz graf č. 8).

**Graf č. 7:** Procentuální zastoupení laboratorně pozitivních EBV/CMV pacientů ve sledovaných metodách.



**Graf č. 8:** Procentuální vyjádření pacientů laboratorně pozitivních ve dvou ze tří metod.



Co se týká vyšetření buněčné imunity ve skupině laboratorně pozitivních pacientů s diagnózou uzlinového syndromu (viz tab. č. 12), tak 26 těchto pacientů (86,7%) splnilo kritéria specifické positivity buněčné imunity ve všech pěti sledovaných parametrech a 28 pacientů (93,3%) vykazovalo charakteristické změny alespoň čtyř parametrů buněčné imunity (viz tab. č. 13). U dvou pacientů nebyl vyšetřen zánětlivý marker CD64/CD16 na granulocytech, jeden pacient měl nižší relativní počet lymfocytů (< 20%) a zároveň vyšší IRI a u jednoho pacienta byly splněny pouze dva sledované parametry BI, a to vyšší procento aktivovaných T lymfocytů a pozitivní zánětlivý marker. V tomto případě se jednalo o laboratorně potvrzenou CMV infekci. Také u laboratorně negativních pacientů byly zhodnoceny parametry buněčné imunity (viz tab. č. 14) a žádný z těchto pacientů nesplnil kritérium charakteristické změny BI alespoň ve čtyřech parametrech.

**Tab. č. 12:** Zhodnocení jednotlivých parametrů BI u 30 laboratorně pozitivních pacientů.

Jednotlivé parametry buněčné imunity		Počet pacientů	Počet pacientů v %
% lymfocytů	< 20%	2	6,7
	20 – 40%	0	0
	> 40%	<b>28</b>	<b>93,3</b>
CD19 <sup>+</sup> B lymfocyty	< 8%	<b>29</b>	<b>96,7</b>
	≥ 8%	1	3,3
CD3 <sup>+</sup> HLADR <sup>+</sup> T lymfocyty	> 5%	<b>30</b>	<b>100</b>
	≤ 5%	0	0

IRI	< 1	28	93,3
	≥ 1	2	6,7
CD64/CD16	≥ 65%	28	93,3
	< 65%	2	6,7
MFI <sub>index</sub>	≥ 2,6%	29	96,7
	< 2,6%	1	3,3
CD64/CD16 současně s MFI <sub>index</sub>	≥ 65% a ≥ 2,6%	28	93,3

**Tab. č. 13:** Splnění parametrů buněčné imunity u 30 laboratorně pozitivních pacientů s akutní EBV/CMV infekcí.

Celkový počet pacientů	Shoda pozitivivity v 5 parametrech BI	Shoda pozitivivity ve 4 parametrech BI
30	26 (86,7%)	28 (93,3%)

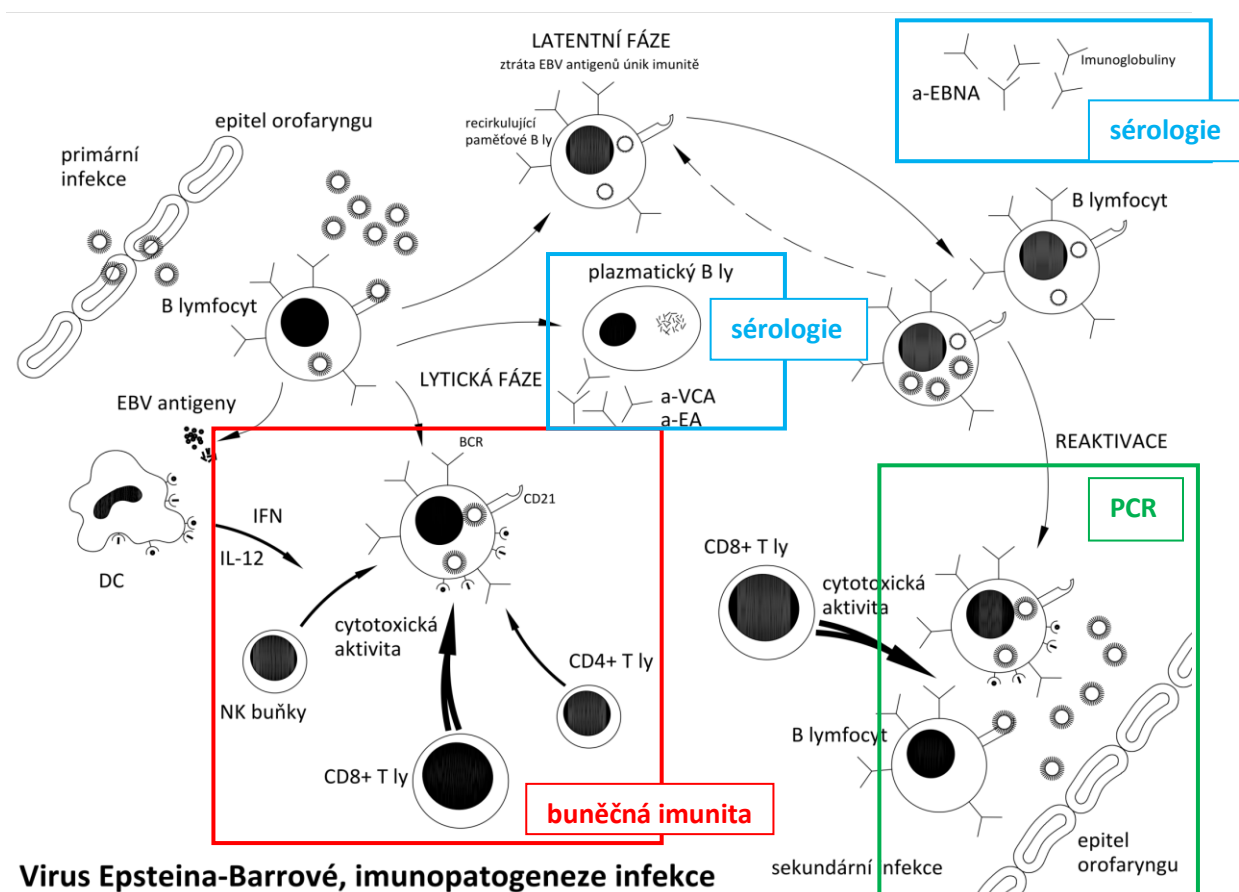
**Tab. č. 14:** Zhodnocení jednotlivých parametrů BI u 212 laboratorně negativních pacientů.

Jednotlivé parametry buněčné imunity	Počet pacientů	Počet pacientů v %	
% lymfocytů	< 20%	49	23,0
	20 – 40%	132	62,0
	> 40%	31	14,6
CD19 <sup>+</sup> B lymfocyty	< 8%	43	20,2
	≥ 8%	169	79,3
CD3 <sup>+</sup> HLADR <sup>+</sup> T lymfocyty	> 5%	48	22,5
	≤ 5%	164	77,0
IRI	< 1	19	8,9
	≥ 1	193	90,6
CD64/CD16	≥ 65%	18	8,5
	< 65%	194	91,1
MFI <sub>index</sub>	≥ 2,6%	17	8,0
	< 2,6%	195	91,5
CD64/CD16 současně s MFI <sub>index</sub>	≥ 65% a ≥ 2,6%	17	8,0

## 6. Diskuse

V této studii bylo hodnoceno celkově 4602 pacientů, u kterých byla na Pracovišti imunologie Nemocnice České Budějovice, a.s. sérologicky vyšetřena přítomnost specifických protilátek proti EBV ve sledovaném období 2017 – 2019.

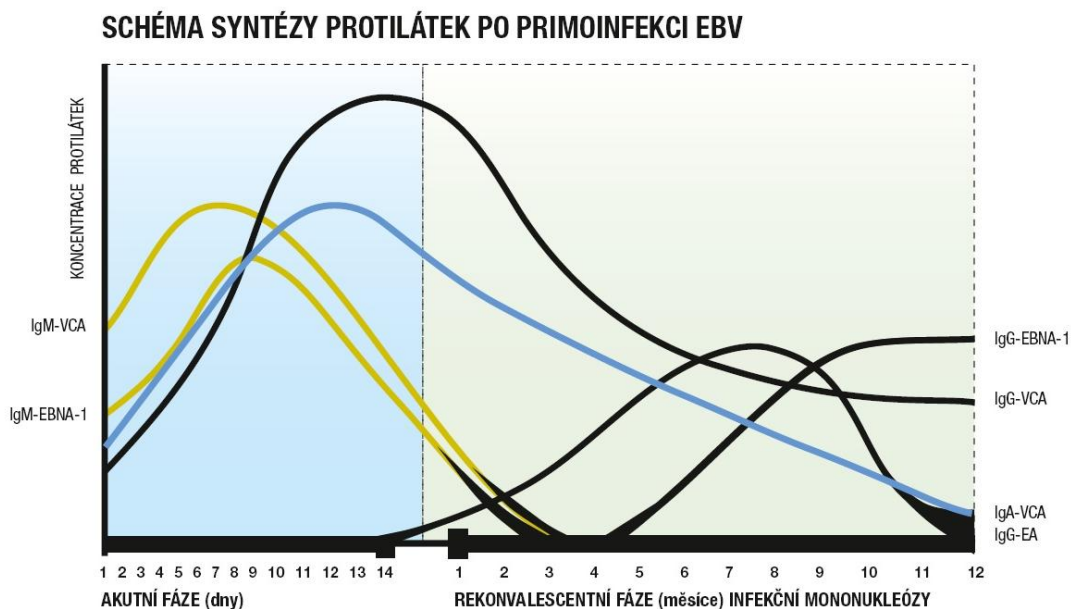
Na základě vybraných kritérií pro určení laboratorní positivity akutní EBV, resp. CMV infekce, tedy pozitivita alespoň ve dvou ze tří sledovaných metod (sérologie, buněčná imunita, PCR) bylo zjištěno 77 pacientů (1,7%) s akutní EBV/CMV infekcí. U těchto pacientů byly dále sledovány charakteristické změny v buněčné imunitě, které byly empiricky vyzorovány při vyšetřování buněčné imunity průtokovou cytometrií. Tyto změny vycházejí z patogeneze herpetické infekce EBV, resp. CMV (viz obr. č. 32).



Obr. č. 32: Imunopatogeneze EBV (Převzato z: Tinavská, 2018).



Jak se ukazuje, tak sérologické metody se uplatňují zejména v počáteční fázi akutní infekce, kdy se spouští tvorba specifických protilátek proti jednotlivým antigenům virů (viz obr. č. 33). Z důvodu poměrně složité interpretace nálezů sérologického vyšetření EBV/CMV infekce jsou další metody přímé i nepřímé diagnostiky jistě vítány.



**Obr. č. 33:** Časový průběh anti-EBV protilátek (Převzato z: [www.vidia.cz](http://www.vidia.cz)).

Vzhledem k tomu, že více než 90 % dospělých na celém světě je séropozitivních, tedy se s infekcí již setkalo a virus je v jejich organismu přítomen v latentní podobě (Zuckerman et. al, 2004), se metoda PCR uplatňuje v případech hodnocení a pozitivního nálezu DNA EBV/CMV v krvi a zároveň v plazmě pacienta. Pozitivita v krvi a současně v plazmě pacienta svědčí pro aktivitu viru a tedy akutní infekci.

Z výsledků dále vyplývá, že také vyšetření buněčné imunity se může významně uplatnit v diagnostice tohoto onemocnění. U 77 pacientů byla vyšetřena buněčná imunita a bylo zjištěno, že 69 těchto pacientů (89,6%) splňuje kritéria pro pozitivitu v rámci buněčné imunity. To znamená, že u těchto pacientů byla zjištěna shoda alespoň ve čtyřech z následujících pěti parametrů: přítomnost vyššího relativního počtu lymfocytů (>40%), sníženého relativního počtu B lymfocytů (<8%), snížený IRI (<1), vyšší procento aktivovaných  $CD3^+HLADR^+$  T lymfocytů (>5%) anebo pozitivní nález zánětlivého markeru CD64/CD16 ( $\geq 65\%$  a  $MFI_{index} \geq 2,6$ ) (viz příloha č. 1, obr. č. 34 - 53).

U pacientů s prokázanou akutní EBV infekcí dochází ke snížení relativních počtů CD19<sup>+</sup> B lymfocytů. Tento parametr splnilo 71 pacientů (92,2%) z celkového počtu 77 laboratorně pozitivních pacientů. Ke snížení relativního počtu CD19<sup>+</sup> B lymfocytů u tohoto onemocnění dochází pravděpodobně z důvodu výrazné cytotoxické odpovědi imunitního systému proti infikovaným buňkám, kterými B lymfocyty v tomto případě určitě jsou. Infikované B lymfocyty exprimují na svém povrchu antigeny EBV a na jejich přítomnost tak reagují složky vrozené i specifické imunity, zejména je charakteristická mohutná cytotoxická aktivita CD8<sup>+</sup> T lymfocytů (Krejsek et al., 2016). Ta se ve vyšetřování buněčné imunity projevuje výrazným snížením imunoregulačního indexu (IRI), tedy poměrem CD4<sup>+</sup> pomocných T lymfocytů a CD8<sup>+</sup> cytotoxických T lymfocytů, který je za normálních okolností posunut ve prospěch CD4<sup>+</sup> T lymfocytů a současně dochází k expresi aktivačního markeru HLADR na povrchu těchto lymfocytů. Také v námi sledované skupině laboratorně pozitivních EBV pacientů tato kritéria, tzn. snížený imunoregulační index (IRI <1) splnilo 73 pacientů (94,8%) a zvýšené procento aktivovaných T lymfocytů (CD3<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup> >5%) splnilo 75 pacientů (97,4%). Současně je u těchto pacientů pozorováno zvýšení relativního počtu lymfocytů (>40%). Toto kritérium splňuje 74 pacientů (96,1%). K výraznému snížení IRI dochází i u jiných onemocnění jako je např. infekce HIV. V tomto případě je však posun IRI ve prospěch CD8<sup>+</sup> T lymfocytů způsoben celkovým deficitem CD4<sup>+</sup> T lymfocytů v důsledku jejich destrukce samotným virem HIV, který pomocné T lymfocyty napadá (Lederman et al., 2004), nikoliv vlastní mohutnou cytotoxickou reakcí imunitního systému. V případě jiného intracelulárního patogena, *Francisella tularensis* – původce tularémie, nedochází k ovlivnění IRI, ale byl prokázán u tohoto onemocnění vyšší výskyt tzv. CD3<sup>+</sup>γδ T lymfocytů (Chrdle et al., 2019). Posledním sledovaným parametrem ve vyšetření buněčné imunity byl zánětlivý marker CD64 na CD16 pozitivních granulocytech, resp. neutrofilech, který byl zvýšen (CD64/CD16 ≥65% a MFI<sub>index</sub> ≥ 2,6) u 69 pacientů (89,6%), resp. 93,2% z vyšetřených 73 pacientů na tento marker. U čtyř pacientů nebyl tento marker vyšetřen. Vyšetření tohoto markeru se uplatňuje zejména pro odlišení bakteriálních infekcí. Vzhledem k tomu, že se jedná o Fcγ receptor, který se na neutrofilech exprimuje ve vyšší míře v přítomnosti opsonizovaných bakterií a rozpoznává Fc fragment navázaných imunoglobulinů a usnadňuje tak jejich fagocytózu neutrofilů (Davis, 2006; Hořejší a Bartůňková,

2009), je otázkou, proč také u této virové infekce dochází k jeho aktivaci. Možným vysvětlením je fakt, že infekce EBV způsobuje nespecifickou polyklonální aktivaci B lymfocytů, jejímž výsledkem je zvýšená tvorba nespecifických imunoglobulinů a možná zvýšená tvorba imunokomplexů, které mohou granulocyty také aktivovat.

Jedním z cílů práce bylo stanovit počet pacientů s uzlinovým syndromem, kteří byli ve sledovaném období (2017 – 2019) vyšetřeni na Pracovišti imunologie Nemocnice České Budějovice, a.s. a definovat počet laboratorně pozitivních pacientů na akutní EBV infekci v tomto souboru. Byla použita stejná kritéria na určení laboratorní positivity této infekce. Z celkového počtu vyšetřených pacientů (4602 pacientů) bylo 242 pacientů (5,2%) s diagnózou uzlinového syndromu (L040, R590, R599). U všech těchto pacientů byla v rámci diferenciálně – diagnostické rozvahy vyšetřena buněčná imunita. Pouze u 66 pacientů (27,3%) byl požadavek také na vyšetření DNA EBV/CMV pomocí PCR.

Z celkového počtu pacientů vyšetřených pro uzlinový syndrom bylo 30 pacientů (12,4%) hodnoceno alespoň dvěma sledovanými metodami jako EBV/CMV laboratorně pozitivní. 28 pacientů (93,3%) mělo kromě sérologie a vyšetření buněčné imunity indikováno vyšetření přítomnosti DNA virů EBV/CMV pomocí PCR. Ve všech třech sledovaných metodách (sérologie, buněčná imunita, PCR) bylo pozitivních 21 pacientů (70,0%), 9 pacientů (30,0%) bylo pozitivních ve dvou ze tří sledovaných metod – 6 pacientů (20,0%) bylo pozitivních v BI a PCR, 2 pacienti (6,7%) měli pozitivní sérologii a PCR a 1 pacient (3,3%) byl pozitivní v BI a sérologii.

Z výsledků vyplývá, že vyšetření buněčné imunity je lékařem indikováno vždy, neboť je součástí rozvahy v diferenciální diagnostice uzlinového syndromu k vyloučení malignity z leukocytárních buněk. Na základě výsledků je možné doporučit vyšetření buněčné imunity také pro vyloučení akutní infekce EBV/CMV.

U 28 pacientů (93,3%) byla splněna změna nejméně čtyř z pěti výše definovaných parametrů buněčné imunity. Snížení B lymfocytů bylo zjištěno u 29 pacientů (96,7%), IRI byl snížen u 28 pacientů (93,3%) a zánětlivý marker CD64/CD16 byl pozitivní u 28 pacientů (93,3%). U 26 pacientů (86,7%) bylo splněno všech pět parametrů buněčné imunity pro splnění kritérií laboratorní positivity akutní EBV/CMV infekce. Dva pacienti nesplnili všechna daná kritéria z důvodu neindikovaného vyšetření zánětlivého markeru CD64/CD16 lékařem,

v dalších čtyřech parametrech buněčné imunity byli ve shodě. U jednoho pacienta byla pozitivita definována na základě pozitivní sérologie a PCR, buněčná imunita zde nebyla jednoznačná. A u jednoho pacienta byla prokázána CMV infekce pomocí sérologie a PCR, buněčná imunita taktéž nebyla průkazná.

Při porovnání výsledků vyšetření buněčné imunity u laboratorně negativních pacientů s uzlinovým syndromem (212 pacientů, tedy 87,6%) bylo zjištěno, že nedochází k charakteristickým změnám alespoň ve čtyřech z pěti sledovaných parametrů buněčné imunity. Z tohoto důvodu se jeví vyšetření buněčné imunity jako vysoce specifické pro odlišení možného infekčního původu uzlinového syndromu. Je ale nezbytné mít stále na paměti, že definitivní diagnózu stanovuje vždy ošetřující lékař na podkladě laboratorního nálezu, vždy ve vztahu s klinickým obrazem pacienta!

## 7. Závěr

Základním tématem předkládané práce bylo laboratorní vyšetření herpetických infekcí (EBV, CMV) u pacientů Nemocnice České Budějovice, a.s. Celkově bylo hodnoceno 4602 pacientů, u kterých byla na Pracovišti imunologie Nemocnice České Budějovice, a.s. sérologicky vyšetřena přítomnost specifických protilátek proti EBV ve sledovaném období 2017 – 2019. U těchto pacientů byla hodnocena laboratorní pozitivita akutní infekce EBV/CMV pomocí tří metod (sérologie, hodnocení buněčné imunity, PCR). Na základě positivity alespoň ve dvou z těchto tří metod bylo zjištěno 77 pacientů s akutní infekcí EBV/CMV. U více jak 89% pacientů byla zjištěna změna minimálně ve čtyřech z pěti vybraných parametrů buněčné imunity, která je charakteristická pro akutní EBV/CMV infekci. Danými kritérii jsou přítomnost vyššího relativního počtu lymfocytů ( $>40\%$ ), snížení relativního počtu B lymfocytů ( $<8\%$ ), snížený IRI ( $<1$ ), vyšší procento aktivovaných  $CD3^+HLADR^+$  T lymfocytů ( $>5\%$ ) a/nebo pozitivní nález zánětlivého markeru  $CD64/CD16$  ( $\geq 65\%$  a  $MFI_{index} \geq 2,6$ ).

Dále byli hodnoceni pacienti s diagnózou uzlinového syndromu (L040, R590, R599). V této skupině bylo laboratorně definováno 30 pacientů s akutní EBV/CMV infekcí. U více než 93% těchto pacientů byla pozorována změna alespoň ve čtyřech z pěti sledovaných parametrů buněčné imunity.

Na základě výsledků této práce se vyšetření buněčné imunity pomocí průtokové cytometrie jeví více než užitečné pro odlišení možného infekčního původu uzlinového syndromu. Laboratorní nález je vždy nutno korelovat s klinickým obrazem pacienta.

## Přehled použité literatury a zdrojů

ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., PILLAI, S., 2016. *Basic immunology: functions and disorders of the immune system*. 5th edition. St. Louis, Missouri: Elsevier. ISBN 978-0-323-39082-8.

AMBROŽOVÁ, H., 2005. Infekční mononukleóza. *Pediatric pro praxi*. 6: 244-246.

ARVIN, A., CAMPADELLI-FIUME, G., MOCARSKI, E., MOORE, P. S., ROIZMAN, B., WHITLEY, R., YAMANISHI, K., 2007. *Human herpesviruses: Biology, therapy, and immunoprophylaxis*. Cambridge University Press, ISBN 978-0-511-29013-8.

BAKKE, A. C., 2001. The Principles of Flow Cytometry. *Laboratory Medicine*, 32(4), 207-211. ISSN 0007-5027.

BALFOUR, H. H., DUNMIRE, S. K., HOGQUIST, K. A., 2015. Infectious mononucleosis. *Clinical & Translational Immunology*. 4: e33. ISSN 2050-0068.

BARTUŇKOVÁ, J., PAULÍK, M., 2005. *Vyšetřovací metody v imunologii*. Praha: Grada. ISBN 80-247-0691-1.

BECKER, Y., DARAI, G., 1992. *Diagnosis of Human Viruses by Polymerase Chain Reaction Technology*. Berlin, Heidelberg: Springer - Verlag Berlin Heidelberg. Frontiers of Virology. ISBN 978-3-642-84768-4.

BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ V., SCHINDLER, J., SOUČEK, A., VÁVRA, J., 1996. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. 2. vydání. Praha: Marvil. ISBN 80-238-0297-6.

CARTER, J. B., SAUNDERS, V. A., 2013. *Virology: principles and applications*. 2nd edition. Chichester: Wiley. ISBN 9781119991427.

COMANS-BITTER, W. M., DE GROOT, R., VAN DEN BEEMD, R., NEIJENS, H. J., HOP, W. C., GROENEVELD, K., HOOIJKAAS, H. a VAN DONGEN, J. M., 1997. Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood Reference values for lymphocyte subpopulations. *The Journal of Pediatrics* [online]. 1997, 130: 388-393 [cit. 2020-04-01]. DOI: 10.1016/S0022-3476(97)70200-2. ISSN 00223476. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022347697702002>.

DAVIS, B. H., 2006. Analyte Neutrophil CD64 expression in infection and sepsis. *Neutrophil CD64 expression in infection and sepsis* [online]. clinlabint, October, 2006 [cit. 2020-04-01]. Dostupné z: <https://www.clinlabint.com/fileadmin/pdf/datasheet/neutrophil-cd64-expression-in-infection-and-sepsis.pdf>.

DE PASCHALE, M., CLERICI, P., 2012. Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection: Problems and solutions. *World Journal of Virology*. 1: 31-43. ISSN 2220-3249.

ECKSCHLAGER, T., VYBÍRALOVÁ, H., BARTUŇKOVÁ, J., 1999. *Průtoková cytometrie v klinické praxi*. Praha. ISBN 80-7169-279-4.

FLINT, S. J., RACANIELLO, V. R., RALL, G. F., SKALKA, A. M., ENQUIST, L. W., 2015. *Principles of virology*. 4th edition. Washington, DC: ASM Press. ISBN 978-1-55581-951.

GOETZ, Ch., HOMMERBECK, Ch., BONNEVIER, J., 2018. *Flow Cytometry Basics for the Non-Expert*. Springer Nature Switzerland. ISBN 978-3-319-98071-3.

GREENWOOD, D., BARER, M., SLACK, R., IRVING, W., 2012. *Medical microbiology: A guide to microbial infections : pathogenesis, immunity, laboratory diagnosis and kontrol*. 18th edition. New York: Churchill Livingstone. ISBN 9781336261815.

GROSELJ-GRENC, M., IHAN, A. a DERGANČ, M., 2008. Neutrophil and Monocyte CD64 and CD163 Expression in Critically Ill Neonates and Children with Sepsis: Comparison of Fluorescence Intensities and Calculated Indexes. *Mediators of Inflammation* [online]. 2008, 1-10 [cit. 2020-04-01]. DOI: 10.1155/2008/202646. ISSN 0962-9351. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/mi/2008/202646/>

HESS, R. D., 2004. Routine Epstein-Barr Virus Diagnostics from the Laboratory Perspective: Still Challenging after 35 Years. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. American Society for Microbiology, Aug. 2004, 42: 3381–3387

HOŘEJŠÍ, V., BARTUŇKOVÁ, J., 2009. *Základy imunologie*. 4. vyd. Praha: Triton. ISBN 978-80-7387-280-9.

HŮLEK, P., URBÁNEK, P., 2018. *Hepatologie*. 3. vydání. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-271-0394-2.

HURT, Ch., TAMMARO, D., 2007. Diagnostic Evaluation of Mononucleosis-Like Illnesses. *The American Journal of Medicine*. 120: 911.e1-911.e8. ISSN 00029343.

CHRDLE, A., TINAVSKÁ, P., DVOŘÁČKOVÁ, O. et al., 2019. Early Diagnosis of Tularemia by Flow Cytometry, Czech Republic, 2003–2015. *Emerging Infectious Diseases* [online]. 2019, 25: 1919-1927 [cit. 2020-04-01]. DOI: 10.3201/eid2510.181875. ISSN 1080-6059. Dostupné z: [http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/25/10/18-1875\\_article.htm](http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/25/10/18-1875_article.htm)

KORSMAN, S. N. J., VAN ZYL, G. U., NUTT, L., ANDERSSON, M. I., PREISER, W., 2012. *Virology: an illustrated colour text*. New York: Churchill Livingstone Elsevier. ISBN 9781455742134.

KREJSEK, J., ANDRÝS, C., KRČMOVÁ, I., 2016. *Imunologie člověka*. Hradec Králové: Garamon. ISBN 978-80-86472-74-4.

KREJSEK, J., KOPECKÝ, O., 2004. *Klinická imunologie*. Hradec Králové: Nucleus HK. ISBN 80-86225-50-X.

LEDERMAN, M. M., RODRIGUES, B., SIEG, S., 2004. Immunopathogenesis of HIV infection. HIV In Site Knowledge Base Chapter. [cit. 2020-03-30]. Dostupné z: <http://hivinsite.ucsf.edu/InSite%3Fpage=kb-02%26doc=kb-02-01-04>

LOCHMANOVÁ, A., 2014. *Základy imunologie: skriptum*. Ostrava: Ostravská univerzita v Ostravě. ISBN 978-80-7464-570-9.

MACEY, M. G., 2007. *Flow cytometry: principles and applications*. Totowa, NJ: Humana Press. ISBN 1-59745-451-6.

MAHY, B. W. J., VAN REGENMORTEL, M. H. V., 2008. *Encyclopedia of virology*. 3rd edition. Boston: Academic Press. ISBN 978-0-12-373935-3.

MARINOV, I., 2008. *Průtoková cytometrie v klinické hematologii*. 2., přeprac. a rozš. vyd. Praha: Triton, 2008. ISBN 978-80-7387-143-7.

MODROW, S., FALKE D., TRUYEN, U., SCHÄTZL, H., 2010. *Molekulare Virologie*. 3. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. ISBN 978-3-8274-1833-3.

NOHÝNKOVÁ, E., 2017. Jak laboratorní metody pomáhají v pátrání po původcích nemocí: Vybrané metody diagnostiky infekčních onemocnění. *ŽIVA: Časopis přírodnický*. Praha: Matice česká při Museu Království českého, 65: CV-CVIII. ISSN 0044-4812.

PRASHANT M., et al., 2018. Heterophile Antibody Positive Infectious Mononucleosis by Epstein Barr Virus (EBV) - A Short Review. *Acta Scientific Microbiology* 1.9 (2018): 44-49.

PUNT, J., STRANFORD, S. A., JONES, P. P., OWEN, J. A., 2019. *Kuby Immunology*. 8th edition. New York, NY: W. H. Freeman. ISBN 9781319172985.

RAJČÁNI, J., ČIAMPOR, F., 2006. *Lekárska virologia*. Bratislava: VEDA vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied. ISBN 80-224-0911-1.

ROHÁČOVÁ, H., 2005. Onemocnění vyvolaná virem Epstein-Barrové. *Interní medicína pro praxi*. 7: 301-302.

ROUBALOVÁ, K., 2010. Laboratorní diagnostika herpetických virů. *Medicína pro praxi*. 7: 241-244.



ROUBALOVÁ, L., 2012. *FONS : bulletin pro odborníky z oblastí: klinické biochemie, laboratorní diagnostiky, výpočetní techniky, laboratorní a zdravotnické techniky*. Pardubice: Stapro, 22. ISSN 1211-7137.

RYU, W. S., 2017. *Molecular virology of human pathogenic viruses*. Amsterdam: Academic Press, an imprint of Elsevier. ISBN 9780128008386.

SAMADIKUCHAKSARAEI, A., 2016. *Polymerase Chain Reaction for Biomedical Applications*. ISBN 9789535127963.

SHAPIRO, H. M., c2003. *Practical flow cytometry*. 4th ed. New York: Wiley-Liss. ISBN 0-471-41125-6.

STANĚK, L., 2013. Polymerázová řetězová reakce: princip metody a využití v molekulární patologii. *Česko-slovenská patologie*. Praha: Česká lékařská společnost J. E. Purkyně, 49: 119-121. ISSN 1805-4498.

ŠMARDA, J., 2005. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 80-210-3841-1.

TANKESHWAR, A., 2014. Hemagglutination Inhibition Test (HAI): Principle, procedure, result and interpretations. *Microbeonline* [online]. MH Magazine WordPress, c2020, [cit. 2020-03-21]. Dostupné z: <https://microbeonline.com/hemagglutination-inhibition-test-hai-principle-procedure-result-interpretations/>

Tinavská, P., 2018. Laboratorní diagnostika EBV a CMV v NCB. Třeboň, mezioborová konference.

*VIDIA: cesta ke správnému výsledku* [online]. 2020 [cit. 2020-03-21]. Dostupné z: <https://www.vidia.cz/elisa/infekcni-serologie/herpetick%C3%A9-viry/epstein-barrov%C3%A9-virus-ebv>

VOTAVA, M., 2005. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přeprac. vyd. Brno: Neptun. ISBN 80-86850-00-5.

WATSON, J. V., 2004. *Introduction to flow cytometry*. New York: Cambridge University Press. ISBN 0521611997.

ZUCKERMAN, A. J., BANATVALA, J. E., PATTISON, J. R., GRIFFITHS, P. D., SCHOUB, B. D., 2004. *Principles and Practise of Clinical Virology*. 5th edition. John Wiley. ISBN 0-470-84338-1.

## Obrázky

<https://www.dreamstime.com/royalty-free-stock-photo-herpes-virus-structure-image27182865>

<https://aurametrix.weebly.com/topics/epstein-barr-virus>

<https://www.dreamstime.com/illustration/cytomegalovirus.html>

<https://ziva.avcr.cz/2017-4/jak-laboratorni-metody-pomahaji-v-patrani-po-puvodcich-nemoci-vybrane-metody-diagnostiky-infekcnich-onemocneni.html>

<https://ziva.avcr.cz/2017-4/jak-laboratorni-metody-pomahaji-v-patrani-po-puvodcich-nemoci-vybrane-metody-diagnostiky-infekcnich-onemocneni.html>

<https://www.prolekare.cz/casopisy/cesko-slovenska-patologie/2013-3-2/polymerazova-retezova-reakce-princip-metody-a-vyuziti-v-molekularni-patologii-41222>

<https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/flow-cytometry-principle>

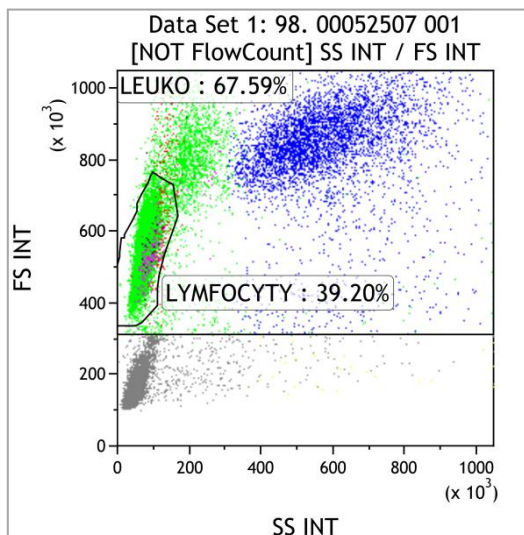
<https://www.bio-rad-antibodies.com/flow-cytometry-fluidics-system.html>

<https://www.creative-diagnostics.com/flow-cytometry-guide.htm>

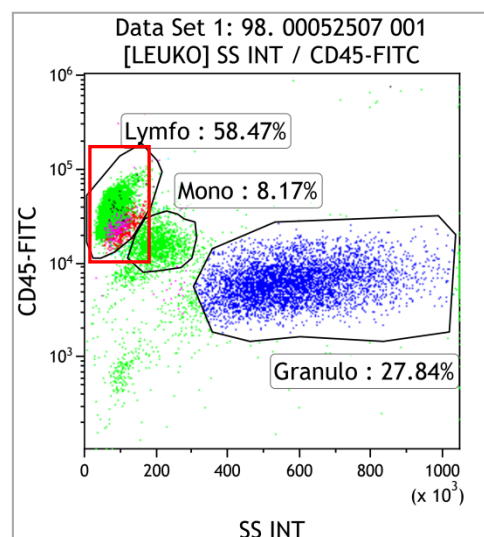
[https://www.vidia.cz/images/letaky/EBV-CZ\\_2017.pdf](https://www.vidia.cz/images/letaky/EBV-CZ_2017.pdf)

# Přílohy

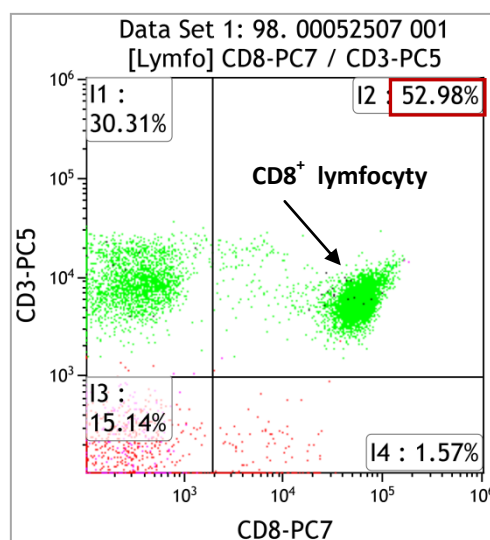
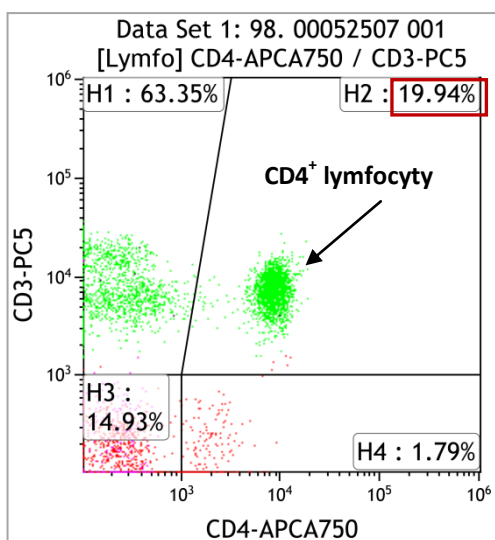
**Příloha 1:** Obraz buněčné imunity u **laboratorně pozitivního** pacienta s akutní EBV infekcí.



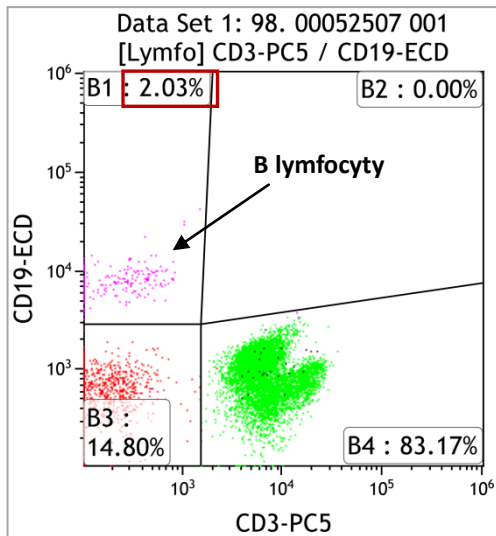
**Obr. č. 34:** Rozdělení buněk periferní krve po lýze dle velikosti a granularity (Foto: Lenka Chaloupková).



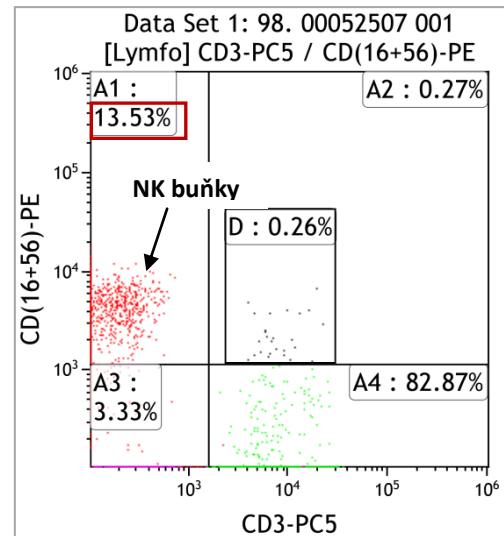
**Obr č. 35:** CD45<sup>+</sup> leukocyty a gateování lymfocytární populace (58,47%) (Foto: Lenka Chaloupková).



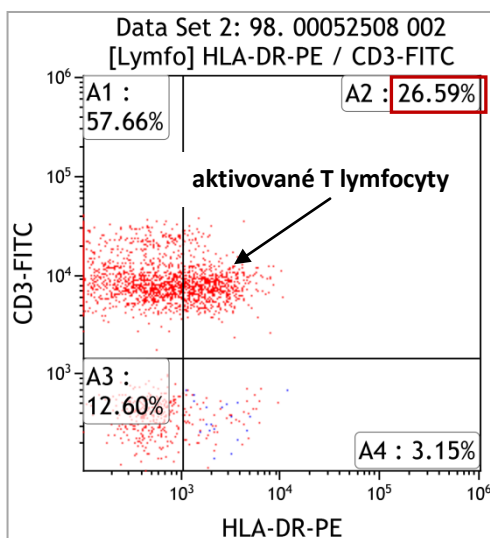
**Obr. č. 36 a 37:** Hodnocení pomocných CD4<sup>+</sup> (19,94%) a cytotoxických CD8<sup>+</sup> (52,98) T lymfocytů pro stanovení IRI (poměr CD4/CD8 T lymfocytů, zde roven **0,37**) (Foto: Lenka Chaloupková).



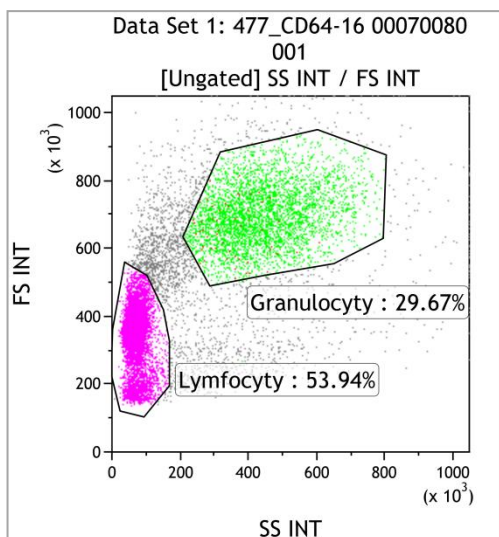
**Obr. č. 38:** Hodnocení relativních počtů CD19<sup>+</sup> B lymfocytů (2,03%) (Foto: Lenka Chaloupková).



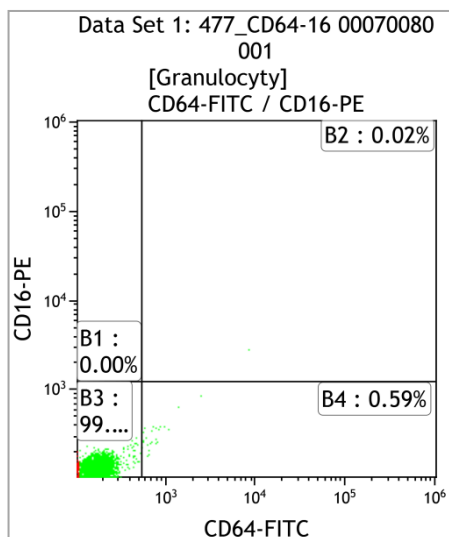
**Obr. č. 39:** Hodnocení relativních počtů CD3-16<sup>+</sup>(56<sup>+</sup>) NK buněk (13,53%) (Foto: Lenka Chaloupková).



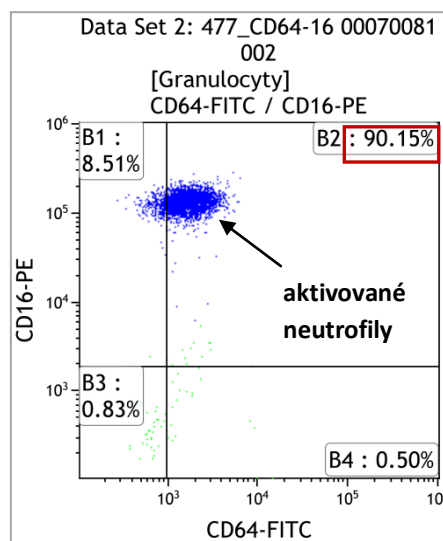
**Obr. č. 40:** Hodnocení aktivovaných CD3<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup> T lymfocytů (Foto: Lenka Chaloupková).



**Obr. č. 41:** Rozdělení buněk periferní krve po lýze dle velikosti a granularity a gateování granulocytární populace (29,67%) (Foto: Lenka Chaloupková).

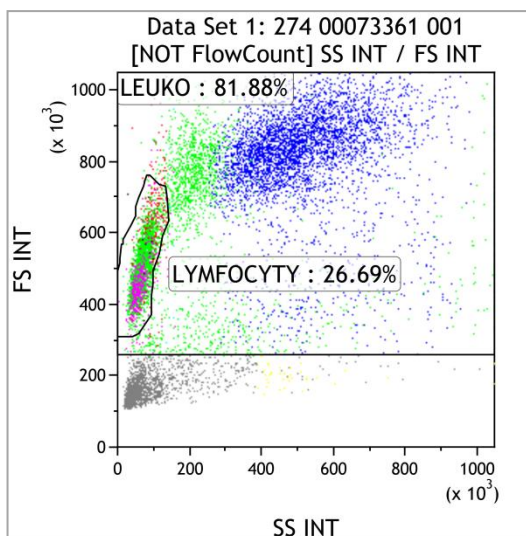


**Obr. č. 42:** Hodnocení izotypové kontroly (K) (Foto: Lenka Chaloupková).

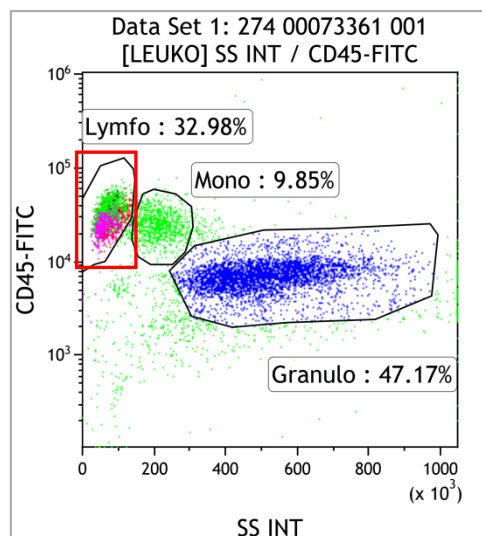


**Obr. č. 43:** Hodnocení zánětlivého markeru CD64 na CD16 pozitivních granulocytech (90,2%, MFI = 3,2) (Foto: Lenka Chaloupková).

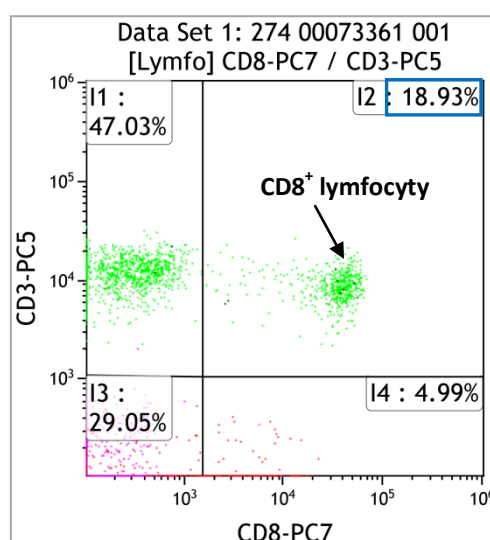
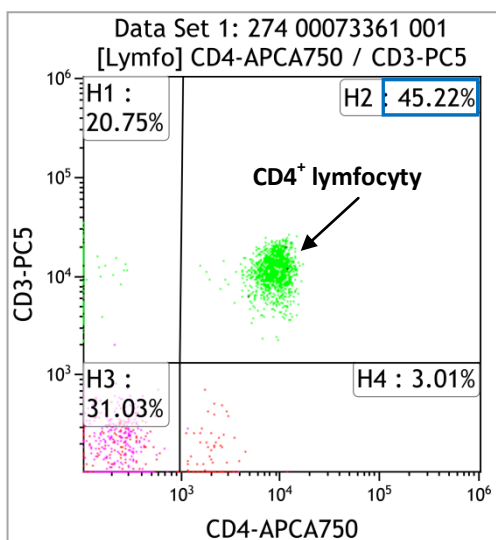
**Příloha 2: Obraz buněčné imunity u laboratorně negativního pacienta.**



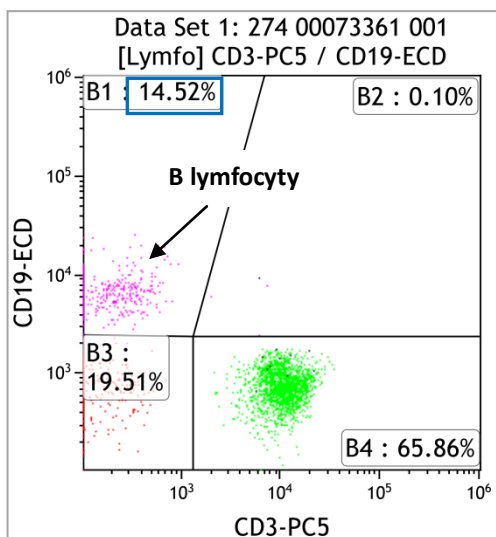
**Obr. č. 44:** Rozdělení buněk periferní krve po lóže dle velikosti a granularity (Foto: Lenka Chaloupková).



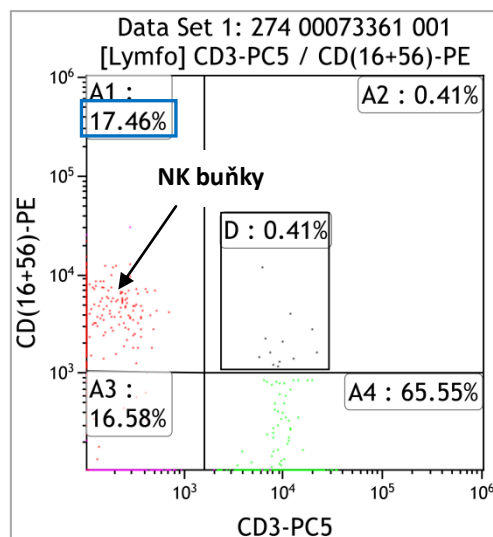
**Obr. č. 45:** Definování CD45<sup>+</sup> leukocytů a gateování lymfocytární populace (32,98%) (Foto: Lenka Chaloupková).



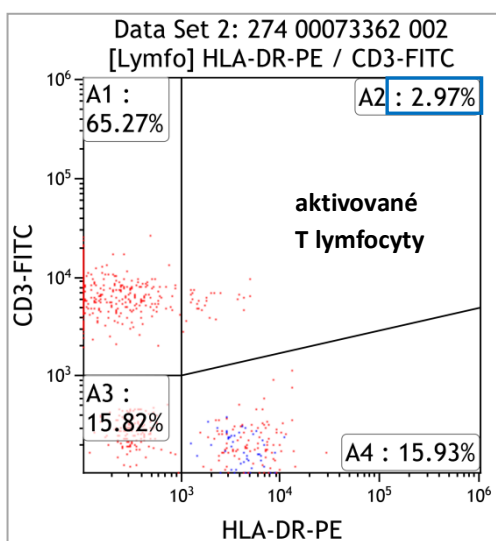
**Obr. č. 46 a 47:** Hodnocení pomocných CD4<sup>+</sup> (45,22%) a cytotoxických CD8<sup>+</sup> (18,93%) T lymfocytů pro stanovení IRI (poměr CD4/CD8 T lymfocytů, zde roven **2,38**) (Foto: Lenka Chaloupková).



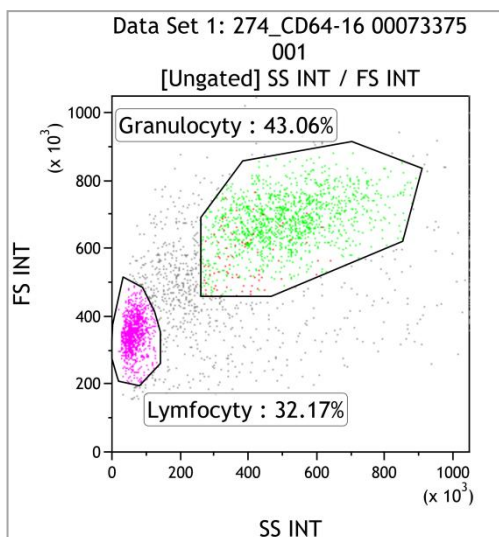
**Obr. č. 48:** Hodnocení relativních počtů CD19<sup>+</sup> B lymfocytů (14,52%) (Foto: Lenka Chaloupková).



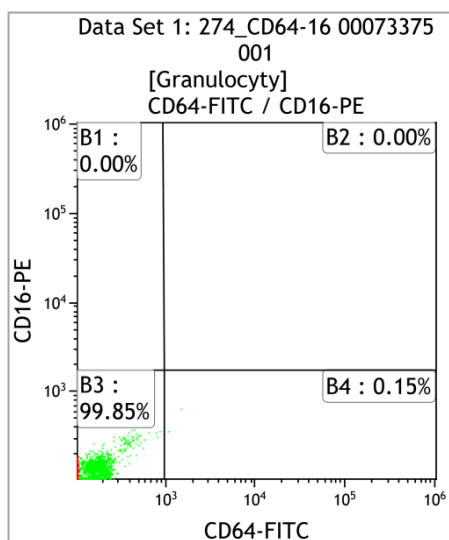
**Obr. č. 49:** Hodnocení relativních počtů CD3-16<sup>+</sup>(56<sup>+</sup>) NK buněk (17,46%) (Foto: Lenka Chaloupková).



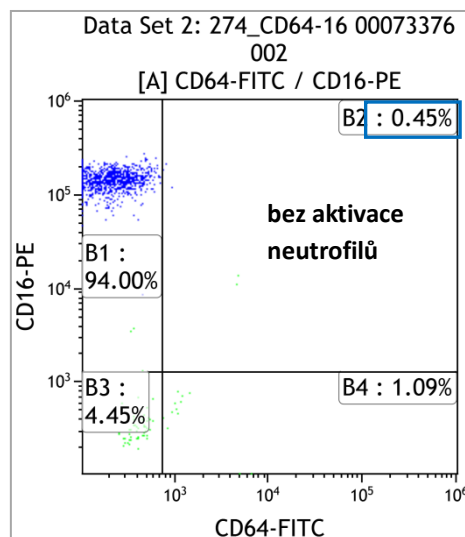
**Obr. č. 50:** Hodnocení aktivovaných CD3<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup> T lymfocytů (2,97%) (Foto: Lenka Chaloupková).



**Obr. č. 51:** Rozdělení buněk periferní krve po lýze dle velikosti a granularity a gateování granulocytární populace (Foto: Lenka Chaloupková).



**Obr. č. 52:** Hodnocení izotypové kontroly (K) (Foto: Lenka Chaloupková).



**Obr. č. 53:** Hodnocení zánětlivého markeru CD64 na CD16 pozitivních granulocytech (0,45%. MFI=0,4) (Foto: Lenka Chaloupková).