

Ročník VIII.

# newslab

časopis laboratórnej medicíny



2017

**Pseudoglandulárny névus – zriedkavá morfológia melanocytového névu (case report)**

Pseudoglandular nevus – rare morphology of melanocytic nevus (case report)

**Diferenciálna molekulová diagnostika mnohopočetného myelómu a Waldenströmovej makroglobulinémie**

Differential molecular diagnostics of multiple myeloma and Waldenström's macroglobulinemia

**Molekulová analýza prognosticky významných markerov chronickej lymfocytovej leukémie**

Molecular analysis of significant prognostic markers in chronic lymphocytic leukaemia

**Výskyt kmeňov *Streptococcus pneumoniae* pri zápalových ochoreniach horných dýchacích ciest detí v predškolskom veku a ich rezistencia na antibiotiká**

Occurrence of *Streptococcus pneumoniae* strains at inflammatory diseases of the upper respiratory tract of preschool children and their resistance to antibiotics

**Malígny melanóm – nové aspekty výskumu**

Malignant melanoma – new research aspects

# ZDRAVIE PLODU NIE JE HÁDANKA

Neinvazívny prenatalný skriningový test na určenie rizika najčastejších trizómií, stanovenie pohlavia, aberácií počtu pohlavných chromozómov a vybraných chromozómových mikrodencií plodu z krvi matky od 11. týždňa tehotenstva.



**TRISOMY**test



**TRISOMY**test+



Chromozómové poruchy

## TRISOMY test

Downov syndróm (trizómia 21)  
Edwardsov syndróm (trizómia 18)  
Patauov syndróm (trizómia 13)  
Pravdepodobné pohlavie plodu

## TRISOMY test +

Downov syndróm (trizómia 21)  
Edwardsov syndróm (trizómia 18)  
Patauov syndróm (trizómia 13)  
Chromozómové pohlavie plodu  
Turnerov syndróm (monozómia X)  
Klinefelterov syndróm (XXY)  
XYY syndróm (XYY)  
XXX syndróm (XXX)

DiGeorgeov syndróm (22q11)  
Praderov-Williho  
a Angelmanov syndróm (15q11)  
Cri-du-chat syndróm (5p15)  
Syndróm delécie 1p36  
Wolfov-Hirschhornov syndróm (4p16.3)



Cena vyšetrenia

350 €

500 €



Stanovenie výsledkov\*

5 pracovných dní

5 pracovných dní



Vyšetrenie indikuje

gynekológ alebo lekársky genetik

lekársky genetik

\*V prípade, že dodanú vzorku nebolo možné laboratórne spracovať v súlade so správnou laboratórnou praxou alebo výsledok vyšetrenia neodpovedá na diagnostickú otázku, laboratórium ponúka bezodplatné opakovanie vyšetrenia z tej istej vzorky (dodanie výsledku sa predlží z 5 na 8 pracovných dní).

0800 00 30 30

info@trisomytest.sk

www.trisomytest.sk



člen  
**MEDIREX GROUP**  
všetko pre vaše zdravie

V súčasnosti si mnohí z nás často povzdychnú, že život ide príliš rýchlo a neustále sa mení. Mnohí sa ťažko vyrovnávajú s neustálymi a rýchlymi zmenami. Takto som si povzdychla aj ja pred pár mesiacmi, keď vyšlo druhé minuloročné číslo časopisu newslab a my sme boli spokojní, ako sa krásne vydaril a ako sa nám dobre rozbehla spolupráca s vydavateľstvom Solen. Bohužiaľ uplynulo pár dní a zástupcovia vydavateľstva nám oznámili, že z dôvodu vysokej vyťaženia a nových projektov, nebudú môcť náš časopis ďalej zastrešovať. Nebolo však času na dlhé povzdychy, pretože sme už mali rozbehnuté nové číslo na rok 2017. Preto sme museli čo najrýchlejšie hľadať nové vydavateľstvo, ktoré by malo dostatok skúseností so zdravotníckou literatúrou a súčasne by jeho predstavitelia videli perspektívu nášho časopisu, ako kvalitného printového média pre laboratórnu diagnostiku.

Začali sme spoluprácu s vydavateľstvom A-medi, ktoré má dlhoročné skúsenosti v oblasti zdravotníckej literatúry. Najviditeľnejším výsledkom tejto spolupráce je nová grafika časopisu, ktorá sa vám, dúfam bude páčiť. Čo je však podstatnejšie, všetci sme presvedčení, že to bude spolupráca dlhodobá a plodná, ktorá prinesie nášmu časopisu nové nápady aj vysokú kvalitu prispievateľov.

Aj v tomto čísle prinášame zaujímavé články vo všetkých pravidelných rubrikách a mňa osobne teší najviac, že sa nám podarilo rozvinúť intenzívnejšiu spoluprácu s mladými vedcami z prírodovedeckej fakulty, ktorí prispeli dvoma zaujímavými článkami.

Nová je rubrika **Novinky, názory a pohľady**, v ktorej by vám kolega Janko Radvánszky pravidelne prinášal novinky z biologických vied aj otvorené otázky a názory, ktoré rezonujú v súčasnej vedeckej komunite. Ako píše jej autor v predstavení hlavných cieľov tejto rubriky: „*Tieto totiž nespočívajú v opisovaní nových vedomostí získaných vedeckou prácou autorov ani v podrobnom zhrnutí väčšiny aktuálne dostupných údajov o vybranej tematike vo forme prehľadových článkov. Ide skôr o našu snahu stimulovať záujem a debatu ohľadne vybraných tém, ktoré aktuálne rezonujú v odbornej a vedeckej literatúre*“. A myslím si, že už prvou témou „*Personalizovaná medicína alebo kam, sa zdá, že smeruje zdravotná starostlivosť v ére „veľkých dát“?*“ plní svoje ciele na 100 percent, otvorí nám obzory a možno aj poradí, ako sa vyrovnat' s množstvom údajov, ktoré vieme v ére rôznych „-ómov“ získať, na druhej strane si často kladieme etické otázky, čo si s týmito „veľkými číslami“ počať. Verím, že v súčasnej rýchlej dobe, keď sme zavalení rutinnou prácou a nie vždy stíhame sledovať všetky novinky, zaujímavé témy a názory, a k niektorým by sme sa ani nemali šancu dostať, bude táto rubrika prínosom, ak aj nie pre dennodennú prácu, tak určite pre získanie širšieho pohľadu na problematiku biologického a medicínskeho výskumu, na jeho prítomnosť ale aj budúcnosť.

V tomto čísle si dovoľujeme predstaviť vám aj novú knihu „**Klinická parazitológia**“, ktorú spolu s kolektívom napísal náš kolega a expert na parazitológiu docent František Ondriska. Ide o komplexnú učebnicu, s najnovšími poznatkami, ktorá je určená študentom medicínskeho i prírodovedného zamerania, jedná sa naozaj o ojedinelú publikáciu, ktorá bude určite prínosom pre všetkých, ktorí sa zaujímajú o parazitológiu či už na úrovni pregraduálneho alebo postgraduálneho štúdia, alebo proste len tak zo záujmu, pretože, ako píše jeden z recenzentov: „*Problematika parazitologie se v našich podmínkách jeví ve srovnání s ostatními podobory mikrobiologie jako zdánlivě méně důležitá, ale opak je pravdou. Při současných možnostech cestování, možných pracovních pobytech v zahraničí, přirozené migraci obyvatelstva nebo migraci způsobené zhoršenou sociálně ekonomickou situací, získává lékařská parazitologie opět na významu. Existuje zde totiž reálná hrozba zavlečení parazitárních onemocnění, která se ve střední Evropě dosud nevyskytovala...*“, a pridanou hodnotou tejto knihy je jej dostupnosť zdarma na web stránke.

Vážení kolegovia, milí čitatelia, dúfam, že vás obsah nového čísla newslabu zaujme, prinesie vám príjemne strávené chvíle a bude inšpiráciou vo vašej a našej spoločnej práci.

**RNDr. Elena Tibenská, PhD.**  
šéfredaktorka časopisu



## Pôvodné práce

## Performance of a DNA methylation marker panel using liquid-based cervical scrapes to detect cervical cancer and its precancerous stages 5

Kristin Eichelkraut, M. Eng., Dana Schmidt, Dipl. Ing., Martina Schmitz, Dr. rer. nat., Ilona Zeiser, Dr. med., Hans Ikenberg, Priv. Doz. Dr. med., Matthias Dürst, Prof. Dr., Alfred Hansel, Dr. rer. nat.

Výskyt kmeňov *Streptococcus pneumoniae* pri zápalových ochoreniach horných dýchacích ciest detí v predškolskom veku a ich rezistencia na antibiotiká 10

RNDr. Gabriela Bertaová, MUDr. Monika Czirfuszová, PhD., RNDr. Veronika Fekete, MUDr. Eva Sinajová, RNDr. Daniela Lacková, PhD., MUDr. Eva Csölleyová, RNDr. Beáta Gottwaldová, MUDr. Alica Sobotová

## Molekulárno-genetická charakterizácia kožných baktérií 16

Mgr. Iveta Gazdaricová

## Pseudoglandulárny névus – zriedkavá morfológia melanocytového névu (case report) 21

MUDr. Andrea Janegová, PhD., MUDr. Pavol Janega, PhD., prof. MUDr. Pavel Babál, CSc.

## Výskyt betahemolytických streptokokov izolovaných z horných dýchacích ciest pacientov z okresov Komárno a Nové Zámky a ich rezistencia na antibiotiká 25

RNDr. Kristína Mózes, RNDr. Veronika Fekete, MUDr. Monika Czirfuszová, PhD.

## Neštandardné výsledky neinvazívneho prenatálneho testu na chromozómové poruchy plodu môžu poskytovať doplňujúcu informáciu o zdravotnom stave tehotných žien 30

RNDr. Tomáš Szemes, PhD., RNDr. Michaela Hýblová, MUDr. Jana Barošová, RNDr. Gabriel Minárik, PhD., Werner Krampfl

## Diferenciálna molekulová diagnostika mnohopočetného myelómu a Waldenströmovej makroglobulinémie 34

Mgr. Lucia Tatayová, prof. MUDr. Beata Mladosičová, CSc., RNDr. Renata Lukačková

## Molekulová analýza prognosticky významných markerov chronickej lymfocytovej leukémie 38

Mgr. Erika Tomková, Mgr. Jakub Petrík, RNDr. Renata Lukačková, RNDr. Miroslav Tomka, PhD.

## Prehľadové práce

## Malígný melanóm – nové aspekty výskumu 44

MUDr. Pavol Janega, PhD., RNDr. Tomáš Szemes, PhD., RNDr. Gabriel Minárik, PhD.

## Cirkulujúca DNA – od jej objavenia cez neinvazívne prenatálne testovanie aneuploidii a monogénne dedičných ochorení až k neinvazívnej nádorovej diagnostike a prognostike 48

RNDr. Gabriel Minárik, PhD.

## Choroba len pre tehotné – PREEKLAMPZIA 53

Mgr. Lucia Striešková

## Uspeli sme v zahraničí

## Postrehy z Prague Spring Symposium 2016 a 4th Central Eastern European Symposium on Free Nucleic Acids in Non-Invasive Prenatal Diagnosis 57

Minutes from conferences Prague Spring Symposium 2016 and 4th Central Eastern European Symposium on Free Nucleic Acids in Non-Invasive Prenatal Diagnosis RNDr. Tomáš Szemes, PhD.

## Novinky, názory a pohľady

## Personalizovaná medicína alebo kam smeruje zdravotná starostlivosť v ére „veľkých dát“? 59

RNDr. Ján Radvánszky, PhD.

## Predstavujeme

## Klinická parazitológia 62

doc. RNDr. František Ondriska, PhD., RNDr. Vojtech Boldiš, PhD., Mgr. Mária Garajová, PhD., RNDr. Martin Mrva, PhD.

## Test

## Garantovaný autodidaktický test 63

Ročník 8, 2017, číslo 1  
Vychádza 2 x ročne  
Dátum vydania: apríl 2017

## Redakčná rada:

RNDr. Elena Tibenská, PhD.

## Výkonné redaktorky:

Mgr. Slavomíra Šindelárová  
PhDr. Mária Žeglenová

## Členovia:

MUDr. Peter Bohuš  
MUDr. Eva Ďurovcová, PhD.  
MUDr. Ján Lazúr  
MUDr. Monika Czirfuszová, PhD.  
MUDr. Katarína Schenková  
Mgr. Peter Baráth, PhD.  
MUDr. Pavol Janega, PhD.  
RNDr. Daniela Hučková  
RNDr. Ján Radvánszky, PhD.  
RNDr. Renata Lukačková  
MUDr. Adriana Krajčíková

## Vydavateľ:

MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o.

## Sídlo vydavateľa a adresa redakcie:

MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o.  
Jána Bottu 2, 917 01 Trnava  
redakcia@newslab.sk, www.newslab.sk  
IČO: 37 98 68 05

## Technická redaktorka:

Ing. Danica Paulenová

## Grafická úprava:

Lucia Vecseiová

Všetky články sú plne recenzované.

Registrácia MK SR pod číslom EV 5164/15

ISSN 1338-9661 (tlačené vydanie)

ISSN 2454-0021 (online)

Časopis je indexovaný v Bibliographia  
Medica Slovaca (BMS).

Citácie sú spracované v CiBaMed.

## Citačná skratka: newslab

Na informačné a nekomerčné účely je dovolené články v publikácii newslab voľne a bezplatne sťahovať, kopírovať, distribuovať, tlačiť, prehľadávať a odkazovať na ne. Je však potrebné, ak je to podľa spôsobu použitia možné, uvádzať ich autora a zdroj. Použitie článkov na iné účely a iným spôsobom je možné len so súhlasom vydavateľa.

Vydavateľ nenesie zodpovednosť za údaje a názory autorov jednotlivých článkov či inzerátov.

## Performance of a DNA methylation marker panel using liquid-based cervical scrapes to detect cervical cancer and its precancerous stages

Kristin Eichelkraut, M. Eng.<sup>1</sup>, Dana Schmidt, Dipl. Ing.<sup>1</sup>, Martina Schmitz, Dr. rer. nat.<sup>1</sup>, Ilona Zeiser, Dr. med.<sup>2</sup>, Hans Ikenberg, Priv. Doz. Dr. med.<sup>2</sup>, Matthias Dürst, Prof. Dr.<sup>3</sup>, Alfred Hansel, Dr. rer. nat.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Oncnostics GmbH, Winzerlaer Strasse 2, DE-07745 Jena

<sup>2</sup>MVZ CytoMol, Berner Str. 76, DE-60437 Frankfurt

<sup>3</sup>Functional unit "Gynecologic Molecular Biology", University Women's Hospital, Bachstrasse 18, DE-07743 Jena

**Aim:** An essential event in early carcinogenesis is the hypermethylation of so-called CpG islands, which are predominantly located in promoter/5' regions of genes in the human genome. Specific patterns of hypermethylation may thus be indicative for carcinogenesis and provide tools for diagnostics. In the current study the performance of a panel of six DNA methylation marker regions for the detection of cervical precancerous lesions and cancer was assessed using cervical scrapes from corresponding patients.

**Methods:** A series of cervical scrapes from women with cervical cancer (n=5), cervical intraepithelial neoplasia grade 3 (CIN3) (n=26) or CIN1/2 (n=14), and women with normal cytology (n=60) were assessed for methylation of the marker regions ASTN1, DLX1, ITGA4, RXFP3, SOX17, and ZNF671. Methylation analysis was done using the GynTect<sup>®</sup> assay.

**Results:** All samples from women with cervical cancer (5/5) were scored positive for the methylation assay. Of the CIN3 cases, 62% (16/26), of the CIN1/2 cases 50% (7/14) were positive for the assay. Only 1.7% of the cytology-normal samples (1/60) were positive for the methylation assay. Overall, the number of methylated marker regions increased proportionally to the lesion severity.

**Conclusion:** DNA methylation analysis of ASTN1, DLX1, ITGA4, RXFP3, SOX17, and ZNF671 in cervical scrapes consistently detects cervical cancer and the majority of CIN3 as well as a subset of CIN1/2 lesions, whereas the detection rate among cytology-normal samples is extraordinarily low. Thus, the GynTect<sup>®</sup> assay based on detection of these six methylation markers may provide an excellent tool within cervical cancer screening.

**Keywords:** DNA methylation; human Papillomavirus (HPV); biomarkers; cervical cancer

### Využitelnost' analýzy zmeny metylácie DNA pre detekciu rakoviny krčka maternice a jej prekancerózných štádií

**Ciel':** Zásadnou udalosťou včasnej karcinogenézy je hypermetylácia takzvaných CpG ostrovčekov, ktoré sa prevažne nachádzajú v promótorových/5'-oblastiach génov v ľudskom genóme. Konkrétne vzory hypermetylácie tak môžu indikovať karcinogenézu a slúžiť ako nástroj pre diagnostiku. V aktuálnej štúdií posudzujeme využitelnosť panelu šiestich vybraných markerov metylácie DNA za účelom detekcie prekancerózných lézií krčka maternice a jej karcinómu pomocou analýzy DNA získanej z buniek sterov krčka maternice príslušných pacientiek.

**Metódy:** Sada cervikálnych sterov od žien s rakovinou krčka maternice (n=5), s cervikálnou intraepiteliálnou neopláziou stupňa 3 (CIN3) (n=26) alebo CIN1/2 (n=14), a od žien s normálnym cytologickým nálezom (n=60) bola hodnotená po analýze stavu metylácie oblastí ASTN1, DLX1, ITGA4, RXFP3, SOX17 a ZNF671. Analýza metylačného stavu bola vykonaná pomocou testu GynTect<sup>®</sup>.

**Výsledky:** Všetky vzorky od žien s rakovinou krčka maternice (5/5) boli pozitívne v teste metylačného stavu. Z CIN3 prípadov bolo v teste pozitívnych 62% (16/26) a z CIN1/2 prípadov to bolo 50% (7/14). Iba 1,7% zo vzoriek s normálnym cytologickým nálezom (1/60) bolo pozitívnych v teste metylačného stavu. Celkovo sa počet regiónov metylovaných markerov zvyšoval úmerne so závažnosťou lézií.

**Záver:** Analýza metylácie DNA buniek zo sterov krčka maternice ASTN1, DLX1, ITGA4, RXFP3, SOX17 a ZNF671 spoľahlivo deteguje vzorky s karcinómom krčka maternice a väčšinu CIN3, ako aj podmnožinu CIN1/2 lézií, zatiaľ čo miera detekcie medzi vzorkami s normálnym cytologickým nálezom je mimoriadne nízka. Test GynTect<sup>®</sup> na základe detekcie vybraných šiestich metylačných markerov môže byť použitý ako vynikajúci nástroj pre skríning rakoviny krčka maternice.

**Kľúčové slová:** metylácia DNA; ľudský Papillomavirus (HPV); biomarkery; rakovina krčka maternice

NewsLab, 2017; roč. 8(1): 5 – 8

## Introduction

Cervical cancer is still among the most frequent cancers in women world-wide (Torre et al., 2015). With the availability of screening programs, however, cervical cancer incidence and mortality have markedly decreased, especially in developed countries (Anttila et al., 2009). The effects of the cytology-based diagnostics – the so-called Pap test, the most prominent screening tool applied even nowadays – have, however, levelled-off the last decade, mainly because of the limited sensitivity for precancerous lesions, as well as limited participation of the women. On the other hand, limited specificity of the Pap test also leads to over-diagnosis and over-treatment, mainly among young women. Therefore alternative screening tools, which may lead to an overcome of these limitations of cytology are discussed since several years.

Testing for the human papillomaviruses (hrHPV) that evoke cervical cancer improves the sensitivity of screening (Ronco et al., 2014). In some countries (e.g. the Netherlands, USA) HPV testing has already been implemented in screening. Infection with one of the high-risk HPV strains is the prerequisite for the development of cervical cancer. Therefore, HPV screening has high sensitivity. It lacks, however, specificity, since most women infected with HPV will clear such an infection without symptoms. Therefore, HPV-based cervical cancer screening only makes sense with the availability of triage methods that allow the detection of precancerous lesions and cancer cases among women tested HPV-positive (Wentzensen et al., 2015).

In this context, hypermethylation of certain DNA regions during the course of carcinogenesis may provide a promising tool for triage of a highly sensitive screening, which finds virtually all disease cases, but lacks specificity, as is the case if testing for HPV infection (Lorincz et al., 2013; Wentzensen et al., 2015). We have previously shown that detection of a DNA hypermethylation marker panel consisting of the five marker regions DLX1, ITGA4, RXFP3, SOX17, and ZNF671 may be a useful tool for triaging HPV-positive women (Hansel et al., 2014). Here we show that a molecular diagnostic test based on the marker regions ASTN1, DLX1, ITGA4, RXFP3, SOX17, and ZNF671, termed GynTect, which received CE IVD mark in October 2015, can easily be adapted for liquid-based cytology samples triage.

## Materials and Methods

### Informed consent

All samples utilized in this study were collected only after informed consent of patient was gained.

### Patient samples

Residual liquid-based cytology (LBC) samples from both, routine cervical cancer screening as well as more accurate diagnostics for further triage following an abnormal cytology result (Pap III or higher) were used for the study. The collection consisted of 60 screening samples from women with normal cytology (PapI), and 45 screening and triage samples from women with histopathology diagnosis CIN1/2 (14 samples), CIN3 (26 samples), and cervical cancer (5 samples). All samples were collected in PreservCyt medium (Hologic).

For all samples cytology results were available. For the samples with abnormal Pap smear finding histopathology results were available, classifying them into the different CIN stages.

### Sample preparation

For sample preparation and lysis the LBC samples were vortexed for a few seconds, and 1 ml of each sample were immediately transferred into 1.5-ml microcentrifuge vials. Cellular material was pelleted by centrifugation at 10,000 x g for 5 min, and the supernatant was removed carefully by pipetting. Pellets were then resuspended in 40 µl of sample lysis buffer (GynTect, oncgnotics), and incubated at 60°C for 30 min at 1,000 rpm in a thermoshaker (Thermomixer, Eppendorf).

### Bisulfite treatment and marker methylation analysis

Bisulfite treatment of cervical samples was performed using the EpiTect Fast Bisulfite Kit (Qiagen) following the supplier's manual. 40 µl of the cervical sample was directly used for bisulfite treatment without prior DNA isolation. After elution in 20 µl Elution Buffer, 70 µl of water was added, and 10 µl of the diluted DNA were used for each single reaction in the GynTect real-time methylation-specific PCR (qMSP) assay as described in the manual of the GynTect kit. The qMSPs were run on a ABI 7500 Real-Time PCR System (Life technologies, Thermo Scientific). Ct values for each marker and each internal control were recorded, and their validity was controlled by comparing the melting curve characteristics of each PCR fragment produced with corresponding positive controls. For such positive controls, which were included in each PCR run, DNA known to be methylated in the marker regions was used. A no template control using water as template was also included in each qMSP run. For evaluation, the difference of the Ct values of each marker with the internal control ACHE was calculated. qMSPs for ASTN1, DLX1, ITGA4, RXFP3 and SOX17 yielding a difference between sample and internal control  $\leq 9.0$  were scored positive, for ZNF671  $\leq 10$  was scored positive. A GynTect assay was scored positive, if the sum of the factors attributed to each marker was 0.5 or higher (**Table 1**).

## Results

For assessing methylation of the GynTect markers ASTN1, DLX1, ITGA4, RXFP3, SOX17, ZNF671 as well as the two internal marker regions ACHE and IDS an intercalating dye-based qMSP assay was performed for each of the 105 patient samples included in this study. The results obtained for the 60 samples from patients with a cytology result Pap I were the basis for setting the delta Ct value limit  $\leq 9$  for all markers but ZNF671, for which the delta Ct value limit was set to  $\leq 10$ .

**Table 1.** Factors and DeltaCt values for the GynTect markers

Marker	Delta Ct ACHE	Factor
ASTN1	$\leq 9$	0.2
DLX1	$\leq 9$	0.1
ITGA4	$\leq 9$	0.2
RXFP3	$\leq 9$	0.2
SOX17	$\leq 9$	0.2
ZNF671	$\leq 10$	0.5

To be scored valid, the Ct value for the control marker ACHE had to be below 32. At these settings, 59 of the 60 Pap I samples were scored negative for the GynTect test. This evaluation was then the basis for scoring the data obtained for the 45 CIN1+ samples.

All five carcinomas included in the study were scored GynTect-positive. Of the 26 samples with histopathology-confirmed CIN3, 16 (= 61.5%) turned out to be GynTect-positive, whereas of the 14 CIN1/2 samples seven (= 50%) were GynTect-positive (**Figure 1A**). When related to cytology findings, the following results were obtained for the CIN samples: of the 17 samples scored Pap III or Pap IIID in cytology, seven (= 41%) turned out to be GynTect-positive; of the 23 Pap IVa samples, 16 (= 69.6%) were GynTect-positive (**Figure 1B**).

## Discussion

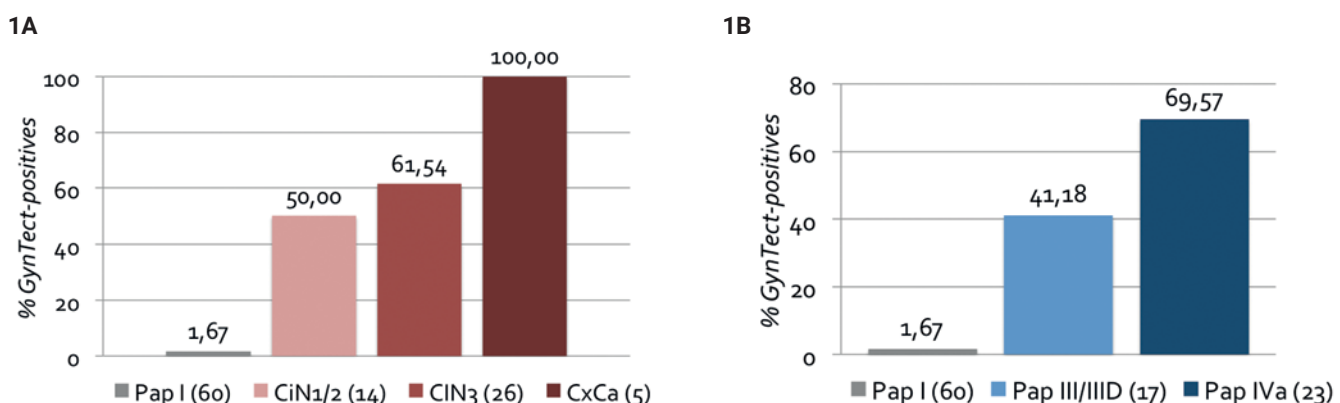
In previous studies we have shown that hypermethylation of CpG islands in proximity to the genes *DLX1*, *ITGA4*, *RXFP3*, *SOX17*, and *ZNF671* correlated with the presence of precancerous cervical lesions and cervical cancer (Hansel et al., 2014). The molecular diagnostic test GynTect based on these results allows the detection of these marker regions in cervical smears collected in the denaturing specimen transport medium (STM), which is originally used for QIAGEN's DIGENE HPV test. Utilization of this medium has, however, its limitations, the most important being that from STM only molecular test formats can be performed. In contrast, cervical smear material collected in liquid-based cytology media can be used more flexibly. As a main advantage, the cellular material preserved in this medium can be used for cytology as well as molecular biology tests. This enables the performance of triage tests from the same sample as the initial screening test, a feature which increasingly is demanded as prerequisite for diagnostics.

In this study we evaluated whether our molecular diagnostic test GynTect is suitable for using residual material from liquid-based cytology samples and such fulfils this prerequisite. GynTect provides the possibility to test if a woman who

obtained an abnormal cytology finding in the Pap smear and/or a positive HPV test result, has a precancerous lesion that requires follow-up and treatment. For this purpose we used samples for which the cytology findings and, for all Pap-abnormal samples, the histopathology results were available for comparison. GynTect showed an excellent performance, since for all 105 samples valid test results could be obtained. The results obtained for the two internal markers that are tested with each patient sample demonstrate this. In fact, the Ct values for these two internal markers obtained for all 105 LBC samples are much lower than those obtained for samples collected in STM, indicating better preservation of the DNA in these LBC samples. Due to the improved performance, a threshold for the marker Ct values in relation to the controls was set. Using a delta Ct threshold of 9 for the five markers *ASTN1*, *DLX1*, *ITGA4*, *RXFP3*, and *SOX17* as well as a delta Ct threshold of 10 for *ZNF671*, of the 60 samples with a normal cytology, Pap I, only one sample yielded a GynTect-positive result, implying that the test has a very good specificity within this group. A larger number of such samples will definitely have to be examined to confirm these results and this very high specificity of the test among healthy women.

As expected, all 5 cervical cancer samples included in the study were detected by GynTect, and that by at least four GynTect markers. This very high sensitivity for cancer cases was already shown previously (Hansel et al., 2014). A detection rate of >60% among the CIN3 samples examined also confirms results obtained in previous studies (Hansel et al., 2014). It is well-known that not all CIN3 lesions proceed to cervical cancer (McCredie et al., 2008), although these high-grade lesions are considered as precancerous stages. In several observational studies CIN2/3 short-term regression rates around 30% were reported (Trimble et al., 2005, 2010, 2015; Grimm et al., 2012). Very recently, Loopik et al. (2016) have demonstrated in a retrospective study that in women < 25 years the regression rate of CIN2 lesions was as high as 71% (150 of 211 women followed

**Figure 1.** Performance of the GynTect assay using PreservCyt samples. In total, residual material from 105 samples was used for the analysis. A. GynTect results compared to histopathology findings for the PreservCyt samples. B GynTect results compared to liquid-based cytology findings for all PreservCyt samples except for the cervical cancer samples. The bar graph in **Figure 1A** shows the percentage of the GynTect-positive samples in the categories "Pap I", "CIN1/2", "CIN3", and "CxCa", with the numbers of cases given in parentheses. The bar graph in **Figure 1B** shows the percentage of the GynTect-positive samples in the categories "Pap I", "PapIII/IIID", "PapIVa", with the numbers of cases given in parentheses.



after CIN2 diagnosis), and the overall progression rate in this study was very low (15%).

The data show that the GynTect score is related to the severity of the lesion confirmed by histopathology. In fact, the higher the CIN grade, the more GynTect markers are positive in the LBC samples. The only GynTect-positive CIN1 case, however, had a score of 1.2, so five of the six markers were positive, with rather low delta Ct values. In cytology this case was graded Pap IVa, which might imply that the biopsy in this

case was not taken at the punctum maximum of the lesion. Altogether, the correlation between cytology finding and GynTect result was even higher.

In conclusion, GynTect, a test which provides a triage option for either HPV-based or cytology-based cervical cancer screening, shows excellent results if performed on cervical scrape material in liquid-based cytology media, a prerequisite for employing such a test in new screening programs.

### REFERENCES

1. Anttila A, von Karsa L, Aasmaa A, et al. Cervical cancer screening policies and coverage in Europe. *Eur J Cancer* 2009; 45(15): 2649-58.
2. Grimm C, Polterauer S, Natter C, et al. Treatment of cervical intraepithelial neoplasia with topical imiquimod: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 2012; 120(1): 152-9.
3. Hansel A, Steinbach D, Greinke C, et al. A promising DNA methylation signature for the triage of high-risk human papillomavirus DNA-positive women. *PLoS One* 2014; 9(3): e91905.
4. Loopik DL, Doucette S, Bekkers RL, Bentley JR. Regression and Progression Predictors of CIN2 in Women Younger Than 25 Years. *J Low Genit Tract Dis* 2016; 20(3): 213-7.
5. Lorincz A, Castanon A, Wey Lim AW, Sasieni P. New strategies for human papillomavirus-based cervical screening. *Womens Health (Lond)* 2013; 9(5): 443-52.
6. McCredie MR, Sharples KJ, Paul C, et al. Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol* 2008; 9(5): 425-34.
7. Ronco G, Dillner J, Elfström KM. International HPV screening working group. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet* 2014; 383: 524-32.
8. Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015; 65(2): 87-108.
9. Trimble CL, Morrow MP, Kraynyak KA, et al. Safety, efficacy, and immunogenicity of VGX-3100, a therapeutic synthetic DNA vaccine targeting human papillomavirus 16 and 18 E6 and E7 proteins for cervical intraepithelial neoplasia 2/3: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2b trial. *Lancet* 2015; 386: 2078-88.
10. Trimble CL, Peng S, Thoburn C, Kos F, Wu TC. Naturally occurring systemic immune responses to HPV antigens do not predict regression of CIN2/3. *Cancer Immunol Immunother* 2010; 59(5): 799-803.
11. Trimble CL, Piantadosi S, Gravitt P, et al. Spontaneous regression of high-grade cervical dysplasia: effects of human papillomavirus type and HLA phenotype. *Clin Cancer Res* 2005 1; 11(13): 4717-23.
12. Wentzensen N, Schiffman M, Palmer T, Arbyn M. Triage of HPV positive women in cervical cancer screening. *J Clin Virol* 2016; 76(Suppl 1): S49-55.



**Kristin Eichelkraut, M. Eng.**  
Oncnostics GmbH  
Winzerlaer Strasse 2  
DE-07745 Jena



## World Leader in Acute Care Testing



**ABL800 FLEX**



**ABL90 FLEX**



**AQT90 FLEX**



**TCM CombiM/400/Tosca**



**1st AUTOMATIC**



**ABL**

- |                  |                   |       |                    |
|------------------|-------------------|-------|--------------------|
| pH               | cCl <sup>-</sup>  | cGlu  | ctHb               |
| cH <sup>+</sup>  | cCa <sup>2+</sup> | cLac  | sO <sub>2</sub>    |
| pCO <sub>2</sub> | cK <sup>+</sup>   | cCrea | FO <sub>2</sub> Hb |
| pO <sub>2</sub>  | cNa <sup>+</sup>  | ctBil | FCOHb              |
|                  |                   |       | FMetHb             |
|                  |                   |       | FHHb               |
|                  |                   |       | FHbF               |

**AQT**

- Troponin I, T
- CK-MB
- Myoglobin
- NT-proBNP
- CRP
- βhCG
- D-dimer
- PCT NOVINKA

**TCM**

- tcpO<sub>2</sub>
- tcpCO<sub>2</sub>
- SpO<sub>2</sub>
- Pulse rate

**RADIOMETER s.r.o.**

**zastoupení pro ČR a SR**

Křenova 3, 162 00 Praha 6, Tel.: +420 220 400 300  
 Email: office@radiometer.cz, Web: www.radiometer.cz

## Výskyt kmeňov *Streptococcus pneumoniae* pri zápalových ochoreniach horných dýchacích ciest detí v predškolskom veku a ich rezistencia na antibiotiká

RNDr. Gabriela Bertaová<sup>1</sup>, MUDr. Monika Czirfuszová, PhD.<sup>1</sup>, RNDr. Veronika Fekete<sup>1</sup>,  
MUDr. Eva Sinajová<sup>2</sup>, RNDr. Daniela Lacková, PhD.<sup>3</sup>, MUDr. Eva Csölleyová<sup>4</sup>,  
RNDr. Beáta Gottwaldová<sup>5</sup>, MUDr. Alica Sobotová<sup>6</sup>

Oddelenie bakteriológie, HPL spol. s r. o., Komárno<sup>1</sup>, Košice<sup>2</sup>, Levice<sup>3</sup>, Galanta<sup>4</sup>, Bratislava-Petržalka<sup>5</sup>, Topoľčany<sup>6</sup>

Cieľom našej práce bolo sledovať výskyt kmeňov *Streptococcus pneumoniae* vo výteroch z hrdla a z nosa u detí do 5 rokov pri akútnych zápaloch horných dýchacích ciest v regiónoch siedmich laboratórií HPL spol. s r. o., zistiť aktuálny stav ich citlivosti na antibiotiká podľa aktuálnych zásad EUCAST a vyjadriť podiel súčasného výskytu tejto baktérie s inými patogénmi alebo potenciálnymi patogénmi horných dýchacích ciest. Výskyt *S. pneumoniae* v sledovanej vekovej kategórii detí do 5 rokov rastie s vekom s najvyšším výskytom v skupine 3- až 5-ročných. Výnimkou je prešovský región, kde sme zaznamenali vyšší výskyt tejto baktérie u detí mladších ako 3 roky. V našom súbore sme zaznamenali rezistenciu/necitlivosť na fenoxymetylpenicilín, t. j. nepoužiteľnosť v ambulantnej liečbe v prípade 14 až 41 % testovaných kmeňov *S. pneumoniae*. Rezistencia na makrolidové antibiotiká sa v našom súbore pohybovala od 23 do 44 % a na linkozamidy od 14 do 33 %. Rezistencia na kotrimoxazol sa v našom súbore vyskytovala od 11 do 32 %. Z vybraných 100 kmeňov *S. pneumoniae* rezistentných na fenoxymetylpenicilín, makrolidy, linkozamidy a kotrimoxazol sme v kvantitatívnom teste citlivosti interpretovanom podľa aktuálnych zásad EUCAST hodnotili 57 % kmeňov ako rezistentných na ampicilín (amoxicilín). Porovnali sme interpretáciu výsledkov kvantitatívneho testu citlivosti na ampicilín (amoxicilín) vybraného súboru 100 kmeňov *S. pneumoniae* hodnotených podľa európskej normy EUCAST a americkej normy CLSI a zistili sme výrazný rozdiel vo výslednej interpretácii výsledkov.

**Kľúčové slová:** *Streptococcus pneumoniae*, rezistencia na antibiotiká, deti do 5 rokov, EUCAST

### *Occurrence of Streptococcus pneumoniae strains at inflammatory diseases of the upper respiratory tract of pre-school children and their resistance to antibiotics*

The aim of our study was to follow up the occurrence of *Streptococcus pneumoniae* in the swabs from throat and nose in children up to 5 years of age with acute inflammation of upper airways in regions of seven laboratories of HPL Ltd., to determine the actual state of their sensitivity to antimicrobials according to recent EUCAST guidelines and express the proportion of coincident occurrence with other pathogens or potential pathogens of the upper airways. The occurrence of *S. pneumoniae* in the studied age group of children up to 5 years increases with age with the highest incidence in a group of 3-5 year olds. The exception is Prešov region, where we have seen a higher incidence of this bacterium in children younger than 3 years. In our group we recorded resistance/non-susceptibility to phenoxymethylpenicillin e.g. uselessness in outpatient treatment in case of 14-41% of the tested strains of *S. pneumoniae*. Resistance to macrolide antibiotics in our group ranged 23-44%, and to lincosamides 14-33%. Resistance to co-trimoxazole in our group was 11-32 %. From the selected 100 strains of *S. pneumoniae* resistant to phenoxymethylpenicillin, macrolides, lincosamides, and co-trimoxazole were in quantitative sensitivity testing according to EUCAST 57% strains resistant to ampicillin (amoxicillin). We compared interpretation of the results of quantitative sensitivity testing of selected 100 strains of *S. pneumoniae* to ampicillin (amoxicillin) in accordance to EUCAST with criteria of american CLSI and we found out marked difference in the final interpretation of the results.

**Keywords:** *Streptococcus pneumoniae*, resistance to antimicrobials children up to age 5, EUCAST

NewsLab, 2017; roč. 8(1): 10 – 15

### Úvod

*S. pneumoniae* je baktéria ktorá často osídľuje sliznice horných dýchacích ciest. Z asymptomatickej kolonizácie sa však môže vyvinúť ochorenie dýchacích ciest ale aj invazívna infekcia. Nazofaryngálne nosičstvo pneumokokov je častejšie u malých detí, ktoré sú rezervoárom a vektorom tejto

baktérie pri jej horizontálnom šírení v komunite. Kolonizácia sliznice nazofaryngu potenciálne patogénnymi baktériami je dynamický proces ovplyvnený najmä stavom lokálnej slizničnej imunity, ale je podmienený aj vekom, genetickými a socioekonomickými faktormi. Nosičstvo pneumokokov v ekonomicky vyspelých štátoch rastie s vekom. Vo Fínsku Syrjänen

a kol.<sup>(1)</sup> zaznamenali výskyt *S. pneumoniae* u 13 % detí do 6 mesiacov a u 43 % detí vo veku nad 19 mesiacov. Zo socioekonomických a environmentálnych faktorov na frekvenciu kolonizácie vplyva najmä veľkosť rodiny, počet súrodencov, príjem rodiny, fajčenie a užívanie antibiotík. Pri kolonizácii má dôležitú úlohu ekosystém sliznice a vzájomné interakcie medzi mikroorganizmami na sliznici horných dýchacích ciest<sup>(2)</sup>. Je známe, že vírusová infekcia zvyšuje predispozíciu na bakteriálnu superinfekciu napr. pri chrípke býva ťažkou komplikáciou pneumokoková pneumónia<sup>(3)</sup>. Nielen pri chrípke, ale všeobecne pri infekciách spôsobených respiračnými vírusmi, ako napr. rinovírus, metapneumovírus, RSV, adenovírus, koronavírusy je vyššia predispozícia k bakteriálnej superinfekcii v dôsledku narušenia epitelovej bariéry vírusom, pre zvýšenie expresie adhezívnych proteínov viažucich potenciálne patogénne baktérie, a pre narušenie funkcie neutrofilov, NK buniek a monocytov<sup>(3)</sup>. Interakcie medzi najčastejšími podmienenými patogénmi kolonizujúcimi horné dýchacie cesty *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* a *Staphylococcus aureus* boli dokázané aj v experimentálnych podmienkach<sup>(4)</sup>. *S. pneumoniae* je mohutným producentom peroxidu vodíka. Ten pôsobí baktericídne aj na baktérie produkujúce katalázu (*S. aureus*, *H. influenzae*), enzým, ktorý rozkladá peroxid vodíka<sup>(5,6)</sup>. Iným mechanizmom vzájomnej interferencie medzi *S. pneumoniae* a *H. influenzae* je pôsobenie pneumokokovej neuraminidázy na povrchové sialové kyseliny *H. influenzae*, čím sa zabráni adhezii hemofila k sliznici<sup>(7)</sup>. Pravdepodobne najpriaznivejšie vzťahy sú medzi *S. pneumoniae* a *M. catarrhalis*. Perez a kol. v roku 2014<sup>(8)</sup> v štúdií vzťahov *S. pneumoniae* a *M. catarrhalis* v biofilmoch zistili, že v prítomnosti *S. pneumoniae* dochádza k množeniu kultúry *M. catarrhalis*. Tento fenomén je sprostredkovaný signálnou molekulou AI-2. *M. catarrhalis* svojou betalaktámázou poskytuje pasívnu ochranu pneumokokom proti betalaktámovým antibiotikám, preto je náročnejšia liečba koinfekcií týchto dvoch mikroorganizmov. *S. pneumoniae* je baktéria, ktorá v posledných štyridsiatich rokoch sa zaradila medzi terapeuticky problematické mikroorganizmy pre častú multi-rezistenciu na antibiotiká. Táto nepriaznivá vlastnosť je dôsledkom jej schopnosti rozpoznať, absorbovať a integrovať extracelulárne polydeoxy nukleotidy do svojich štrukturálnych génov. Prítomnosť dlhých cudzích DNA sekvencií v génoch pre proteíny viažuce penicilín (PBP), tzv. mozaicizmus, spôsobuje polymorfizmus proteínov PBP, ich zníženú afinitu k penicilínu a zmenenú štruktúru baktérií rezistentných na peptidoglykán. *S. pneumoniae* získava cudzie DNA sekvencie podmienujúce zníženú citlivosť až rezistenciu na penicilín od alfa-hemolytických streptokokov kolonizujúcich horné dýchacie cesty. Kmene rezistentné na penicilín sú často nositeľmi rezistencie aj na ďalšie skupiny antibiotík, ako sú makrolidy, linkozamidy, tetracyklíny, kotrimoxazol. Pneumokoky získavajú gény rezistencie aj od iných grampozitívnych (napr. stafylokoky, enterokoky) alebo od gramnegatívnych baktérií (napr. *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Neisseria spp.*, *Haemophilus spp.*)<sup>(9)</sup>.

Cieľom tejto publikácie je monitorovať výskyt kmeňov *S. pneumoniae* vo výteroch z tonzíl a z nosa u detí do 5 rokov pri akútnych zápaloch horných dýchacích ciest vo vybraných regiónoch Slovenska, zistiť jeho koincidenciu s inými patogénmi alebo potenciálnymi patogénmi horných dýchacích

ciest a prezentovať aktuálny stav ich citlivosti na testované antibiotiká podľa kritérií normy EUCAST.

## Materiál a metodika

Do súboru sme zaradili výtery z horných dýchacích ciest detí do 5 rokov veku s diagnózami akútneho zápalu horných dýchacích ciest, odobraté v období od 1. 3. 2014 do 31. 3. 2015. Výtery z tonzíl a z nosa odobrali ošetrojúci lekári na detoxikovaný tampón v transportnom médiu podľa Amiesa s aktívnym uhlím, ktoré boli transportované pri teplote 20 až 25 °C do laboratórií HPL spol. s r. o. v Komárne, Leviciach, Galante, Topoľčanoch, Prešove, Košiciach a Bratislave-Petržalke. Vzorky pochádzali od 115 804 pacientov z 13 okresov Západného Slovenska (Komárno, Levice, Nitra, Nové Zámky, Šaľa, Topoľčany, Zlaté Moravce, Dunajská Streda, Partizánske, Galanta, Bánovce nad Bebravou, Pezinok, Bratislava V) a zo 7 okresov Východného Slovenska (Košice, Michalovce, Trebišov, Prešov, Snina, Humenné, Sabinov). Výtery boli inokulované na krvný agar Columbia so 7 % baranej krvi a boli inkubované 18 až 20 hodín pri teplote 35 °C v mikroaerofilnom prostredí s 5 % CO<sub>2</sub>. Suspektné kolónie *S. pneumoniae* boli overené testom citlivosti na optochín (5 ug) a bola stanovená ich citlivosť na zostavu antibiotík – oxacilín (skrínigový disk), erytromycín, klindamycín, ofloxacín, tetracyklín, kotrimoxazol – diskovou difúznou metódou podľa pravidiel normy EUCAST<sup>(10,11)</sup>. Na testovanie citlivosti bol použitý agar podľa Muellera a Hintonovej s 5 % konskej krvi a s NAD (MHF), na ktorú bolo rovnomerne v troch na seba kolmých smeroch naočkované inokulum *S. pneumoniae* s hustotou 0,5 McF. Disky s požadovanou koncentráciou antibiotík boli umiestnené na povrch naočkovaného kultivačného média a následne boli inkubované v termostate s 5 % CO<sub>2</sub> pri teplote 35 °C 18 až 20 hodín. Citlivosť na penicilín a amoxicilín bola hodnotená na základe skrínigového testu betalaktámovej rezistencie *S. pneumoniae* skrínigovým diskom s obsahom 1 ug oxacilínu v súlade s normou EUCAST<sup>(10,11)</sup>. V prípade, že inhibičná zóna okolo skrínigového disku bola  $\geq 20$  mm, testovaný kmeň *S. pneumoniae* bol hodnotený ako citlivý na penicilín a amoxicilín. Pri veľkosti inhibičnej zóny 1 ug oxacilínu  $< 20$  mm, ale zároveň  $\geq 8$  mm je perorálny fenoxymetylpenicilín v liečbe klinicky neúčinný, testovaný kmeň bol hodnotený ako rezistentný na penicilín a citlivý na amoxicilín. Pri veľkosti inhibičnej zóny 1 ug oxacilínového disku  $< 8$  mm, použitie betalaktámového antibiotika v liečbe je možné len na základe výsledku kvantitatívnej citlivosti – MIC. Keďže náš súbor tvorili ambulanti pacienti v detskom veku, u ktorých sú betalaktámové antibiotiká pri infekciách horných dýchacích ciest liekmi voľby, na súbore 100 pacientov, z toho 85 pacientov s masívnym a 15 pacientov so stredne masívnym nálezom kmeňa *S. pneumoniae* v skrínigovom teste so zónou oxacilínu  $< 8$  mm a zároveň rezistentným na makrolidové, linkozamidové antibiotiká a kotrimoxazol sme stanovili MIC ampilínu (amoxicilínu) antibiotika, ktoré prichádza do úvahy v perorálnej liečbe. Kvantitatívnu citlivosť týchto kmeňov na ampilín (amoxicilín) sme stanovili pomocou E-testu. Suspenziu testovaného kmeňa s hustotou 0,5 McF sme naniesli na povrch kultivačného média MHF tak, ako pri diskovej difúznej metóde, s následným uložením prúžku E-testu obsahujúcim

gradient koncentrácií testovaného antibiotika ampicilínu. Takto pripravenú pôdu s E-testom sme inkubovali 18 až 20 hodín pri teplote 35 °C v prostredí 5 % CO<sub>2</sub> a následne sme odčítali hodnotu minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) podľa odporúčaní výrobcu<sup>(20)</sup>.

## Výsledky

Za sledované obdobie bolo v uvedených laboratóriách HPL spol. s r. o. analyzovaných spolu 115 804 výterov z horných dýchacích ciest od detí vo veku do 5 rokov. Tieto tvorili 50,76 % všetkých výterov z horných dýchacích ciest odobraťých od pacientov do veku 18 rokov. V **tabuľke 1** a na **grafe 1** uvádzame počet a percentuálny podiel výterov z horných dýchacích ciest s nálezom *S. pneumoniae* u detí do 5 rokov vek v regiónoch jednotlivých pracovísk HPL spol. s r. o. Na porovnanie v **tabuľke 2** uvádzame počet a percentuálny podiel nálezov *S. pneumoniae* v ostatnej časti detskej populácie (vek 6 až 18 rokov).

Najvyšší podiel *S. pneumoniae* u detí do 5 rokov veku sme zaznamenali v regióne laboratória v Topoľčanoch (14,09 %) a najnižší v regióne laboratória v Komárne (6,81 %). Výskyt *S. pneumoniae* u detí starších ako 5 rokov bol vo všetkých regiónoch výrazne nižší ako u detí do 5 rokov veku.

Najviac kmeňov *S. pneumoniae* bolo izolovaných v regióne laboratória v Bratislave-Petržalke a v prešovskom regióne (**graf 1**).

Počet a percentuálny podiel nálezov *S. pneumoniae* v jednotlivých vekových kategóriách detí do 5 rokov znázorňuje **tabuľka 3** a **graf 2**.

Výskyt *S. pneumoniae* pri infekciách horných dýchacích ciest v sledovanej vekovej kategórii detí do 5 rokov rastie s vekom s najvyšším výskytom v skupine 3- až 5-ročných. Výnimkou je prešovský región, kde sme zaznamenali vyšší výskyt tejto baktérie v skupinách detí do 1 roka a u 1- až 3-ročných.

Zaujímala nás aj koincidencia *S. pneumoniae* s ďalšími potenciálne alebo primárne patogénnymi baktériami pri zápaloch horných dýchacích ciest u detí do 5 rokov. Prehľad týchto nálezov uvádzame v **tabuľke 4**.

Najčastejší bol súčasný nález *S. pneumoniae* a *M. catarrhalis* (24,47 %), *S. pneumoniae* s *H. influenzae* sa vyskytovali spolu u 8,02 % pacientov a súčasný nález *S. pneumoniae* a *S. aureus* sme zaznamenali u 5,01 % pacientov. Súčasný výskyt s inými podmienenými patogénmi, resp. primárnymi patogénmi horných dýchacích ciest sme zaznamenali iba ojedinele.

**Tabuľka 1.** Počet a percentuálny podiel nálezov *S. pneumoniae* vo výteroch z horných dýchacích ciest u detí do 5 rokov podľa regiónov

Vek detí: do 5 rokov	Komárno		Levice		Galanta		Topoľčany		Košice		Prešov		BA-Petržalka	
Celkový počet výterov z HDC	11 976		11 656		21 329		12 737		10 864		17 214		30 028	
Počet a % nálezov <i>S. pneumoniae</i>	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%
	816	6,81	915	7,85	1 821	8,54	1 795	14,09	1 412	12,99	2 231	12,96	3 588	11,95

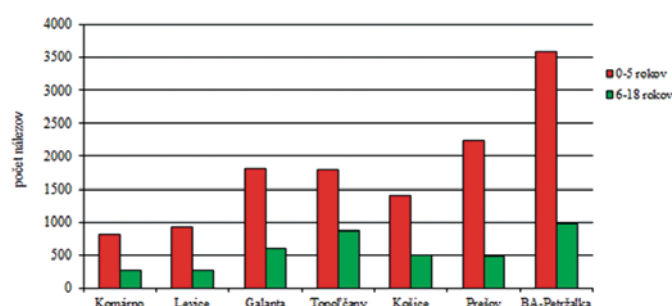
**Tabuľka 2.** Počet a percentuálny podiel nálezov *S. pneumoniae* vo výteroch z horných dýchacích ciest u detí vo veku 6 až 18 rokov podľa regiónov

Vek detí: 6 až 18 rokov	Komárno		Levice		Galanta		Topoľčany		Košice		Prešov		BA-Petržalka	
Celkový počet výterov z HDC	15 901		11 381		22 613		14 686		10 494		12 459		24 807	
Počet a % nálezov <i>S. pneumoniae</i>	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%
	272	1,71	271	2,38	604	2,67	878	5,98	503	4,79	472	3,79	979	3,95

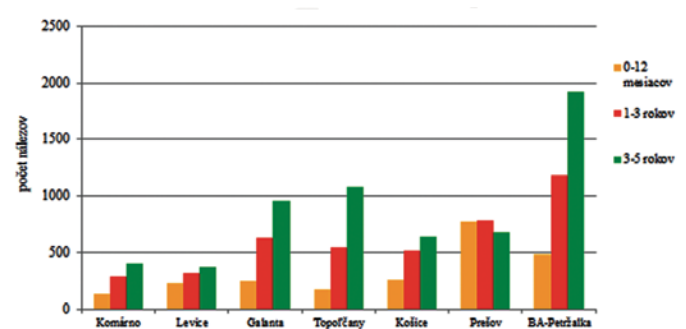
**Tabuľka 3.** Počet a percentuálny podiel nálezov *S. pneumoniae* v jednotlivých vekových kategóriách detí do 5 rokov

	Komárno		Levice		Galanta		Topoľčany		Košice		Prešov		BA-Petržalka	
	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%
0 – 12 mesiacov	133	1,11	229	1,96	243	1,14	176	1,38	261	2,4	770	4,47	486	1,62
1 – 3 roky	285	2,38	316	2,71	628	2,94	541	4,25	511	4,7	783	4,55	1 183	3,94
3 – 5 rokov	398	3,32	370	3,17	950	4,45	1 078	8,46	640	5,89	678	3,94	1 919	6,39

**Graf 1.** Porovnanie absolútnych počtov izolovaných kmeňov *S. pneumoniae* vo výteroch z horných dýchacích ciest u detí do 5 rokov a u detí 6- až 18-ročných podľa regiónov



**Graf 2.** Porovnanie absolútnych počtov izolovaných kmeňov *S. pneumoniae* v jednotlivých vekových kategóriách detí do 5 rokov



Tabuľka 4. Súčasný výskyt *S. pneumoniae* s inými podmienenými patogénmi horných dýchacích ciest u detí do 5 rokov

	Komárno		Levice		Galanta		Topoľčany		Košice		Prešov		BA-Petržalka		Celkom	
	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%
<i>Haemophilus influenzae</i>	22	2,69	19	2,07	22	1,21	134	7,46	188	13,31	220	9,86	404	11,26	1009	8,02
<i>Moraxella catarrhalis</i>	204	25,00	167	18,25	102	5,60	121	6,74	439	31,09	789	35,36	1257	35,03	3079	24,47
<i>Staphylococcus aureus</i>	41	5,02	45	4,92	79	4,33	125	6,96	69	4,89	119	5,33	152	4,24	630	5,01

Tabuľka 5. Rezistencia kmeňov *S. pneumoniae* izolovaných od detí vo veku do 5 rokov so zápalovými ochoreniami horných dýchacích ciest

	Komárno	Levice	Galanta	Topoľčany	Košice	Prešov	BA-Petržalka
Erytromycín	44 %	42 %	23 %	40 %	38 %	37 %	24 %
Klindamycín	33 %	32 %	21 %	27 %	26 %	21 %	14 %
Kotrimoxazol	19 %	21 %	11 %	28 %	23 %	32 %	16 %
Ofloxacin	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Penicilín	28 %	20 %	14 %	36 %	23 %	41 %	19 %
Tetracyklín	21 %	13 %	9 %	26 %	9 %	21 %	11 %

Prehľad rezistencie kmeňov *S. pneumoniae* izolovaných zo vzoriek horných dýchacích ciest detí do 5 rokov pri zápalových ochoreniach horných dýchacích ciest na testované antimikrobiálne látky uvádzame v **tabuľke 5**.

V našom súbore bolo 14 až 41 % kmeňov *S. pneumoniae* necitlivých na fenoxymetylpenicilín. V rezistencii na toto antibiotikum sme zaznamenali výrazný geografický rozdiel. Vo väčšine regiónov západného Slovenska bola táto rezistencia okolo 20 %, s výnimkou regiónu laboratória v Topoľčanoch, kde bol podiel kmeňov necitlivých na fenoxymetylpenicilín 36 %. Na východnom Slovensku bola miera necitlivosti kmeňov *S. pneumoniae* na fenoxymetylpenicilín v prešovskom regióne 41 %. Rezistencia na makrolidové antibiotiká sa v našom súbore pohybovala od 23 do 44 % a na linkozamidy od 14 do 33 %. Rezistencia na kotrimoxazol sa v našom súbore vyskytovala od 11 do 32 %. V prípade 100 vybraných kmeňov *S. pneumoniae* s rezistenciou na erytromycín, klindamycín, kotrimoxazol a s výsledkom skriningového testu betalaktámovej rezistencie svedčiaceho o nevhodnosti fenoxymetylpenicilínu v liečbe sme vykonali kvantitatívne stanovenie citlivosti na ampicilín (amoxicilín) E-testom. Na základe výsledku E-testu bolo 57 % testovaných kmeňov rezistentných (MIC > 2 mg/l) na ampicilín (amoxicilín), 34% intermediárne citlivých (MIC > 0,5 ≤ 2 mg/l) a iba 9 % testovaných kmeňov vykazovalo citlivosť (MIC ≤ 0,5 mg/l) na ampicilín (amoxicilín) podľa interpretačných kritérií normy EUCAST<sup>(10,11)</sup>.

## Diskusia

Nazofaryngálne nosičstvo *Streptococcus pneumoniae* je hlavným faktorom šírenia tejto baktérie v populácii. Prehľadné štúdie venujúce sa zmapovaniu výskytu tejto baktérie v populácii detí boli vykonávané najmä pred zavedením očkovania proti tejto baktérii s cieľom zistiť prevalenciu sérotypov v populácii. V našej štúdií sme sledovali výskyt *S. pneumoniae* u detí do 5 rokov s príznakmi infekcie horných dýchacích ciest na početnom súbore 115 804 pacientov. Keďže sérotypizácia kmeňov *S. pneumoniae* nie je súčasťou rutinnej mikrobiologickej diagnostiky a vykonáva sa iba v prípade kmeňov spôsobujúcich invazívnu infekciu alebo zápal stredného ucha, prehľad sérotypov nie je súčasťou našej práce. Naše výsledky môžeme porovnať s výsledkami podobnej štúdie ktorú vykonávali v Litve medzi februárom 2012 a marcom 2013<sup>(12)</sup>. Do štúdie zahrnuli celkovo 900 detí vo veku do 6 rokov s príznakmi

akútnej infekcie horných alebo dolných dýchacích ciest a ktoré neboli očkované proti pneumokokom. *S. pneumoniae* bol izolovaný z výterov horných dýchacích ciest u 367 detí, miera ich kolonizácie pneumokokom bola 40,8 %. Ferreira a kol. v roku 2001<sup>(13)</sup> sledovali výskyt *S. pneumoniae* v súbore 400 detí do 5 rokov s príznakmi rinofaryngitídy. Vzorky odoberali v období od júna 1997 do mája 1998 na detskej pohotovosti dvoch nemocníc v Sao Paule v Brazílii. Pneumokoka izolovali z nazofaryngu 139 detí, miera kolonizácie bola 34,8 %. V našom súbore sa vyskytoval nález *S. pneumoniae* v 10,86 % vzoriek detí do 5 rokov veku. Syrjanen a kol.<sup>(1)</sup> sledovali výskyt nosičských kmeňov *S. pneumoniae* u 329 detí vo veku 2 mesiacov až 2 roky, keď boli deti zdravé a následne aj pri prejavoch infekcie horných dýchacích ciest, resp. pri príznakoch akútneho zápalu stredoušia. Z 3 024 výterov z nazofaryngu odobratých od detí v bezpríznakovom štádiu zaznamenali prítomnosť *S. pneumoniae* v 649 vzorkách (21 %). U zdravých detí pozorovali zvyšovanie výskytu nosičstva *S. pneumoniae* vekom (9 % u 2-mesačných až 43 % u 2-ročných). Z 2007 výterov z nazofaryngu odobratých od detí sledovaného súboru v čase prejavov infekcie dýchacích ciest alebo akútneho zápalu stredoušia zaznamenali nález *S. pneumoniae* v 826 (41 %) vzorkách. V našom súbore sme tiež pozorovali postupný nárast výskytu *S. pneumoniae* s vekom, s výnimkou prešovského regiónu. Percentá výskytu v našom súbore sú však nižšie, možným vysvetlením je veľkosť súboru – v spomínanej publikácii bolo analyzovaných 3 024 výterov z horných dýchacích ciest zdravých a 2 007 výterov chorých detí, v našom súbore sme vyhodnotili výsledky 115 804 výterov z horných dýchacích ciest detí do 5 rokov veku s prejavmi akútnej infekcie horných dýchacích ciest. Celý rad dostupných štúdií bolo zameraných prevažne na zmapovanie výskytu *S. pneumoniae* v populácii bez príznakových detí v súvislosti s plánovaným zavedením očkovania proti tejto baktérii. Keďže tieto publikácie sa týkajú výskytu *S. pneumoniae* v súboroch zdravých detí, nie je úplne relevantné porovnávať ich výsledky s našimi výsledkami. Kumar a kol.<sup>(14)</sup> na súbore 190 bezpríznakových detí vo veku 3 mesiacov až 5 rokov sledovali nazofaryngálne nosičstvo *S. pneumoniae* v období od decembra 2010 do decembra 2011 v Bangalore (India). Pneumokoka izolovali u 53 zo 190 detí, čo predstavuje 27,9 %. Vo vekovej distribúcii výskytu pneumokokov sme zaznamenali značnú odlišnosť medzi výsledkami publikácie Kumar a kol. a našimi výsledkami. U nás bola prevaha výskytu

*S. pneumoniae* u detí vo vekovej kategórii 3- až 5-ročných, len v prešovskom regióne bol výskyt tejto baktérie najvyšší u detí mladších ako 3 roky. V publikácii Kumar a kol. uvádzajú najvyšší výskyt *S. pneumoniae* u detí vo veku 3 až 12 mesiacov (49,2 %). Podobná multicentrická štúdia bola vykonaná v Rumunsku v období od novembra 2011 do apríla 2013 v štyroch mestách na súbore 2 000 zdravých detí do 5 rokov veku<sup>(15)</sup>. *S. pneumoniae* izolovali z výterov z nazofaryngu 505 detí, nosičstvo pneumokoka v sledovanom súbore bola 25,25 %. Pozorovali nárast výskytu nosičstva *S. pneumoniae* vekom – 16,7 % u detí do 11 mesiacov a 29,4 % u detí 3- až 5-ročných. Zaujímavé sú vzájomné vzťahy potenciálne patogénnych baktérií a ich súčasný výskyt na sliznici horných dýchacích ciest<sup>(4,5,6,7,8)</sup>. V našom súbore sa tiež potvrdila častejšia koincencia *S. pneumoniae* a *M. catarrhalis* ako *S. pneumoniae* a ostatných potenciálne patogénnych mikroorganizmov. Súčasný nález *S. pneumoniae* s *M. catarrhalis* sa vyskytoval v 24,47 %, kým súčasný nález *S. pneumoniae* a *H. influenzae* sme pozorovali v 8,02 %. *S. pneumoniae* a *S. aureus* sa vyskytovali spolu v 5,01 % analyzovaných vzoriek. Uvedené skutočnosti jednoznačne svedčia o dôležitosti bakteriologickej kultivačnej analýzy vzoriek z horných dýchacích ciest aj v prípadoch, že pacient má spočiatku príznaky svedčiace o vírusovej etiológii. V prípade stredne masívneho a masívneho nálezu podmienene patogénnych baktérií je dôležité stanoviť citlivosť na antimikrobiálne látky, aby v prípade potreby bola možná cieleňá antibiotická liečba. V našom súbore sme do výsledkového listu uviedli rezistenciu/necitlivosť na penicilín, t. j. nepoužitelnosť perorálneho fenoxymetylpenicilínu u ambulantných pacientov v prípade 14 až 41 % testovaných kmeňov *S. pneumoniae*. V rezistencii na penicilín sme zaznamenali výrazný geografický rozdiel – vo väčšine regiónov Západného Slovenska bola táto rezistencia okolo 20 %, s výnimkou regiónu laboratória v Topoľčanoch, kde bol podiel kmeňov necitlivých na penicilín 36 %. Na Východnom Slovensku bola miera necitlivosti kmeňov *S. pneumoniae* na penicilín v prešovskom regióne 41 %. Podiel kmeňov necitlivých na penicilín v regiónoch Západného Slovenska (okrem Topoľčan) je porovnateľný s výsledkami podobných prác, v ktorých bol hodnotený antibiogram neinvazívnych kmeňov *S. pneumoniae* podľa aktuálnych zásad EUCAST. Ruskí autori Mayanskiy a kol. v roku 2013 publikovali výsledky rezistencie 863 neinvazívnych izolátov *S. pneumoniae* izolovaných z dýchacích ciest a zo stredoušia. Zaznamenali 28 % kmeňov necitlivých na penicilín<sup>(16)</sup>. Autori z Litvy analyzovali výtery z nazofaryngu 900 detí v predškolskom veku s akútnou infekciou horných dýchacích ciest. Zaznamenali 15,8 % kmeňov necitlivých na penicilín<sup>(12)</sup>. Rezistencia na makrolidové antibiotiká sa v našom súbore pohybovala od 23 do 44 % a na linkozamidy od 14 do 33 %. Rezistencia na kotrimoxazol sa v našom súbore vyskytovala od 11 do 32 %. Keď to porovnáme s výsledkami podobnej práce<sup>(12)</sup>, kde autori zaznamenali rezistenciu testovaných kmeňov *S. pneumoniae* u detí v predškolskom veku na erytromycín 21,3 %, na klindamycín 16,9 % a kotrimoxazol 27,3 %, môžeme pove-

dať, že u nás je miera rezistencie kmeňov *S. pneumoniae* izolovaných z horných dýchacích ciest detí s infekciami horných dýchacích ciest vyššia. Naše výsledky sú v súlade s výsledkami projektu MIKROMED, podľa ktorých už v prvom polroku 2014 bola rezistencia *S. pneumoniae* na makrolidové antibiotiká viac ako 30 %<sup>(17)</sup>. Nie je dobrá správa ani to, že zo 100 kmeňov rezistentných na fenoxymetylpenicilín so zónou oxacilínu < 8 mm, makrolidy, linkozamidy a kotrimoxazol bolo v kvantitatívnom teste citlivosti citlivých na ampicilín (amoxicilín) iba 9 %, intermediárne citlivých 34% a rezistentných 57%. Síce sme analyzovali iba 100 kmeňov *S. pneumoniae* rezistentných na antibiotiká ktoré by prichádzali do úvahy v perorálnej liečbe detí s akútnou infekciou horných dýchacích ciest, ale tieto predbežné výsledky poukazujú na to, že pri interpretácii MIC ampicilínu (amoxicilínu) podľa kritérií EUCAST by ani toto antibiotikum nebolo vhodné v liečbe. Zistili sme však, že pri interpretácii týchto výsledkov podľa kritérií americkej normy CLSI<sup>(18,19)</sup>, výsledky kvantitatívneho testovania citlivosti nami vybraných 100 kmeňov *S. pneumoniae* na ampicilín (amoxicilín) by boli oveľa priaznivejšie. Na základe interpretačných kritérií CLSI v nami otestovanom súbore 100 kmeňov *S. pneumoniae* by bolo 43% kmeňov citlivých na amoxicilín (MIC ≤ 2 ug/ml), 55% kmeňov intermediárne citlivých (MIC > 2 ug/ml < 8 ug/ml) a iba 2 % kmeňov by sme hodnotili ako rezistentné (MIC ≥ 8 ug/ml). Táto otázka však vyžaduje ďalšiu analýzu na väčšom súbore kmeňov po rutínnom zavedení kvantitatívneho testovania citlivosti *S. pneumoniae* na ampicilín (amoxicilín) v prípade kmeňov rezistentných na všetky ostatné antibiotiká, ktoré je možné podávať v detskom veku v perorálnej forme.

## Záver

Naša štúdia poukázala na potrebu prehodnotiť a bližšie analyzovať interpretačné kritériá kvantitatívneho testu citlivosti na ampicilín (amoxicilín) v prípade kmeňov izolovaných z výterov z horných dýchacích ciest detí ktorým *S. pneumoniae* spôsobuje opakované komplikácie zdravotného stavu s príznakmi akútneho zápalu horných dýchacích ciest a na základe testu citlivosti nie je iná vhodná alternatíva liečby. Keďže u týchto detí sa väčšinou jedná o nosičský stav, treba vždy individuálne prehodnotiť potrebu perorálnej antimikrobiálnej liečby, v menej závažných prípadoch stačí aplikácia antibiotík lokálne na sliznicu nosa, napr. neomycín s bacitracínom alebo ofloxacín. V prípade pretrvávania nosičstva *S. pneumoniae* môže byť riešením aj imunomodulačná liečba komerčná alebo individualizovaná, ktorá napomáha mobilizácii faktorov vrodenej imunity a zvládnutiu recidivujúcich zápalov horných dýchacích ciest komplikovaných podmienene patogénnymi baktériami.

## Podakovanie

Autori publikácie ďakujú za spoluprácu všetkým kolegom z pracovísk HPL uvedených v publikácii.

## LITERATÚRA

1. Syrjanen RK, et al. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Finnish children younger than 2 years old. *The Journal of Infectious Diseases* 2001; 184: 451-459.

2. Bogaert D, de Groot R, Hermans PWM *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *The Lancet Infectious Diseases* 2004; 4: 144-154.

3. McCullers JA, Insights into the interaction between influenza virus and pneumococcus. *Clinical Microbiology Reviews* 2006; 19: 571-582.
4. Astrid A, et al. Viral and Bacterial Interactions in the Upper Respiratory Tract. *Plos Pathogens* 2013; 9(1): e1003057.
5. Regev-Yochay G, et al. Is nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* protective against carriage of *Staphylococcus aureus*? 43rd ICCAC; Chicago; sept 14-17, 2003, abstr. G-2048.
6. Pericone CD, et al. Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by *Streptococcus pneumoniae* on other inhabitants of the upper respiratory tract. *Infection and Immunity* 2000; 68(7): 3990-3997.
7. Shakhnovich EA, King SJ, Weiser JN Neuraminidase expressed by streptococcus pneumoniae desialylates the lipopolysaccharide of *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae*: A paradigm for interbacterial competition among pathogens of the human respiratory tract. *Infection and Immunity* 2002; 70(12): 7161-7164.
8. Perez AC, Pang B, King LB, et al. Residence of *Streptococcus pneumoniae* and *Moraxella catarrhalis* within polymicrobial biofilm promotes antibiotic resistance and bacterial persistence in vivo. *Pathogens and disease* 2014; 70(3): 280-288.
9. Tomasz A. Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Clinical Infectious Diseases* 1997; 24(Suppl 1): S85-8.
10. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 4.0, valid from 2014-01-01, Dostupné na <http://www.eucast.org/>
11. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 5.0, valid from 2015-01-01, Dostupné na <http://www.eucast.org/>
12. Stacevičiene I, et al. Antibiotic resistance of *Streptococcus pneumoniae*, isolated from nasopharynx of preschool children with acute respiratory tract infection in Lithuania. *BMC Infectious Diseases* 2016; 16: 216.
13. Ferreira LM, et al. Nasopharyngeal colonisation and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolated from children with acute rhinopharyngitis. *Journal de Pediatria* 2001; 77(3): 227-234.
14. Kumar KLR, et al. Nasopharyngeal carriage, antibiogram & serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* among healthy under five children. *Indian J Med Res* 2014; 140: 216-220.
15. Luminos M, et al. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Romanian children before the introduction of the pneumococcal conjugated vaccination into the national immunization programme: a national, multi-centre, cross-sectional observational study. *International Journal of Infectious Diseases* 2014; 29: 169-173.
16. Mayanskiy N, et al. Serotypes and antibiotic resistance of non-invasive *Streptococcus pneumoniae* circulating in pediatric hospitals in Moscow, Russia. *International Journal of Infectious Diseases* 2014; 20: 58-62.
17. Líšková A. Racionálna antibiotická terapia respiračných infekcií. *Primárny kontakt* 2014; 2(6): 14-16.
18. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty fourth informational supplement, CLSI 2014; M100-S24
19. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty fourth informational supplement, CLSI 2015; M100-S25
20. Liofilchem® – MIC Test Strip Technical Sheet *Streptococcus pneumoniae* - MTS23 Rev.6

RNDr. Gabriela Bertaová

HPL spol. s r. o.

Oddelenie klinickej mikrobiológie

Mederčská 39, 945 01 Komárno

e-mail: bertaova@hpl.sk

**HERMES**  
Lab Systems

 **Agilent Technologies**  
Authorized Distributor

 **Dako**  
Agilent Pathology Solutions

## NOVÁ GENERÁCIA PORTFÓLIA Z OBLASTI GENOMIKY

Stačí si iba vybrať...



## Molekulárno-genetická charakterizácia kožných baktérií

Mgr. Iveta Gazdaricová

Katedra molekulárnej biológie, Univerzita Komenského v Bratislave

Kožné baktérie majú dokázateľný vplyv na zdravotný status hostiteľa. Všetky ľudské kožné baktérie tvoria so svojimi génmi unikátnu nadstavbu ľudského genómu. Vďaka detailným analýzám pozitívnych a negatívnych asociácií medzi baktériami kože a zdravím hostiteľa môže byť odhalené pozadie niektorých kožných ochorení spojených s kožnými baktériami vo väčšej či menšej miere. Tieto poznatky sme potenciálne schopní využiť pri prevencii a liečbe kožných chorôb pomocou alternatívnej cielenej génovej terapie. Na dosiahnutie tohto cieľa je nevyhnutné vykonať kompletnú molekulárnogenetickú analýzu nepatogénnych kožných baktérií a dokázať ich spojenie so zdravotným statusom hostiteľa. Avšak tieto bakteriálne druhy nie sú bežnými laboratórnymi druhmi a preto je nevyhnuté optimalizovať všetky postupy analýzy.

**Kľúčové slová:** kožný mikrobióm, molekulárnogenetická analýza baktérií, kultivácia nemodelových bakteriálnych druhov, izolácia DNA

### *Molecular genetic characterization of skin bacteria*

Human skin non-pathogenic bacteria have an evincible impact on a host's health condition. All of the human skin bacteria genes create a unique extension of the human genome. Due to the deep studying of positive and negative associations between skin bacteria and health status of an individual, it can be possible to detect a molecular background of some human skin disorders. Such knowledge would be potentially useful for prevention and treatment of skin diseases by targeted alternative gene therapy. To achieve this goal, it is necessary to perform a complete molecular-genetic analysis of human skin bacteria and to demonstrate their connection to human health status. Moreover, these are not bacteria species from the laboratory, so it is important to build up an optimal pipeline of handling wild human skin bacteria.

**Keywords:** skin microbiome, molecular genetic analysis of bacteria, cultivation of non-model bacterial species, isolation of DNA

NewsLab, 2017; roč. 8(1): 16 – 20

### Úvod

Najväčším orgánom ľudského tela je koža. Okrem svojej primárnej funkcie (fyzická bariéra medzi vonkajším a vnútorným prostredím tela, ochrana tela pred nebezpečnými látkami a cudzími škodlivými organizmami) je koža domovom pre nespočetné množstvo mikroorganizmov. Najväčšie zastúpenie majú baktérie. Spolu s hubami, vírusmi a malými eukaryotickými organizmami, ako sú roztoče, tvoria tzv. kožný mikrobióm.

Kožné baktérie boli a sú študované ako potenciálna príčina vzniku rôznych chorôb. Dnes však vieme, že mnohé z nich nemajú negatívny vplyv na zdravie jedinca či dokonca pozitívne ovplyvňujú hostiteľa. Bolo preukázané, že niektoré baktérie pozitívne ovplyvňujú imunitný systém hostiteľa tak, že dokážu imunitnú odpoveď modifikovať a dopĺňať. Napríklad dokážu zvyšovať efektívnosť T-buniek pri protizápalovej imunitnej odpovedi<sup>(16)</sup>.

Koža funguje ako osobitý ekosystém. Nachádza sa tu 1,8 m<sup>2</sup> rôznych habitatov, záhybov, invaginácií a výklenkov, ktoré zabezpečujú nepravidelnú kolonizáciu kože rôznymi bakteriálnymi druhmi. Zastúpenie bakteriálnych druhov závisí od toho, aké sú podmienky v jednotlivých lokalitách na koži. Rozlišujeme suché, vlhké a mastné miesta (**obrázok 1**). V oblastiach na koži, ktoré sú najviac vystavené vzduchu, prevláda kmeň *Proteobacteria*. Oblasti, kde sa nachádza najviac

mazových žliaz, ako je chrbát a tvár, kolonizujú najmä baktérie z kmeňa *Actinobacteria*. Miesta s najvyššou vlhkosťou, ako je chodidlo, sú pokryté hlavne baktériami z kmeňa *Firmicutes*. Okrem týchto kritérií sa množstvo a rozloženie baktérií menia aj počas rastu a dospievania jedinca, v závislosti od životosprávy a miesta života<sup>(2,9,10)</sup>.

Rovnováha medzi ľudskými kožnými bunkami a kožnými baktériami je veľmi dôležitá. Taktiež je nevyhnuté, aby sa zachovala rovnováha medzi bakteriálnymi druhmi navzájom. Tzv. spontánna necielená dysbalancia môže viesť až ku kožným ochoreniam. Necielenou dysbalanciou rozumieme zmenu v zastúpení kožných baktérií na určitom mieste na tele. Táto zmena môže byť vyvolaná vystavením kože nevhodným podmienkam, nevhodná životospráva alebo dysbalancia môže byť geneticky zakódovaná. Vedci sa snažia odhaliť dysbalanciu detailne a ak je to možné, spojiť ju s určitým ochorením. Dnes vieme, že napríklad ochorenie atopickej dermatitídy je spojené so znížením výskytu *Staphylococcus* a znížením celkovej diverzity kožných baktérií. Viac asociácií ochorenia s kožným mikrobiómom uvádza **tabuľka 1**<sup>(6,9,12)</sup>

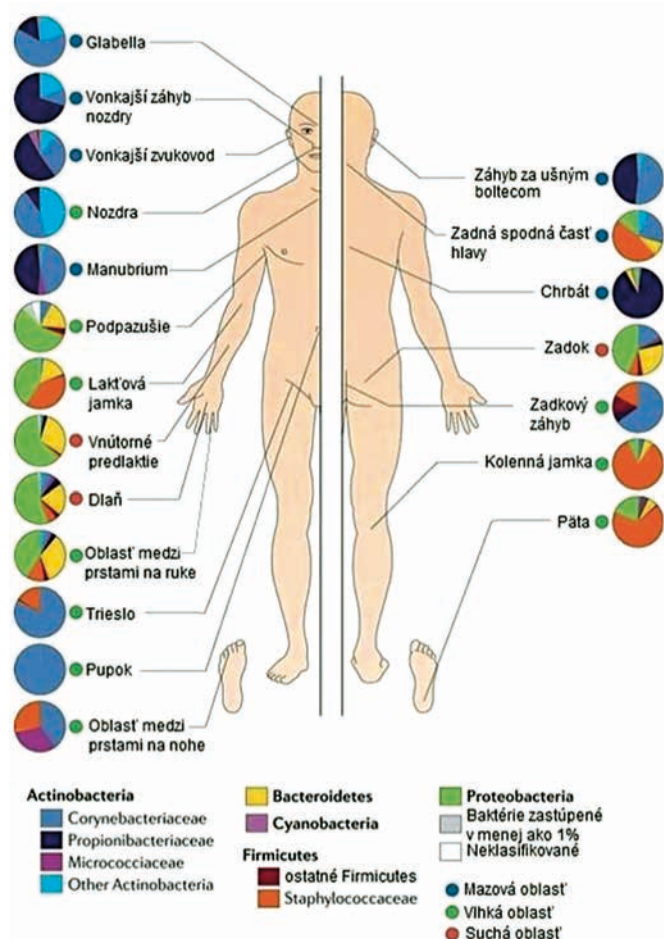
Cielená zmena mikrobiómu sa snaží využiť poznatky o poškodení rovnováhy na liečenie kožných ochorení. Ak budeme vedieť presnú príčinu kožného ochorenia a bude sa to týkať dysbalancie medzi kožnými bunkami a baktériami na koži, budeme vedieť navrhnúť najefektívnejšie liečenie



ochorenia. Pod cieľenou zmenou mikrobiómu sa skrývajú rôzne prístupy. Jednou z možností je genetická modifikácia kožných baktérií s cieľom zvýšiť tvorbu bakteriocínov, čo sa vykonáva najčastejšie klonovaním do bakteriálnych plazmidov z kožných baktérií, ktoré sa nachádzajú na koži pacienta. Ďalšou možnosťou je umelé zvýšenie počtu chýbajúcich druhov baktérií na určitom mieste na koži<sup>(10)</sup>.

Aby sme mohli pracovať s kožným mikrobiómom, musíme sa naučiť pracovať s kožnými baktériami nachádzajúcimi sa na koži pacienta. Keďže to nie sú laboratórne kmene, práca s nimi nie je triviálna. Je nutné nájsť najefektívnejší postup práce. Všetky postupy od spôsobu odberu cez spôsob kultivácie, izolácie genomickej a plazmidovej DNA, identifikácie bakteriálnych druhov a vyhľadávania bakteriálnych plazmidov a génov sú nevyhnuté optimalizovať.

**Obrázok 1.** Rozmiestnenie určitých druhov kožných baktérií na povrchu tela človeka



## Materiál a metodika

Na pokus boli použité stery z kože človeka (vnútorná strana predlaktia a lakťová jamka, 4 zdraví ľudia, každý zo spôsobu odberu bol vykonaný nasledujúci deň, požiadavky na hygienu odberového miesta boli rovnaké pre všetkých – sprchovať sa nami dodaným mydlom maximálne 24 hodín pred odberom) a stery z kože bezsrstej myši pomocou sterilnej vatovej tyčinky Swab plastic stem (Sarstedt, Numbrecht, Germany). Tá sa namáčala do siedmich rôznych roztokov (MBGW (molecular biology grade water), NaCl (chlorid sodný), Tween-20 (polysorbate 20), PBS (fosfátový pufer), SCF (colony stimulating factor), EtOH (etanol) a NaCl + Tween-20) a sledovali sa prípadné rozdiely. Baktérie boli po odbere vysiate na tuhé LB médium, kde bolo možné separovať jednotlivé bakteriálne druhy. Na namoženie baktérií bolo použité tuhé a tekuté LB médium, pričom sa pozoroval výťažok. Boli zvolené tri prístupy izolácie bakteriálnej genomickej DNA, ktorých efektívnosť bola porovnávaná. Bakteriálne druhy sa identifikovali pomocou Sangerovho sekvenovania. Bakteriálna plazmidová DNA bola izolovaná použitím dvoch izolačných kitov, ktoré boli porovnávané medzi sebou. Následne sa plazmidy identifikovali pomocou cieľných PCR esejí. Množstvo DNA sa v každom z uvedených prípadov meralo pomocou prístroja Qubit® 2.0 Fluorometer.

Na vyhodnotenie dát pri porovnávaní výsledkov bol využitý štatistický nepárový one-tailed t-test, ktorý porovnáva stredné hodnoty a je schopný porovnať dve variácie a pri hladine významnosti nami zvolenej (5 %) určí, či je rozdiel štatistiky významný, alebo nie je. Nepárový t-test bol zvolený z toho dôvodu, že jednotlivé namerané koncentrácie sa navzájom neovplyvňujú. Bola zvolená one-tailed analýza, lebo distribúcia koncentrácií bola iba v kladných hodnotách na osi X. Taktiež treba uviesť, že všetky dáta v rámci práce boli testované Shapirovým-Wilkovým testom na to, aby sa potvrdilo, že pochádzajú z normálneho rozdelenia. Všetky dáta mali charakter normálneho rozdelenia, takže bolo možné používať parametrické štatistické testy.

## Výsledky

### Optimalizácia spôsobu odberu baktérií z kože

Bola porovnávaná koncentrácia DNA, ktorá bola získaná použitím rôznych druhov roztokov. Do týchto roztokov bola namáčaná vatová tyčinka. Nulová hypotéza bola stanovená tak, že typ roztoku nemá vplyv na množstvo získanej bakteriálnej DNA. Výsledky sú uvedené **na obrázku 2 vľavo**.

P-hodnota vzájomného porovnávania rôznych druhov roztokov sa pohybuje nižšie od hodnoty 0,05. V jednom prípade dokonca pod úrovňou 0,01. Z výsledku vyplýva, že roztok NaCl + Tween 20 nie je vhodný na tento typ laboratórnej práce.

**Tabuľka 1.** Zmena kožného mikrobiómu asociovaná s niektorými bakteriálnymi druhmi

Ochorenie	Nájdená asociácia s kožným mfcrobiómom	Množstvo vzoriek
Akné vulgaris	Asociácia s baktériou <i>Propionibacterium acnes</i> <sup>(7)</sup>	49 chorých + 52 kontrol
Červienka	Zvýšenie výskytu baktérie <i>Demodex follicularum</i> <sup>(3)</sup>	50 chorých + 48 kontrol
Atopická dermatitída	Zvýšenie výskytu <i>Staphylococcus</i> a zníženie celkovej diverzity kožných baktérií <sup>(10)</sup>	12 chorých + 11 kontrol
Psoriáza vulgaris	Zvýšenie výskytu <i>Corynebacteria</i> , <i>Propionibacterium</i> , <i>Streptococcus</i> a <i>Staphylococcus</i> <sup>(1)</sup>	51 chorých + 51 kontrol
	Zvýšenie výskytu Firmicutes a Actinobacteria <sup>(8)</sup>	6 chorých
Lupiny	Zníženie výskytu <i>Staphylococcus</i> a <i>Propionibacterium</i> <sup>(5)</sup>	10 chorých + 12 kontrol
	Asociácia s hubami rodu <i>Malessezia</i> <sup>(4)</sup>	

Medzi ostatnými roztokmi sa nezistil žiadny významný štatistický rozdiel, takže výber roztoku neovplyvní výťažok bakteriálnej genomickej DNA.

## Kultivácia kožných baktérií

Testovalo sa, či konzistencia LB média a prítomnosť/neprítomnosť agaru má vplyv na výťažok bakteriálnej genomickej DNA. Bolo kultivovaných 13 nami získaných bakteriálnych druhov, ktoré bolo nutné namnožiť.

Nulová hypotéza bola stanovená tak, že typ kultivačného média nemá vplyv na výťažok DNA. Výsledky porovnávania sú uvedené na obrázku 2 vpravo.

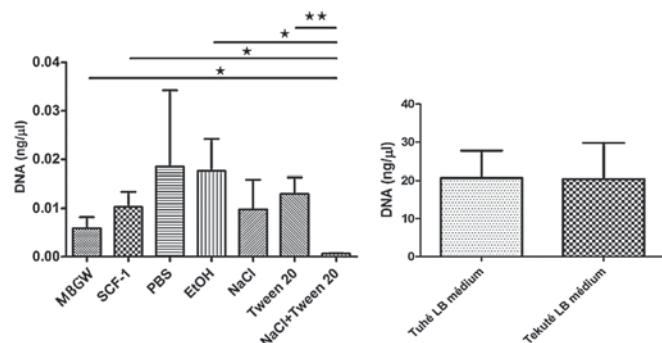
P-hodnota je na úrovni 0,4917, čo znamená potvrdenie nulovej hypotézy.

## Izolácia bakteriálnej genomickej DNA

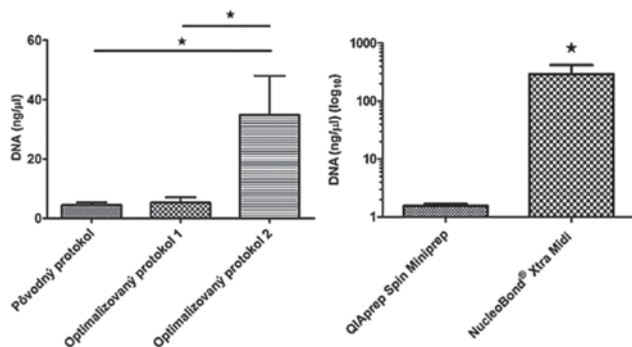
Experimentálne boli porovnávané tri postupy izolácie:

1. Izolačný kit QIAamp® DNA Mini kit 250;
2. 1. Optimalizovaný protokol izolačného kitu QIAamp® DNA Mini kit 250 (doplnenie pôvodného protokolu o teplotné šoky pred prvým krokom 5x striedanie 5 min 90 °C/5 min -20 °C);

**Obrázok 2.** – Vľavo – Výsledky porovnania závislosti použitého roztoku pri odbere baktérií od množstva získanej bakteriálnej DNA (★ –  $P < 0,05$ , ★★ –  $P < 0,01$ ). Vpravo – Porovnanie výťažku bakteriálnej DNA z baktérií kultivovaných na tuhom a tekutom LB kultivačnom médiu



**Obrázok 3.** Vľavo – Porovnanie výťažkov bakteriálnej genomickej DNA získanej použitím troch rôznych izolačných protokolov. Vpravo – Porovnanie výťažku bakteriálnej plazmidovej DNA použitím izolačných kitov DNA QIAprep Spin Miniprep kit a NucleoBond® Xtra Midi



3. 2. Optimalizovaný protokol (zmena oproti pôvodnému protokolu – pufo ATL bol nahradený lyzačným roztokom; bol pridaný roztok lyzozýmu, roztok RNázy; pred pridaním proteínázy K bola pridaná hodinová inkubácia pri 37 °C, po pridaní pufru AL bola pridaná 30-minútová inkubácia pri 55 °C a následne 30-minútová inkubácia pri 70 °C).

Vzájomné porovnávanie výsledkov demonštruje **obrázok 3 vľavo**. Nulová hypotéza bola stanovená tak, že typ protokolu nemá vplyv na množstvo izolovanej DNA. Výsledkom porovnania pôvodného protokolu s 1. optimalizovaným protokolom je P-hodnota na úrovni 0,3388. Porovnanie pôvodného protokolu s 2. optimalizovaným protokolom dáva P-hodnotu na úrovni 0,0150 a porovnanie 1. optimalizovaného protokolu s 2. optimalizovaným protokolom dáva P-hodnotu 0,0178. Možno teda povedať, že nulová hypotéza sa zamietá v prospech 2. optimalizovaného protokolu, s ktorým sme boli schopní izolovať najväčšiu koncentráciu bakteriálnej genomickej DNA.

## Identifikácia získaných bakteriálnych druhov pomocou Sangerovho sekvenovania

Bakteriálne druhy boli identifikované pomocou klasickej metódy Sangerovho sekvenovania 16S rDNA. Podarilo sa nám získať 12 rôznych bakteriálnych druhov – 7 zo sterov z kože človeka a 7 z kože myši, pričom dva druhy sa vyskytli aj u človeka aj u myši. Jednotlivé druhy sú uvedené v **tabuľke 2**.

## Izolácia bakteriálnej plazmidovej DNA

Zo všetkých nami získaných bakteriálnych druhov bolo vybratých šesť, z ktorých sa izolovala plazmidová DNA. Boli porovnané dva izolačné kity DNA QIAprep Spin Miniprep kit a NucleoBond® Xtra Midi. Výsledky sú demonštrované na obrázku 3 vpravo.

Nulová hypotéza bola tradične stanovená tak, že typ izolačného kitu nemá vplyv na množstvo izolovanej plazmidovej DNA. Hypotéza však bola vzhľadom na výsledky zamietnutá v prospech kitu NucleoBond® Xtra Midi.

**Tabuľka 2.** Získané bakteriálne druhy pomocou Sangerovho sekvenovania

Bakteriálny druh	Gramovo farbenie	Kmeň
<b>človek</b>		
<i>Staphylococcus lentus</i>	G+	Actinobacteria
<i>Staphylococcus sciuri</i>	G+	Firmicutes
<i>Micrococcus yunnanensis</i>	G+	Actinobacteria
<i>Staphylococcus cohnii</i>	G+	Firmicutes
<i>Klebsiella oxytoca</i>	G-	Proteobacteria
<i>Staphylococcus homini</i>	G+	Firmicutes
<i>Bacillus licheniformis</i>	G+	Firmicutes
<b>myš</b>		
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	G+	Firmicutes
<i>Micrococcus yunnanensis</i>	G+	Actinobacteria
<i>Staphylococcus aureus</i>	G+	Firmicutes
<i>Bacillus subtilis</i>	G+	Firmicutes
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	G+	Firmicutes
<i>Micrococcus luteus</i>	G+	Actinobacteria
<i>Staphylococcus hominis</i>	G+	Firmicutes

### Identifikácia prítomných plazmidov

Jedným zo spôsobov, ako vyhľadať a identifikovať prítomné plazmidy, je použitie cielených PCR esejí. Na tento experiment bol vybraný bakteriálny druh *Staphylococcus epidermidis*, v ktorom sa vyhľadávali potenciálne prítomné vlastné plazmidy. Bolo navrhnutých šesť párov primerov na šesť rôznych plazmidov. Následne bolo všetkých šesť potenciálnych PCR produktov nanesených na agarózový gél (**obrázok 4**).

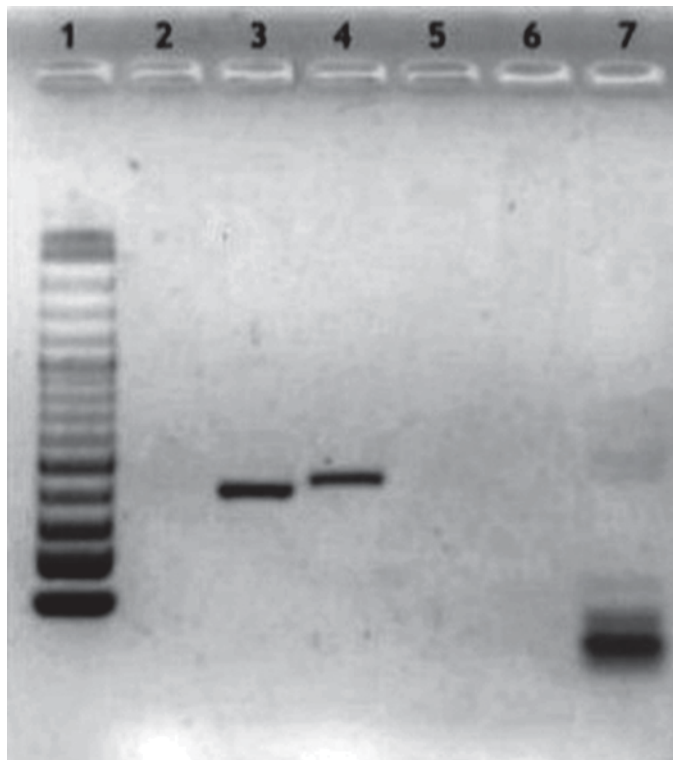
Cielenými PCR esejami bolo možné identifikovať dva plazmidy prítomné v línii nami získanej baktérie *Staphylococcus epidermidis*.

### Diskusia

Práca s baktériami, ktoré nie sú klasickými laboratórnymi kmeňmi, je veľmi náročná. Každý krok si vyžaduje práčne optimalizovanie. Avšak bez toho by sme sa v tejto oblasti nemohli posunúť ďalej, preto má toto úsilie veľký význam. V mojej práci sú sumarizované najvhodnejšie postupy molekulárnogentickej analýzy nepatogénnych nami získaných baktérií z kože. Bolo možné identifikovať najlepší postup práce.

Optimalizácia spôsobu odberu kožných baktérií bola východisková úloha pre ďalšie experimenty. Bolo vybratých sedem roztokov, do ktorých sa namáčala vatová tyčinka, na zvýšenie výťažku bakteriálnych buniek. Každá z látok má potenciál pozitívne ovplyvniť odber baktérií. Výsledky testovania vylúčili roztok NaCl + Tween 20, pretože sa preukázal ako

**Obrázok 4.** Separácia a vizualizácia PCR produktov získaných amplifikáciou špecifických úsekov rôznych plazmidov *Staphylococcus epidermidis* (popis dráh: 1 – Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA Ladder, 2 – primery 1 + 2, 3 – primery 3 + 4, 4 – primery 5 + 6, 5 – primery 7 + 8, 6 – primery 9 + 10, 6 – primery 11 + 12)



nehodný. Dôvodom môže byť rozdielna pH hodnota. Zatiaľ čo pH hodnota kože na predlaktí po 24 hodinách po sprchovaní a nepoužití žiadnych kozmetických prípravkov je od  $5,12 \pm 0,56$  do  $4,93 \pm 0,45^{(11)}$ , tak pH hodnota roztoku je 7,6. Medzi ostatnými látkami nebol štatisticky významný rozdiel. Na záver však bolo možné určiť MBGW ako najideálnejšiu látku, lebo s jej použitím sme získali najmenšiu odchýlku v meraní, má chemické zloženie bez najmenších odchýlok v rámci rôznych laboratórií, čím sa zabezpečí maximálna reprodukovateľnosť experimentu.

Živné médiá, ktoré sa používajú na kultiváciu baktérií, sa líšia svojím zložením a konzistenciou. Ak by sme potrebovali získať čo najviac bakteriálnych druhov, určite by sme zvolili rôzne pôdy, experimentovalo by sa so zložkami a testovali by sa selekčné médiá. V našom prípade bola zvolená klasická LB pôda, pomocou ktorej bolo možné získať dostatočné množstvo bakteriálnych druhov. Avšak experimentálne bolo zisťované, či konzistencia kultivačného média vplyva na výťažok bakteriálnej genomickú DNA. Nenašli sa žiadne signifikantné rozdiely medzi týmito dvoma prístupmi, preto možno povedať, že konzistencia média nemá vplyv na výťažok bakteriálnej DNA.

Ďalším krokom analýzy bola izolácia bakteriálnej genomickú DNA na následné určenie získaných bakteriálnych druhov. Na trhu sú dostupné rôzne izolačné kity, ktoré sa líšia svojou špecifickosťou na určité bakteriálne druhy, či schopnosťou izolácie grampozitívnych a gramnegatívnych baktérií. Na našom pracovisku sa dlhodobo osvedčil izolačný kit QIAamp® DNA Mini kit 250 od firmy Qiagen, preto bol zvolený ako východiskový, ktorý bol následne podrobený niekoľkým zmenám. Z výsledkov vyplýva, že optimalizácie viedli k zvýšeniu výťažku bakteriálnej DNA, preto boli uvedené do praxe.

Bakteriálne druhy boli identifikované pomocou sekvenovania 16S rDNA kódujúcej sekvencie. Táto sekvencia obsahuje vysokokonzervované úseky s vysokou medzidruhovou variabilitou, čo je dôvodom, prečo je táto sekvencia vhodná pri identifikácii bakteriálnych druhov<sup>(14,15)</sup>. Na tento konzervovaný úsek bolo navrhnutých niekoľko párov<sup>(13)</sup>, z ktorých boli pre túto štúdiu vybraté dva – 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGC-TCAG-3') a 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Výsledkom bola úspešná identifikácia trinástich bakteriálnych druhov, ktoré sú uvedené v **tabuľke 2**. Z nich bolo na základe určených vlastností (nepatogenita a výskyt na koži) vybratých šesť, z ktorých bola izolovaná plazmidová DNA. Z veľkej škály dostupných izolačných kitov boli vybraté dva kity, ktoré boli porovnávané. Na základe výsledkov sa ako lepší ukázal NucleoBond® Xtra Midi.

Cielená PCR esej je dobrým nástrojom na vyhľadávanie špecifických úsekov DNA vo vzorke. Práve týmto prístupom boli vyhľadávané bakteriálne plazmidy v našom experimente. Zo všetkých získaných druhov bol vybraný iba *Staphylococcus epidermidis* preto, že z druhov nami získaných má najviac opísaných vlastných plazmidov so známou sekvenciou. Navrhli sme šesť párov primerov na šesť plazmidov. PCR produkty boli nanesené na gélovú elektroforézu, na ktorej bola úspešne identifikovaná prítomnosť práve dvoch bakteriálnych plazmidov pUR3036 a pSK103.

### Záver

Na to, aby bolo možné uvažovať o cielej zmene kožného mikrobiómu, je potrebné najprv sa naučiť s nelaboratornými baktériami pracovať čo najlepšie a najefektívnejšie. Na to nám slúžia práve takéto experimenty, ktoré vymedzujú tie najlepšie metódy a postupy.

Plazmidy, ktoré boli týmto postupom získané, by mali byť následne analyzované a neskôr potenciálne využité pri

alternatívnej génovej terapii. Gén záujmu by sa mohol vkladať do tých plazmidov, ktoré by boli následne vložené späť do baktérie. Takto pozmenená baktéria by sa mala ďalej analyzovať a študovať jej potenciálne opätovné osídlenie hostiteľského organizmu s cieľom zdravotného benefitu pre človeka pri liečení kožných ochorení.

### LITERATÚRA

1. Alekseyenko AV, Perez-Perez GI, De Souza A. Community differentiation of the cutaneous microbiota in psoriasis. *Microbiome* 2013; 1(1): 31.
2. Baviera G, Leoni MCH, Capra L. Microbiota in healthy skin and in Atopic eczema. Hindawau Publishing Corporation, BioMed Research International 2014. ID 436921.
3. Casas C, Paul C, Lahfa M, et al. Quantification of Demodex folliculorum by PCR in rosacea and its relationship to skin innate immune activation. *Exp Dermatol* 2012; 21(12): 906-10.
4. Dawson TL. Malassezia globosa and restricta: Breakthrough understanding of the etiology and treatment of dandruff and seborrheic dermatitis through whole-Genome analysis. *J Invest Derm Symp* 2007; P12: 15-19.
5. Fahlen A, Engstrand L, Baker BS, et al. Comparison of bacterial microbiota in skin biopsies from normal and psoriatic skin. *Arch Dermatol Res* 2012; 304(1): 15-22.
6. Findley K, Grice EA. The Skin Microbiome: A focus on pathogens and their association with skin disease. *PLoS Pathogens* 2014; 10(11): 1004436.
7. Fitz-Gibbon S, Tomida S, Chiu BH. Propionibacterium acnes strain populations in the human skin microbiome associated with acne. *J Invest Dermatol* 2013; 133(9): 2152-2160.
8. Gao Z, Tseng CH, Strober BE, et al. Substantial alterations of the cutaneous bacterial biota in psoriatic lesions. *PLoS One* 2008; 3(7): 2719.
9. Grice EA. The skin microbiome: potential for novel diagnostic and therapeutic approaches to cutaneous disease. *Seminars in Cutaneous Medicine and surgery* 2014; vol 33.
10. Kong HH, Oh J, Deming C, et al. Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. *Genome Res* 2012; 22(5): 850-859.
11. Lambers H, Piessens S, Bloem A, Pronk H, Finkel P. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *Int J Cosmet Sci* 2006; 28(5): 359-70.
12. Tomida S, Nguyen L, Chiu B, et al. Pan-genome and comparative genome analyses of Propionibacterium acnes reveal its genomic diversity in the healthy and diseased human skin microbiome. *MBio* 2013; 4(3): 3-13.
13. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 1991; 173(2): 697-703.
14. Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1977; 74(11): 5088-5090.
15. Woo PCY, Lau SKP, et al. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Journal Compilation* 2008; 14(10): 908-934.
16. Zeeuwen P, Boekhorst J, van den Bogaard EH. Bacterial pathogenesis. *Microbiome dynamics of human epidermis following skin barrier disruption* 2012. kap.7.



**Mgr. Iveta Gazdaricová**

Katedra molekulárnej biológie  
Univerzita Komenského v Bratislave  
Ilkovičova ul. 6, 842 15 Bratislava  
e-mail: gazdaricova.iveta@gmail.com

## Pseudoglandulárny névus – zriedkavá morfológia melanocytového névu (case report)

MUDr. Andrea Janegová, PhD.<sup>1</sup>, MUDr. Pavol Janega, PhD.<sup>1,2,3</sup>, prof. MUDr. Pavel Babál, CSc.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav patologickej anatómie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

<sup>2</sup>MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o., Bratislava

<sup>3</sup>Ústav normálnej a patologickej fyziológie, Slovenská akadémia vied, Bratislava

Pseudoglandulárne zmeny sú veľmi zriedkavým fenoménom, ktorý môžeme nájsť v melanocytových léziách. Príčiny ich vzniku ani prípadný klinický význam doposiaľ nie sú úplne známe. Opísané sú najmä v prípadoch Spitzovej névu, môžu byť pozorované prakticky v ktorejkoľvek melanocytovej lézii. V súčasnosti sa predpokladá, že vznik pseudoglandulárnych formácií predstavuje skôr retrakčný artefakt pri fixácii a spracovaní tkaniva. Za určitých okolností však tento nález môže byť zavádzajúci a môže predstavovať diferenciálnodiagnostický problém pre hodnotiaceho patológa, vyžadujúci použitie doplňujúcich imunohistochemických farbení.

**Kľúčové slová:** melanocytový névus, pseudoglandulárne zmeny, etiológia, klinický význam

### *Pseudoglandular nevus – rare morphology of melanocytic nevus (case report)*

Pseudoglandular change is a very rare phenomenon to be found in melanocytic lesions. The causes or potential clinical relevance of these changes are not yet fully clarified. Although they are described particularly in Spitz nevi. Virtually, they can be observed in any melanocytic lesions. At present it is believed that the pseudoglandular formations represent rather a retraction artifact due to tissue fixation and processing. However this finding can be misleading and may pose a differential-diagnostic problem for the evaluating pathologist, requiring the use of additional immunohistochemical staining.

**Keywords:** melanocytic nevus, pseudoglandular changes, aetiology, clinical significance

NewsLab, 2017; roč. 8(1): 21 – 24

### Úvod

Melanocytové névy sú časté benígne kožné lézie. Aj keď ich morfológia môže byť variabilná, tvorba štruktúr podobných žľazám je v melanocytových névoch zriedkavý fenomén. V odbornej literatúre sú uvedené prevažne prípady, ktoré sa dávajú do súvislosti so Spitzovou névom<sup>(1-3)</sup>. Príčina vzniku týchto morfológických zmien aj ich klinický význam nie sú jednoznačne známe. V diagnostickej praxi patológa môže byť výskyt pseudoglandulárnych štruktúr v melanocytovej lézii zavádzajúci a v konečnom dôsledku sťažiť správnu diagnostiku chorobného procesu.

Uvádžame prípad tohto zvláštného variantu intradermálneho epiteloïdného névu s tvorbou pseudoglandulárnych štruktúr u mladej ženy na koži vonkajších genitálií.

### Vlastný prípad

35-ročná žena bola vyšetrená s nálezom sivo-ružového ostro ohraničeného bradavicovitého tumorózneho útvaru veľkosti 8 mm na pravom veľkom pysku. Bola vykonaná excízna biopsia lézie s následnou histologizáciou. Léziu tvorilo v podkoží lokalizované jedno väčšie ložisko a početné menšie uzly prevažne polygonálnych až epiteloïdných buniek (**obrázok 1**), často s tvorbou centrálnych, rôzne tvarovaných cysticky prázdnych priestorov pripomínajúcich žliazky (**obrázok 2**). Smerom

do hĺbky boli bunky usporiadané do tenkých pruhov až jednotlivu roztrúsené. Bunky mali stredne objemnú eozinofilnú cytoplazmu s uniformnými jadrami bez výrazných jadierok, bez atypii, bez mitóz. Ojedinele bunky vykazovali pigmentáciu. Na jednom mieste bola zachytená junkčná aktivita.

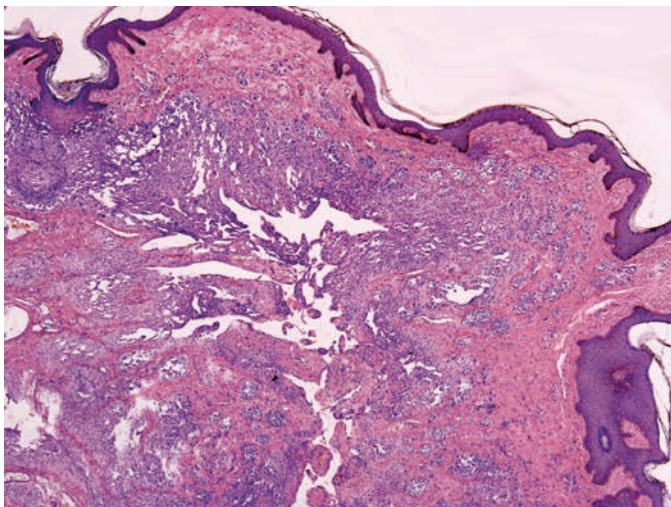
Imunohistochemické vyšetrenie preukázalo expresiu proteínu S-100 a melanA (**obrázok 3-4**) v epiteloïdných bunkách lézie. Tieto bunky boli negatívne na pancytokeratíny (AE1/3) a epiteloïdny membránový antigén (EMA). Expresiu CD34 vykazovali iba cievy podkožia (**obrázok 5**). Proliferačná aktivita lezionálnych buniek bola veľmi nízka (Ki67 < 1 %, **obrázok 6**).

Definitívna diagnóza bola stanovená ako intradermálny epiteloïdný névus so pseudoglandulárnou morfológiou.

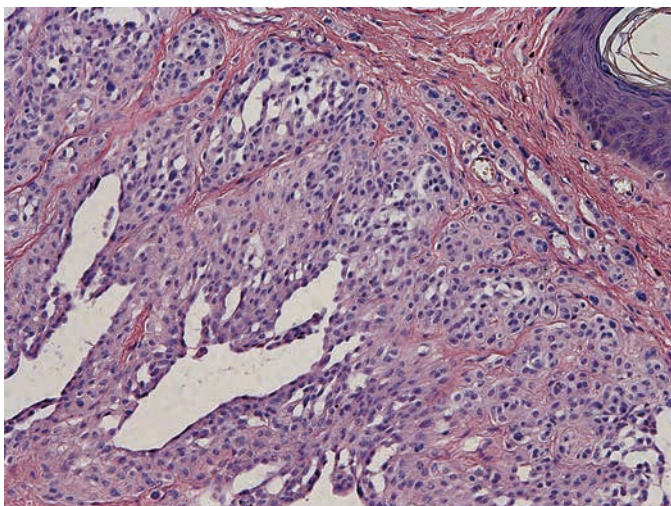
### Diskusia

Glandulárna diferenciácia je typickou črtou najmä epiteloïdnych nádorov. Melanocyty nemajú schopnosť tvoriť pravé žľazové štruktúry. Výskyt pseudoglandulárnych zmien je v melanocytových léziách zriedkavou črtou. Tvorbu tubulov a cystických priestorov v epiteloïdnom dermálnom néve ako prví opísali Burg a spol.<sup>(1)</sup>, ktorí túto léziu označili ako „tubulárny epiteloïdný névus“, a považovali ho za variant Spitzovej névu. Neskôr boli opísané ďalšie prípady s výskytom pseudoglandulárnych zmien. Práve Spitzovej névus sa

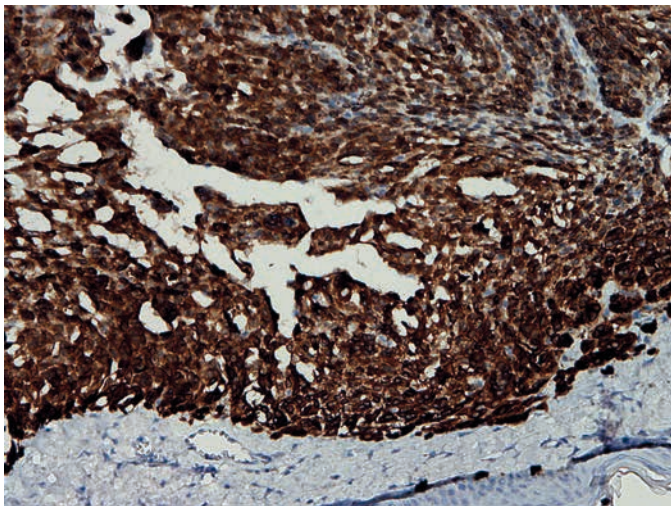
**Obrázok 1.** Pseudoglandulárny névus tvorilo jedno väčšie ložisko a drobné menšie uzly prevažne polygonálnych až epitelioidných buniek, HE, 25x



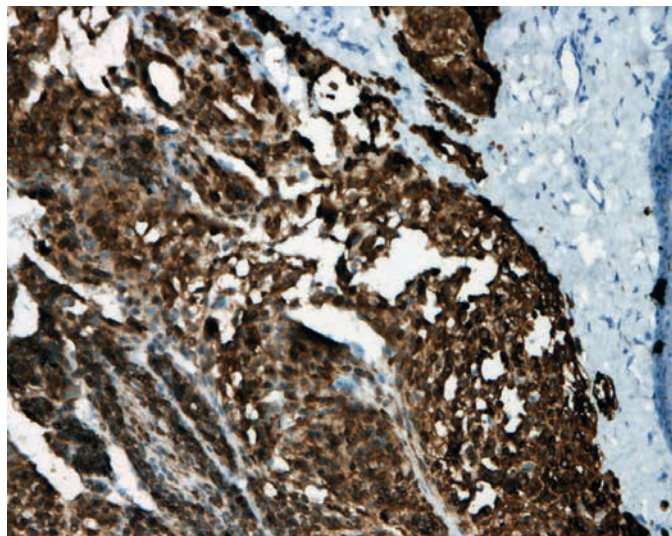
**Obrázok 2.** V néve dominoval nález tvorby centrálnych, rôzne tvarovaných cysticky prázdnych priestorov pripomínajúcich žliazky, HE, 100x



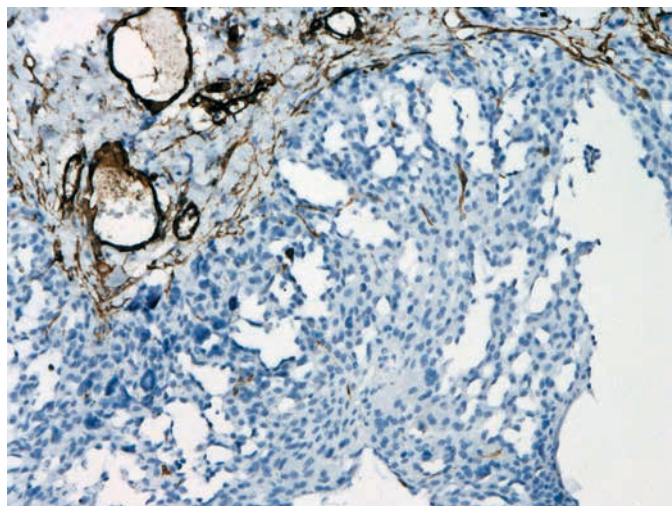
**Obrázok 3.** Pseudoglandulárny névus. Prítomná bola pravidelná a silná pozitivita S100, IHC, Ab-Poly-HRP, 100x



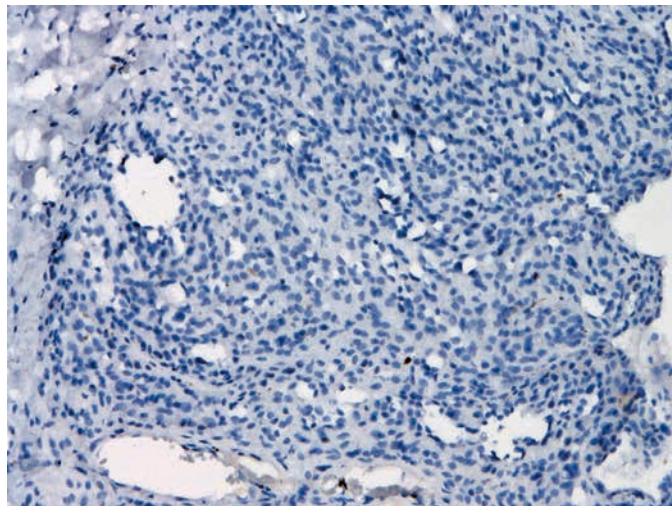
**Obrázok 4.** Pseudoglandulárny névus. Prítomná bola pravidelná a silná pozitivita MelanA, IHC, Ab-Poly-HRP, 100x



**Obrázok 5.** Pseudoglandulárny névus. Névvové boli CD34 negatívne, pozitivitu vykazovali iba cievy podkožia. CD34, IHC, Ab-Poly-HRP, 100x



**Obrázok 6.** Proliferačná aktivita buniek pseudoglandulárneho névu bola veľmi nízka. Ki67, IHC, Ab-Poly-HRP, 100x



v odbornej literatúre najčastejšie spomína v súvislosti so vznikom pseudoglandulárnych formácií<sup>(4,6)</sup>. Vzhľadom na prevažne epiteloidnú morfológiu a výskyt u mladého dospelého človeka niektoré naznačené spitzoidné rysy vykazuje aj nami prezentovaná lézia. Asociácia Spitzovej névu so pseudoglandulárnou morfológiou však nie je výhradná. Soyer a spol.<sup>(3)</sup> poukázali, že môže byť pozorovaná v oveľa širšom spektre melanocytových lézií vrátane dysplastických (Clarkových) névov. Pseudoglandulárny variant je známym a dobre opísaným, aj keď zriedkavým variantom malígneho melanómu<sup>(3,7)</sup>.

Histologicky je tvorba tubulov a cystických priestorov v melanocytových léziách skôr ložiskovou fokálnou zmenou. Len niektorí autori ich opisujú ako dominantnú črtu<sup>(1,2)</sup>, často až s tvorbou mikrocystických štruktúr. Aj v nami predloženom prípade bol výskyt pseudoglandulárnych zmien poprednou črtou lézie tvorenej prevažne epiteloidnými bunkami, bez výraznejších atypií alebo mitóz.

Nie je známa asociácia medzi výskytom pseudoglandulárnych zmien a vekom, resp. pohlavím pacientov. V literatúre opísané prípady majú široký vekový rozptyl. Tento nález nesúvisí ani s lokalitou výskytu lézie. Sú opísané prípady na horných<sup>(2,8)</sup> aj dolných končatinách<sup>(1)</sup>. Výskyt v oblasti vonkajšieho genitálu z literatúry známy nie je.

Predpokladá sa, že v melanocytových léziách je vznik pseudoglandulárnych formácií spôsobený najpravdepodobnejšie retrakčným artefaktom ako následok fixácie tkaniva formaldehydom. Zdá sa, že určité typy névov sú náchylné na tvorbu určitých artefaktov. Opísaný je výskyt pseudovaskulárnych štruktúr prevažne v polypoidných a verukózných névoch<sup>(9,10)</sup>. Ziemer a spol.<sup>(6)</sup> pozorovali výskyt rôznych druhov artefaktov podmienených fixáciou vo vyše 80 % skúmaných Spitzovej névov. Žľazové štruktúry pripomínajúce „prázdne priestory“ sa typicky vyskytovali, podobne ako v našom prípade, v névoch tvorených prevažne alebo aspoň čiastočne z epiteloidných buniek.

Vznik tubulárnych štruktúr v melanocytových léziách môže byť spôsobený aj apoptózou centrálnych buniek v hniezdach melanocytov<sup>(1)</sup>. Sledovaním apoptotických zmien v súbore Spitzovej névov však Ziemer a spol.<sup>(6)</sup> túto možnosť skôr vylučujú. Autori sa sústredili práve na možnú úlohu apoptózy a vo svojej štúdii nezistili prítomnosť apoptotických buniek v oblasti pseudoglandulárnych štruktúr a imunohistochemicky ani geneticky nepreukázali zvýšenú aktiváciu apoptózy pri porovnávaní melanocytových lézií so pseudoglandulárnymi štruktúrami a bez nich. Prítomnosť apoptotických figúr sme v nami opísanom prípade nepozorovali ani my.

Podľa ďalšej teórie by mohla byť tvorba útvarov podobných žľazám prejavom diferenciácie smerom k neurálnym štruktúram. Kantrow a spol.<sup>(5)</sup> opísali Spitzovej névus s tvorbou štruktúr pripomínajúcich Homerove-Wrightove rozety. Iný prípad Spitzovej névu s tvorbou rozetovitých formácií, pripomínajúcich skôr „pravé ependymové rozety“, zdokumentoval Fujita spol.<sup>(8)</sup>. Ide však o špecifický typ zmien, ktorý sa morfológicky odlišuje od typických pseudoglandulárnych štruktúr.

Pseudoglandulárna morfológia môže predstavovať za určitých okolností diagnostický problém pre hodnotiaceho patológa. Prvotné diagnostické úvahy v nami prezentovanom prípade zahŕňali okrem „nezvyčajnej“ melanocytárnej lézie, nádor z kožných adnexov, metastázu adenokarcinómu alebo léziu vaskulárneho pôvodu. Imunohistochemické farbenie však jednoznačne preukázalo pozitívitu buniek na proteín S-100 a melanA, pri súčasnej negativite pancytokeratínov AE1/3, EMA a vaskulárneho markera CD34, a tak umožnilo vylúčiť ostatné diferenciálnodiagnostické možnosti. Blandná histológia, absencia atypií spolu s nízkou proliferáčnou aktivitou (Ki67 < 1 %) podporili diagnózu benígnej melanocytovej lézie.

Klinický význam nálezu pseudoglandulárnych zmien v melanocytových léziách nebol doposiaľ objasnený. Význam pre diagnostickú prax tkvie hlavne v zamedzení vzniku diagnostického omylu pri hodnotení bežných jednotiek s nezvyčajnými morfológickými zmenami.

## Záver

Výskyt pseudoglandulárnych štruktúr v melanocytových léziách je zriedkavou zmenou, treba však na túto možnosť pamätať predovšetkým v prípade rozsiahlej tvorby tubulárnych alebo cystických útvarov, keď nie sú zachované takmer žiadne typické hniezda névových buniek. Nepredpokladá sa, že by pseudoglandulárna premena mohla mať klinický význam, vzniká najpravdepodobnejšie ako retrakčný artefakt pri fixácii a spracovaní tkaniva.

## Podakovanie

Tento článok vznikol vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt „Dobudovanie multidisciplinárneho centra pre biomedicínsky výskum – BIOMEDIRES“, ITMS 26210120041, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

## LITERATÚRA

1. Burg, G., Kempf, W., Hochli, M., et al., 'Tubular' epithelioid cell nevus: a new variant of Spitz's nevus. J Cutan Pathol, 1998. 25(9): p. 475-8.
2. Uhlenhake, E.E., Smoller, B.R., Gardner, J.M., et al., Epithelioid melanocytic nevus with tubule and pseudoacini formation. J Cutan Pathol, 2015. 42(3): p. 213-6.
3. Soyer, H.P., Breier, F., Cerroni, L., et al., 'Tubular' structures within melanocytic proliferations: a distinctive morphologic finding not restricted to Spitz nevi. J Cutan Pathol, 1999. 26(6): p. 315-7.
4. Requena, C., Requena, L., Kutzner, H., et al., Spitz nevus: a clinicopathological study of 349 cases. Am J Dermatopathol, 2009. 31(2): p. 107-16.
5. Kantrow, S., Kalemeris, G.C., and Prieto, V., Spitz nevus with rosette-like structures: a new histologic variant. J Cutan Pathol, 2008. 35(5): p. 510-2.
6. Ziemer, M., Diaz-Cascajo, C., Kohler, G., et al., "Tubular Spitz's nevus" an artifact of fixation? J Cutan Pathol, 2000. 27(10): p. 500-4.
7. Tarlow, M.M., Nemlick, A.S., Rothenberg, J., et al., Pseudoglandular-type melanoma: a rare melanoma variant. J Cutan Pathol, 2008. 35(6): p. 588-90.
8. Fujita, Y., Aoyagi, S., Tsujiwaki, M., et al., Tubular spitz naevus mimicking eccrine spiradenoma. Acta Derm Venereol, 2014. 94(1): p. 114-5.
9. Collina, G. and Eusebi, V., Naevocytic naevi with vascular-like spaces. Br J Dermatol, 1991. 124(6): p. 591-5.
10. Sagebiel, R.W., Histologic artifacts of benign pigmented nevi. Arch Dermatol, 1972. 106(5): p. 691-3.



**MUDr. Andrea Janegová, PhD.**  
Ústav patologickej anatómie LF UK  
Sasinkova 4, 813 72 Bratislava  
e-mail: andi.janegova@gmail.com

# GUTTA

GUTTA Slovakia spol. s r. o. je obchodná spoločnosť zameraná na distribúciu, prenájom a servis špeciálnej zdravotníckej techniky a materiálu. Spoločnosť vznikla v januári 1997 a v súčasnosti jej patrí popredné miesto medzi obchodnými spoločnosťami na slovenskom, českom a maďarskom trhu v oblasti denzitometrie a mamografie.

Od roku 2014 sme začali s distribúciou špeciálneho zdravotníckeho materiálu a predajom špeciálneho testu, ktorý zisťuje agresivitu rakovinového nádoru prs na stanovenie optimálnej liečby. V roku 2016 sme začali s distribúciou laboratórneho spotrebného materiálu, ako odberné skúmavky, ihly a iné.

## MOLEKULÁRNA DIAGNOSTIKA

Systém Panther® od spoločnosti HOLOGIC je integrovaný systém pre testovanie nukleových kyselín. Detekcia RNA: HPV 16 18/45, Chlamydia trachomatis (CT), Neisseria gonorrhoeae (GC), Trichomonas vaginalis (TV), Mycoplasma genitalium, HIV-1 Quant, HCV Quant, HBV Quant, HSV 1 a 2, ZIKA (EUA). V príprave: Bacterial vaginosis, Candida.



## UZATVORENÉ / VÁKUOVÉ ODBEROVÉ SYSTÉMY

VACUSERA® vákuový systém na odber krvi a moču, odberové ihly, systém najvyššej kvality, pohodlia pacienta a vysoká úroveň bezpečnosti.



## LBC - CYTOLÓGIA

HOLOGIC ThinPrep® Integrated Imager a Imaging systém sú automatizované mikroskopy pre cytologické hodnotenie a sú navrhnuté na zobrazovanie gynekologických alebo negynekologických vzoriek.



## Výskyt betahemolytických streptokokov izolovaných z horných dýchacích ciest pacientov z okresov Komárno a Nové Zámky a ich rezistencia na antibiotiká

RNDr. Kristína Mózes, RNDr. Veronika Fekete, MUDr. Monika Czirfuszová, PhD.

Oddelenie klinickej mikrobiológie, HPL spol. s r. o., Komárno

Cieľom našej práce bolo sledovať výskyt betahemolytických streptokokov vo výteroch z horných dýchacích ciest pacientov s diagnózami akútneho zápalu horných dýchacích ciest v okresoch Komárno a Nové Zámky v období od 1. 1. 2014 do 31. 12. 2015. Počas tohto obdobia sme izolovali 3 900 (5,72 %) kmeňov betahemolytických streptokokov: 3 729 (5,47 %) z výterov hrdla a 171 (0,25 %) z výterov nosa. Vzájomný pomer betahemolytických streptokokov bol nasledujúci: 38,69 % *S. pyogenes*, 11,74 % *S. agalactiae*, 13,05 % betahemolytické streptokoky skupiny C a G, 4,80 % netypovateľné betahemolytické streptokoky a 31,72 % *S. anginosus group*. Streptokokové infekcie horných dýchacích ciest boli najčastejšie v jesenných a zimných mesiacoch, v jarných mesiacoch ich výskyt poklesol a v lete dosahoval najnižšie hodnoty. Najvyššiu vnímavosť na infekciu *S. pyogenes* sme zaznamenali v skupine detí vo vekovej kategórii 7 až 11 rokov, výskyt ostatných druhov betahemolytických streptokokov bol najvyšší u dospelých. Liekom voľby týchto infekcií (s výnimkou infekcií *S. agalactiae*) je naďalej fenoxymetylpenicilín, rezistencia na makrolidové a linkozamidové antibiotiká sa pohybuje od 15 do 43 %.

**Kľúčové slová:** betahemolytické streptokoky, tonzilitída, faryngitída, penicilín, makrolidy

### *The incidence of beta-haemolytic streptococci in swabs from the upper respiratory tract of patients in the districts Komárno and Nové Zámky and their resistance to antibiotics*

The aim of our study was to investigate the incidence of beta-haemolytic streptococci in swabs from the upper respiratory tract of patients with acute inflammation of the upper airways in the district Komárno and Nové Zámky from 1 January 2014 to 31 December 2015. During this period we isolated 3900 (5.72%) strains of beta-haemolytic streptococci: 3729 (5.47%) from throat swabs and 171 (0.25%) from nasal swabs. The relative proportion of beta-haemolytic streptococci was as follows: 38.69 % *S. pyogenes*, 11.74 % *S. agalactiae*, 13.05 % beta-haemolytic streptococci group C and G, 4.80 % non-typeable beta-haemolytic streptococci and 31.72 % *S. anginosus group*. Streptococcal infections of the upper airways were the most common in autumn and winter months, during the spring months their occurrence decreased and in summer their incidence was the lowest. The highest susceptibility to infection with *S. pyogenes* was recorded in the age group 7 to 11; the other types of beta-haemolytic streptococci were the highest in adults. The drug of choice for these infections (except *S. agalactiae* infections) remains phenoxymethylpenicillin, resistance to macrolides and lincosamides is between 15 and 43%.

**Keywords:** beta-haemolytic streptococci, tonsillitis, pharyngitis, penicillin, macrolides

**NewsLab, 2017; roč. 8(1): 25 – 29**

### Úvod

Akútne infekcie horných dýchacích ciest najmä v detskom veku sú najčastejším dôvodom preskripcie antibiotík v ambulancijnej starostlivosti. Väčšinu infekcií horných dýchacích ciest spôsobujú vírusy. Okrem vírusov približne 10 % všetkých prípadov spôsobujú baktérie. Z nich sú na významnom mieste betahemolytické streptokoky<sup>(1)</sup>. *Streptococcus pyogenes* je primárny patogén v horných dýchacích cestách, pri tonzilitíde alebo faryngitíde spôsobenej touto baktériou je antimikrobiálna liečba indikovaná vzhľadom na možné neskoré následky<sup>(2)</sup>. Netreba však podceňovať ani ostatné betahemolytické streptokoky, najmä zo skupiny C, pretože existuje reálne, síce pomerne nízke, riziko vzniku postinfekčnej glomerulonefritídy aj po infekcii týmito streptokokmi<sup>(2,9,10)</sup>.

Faryngitídu môže spôsobovať aj *Streptococcus agalactiae*<sup>(3,5)</sup>. Pri tejto infekcii však podľa súčasných poznatkov nehrozia neskoré následky. *Streptococcus anginosus group* sa vo všeobecnosti vyznačuje tvorbou abscesov, avšak subtyp *Streptococcus constellatus subsp. pharyngis* môže byť pôvodcom faryngitíd<sup>(4)</sup>. V súčasnosti je známe, že aj iní príslušníci betahemolytických streptokokov skupiny C patriacich do *S. anginosus group* majú podiel na ochoreniach sprevádzaných bolesťami hrdla<sup>(11)</sup>.

V tejto publikácii autori prezentujú výsledky sledovania výskytu betahemolytických streptokokov vo výteroch z horných dýchacích ciest pacientov z okresov Komárno a Nové Zámky so zápalovými diagnózami horných dýchacích ciest (J00-J06), odobratých a kultivačne analyzovaných

v laboratóriu HPL spol. s r. o., na prevádzke v Komárne v období 1. 1. 2014 až 31. 12. 2015. Bola sledovaná sezonalita, vekové rozloženie výskytu týchto baktérií a ich citlivosť na antibiotiká. Aj keď sú tieto baktérie (s výnimkou *S. agalactiae*) stále stopercentne citlivé na fenoxymetylpenicilín, v prípade kontraindikácie liečby penicilínom u detí je výber vhodného antibiotika často sťažený pre pomerne vysoký výskyt rezistencie týchto kmeňov na makrolidové antibiotiká.

## Materiál a metodika

Súbor vzoriek tvorili kmene betahemolytických streptokokov izolovaných z výterov hrdla a nosa pri akútnych infekciách horných dýchacích ciest (diagnózy J00-J06) od pacientov v období od 1. 1. 2014 do 31. 12. 2015 z okresov Komárno a Nové Zámky. Vzorky biologických materiálov odobrali ošetrojúci lekári na detoxikovaný tampón, ktorý po umiestnení do transportného média podľa Amies a s aktívnym uhlím bol v deň odberu transportovaný do laboratória HPL spol. s r. o., v Komárne. Výtery z horných dýchacích ciest boli očkované na krvný agar Columbia so 7 % baranej krvi v súlade so štandardnými postupmi HPL spol. s r. o. Naočkované kultivačné médiá boli inkubované 18 až 20 hodín pri teplote 35 °C v prítomnosti 5 % CO<sub>2</sub>. Po uplynutí lehoty inkubácie ich hodnotili laboratórni diagnostici a nálezy boli zaznamenané v laboratórnom informačnom systéme laboratória. Suspektné kolónie betahemolytických streptokokov boli izolované na kultivačnej pôde krvný agar č. 2 so 7 % baranej krvi. Pri identifikácii izolovaných betahemolytických streptokokov sme sa riadili morfológiou ich kolónií a testovali sme ich biochemické vlastnosti. Pri veľkosti kolónií suspektných betahemolytických streptokokov > 0,5 mm sme pokračovali v identifikácii testom PYR na dôkaz pyrolidonylarylamidázy, ktorý je z betahemolytických streptokokov pozitívny len pri *S. pyogenes*. Pri negatívnom PYR teste sme vykonali VP test (Vogesov-Proskauerov test) na detekciu acetoínu, ktorý býva pozitívny v prípade *S. agalactiae*, pri betahemolytických streptokokoch skupín C a G je však vždy negatívny. V prípade negatívneho PYR a VP testu pri betahemolytických streptokokoch s veľkosťou kolónií > 0,5 mm sme určili ich skupinovú príslušnosť podľa Lancefieldovej metódou latexovej aglutinácie. Suspektné kolónie *S. agalactiae* sme overili CAMP testom. V prípade betahemolytických streptokokov s veľkosťou kolónií < 0,5 mm sme vykonali VP test a v prípade

pozitivity sme ich zaradili do *Streptococcus anginosus group*. Sledovali sme výskyt prípadných atypických reakcií, vtedy sme vždy overili suspektné kolónie betahemolytických streptokokov mikroskopickým preparátom farbeným podľa Grama a zároveň sme vizuálne skontrolovali čistotu izolovanej bakteriálnej kultúry. Citlivosť kmeňov na antibiotiká sme testovali diskovou difúznou metódou podľa zásad EUCAST na kultivačnom médiu MHF – agar podľa Muellera a Hintonovej so 7 % konskej krvi a NAD. Testovali sme citlivosť kmeňov na penicilín (PEN), erytromycín (ERY), klindamycín (CLI), ofloxacín (OFL), tetracyklín (TET). Inhibičné zóny antibiotík PEN, ERY, CLI a TET sme hodnotili podľa zásad normy EUCAST<sup>(12)</sup>, inhibičnú zónu OFL sme hodnotili podľa americkej normy CLSI<sup>(14)</sup>. Spolu s testom citlivosti sme hodnotili aj diagnostický disk s obsahom 0,04 jednotiek bacitracínu, ktorý bol umiestnený na pôdu MHF spolu s diskami na antibiotickú citlivosť. Bacitracínový disk slúži ako skrínový test na dôkaz *S. pyogenes*, ktorý nerastie v okolí disku s bacitracínom (0,04 j.) Ostatné streptokoky bacitracín v nízkej koncentrácii tolerujú. Ak je priemer inhibičnej zóny okolo disku s 0,04 j. bacitracínu ≥ 10 mm, môže ísť o *S. pyogenes*, ak je priemer inhibičnej zóny ≤ 10 mm, je pravdepodobné, že ide o betahemolytický streptokok inej sérologickej skupiny.

## Výsledky

Za obdobie od 1. 1. 2014 do 31. 12. 2015 v laboratóriu HPL spol. s r. o., v Komárne sme vyšetrili celkovo 68 138 vzoriek z horných dýchacích ciest od pacientov s diagnózami akútneho zápalu horných dýchacích ciest, z toho 47 548 výterov hrdla a 20 588 výterov nosa. Izolovali sme 3 900 (5,72 %) kmeňov betahemolytických streptokokov: 3 729 (5,47 %) z výterov hrdla a 171 (0,25 %) z výterov nosa. Sledovali sme výskyt *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, betahemolytických streptokokov ostatných skupín a masívne nálezy podmienené patogénneho streptokoka *S. anginosus group* vo vzorkách z horných dýchacích ciest pacientov (**tabuľka 1**).

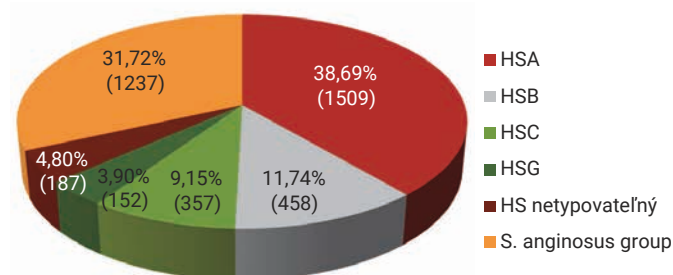
Rozloženie nálezov betahemolytických streptokokov v našom súbore znázorňuje **graf 1**.

Vo výskyte betahemolytických streptokokov sme zaznamenali výraznú sezonalitu. Streptokokové nákazy horných dýchacích ciest boli najčastejšie v jesenných a zimných mesiacoch, v jarných mesiacoch ich výskyt poklesol a v lete dosahoval najnižšie hodnoty. Výskyt betahemolytických

**Tabuľka 1.** Zastúpenie jednotlivých druhov betahemolytických streptokokov vo výteroch z hrdla a nosa pacientov s diagnózami akútneho zápalu horných dýchacích ciest

Druh streptokoka	Počet	%
<i>Streptococcus pyogenes</i> (HSA)	1 509	2,22
<i>Streptococcus agalactiae</i> (HSB)	458	0,67
Betahemolytický streptokok sk. C (HSC)	357	0,52
Betahemolytický streptokok G (HSG)	152	0,22
Betahemolytický streptokok (HS) netyповateľný	187	0,27
<i>S. anginosus group</i> (SANG)	1 237	1,82
<b>Spolu</b>	<b>3 900</b>	<b>5,72</b>

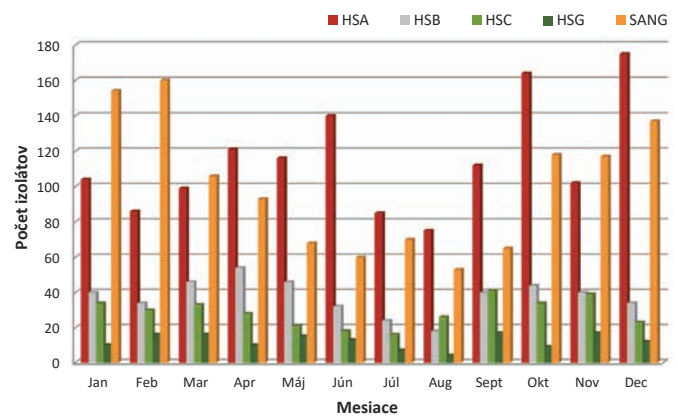
**Graf 1.** Vzájomný pomer druhov betahemolytických streptokokov



**Tabuľka 2.** Výskyt betahemolytických streptokokov v jednotlivých mesiacoch roka

Mesiace	Počet kmeňov	%
Január	365	9,36
Február	369	9,46
Marec	343	8,80
Apríl	332	8,51
Máj	280	7,18
Jún	284	7,28
Júl	220	5,64
August	183	4,69
September	273	7,00
Október	393	10,08
November	449	11,51
December	409	10,49
Spolu	3 900	100,00

**Graf 2.** Výskyt jednotlivých druhov betahemolytických streptokokov počas roka



**Tabuľka 3.** Vekové rozloženie pacientov s nálezom betahemolytického streptokoka

	< 6 rokov	7 – 11 rokov	12 – 15 rokov	16 – 19 rokov	> 19 rokov
HSA	188 (4,82 %)	644 (16,51 %)	214 (5,49 %)	131 (3,36 %)	332 (8,51 %)
HSB	71 (1,82 %)	67 (1,72 %)	40 (1,03 %)	87 (2,23 %)	193 (4,94 %)
HSC	41 (1,05 %)	63 (1,62 %)	35 (0,90 %)	45 (1,14 %)	173 (4,44 %)
HSG	22 (0,56 %)	23 (0,59 %)	13 (0,34 %)	22 (0,56 %)	72 (1,85 %)
HS	19 (0,49 %)	40 (1,03 %)	11 (0,28 %)	32 (0,82 %)	85 (2,18 %)
SANG	69 (1,77 %)	114 (2,93 %)	81 (2,07 %)	157 (4,03 %)	816 (20,92 %)

**Tabuľka 4.** Prehľad rezistencie betahemolytických streptokokov na antibiotiká

	Percento rezistencie betahemolytických streptokokov na ATB (%)				
	CLI	ERY	OFL	PEN	TET
HSA	15	16	0	0	8
HSB	35	36	4	-	69
HSC	25	25	0	0	8
HSG	35	41	0	0	16
HS	41	43	0	0	10
SANG	28	32	0	0	9

streptokokov v jednotlivých mesiacoch uvádzame v **tabuľke 2**. Sezónny výskyt jednotlivých druhov betahemolytických streptokokov je znázornený na **grafe 2**.

*S. pyogenes* (HSA) sa vyskytoval najčastejšie v období od októbra do decembra s vrcholom výskytu v novembri. Výskyt betahemolytických streptokokov sk. C a G kulminoval v jesenných mesiacoch, najmä v septembri a novembri. *S. agalactiae* sa vyskytoval prevažne v jarných, kým *S. anginosus group* v zimných mesiacoch.

Sledovali sme výskyt betahemolytických streptokokov aj v jednotlivých vekových kategóriách. Zistili sme najväčšiu vnímavosť na infekciu *S. pyogenes* u detí vo veku od 7 do 11 rokov, t. j. v mladšom školskom veku. Výskyt jednotlivých druhov betahemolytických streptokokov podľa vekových kategórií znázorňuje **tabuľka 3**.

Percentuálne zastúpenie rezistentných kmeňov na testované antimikrobiálne látky klindamycín (CLI), erytromycín (ERY), ofloxacin (OFL), penicilín (PEN), tetracyklín (TET) znázorňuje **tabuľka 4**.

## Diskusia

Betahemolytické streptokoky sú významnými pôvodcami bakteriálnych infekcií horných dýchacích ciest, z nich najvýznamnejší je *Streptococcus pyogenes*, primárny patogén, pôvodca bakteriálnej tonzilofaryngitídy. V literatúre sa uvádza, že *S. pyogenes* býva etiologickým faktorom tohto ochorenia v 5 až 17 % prípadov infekcie u dospelých<sup>(6)</sup> a v 20 až 30 % prípadov tonzilofaryngitídy u detí<sup>(7)</sup>. Tieto výsledky vyplývajú z cieľených štúdií založených na dôkladnom výbere pacientov na základe klinických príznakov. Keďže klinická symptomatológia streptokokovej tonzilofaryngitídy nie je vždy typická, do nášho štúdie sme zaradili všetkých pacientov, ktorí mali diagnózu akútneho zápalu v oblasti horných dýchacích ciest. V našom súbore sme zistili streptokokovú etiológiu u 5,72 % pacientov prejavujúcich príznaky akútneho zápalu horných dýchacích ciest s najvyšším podielom *S. pyogenes* (2,22 %). Bližšou analýzou výsledkov sme zistili, že táto baktéria sa podieľa na 38,69 % všetkých tonzilofaryngitíd vyvolaných betahemolytickými streptokokmi a najčastejšie sa vyskytuje u detí vo vekovej skupine 7 až 11 rokov, kde spôsobuje až 16,51 % faryngitíd streptokokovej etiológie.

Betahemolytické streptokoky iných skupín ako A, prevažne B, C a G môžu spôsobovať klinický obraz podobný ako pri tonzilofaryngitíde vyvolanej *S. pyogenes*. Tiemstra a kol.<sup>(8)</sup> vykonali retrospektívnu analýzu priebehu ochorenia 915 pacientov, ktorí navštívili praktického lekára pre bolesti hrdla s klinickými príznakmi streptokokovej faryngitídy. Hľadali zhodu alebo odlišnosti klinických príznakov v závislosti od druhu izolovaného betahemolytického streptokoka. Z 915 pacientov 63 % malo negatívny bakteriologický kultivačný nález, prítomnosť *S. pyogenes* potvrdili u 16 % pacientov,

betahemolytický streptokok sk. C bol izolovaný u 9 %, sk. B u 6 %, sk. G u 4 %, sk. F u 1 % a netyfovateľné betahemolytické streptokoky u 1 % pacientov. Zistili, že bolesť hlavy, zvýšená teplota, faryngálny exudát a krčná lymfadenopatia sú príznaky typické pri streptokokovej faryngitíde bez ohľadu na druh vyvolávateľa. Vekový priemer pacientov bol 26 rokov. V našom súbore dospelých pacientov sa tiež potvrdilo najvyššie percentuálne zastúpenie *S. pyogenes* pri faryngitídach streptokokovej etiológie (8,51 %). Betahemolytické streptokoky sk. B a C (4,95 %, 4,44 %) boli zastúpené približne v rovnakom pomere a sk. G bola dokázaná v nízkom percente (1,85 %). Faryngitídy spôsobené inými betahemolytickými streptokokmi ako *S. pyogenes* je odporúčané preliečiť antibiotikami v záujme skoršieho uzdravenia a pre zníženie rizika šírenia infekcie na ľudí v blízkosti pacienta. Osobitne dôležité je zamedziť šírenie infekcie v prítomnosti imunosuprimovaných ľudí, tehotných žien a novorodencov v domácnosti chorého<sup>(8)</sup>. V prípade betahemolytických streptokokov skupiny C existuje určité, síce veľmi nízke, riziko vzniku postinfekčnej glomerulonefritídy. V literatúre sa opisuje najmä v súvislosti s nálezom betahemolytického streptokoka skupiny C zvieracieho pôvodu *Streptococcus equi subspecies zooepidemicus* nielen po systémovej infekcii<sup>(9)</sup>, ale aj v súvislosti s nálezom vo výteroch z hrdla pacientov<sup>(10)</sup>. *S. anginosus group* je skupina betahemolytických streptokokov, ktorých niektorí príslušníci majú potenciál spôsobovať faryngitídu alebo stav spojený s bolesťami hrdla. V poslednom období využitím moderných metód molekulárnej biológie je snaha zrevidovať taxonómiu *S. anginosus group* s osobitným dôrazom na odlíšenie betahemolytických kmeňov patriacich do Lancefieldovej skupiny C, medzi ktorými sú pôvodcovia faryngitíd<sup>(11)</sup>. Keďže v podmienkach rutinných laboratórií nie je možnosť presnej druhej identifikácie izolovaných kmeňov *S. anginosus group* a stanovenie skupinovej príslušnosti je problematické z dôvodu slabého nárastu izolovaných kmeňov, do štúdie sme zaradili všetky masívne nálezy tejto skupiny betahemolytických streptokokov pri zápalových diagnózach horných dýchacích ciest. Najviac takýchto nálezov sme zaznamenali v skupine dospelých pacientov, kde tvorili 20,92 % betahemolytických streptokokov izolovaných od pacientov tejto vekovej skupiny.

Vo výskyte streptokokových infekcií horných dýchacích ciest sme zaznamenali sezonalitu s najčastejším výskytom v jesenných a zimných mesiacoch, s poklesom v jarných mesiacoch a s najnižším výskytom počas leta.

Betahemolytické streptokoky sú stále stopercentne citlivé na penicilín, v ambulantnej liečbe je perorálny fenoxyme-

tylpenicilín liekom voľby. Výnimkou je *S. agalactiae*, v prípade ktorého európska norma na testovanie citlivosti EUCAST neobsahuje interpretačné kritériá fenoxymetylpenicilínu, použitie tohto antibiotika v liečbe infekcií spôsobených *S. agalactiae* preto nie je odporúčané<sup>(12)</sup>. Vhodnejšie sú iné penicilínové antibiotiká alebo cefalosporíny 1. a 2. generácie. U pacientov alergických na penicilín v liečbe streptokokových infekcií sú alternatívnou voľbou makrolidové alebo linkozamidové antibiotiká, prípadne cefalosporíny 1. a 2. generácie. Nárast rezistencie na makrolidy v rámci Slovenskej republiky je pozorovaný od roku 2001, vtedy bola zaznamenaná rezistencia v 19 % kmeňov *S. pyogenes*. V roku 2010 priemerná rezistencia kmeňov *S. pyogenes* na makrolidy bola 32,5 %, v rokoch 2012 – 2013 sa pohybovala v rozmedzí 29 – 30 % (13). V našom súbore sme zaznamenali 16 % rezistenciu *S. pyogenes* na makrolidové antibiotiká. V prípade *S. agalactiae* sme zaznamenali 36 % rezistenciu na makrolidy, pri betahemolytických streptokokoch sk. C bolo 25 % kmeňov rezistentných na makrolidové antibiotiká a pri betahemolytických streptokokoch skupiny G bola rezistencia až 41 %. V prípade linkozamidov bola miera rezistencie podobná ako pri makrolidoch. Pozoruhodná bola rezistencia *S. agalactiae* na tetracyklínové antibiotiká, ktorá dosahovala 69 %. Testované kmene boli citlivé na zástupcu fluorovaných chinolónov ofloxacín, ktorého citlivosť sme interpretovali podľa zásad americkej normy CLSI<sup>(14)</sup>.

## Záver

V našom súbore bol *S. pyogenes* dominantným pôvodcom bakteriálnej tonzilofaryngitídy u detí v mladšom školskom veku. Liekom voľby týchto infekcií ostáva naďalej fenoxymetylpenicilín. Rezistencia na makrolidové a linkozamidové antibiotiká bola v našom súbore najnižšia pri kmeňoch *S. pyogenes*. Zriedkavejší bol výskyt betahemolytických streptokokov sk. C a G, pri ktorých je takisto stopercentná citlivosť na penicilín, zaznamenali sme však výrazne vyššiu rezistenciu na makrolidové a linkozamidové antibiotiká. V prípade *S. agalactiae* sa liečba fenoxymetylpenicilínom neodporúča, liekom voľby sú iné penicilínové antibiotiká alebo cefalosporíny. Vzhľadom na tieto zistenia je na mieste zdôrazniť dôležitosť mikrobiologickej kultivačnej analýzy s určením druhu a/alebo skupinovej príslušnosti betahemolytického streptokoka a citlivosti na antibiotiká, aby v prípade potreby pacienti dostávali indikovanú a cieľnú liečbu bakteriálnej tonzilofaryngitídy.

## LITERATÚRA

1. Lišková A. Racionálna antibiotická terapia respiračných infekcií. Primárny kontakt 2014; 2(6): 14-16.
2. Streptococcus. In: Murray RP, Rosenthal SK, Pfaller AM. Medical Microbiology. Philadelphia: Mosby Elsevier 2009: 225-236.
3. Chretien JH, McGinniss CG, Thompson J, et al. Group B beta-hemolytic streptococci causing pharyngitis. Journal of Clinical Microbiology 1979; 10(3): 263-266.
4. Whitley RA., Hall LMC, Hardie JM, et al. A study of small-colony, beta-haemolytic, Lancefield group C streptococci within the anginosus group: description of *Streptococcus constellatus subsp. pharyngis subsp. nov.* associated with the human throat and pharyngitis. International Journal of Systematic Bacteriology 1999; 49: 1443-1449.
5. Corrado LM, Palmadessa JD, Corrado HS, et al. Group B streptococcal pharyngitis in the compromised Adult: Therapeutic Considerations Journal of the National Medical Association 1981; 73(10): 943-948.
6. Linder JA, Stafford RS. Antibiotic treatment of adults with sore throat by community primary care physicians: a national survey 1989-1999. Jama 2001; 286(10): 1181-1186.
7. Bisno AL. Acute pharyngitis: etiology and diagnosis. Pediatrics 1996; 97: 949-954.
8. Tiemstra J, Rosita LFM. Role of Non-Group A Streptococci in Acute Pharyngitis. Journal of American Board of Family Medicine 2009; 22(6): 663-669.

9. Francis AJ, Nimmo JR, Efstratiou A, et al. Investigation of milk-borne *Streptococcus zooepidemicus* infection associated with glomerulonephritis in Australia, *The Journal of Infection* 1993; 27: 317-323.
10. Balter S, Benin A, Pinto SW, et al. Epidemic nephritis in Nova Serrana, Brazil. *Lancet* 2000; 355: 1776-1780.
11. Jensen A, Hoshino T, Kilian M. Taxonomy of the anginosus group of the genus *Streptococcus* and description of *Streptococcus anginosus* subsp. *whileyi* subsp. nov. and *Streptococcus constellatus* subsp. *Viborgensis* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2013; 63: 2506-2519.
12. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Dostupné na <http://www.eucast.org/>
13. Líšková A. Trendy vo vývoji rezistencie patogénov dýchacích orgánov v komunite. *Primárny kontakt* 2013; 1(1): 22-23.
14. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-fourth informational supplement M100-S24 January 2014, Twenty-fifth informational supplement M100-S25 January 2015. Clinical Laboratory Standards Institute.

**RNDr. Kristína Mózes**

HPL spol. s r. o.  
Mederčská 39, 945 01 Komárno  
e-mail: [mozes@hpl.sk](mailto:mozes@hpl.sk)



## ALL YOU NEED FOR GENOMICS

- Plasmid purification
- Genomic DNA purification
- RNA purification
- Clean-up
- Automated DNA/RNA extraction
- DNA/RNA storage
- Modifying enzymes
- And more .....



Request your copy from your local VWR sales office or [sk.vwr.com](http://sk.vwr.com)

## Neštandardné výsledky neinvazívneho prenatalného testu na chromozómové poruchy plodu môžu poskytovať doplňujúcu informáciu o zdravotnom stave tehotných žien

RNDr. Tomáš Szemes, PhD.<sup>1,2</sup>, RNDr. Michaela Hýblová<sup>1,2</sup>, MUDr. Jana Barošová<sup>3</sup>, RNDr. Gabriel Minárik, PhD.<sup>4</sup>, Werner Kramp<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Geneton, s. r. o., Bratislava

<sup>2</sup>Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

<sup>3</sup>MUDr. Janka Barošová – GENET, s. r. o., Nitra

<sup>4</sup>Medirex, a. s., Pezinok

Neinvazívne prenatalné testovanie (NIPT) na najčastejšie aneuploidie pomocou analýzy voľnej DNA získanej z periférnej krvi tehotných žien predstavuje jeden z najrýchlejších sa presadzujúcich nových genetických testov. O prítomnosti voľnej DNA plodu v periférnej plazme tehotných žien vieme od roku 1997, no vzhľadom na jej malý podiel trvalo 14 rokov, kým sa stal dostupným prvý test na stanovenie najčastejších trizómií. Dnes existuje viacero dostupných NIPT metód, ktoré rôznymi spôsobmi detegujú zmeny početnosti sledovaných chromozómov v porovnaní s referenčnými chromozómami. Úspech NIPT spočíva vo vysokej citlivosti na najčastejšie aberácie, v prípade trizómie 21 nad 99 %, a v nízkej miere falošne pozitívnych výsledkov. Svetovo najviac používané testy sú založené na analýze s tzv. celogenómovým prístupom, pričom pomocou metódy masívne paralelného sekvenovania sa analyzuje celková DNA získaná z periférnej plazmy tehotnej ženy. V našom laboratóriu sme v roku 2015 zaviedli test, ktorý využíva celogenómový prístup. Primárne bol navrhnutý na detekciu trizómie 21, 18 a 13. Pri vhodnom spôsobe interpretácie dát však možno získať detailný prehľad o stave všetkých chromozómov a zistiť aj malé aberácie. Vďaka zavedeniu takejto interpretácie pri NIPT sme zachytili prípad pacientky, u ktorej sme pozorovali viacpočetné subchromozómové aberácie na viacerých chromozómoch. Existuje viacero možných príčin na pozorovanie takýchto zmien – aberácie pochádzajúce z miznúceho dvojčaťa, okultná malignita, ale aj systémový lupus erythematosus (SLE). Pri hodnotení neštandardných výsledkov NIPT testov je kľúčové získanie dodatočných klinických dát na stanovenie príčiny. Celogenómové testy NIPT však môžu poskytnúť doplňujúce informácie aj k zdravotnému stavu tehotnej a môžu byť cenným nástrojom prevencie aj pri diferenciálnej diagnostike. **Kľúčové slová:** neinvazívne prenatalné testovanie, NIPT, voľná fetálna DNA, chromozómové aberácie, celogenómové sekvenovanie, okultná malignita, systémový lupus erythematosus, SLE

### *Abnormal results of non-invasive prenatal test for common foetal aneuploidies can provide additional information about medical conditions in pregnant women*

Non-invasive prenatal testing (NIPT) for common foetal aneuploidies based on analysis of circulating free foetal DNA obtained from peripheral maternal blood represents one of the most rapidly adopted genetic tests. We are aware that free foetal DNA is present in maternal blood since 1997 but due to its low relative amount it took 14 years until the first commercial test became available. Various NIPT tests are currently available which use different approaches to detect changes in tested chromosome counts compared to reference chromosomes. The success of NIPT lies in the high detection rate of the most common aneuploidies, in case of trisomy 21 above 99%, and low false positive rate compared to other screening methods. The most common NIPT test worldwide is based on so called whole genome approach, which is based on massively parallel sequencing of total DNA isolated from peripheral plasma of a pregnant woman. We implemented an in-house NIPT test in our laboratory in 2015, which also uses whole genome approach. It was primarily designed for detection of trisomies 21, 18 and 13. Using an alternative interpretation of the entire genome analysis is possible to study all chromosomes and identify aberrations of small extent. Due to the implementation of such analysis we identified a case of a pregnant woman with various subchromosomal aberrations on different chromosomes. Following conditions can lead to such abnormal results – aberrations of demised aberrant twin, occult maternal malignancy, or systemic lupus erythematosus (SLE). Additional clinical information may be needed to determine causative condition. Whole genome NIPT tests can be a source of a valuable information for differential diagnosis of various clinical conditions of pregnant women or even prevention.

**Keywords:** non-invasive prenatal testing, NIPT, free foetal DNA, whole genome sequencing, chromosomal aberrations, occult malignancy, systemic lupus erythematosus, SLE

NewsLab, 2017; roč. 8(1): 30 – 33

## Úvod

V roku 1997 bola v periférnej krvi tehotných žien objavená voľná DNA pochádzajúca z plodu<sup>(1)</sup>. Táto DNA však nie je priamo uvoľňovaná plodom, ale bunkami cytotrofoblastu placenty, ktoré odumrú v procese apoptózy<sup>(2)</sup>. NIPT predstavuje pokročilý skriningový test, nie však diagnostický test, pretože môže viesť k falošne pozitívnym alebo menej často k falošne negatívnym výsledkom. Práve placentárny pôvod a fenomén placentárneho mozaicizmu zodpovedajú za malú mieru diskordantných výsledkov NIPT a skutočného karyotypu plodu a sú jednou z biologických príčin nesprávneho výsledku NIPT<sup>(3)</sup>. Ďalšou z príčin falošne pozitívnych výsledkov NIPT je syndróm miznúceho dvojčťa, pretože u miznúceho dvojčťa je vyšší výskyt aneuploidii a príslušná časť placenty uvoľňuje aberantnú DNA<sup>(11)</sup>. Nízky podiel DNA plodu (menej ako 4 %) môže byť príčinou falošne negatívneho výsledku. DNA získaná z plazmy je zmesou dominujúcej materskej DNA a DNA plodu, ktorá predstavuje priemerne len okolo 10 – 20 % medzi 10. a 21. týždňom tehotenstva<sup>(4)</sup>. Výsledok NIPT môže byť preto ovplyvnený aj aberantným genotypom matky (napr. mozaicizmus). Až v roku 2008 bola prvýkrát publikovaná nová metóda analyzujúca cirkulujúcu DNA v krvi tehotnej pomocou sekvenátorov novej generácie, vďaka ktorej bolo možné s vysokou spoľahlivosťou odlišiť trizomické plody od euploidných<sup>(5)</sup>. Bol založený na celogenómovej sekvenovaní voľnej cirkulujúcej DNA, priradení sekvencií k jednotlivým chromozómom a následnému porovnaniu pomerov sledovaných a referenčných chromozómov s pomermi zistenými pre súpravu vzoriek euploidných tehotenstiev. Prvý komerčne dostupný NIPT test prišiel v roku 2011 a odvtedy došlo k veľkému nárastu počtu vyšetrených tehotných, ako aj k dostupnosti rôznych NIPT<sup>(6)</sup>. Prax ukázala prínos NIPT metód vo vysokej citlivosti a špecificite častých chromozómových porúch plodu v porovnaní so štandardným skriningom a NIPT predstavuje najspoľahlivejšiu metódu v prípade, že tehotná nie je ochotná podstúpiť amniocentézu<sup>(7)</sup>.

NIPT testy však nesú predovšetkým genomickú informáciu o tehotnej žene. Práca Bianchi a kol.<sup>(7)</sup> poukazuje na zacytenie ešte neidentifikovaných desiatich prípadov materskej malignity u tehotných žien v rámci poskytovania komerčného NIPT testu, ktoré boli pri následnom klinickom manažmente aj potvrdené. Maligne bunky totiž do obehu uvoľňujú DNA podobne ako placenta, pričom tumorové tkanivo je často tvorené bunkami s viacpočetnými chromozómovými aberáciami. Malignita však nie je jedinou možnou príčinou zacytenia abnormálneho NIPT chromozómového profilu. Chan a spol.<sup>(8)</sup> v roku 2015 poukázali na to že aj systémový lupus erythematosus (SLE) spôsobuje viacpočetné aberantné chromozómové artefakty pri celogenómovej analýze DNA z placenty. Táto práca poukazuje na zacytenie prípadu tehotnej s prítomnými viacpočetnými chromozómovými aberáciami zistenými pomocou NIPT testu<sup>(9)</sup> s rozborom možných príčin. Práve schopnosť zachytiť iné aberácie okrem testovaných vnímame ako hlavnú výhodu celogenómoveho prístupu pri NIPT skriningu.

## Materiál a metódy

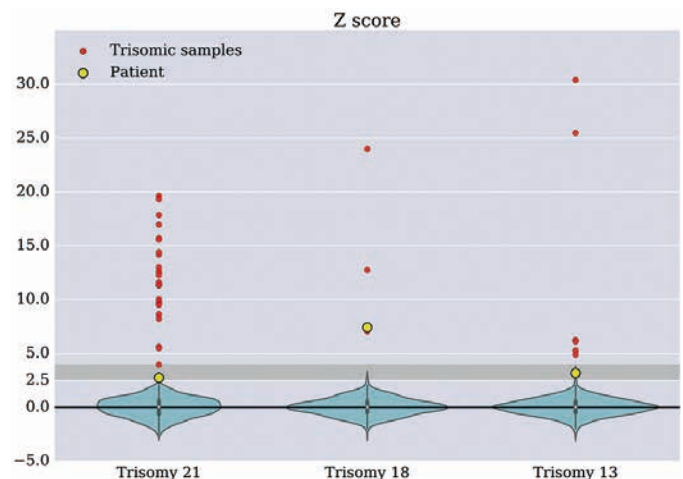
U pacientky vo veku 32 rokov, po in vitro fertilizácii bol indikovaný NIPT test. Odborová skúmanka s periférnou krvou odobratou do EDTA bola prepravená do laboratória a do

24 hodín z nej bola získaná čistá frakcia plazmy. Z plazmy bola izolovaná celková DNA pomocou kitu DNA Blood Mini kit (Qiagen, DE) a celý výťažok bol použitý na prípravu fragmentovej sekvenačnej knižnice s kitom TruSeq Nano (Illumina, USA) na účely masívne paralelného sekvenovania na sekvenátore Illumina MiSeq. Vykonané bolo párové sekvenovanie s dĺžkou čítania 75bp. Získané dáta zo sekvenovania boli spracované pomocou bioinformatického expertného nástroja NIPT-APP, ktorý zabezpečil kvalitatívne filtrovanie dát, mapovanie čítania k referenčnému ľudskému genómu verzie hg19, zisteniu početností čítania pre jednotlivé chromozómy, ako aj pre rovnomerné segmenty chromozómov, ktoré pomocou vlastného algoritmu boli porovnané s normálnymi početnosťami referenčných vzoriek. Na základe porovnania vzoriek s referenčnými hodnotami bolo stanovené Z skóre pre analyzované chromozómy pomocou vyvinutého algoritmu Multinomial. Na účely kontroly validity výsledkov boli výsledky vizualizované aj formou grafickej reprezentácie chromozómov na subchromozómovej úrovni pomocou nástroja Circos<sup>(10)</sup>. Vzhľadom na výsledok bol s odstupom dvoch týždňov vykonaný opakovaný odber s použitím rovnakého postupu.

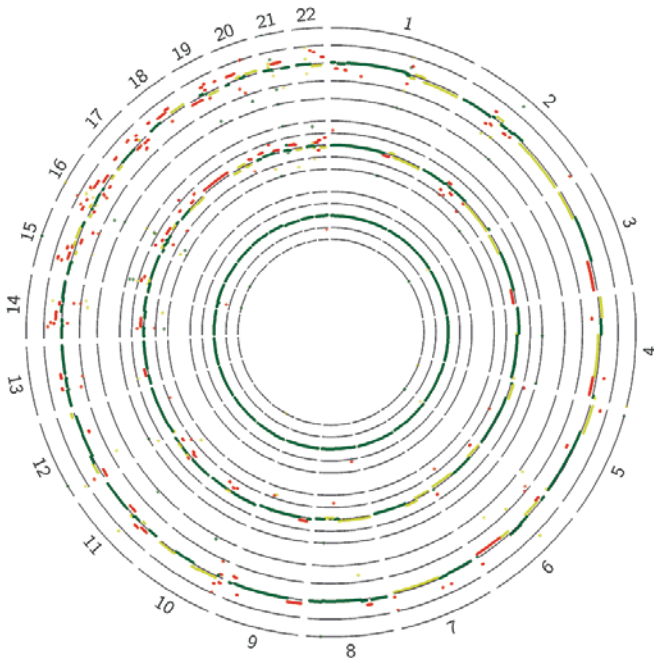
## Výsledky

Pri prvej NIPT analýze vzorky sme získali 6,9 milióna párových čítaní, ktoré sa unikátne mapovali na genóm vo verzii GRCh37. Bola zistená pozitivita na trizómii chromozómu 18 (Z skóre > 6) a zároveň hodnoty Z skóre chromozómov 21 a 13 boli v sivom pásme (Z skóre medzi 2,5 a 4), čo je neštandardné (**obrázok 1**). Výsledok po 2. odbere bol rovnaký. Pomocou nástroja Circos sme hodnotili distribúciu čítania v rámci všetkých autozómov (**obrázok 2**). Pozorovali sme prítomnosť viacpočetných subchromozómových aberácií (mikrodelécie a duplikácie) na každom z chromozómov (**obrázok 1**). Pacientka bola na základe výsledkov indikovaná na amniocentézu.

**Obrázok 1.** Zobrazenie výsledného Z skóre stanoveného algoritmom Multinomial pre testované chromozómy 21, 18 a 13. Svetlomodrá oblasť predstavuje distribúciu Z skóre negatívnych vzoriek a červené body predstavujú Z skóre prípadov s trizómiou. Sivá zóna Z skóre od 2,5 do 4 predstavuje pásmo neinformatívnych hodnôt. Skúmaná vzorka (žlté body) mala pozitívny výsledok na trizómii 18, no atypicky aj Z skóre pre chromozómy 21 a 13 boli v sivej zóne.



**Obrázok 2.** Profil autozómov 1 – 22 zobrazený v kruhu pomocou nástroja Circos. Vnútorý kruh predstavuje referenčnú vzorku, stredný kruh je výsledkom NIPT prvého odberu pacientky a vonkajší kruh je výsledkom NIPT druhého odberu. Zelené oblasti predstavujú normálnu reprezentáciu sekvencií v daných oblastiach chromozómu, žlté malú a červené vyššiu odchýlku v početnosti. Posun odchýlok smerom von poukazuje na duplikované a smerom dnu deletované oblasti.



## Diskusia a záver

Neinvazívne prenatálne testy v praxi preukázali vysokú citlivosť a špecifickosť pri odhaľovaní najčastejších aneuploidii plodu analýzy voľnej DNA plodu v periférnej krvi tehotných žien. Od pôvodného názoru expertov na prenatálnu starostlivosť pri využití NIPT testu ako alternatívy štandardného skríningu pre tehotné s vyšším rizikom plodu s Downovým syndrómom badať posun k názoru vhodnosti nasadenia testu ako prvej voľby skríningu na najčastejšie aneuploidie plodu. No skupina testov založených na celogenómovom skenovaní dokáže poskytnúť doplňujúce informácie, ktoré sa týkajú samotnej tehotnej ženy.

Pri poskytovaní NIPT testu v našom laboratóriu sme zachytili prípad tehotnej, ktorá mala abnormálny výsledok NIPT testu a vo vizualizácii distribúcie čítania pre všetky chromozómy sme pozorovali veľký počet subchromozómových odchýlok (duplikácií aj delécií). Okultná malignita je jedným z možných vysvetlení získania tohto neštandardného výsledku.

## LITERATÚRA

1. Lo YM, Corbetta N, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350: 485-487.
2. Faas BH, de Ligt J, Janssen I, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of fetal aneuploidies using massively parallel sequencing-by-ligation and evidence that cell-free fetal DNA in the maternal plasma originates from cytotrophoblastic cells. *Expert Opin Biol Ther* 2012; 12: S19-S26.
3. Grati FR, Malvestiti F, Ferreira JC, et al. Fetoplacental mosaicism: potential implications for false-positive and false-negative noninvasive prenatal screening results. *Genet Med* 2014; 16(8): 620-4.

Masa malígneho tumoru môže mať všetky alebo subpopulácie buniek s prítomnými subchromozómovými aberáciami, ktoré v dôsledku poruchy v kontrolných a opravných mechanizmoch bunky prežívajú a množia sa. Práve pri rozpade takýchto buniek sa do cirkulácie uvoľňujú aberantné DNA tumoru a menia tak relatívne zastúpenie fragmentov v aberantných oblastiach. Viaceré práce uvádzajú zachytenie takýchto prípadov skrytej malignity v skorom štádiu v rámci NIPT, ktoré boli následne potvrdené, lokalizované, prípadne aj liečené pri ďalšom klinickom manažmente<sup>(7)</sup>.

Príčinou zisteného aberantného profilu však môže byť aj SLE a napriek zatiaľ nedostupným informáciám z odbornej literatúry možno predpokladať, že aj iné autoimunitné ochorenia môžu spôsobiť podobný výsledok. Pri pozorovaní abnormálneho profilu je potrebné vylúčiť SLE alebo iné autoimunitné ochorenia u pacientky. V anamnéze však pacientka neuviedla SLE.

V analyzovanom prípade treba vziať do úvahy aj tretiu alternatívnu príčinu. Tehotná žena totiž podstúpila procedúru in vitro fertilizácie, pričom boli implantované dve embryá, jedno z nich neprosperovalo. Zdrojom aberantnej DNA pozorovanej v NIPT teste by teda mohlo byť aj jedno z embryí.

Na definitívne stanovenie príčiny pozorovaného abnormálneho profilu je potrebné vykonať doplňujúce vyšetrenia a získať ďalšie anamnestické údaje. Kľúčový je výsledok z analýzy vzorky získanej z amniocentézy, vďaka čomu bude možné vylúčiť aberácie prítomné u prosperujúceho plodu. Vzhľadom na odber z vnútra plodového obalu prosperujúceho dvojčata pravdepodobne nebude možné zistiť, či aberantná DNA zachytená v periférnej krvi pochádza z druhého embrya. Ten však pacientka odmieta. Vzorka placenty získaná pomocou CVS a jej karyotypová analýza by mohla byť vhodnou metódou na stanovenie embryonálneho pôvodu aberantnej DNA. Definitívne však možno embryonálny pôvod aberantnej DNA potvrdiť alebo vylúčiť až po ukončení gravidity podľa vymiznutia aberantného signálu. Z anamnézy pacientky alebo špecifickými vyšetreniami bude možné preveriť hypotézu o prítomnosti SLE. Po vylúčení predchádzajúcich príčin by bolo potrebné vyšetriť okultnú malignitu.

## Záver

Celogenómový prístup pri neinvazívnom testovaní na najčastejšie chromozómové poruchy môže byť významným zdrojom informácií o zdravotnom stave tehotných žien a pomôcť tak pri odhaľovaní závažných patologických fenoménov. Identifikovali sme prípad s viacpočetnými chromozómovými aberáciami s viacerými možnými príčinami vzniku, no na stanovenie ich príčiny je potrebný vhodný algoritmus diferenciálnej diagnostiky.

4. Taglauer ES, Wilkins-Haug L, Bianchi DW. Review: cell-free fetal DNA in the maternal circulation as an indication of placental health and disease. *Placenta* 2014; 35: Suppl S64-8.
5. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, et al. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(42): 16266-71.
6. Bianchi DW, Wilkins-Haug L. Integration of Noninvasive DNA Testing for Aneuploidy into Prenatal Care: What Has Happened Since the Rubber Met the Road? *Clinical Chemistry* 2014; 60(1): 78-87.



7. Bianchi DW, Chudova D, Sehnert AJ, et al. Noninvasive Prenatal Testing and Incidental Detection of Occult Maternal Malignancies. *JAMA* 2015; 314(2): 162-169.

8. Chan RWY, Jiang P, Peng Z, et al. Plasma DNA aberrations in systemic lupus erythematosus revealed by genomic and methylomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci* 2015; 111: E5302–E5311.

9. Minarik G, Repiska G, Hyblova M, et al. Utilization of Benchtop Next Generation Sequencing Platforms Ion Torrent PGM and MiSeq in Noninvasive Prenatal Testing for Chromosome 21 Trisomy and Testing of Impact of In Silico and Physical Size Selection on Its Analytical Performance. *PLoS One* 2015;10(12): e0144811.

10. Krzywinski M, Schein J, Birol I, et al. Circo: an information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res* 2009; 19(9): 1639-45.

11. Curnow KJ, Wilkins-Haug L, Ryan A, et al. Detection of triploid, molar, and vanishing twin pregnancies by a single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal test. *Am J Obstet Gynecol* 2015; 212(1): 79.e1-9.



**RNDr. Tomáš Szemes, PhD.**

Geneton s. r. o.

Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava

e-mail: [tomasszemes@gmail.com](mailto:tomasszemes@gmail.com)



## Zdravotníctvo moderne a efektívne

**„Zavádzame a prevádzkujeme  
užitočné informačné technológie  
v organizáciách“**

IT infraštruktúra  
Infraštruktúra laboratórií  
Systémová integrácia  
Podnikové aplikácie  
Vývoj softwaru  
Outsourcing

[www.autocont.sk](http://www.autocont.sk)

**AUTOCONT**

## Diferenciálna molekulová diagnostika mnohopočetného myelómu a Waldenströmovej makroglobulinémie

Mgr. Lucia Tatayová<sup>1</sup>, prof. MUDr. Beata Mladosičová, CSc.<sup>2</sup>, RNDr. Renata Lukačková<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Medirex, a. s., Bratislava

<sup>2</sup>Oddelenie klinickej patofyziológie LF UK, Bratislava

Mnohopočetný myelóm (MM) je lymfoproliferatívne ochorenie zasahujúce plazmatické B-lymfocyty. Je zaradený medzi monoklonálne gamapatie, pretože medzi jeho hlavné príznaky patrí produkcia monoklonálnych protilátok, ktoré značne znižujú variabilitu imunitného systému. Charakteristické symptómy tiež zahŕňajú osteolytické lézie, najmä v oblasti axiálneho skeletu, hyperkalciémiu a postupné zlyhávanie renálneho systému. Priebeh ochorenia je variabilný, môže sa začať ako indolentná monoklonálna gamapatia nejasného významu (MGUS, monoclonal gammopathy of undetermined significance), ktorá sa postupne transformuje do plne rozvinutého patologického stavu. Podobnou hematologickou malignitou je Waldenströмова makroglobulinémia (WM), ktorá tiež patrí medzi monoklonálne gamapatie a tvorí podskupinu non-Hodgkinových lymfómov. Symptómy a výsledky laboratorných vyšetrení sú v oboch prípadoch takmer identické. Pre začatie vhodnej liečby je nevyhnutná diferenciálna diagnostika na molekulovej úrovni.

**Kľúčové slová:** mnohopočetný myelóm, Waldenströмова makroglobulinémia, diferenciálna diagnostika

### *Differential molecular diagnostics of multiple myeloma and Waldenström's macroglobulinemia*

Multiple myeloma (MM) is a lymphoproliferative disease affecting plasma B-cells. It ranks to monoclonal gammopathies with the typical presence of monoclonal antibodies which significantly reduce the variability of the immune system. Typical symptoms also include osteolytic bone lesions mainly in the axial skeleton, hypercalcaemia and progressive renal failure. The approach to the disease is variable, may start as indolent monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), which progresses into fully developed condition. Similar hemato-oncological malignity is Waldenström's macroglobulinemia (WM). As well as MM, WM is also monoclonal gammopathy and is one of the subtypes of non-Hodgkin's lymphomas. Symptoms and results of laboratory examinations are relatively similar in both cases. For initiation of appropriate the treatment differential diagnostic at a molecular level is needed.

**Keywords:** multiple myeloma, Waldenström's macroglobulinemia, differential diagnostic

NewsLab, 2017; roč. 8(1): 34 – 37

### Úvod

Mnohopočetný myelóm (MM) patrí medzi hematologické ochorenia plazmatických B-buniek. Vo väčšine prípadov prevláda výskyt nádorových buniek typu zreých plazmocytov s nízkou proliferatívnou aktivitou. Lokalizácia uvedených patologických foriem je striktne viazaná na mikroprostredie kostnej drene, kde prebieha ich proliferácia a diferenciácia<sup>(1)</sup>. MM sa radí do skupiny monoklonálnych gamapatií, pretože jedným z jeho základných znakov je produkcia monoklonálnych protilátok. Za fyziologických podmienok sa v sére zdravého jedinca vyskytujú polyklonálne imunoglobulíny, ktoré sú schopné podliehať rekombináciám a vytvárať tak široké spektrum väzbových miest pre rôzne antigény. Pri monoklonálnych gamapatiách vrátane MM dochádza v organizme k produkcii jedného antigénne i štruktúrne konzistentného antigénu, prípadne jeho fragmentu, čím je značne znížená efektívnosť imunitného systému. Monoklonálne imunoglobulíny postupne infiltrujú kostnú dreň, kde nahrádzajú funkčné plazmocyt<sup>(2)</sup>.

### Patogenéza MM

MM prebieha ako viacúrovňový proces, ktorý sa začína ako premalignné štádium, resp. monoklonálna gamapatia nejasného významu (MGUS) s variabilnou dĺžkou trvania. Od plne rozvinutého patologického stavu sa líši nižšou hodnotou paraproteínu M, kostná dreň obsahuje menej ako 10 % mononukleárných buniek a nie sú prítomné ďalšie symptómy a poškodenia orgánov<sup>(3)</sup>. „Smoldering“ myelóm (SMM) je heterogénna prechodná forma medzi MGUS a plne rozvinutým ochorením. Odlíšenie SMM a MGUS je možné len na základe hodnotenia laboratorných výsledkov. Hlavným diferenciálnym faktorom je prítomnosť vyššej hladiny paraproteínu (nad 30 g/l) a plazmatických buniek (nad 10 %) v kostnej dreni, ale zároveň nesmú byť u pacienta prítomné žiadne ďalšie príznaky ako hyperkalciémia, poškodenie obličiek alebo anémia<sup>(4)</sup>. Dôsledkom progresie nádorovej masy je tiež potlačenie hostiteľskej imunity, preto počas transformácie SMM na myelóm dochádza k vzniku prídavných deficiencií celulórných aj humorálnych zložiek imunity. Nastáva postupné

zhoršenie orgánových funkcií s možnosťou rozšírenia tumorových buniek do extramedulárnych oblastí, najčastejšie do pečene a sleziny<sup>(5)</sup>.

### Molekulová cytogenetika MM

Ako primárne mutácie sa pri MM označujú translokácie zahŕňajúce lokus pre ťažký (*IgH*) imunoglobulínový reťazec alebo jeden z lokusov pre ľahký Ig reťazec (*IgL* – kappa/lambda).

Uvedené mutácie sú prítomné u viac ako polovice pacientov. Vznikajú ako dôsledok nesprávnej „cross-switch“ rekombinácie a somatickej hypermutácie protilátok. *IgH* translokácie zahŕňajú pri MM tri cieľové skupiny onkogénov, uvedené v **tabuľke 1**. Zvyčajne ide o vyvážené translokácie, počas ktorých sa onkogény dostanú pod kontrolu silného Ig intrónového enhanceru Emu a/alebo *IgH* alfa<sup>(6)</sup>. V rámci sekundárnych aberácií dochádza pri MM najčastejšie k mutáciám zahŕňajúcim chromozómy 1, 13, 17 a výnimkou nie sú ani translokácie chromozómov 4, 11 a 14. Tumory plazmatických buniek s t(11;14)(q13;q32) sú pri MM a MGUS asociované s nadprodukciami cyklínu D1 (*CCND1*), ale paradoxne sú pri zavedení vhodnej liečby spojené s dlhším prežívaním pacientov<sup>(7)</sup>.

### Waldenströмова makroglobulinémia a gén *MYD88*

Waldenströмова makroglobulinémia (WM) je lymfoproliferatívne ochorenie B-lymfocytov a zároveň jeden z podtypov non-Hodgkinových lymfómov. Primárnou črtou je infiltrácia kostnej drene patologickými plazmocytárnymi bunkami a prítomnosť Ig monoklonálnej gamapatie. K najčastejším sprievodným javom patrí anémia, hyperviskózný syndróm, hepatosplenomegália či lymfadenopatie. Histologická transformácia buniek býva príčinou progresie ochorenia do štádia difúznej B-bunkovej leukémie (DLBCL), keď dochádza ku komplexnému zhoršeniu symptómov s extramedulárnym postihnutím<sup>(8)</sup>. Kandidátnym génom pri WM je *MYD88* (myeloid differentiation primary response 88) lokalizovaný na chromozóme 3p22. Kóduje 31 – 33 kDa adaptorový proteín, ktorý obsahuje N-terminálnu „death“ doménu (DD) a C-terminálnu TIR doménu (Toll/interleukín-1 receptor). Funkciou proteínu je ukotvenie signálnych molekúl na TIR doménu a na receptory pre interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) na zabezpečenie správneho fungovania vrodenných imunitných reakcií. Deregulácia génu *MYD88* má v prevažnej väčšine prípadov negatívny dôsledok na signálne dráhy NF- $\kappa$ B, PI3K/Akt/mTOR či JAK/STAT<sup>(9)</sup>.

**Tabuľka 1.** Cieľové skupiny onkogénov pri MM (reprodukované podľa Chesi M, Bergsagel PL, 2011)

skupiny cieľových onkogénov		lokalizácia	výskyt
1. cyklín	CCND1	11q13	15 %
	CCND2	12p13	< 1 %
	CCND3	6p21	2 %
2. MAF	MAF	16q23	5 %
	MAFA	20q12	2 %
	MAFB	8q24.3	< 1 %
3. MMSET/FGFR3		4q16	15%

**CCND** – cyklín D; **MAF** – muskuloaponeurotický fibrosarkómový onkogénny homológ; **MMSET** – chromatín remodelačný faktor; **FGFR** – receptor fibroblastového rastového faktora

### Somatická mutácia L265P

Somatický variant (T→C) v chromozómovej oblasti 3p22.2 je jednoznačným diagnostickým markerom WM. Mutácia zapríčiňuje aminokyselinovú zmenu leucínu za prolín (L265P) v géne *MYD88*, čoho následkom je abnormálne vysoká aktivita uvedených signálnych dráh. Výsledkom komplexného patologického procesu je tak malígna proliferácia a supresia apoptózy B-lymfocytov<sup>(10,11)</sup>.

### Diferenciálna diagnostika monoklonálnych gamapatií

Potvrdenie diagnózy monoklonálnych gamapatií zahŕňa sériu biochemických vyšetrení, predovšetkým elektroforézu sérových bielkovín (SPEP) a elektroforézu bielkovín v moči (UPEP). Separácia na klasickej agaróze v kombinácii s imunofixáciou sa využíva ako skriningová metóda na detekciu prítomnosti M-proteínu a jeho ťažkých Ig reťazcov a determináciu ľahkých Ig reťazcov. Pretože uvedené metódy sú relatívne neinvazívne, je vhodné vykonať ich u všetkých pacientov. Pri UPEP je nevyhnutný 24-hodinový odber moču, pretože množstvo M-proteínu v ňom je nepriamym meradlom rozsahu tumorovej masy<sup>(12)</sup>. Metódy fluorescenčnej *in situ* hybridizácie (FISH) sa rutinne využívajú na analýzu chromozómových aberácií, najčastejšie t(11,14), ktorá priamo súvisí so zvýšenou expresiou *CCND1* a je typická práve pre MM. Významným markerom monoklonálnych gamapatií sú tiež prestavby IgH lokusu a časté sú aj delécie 17p13 (*TP53*) a 13q14 (*RB1*). Na molekulovej úrovni možno potvrdiť prítomnosť najfrekvencovanejších genomických delécií a duplikácií metódou MLPA (multiple ligation-dependent probe amplification). Využitím kvantitatívnej real-time PCR možno sledovať hladinu expície *CCND1*, ktorá u pacientov koreluje s mierou liečebnej odpovede.

Problémom v rutínnej praxi je skutočnosť, že výsledky uvedených laboratórnych testov sú pri WM a MM do značnej miery rovnaké, čo môže viesť k nepresnej diagnostike daného ochorenia, a tým aj k podaniu nešpecifickej liečby. U pacientov s MM sa využíva kombinácia cytostatík a kortikosteroidov, prípadne imunomodulačné látky. Medzi najnovšie liečivá z oblasti cielej terapie MM patrí talidomid, inhibítory VEGF (vascular endothelial growth factor) alebo proteazómové inhibítory<sup>(13)</sup>. U pacientov s WM je pomerne častý výskyt neuropatií a hemolytickej anémie. V danom prípade je prvou voľbou rituximab, ktorý zabezpečuje elimináciu malígnych B-lymfocytov prezentujúcich povrchový antigén CD20. Pri progresii ochorenia sa využíva trojkombinácia DRC (dexametazón, rituximab, cyklofosfamid)<sup>(14)</sup>. Pre aplikáciu vhodného liečebného algoritmu je teda nevyhnutná spoľahlivá diferenciálna diagnostika, ktorou možno odlišiť uvedené monoklonálne gamapatie na molekulovej úrovni.

### Materiál a metodika

#### Vzorky

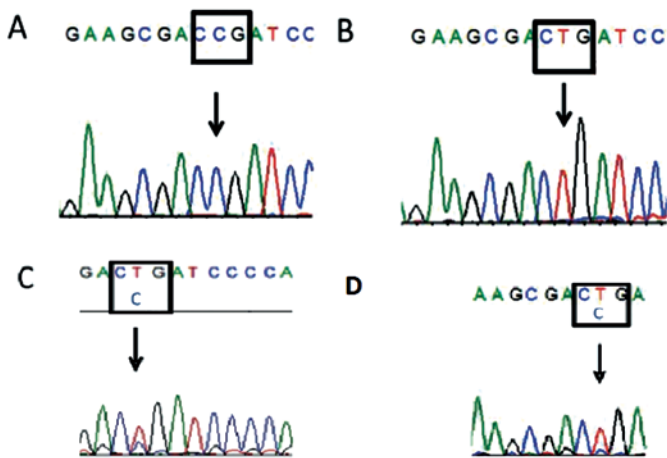
Do súboru pacientov s podozrením na Waldenströmovu makroglobulinémiu boli zahrnuté vzorky kostnej drene spracované na oddelení lekárskej genetiky v Medirexe, a. s., v časovom rozmedzí od októbra 2015 do marca 2016. Súbor bol zostavený z 29 vzoriek. DNA na analýzy bola izolovaná kítom QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) podľa priloženého protokolu. Koncentrácia a kvalita vzoriek bola

meraná na Implen nanofotometri (Implen GmbH, Munchen, Germany). Ako negatívne kontroly boli použité vzorky od pacientov bez onkologických diagnóz.

## Alelovo špecifická PCR (AS-PCR)

Pri optimalizácii vhodnej AS-PCR boli použité komerčne dostupné primery od firmy Sigma-Aldrich pre wild-type a mutovaný typ alel. Reakčné mixy boli pripravené s viacerými druhmi polymeráz vrátane Pfu Turbo Cx Hotstart, AmpliTaq Gold a Phu. Ideálny priebeh reakcie bol dosiahnutý iba v prípade poslednej Phu polymerázy. Genomická DNA bola nariadená na 10 ng a teplotný program bol nastavený podľa článku Varettoni et al., 2013<sup>(12)</sup>. Veľkosť získaných PCR produktov bola približne 300 bp.

**Obrázok 1.** Genotypy WM



**A)** mutovaný typ alely, tranzícia T > C; **B)** Wt typ alely – bez tranzície T > C; **C) D)** – heterozygotný typ alel

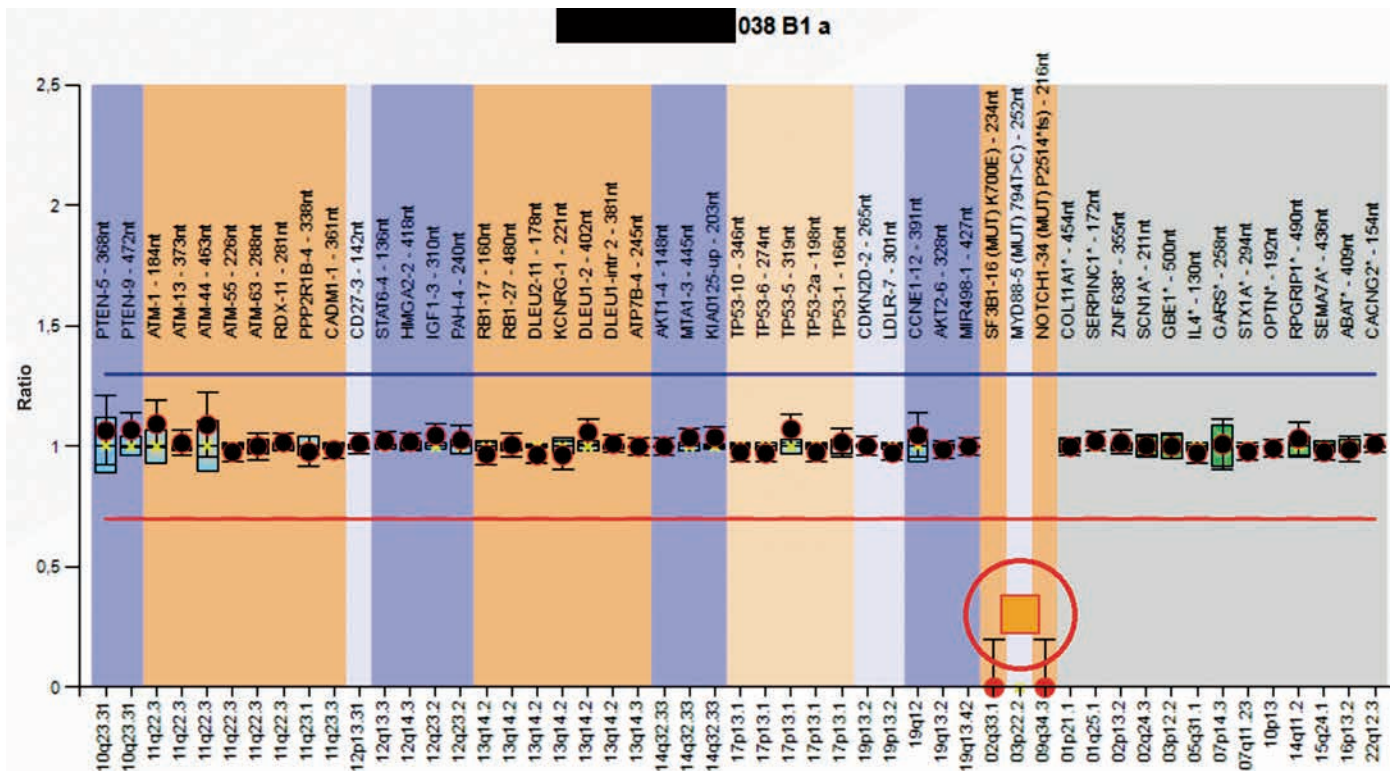
## Sekvenovanie a MLPA analýza

Získané PCR produkty boli enzymaticky purifikované pomocou Exo Sap (Applied Biosystems, Foster City, USA), ktorý zo zmesi odstráni nezainkorporované primery a dNTP. Na prípravu sekvenačnej reakcie bol použitý BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) a na finálnu purifikáciu DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen, Hilden, Germany) so živicovými kolónkami. Vzorky sme sekvenovali na genetickom analyzátoře ABI 3500 (Applied Biosystems, Foster City, USA) a vyhodnotili pomocou softvéru SeqScape. Výsledky sme overili vložení sekvenčív do BLAST-u a tiež pomocou MLPA analýzy (MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands). Použitý probemix SALA MLPA P038 B1 obsahuje 51 špecifických prób pre B-bunkové aberácie vrátane somatickej mutácie L265P v géne MYD88.

## Výsledky

Kombináciou komerčne dostupných primerov, Phu polymerázy a protokolu podľa Varettoni et al., 2013 sme zostavili vhodnú AS-PCR, ktorej produkty možno použiť na ďalšie sekvenovanie a detekciu mutácie v géne MYD88. V našom súbore analyzovaných pacientov sme pozitivitu výsledkov hodnotili na základe zámény tymínu za cytozín na 978 nukleotide (**obrázok 1**). Získané výsledky sme potvrdili aj MLPA analýzou (**obrázok 2**). Uvedenými metódami sa nám podarilo zostaviť diagnostický algoritmus vhodný na detekciu pacientov s WM a odlíšiť ich tak od ostatných prípadov MM či iných monoklonálnych gamapatií. Počas analýzy pacientov sme detegovali aj ďalších 11 polymorfizmov v géne MYD88, ktoré však nemali žiadny fenotypový prejav.

**Obrázok 2.** Výsledok MLPA analýzy, prítomnosť mutácie L265P v géne MYD88



## Diskusia

Waldenströmova makroglobulinémia rovnako ako myelóm patrí medzi lymfoproliferatívne ochorenia B-buniek s výskytom monoklonálnych protilátok. Keďže je pomerne ťažké odlíšiť MM od WM na základe klinického obrazu a výsledkov laboratórnych testov, bolo naším cieľom zaviesť do rutinej diagnostiky molekulovú metódu, ktorá by spoľahlivo identifikovala konkrétny typ ochorenia. Publikácie z posledných rokov uvádzajú somatickú mutáciu L265P v géne *MYD88* ako diagnostický marker jedinečný pre WM, pretože pri MM sa nenachádza. WM je relatívne zriedkavé ochorenie v rámci hematologických malignít. Globálne je zaznamenaných približne 5 pacientov na 1 milión prípadov. Počas diagnostiky nových pacientov sme zaznamenali častý výskyt bodových

polymorfizmov, najmä 2856 A > R. Vo väčšine prípadov však išlo o silent mutácie a v žiadnom z prípadov sme nedetegovali fenotypový prejav.

## Záver

Molekulové metódy majú v laboratórnej praxi nezastupiteľný význam, pretože prispievajú k presnej a relatívne rýchlejšej diagnostike mnohých ochorení. Pomocou vhodne zvoleného algoritmu je možný spoľahlivý manažment pacientov či samotné sledovanie liečebnej odpovede.

## Podakovanie

Tento článok vznikol vďaka podpore projektu VEGA 1/0906/14.

## LITERATÚRA

- Boyle EM, Davies FE, Leleu X, et al. Understanding the multiple biological aspect leading to myeloma. *Haematologica* 2014; 99(4): 605-612.
- Matsui W, Wang Q, Barber JP, et al. Clonogenic Multiple Myeloma Progenitors, Stem Cell Properties, and Drug Resistance. *Cancer Res* 2008; 68(1): 190-197.
- Chesi M, Bergsagel PL. Molecular pathogenesis of multiple myeloma: basic and clinical updates. *Int J Hematol* 2013; 97: 313-323.
- Korde N, Kristinsson SY, Landgren O. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering multiple myeloma (SMM): novel biological insights and development of early treatment strategies. *Blood* 2011; 117(21): 5573-5581.
- Kristinsson SY, Goldin LR, Björkholm M, et al. Genetic and immune-related factors in the pathogenesis of lymphoproliferative and plasma cell malignancies. *Haematologica*, 2009 94: 1581-1589.
- Chesi M, Bergsagel PL. Many Multiple Myelomas: Making More of the Molecular Mayhem. *Hematology* 2011; 344-353.
- Raab MS, Podar K, Breitkreutz I, et al. Multiple myeloma. *Lancet* 2009; 374: 324-329.
- Braggio E, Philipsborn C, Novak A, et al. Molecular Pathogenesis of Waldenström's Macroglobulinemia. *Haematologica* 2012; 97(9): 1281-1290.
- Olson A, Lee MS, Kissner TL, et al. Discovery of Small Molecule Inhibitors of MyD88-Dependent Signaling Pathways Using a Computational Screen. 2015; Online Available: [www.nature.com/scientificreports](http://www.nature.com/scientificreports).
- Treon SP, Hunter ZR. A New Era for Waldenström Macroglobulinemia: MYD88 L265P. *Blood* 2013; 121(22): 4434-4436.
- Hamadeh F, MacNamara SP, Aguilera NS, et al. MYD88 L265P mutation analysis helps define nodal lymphoplasmacytic lymphoma. *Modern Pathology* 2015; 28: 564-574.
- Molle P. Current Trends in the Diagnosis, Therapy and Monitoring of the Monoclonal Gammopathies. *Clin Biochem Rev* 2009; 30: 93-103.
- Špička I, Bartůnková J, Campr V, et al. Mnohopočetný myelóm a ďalší monoklonální gamapatie. Praha: Galén 2005. 125p.
- Ansell SM, Kyle RA, Reeder CB, et al. Diagnosis and Management of Waldenström Macroglobulinemia: Mayo Stratification of Macroglobulinemia and Risk-Adapted Therapy (mSMART) Guidelines. *Mayo Clin Proc* 2010; 85(9): 824-833.
- Varettoni M, Arcaini L, Zibellini S, et al. Prevalence and Clinical Significance of the MYD88 (L265P) Somatic Mutation in Waldenström's Macroglobulinemia and Related Lymphoid Neoplasms. *Blood* 2013; 121(13): 2522-2528.



**Mgr. Lucia Tatayová**

Medirex, a. s.

Galvaniho 17/C, 820 16, Bratislava

e-mail: [lucia.tatayova@medirex.sk](mailto:lucia.tatayova@medirex.sk)

## Molekulová analýza prognosticky významných markerov chronickej lymfocytovej leukémie

Mgr. Erika Tomková, Mgr. Jakub Petřík, RNDr. Renata Lukačková, RNDr. Miroslav Tomka, PhD.  
Medirex, a. s., Bratislava

Chronická lymfocytová leukémia (CLL) je klinicky a biologicky značne heterogénne ochorenie. Pacienti sa vo všeobecnosti rozdeľujú na dve skupiny, a to na pacientov s indolentnou formou ochorenia a pacientov s agresívnou formou so zlou prognózou. Najspoľahlivejšími prognostickými markermi využívanými v klinickej praxi sú stanovenie mutačného statusu génu *IGHV*, ktorý kóduje variabilnú oblasť ťažkého reťazca imunoglobulínu, a detekcia významných chromozómových aberácií. V súbore 200 pacientov sme študovali zastúpenie a mutačný status génov *IGHV* a zisťovali prítomnosť trizómie 12 a delécií 11q22-23, 13q14 a 17p13 v slovenskej populácii. Na záver sme sa snažili interpretovať vzájomný vzťah týchto prognostických markerov.

**Kľúčové slová:** chronická lymfocytová leukémia, prognostické markery, chromozómové aberácie, *IGHV*

### *Molecular analysis of significant prognostic markers in chronic lymphocytic leukaemia*

Chronic lymphocytic leukaemia (CLL) is a clinically and biologically heterogeneous disease. The majority of patients have an indolent disease course, while others may experience a far more aggressive disease and poor overall survival. Two of the most reliable molecular prognostic markers, both of which are offered in routine diagnostics, are the mutational status of the immunoglobulin heavy chain variable region gene (*IGHV*) and detection of relevant genomic aberrations. Here, we studied repertoire and mutational status of *IGHV* genes, and the presence of trisomy 12 and deletions of 11q22-23, 13q14, 17p13 in a cohort of 200 patients from Slovakia. Finally, we tried to interpret the relationship of these prognostic markers.

**Keywords:** chronic lymphocytic leukaemia, prognostic markers, genetic aberrations, *IGHV*

NewsLab, 2017; roč. 8(1): 38 – 43

### Úvod

Chronická lymfocytová leukémia (CLL) je lymfoproliferatívne ochorenie charakterizované akumuláciou zrelých monoklonálnych B-lymfocytov v periférnej krvi, kostnej dreni a lymfatických tkanivách. Je najčastejšou leukémiou dospelých západného sveta a postihuje najmä pacientov starších ako 50 rokov. Pri CLL bola pozorovaná značná diverzita v morfológii, imunofenotype, cytogenetike a molekulových znakoch buniek, ktorá vyúsťuje do variabilného klinického priebehu a odpovede na liečbu. Približne jedna tretina pacientov preživa dlhšie ako 20 rokov po diagnostikovaní ochorenia a nevyžaduje terapiu, u niektorých pacientov, naopak, ochorenie rapídne progreduje a je spojené s ďalšími komplikáciami<sup>(1)</sup>.

Vzhľadom na klinickú heterogenitu CLL bolo potrebné nájsť vhodné parametre na stratifikáciu pacientov do prognostických skupín s cieľom uľahčiť výber vhodnej liečebnej stratégie od „watch-and-wait“ po alogénnu transplantáciu kmeňových buniek. V súčasnosti je určenie rizikového profilu CLL založené na identifikácii tzv. nových prognostických faktorov, medzi ktoré patria aj chromozómové aberácie a mutačný stav génu *IGHV*. Tieto faktory sú nezávislé od klinického štádia a umožňujú predikovať prognózu ochorenia už v čase diagnózy. Znalosť genotypu CLL buniek je základom individuálneho prístupu ku každému pacientovi a ovplyvňuje terapeutický postup<sup>(2)</sup>.

### Chromozómové aberácie

Napriek relatívnej genómovej stabilite CLL buniek sa až u 80 % pacientov vyskytujú chromozómové aberácie<sup>(3)</sup>.

Najčastejšími chromozómovými abnormalitami s prognostickým charakterom sú parciálne delécie 13q14, 11q22-23 a 17p13, menej frekvencovaná je trizómia chromozómu 12. Delécia 13q14 predstavuje najčastejšiu cytogenetickú aberáciu pri CLL. Samostatná del13q14 je charakterizovaná benigným priebehom ochorenia, v prípade kombinácie s inou aberáciou sa jej pozitívny prognostický význam stráca. Trizómia 12 je najčastejšou CLL aberáciou, pri ktorej dochádza k amplifikácii genetického materiálu. V niektorých prípadoch ide len o duplikáciu segmentu medzi 12q13 a 12q21.2<sup>(4)</sup>. Delécia 11q22-23 je asociovaná s horšou prognózou, pretože narúša expresiu génu *ATM* (ataxia teleangiectasia mutated), spôsobuje dereguláciu bunkového cyklu a vedie k akumulácii malígnych B-lymfocytov náchylných na vznik prídavných genetických aberácií. Delécia 17p13 je asociovaná s veľmi agresívnym priebehom ochorenia a so slabou odpoveďou na terapiu v dôsledku deregulácie expresie *TP53*<sup>(3)</sup>. Prítomnosť aberácií *TP53* zaraďuje pacienta do „ultra high-risk“ CLL skupiny. Zriedka sa vyskytuje samostatne, zvyčajne je asociovaná s ďalšími aberáciami<sup>(5)</sup>.

### Somatické mutácie *IGHV*

Nezávislým prognosticky významným markerom CLL je stanovenie mutačného statusu *IGHV*, ktorý kóduje variabilnú oblasť ťažkého reťazca imunoglobulínov. V roku 1999 Damle a kolektív uverejnili publikáciu, kde vysvetľujú heterogenitu, ktorá bola v praxi pozorovaná u pacientov s CLL. Podľa mutačného stavu *IGHV* rozdelili pacientov na dve skupiny. Pacienti s rozdielom v nukleotidovej sekvencii oproti zárodočnej línii > 2 %, t. j. mutovaným stavom *IGHV* génu (*M-IGHV*), sú

charakteristickí miernejším priebehom ochorenia. Tento stav je považovaný za prognosticky priaznivý a definuje potenciálne indolentnú formu CLL. U pacientov s rozdielom oproti zárodočnej línii  $\leq 2\%$ , t. j. nemutovaným stavom *IGHV* génu (*UM-IGHV*), tento stav koreluje s horšou prognózou a kratším prežívaním. Pacienti s *UM-IGHV* sú náchylní na vývin cytogenetických abnormalít alebo na tzv. Richterovu transformáciu (transformácia CLL na vyšší stupeň malignity)<sup>(6)</sup>. Okrem rozdielov v dĺžke prežívania boli medzi týmito dvoma skupinami pacientov pozorované rozdiely v prítomnosti nepriaznivých cytogenetických abnormalít. Nepriaznivé aberácie (del11q22-23, del17p13) sa objavujú častejšie u pacientov s *UM-IGHV*, priaznivá aberácia (samostatná del13q14) je častejšie asociovaná s *M-IGHV*<sup>(7)</sup>. Táto nevyvážená distribúcia len zdôrazňuje rozdielne biologické pozadie CLL podskupín s mutovaným a nemutovaným *IGHV*, ale len čiastočne vysvetľuje ich rozdielny klinický priebeh<sup>(8)</sup>.

## Materiál a metodika

### Súbor pacientov

Za obdobie 8/2015 – 2/2016 sme vyšetrili 200 pacientov s podozrením na CLL. Súbor pacientov pozostával zo 109 mužov a z 91 žien. Pacienti boli v čase diagnózy vo veku 34 – 89 rokov. Na molekulovú analýzu sme používali periférnu krv alebo kostnú dreň, ktoré boli odobraté do skúmaviek s EDTA a zároveň do skúmaviek TEMPUS. Vzorky DNA na analýzu MLPA boli izolované kitom Magnesia 16 Genomic DNA Whole Blood Kit (Anatolia Geneworks). Vzorky RNA na analýzu *IGHV* mutačného statusu boli izolované pomocou kitu Tempus Spin RNA Isolation Kit (ThermoFisher Scientific).

### IGH Somatic Hypermutation Assay

Princípom metódy je fragmentová analýza, pomocou ktorej sme identifikovali prestavby génu *IGH* (gén pre ťažký reťazec imunoglobulínu), a Sangerovo sekvenovanie, ktorým sme zisťovali mutačný status génu *IGHV*. Používali sme IGH Somatic Hypermutation Assay v2.0 – Gel Detection kit (Invivoscribe), IGH Somatic Hypermutation Assay v2.0 – ABI Fluorescence Detection kit (Invivoscribe) a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher Scientific). PCR produkty boli separované pomocou genetického analyzátoru ABI 3500 Series Genetic Analyzer (ThermoFisher Scientific). Fragmentovú analýzu sme vyhodnotili v softvéri GeneMapper Software 5 (ThermoFisher Scientific), na hodnotenie sekvenovania sme použili softvér Sequencing Analysis Software v6.0 (ThermoFisher Scientific). Po analýze sme sekvencie vzoriek porovnali so sekvenciami *IGHV* génu zárodočnej línii B-lymfocytov pomocou databázy IMG/VT-QUEST.

### MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification)

Chromozómové aberácie sme detegovali u pacientov metódou MLPA, ktorej princípom je hybridizácia špecifických prôb na cieľové sekvencie DNA. Používali sme kit SALSA MLPA P040 CLL probemix kit (MRC-Holland) obsahujúci sondy pre niekoľko chromozómových oblastí, ktoré majú u pacientov s CLL diagnosticky alebo prognosticky významnú úlohu: 11q22-23, chromozóm 12, 13q a 17p. PCR produkty boli separované pomocou genetického analyzátoru ABI 3500 Series

Genetic Analyzer (ThermoFisher Scientific), výsledky sme vyhodnotili v softvéri Coffalyser.Net Software (MRC-Holland).

### Štatistická analýza

Na vyhodnotenie frekvencií mutačného statusu *IGHV* a interpretáciu vzťahu medzi výskytom chromozómových aberácií a mutačným stavom *IGHV* sme použili  $\chi^2$  test.

## Výsledky

### Stanovenie *IGHV* segmentu a mutačného statusu

Metódou fragmentovej analýzy sme v celom súbore pacientov stanovili klonalitu populácie B-lymfocytov. U 150 (75 %) pacientov sme preukázali monoklonálnu populáciu typickú pre CLL (**obrázok 1 (A)**), u zvyšných 50 (25 %) pacientov sme detegovali rôzne typy iných populácií (**obrázok 1 (B)**). Po stanovení klonality sme do ďalšieho skríningu zaradili 154 (77 %) pacientov, u ktorých bolo možné určiť *IGHV* segment a jeho mutačný status. Najčastejšie sa vyskytujúcim segmentom v súbore pacientov bol *IGHV1-69* prítomný u 22 (14,29 %) pacientov, a to výhradne v nemutovanom stave. Druhým najčastejšie sa vyskytujúcim segmentom bol *IGHV3-30* u 18 (11,69 %) pacientov. Všetky ostatné segmenty mali v súbore zastúpenie menej ako 10 %. Z týchto mali najvyššiu frekvenciu segmenty *IGHV3-21*, *IGHV3-7* a *IGHV4-34*, ktoré boli vo väčšine prípadov mutované. U jedného pacienta s biklonálnou populáciou B-lymfocytov bolo možné stanoviť výsledok pre oba klony: segment *IGHV1-69* v nemutovanom stave a segment *IGHV4-59* v mutovanom stave.

### Detekcia chromozómových aberácií

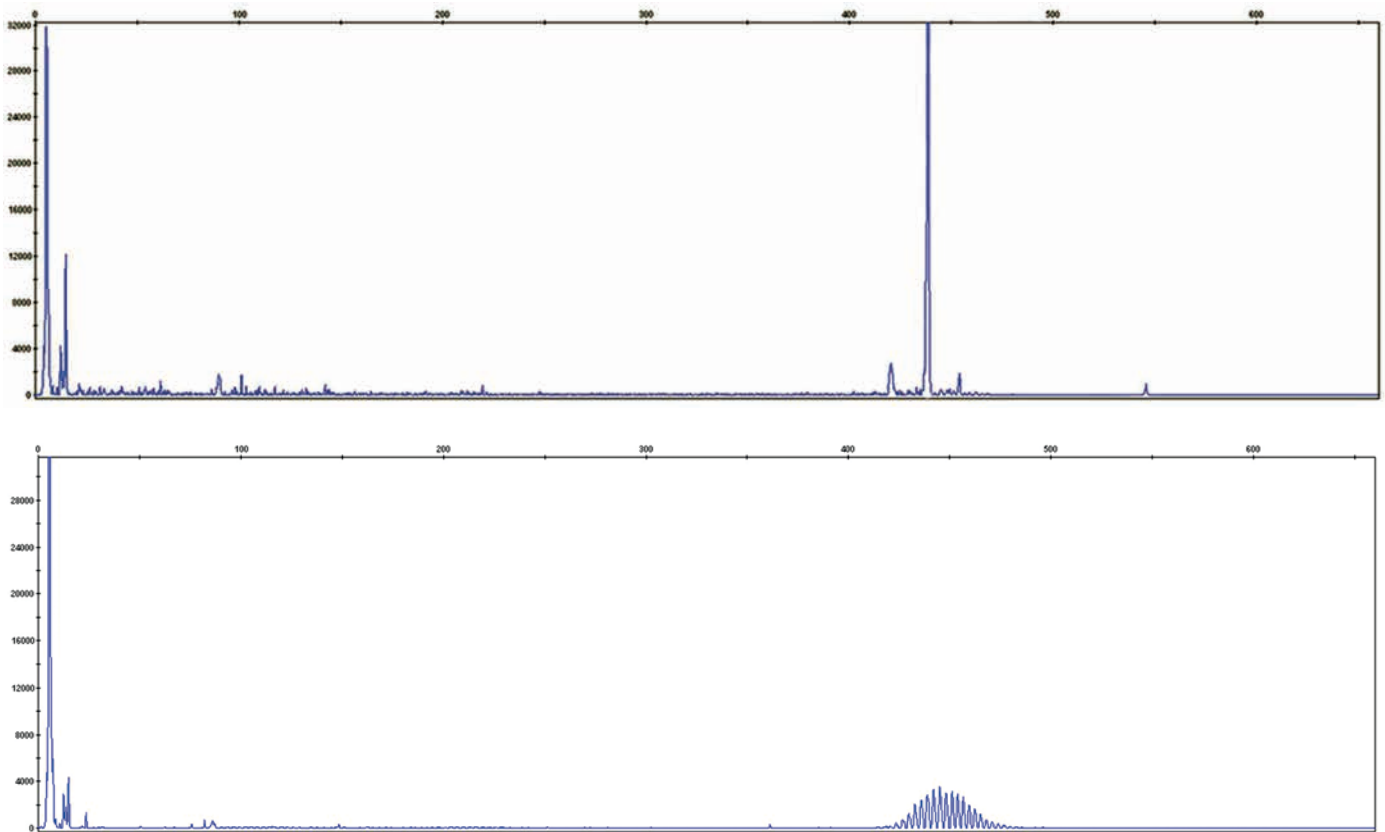
U pacientov sa chromozómové aberácie vyskytovali samostatne aj v rôznych kombináciách. U 79 (39,5 %) pacientov sme nedetegovali žiadnu aberáciu. Najväčšiu frekvenciu výskytu sme zaznamenali pri del13q14, a to celkovo u 85 (42,5 %) pacientov. Delécia sa najčastejšie vyskytovala samostatne, a to v 58 (68,24 %) prípadoch. Druhou najfrekvencovanejšou aberáciou bola del11q22-23, ktorú sme detegovali u 27 (13,5 %) pacientov. Parciálnu trizómiu 12 (**obrázok 2**) sme zaznamenali u 23 (11,5 %) pacientov. Najmenej početnou zo sledovaných aberácií bola del17p13 detegovaná u 10 (5 %) pacientov. V 3 (1,5 %) prípadoch sme pozorovali prítomnosť 3 aberácií súčasne. U 7 (3,5 %) pacientov bol výsledok neinformatívny.

### Diskusia

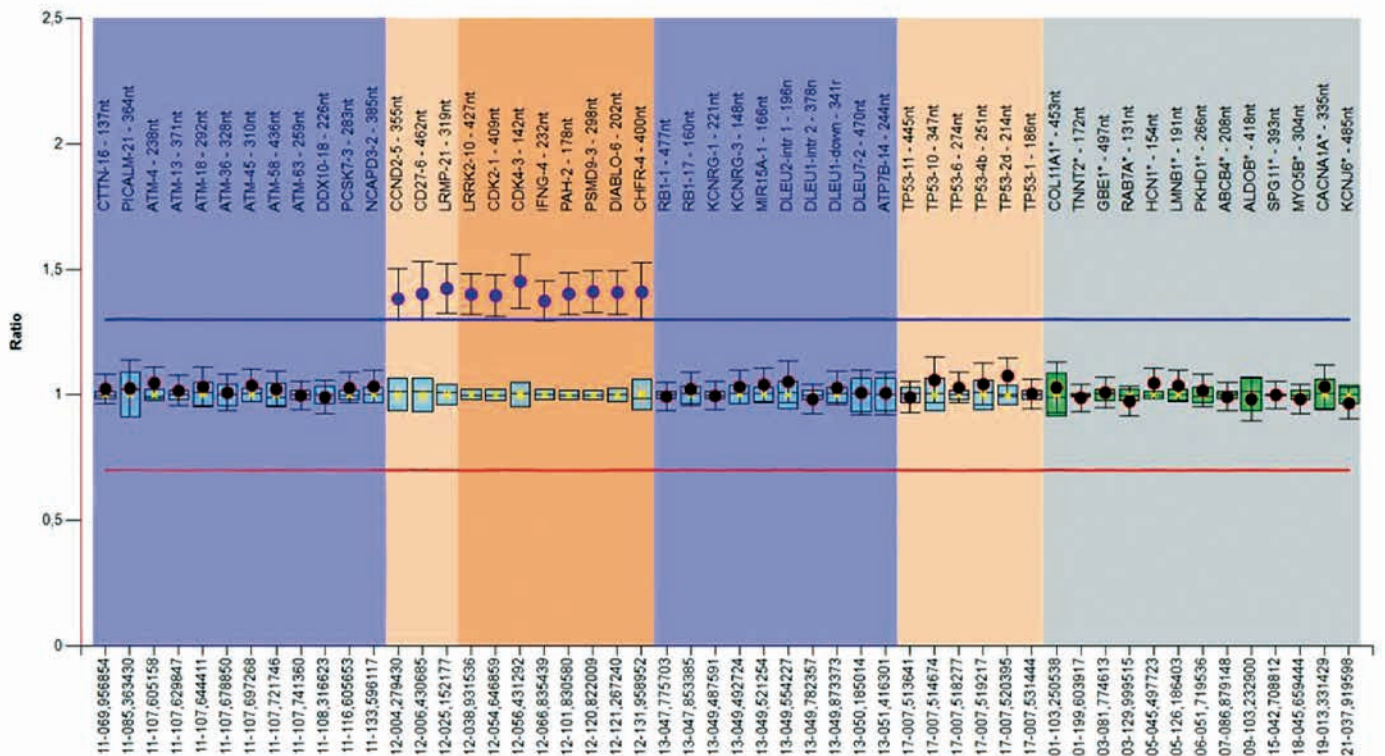
Klinický obraz CLL vyznačujúci sa stabilným priebehom ochorenia bez potreby liečebnej intervencie alebo, naopak, s vysokou početnosťou relapsov vyžadujúcich opakovanú terapiu je preukázateľne ovplyvnený výskytom genetických zmien v bunkách CLL. Hoci žiadna konkrétna genetická abnormalita nebola identifikovaná ako príčina vzniku CLL, ochorenie je charakteristické prítomnosťou molekulovogenetických markerov, na základe ktorých je možná stratifikácia pacientov do prognostických skupín a individuálny terapeutický prístup.

Polyklonalita populácie B-lymfocytov u zdravého jedinca je dôsledkom rôznorodej dĺžky preskupených génov *IGHV*. U pacienta s CLL je táto rôznorodosť z veľkej časti narušená, preto je pre CLL typická monoklonálna populácia, pri ktorej jeden klon úplne potlačil ostatné klony. Prítomnosť

**Obrázok 1.** Výsledky fragmentovej analýzy na určenie klonality populácie B-lymfocytov: (A) monoklonálna populácia, v ktorej je majoritný klon reprezentovaný jediným píkcom, (B) polyklonálna populácia, v ktorej píky reprezentujúce jednotlivé klony vytvárajú typický obraz Gausovej krivky



**Obrázok 2.** Výsledok analýzy MLPA pacienta pozitívneho na amplifikáciu 12q13 (duplikovaný úsek reprezentujú próby vyznačené modrou farbou vystúpené nad modrou líniou)





takejto populácie sme dokázali u 75 % pacientov. Polyklonálnu populáciu sme identifikovali u 16 % pacientov, u ktorých nebolo možné potvrdiť diagnózu CLL. V takýchto prípadoch je nutné kritické posúdenie nálezu a s odstupom času realizovať dodatočné vyšetrenia na stanovenie definitívnej diagnózy. U 3 % pacientov sme dokázali polyklonálnu populáciu, v ktorej mal jeden klon výrazné zastúpenie, a u jedného pacienta sme zistili dva prevažujúce klony. Prítomnosť polyklonálnej populácie, v ktorej pôvodne minoritný klon získal rastovú výhodu, sme považovali za znak subklonálnej selekcie. U takýchto pacientov je dôležitá stratégia „watch-and-wait“, teda pacienta dôkladne sledovať a časom vyšetrenia zopakovať na detekciu progresu ochorenia.

U 5 % pacientov sme detegovali biklonálnu populáciu. Takéto prípady sú zriedkavé a nie veľmi dobre charakterizované. Bolo navrhnutých niekoľko príčin, kedy u pacienta s CLL môže byť detegovateľná viac ako jedna *IGH* prestavba. Bunky CLL môžu exprimovať dva rôzne receptory BCR (B cell receptor), a teda sekretovať dva typy protilátok. Takéto bunky označujeme ako dvojnásobne produktívne (HCDP, heavy chain double productive)<sup>(9)</sup>. Druhou z možností je, že pacienti majú dve *IGH* prestavby detegovateľné pomocou PCR, ale iba jedna je produktívna a translatovaná do imunoglobulínu<sup>(10)</sup>. Ďalším možným vysvetlením biklonálneho modelu je, že v krvi pacienta sú naozaj prítomné dva malígne klony so samostatným pôvodom, pričom každý exprimuje iný imunoglobulín. V tomto prípade ide o pravú biklonálnu leukémiu<sup>(11)</sup>. Vysoký výskyt atypických modelov poukázal na dôležitosť vyšetrenia klonality nádorovej populácie u CLL suspektných pacientov.

Somatické mutácie génu *IGHV* sú prítomné asi v polovici prípadov CLL<sup>(6)</sup>. Nemutované CLL bunky pravdepodobne pochádzajú z B-lymfocytov, ktoré podstúpili antigénovú stimuláciu až po malígnej transformácii. Zachovávajú si reaktivitu na antigén, dôsledkom čoho je ich vysoká proliferačná aktivita. Naopak, mutované bunky CLL prešli malígnou transformáciou až po stimulácii antigénom, nemajú zachovanú signálnu kapacitu BCR receptora a prognóza je priaznivejšia<sup>(12)</sup>. *IGHV* segment a mutačný status bolo možné určiť u 77 % pacientov. U jedného pacienta s biklonálnou populáciou bolo možné stanoviť dva výsledky, celkovo sme teda analyzovali 154 pacientov, ale 155 segmentov (**graf 1**). Až 52,26 % segmentov nevykazovalo somatickú hypermutáciu, 47,74 % segmentov bolo v mutovanom stave. V porovnaní so svetovými štúdiami bola frekvencia mutovaných a nemutovaných *IGHV* génov rovnaká ako v populácii Spojených štátov (53 % *UM-IGHV*, 47 % *M-IGHV*)<sup>(13)</sup>. Celkovo sme zaznamenali 29 typov segmentov, pričom až 14 typov patrilo do génovej rodiny *IGHV3*. Z celkového počtu 155 identifikovaných génov tvorili segmenty tejto génovej rodiny až 52,26 % prípadov. *IGHV3* je vo všeobecnosti najrozšírenejšou génovou rodinou, čo potvrdzujú viaceré európske i svetové štúdie.

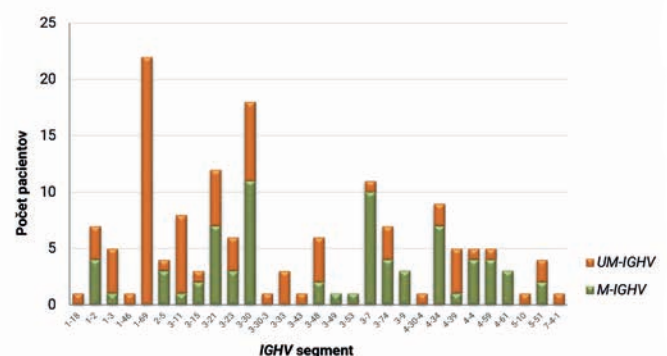
Najčastejšie sa vyskytujúcim segmentom v súbore bol *IGHV1-69* prítomný u 14,29 % pacientov a vyskytoval sa výhradne v nemutovanom stave. Veľmi podobná frekvencia bola reportovaná v populácii Švédska, kde bol tento segment tiež najfrekventovanejší a rovnako sa vyskytoval výhradne v nemutovanom stave<sup>(14)</sup>. Druhým najčastejším génom bol *IGHV3-30* zaznamenaný u 11,69 % pacientov, z toho u 61,11 % prípadov mutovaný. Segment bol tiež často reportovaný v oblasti Stredozemného mora<sup>(15)</sup>. *IGHV3-30* je vo

väčšine oblastí asociovaný s mutovaným stavom. Prítomnosť segmentu *IGHV3-21* sme stanovili u 7,79 % prípadov. Preferenčne sa vyskytoval mutovaný, a to u 58,33 % pacientov. *IGHV3-21* je asociovaný s horšou prognózou bez ohľadu na mutačný status<sup>(16)</sup>. Najvyššia prevalencia génu bola publikovaná v Škandinávii (11,2 %), kde sa vyskytoval prevažne v mutovanom stave<sup>(14)</sup>. Naopak, v populáciách južnej Európy (Francúzsko, Grécko, Taliansko, Španielsko) je výskyt *IGHV3-21* značne nižší (2,9 %) a nižšia je aj prítomnosť somatickej hypermutácie<sup>(15)</sup>. Rozdiely vo výskyte jednotlivých génov *IGHV* pravdepodobne reflektujú nielen variácie v genetickom pozadí CLL, ale aj leukemickú variabilitu dependentnú od geografickej polohy<sup>(17)</sup>. Tieto rozdiely tiež môžu znamenať, že prestavby *IGH* génu kódujú špecifický epitop, na ktorý sa viaže neznámy antigén a stimuluje proliferáciu B-lymfocytov<sup>(14)</sup>.

Napriek relatívnej genómovej stabilite buniek CLL sa až u 80 % pacientov vyskytujú chromozómové aberácie. Vo všeobecnosti majú pacienti s del17p13 a del11q22-23 horšiu prognózu a kratšie prežívanie, pretože narúšajú expresiu tumor-supresorových génov *TP53* a *ATM*. Prítomnosť del13q14 má pri samostatnom výskyte priaznivý prognostický charakter a prognostický význam trizómie 12 je sporný<sup>(3)</sup>. Prítomnosť aberácií sme dokázali u 57 % pacientov. U 39,5 % pacientov sme nedetegovali žiadnu abnormalitu a v 3,5 % prípadov nebolo možné výsledky vyhodnotiť. Ak by sme vyhodnotili len 168 pacientov, u ktorých sme potvrdili plne vyvinutú CLL (prípady s monoklonálnou populáciou) alebo vyvíjajúcu sa CLL (prípady s atypickým modelom populácie), prítomnosť aberácie by sme detegovali u 64,88 % pacientov. Dané výsledky neboli v súlade s publikovanými údajmi iných štúdií, ale boli značne nižšie. Nemecké štúdie uvádzajú frekvenciu chromozómových abnormalít 82 – 85,2 %<sup>(3,18)</sup>, frekvencia vo Veľkej Británii je 69 %<sup>(19)</sup> a v USA 72,5 %<sup>(20)</sup>. Uvedený rozdiel mohol byť ovplyvnený viacerými faktormi, napr. kompozíciou a veľkosťou súboru, rozdielmi v indikačných kritériách či metodickými rozdielmi.

U 12,5 % pacientov sme neidentifikovali žiadnu aberáciu a súčasne sme pozorovali polyklonálny model populácie. Takíto pacienti nevykazujú žiadne základné molekulogenetické znaky rozvíjajúceho sa ochorenia CLL. Normálny karyotyp sme pozorovali aj v 24 % prípadov s monoklonálnou populáciou, čo je priaznivý prognostický znak. U pacientov s atypickým modelom populácie (polyklonálna s jedným alebo dvoma prevažujúcimi klonmi, biklonálna, triklonálna,) sme nezaznamenali asociáciu so žiadnou špecifickou aberáciou.

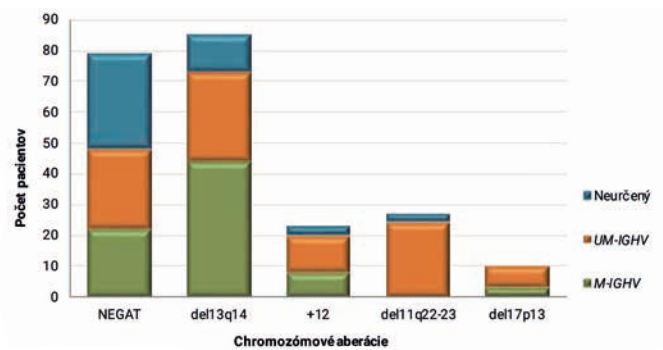
**Graf 1.** Mutačný status *IGHV* segmentov v súbore pacientov



Najväčšiu frekvenciu výskytu sme zaznamenali pri del13q14, a to celkovo u 42,5 % pacientov. Delícia sa najčastejšie vyskytovala samostatne, a to u 68,24 % pacientov. Prevalencia a samostatný výskyt boli najviac podobné stavu v USA (62 %)<sup>(20)</sup>. Pre pacientov predstavuje samostatný výskyt tejto aberácie priaznivú prognózu. U 31,76 % pacientov bola pozorovaná spolu s niektorou ďalšou aberáciou a jej priaznivý prognostický význam sa strácal. Del13q14 bola jedinou aberáciou, ktorú sme dokázali u pacientov s polyklonalitou B-lymfocytov. Vysvetlením tohto faktu môže byť, že delícia postihuje gény *MIR15A* a *MIR161* kódujúce miRNA, ktorých úlohou je negatívna regulácia génu *BCL2* (B cell lymphoma 2) na posttranskripčnej úrovni. Pri delícii týchto génov dochádza k zvýšenej expresii antiapoptotického proteínu Bcl2, čo môže spôsobiť perzistentnú lymfocytózu aj u pacientov s polyklonálnou populáciou. Druhou najfrekvencijou bola del11q22-23, ktorú sme detegovali u 13,5 % pacientov. Prevalencia delície bola podobná Nemecku (12 %)<sup>(18)</sup>. Bunky CLL s del11q22-23 sú náchylnejšie na vznik ďalších genetických aberácií<sup>(5)</sup>. Prítomnosť parciálnej trizómie 12 sme zaznamenali u 11,5 % pacientov a jej výskyt bol v súlade s frekvenciou u nemeckých pacientov (13,6 %)<sup>(18)</sup>. Trizómia 12 je považovaná za marker s intermediárnou prognostickou hodnotou<sup>(3)</sup>. Najmenej početná zo sledovaných aberácií bola del17p13, detegovaná u 5 % pacientov. Výskyt delície sa zhoduje s britskou (6 %)<sup>(19)</sup> a nemeckou populáciou (7 %)<sup>(18)</sup>. Bez ohľadu na prítomnosť inej aberácie je asociovaná s veľmi agresívnym priebehom ochorenia, pretože narúša expresiu génu *TP53*<sup>(3)</sup>. U 1,5 % pacientov sme zaznamenali prítomnosť 3 aberácií súčasne, čo je indikátorom agresívneho priebehu ochorenia. Nižšiu frekvenciu chromozómových abnormalít v porovnaní so zahraničnými štúdiami pripisujeme ich zachyteniu v raných štádiách ochorenia. Neprítomnosť aberácie sa však môže časom zmeniť v dôsledku klonálnej evolúcie buniek CLL.

V súbore pacientov sme tiež sledovali vzájomný vzťah mutačného statusu *IGHV* s výskytom chromozómových aberácií (graf 2). Zo 79 pacientov negatívnych na chromozómové aberácie sme v 32,91 % prípadov stanovili nemutovaný stav *IGHV*, u 27,85 % pacientov stav mutovaný. U 39,24 % negatívnych pacientov s polyklonálnou, biklonálnou a triklonálnou populáciou sme mutačný status neurčovali. Vzhľadom na rovnomerné percentuálne zastúpenie jednotlivých kategórií sme neidentifikovali žiaden preferenčný mutačný status. Del13q14 bola prevažne, t. j. u 51,76 % prípadov, asociovaná s *M-IGHV*. U týchto pacientov bola jedinou detegovanou aberáciou, čo potvrdzuje jej priaznivý prognostický význam. U 34,12 % pacientov sa vyskytovala v spojení s *UM-IGHV*, pričom bola u nich okrem del13q14 pozorovaná ešte aspoň jedna aberácia. Vzťah chromozómových aberácií s mutačným statusom potvrdil koreláciu prognosticky priaznivej aberácie, samostatnej del13q14, s mutovaným stavom *IGHV*. Trizómiu

**Graf 2.** Zastúpenie chromozómových aberácií a ich asociácia s mutačným statusom *IGHV* v súbore pacientov



12 sme pozorovali v asociácii s *UM-IGHV* u 52,17 % pacientov, v 34,79 % prípadov bola asociovaná s *M-IGHV*. Preferenčný status však nebolo možné určiť, pretože rozdiel vo frekvenciách nebol preukazný ( $P = 0,0706$ ), čo naznačuje intermediárnu prognostickú hodnotu. Del11q22-23 sa vyskytovala výhradne u pacientov s *UM-IGHV* a nikdy sa nevyskytovala u pacientov s typickou polyklonalitou. Dosažené výsledky potvrdili negatívny prognostický význam del11q22-23. Delíciu 17p13 sa najmenej priaznivou prognózou sme v 70 % prípadov pozorovali s *UM-IGHV*, čo potvrdzuje ich koreláciu. Mutačný status tiež súvisel s počtom chromozómových abnormalít. U 28 pacientov sme detegovali prítomnosť dvoch a viacerých aberácií, z toho 67,88 % prípadov bolo asociovaných s nepriaznivým nemutovaným stavom *IGHV*. Pozorovaný vzťah chromozómových aberácií s mutačným statusom potvrdil prognostickú koreláciu a výsledky boli v súlade so štúdiami z Nemecka<sup>(18)</sup> či Veľkej Británie<sup>(19)</sup>.

## Záver

V súčasnosti je hlavným vedeckým cieľom analýzy prognostických markerov nájsť genetické vysvetlenie klinickej heterogenity CLL. Molekulovogenetické parametre, ako je mutačný status *IGHV* a chromozómové aberácie, boli úspešne zavedené do klinickej praxe. V predloženej štúdii sme preukázali, že stav týchto parametrov v slovenskej populácii je intermediárny, pretože so žiadnou zo zahraničných štúdií sa nezhodoval úplne. Naznačuje to nielen genetické pozadie ochorenia, ale aj existenciu environmentálneho antigénového tlaku na selekciu B-lymfocytov. Výsledkom správnej detekcie a interpretácie prognostických faktorov je skorá stratifikácia pacientov do prognostických skupín pre voľbu vhodnej terapeutickú stratégiu a následné zlepšenie klinickej starostlivosti.

## Podakovanie

Moja vďaka patrí všetkým kolegom, ktorí sa podieľali na príprave a vyhodnocovaní vzoriek pacientov vyšetřovaného súboru.

## LITERATÚRA

- Rodríguez D, Bretones G, Arango JR, et al. Molecular pathogenesis of CLL and its evolution. *International Journal of Hematology* 2015; 101(3): 219-228.
- Balhárek T, Barthová M, Szépe P, et al. Komentár k vývoju konceptu prognostických faktorov chronickej lymfocytovej leukémie: Cesta od prognostických faktorov k prediktorom liečebnej odpovede. *Klinická Onkologie* 2009; 22(6): 254-263.

- Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine* 2000; 343(26): 1910-1916.
- Cuneo A, Cavazzini F, Ciccone M, et al. Molecular cytogenetic lesions in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Meeting Reports* 2009; 3(3): 86-90.

5. Copáková L, Piačková B, Leitnerová M. Význam delécie a mutácie génu TP53 a ďalších prognostických markerov u pacientov s CLL. *Onkológia* 2014; 9(2): 100-103.
6. Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94(6): 1840-1847.
7. Kröber A, Seiler T, Benner A, et al. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 100(4): 1410-1416.
8. Rodríguez-Vicente AE, Díaz MG, Hernández-Rivas JM. Chronic lymphocytic leukemia: a clinical and molecular heterogeneous disease. *Cancer Genetics* 2013; 206(3): 49-62.
9. Kalmanovich G, Mehr R. Models for antigen receptor gene rearrangement. iii. heavy and light chain allelic exclusion. *The Journal of Immunology* 2003; 170(1): 182-193.
10. Buc M. *Imunológia*. Bratislava: Veda 2001; 463 pp.
11. Chang H, Cerny J. Molecular characterization of chronic lymphocytic leukemia with two distinct cell populations: Evidence for separate clonal origins. *American Journal of Clinical Pathology* 2006; 126(1): 23-28.
12. Stevenson FK, Krysov S, Davies AJ, et al. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011; 118(16): 4313-4320.
13. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, et al. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine* 2004; 351(9): 893-901.
14. Tobin G, Thunberg U, Johnson A, et al. Somatic mutated IgVH3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 99(6): 2262-2264.
15. Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, et al. Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene. *Blood* 2005; 105(4): 1678-1685.
16. Dal-Bo M, Del Giudice I, Bomben R, et al. B-cell receptor, clinical course and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia: the growing saga of the IGHV3 subgroup gene usage. *British Journal of Haematology* 2011; 153(1): 3-14.
17. René C, Prat N, Thuizat A, et al. Comprehensive characterization of immunoglobulin gene rearrangements in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2014; 18(6): 979-990.
18. Haferlach C, Dicker F, Schnittger S, et al. Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV<sub>H</sub> status and immunophenotyping. *Leukemia* 2007; 21(12): 2442-2451.
19. Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ, et al. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood* 2002; 100(4): 1177-84.
20. Nelson BP, Gupta R, Dewald GW, et al. Chronic lymphocytic leukemia FISH panel: impact on diagnosis. *American Journal of Clinical Pathology* 2007; 128(2): 323-332.



**Mgr. Erika Tomková**

Medirex, a. s.

Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava

e-mail: erika.tomkova@medirex.sk



**BIOG**  
MEDICÍNSKA TECHNIKA



## Malígný melanóm – nové aspekty výskumu

MUDr. Pavol Janega, PhD.<sup>1,3,4</sup>, RNDr. Tomáš Szemes, PhD.<sup>2,5</sup>, RNDr. Gabriel Minárik, PhD.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o., Bratislava

<sup>2</sup>Geneton, s. r. o., Bratislava

<sup>3</sup>Ústav patologickej anatómie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

<sup>4</sup>Ústav normálnej a patologickej fyziológie, Slovenská akadémia vied, Bratislava

<sup>5</sup>Centrum genomiky, Univerzitný vedecký park, Univerzita Komenského v Bratislave

Malígný melanóm patrí v Slovenskej republike medzi nádory s neustále rastúcou incidenciou a mortalitou. Problematika malígneho melanómu bola a v súčasnosti je predmetom intenzívneho výskumu mnohých projektov. Ich ciele sú zamerané na identifikáciu nových diagnostických a prognostických markerov, ale najmä potenciálnych terapeutických cieľov. Prognóza pacientov sa za posledné roky zlepšila. Súvisí to najmä so zavedením nových terapeutických postupov v liečbe malígneho melanómu. Cielená terapia a hlavne inhibítory imunitnej odpovede priniesli zásadný obrat v liečbe metastázujúcich malígnych melanómov. Aplikácia výsledkov výskumu do praxe predstavuje do budúcnosti novú nádej pre pacientov s malígnym melanómom.

**Kľúčové slová:** malígný melanóm, výskum, review, súčasný pohľad

### *Malignant melanoma – new research aspects*

Malignant melanoma belongs to cancer with increasing incidence and mortality in the Slovak Republic. The current issue of malignant melanoma has been and still is the subject of intensive research in many projects. Their objectives aim to identify new diagnostic and prognostic markers, with emphasis on therapeutic targets. The prognosis of patients has improved in recent years. It is particularly related to new therapies in the treatment of malignant melanoma. The targeted therapy and especially the use of immune response inhibitors brought a turning point in the treatment of metastatic malignant melanoma. Application of research results in practice represents new hope for patients with malignant melanoma in the future.

**Keywords:** malignant melanoma, research, review, current concept

NewsLab, 2017; roč. 8(1): 44 – 47

Aj keď malígný melanóm nepatrí v Slovenskej republike medzi malígne nádory s najvyššou incidenciou, je závažný svojou relatívne vysokou mortalitou, najmä v prípade, ak je zachytený v neskorších štádiách choroby. Alarmujúca je stále stúpajúca incidencia tohto nádoru v celej Európe. V Slovenskej republike sa jeho výskyt za posledných 30 rokov viac ako strojnásobil, v roku 1978 bola incidencia 3,9 na 100 000 obyvateľov, v roku 2007 dosiahla 12,19 na 100 000 obyvateľov (**graf 1**)<sup>(1)</sup>. Kritický je aj štvornásobný vzostup mortality za rovnaký časový interval, z 0,8 na 100 000 obyvateľov v roku 1978 na hodnotu 3,65 na 100 000 obyvateľov v roku 2010. Výskyt melanómu sa v posledných desaťročiach zvyšuje najmä v populácii ľudí starších ako 45 rokov, incidencia u starších ako 70 rokov je viac ako 40 na 100 000 obyvateľov (**graf 2**)<sup>(1)</sup>.

Kľúčovým rizikovým faktorom jeho vzniku je expozícia UV žiareniu. Nádor je preventabilný, vyhýbanie priamemu slnečnému žiareniu či používanie protektívnych prípravkov znižuje riziko jeho vzniku u predisponovaných ľudí.

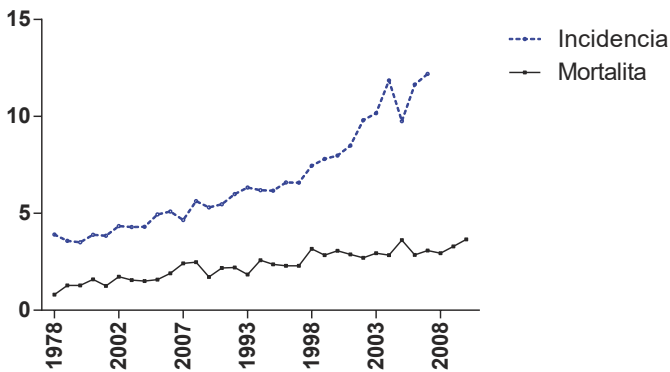
Sekundárna prevencia, odborné dermatologické vyšetrenie s použitím dermatoskopu umožní zachytenie skorých neinvazívnych alebo nízkoinvazívnych lézií. Práve skorá detekcia výrazným spôsobom zvyšuje prežívanie pacientov. Väčšina melanómov je vďaka dostupnosti vyšetrovacích

metód a vďaka dlhodobému vzdelávaniu populácie o rizikách zachytená v skorom, teda liečiteľnom štádiu. Päťročné prežívanie je priemerne 91 %, v prípade lokalizovaného nádoru až 98 %. Prežívanie však výrazne klesá, ak je choroba zachytená v neskoršom štádiu<sup>(2)</sup>. Metastázujúci melanóm predstavuje jeden z najagresívnejších a najrýchlejšie progredujúcich nádorov historicky len s veľmi obmedzenými možnosťami efektívnej liečby. V prípadoch metastázujúceho melanómu je 10-ročné prežívanie menšie ako 10 %<sup>(3)</sup>. Problémom je aj skutočnosť, že napriek včasnému zachyteniu a terapii v skorom štádiu nie sú výnimkou neskoré metastázy.

Problematika malígneho melanómu bola a v súčasnosti je predmetom intenzívneho výskumu. Ten umožnil objasniť viaceré molekulárne mechanizmy zodpovedné za transformáciu a rast melanómových buniek. Pozorované boli mutácie viacerých génov, kľúčových v iniciácii nádorovej transformácie. Zasiahnuté dráhy sú zaujímavé aj z hľadiska hľadania nových cieľov pre protinádorovú terapiu.

Historicky najznámejší mechanizmus iniciácie tumorigenézy malígneho melanómu súvisí s konštitutívnou aktiváciou proteínkinázovej dráhy aktivovanej mitogénom (MAPK), komplexnej signálnej dráhy zahrňujúcej proteíny RAS/RAF a ďalšie proteínkinázy vrátane MEK a ERK. Táto dráha sa ukazuje ako kritická aj pre rastovú fázu melanómu<sup>(4)</sup>. Odhaduje sa, že

**Graf 1.** Graf nárastu incidencie a mortality na malígnym melanóm v Slovenskej republike. Počet prípadov na 100 000 obyvateľov



Spracované podľa Steliarova-Foucher a spol.<sup>(1)</sup>

takmer polovica malígnych melanómov je asociovaná s aktivačnou mutáciou v MAPK dráhe<sup>(2,5)</sup>. Onkogénna aktivácia pri melanóme môže vzniknúť v dôsledku mutácie v ktoromkoľvek komponente alebo promotóre tejto dráhy<sup>(6)</sup>.

Charakteristickým iniciačným onkogénom zahrnutým v MAPK dráhe je mutovaný gén *BRAF* s bodovými mutáciami. Viac ako 50 percent melanómov nesie mutáciu v géne *BRAF* a z toho 80 percent predstavuje mutácia *BRAF* V600E (resp. V599E)<sup>(7,8)</sup>. Okrem onkogénnych mutácií v *BRAF* sú dobre opísané iniciačné onkogénne bodové mutácie v géne *NRAS* (15 – 20 %). Mutácie v *BRAF* géne sa spájajú typicky so vznikom melanómu šíriaceho sa povrchovo, v *NRAS* géne s nodulárnym melanómom<sup>(9)</sup>. Blokátory *BRAF* *vemurafenib* a *dabrafenib* sú štandardom v liečbe metastázujúceho malígneho melanómu kože<sup>(10)</sup>. Ukazuje sa, že súčasné podávanie inhibítora MEK *trametinib* zlepšuje prežívanie s dobrou toleranciou liečby<sup>(11)</sup>.

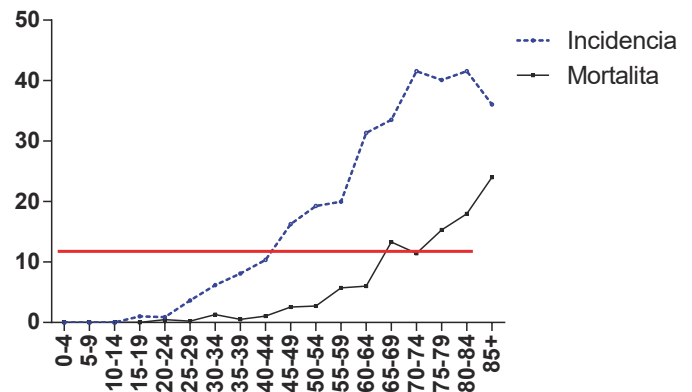
Aj keď mutácia v géne *BRAF* sa považuje za kľúčovú v iniciácii tumorigenézy, vyskytuje sa vo vysokom percente aj v bunkách benígnych névov, ktoré ešte nemajú vlastnosti malígneho procesu.

Opísané boli aj mutácie v *CDKN2A*, *PTEN*, *APAF1*, *TP53*, *GNAQ*, *GNA11*<sup>(6,7,12)</sup> aj aktivačné fúzie génu *BRAF* s receptorovými tyrozínkinázami *ALK*, *ROS1*, *RET*, *MET*, *NTRK1* a *ROS1*<sup>(13-15)</sup>. Samotné *GNAQ/GNA11* proteíny síce, ako sa zdá, nie sú vhodné na cieľnú terapiu, no ich aktivácia je čiastočne regulovaná prostredníctvom proteínu *YAP*<sup>(16)</sup>, ktorý môže mať terapeutický potenciál. V malígnom melanóme kože zatiaľ tento prístup použitý nebol.

Opisujú sa aj mutačné zmeny v dráhe p16INK4A-CDK4-RB (s mutačným postihnutím najmä *INK4A* alebo *CDK4*) a dráhy ARF-p53<sup>(17)</sup>. V menšej frekvencii boli pozorované aj mutácie v dráhe AKT/mTOR, ktorá reprezentuje pravdepodobne alternatívny mechanizmus aktivácie v malígnom melanóme<sup>(18)</sup>.

Veľmi zaujímavú oblasť výskumu predstavujú aj mutačné zmeny vo Wnt signálnej dráhe s  $\beta$ -katenínom ako kľúčovým komponentom. Zmeny aktivácie tejto dráhy vedú k zmenám fenotypu melanómových buniek, ovplyvňujú nádorové mikroprostredie, bunkový rast, invazivitu nádorových buniek aj vznik rezistencie na terapiu<sup>(19)</sup>. Z hľadiska nových terapeutických prístupov sa ukazuje ako zásadný aj vzťah Wnt

**Graf 2.** Incidencia a mortalita na malígnym melanóm v závislosti od vekovej skupiny pacientov



Počet prípadov na 100 000 obyvateľov. Spracované podľa Steliarova-Foucher a spol.<sup>(1)</sup>

signálnej dráhy k ovplyvneniu protinádorovej imunity v mikroprostredí buniek malígneho melanómu a k vzniku rezistencie na imunoterapiu<sup>(20)</sup>. Výskum naznačuje možné využitie viacerých molekúl tejto dráhy ako potenciálnych cieľov pre cieľnú terapiu.

Z hľadiska možného terapeutického ovplyvnenia sú zaujímavé aj antiapoptotické proteíny survivín a livín. Survivín je v malígnom melanóme exprimovaný vo zvýšenej miere vo väčšine prípadov<sup>(21)</sup>. Uvažuje sa, že práve upregulácia survivínu môže byť jedným zo stimulov nádorovej transformácie v névových bunkách. Takeuchi a spol.<sup>(22)</sup> preukázali, že nízka expresia survivínu v rekurentnom metastatickom malígnom melanóme kože je spájaná so signifikantne lepším prežívaním pacientov. Zvýšenú citlivosť buniek malígneho melanómu na chemoterapiu pri súčasnej inhibícii survivínu *in vitro* preukázal aj Pennati a spol.<sup>(23)</sup>. Výsledky publikovaných štúdií naznačujú, že môže ísť o nádejnú molekulu aj z hľadiska možného klinického ovplyvnenia.

Livín je nedávno opísaný proteín s komplexným prevažne antiapoptotickým, za určitých okolností proapoptotickým účinkom. Vyššia expresia preukázaná v malígnom melanóme kože koreluje s progresiou a so zlou prognózou pacientov<sup>(24)</sup>. Práve vysoká expresia livínu súvisí s rezistenciou na chemoterapiu, naznačujúc budúci cieľ výskumu cieľnej protinádorovej terapie<sup>(25,26)</sup>.

S aktivitou apoptotických dráh úzko súvisí regulácia PARP proteínu, ktorý je, naopak, zodpovedný za DNA reparáciu. Inhibícia PARP interferuje s kľúčovými procesmi metastázovania a inhibuje invazivitu a metastázovanie buniek malígneho melanómu kože do vzdialených orgánov<sup>(27)</sup>, predstavuje kľúčový marker agresívneho kožného MM<sup>(28)</sup>. Jeho cieľný blokátor *temozolomid* je v súčasnosti v štádiu klinického testovania (II. fáza).

Progresia melanómu je spojená so sériou onkogénnych udalostí, ktorá je charakterizovaná ako geneticky vysoko heterogénna. Identifikované boli viaceré kandidátne „driver“ mutácie, k najštudovanejším patria alternatívne transkripty génu *ALK*, identifikovateľné na úrovni prepisovanej RNA<sup>(29)</sup>. Častou „driver“ udalosťou pri rôznych variantoch melanómov je aj bialelická strata histónovej deubikvitinázy BAP1 ako *de novo* udalosť u ľudí s germinálnou poruchou jednej kópie

génu<sup>(30)</sup>. Viaceré subchromozomálne aberácie, zmeny v počte kópií repetitívnych elementov ako príčina mikrosatelitnej instability boli opísane pri metastázujúcich melanómoch<sup>(31,32)</sup>.

Študované boli a potenciálny klinický význam môžu mať aj epigenetické zmeny. Boli identifikované viaceré kandidátne gény, ktoré sú ovplyvnené aberantnou DNA metyláciou, resp. modifikáciou histónov, a kde sa ukazuje, že tieto zmeny korelujú s bunkovými charakteristikami nádoru a majú vplyv na klinickopatologický obraz choroby. Ako gény s najvyššou frekvenciou hypermetylácie sú študované najmä *RIL* a *ECAD*, *RASSF1A*, *NKX2-3*, *HAND1* a *OLIG2*. Ich potvrdenie v ďalších štádiách môže priniesť nové možnosti v terapii. Epigenetická terapia malígneho melanómu je síce nová oblasť, ale perspektívne s veľkým potenciálom a možným dosahom na pacientov<sup>(33)</sup>.

Štúdium transformácie névových buniek sa v poslednom čase zameriava najmä na problematiku regulácie aktivity a inhibície protinádorovej imunitnej reakcie. Protinádorová imunoterapia je založená na pôsobení vlastného imunitného systému pacienta. Využíva fyziologické princípy, prirodzenú schopnosť organizmu ničiť poškodené bunky vrátane nádorovo transformovaných buniek. Súčasná liečba sa orientuje najmä na inhibíciu kontrolných bodov imunitnej odpovede. Ich fyziologickou úlohou je zabrániť hyperaktivácii imunitného systému, a tým vzniku imunopatologických stavov. Bunky malígneho melanómu sú schopné využiť ich a uniknúť tak protinádorovej imunitnej odpovedi. Veľkým prevratom v terapii metastázujúceho malígneho melanómu sa stali ich inhibítory. V roku 2011 bola v liečbe malígneho melanómu schválená molekula *ipilimumab*, protilátka proti CTLA-4 receptoru, ktorá sa stala súčasťou bežnej klinickej praxe<sup>(34)</sup>. Veľmi perspektívne sa v štádiách ukazujú aj blokátory receptorov PD-1 *nivolumab* a *pembrolizumab*<sup>(35)</sup>. Perspektívna

môže byť aj protinádorová vakcinácia, aj adoptívny transfer imunokompetentných buniek<sup>(36)</sup>.

## Záver

Chirurgické odstránenie malígneho melanómu je základom terapie vo všetkých štádiách, nasledovaná v prípade I. a II. štádia lymfadenektómiou, v III., vo IV. štádiu a v prípadoch rekurentného melanómu imuno- a chemoterapiou. Práve zavedenie cielenej terapie, inhibítorov imunitnej regulácie ako anti-PD-1 (*nivolumab*, *pembrolizumab*), anti-CTLA-4 (*ipilimumab*) a cieleňá terapia inhibítormi BRAF proteínu (*vemurafenib* a *dabrafenib*), prípadne MEK inhibítorov (*trametinib*, *cobimetinib*) predstavujú zásadný obrat v liečbe neresekovateľných a metastázujúcich malígnych melanómov a sú testované v klinických skúškach.

Problémom je však výrazná heterogenita melanómových buniek, umožňujúca nádoru meniť nádorové mikroprostredie a unikať terapeutickým stratégiám. Použitá cieleňá liečba sa často spája s mnohými neobvyklými nežiaducimi účinkami, znižujúcimi jej využiteľnosť v praxi<sup>(37)</sup>.

Až doteraz bola terapia malígneho melanómu v neskoršom štádiu neefektívna. Zavádzanie nových poznatkov do praxe spolu so štúdiom správanie nádorových buniek a hľadáním ďalších alternatívnych terapeutických cieľov a ich kombinácií zvyšujú aj v pokročilejšom štádiu nádej na liečbu choroby, ktorá je intenzívne študovaná a aktuálnou problematikou.

## Podakovanie

Tento článok vznikol vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt „Dobudovanie multidisciplinárneho centra pre biomedicínsky výskum – BIOMEDIRES“, ITMS 26210120041, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

## LITERATÚRA

1. Steliarova-Foucher E, O'Callaghan M, Ferlay J, et al. The European Cancer Observatory: A new data resource. *Eur J Cancer* 2015; 51(9): p. 1131-43.
2. Niezgodá A, Niezgodá P, Czajkowski R, Novel Approaches to Treatment of Advanced Melanoma: A Review on Targeted Therapy and Immunotherapy. *Biomed Res Int* 2015; 2015: p. 851387.
3. Balch, C.M., Buzaid, A.C., Soong, S.J., et al., Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001; 19(16): p. 3635-48.
4. Junkins-Hopkins JM. Malignant melanoma: molecular cytogenetics and their implications in clinical medicine. *J Am Acad Dermatol* 2010; 63(2): p. 329-32.
5. Shah DJ, Dronca, RS. Latest advances in chemotherapeutic, targeted, and immune approaches in the treatment of metastatic melanoma. *Mayo Clin Proc* 2014; 89(4): p. 504-19.
6. Omholt K, Platz A, Kanter L, et al. NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. *Clin Cancer Res* 2003; 9(17): p. 6483-8.
7. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417(6892): p. 949-54.
8. Kumar R, Angelini S, Czene K, et al. BRAF mutations in metastatic melanoma: a possible association with clinical outcome. *Clin Cancer Res* 2003; 9(9): p. 3362-8.
9. Lee JH, Choi JW, Kim YS, Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. *Br J Dermatol* 2011; 164(4): p. 776-84.
10. Atkinson, V., Medical management of malignant melanoma. *Aust Prescr* 2015; 38(3): p. 74-8.

11. Lugowska I, Kosela-Paterczyk H, Kozak K, et al. Trametinib: a MEK inhibitor for management of metastatic melanoma. *Oncotargets Ther* 2015; 8: p. 2251-9.
12. Romano E, Schwartz GK, Chapman PB, et al. Treatment implications of the emerging molecular classification system for melanoma. *Lancet Oncol* 2011; 12(9): p. 913-22.
13. Yeh I, Botton T, Talevich E, et al. Activating MET kinase rearrangements in melanoma and Spitz tumours. *Nat Commun* 2015; 6: p. 7174.
14. Wiesner T, He J, Yelensky R, et al. Kinase fusions are frequent in Spitz tumours and spitzoid melanomas. *Nat Commun* 2014; 5: p. 3116.
15. Botton T, Yeh I, Nelson T, et al. Recurrent BRAF kinase fusions in melanocytic tumors offer an opportunity for targeted therapy. *Pigment Cell Melanoma Res* 2013; 26(6): p. 845-51.
16. Yu FX, Zhang K, Guan KL. YAP as oncotarget in uveal melanoma. *Oncoscience* 2014; 1(7): p. 480-1.
17. Dahl C, Guldborg P. The genome and epigenome of malignant melanoma. *APMIS* 2007; 115(10): p. 1161-76.
18. Omholt K, Krockel D, Ringborg U, et al. Mutations of PIK3CA are rare in cutaneous melanoma. *Melanoma Res* 2006; 16(2): p. 197-200.
19. Kaur A, Webster MR, Weeraratna AT. In the Wnt-er of life: Wnt signaling in melanoma and ageing. *Br J Cancer* 2016; 115(11): p. 1273-9.
20. Webster MR, Kugel CH 3rd, Weeraratna AT. The Wnts of change: How Wnts regulate phenotype switching in melanoma. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1856(2): p. 244-51.
21. Grossman D, McNiff JM, Li F, et al. Expression and targeting of the apoptosis inhibitor, survivin, in human melanoma. *J Invest Dermatol* 1999; 113(6): p. 1076-81.

22. Takeuchi H, Morton DL, Elashoff D, et al., Survivin expression by metastatic melanoma predicts poor disease outcome in patients receiving adjuvant polyvalent vaccine. *Int J Cancer* 2005; 117(6): p. 1032-8.
23. Pennati M., Binda, M., Colella, G., et al., Radiosensitization of human melanoma cells by ribozyme-mediated inhibition of survivin expression. *J Invest Dermatol*, 2003. 120(4): p. 648-54.
24. Lazar I, Perlman R, Lotem M, et al. The clinical effect of the inhibitor of apoptosis protein livin in melanoma. *Oncology* 2012; 82(4): p. 197-204.
25. Chang H, Schimmer AD. Livin/melanoma inhibitor of apoptosis protein as a potential therapeutic target for the treatment of malignancy. *Mol Cancer Ther* 2007; 6(1): p. 24-30.
26. Zhou J, Yuen NK, Zhan Q, et al. Immunity to the melanoma inhibitor of apoptosis protein (ML-IAP; livin) in patients with malignant melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 2012; 61(5): p. 655-65.
27. Rodriguez MI, Peralta-Leal A, O'Valle F, et al. PARP-1 regulates metastatic melanoma through modulation of vimentin-induced malignant transformation. *PLoS Genet* 2013; 9(6): p. e1003531.
28. Staibano S, Pepe S, Lo Muzio L, et al. Poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase 1 expression in malignant melanomas from photoexposed areas of the head and neck region. *Hum Pathol* 2005; 36(7): p. 724-31.
29. Busam KJ, Vilain RE, Lum T, et al. Primary and Metastatic Cutaneous Melanomas Express ALK Through Alternative Transcriptional Initiation. *Am J Surg Pathol* 2016; 40(6): p. 786-95.
30. Wiesner T, Obenauf AC, Murali R, et al. Germline mutations in BAP1 predispose to melanocytic tumors. *Nat Genet* 2011; 43(10): p. 1018-21.
31. Yeh I, Mully TW, Wiesner T, et al. Ambiguous melanocytic tumors with loss of 3p21. *Am J Surg Pathol*, 2014. 38(8): p. 1088-95.
32. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 2005; 353(20): p. 2135-47.
33. Besaratinia A, Tommasi S. Epigenetics of human melanoma: promises and challenges. *J Mol Cell Biol* 2014; 6(5): p. 356-67.
34. Eggermont AM, Chiarion-Sileni V, Grob JJ, et al. Prolonged Survival in Stage III Melanoma with Ipilimumab Adjuvant Therapy. *N Engl J Med* 2016; 375(19): p. 1845-55.
35. Shu CA, Rizvi NA. Into the Clinic With Nivolumab and Pembrolizumab. *Oncologist* 2016; 21(5): p. 527-8.
36. Singh BP, Salama AK. Updates in Therapy for Advanced Melanoma. *Cancers (Basel)* 2016; 8(1).
37. Steenbruggen TG, van den Heuvel MM, Blank CU, et al. No hair loss, but colitis or pneumonitis: unique side effects of immune checkpoint inhibitors for cancer. *Ned Tijdschr Geneesk* 2016; 160(0): p. A9873.



**MUDr. Pavol Janega, PhD.**

**MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o.**

Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava

e-mail: [pavol.janega@medirexgroupacademy.sk](mailto:pavol.janega@medirexgroupacademy.sk)



## ALL YOU NEED FOR HISTOLOGY & CYTOLOGY

- Histology
- Cytology
- Microscopes and accessories
- Archiving and storage
- Molecular histopathology
- Personal protection, safety and hygiene



Request your copy from your local VWR sales office or [sk.vwr.com](http://sk.vwr.com)

## Cirkulujúca DNA – od jej objavenia cez neinvazívne prenatálne testovanie aneuploidí a monogénne dedičných ochorení až k neinvazívnej nádorovej diagnostike a prognostike

RNDr. Gabriel Minárik, PhD.

MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o., Bratislava

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Bratislava

Za posledných pár dekád si v oblasti biomedicínskeho výskumu vydobyla silnú pozíciu analýza cirkulujúcich nukleových kyselín. Táto pozícia je spojená s objavmi súvisiacimi s premenou genetických analýz na genomické, s rozsiahlym rozvojom bioinformatiky, technologickým pokrokom a dostupnosťou genomických analyzátorov. Robustnosť aktuálne využívaných genomických metód a ich kapacita poskytovať predtým bezprecedentné výsledky kvalitatívneho aj kvantitatívneho charakteru umožnila okrem iného rozvoj nových možností výskumu tzv. neinvazívneho testovania.

**Kľúčové slová:** cirkulujúca DNA, neinvazívne DNA testovanie, cirkulujúca voľná fetálna DNA, cirkulujúca nádorová DNA, masívne paralelné sekvenovanie

***Circulating DNA – from its discovery through noninvasive prenatal testing of chromosomal aneuploidies and monogenic hereditary disorders up to noninvasive cancer diagnostics and prognostics***

Over the last few decades analysis of circulating nucleic acids gained a strong position in the field of biomedical research. This position is associated with discoveries related to the shift from genetic analysis to the genomic, extensive development in bioinformatics as well as with technological advances and the availability of genomic analysers. Robustness of currently used genomic methods and their capacity to provide previously unprecedented results as from a qualitative as well as quantitative point of view allow the development of new research in the field of so-called noninvasive testing.

**Keywords:** Circulating DNA, noninvasive DNA testing, cell-free fetal DNA, circulating tumour DNA, massively parallel sequencing

NewsLab, 2017; roč. 8 (1): 48 – 52

### Úvod

Dôležitosť objavenia cirkulujúcej DNA v roku 1947 Mandelom a Metaisom bola dlhý čas nerozpoznaná<sup>(1)</sup>. Až o dvadsať rokov, v roku 1966, bola publikovaná štúdia poukazujúca na asociáciu medzi zvýšenou hladinou cirkulujúcej DNA v sére pacientov so systémovým lupus erythematosus<sup>(2)</sup>. V roku 1973 bola zvýšená hladina cirkulujúcej DNA identifikovaná aj pri ďalších závažných ochoreniach, napr. pri reumatoidnej artritíde, glomerulovej nefritíde, pankreatitíde, zápalových ochoreniach čriev a hepatitíde<sup>(3)</sup>. Krátko nato, v roku 1977, už bola opísaná asociácia aj medzi zvýšenými hladinami cirkulujúcej DNA a nádorovým ochorením u pacientov s lymfómom, gliómom, rakovinou pľúc, maternice, krčka maternice, prsníka, kolorekta, v porovnaní so zdravými jedincami a, navyše, pacienti s lokalizovaným nádorom dosahovali nižšiu koncentráciu cirkulujúcej DNA v porovnaní s pacientmi s metastatickým ochorením. Čo bolo ešte dôležitejšie, autori štúdie prvýkrát preukázali, že po liečbe týchto pacientov bo zaznamenaný pokles hladiny cirkulujúcej DNA u časti pacientov, a že jej sledovanie môže mať potenciál využitia v prognostike nádorových ochorení<sup>(4)</sup>. V tom období však neexistovali dostatočne senzitivné a špecifické metódy, ktoré by umožňovali identifikovať nádorovo špecifickú cirkulujúcu DNA a kvantitatívne analýzy boli realizované prostredníctvom biochemických metód alebo s využitím univerzálnych genetických markerov (ako napr. *Alu*-PCR).

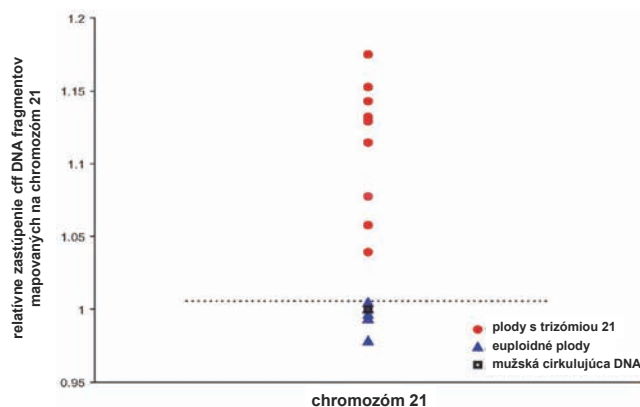
### Cirkulujúca voľná fetálna DNA – genetická éra

Ďalším dôležitým míľnikom vo výskume cirkulujúcej DNA bol v roku 1989 objav prítomnosti tzv. cirkulujúcej voľnej fetálnej DNA (cffDNA – cell free fetal DNA) ako súčasť celkovej cirkulujúcej DNA v krvi tehotných žien, ktorý predznamenal nielen vznik a rozvoj novej oblasti tzv. neinvazívneho prenatálneho testovania (NIPT), ale zároveň naštartoval vysoký záujem o oblasť výskumu cirkulujúcich nukleových kyselín všeobecne<sup>(5)</sup>. Prvou klinicky využiteľnou aplikáciou výskumu bol test založený na kvalitatívnej detekcii konkrétnych Y-chromozómových sekvencií v maternálnej plazme, umožňujúci neinvazívne určenie pohlavia plodu z krvi tehotnej. Prítomnosť týchto sekvencií bola na účely stanovenia pohlavia plodu kritériom, ktoré umožnilo využitie analýzy pri neinvazívnom prenatálnom testovaní X-viazaných dedičných ochorení. Po pridaní kvantitatívneho rozmeru analýzy boli definované množstvá fetálnej DNA v maternálnej cirkulácii, keď pôvodná práca z roku 1998 preukázala nielen prítomnosť dostatočného množstva fetálnej DNA pre rôzne typy genetických analýz už v skorých štádiách tehotenstva, ale aj nárast podielu fetálnej DNA s postupujúcim tehotenstvom. Podiel fetálnej DNA narástol od 7. týždňa tehotenstva z priemerných 25 GEq/ml (genomických ekvivalentov/ml plazmy) na priemerných 300 GEq/ml<sup>(6)</sup>. O rok neskôr bolo navyše preukázané rýchle odbúranie fetálnej DNA po pôrode, keď počas rozpadu fetálnej DNA bol na úrovni 16 minút a prakticky úplné odbúranie



fetálnej DNA do dvoch hodín po pôrode<sup>(7)</sup>. To znamenalo veľkú výhodu v porovnaní s dovtedy konkurenčnou stratégiou neinvazívneho prenatalného DNA testovania založeného na analýze cirkulujúcich fetálnych buniek. Ich nevýhodou bolo na jednej strane veľmi nízke zastúpenie v krvi tehotnej – 2 – 20/ml krvi<sup>(8,9)</sup>, na druhej strane dlhodobé prežívanie fetálnych buniek v krvi matky (mikrochimérizmus), ktoré mohlo kompromitovať výsledky DNA analýzy buniek z odberu krvi v priebehu aktuálnej tehotnosti s bunkami z tej predchádzajúcej<sup>(10)</sup>. V nadväznosti na tieto zistenia sa rozvoj v oblasti neinvazívnej prenatalnej DNA diagnostiky zamerával práve na cfDNA. Vďaka tomu sa postupne do klinickej praxe dostali testy pre determináciu RhD statusu plodu<sup>(11)</sup> či detekciu monogénových mendelických ochorení s autozomálne dominantnou dedičnosťou v prípadoch ich dedičnosti od otca plodu, ako napr. achondroplázia<sup>(12)</sup>, myotonická dystrofia<sup>(13)</sup>. V nadväznosti na zistenie, že DNA fetálneho a maternálneho pôvodu sú rozdielne fragmentované, pričom fetálna DNA bola fragmentovaná viac ako maternálna<sup>(14)</sup>, sa v nasledujúcom období začala testovať možnosť využitia frakcionácie cirkulujúcej DNA pred samotnou molekulárnou analýzou. Tá bola v začiatkoch sprostredkovaná predovšetkým vyrezávaním frakcie DNA s veľkosťou < 300 bp (bázových párov) z agarózových gélov po elektroforéze izolovanej DNA. Takto predpripravená DNA vykazovala preukaznejšie výsledky pri detekcii patogénnych variantov v DNA plodu napr. pri achondroplázii,  $\beta$ -talasémii či dokonca pri neinvazívnej detekcii parentálnych alel STR markerov využívaných štandardne pri detekcii chromozómových aneuploidii<sup>(15-17)</sup>. V tomto období boli detegované a na účely využitia pri NIPT validované konkrétne oblasti DNA plodu (napr. RASSF1A), ktoré boli v porovnaní s maternálnou DNA rozdielne metylované a mali umožniť zvýšenie spoľahlivosti NIPT analýz najmä vďaka presnejšiemu stanoveniu podielu fetálnej DNA vo vzorke<sup>(18)</sup>. S nástupom technológie digitálnej PCR bola ešte preukázaná možnosť neinvazívnej determinácie prítomnosti trizómie chromozómu 21 u plodu v prípade, že jeho fetálna DNA bola zastúpená v celkovej cirkulujúcej DNA tehotnej nad 25 %<sup>(19)</sup>. Ani táto metóda však nebola všeobecne využiteľná pre rutinné použitie NIPT pri detekcii chromozómových aneuploidii plodu, pretože v tom čase publikované údaje uvádzali priemerný podiel cfDNA v maternálnej cirkulácii maximálne na úrovni 12 %<sup>(6)</sup>.

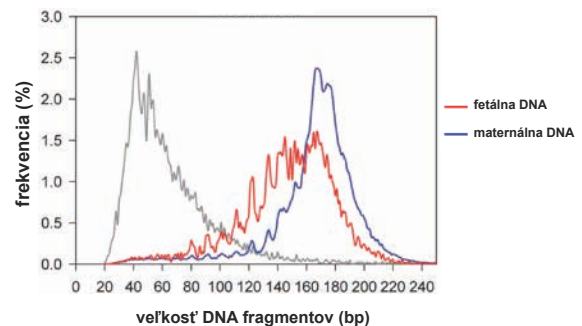
**Obrázok 1.** Identifikácia tehotenstiev s plodom s trizómiou chromozómu 21 v dôsledku detekcie vyššieho zastúpenia DNA molekúl zodpovedajúcim 21. chromozómu v analyzovaných vzorkách krvi tehotných žien a kontrolnej mužskej vzorky (Fan HC et al., 2008)



### Cirkulujúca voľná fetálna DNA – genomická éra

Ďalší rozmach súvisel s nástupom éry genomiky sprostredkovanou predovšetkým dostupnosťou masívneho paralelného sekvenovania (MPS). Technológia MPS spôsobila v oblasti NIPT revolúciu. Od roku 2008, keď boli simultánne publikované štúdie preukazujúce potenciál využitia MPS pri neinvazívnej detekcii trizómií chromozómov 21, 18 a 13 (**obrázok 1**)<sup>(20,21)</sup>, sa rozbehol rozsiahly výskum, ktorý priniesol nové základné informácie o charakteristike cfDNA v maternálnej cirkulácii. Okrem toho už v pôvodnej práci Fan a kol., 2008<sup>(20)</sup> bol opísaný charakteristický veľkostný profil DNA fragmentov cirkulujúcej DNA, ktorý poukázal na fragmentáciu založenú na veľkosti DNA sekvencie zodpovedajúcej nukleozómu. Táto informácia bola neskôr špecifikovaná a bolo preukázané, že priemerná veľkosť DNA fragmentov fetálneho pôvodu je 143 bp, kým fragmenty maternálnej DNA majú priemernú veľkosť 166 bp (**obrázok 2**)<sup>(22)</sup>. Zároveň bola technológia MPS využitá na prípravu univerzálneho postupu umožňujúceho neinvazívnym spôsobom determináciu prenosu oboch parentálnych alel z rodičov na plod, nielen pri autozomálne dominantných ochoreniach dedených po otcovi, ale aj pri autozomálne recesívnych ochoreniach prostredníctvom kvantitatívnej genotypovej analýzy cirkulujúcej DNA vychádzajúcej z digitálne veľkostne selektovaných MPS dát a s využitím metódy tzv. stanovenia relatívnej mutačnej dávky<sup>(23)</sup>. Veľkostná charakteristika slúžila neskôr pri optimalizácii metód prípravy vzoriek pre MPS analýzy, ale aj pri úprave bioinformatických algoritmov využívaných aj v súčasnosti pri NIPT zameranom na neinvazívnu detekciu závažných trizómií plodu. Zároveň v tej istej práci bola prostredníctvom pokročilej haplotypovej analýzy determinovaná celá chromozómová mapa plodu vychádzajúca z analýzy cirkulujúcej DNA tehotnej a DNA matky a otca plodu, čo predznamenalo éru neinvazívneho sekvenovania genómu plodu s potenciálnymi aplikáciami, napr. aj v oblasti výskumu cirkulujúcich nádorových DNA. V rokoch 2010 – 2013 boli v rozsiahlych štúdiách validované metódy a prístupy k analýze vzoriek tehotných žien s cieľom detekcie trizómií chromozómov 21, 18 a 13, ktoré preukázali vysokú senzitivitu (> 99,9 % pre trizómiu 21; > 91,9 % pre trizómiu 18; > 78,6 % pre trizómiu 13; > 93,8 % pre monozómiu X) a špecificitu (> 97,9 % pre autozómové aneuploidie), takéhoto neinvazívneho prenatalného testovania<sup>(24-27)</sup>. Nasledovala publikácia aktualizujúca a opisujúca priemerný podiel fetálnej DNA (fetálna frakcia) u tehotných v 11. týždni tehotenstva, čo je z pohľadu načasovania NIPT

**Obrázok 2.** Analýza veľkosti fragmentov cirkulujúcej DNA izolovanej z krvi tehotných žien. Šedá krivka – mitochondriálna DNA, červená krivka – DNA fetálneho pôvodu, modrá krivka – DNA maternálneho pôvodu (Tsui NB et al., 2012)

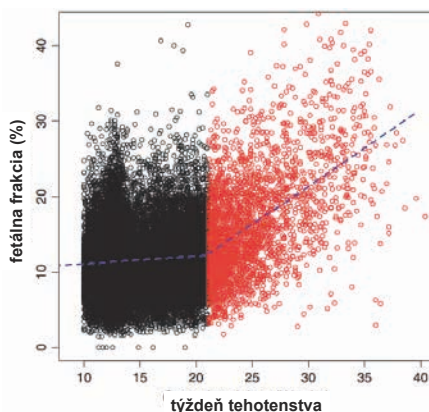


ideálny čas, v hodnote 10,2 % (**obrázok 3**)<sup>(28)</sup>. Ďalšia preukázala medzipopulačné rozdiely v priemernej fetálnej frakcii a tiež závislosť fetálnej frakcie od hmotnosti tehotnej. Fetálna frakcia bola nižšia u tehotných afrokaribského pôvodu v porovnaní s tehotnými kaukazského pôvodu a kým sa fetálna frakcia < 4 % vyskytovala u tehotných s hmotnosťou 60 kg len u 0,7 % žien, pri hmotnosti 100 kg to už bolo u 7,1 % žien a hmotnosti 160 kg až 51,1 % žien<sup>(29)</sup>. Tento údaj je dôležitý preto, že nízka fetálna frakcia < 4 % je aj v súčasnosti používaným štandardom pre neinformativnosť výsledku NIPT pre detekciu trizómii chromozómov 21, 18 a 13 v prípade analýzy celogenómovým skenom cirkulujúcej DNA tehotnej. V prípade determinácie celého fetálneho genómu z cirkulujúcej maternálnej DNA sa aj vďaka spomenutým poznatkom v jednej z najaktuálnejších štúdií podarilo pri genómovom resekvenovaní s pokrytím 270x (haploidný genóm) zvýšiť senzitivitu detekcie *de novo* patogénnych variantov až na 85 % a zvýšenie pozitívnej prediktívnej hodnoty na 74 % (169-násobné zlepšenie v porovnaní s predchádzajúcou štúdiou). Uvedené zlepšenie senzitivity a pozitívnej prediktívnej hodnoty dáva významný predpoklad na využívanie NIPT nielen v rámci detekcie chromozómových aberácií, ale dokonca aj pri neinvazívnom prenatalnom skríningu zameranom na monogénne dedičné ochorenia, čím sa využitie NIPT významne rozšíri. Zároveň bola zistená nová skutočnosť ďalej rozvíjajúca poznatok o rozdielnej veľkostnej charakteristike fetálnej a maternálnej DNA. Bolo preukázané, že rozdiel nie je len vo veľkosti týchto pôvodom odlišných fragmentov, ale aj v lokalizácii miest v genóme, kde k štiepeniu genomickej DNA pri fragmentácii dochádza (**obrázok 4**)<sup>(30)</sup>. To môže výrazným spôsobom pomôcť k ďalšiemu zvýšeniu špecificity NIPT, napr. pri presnejšom výpočte fetálnej frakcie, ktorá slúži ako jeden zo základných parametrov pri štatistických a bioinformatických analýzach získaných dát.

## Cirkulujúca nádorová DNA – paralelné využitie výsledkov výskumu z cffDNA

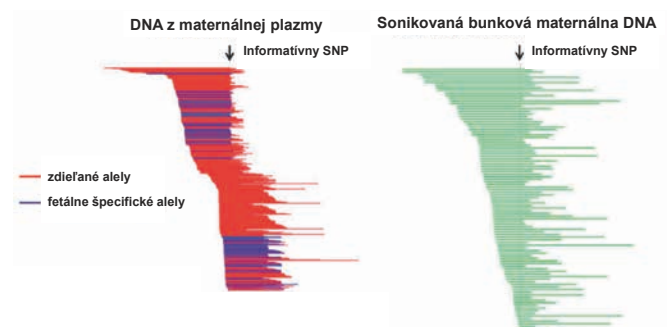
Paralelne s výskumom v oblasti analýzy cffDNA bolo možné sledovať podobný výskum v oblasti analýzy cirkulujúcej nádorovej DNA (ctDNA – circulating tumor DNA). Základné poznatky o prítomnosti a množstve ctDNA u pacientov s rôznymi nádorovými ochoreniami boli detailne študované, avšak do prechodu na genomické metódy analýzy univerzálnymi

**Obrázok 3.** Nárast podielu fetálnej DNA (fetálnej frakcie) na celkovej cirkulujúcej DNA tehotných v priebehu tehotenstva (Wang E et al., 2013)

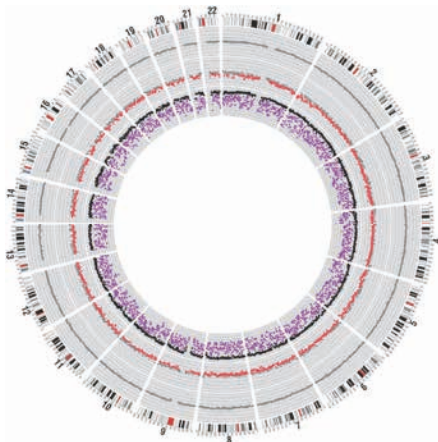


metódami, ktoré neumožňovali špecifickú detekciu, a teda ani kvantifikáciu ctDNA, bola ich aplikácia v klinickej praxi relatívne obmedzená. Po zavedení metód MPS sa však postupne preukázalo, že ctDNA možno špecificky detegovať, a to kvalitatívne (detekcia nádorovo špecifických patogénnych zmien v cirkulujúcej DNA) aj kvantitatívne (množstvo ctDNA koreluje s veľkosťou nádorovej masy) a tiež s vyššou senzitivitou a špecificitou ako pri využití cirkulujúcich nádorových buniek<sup>(31)</sup>. Len nedávno bola publikovaná práca, ktorá sledovala nádorovo špecifické zmeny identifikované v podobe globálnej hypometylácie v plazme pacienta s hepatocelulárnym karcinómom (**obrázok 5**). Genomická analýza zameraná na hypometyláciu a analýzu CNV poukázala na rýchle odbúranie ctDNA po odstránení nádorového tkaniva a tiež na možnosť využitia tejto univerzálnej na zároveň nádorovo špecifickej analýzy zameranej na sledovanie prítomnosti a množstva ctDNA, na monitoring, keď bolo možné vidieť udržanie či nárast týchto nádorovo špecifických zmien v cirkulujúcej DNA u pacientov s neúspešným chirurgickým odstránením nádorového tkaniva či relapsom ochorenia<sup>(32)</sup>. V súčasnosti možno už aj v klinickej rutine využiť molekulárne testy zamerané na neinvazívnu detekciu nádorovo špecifických genetických zmien. Navyše možno pri takýchto analýzach využiť na MPS alternatívne, pre rutinnú laboratórnu prax efektívnejšie a jednoduchšie vysokopriepustné metódy ich identifikácie, ako napr. digitálnu PCR alebo tzv. Beaming metódu, ktoré sú schopné identifikovať nádorovo špecifické bodové mutácie a kvantifikovať ich s vysokou presnosťou. Ako v súčasnosti komerčne dostupné analyzačné komplety možno spomenúť komplety na identifikáciu dôležitých patogénnych a farmakogeneticky relevantných variantov v génoch *KRAS*, *NRAS* a *EGFR* relevantných pre pacientov s kolorektálnym a nemalobunkovým pľúcnym karcinómom. Podobne ako pri cffDNA bolo aj pri ctDNA preukázané, že táto je viac fragmentovaná ako zvyšná cirkulujúca DNA, pričom ctDNA je priemerne najviac zastúpená vo veľkosti 144 bp, kým nenádorová cirkulujúca DNA vo veľkosti 165 bp<sup>(33)</sup>. Opäť je možné, že veľkostná selekcia zameraná na obohatenie ctDNA veľkostnej frakcie môže viesť k zvýšeniu senzitivity či špecificity použitých molekulárnych metód analýzy DNA, ako to bolo pri NIPT. Aktuálne najnovším a vysokoperspektívnym výsledkom výskumu cirkulujúcich DNA je možnosť identifikácie tkaniva, z ktorého v cirkulujúcej DNA sa nachádzajú DNA molekuly pochádzajú, tzv. tkanivové mapovanie. Využitie

**Obrázok 4.** Rozdielnosť miesta fragmentácie molekúl cirkulujúcej DNA izolovanej z maternálnej plazmy podľa ich fetálneho a maternálneho pôvodu pri porovnaní s náhodne štiepenou bunkovou DNA (Chan KC et al., 2016)



**Obrázok 5.** Identifikácia hypometylácie genomickú DNA z nádorových buniek - fialové bodky (vnútorná časť) a plazmy – šedo-červené bodky (stredná časť) pacienta s hepatocelulárnym karcinómom. Čierne bodky reprezentujú DNA z lymfocytov pacienta, šedé bodky (vonkajšia časť) DNA zdravého človeka (Chan KC et al., 2013)



možnosti takejto identifikácie je aplikovateľné v rôznych klinických špecializáciách nielen v NIPT či nádorovej diagnostike a prognostike (**obrázok 6**)<sup>(34)</sup>. Podobne ho možno využiť tam, kde je potrebné sledovať nárast poškodenia tkanív prejavujúce sa odumieraním buniek (kardiovaskulárne zlyhanie, posttransplantačný monitoring, extrémna námaha, a pod.)<sup>(34,35)</sup>.

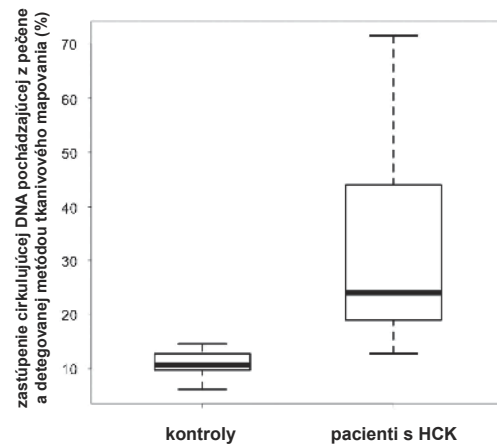
## Záver

Analýza cirkulujúcich nukleových kyselín sa v súčasnosti ukazuje ako najvhodnejší spôsob neinvazívneho DNA skríningu, prognostiky a diagnostiky s mnohými klinickými aplikáciami. Výskum za posledných pár rokov ukázal, že ju

## LITERATÚRA

- Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. C R Seances Soc Biol Fil 1948; 142(3-4): 241-3.
- Tan EM, Schur PH, Carr RI, Kunkel HG. Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. J Clin Invest 1966; 45(11): 1732-40.
- Koffler D, Agnello V, Winchester R, Kunkel HG. The occurrence of single-stranded DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus and other diseases. J Clin Invest 1973; 52(1): 198-204.
- Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. Cancer Res 1977; 37(3): 646-50.
- Lo YM, Patel P, Wainscoat JS, et al. Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood. Lancet 1989; 2(8676): 1363-5.
- Lo YM, Tein MS, Lau TK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. Am J Hum Genet 1998; 62(4): 768-75.
- Lo YM, Zhang J, Leung TN, et al. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. Am J Hum Genet 1999; 64(1): 218-24.
- Krabchi K, Gros-Louis F, Yan J, et al. Quantification of all fetal nucleated cells in maternal blood between the 18th and 22nd weeks of pregnancy using molecular cytogenetic techniques. Clin Genet 2001; 60(2): 145-50.
- Mergenthaler S, Babochkina T, Kiefer V, et al. FISH analysis of all fetal nucleated cells in maternal whole blood: improved specificity by the use of two Y-chromosome probes. J Histochem Cytochem 2005; 53(3): 319-22.
- Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, et al. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93(2): 705-8.

**Obrázok 6.** Rozdielne zastúpenie cirkulujúcej DNA pečeňového pôvodu v celkovej cirkulujúcej DNA izolovanej z plazmy zdravého jedinca a pacienta s hepatocelulárnym karcinómom a charakterizovanej s využitím metylačne špecifickej analýzy DNA tzv. tkanivovým mapovaním (Sun K et al., 2015)



možno zužitkovať pri prenatálnom genetickom skríningu, v rámci ktorého bola najmä zo začiatku intenzívne študovaná, ale po celosvetovom rozšírení genomických analyzátorov aj pri rutinných analýzach cirkulujúcej nádorovej DNA v oblasti diagnostiky kardiovaskulárneho poškodenia či posttransplantačného monitoringu, založenej na univerzálnej metóde tkanivového mapovania.

## Podakovanie

Publikácia je výsledkom implementácie projektu podporeného grantom APVV-14-0273 a APVV-15-0327 Agentúry pre podporu výskumu a vývoja.

- Lo YM, Hjelm NM, Fidler C, Set al. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. N Engl J Med 1998; 339(24): 1734-8.
- Saito H, Sekizawa A, Morimoto T, et al. Prenatal DNA diagnosis of a single-gene disorder from maternal plasma. Lancet 2000; 356(9236): 1170.
- Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B. Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. Clin Chem 2000; 46(2): 301-2.
- Chan KC, Zhang J, Hui AB, et al. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. Clin Chem 2004; 50(1): 88-92.
- Li Y, Holzgreve W, Page-Christiaens GC, et al. Improved prenatal detection of a fetal point mutation for achondroplasia by the use of size-fractionated circulatory DNA in maternal plasma – case report. Prenat Diagn 2004; 24(11): 896-8.
- Li Y, Di Naro E, Vitucci A, et al. Detection of paternally inherited fetal point mutations for beta-thalassemia using size-fractionated cell-free DNA in maternal plasma. JAMA. 2005 Feb 16;293(7):843-9. Erratum in: JAMA 2005; 293(14):1728.
- Li Y, Zimmermann B, Rusterholz C, et al. Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. Clin Chem 2004; 50(6): 1002-11.
- Chan KC, Ding C, Gerovassili A, et al. Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis. Clin Chem 2006; 52(12): 2211-8.
- Lo YM, Lun FM, Chan KC, et al. Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. Proc Natl Acad Sci U S A 2007; 104(32): 13116-21.

20. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, et al. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105(42): 16266-71.
21. Chiu RW, Chan KC, Gao Y, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105(51): 20458-63.
22. Lo YM, Chan KC, Sun H, et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. Sci Transl Med 2010; 2(61): 61ra91.
23. Lun FM, Tsui NB, Chan KC, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma. Proc Natl Acad Sci U S A 200; 105(50): 19920-5.
24. Chiu RW, Akolekar R, Zheng YW, et al. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. BMJ 2011; 342: c7401.
25. Chen EZ, Chiu RW, Sun H, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 18 and trisomy 13 by maternal plasma DNA sequencing. PLoS One 2011; 6(7): e21791.
26. Ashoor G, Syngelaki A, Wagner M, et al. Chromosome-selective sequencing of maternal plasma cell-free DNA for first-trimester detection of trisomy 21 and trisomy 18. Am J Obstet Gynecol 2012; 206(4): 322.e1-5.
27. Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD, et al; Maternal Blood IS Source to Accurately Diagnose Fetal Aneuploidy (MELISSA) Study Group. Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. Obstet Gynecol 2012; 119(5): 890-901.
28. Wang E, Batey A, Struble C, et al. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. Prenat Diagn 2013; 33(7): 662-6.
29. Ashoor G, Syngelaki A, Poon LC, et al. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics. Ultrasound Obstet Gynecol 2013; 41(1): 26-32.
30. Chan KC, Jiang P, Sun K, et al. Second generation noninvasive fetal genome analysis reveals de novo mutations, single-base parental inheritance, and preferred DNA ends. Proc Natl Acad Sci U S A 2016; 113(50): E8159-E8168.
31. Punnoose EA, Atwal S, Liu W, et al. Evaluation of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in non-small cell lung cancer: association with clinical endpoints in a phase II clinical trial of pertuzumab and erlotinib. Clin Cancer Res 2012; 18(8): 2391-401.
32. Chan KC, Jiang P, Chan CW, et al. Noninvasive detection of cancer-associated genome-wide hypomethylation and copy number aberrations by plasma DNA bisulfite sequencing. Proc Natl Acad Sci U S A 2013; 110(47): 18761-8.
33. Underhill HR, Kitzman JO, Hellwig S, et al. Fragment Length of Circulating Tumor DNA. PLoS Genet 2016; 12(7): e1006162.
34. Sun K, Jiang P, Chan KC, et al. Plasma DNA tissue mapping by genome-wide methylation sequencing for noninvasive prenatal, cancer, and transplantation assessments. Proc Natl Acad Sci U S A 2015; 112(40): E5503-12.
35. Atamaniuk J, Vidotto C, Tschan H, et al. Increased concentrations of cell-free plasma DNA after exhaustive exercise. Clin Chem 2004; 50(9): 1668-70.



**RNDr. Gabriel Minárik, PhD.**  
**MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o.**  
Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava  
e-mail: gabriel.minarik@gmail.com



# Vaše komplexné diagnostické riešenie

Využite plno automatický systém pre molekulárnu diagnostiku, vyvinutý pre rýchle získanie klinických diagnostických informácií.

**Systém Idylla™** pracuje na princípe RT-PCR. Je to komplexné diagnostické riešenie od izolácie DNA až po užívateľsky modifikovaný report. Celý proces trvá od 40 do 150 minút. **Systém Idylla™** je určený na spracovanie rôznych typov vzoriek vrátane FFPE a plazmy. Vďaka patentovanej technológii si poradí aj s problematickými alebo archívnymi vzorkami.



Idylla™ BRAF Mutation test CE-IVD  
Idylla™ KRAS Mutation test CE-IVD  
Idylla™ NRAS/BRAF Mutation test CE-IVD  
Idylla™ NRAS-BRAF-EGFR S492R Mutation Assay RUO  
Idylla™ EGFR Mutation Assay RUO  
Idylla™ ctBRAF Mutation Assay RUO  
Idylla™ ctKRAS Mutation Assay RUO  
Idylla™ ctNRAS/BRAF Mutation Assay RUO cca 03/2017

### Testy Idylla™



## Choroba len pre tehotné – PREEKLAMPSIA

Mgr. Lucia Striešková<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Bratislava

<sup>2</sup>Geneton, s. r. o., Bratislava

Preeklampsia (PE) je multisystémové ochorenie postihujúce 2 – 8 % všetkých tehotných žien a je jednou z hlavných príčin maternálnej a fetálnej mortality a morbidity. Celosvetovo PE a s ňou spojené ochorenia ročne spôsobujú smrť 76 000 tehotných žien a počet detí, ktoré zomrú ako následok tohto ochorenia, je ročne príliš vysoký. V súčasnosti neexistuje žiadny spoľahlivý parameter skorej diagnostiky PE, no symptómami nástupu ochorenia sú hypertenzia a proteinúria po 20. týždni tehotenstva. Aj keď patomechanizmus PE zostáva zatiaľ neznámy, ustálenou hypotézou sa stala narušená funkcia placenty v skorom štádiu tehotenstva. Počas tehotenstva existuje úzke spojenie medzi maternálnym a fetálnym systémom pomocou placenty. Takže hľadanie prediktívnych markerov v krvi matky je pre toto prepojenie extrémne náročné, pretože markery môžu byť odvodené buď len z maternálnych zdrojov, len z fetálnych zdrojov alebo z oboch.

**Kľúčové slová:** preeklampsia, mimobunková fetálna DNA, hypertenzia, angiogénne faktory

### *Disease just for pregnant women – PREECLAMPSIA*

Preeclampsia (PE) is a multisystemic disease complicating about 2-8% of all pregnancies and remains a leading cause of maternal and perinatal mortality and morbidity. Worldwide PE and related hypertensive disorders cause the death of 76,000 pregnant women each year and a number of babies who die from these disorders are annually too high. There is currently not a reliable marker for early detection of PE, but symptoms of the disease onset are hypertension and proteinuria after the 20th week of gestation. Although the mechanism of PE remains unknown, an established hypothesis involves a disrupted function of the placenta during early pregnancy. During pregnancy, there are close interactions between the maternal system and the foetal system via the placenta. Looking for predictive biomarkers in maternal blood is extremely complicated due to close interactions and such markers may be derived from not only maternal, but also placental sources or both.

**Key words:** preeclampsia, cell-free foetal DNA, hypertension, angiogenic factors

NewsLab, 2017; roč. 8(1): 53 – 56

### Úvod

Objav extracelulárnej fetálnej DNA (cffDNA) spôsobil revolúciu v oblasti neinvazívnej prenatalnej diagnostiky a otvoril nové možnosti v oblasti pôrodnického výskumu. Zvýšené koncentrácie fetálnej DNA sú úzko spojené s rôznymi patológiami v tehotenstve, pričom najzávažnejšie sú preeklampsia a trizómia 21. chromozómu<sup>(1)</sup>.

Novšie štúdie naznačili, že hlavným zdrojom cffDNA sú bunky trofoblastu, ktoré sú uvoľnené zo syncytiotrofoblastu vo forme syncytiálnych uzlov. Tieto bunky podliehajú apoptóze a nukleové kyseliny nachádzajúce sa vnútri vrátane RNA a DNA sú uvoľnené do matkinho obehu. Okrem apoptických mechanizmov, ktoré prebiehajú v dôsledku normálneho starnutia syncytiotrofoblastu, náhodné poškodenie alebo nekróza môžu byť tiež jednou z príčin uvoľňovania mimobunkových nukleových kyselín<sup>(2)</sup>.

### Preeklampsia

Preeklampsia je definovaná ako nový nástup hypertenzie a proteinúrie v druhej polovici tehotenstva u predtým zdravých žien. Gestačná hypertenzia je diagnostikovaná v prípade, ak je systolický krvný tlak  $\geq 140$  mmHg a/alebo diastolický krvný tlak  $\geq 90$  mmHg aspoň vo dvoch po sebe nasledujúcich meraniach v priebehu 4-6 hodín. Proteinúria je

definovaná, ak je u tehotnej ženy zaznamenaná prítomnosť  $\geq 300$  mg proteínov v moči zbieranom 24 hodín. Ťažká preeklampsia sa vyznačuje hypertenziou so systolickým krvným tlakom minimálne 160 mmHg a/alebo s diastolickým krvným tlakom najmenej 110 mmHg alebo proteinúriou s vylučovaním aspoň 1 g proteínov počas 24 hodín<sup>(3)</sup>. Avšak hypertenzia alebo proteinúria nie sú prítomné u 10 – 15 % žien, u ktorých sa vyvíja HELLP syndróm (hemolýza, zvýšené hodnoty pečenej enzýmov a nízky počet krvných doštičiek)<sup>(4)</sup>. Hoci už existujú smernice pre skrining a včasnú detekciu tohto ochorenia, žiaľ, neexistuje jeden univerzálny skorý marker preeklampsie.

### Rizikové faktory

Vzhľadom na to, že etiopatogenéza preeklampsie stále zostáva neznáma, je ťažké nájsť prevládajúce znaky medzi tehotnými ženami postihnutými týmto ochorením, pretože príznaky medzi jednotlivými ženami sa výrazne líšia. Je však známych niekoľko rizikových faktorov. Preeklampsia v predchádzajúcom tehotenstve je významným rizikovým faktorom v každom ďalšom tehotenstve u danej ženy<sup>(5)</sup>. Opätovný výskyt preeklampsie je asi 14 %, okrem toho je až 7-násobne vyššie riziko vzniku preeklampsie u žien, u ktorých sa toto ochorenie už vyskytlo, v porovnaní so ženami, ktoré predtým

preeklampsiu nemali. Ženy, u ktorých sa v predchádzajúcom tehotenstve vyskytla ťažká forma preeklampsie, sú rizikovou skupinou žien, ktoré by mali byť pod prísny lekárskym dohľadom už na začiatku každého ďalšieho tehotenstva. U žien, ktoré trpia chronickou hypertenziou, je frekvencia výskytu ochorenia vyššie až o 25 %, u žien, ktoré majú diabetes mellitus, je to 22 % a 14 % u žien, u ktorých sa preeklampsia vyskytla v predchádzajúcom tehotenstve<sup>(5)</sup>. Pri druhom tehotenstve sú u žien významnými rizikovými faktormi: dlhší interval medzi jednotlivými pôrodmi, predčasný pôrod v predchádzajúcom tehotenstve, a teda nízky gestačný vek novorodenca v predchádzajúcom tehotenstve, obličkové ochorenie, chronická hypertenzia, diabetes mellitus, obezita, nedostatočná prenatálna starostlivosť a iné<sup>(6)</sup>. Rizikovou skupinou sú aj prvoroďičky, u ktorých je až 26 % riziko výskytu preeklampsie oproti ženám, ktoré rodili už viackrát.

Obezita je tiež definovaná ako riziko pre preeklampsiu, ktoré rastie so zvýšením indexu telesnej hmotnosti (BMI > 30) v porovnaní so ženami s normálnou hmotnosťou<sup>(7)</sup>. Niektoré štúdie uvádzajú súvislosť medzi vekom a preeklampsiou, a to najmä u žien vo veku 40 rokov. Tieto ženy mali takmer 2-násobné riziko vzniku preeklampsie v porovnaní s mladšími ženami<sup>(5)</sup>. K vyššiemu veku matky sa viaže ďalší rizikový faktor, a to dlhší interval medzi jednotlivými tehotenstvami. Ak je interval medzi dvomi tehotenstvami 10 a viac rokov, vedie to k vyššiemu riziku preeklampsie. Rovnako tak aj tehotenstvá nesúce mužský plod sa zdajú spojené s preeklampsiou, čo by mohlo byť v dôsledku zvýšenej hladiny testosterónu<sup>(8)</sup>.

Predchádzajúci potrat alebo zdravé tehotenstvo s rovnakým partnerom sú, naopak, spojené so zníženým rizikom preeklampsie, aj keď tento ochranný účinok sa stráca so zmenou partnera<sup>(9)</sup>.

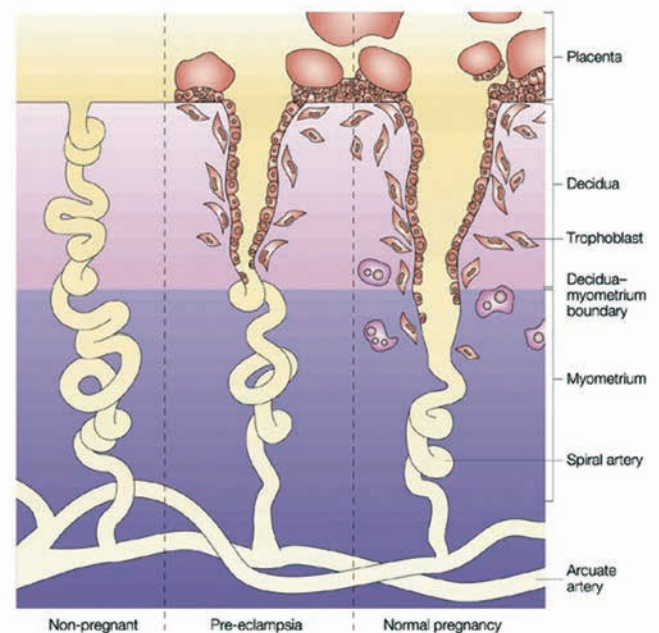
Napriek množstvu nepriaznivých účinkov fajčenia, vrátane obmedzenia rastu plodu, predčasného pôrodu, narodenia mŕtveho plodu a abrupcie placenty, 12 – 15 % všetkých tehotných žien počas tehotenstva fajčí. Paradoxne, mnoho štúdií prináša informáciu, že fajčenie je spojené so zníženým rizikom preeklampsie. Na druhej strane je tu možnosť, že fajčenie môže viesť k predčasnému pôrodu, a tak môže znižovať výskyt preeklampsie. Takže fajčenie počas tehotenstva môže byť nepriamo spojené s rizikom preeklampsie<sup>(10)</sup>.

## Patogenéza preeklampsie

Vysoký výskyt preeklampsie u prvoroďičiek odráža „neskúsenú“ imunitnú odpoveď matky na tehotenstvo. Bežné rizikové faktory preeklampsie zahŕňajú chronickú hypertenziu, diabetes, vek matky, obezitu, predchádzajúcu preeklampsiu, trombofiliu, autoimunitné ochorenie, vaskulárne ochorenie a iné. Predchádzajúce rizikové faktory hrajú dôležitú úlohu pri zmene citlivosti voči adaptačným zmenám podieľajúcim sa na tehotenstve, a tým zvyšujú náchylnosť na preeklampsiu. Patogenéza preeklampsie zatiaľ nie je celkom objasnená pre svoju heterogénnu multisystémovú povahu. Boli navrhnuté rôzne teórie, aby vysvetlili patogenézu preeklampsie, ktorá zahŕňa genetickú predispozíciu, dysfunkciu regulácie imunitného systému, placentárnu ischemiu, zápal a ďalšie. Avšak sľubným vysvetlením patogenézy je zlyhanie fyziologickej transformácie špirálnej artérie a nedostatočná invázia trofoblastu<sup>(11)</sup> (**obrázok 1**). Počas normálneho te-

hotenstva vyvíjajúci sa plod prijíma výživu a zásobu kyslíka cez špirálne artérie maternice. Aby sa prispôbili zvýšenej potrebe kyslíka a výživy, artérie podstupia vaskulárnu remodeláciu. Proces vaskulárnej remodelácie sa začína v prvom trimestri a končí sa v 18. – 20. týždni tehotenstva. Cieľom remodelácie je zmeniť špirálne artérie maternice z vysokorezistentných, nízkokapacitných krvných ciev na nízkorezistentné, vysokokapacitné cievy. Vaskulárna remodelácia trvá 8 – 12 týždňov tehotenstva, počas ktorých extravilové bunky trofoblastu napádajú deciduálnu časť špirálnych artérií<sup>(12)</sup>. Predpokladá sa, že pri preeklampsii je obmedzená invázia trofoblastu, čím sa zabráni správnej transformácii špirálnych artérií, a teda nedochádza k zmene fenotypu elastického svalstva. Nedostatočná invázia trofoblastu spôsobuje hypoperfúziu a hypoxiu v placente. Druhé štádium je charakterizované hypoxiou a hypoperfúziou sprostredkovanou systémovou zápalovou odpoveďou, ktorá uvoľňuje rôzne zápalové, angiogénne a vazoaktívne faktory do obehu. Tieto faktory vedú k materskej systémovej endotelovej dysfunkcii, t. j. dochádza k aktivácii koagulačného systému, vazokonstrikcii, hemolýze, čo má za následok proteinúriu a hypertenziu, ktoré sú charakteristickými klinickými príznakmi preeklampsie<sup>(13)</sup>.

**Obrázok 1.** Zlyhanie fyziologickej transformácie špirálnych artérií sa podieľa na preeklampsii.



a) Špirálna artéria u netehotnej ženy.

b) V normálnom tehotenstve dochádza k fyziologickej transformácii špirálnej artérie v myometriálnom segmente. Bunky trofoblastu sa rozširujú aj na deciduálny segment, aj do jednej tretiny segmentu myometria špirálnej artérie. Artéria a endotel sú zničené trofoblastom, a premenené na artérie so širokým prietokom a zvýšeným príjmom krvi do intervilového priestoru.

c) V tehotenstvách ovplyvnených preeklampsiou, kde dochádza k zlyhaniu fyziologickej transformácie špirálnej artérie, je problémom nedostatočná invázia trofoblastu do myometriálneho segmentu špirálnej artérie. Výsledný nedostatok transformácie krvných ciev má za následok úzke špirálne artérie, narušený prietok krvi a zníženie prekrvenia placenty<sup>(20)</sup>.

A tak nedostatok účinných diagnostických a terapeutických liečebných zákrokov robí preeklampsiu veľkou výzvou pre lekárov. Pôrod plodu a zároveň placenty tak zostáva jedinou účinnou liečbou na ustúpenie symptómov preeklampsie<sup>(14)</sup>.

### Angiogénne faktory

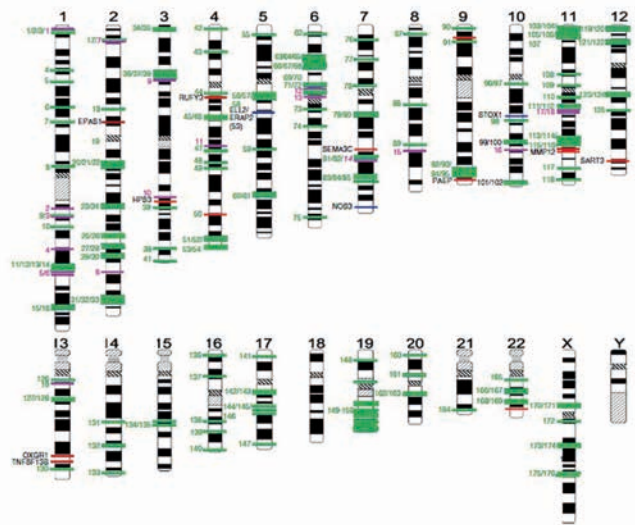
V patogeneze preeklampsie si značnú pozornosť získali aj angiogénne rastové faktory, najmä placentárny rastový faktor (PIGF), vaskulárny endotelový rastový faktor (VEGF) a antiangiogénny rozpustný VEGF receptor 1 (solubilná tyrozínkináza podobná fms alebo sFlt-1). Angiogénne rastové faktory hrajú pravdepodobne dôležitú úlohu vo vaskulárnej funkcii a v remodelácii materského cievneho systému počas tehotenstva vrátane maternicovej špirálnej artérie prechádzajúcej placentou. Rozpustný Flt-1 viaže VEGF a PIGF, súťaží s nadväzovaním receptorov, ktoré sú umiestnené na endotele, a je spojený so zníženou funkciou ciev. Levine a spol. zaznamenali významné rozdiely v týchto angiogénnych faktoroch, ktoré predchádzajú klinickým prejavom preeklampsie. Zvýšené hladiny angiogénnych faktorov, ako je placentárna solubilná tyrozínkináza podobná fms (sFlt-1) a solubilný endoglin (sEng) sú zaznamenané v prípadoch preeklampsie už v 12. týždni tehotenstva, ale slabé prediktívne hodnoty týchto markerov v nasledujúcich štúdiách prekážajú ich klinickému použitiu ako prediktívne markery. Konkrétne bola zaznamenaná nižšia koncentrácia PIGF, zatiaľ čo koncentrácia sFlt-1 bola zvýšená. Naopak, nedávne dôkazy naznačujú, že fajčenie cigariet počas tehotenstva môže koncentráciu maternálneho sFlt-1 znížiť<sup>(15)</sup>.

### Genetické markery

Veľké množstvo výskumov však poukazuje na to, že na rozvoj tohto ochorenia má vplyv multifaktoriálna polygénna dedičnosť, preto bolo skúmaných veľa kandidátnych génov a polymorfizmov vo vzťahu s preeklampiou (**obrázok 2**). Z epidemiologického hľadiska mnohé štúdie ukazujú, že preeklampsia je ochorenie so silnou rodinnou predispozíciou. Bolo zistené, že ženy, ktorých prvostupňové príbuzné mali preeklampsiu, majú 5-násobne vyššie riziko vzniku ochorenia, zatiaľ čo tie s druhostupňovými príbuznými majú len 2-násobné riziko<sup>(16)</sup>. Okrem toho sa predpokladá, že otcovské gény hrajú tiež dôležitú úlohu vo vývoji preeklampsie<sup>(17)</sup>.

Napriek tomu existujú viaceré celogenómové asociačné štúdie, v ktorých sa zatiaľ nepodarilo preukázať asociáciu skúmaných genetických variantov s preeklampiou. Avšak nové moderné technológie, sekvenovanie novej generácie, otvárajú možnosti v objasňovaní genetických poškodení, ktoré spôsobujú dedičné ochorenia predovšetkým v prípadoch s nejednoznačnou klinickou diferenciálnou diagnostikou.

**Obrázok 2.** Prehľad lokalizácie všetkých génov, ktoré boli opísané v spojení s preeklampiou, na chromozómoch<sup>(21)</sup>.



### Záver

Preeklampsia je jedna z najčastejších a najnebezpečnejších komplikácií tehotenstva. Aj keď presná etiológia nie je ešte objasnená, predpokladá sa, že najväčší vplyv má placenta a/alebo vaskulárny systém matiek. Preto je extrémne náročné objasnenie, prevencia a predikcia tohto ochorenia, pretože je potrebné vziať do úvahy príliš veľa parametrov.

Ukázalo sa, že zvýšenie fetálnej DNA v krvnom obeh matky v skorom štádiu tehotenstva je tiež znakom rozvoja preeklampsie. Kvantitatívne zmeny mimobunkovej fetálnej DNA v materskej plazme sú indikátorom pre fetálne poruchy. Zmena koncentrácie fetálnej DNA počas tehotenstva môže byť spôsobená v dôsledku placentárnej nekrózy alebo apoptózy, alebo v dôsledku zníženého odstraňovania DNA. Zvýšené množstvo fetálnej DNA môže byť detegované už v skorom štádiu tehotenstva a nesie so sebou 8-násobne vyššie riziko vzniku preeklampsie<sup>(18)</sup>. Teda sa ukázalo, že koncentrácia fetálnej DNA je v preeklampsii podstatne vyššia ako v normálnych tehotenstvách, a to ešte pred nástupom prvých klinických symptómov<sup>(19)</sup>. Z toho dôvodu sú potrebné široko použiteľné a cenovo dostupné testy, ktoré umožnia skoré diagnostikovanie ešte pred výskytom klinických symptómov. Takže kvantifikácia fetálnej DNA v krvnom obeh matky v skorom štádiu tehotenstva by mohla byť skriningovým testom.

Avšak preeklampsia je heterogénne multisystémové ochorenie, preto je tiež otáznou, či hladina cfDNA môže byť použitá ako prediktívny faktor preeklampsie. A tak prichádza otázka, či je zvýšenie hladiny cfDNA príčinou alebo dôsledkom preeklampsie.

### LITERATÚRA

1. Lo YM. Fetal DNA in maternal plasma. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2000; 906: 141-147.
2. Litton C, Stone J, Eddleman K, et al. Noninvasive prenatal diagnosis: past, present, and future. *The Mount Sinai Journal of Medicine* 2009; 76: 521-528.
3. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet* 2005; 365: 785-799.

4. Haram K, Svendsen E, Abildgaard U. The HELLP syndrome: clinical issues and management. A Review. *BMC pregnancy and childbirth* 2009; 9: 1-15.
5. Trogstad L, Magnus P, Stoltenberg C. Pre-eclampsia: Risk factors and causal models. *Best practice and research Clinical obstetrics and gynaecology* 2011; 25: 329-342.

6. Mostello D, Catlin TK, Roman L, et al. Preeclampsia in the parous woman: who is at risk?. American Journal of Obstetrics and Gynecology 2002; 187: 425-429.
7. Boghossian NS, Yeung E, Mendola P, et al. Risk factors differ between recurrent and incident preeclampsia: a hospital-based cohort study. Annals of Epidemiology 2014; 24: 871-877.
8. Shamsi U, Saleem S, Nishter N. Epidemiology and risk factors of preeclampsia; an overview of observational studies. Al Ameen Journal of Medical Sciences 2013; 6: 292-300.
9. Saftlas AF, Levine RJ, Klebanoff MA, et al. Abortion, changed paternity, and risk of preeclampsia in nulliparous women. American Journal of Epidemiology 2003; 157: 1108-1114.
10. Kawashima A., Koide K, Ventura W, et al. Effects of maternal smoking on the placental expression of genes related to angiogenesis and apoptosis during the first trimester. PLoS one 2014; 9: 1-7.
11. George EM, Granger JP. Recent insights into the pathophysiology of preeclampsia. Expert Review of Obstetrics and Gynecology 2010; 5: 557-566.
12. Jadli A, Sharma N, Damania K, et al. Promising prognostic markers of preeclampsia: new avenues in waiting. Thrombosis Research 2015; 136: 189-195.
13. Maynard SE, Karumanchi SA. Angiogenic factors and preeclampsia. Seminars in Nephrology 2011; 31: 33-46.
14. Shennan AH, Redman C, Cooper C, et al. Are most maternal deaths from preeclampsia avoidable? Lancet 2012; 379: 1686-1687.
15. Levine RJ, Lam C, Qian C, et al. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. The New England journal of medicine 2006; 355: 992-1005.
16. Steegers EAP, von Dadelszen P, Duvekot JJ, et al. Preeclampsia. Lancet 2010; 376: 631-644.
17. Wikström AK, Gunnarsdóttir J, Cnattingius S. The paternal role in pre-eclampsia and giving birth to a small for gestational age infant; a population-based cohort study 2012; 2: 1-9.
18. Cotter AM, Martin CM, O'leary JJ, et al. Increased fetal DNA in the maternal circulation in early pregnancy is associated with an increased risk of preeclampsia. American Journal of Obstetrics and Gynecology 2004; 191: 515-520.
19. Engel K, Plonka T, Bilar M, et al. The correlation between clinical characteristics of preeclampsia and the concentration of fetal DNA in maternal circulation. European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology 2008; 139: 256-257.
20. Chaiworapongsa T, Chaemsaihong P, Yeo L, et al. Pre-eclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. Nature Reviews. Nephrology 2014; 10: 466-480.
21. Jebbink J, Wolters A, Fernando F, et al. Molecular genetics of preeclampsia and HELLP syndrome – A review. Biochimica et Biophysica Acta 2012; 1822: 1960-1969.



**Mgr. Lucia Striešková**

Univerzita Komenského v Bratislave  
Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie  
Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava  
e-mail: strieskova.lucia@gmail.com

illumina

AUTHORIZED  
DISTRIBUTOR



have a genius for...  
**GeneTiCA**

The next era in sequencing  
**starts now**



## Postrehy z Prague Spring Symposium 2016 a 4th Central Eastern European Symposium on Free Nucleic Acids in Non-Invasive Prenatal Diagnosis

### Minutes from conferences Prague Spring Symposium 2016 and 4th Central Eastern European Symposium on Free Nucleic Acids in Non-Invasive Prenatal Diagnosis

RNDr. Tomáš Szemes, PhD.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Geneton, s. r. o., Bratislava

<sup>2</sup>Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

NewsLab, 2017; roč. 8(1): 57 – 58

Centrum lekárskej genetiky a reprodukčnej medicíny organizuje každoročne konferenciu Prague Spring Symposium a v roku 2016 som bol pozvaný predniesť naše skúsenosti s nami vyvinutým neinvazívnym testom na tri najčastejšie trizómie (trizómie chromozómov 21, 18 a 13) s názvom Trisomy test. Koncom mája som bol pozvaný prednášať na kongres 4th Central Eastern European Symposium on Free Nucleic Acids, kde som taktiež referoval o skúsenostiach s NIPT.

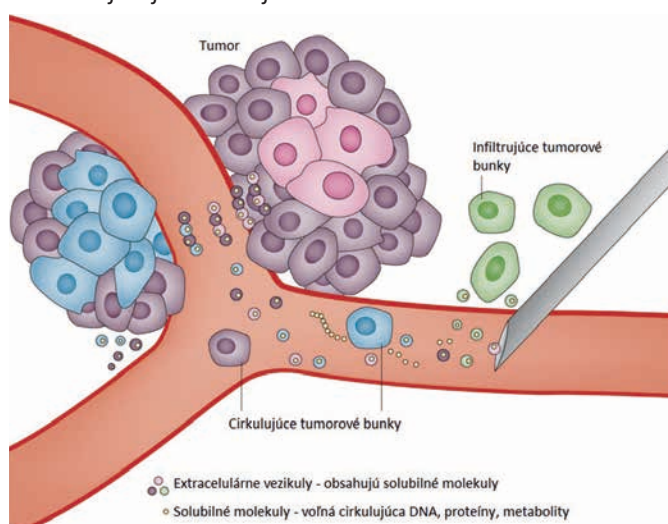
Kongres sa uskutočnil koncom apríla a bol tematicky zameraný na neinvazívny skríning a diagnostiku plodu a nádorov, pričom bol rozdelený na dva dni. Prvý deň bolo nosnou témou využitie cirkulujúcich buniek plodu/nádoru a druhý deň využite cirkulujúcich voľných fetálnych alebo tumorových DNA.

Problematike cirkulujúcich buniek plodu a ich analýze na účely prenatálnej diagnostiky bolo venovaných niekoľko prednášok. Hoci bunky plodu boli objavené omnoho skôr ako voľná cirkulujúca DNA plodu, ich využitie v diagnostike je obmedzené. Problémom je najmä ich extrémne nízky podiel v porovnaní s materskými leukocytmi. Je ich 2 – 6 kusov v 1 ml krvi. Okrem toho cirkulujúce bunky pochádzajú najmä z trofoblastu placenty a v jednotlivých bunkách možno pozorovať chromozomálne aberácie, ktoré však plod nemá. V súčasnosti sú cirkulujúce bunky plodu používané menej<sup>(1)</sup>. Oveľa rozsiahlejšie uplatnenie majú cirkulujúce tumorové bunky (CTC) (**obrázok 1**) pre rôzne aspekty klinického manažmentu pacientov s nádorom a im bola venovaná aj väčšina prednášok<sup>(2)</sup>. Ako svetová špecialistka Patrizia Paterlini-Bréchet prednášala, v oblasti analýzy CTC v krvi patria tiež k tzv. zriedkavým bunkám. Je ich priemerne okolo 1 bunky na 1 ml krvi. Preto je potrebné oddeliť ich od zvyšku buniek a práve rôznym prístupom, dokonca automatizovaným prístrojom pri ich oddeľovaní, sa venuje viacero skupín. Svojou prednáškou zaujala aj Katarína Kološťová, Slovenka pôsobiaca na Karlovej univerzite v Prahe, a to jednoduchým riešením na oddeľovanie CTC na báze ich odlišnej veľkosti. CTC sú navyše podstatne krehkejšie, čo komplikuje ich následné spracovanie či analýzy. Sú značne heterogénne (aj geneticky), čo je dôsledkom dynamického a heterogénneho charakteru nádorového tkaniva. Ich skúmanie má však potenciál pri hodnotení štádia nádorového ochorenia aj metastatického

potenciálu či ako podklad pre riadenie personalizovanej terapie. Ďalším prednášajúcim bol aj Stefan Schuster z nemeckej spoločnosti SIMFO, špecializujúcej sa na analýzy cirkulujúcich epitelových tumorových buniek, i Hannes Arnold zo Silicon Biosystems z Bologne.

Druhý deň bol venovaný analýze voľnej mimobunkovej cirkulujúcej DNA prakticky výlučne v oblasti prenatálneho skríningu na závažné chromozomálne aberácie plodu. Fang Chen zo spoločnosti BGI zo Shenzhen prezentovala skúsenosti a novinky v rámci najdlhšie ponúkaného a najviac rozšíreného NIPT testu vôbec – NIFTY. Robert Old z London School of Medicine predniesol výsledky štúdie zameranej na preverenie vhodnosti špeciálnej schémy prenatálneho skríningu nazvaného *reflex DNA screening*<sup>(3)</sup>. V ňom kľúčovú úlohu pre vybrané skupiny tehotných zohráva práve NIPT test a preukázal prínos zaradenia metódy v rutinej starostlivosti o tehotné. Ja som predniesol naše skúsenosti s vlastným testom<sup>(4)</sup> po roku a podarilo sa na spoluprácu osloviť dnes už partnerské laboratórium v Budapešti.

**Obrázok 1.** Tumor uvoľňuje do krvi bunky, ktoré označujeme ako cirkulujúce tumorové bunky (CTC). Okrem toho sa však v krvi nachádzajú ďalšie solubilné molekuly pochádzajúce z nádoru vrátane cirkulujúcej tumorovej DNA<sup>(7)</sup>



V chorvátskom Splite sa koncom mája konal kongres 4th Central Eastern European Symposium on Free Nucleic Acids in Non-Invasive Prenatal Diagnosis. Kľúčovú prednášku mal sám objaviteľ a najrenomovanejší špecialista na tému využitia voľnej fetálnej DNA plodu, profesor Dennis Lo z Chinese University v Hongkongu (**obrázok 2**). Prednášal o novej metóde založenej na epigenomickom profilovaní, ktoré umožňuje zistiť, aký je pôvod voľne cirkulujúcej DNA, ktorý sa označuje ako tissue mapping<sup>(5)</sup>. Táto metóda nájde využitie nielen pri prenatálnej starostlivosti, ale aj pri tzv. tekutej biopsii nádorov, kde bude možné zistiť, z ktorého tkaniva pochádza nádor. Profesor Howard Cuckle z Columbia University v New Yorku urobil podrobný ekonomický rozbor rôznych schém uplatnenia NIPT v štandardnej zdravotnej starostlivosti. Docent Peter Celec z Lekárskej fakulty UK mal strhujúcu prednášku o fenoméne preeklampsia a možnostiach využitia potenciálnych cirkulujúcich markerov v krvi tehotných žien na zistenie rizika preeklampsie<sup>(6)</sup>. Profesorka Ilona Hromadníková z Karlovej univerzity prednášala o miRNA markeroch preeklampsie aj gestačnej hypertenzie. Tejto téme venoval prednášku tiež Orsolya Bíró zo Semmelweis Univerzity v Budapešti. Moja prednáška bola venovaná aspektom zavedenia nášho NIPT testu na Slovensku.

**Obrázok 2.** Tomáš Szemes a objaviteľ voľnej DNA plodu v plazme tehotných žien profesor Dennis Lo na konferencii 4th Central Eastern European Symposium on Free Nucleic Acids in Non-Invasive Prenatal Diagnosis



Viac informácií k problematike v nasledujúcich odborných článkoch:

### LITERATÚRA

1. Fiddler M. Fetal Cell Based Prenatal Diagnosis: Perspectives on the Present and Future. *Journal of Clinical Medicine* 2014; 3(3): 972-985.
2. Paterlini-Bréchet P. Circulating Tumor Cells: Who is the Killer? *Cancer Microenvironment* 2014; 7(3): 161-176.
3. Wald NJ, Huttly WJ, Bestwick JP et al. Reflex antenatal DNA screening for Down syndrome. *Prenat Diagn* 2015; 35(11): 1154.
4. Minarik G, Repiska G, Hyblova M, et al. Utilization of Benchtop Next Generation Sequencing Platforms Ion Torrent PGM and MiSeq in Noninvasive Prenatal Testing for Chromosome 21 Trisomy and Testing of Impact of In Silico and Physical Size Selection on Its Analytical Performance. *PLoS One* 2015; 10(12): e0144811.
5. Sun K, Jiang P, Chan KC, et al. Plasma DNA tissue mapping by genome-wide methylation sequencing for noninvasive prenatal, cancer, and transplantation assessments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112(40): E5503-12.
6. Konečná B, Vlčková B, Celec P. Role of fetal DNA in preeclampsia (review). *Int J Mol Med* 2015; 35(2): 299-304.
7. Westphal M, Lamszus K. Circulating biomarkers for gliomas. *Nat Rev Neurol.* 2015; 11(10): 556-66.



**RNDr. Tomáš Szemes, PhD.**

Geneton s. r. o.

Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava

e-mail: tomasszemes@gmail.com

## Personalizovaná medicína alebo kam smeruje zdravotná starostlivosť v ére „veľkých dát“?

RNDr. Ján Radvánszky, PhD.

Ústav klinického a translačného výskumu, Biomedicínske centrum, Slovenská akadémia vied, Bratislava

NewsLab, 2017; roč. 8(1): 59 – 60

Keďže tu máme prvú časť našej novej rubriky *Novinky, názory a pohľady*, na začiatok by som chcel v skratke charakterizovať jej ciele. Tie totiž nespočívajú v opisovaní nových vedomostí získaných vedeckou prácou autorov ani v podrobnom zhrnutí väčšiny aktuálne dostupných údajov o vybranej tematike vo forme prehľadových článkov. Ide skôr o našu snahu stimulovať záujem a debatu týkajúcu sa vybraných tém, ktoré aktuálne rezonujú v odbornej a vedeckej literatúre. Tomuto cieľu sme prispôbili aj dĺžku príspevkov, ktorú sa budeme snažiť držať v „čitateľnom“ rozsahu jednej, maximálne dvoch strán. V kontexte celkového zamerania nášho časopisu sme za prvú asi ani nemohli vybrať inú tému než personalizovanú medicínu. Budeme sa pritom snažiť odvolávať na články písané popularizačným štýlom, a to pre prípad, ak by daná tematika zaujala aj tých čitateľov, ktorí by sa chceli dozvedieť o daných témach viac, ale sa im nechce stráviť dni až týždne študovaním tvrdej vedeckej literatúry.

Hlavným konceptom personalizovanej medicíny je individuálny návrh zdravotnej starostlivosti na základe genetických predpokladov a iných molekulárných prejavov konkrétnych pacientov, ich životného štýlu aj prostrediu. Základná téza personalizovanej medicíny, čiže prispôsobenie starostlivosti konkrétnym pacientom, vlastne ani nie je nová, keďže už prvé zdravotné zákroky boli zväčša individualizované a založené na najlepších vedomostiach liečiteľov. Problémom však bolo, že boli zväčša neefektívne, keďže ich vykonávateľom chýbali základné vedomosti týkajúce sa biológie konkrétnych ochorení<sup>(1)</sup>. Vďaka pokrokom 20. storočia – hlavne v oblasti genetiky a molekulárnej biológie – sa však tento problém začal pomaličky eliminovať, pričom do stredobodu personalizovanej starostlivosti sa dostali genetické analýzy. Na prelome 20. a 21. storočia za pomerne krátky čas nastal obrovský technologický skok v tejto oblasti, čoho následkom dnes možno študovať genóm prakticky u každého človeka. Dozvedeli sme sa však aj to, že štúdium organizmu len na úrovni nukleových kyselín neumožňuje odhaliť všetko, čo potrebujeme vedieť na pochopenie súvislostí medzi DNA, zdravím a chorobou, čiže iba sekvenovanie DNA neodhalí všetky súvislosti medzi genotypom a fenotypom. Dnes však možno vo veľkom študovať popri DNA napr. jej chemické modifikácie (metylačné vzory), expresné profily vo forme transkriptómu (RNA) a proteómu vybraných tkanív<sup>(2)</sup>, posttranslačné modifikácie proteínov, ale tiež rôzne iné „ómy“, ako metabolóm, mikrobióm, atď. Podľa očakávaní by nás to malo priviesť bližšie k precíznemu spájaniu genomických a hĺbkových fenotypových dát s nádejou, že čím hlbšie

pôjdeme, tým viac sa dozvieme, pričom by mala takáto „hĺbková fenotypizácia“ umožniť stratifikovať ochorenia do subtypov podľa ich konkrétnych molekulárných charakteristík<sup>(3)</sup>. Boom technologických vymožeností však nezostal iba na molekulárnej úrovni a zasiahol aj vyššie funkčné úrovne organizmu, umožňujúc výrazne efektívnejšiu fenotypizáciu pomocou detailného personálneho monitorovania. V tomto prípade ani nemusíme hovoriť o finančne náročných špecializovaných medicínskych zariadeniach na získavanie dát. V súčasnosti sú už bežné *smartfóny*, *smart* hodinky alebo fitnessové náramky, ktoré ponúkajú funkciu kontinuálneho monitorovania základných fyziologických údajov vo forme teplomeru alebo merania tepovej a dychovej frekvencie, ale aj fyzickej aktivity a vplyvov prostredia vo forme krokomeru, výškomeru, barometra atď. Špecifickejšie symptómy – napr. neurodegeneratívnych ochorení – ako motorické a rečové funkcie sa zas dajú monitorovať cez špeciálne mobilné aplikácie využívajúce základné schopnosti dnešných mobilných zariadení: mikrofón môže nahrávať hlas, triaxiálny akcelerometer deteguje pohyb v troch dimenziách, dávajúc tak informáciu o postoji, chôdzi a trasení rúk, gyroskop meria rotáciu, kým dotyková obrazovka umožňuje hodnotiť dotyky prstom a reakčný čas<sup>(4)</sup>. Takéto „nositeľné zariadenia“, v spojení s faktom, že nimi disponuje čoraz väčšia časť populácie, umožňujú získať nesmierne veľké množstvo informácií v populačných meradlách, pričom neumožňujú len sa pozerať na veľké množstvo dát, ale na veľké množstvo dát z veľkého množstva rôznych zdrojov súbežne<sup>(5)</sup>. Napriek niektorým limitáciám však samotné generovanie dát je v súčasnosti možno už tou jednoduchšou a v mnohých prípadoch aj lacnejšou časťou práce. Veľkú analytickú snahu však vyžaduje samotná interpretácia získaných dát, čiže ich využiteľné preklopenie do priamej klinickej praxe. Príval „veľkých dát“ predstavuje veľké nároky nielen na ich skladovanie, ale sú schopné presiahnuť napr. schopnosti infromatických algoritmov analyzovať ich. Pri zvyšovaní počtu pacientov zahrnutých do štúdie napríklad narastajú výpočtové nároky lineárne, len čo sa však pridá do súboru viac premenných – napr. rôzne typy dát – a chceme ich kombinovať, nároky začnú narastať exponenciálne, čo môže paralyzovať algoritmy, ktoré pri štúdiách malých rozmerov fungujú dokonale. Riešenia na tieto problémy však existujú, pričom sa niekedy stačí pozrieť mimo oblastí biomedicínskeho výskumu. Odbory ako meteorológia, finančníctvo a astronómia využívajú integráciu rôznych typov dát už dlhšie obdobie, pričom podľa názorov niektorých expertov biomedicínske „veľké dáta“ sa zdajú

maličké pri „veľkých dátach“, s ktorými pracujú napr. v *Google* alebo na *Facebooku*. Jednou z možností je presun na riešenia tzv. *cloudových* architektúr, pri ktorých sa dáta umiestňujú a procesujú masívne paralelným spôsobom v súbore veľkého počtu výpočtových zdrojov, pričom sa môžu analyzovať s výpočtovou silou, aká je práve potrebná. Toto riešenie pritom môže podporovať aj zdieľanie a spoluprácu na dátových súboroch, otvára však zároveň otázky týkajúce sa etických a legálnych aspektov šírenia a ochrany dát týkajúcich sa citlivých medicínskych informácií<sup>(6)</sup>. Údaje potrebné na vytvorenie vedomostnej bázy a na posun personalizovanej medicíny totiž nevyžadujú len generovanie a základné spracovanie „omických“ a zdravotných dát, ale aj ich sprístupnenie aspoň pre širšiu odbornú verejnosť. Bolo však na viacerých súboroch veľkých genomických projektov dokázané, že s určitými vedomosťami a vyhradeným úsilím možno re-identifikovať darcov DNA z genomických dát, aj keď boli uverejnené základne v anonymizovanej forme. Je teda viac-menej jednoznačné, že nemožno naozaj uchrániť identitu genomických dát a možno k nim priradiť mená ich darcov. Dokonca, aj keď sa dáta uchovávajú od seba oddelene v rôznych databázach vo forme „meno“, „genóm“ a „zdravotné informácie“, podľa uvedeného existuje určitá šanca, že sa dajú poskladať do použiteľného/zneužiteľného trojuholníka „meno – genóm – zdravotné informácie“, ktorý už môže obsahovať viac informácií, než by o sebe niektorí ľudia chceli uverejniť.

### REFERENCIE

1. Dance A. Medical histories, *Nature*. 2016; 537(7619): Suppl. S52-S53
2. Scott AR. Read the instructions. *Nature*. 2016; 537(7619): Suppl. S54-S56.
3. Delude CM. The details of disease. *Nature*. 2015; 527(7576): Suppl. S14-S15.
4. Gravitz L. Monitoring gets personal. *Nature*. 2016; 538(7626): Suppl. S8-S10.
5. Savage N. Made to measure. *Nature*. 2015; 527(7576): Suppl. S12-S13
6. Eisenstein M. The power of petabytes, *Nature*. 2015; 527(7576): Suppl. S12-S13.
7. Savage N. The myth of anonymity. *Nature*. 2016; 537(7619): Suppl. S70-S72.

Otázne však je, nakoľko a akým spôsobom to predstavuje reálny problém. Vedci z oblastí informačných technológií ukazujú aj na pohľady, podľa ktorých takto uverejnené dáta nepredstavujú väčšie nebezpečenstvo ako iné zdroje, v ktorých ľudia uverejňujú o sebe informácie vlastnou dobrovoľnou činnosťou. Je možné totiž rôzne citlivé informácie o ľuďoch získať na základe hodnotenia *likov* na *Facebooku*, a to ešte nehovoríme o informáciách, ktoré o sebe uverejňujeme vo forme fotografií, diskusných komentárov, cez naše elektronické nákupy, internetové prehliadače, mobilné aplikácie, hry, atď. Keď sa vrátíme k možnosti úniku zdravotných dát z genomických štúdií, je teda jednoznačné, že sa im pravdepodobne nedá efektívne zabrániť a zatiaľ nevieme ani úplne presne charakterizovať všetky možné hrozby. Je preto dôležité, aby boli účastníci štúdií vopred jednoznačne informovaní o rizikách a benefitoch štúdie a aby sa im nesľubovali záležitosti o ochrane dát, ktoré nebude možné následne dodržať. Podľa viacerých názorov sa pritom problém ochrany dát technologicky ani nedá vyriešiť dostatočne efektívne, čiže jeho riešenie zostáva s najväčšou pravdepodobnosťou na právno-legislatívnej úrovni a na úrovni spoločnosti a jej uvedomelosti<sup>(7)</sup>. Bola by to však naozaj veľká škoda, ak by tieto obavy a prípadné možné zneužívania dát stáli v ceste rozvoja tomu, čo si dnes predstavujeme pod pojmom personalizovaná medicína.



**RNDr. Ján Radvánszky, PhD.**

Ústav klinického a translačného výskumu  
Biomedicínske centrum, Slovenská akadémia vied  
Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava  
e-mail: jan.radvanszky@savba.sk

## Nové trendy v usg diagnostike

So zmenou spoločenského a sexuálneho správania sa mladých ľudí súvisí aj prenos Human Papiloma Virus (HPV). Štatistiky<sup>(1)</sup> uvádzajú, že výskyt HPV u mladých žien vo veku 25 až 30 rokov je 50% až 60%. Nie všetky typy HPV sú rovnako rizikové z hľadiska onkogynekologických ochorení. Skupina HPV s nízkym rizikom vzniku onkologického ochorenia spôsobuje bradavice, známe ako condylomata acuminata. Do druhej skupiny s vysokým rizikom vzniku rakoviny patria vírusy, ktoré spôsobujú najskôr pred rakovinové stavy (tzv. prekancerózy), ktoré v prípade neriešenia môžu neskôr prechádzať do samotného rakovinového ochorenia. Do tejto skupiny patria vírusy označené číslami 16, 18, 31, 33, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 66, 68, 73, 82, pričom HPV 16 a 18 majú na vzniku karcinómu krčka maternice až 70% podiel<sup>(1)</sup>.

Dôležitou súčasťou pri sledovaní a prevencii gynekologických pacientiek je okrem klinického a biologického vyšetrenia aj ultrazukové vyšetovanie, kde okrem klasickej biopsie (steru), je moderným trendom aj elastografia. Tkanivo postihnuté ochorením, je často tvrdšie a tuhšie ako zdravé tkanivo. Požitím manuálnej kompresie, pri ktorej vyšetrujúca osoba vyvíja mierny tlak zvonku tela na orgán s ultrazukovou sondou, dokáže softvérový program z malých posunov medzi jednotlivými snímkami vypočítať relatívnu tuhosť tkaniva. Meranie tuhosti tkaniva teda umožňuje včasnú diagnostiku nádorov. Moderné ultrazukové prístroje rady ACUSON S-Family poskytujú tieto najnovšie technológie aj pre gynekologické vyšetovanie s názvom eSie Touch.

Ďalším trendom, je využívanie ultrazukovej kontrastnej látky pri diagnostike sterility žien súvisiacej s nepriechodnosťou vajčikovodov. V minulosti sa toto vyšetrenie vykonávalo aj pod RTG žiarením, čo môže mať veľmi neblahé účinky na zdravie ženy prípadne plodu. Moderné USG prístroje ACUSON S-Family, umožňujú toto vyšetrenie vykonávať bez RTG žiadenia s použitím ultrazukovej kontrastnej látky. Podľa nemeckej lekárskej spoločnosti pre ultrazuk DEGUM, ultrazuk s využitím kontrastného média predstavuje najvýznamnejší pokrok v oblasti diagnostiky za ostatné roky. Pri takomto vyšetrení sú pacientke podané mikrobublinky, naplnené plynom, teda ultrazuková kontrastná látka. Tá sa po určitom čase nahromadí v tkanive v špecifickom usporiadaní a ultrazukový prístroj ju dokáže zobrazit'. Doktor na základe pozorovania migrácie kontrastnej látky môže vyšetrit' okrem iného aj priechodnosť vajčikovodov. Spoločnosť



Siemens Healthcare vo svojich ultrazukových systémoch ponúka rôzne aplikácie pre mnohé typy kontrastnej sonografie. CPS umožňuje pozorovanie hlbších vrstiev orgánov na obrazovke, zatiaľ čo CHI veľmi detailne zobrazuje menšie cievy a objemy, nachádzajúce sa bližšie pri povrchu tela.

### Presnejšia diagnostika

Trieda ultrazukových prístrojov ACUSON S-Family je vybavená modernými technológiami, ktoré prinášajú vysokú kvalitu zobrazenia. Diagnostika je vďaka tomu presnejšia, čím sa zvyšuje pravdepodobnosť odhalenia odchýlok vo vývoji plodu ako aj včasného rozpoznania iného závažného ochorenia ženy. Pri podozrení na niektoré vývojové vady, prístroj umožňuje využit' aj techniku 3D/4D vyšetrenia v reálnom čase.

Samozrejmosťou je plné softvérové vybavenie, ktoré umožňuje robiť všetky druhy meraní pre správny výpočet a zdokumentovanie vývoja plodu počas tehotenstva ale aj zdravia ženy.

Prístroje rady ACUSON S-Family bol navrhované s dôrazom na čo najvyššiu spoľahlivosť a najvyššiu kvalitu obrazu a spôsob obsluhy pomocou dotykového displeja označila nezávislá štúdia Macadamian, ako jednu z najlepších metód ovládania ultrazukových systémov.

### LITERATÚRA

1. <http://primar.sme.sk/c/4934341/virus-hpv-mame-takmer-vsetci-rakovinu-sposobi-len-ojedinele.html>

Pre viac info: Ing. Matúš Kolarčík, Siemens Healthcare s.r.o. Tel. 0911 896 475, [matus.kolarcik@siemens.com](mailto:matus.kolarcik@siemens.com)

### Klinická parazitológia

doc. RNDr. František Ondriska, PhD., RNDr. Vojtech Boldiš, PhD., Mgr. Mária Garajová, PhD.,  
RNDr. Martin Mrva, PhD.

Univerzita Komenského v Bratislave, december 2016, ISBN 978-80-223-4217-9

Predkladaná publikácia je komplexným dokumentom s najnovšími poznatkami z parazitológie určeným pre študentov medicínskeho i prírodovedného zamerania na pregraduálnej i postgraduálnej úrovni. Užitočné informácie sústredené v jednom dokumente nájdú i lekári teoretických i klinických odborov a laboratórni diagnostici pri výkone praktických povolaní. Publikáciu sme rozdelili na tri časti: Všeobecná parazitológia, Špeciálna parazitológia a Laboratórna diagnostika parazitóz. V prvej časti sa zaoberáme charakteristikou a vlastnosťami parazita a hostiteľa, ich vzájomnými vzťahmi (parazito-hostiteľskými vzťahmi), epidemiológiou parazitárnych nákaz, patobiológiou a klinickými prejavmi ochorení spôsobených parazitmi. V ďalších kapitolách prvej časti predstavujeme prvky a helminty, základné morfológické charakteristiky, vývinové cykly a taxonomické zatriedenie. Kapitoly špeciálnej parazitológie predstavujú parazity a nozologické jednotky, ktoré sme usporiadali podľa systémových lokalizácií v ľudskom organizme. Okrem opisu pôvodu parazitárneho ochorenia vrátane životného cyklu uvádzame u každej jednotky imunobiológiu, epidemiológiu, patobiológiu, klinické prejavy, diagnózu, liečbu a preventívne opatrenia. Osvojenie si základných informácií o jednotlivých parazitárnych druhoch, ich vývinových cykloch považujeme za základ pochopenia patobiologických, klinických i ekologických súvislostí vedúcich k stanoveniu správnej diagnózy, cielej terapie a preventívnych opatrení zameraných na zamedzenie šírenia jednotlivých parazitárnych nákaz. V tretej časti predkladáme základné metódy používané v diagnostike parazitóz vrátane ich receptária. Okrem textovej časti učebnica obsahuje päť tabuliek a 117 čierno-bielych i farebných ilustrácií a doplnená je registrom parazitov.

Publikáciu recenzovali: Prof. RNDr. Jozef Halgoš, DrSc.  
RNDr. Karel Fajfrlík, PhD.

**V krátkej dobe plánujeme vydať tlačovú verziu učebnice. Publikácia je dostupná na linku:**

<https://www.laboratornadiagnostika.sk/aktuality/675/nasi-parazitologia-s-kolektivom-autorov-napisali-novu-ucebnicu-pre-studentov-lekarov-sirokych-odbornosti-i-laboratornych-diagnostikov>

### Recenze na učebnici Františka Ondrisky a ďalšieho kolektivu autorů – „Klinická parazitológia“

Autoři předkládají k tisku vysokoškolskou učebnici zabývající se komplexně odbornou problematikou lékařské parazitologie. Jedná se o publikaci, která je zdrojem informací hlavně pro studenty s lékařským zaměřením, přírodovědným, ale i pro studenty připravující se na dráhu laboratorních pracovníků v diagnostických pracovištích. Jak pro studenty pregraduálního studia, tak i pro studenty postgraduální formy studia. Problematika parazitologie se v našich podmínkách jeví ve srovnání s ostatními podoborů mikrobiologie jako zdnalivě méně důležitá, ale opak je pravdou. Při současných možnostech cestování, možných pracovních pobytů v zahraničí, přirozené migraci obyvatelstva nebo migraci způsobené zhoršenou sociálně ekonomickou situací, získává lékařská parazitologie opět na významu. Existuje zde totiž reálná hrozba zavlečení parazitárních onemocnění, která se ve střední Evropě dosud nevyskytovala nebo hrozba následného šíření onemocnění z jižních destinací na sever v důsledku globálního oteplování. Celosvětově totiž tato onemocnění mají neustále velký význam a závažný negativní dopad na zdraví lidské populace zvláště v tropických a subtropických destinacích.

Text má celkem 239 stran a je členěn do 3 velkých částí: „Obecná parazitologie“, „Speciální parazitologie: klinicky významní paraziti člověka“ a poslední část s názvem „Laboratorní diagnostika parazitárních onemocnění“. První část seznamuje studenty a čtenáře se základní terminologií tohoto oboru, s obecnými zákonitostmi mezi parazitem a jeho hostitelem, s epidemiologií parazitárních nákaz. Velmi důležitá a dobře zpracovaná je kapitola o imunologických aspektech reakce hostitele na přítomnost parazita a naopak. Kapitulu o klinických příznacích a patobiologii parazitárních onemocnění ocení hlavně studenti lékařských fakult. Součástí této kapitoly je i stručná charakteristika a morfologie parazitických protozoí a helmintů. Druhá velká kapitola „Speciální parazitologie“ popisuje jednotlivé zástupce, kteří jsou schopni parazitovat u člověka. Tato kapitola je pojata netradičně, ale s ohledem na velkou skupinu čtenářů – studenty medicíny. Systém není rigidní biologický, ale paraziti jsou popisováni s ohledem na oblast, kde převážně parazitují. V první kapitole jsou popsány protozoární i helmintární nákazy zažívacího traktu, druhá část popisuje parazity ostatních systémů těla člověka. Poslední část textu představuje a popisuje možnosti laboratorní diagnostiky parazitárních nákaz. Autoři se v této kapitole věnují preanalytické fázi přípravy vzorku zajišťující co největší výtěžnost. V její druhé části pak precizně popisují jednotlivé laboratorní metody vhodné ke zpracování jednotlivých druhů materiálu.

Celá publikace je vhodně a citlivě doplněna celou řadou obrázků, fotografií a tabulek, které problematiku objasňují a výborně napomáhají k lepšímu pochopení textu.

Problematika parazitologie, díky zdravotním problémům, které přináší na našem území, se může jevit jako okrajová. Od toho se odvíjí i četnost vydávaných odborných publikací v mikrobiologii. „Klinická parazitologie“ tento nedostatek kompenzuje. Lze konstatovat, že se jedná o velmi užitečnou moderní odbornou vysokoškolskou učebnici. Autorům se podařilo sestavit komplexní text, který shrnuje současné poznatky v oboru lékařské parazitologie. Studentům přináší nové poznatky z oboru a lze ji jako učebnici doporučit pro všechny typy škol, kde se daná problematika vyučuje. Nové poznatky a vědomosti publikované v textu budou určitě užitečné i pro odborné pracovníky v laboratořích, pro lékaře v klinické praxi, ale i pro pedagogy, kteří daný obor vyučují na různých stupních vzdělávacích institucí. Takto komplexní a moderní vysokoškolská učebnice v nabídce pro široký okruh odborných pracovníků chyběla.

V Plzni dne 18. 12. 2016

RNDr. Karel Fajfrlík, PhD.

Přednosta Mikrobiologického ústavu LF a FN v Plzni

## AUTODIDAKTICKÝ TEST 1/2017

Autodidaktický test pre lekárov je akreditovaný Slovenskou lekárskou komorou (SLK) ako garantovaná celoročná vzdelávacia aktivita.

Autodidaktický test pozostáva z minimálne 20 otázok, pričom na každú otázku je jedna správna odpoveď.

Test je možné riešiť online. Postup nájdete na [www.newslab.sk](http://www.newslab.sk).

Riešiť možno ľubovoľný počet testov v rámci aktuálneho roku. Na konci roku bude ohodnotená úspešnosť riešenia testov, podľa ktorej pridelí SLK príslušný počet kreditov.

V aktuálnom roku možno získať 4 kredity.

Hodnotenie testov CME kreditmi:

100 % – 80 % úspešnosť riešenia - 2 kredity

79,99 % – 60 % úspešnosť riešenia - 1 kredit

59,99 % – 0 % úspešnosť riešenia - 0 kreditov

Termín pre vyriešenie autodidaktického testu 01/2017: do 30. 06. 2017.

**Výskyt kmeňov *Streptococcus pneumoniae* pri zápalových ochoreniach horných dýchacích ciest detí v predškolskom veku a ich rezistencia na antibiotiká**

1. V ktorom regióne bol najvyšší percentuálny podiel nálezov *Streptococcus pneumoniae* v populácii 0- až 5-ročných detí?

- Prešov
- Topoľčany
- Galanta
- Komárno

2. Ktorá potenciálne patogénna baktéria sa vyskytovala najčastejšie súčasne s *S. pneumoniae* vo výteroch z horných dýchacích ciest?

- Haemophilus influenzae*
- Moraxella catarrhalis*
- Staphylococcus aureus*
- Neisseria meningitidis*

**Kultivácia a molekulárno-genetická charakterizácia kožných baktérií**

3. Aká je plocha kože?

- 1,7 m<sup>2</sup>
- 1,8 m<sup>2</sup>
- 2 m<sup>2</sup>
- 2,8 m<sup>2</sup>

4. Čo tvorí kožný mikrobióm?

- baktérie, plesne a eukaryotické organizmy
- huby, baktérie a plesne
- vírusy, baktérie, eukaryotické organizmy
- baktérie, vírusy, huby, eukaryotické organizmy

**Pseudoglandulárny névus – zriedkavá morfológia melanocytového névu (case report)**

5. Pseudoglandulárne zmeny v melanocytárnych léziách:

- sú zriedkavé zmeny, ktoré však možno pozorovať prakticky v ktoromkoľvek type lézie
- sú časté zmeny, ktoré však možno pozorovať prakticky v ktoromkoľvek type lézie
- sú zriedkavé zmeny, ktoré však možno pozorovať výhradne v malígnych melanómoch
- sú časté zmeny, ktoré však možno pozorovať výhradne v malígnych melanómoch

6. Medzi predpokladané možné mechanizmy vzniku pseudoglandulárnych zmien patrí:

- nedostatočný prísun vápnika a s tým súvisiaca dekalifikácia
- retrakčný mechanizmus/artefakt pri spracovaní
- mutácia v *brca1* géne
- vysoká aktivita neuraminidáz a transsialidáz

**Výskyt betahemolytických streptokokov izolovaných z horných dýchacích ciest pacientov z okresov Komárno a Nové Zámky a ich rezistencia na antibiotiká**

7. Ktorý betahemolytický streptokok je primárnym patogénom horných dýchacích ciest?

- Streptococcus pyogenes*
- Streptococcus agalactiae*
- Streptococcus anginosus* group
- Betahemolytický netyppovateľný streptokok

8. V ktorej vekovej kategórii bol výskyt *S. pyogenes* najčastejší?

- menej ako 6 rokov
- 7 až 11 rokov
- 12 až 15 rokov
- 16 až 19 rokov

**Neštandardné výsledky neinvazívneho prenatalného testu na chromozómové poruchy plodu môžu poskytovať doplňujúcu informáciu o zdravotnom stave tehotných žien**

9. Priemerný podiel voľnej DNA plodu v periférnej krvi tehotných žien sa medzi 10. a 21. týždňom pohybuje v rozmedzí:

- 10 – 20 %
- 20 – 30 %
- 100 – 200 %
- 200 – 300 %

10. Skratka NIPT sa v problematike prenatalnej starostlivosti používa na označenie:

- neinvazívnej prenatalnej diagnostiky
- neinvazívneho paternitného testovania
- neinvazívneho prenatalného testovania
- nelineárnej intracytoplazmatickej aplikácie spermie

**Diferenciálna molekulová diagnostika mnohopočetného myelómu a Waldenströmovej makroglobulinémie**

**11. Mnohopočetný myelóm patrí do skupiny ochorení:**

- a. monoklonálnych gamapatií
- b. non-Hodgkinových lymfómov
- c. obe uvedené
- d. ani jedna uvedená

**12. Mnohopočetný myelóm a Waldenströmova makroglobulinémia sú ochoreniami:**

- a. B-lymfocytov
- b. T-lymfocytov
- c. B- aj T-lymfocytov
- d. ani jedno z uvedených

**Molekulová analýza prognosticky významných markerov chronickej lymfocytovej leukémie**

**13. Chromozómy najčastejšie postihnuté aberáciami pri CLL sú:**

- a. 13, 18, 21
- b. 11, 12, 13, 17
- c. 11, 13, 15
- d. všetky odpovede sú správne

**14. Aberáciu, ktorá narúša expresiu tumor supresorového génu ATM, je:**

- a. parciálna delécia chromozómu 11
- b. parciálna trizómia chromozómu 12
- c. delécia chromozómu 17
- d. trizómia chromozómu 21

**Malígnny melanóm – nové aspekty výskumu**

**15. Incidencia malígneho melanómu v Slovenskej republike sa za posledných 30 rokov:**

- a. viac ako strojnásobila
- b. zdvojnásobila
- c. je nemenná
- d. dvojnásobne poklesla

**16. Veľká časť prípadov malígneho melanómu je charakteristická mutáciou:**

- a. GNAQ V300E (resp. V399E)
- b. GNAQ V600E (resp. V599E)
- c. BRAF V300E (resp. V399E)
- d. BRAF V600E (resp. V599E)

**Cirkulujúca DNA – od jej objavu cez neinvazívne prenatálne testovanie aneuploidii a monogénne dedičných ochorení až k neinvazívnej nádorovej diagnostike a prognostike**

**17. Z akého biologického materiálu sa získava cirkulujúca DNA?**

- a. krv
- b. sliny
- c. moč
- d. pot

**18. Hodnota fetálnej frakcie negatívne koreluje:**

- a. so zlými stravovacími návykmi
- b. s fajčením a požívaním alkoholu
- c. s telesnou hmotnosťou
- d. s časom odberu

**Choroba len pre tehotné – PREEKLAMPSIA**

**19. Symptómom nástupu ochorenia (preeklampsia) je:**

- a. hypertenzia a proteinúria na začiatku tehotenstva
- b. hypertenzia a proteinúria po 20. týždni tehotenstva
- c. znížená koncentrácia cfDNA
- d. diabetes mellitus

**20. Jedným z rizikových faktorov preeklampsie je:**

- a. ženy mladšie ako 40 rokov
- b. tehotenstvá nesúce ženský plod
- c. preeklampsia v predchádzajúcom tehotenstve
- d. kratší interval medzi jednotlivými tehotenstvami

*Garantovaný autodidaktický test skontrolovala a jeho uverejnenie povolila MUDr. Kristína Mikuš Kuracinová.*

**Test je možné riešiť online. Postup nájdete na [www.newslab.sk](http://www.newslab.sk).**

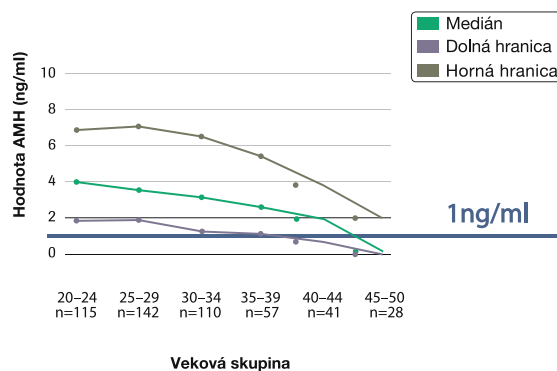


„Ktorý test by mal byť prvý?“

## Diagnostika neplodnosti začína kontrolou ovariálnej rezervy pomocou AMH testu z krvi.

*Nízka ovariálna rezerva – na ktorú nás upozorňuje koncentrácia AMH <1ng/ml – si vyžaduje konzultáciu s odborníkom na reprodukčnú medicínu.*

- Anti-Müllerov hormón (AMH) je markerom voľby pre posúdenie ovariálnej rezervy, lebo jeho sérové hladiny korelujú s počtom rastúcich folikulov.<sup>1-3</sup>
- Hladiny AMH môžu byť merané v ktoromkoľvek dni menštruačného cyklu, pretože sú relatívne stabilné počas celého cyklu.<sup>4,5</sup>
- AMH test je plne hrađený, ak ho indikuje gynekológ alebo gynekológ v špecializácii reprodukčná medicína.<sup>6</sup>
- Interpretácia je jednoduchá s AMH vekovo špecifickými hodnotami.<sup>7</sup>



Literatúra: 1. Hansen, K.R. et al. (2011). *Fertil Steril*; 95:170–175. 2. Dewailly, D. et al. (2014). *Hum Reprod Update*; 20:370–385. 3. Iliodromiti, S., Nelson, S.M. (2013). *Biomark Med*; 7:147–158. 4. Van Disseldorp, J. et al. (2010). *Hum Reprod*; 25:221–227. 5. Tsepelidis, S. et al. (2007). *Hum Reprod*; 22:1837–1840. 6. Podobné vyšetrenia SVLZ [www.vszp.sk/poskytovatelia/zdravotna-starostlivost/zdravotna-starostlivost/vykazovanie-dat/pravidla-uznavania-laboratornych-vykonov/](http://www.vszp.sk/poskytovatelia/zdravotna-starostlivost/zdravotna-starostlivost/vykazovanie-dat/pravidla-uznavania-laboratornych-vykonov/) 7. Anti-Müllerian Hormone. Elecsys and cobas e analyzers package insert 2014.



Ferring Slovakia, s.r.o.

Galvaniho 7/D  
821 04 Bratislava  
Tel. 02/5441 6010

## CESTA K OTEHOTNENIU

Projekt podporený edukačným grantom  
Ferring Pharmaceuticals a Roche Diagnostics.



Roche Slovensko, s.r.o.  
Diagnostics Division  
Lazaretská 12  
811 08 Bratislava  
Tel. 02/5710 3680

## INTERNÁ MEDICÍNA



11x ROČNE

## KARDIOLÓGIA pre prax



4x ROČNE

## GASTROENTEROLÓGIA pre prax



4x ROČNE

## GYNEKOLÓGIA pre prax



4x ROČNE

## NEUROLOGIA



3x ROČNE

## PEDIATRIA



6x ROČNE

## KLINICKÁ UROLÓGIA



3x ROČNE

## SLOVENSKÁ GYNEKOLÓGIA A PÔRODNÍCTVO



4x ROČNE



GARANTOVANÝ AUTODIDAKTICKÝ  
TEST S PRIDELENÍM KREDITOV




PRÍSTUP DO ARCHÍVU ČASOPISU



RECENZOVANÉ ČLÁNKY  
NA ZAUJÍMAVÉ TÉMY



PREDPLATNÉ NA [WWW.AMEDI.SK](http://WWW.AMEDI.SK)

Môžete použiť aj kópiu 

## OBJEDNÁVKA – PREDPLATNÉ 2017

- GASTROENTEROLÓGIA pre prax 4x ročne – 16 €   
  PEDIATRIA 6x ročne – 18 €   
  NEUROLOGIA 3x ročne – 12 €   
  SLOVENSKÁ GYNEKOLÓGIA A PÔRODNÍCTVO 4x ročne – 16 €
- KARDIOLÓGIA pre prax 4x ročne – 20 €   
  GYNEKOLÓGIA pre prax 4x ročne – 16 €   
  INTERNÁ MEDICÍNA 11x ročne – 40 €   
  KLINICKÁ UROLÓGIA 3x ročne – 12 €

(titul) Meno a priezvisko .....

Ulica, mesto, PSČ .....

Telefón ..... e-mail .....

IČO ..... IČ DPH ..... Podpis .....

SPÔSOB ÚHRADY:  Faktúra  Zložienka

\*DÔLEŽITÉ: nezabudnite dať krížik k príslušnému spôsobu úhrady a objednanému časopisu

A-medi management, s.r.o.  
Stromová 13, 831 01 Bratislava  
IBAN: SK11 1111 0000 0010 2685 2003

02/55 64 72 48  
ekonom@amedisk

abbvie

## SVOJU PRÁCU ROBÍME SRDCOM A VŽDY MYSLÍME NA NAŠICH PACIENTOV.

**Spojili sme zázemie silnej farmaceutickej spoločnosti so špičkovými biotechnologickými poznatkami, aby sme pomohli pacientom zvládnuť výzvy, ktoré denne podstupujú.**

Zameriavame sa na vývoj nových liekov, ktoré zlepšujú pacientom kvalitu života a majú významné klinické účinky. Náš výskum je zameraný na oblasť neurológie, imunológie, onkológie, ochorenia obličiek, liečbu hepatitídy C, zdravie žien a starostlivosť o predčasne narodené deti.

**[www.abbvie.sk](http://www.abbvie.sk)**



[www.newslab.sk](http://www.newslab.sk)  
[www.medirexgroupacademy.sk](http://www.medirexgroupacademy.sk)

