

Ročník IX.

# newslab

časopis laboratórnej medicíny



2018

**Zrelý ovariálny teratóm s obrazom podobným cystoidnej pneumatóze – morfológická a imunohistochemická štúdia**

Mature ovarian teratoma with pneumatosis cystoides-like appearance – morphological and immunohistochemical study

**Incidentálna pelvická lymfangioleiomyomatóza pri karcinóme maternice. Opis prípadu a pátranie po podobných léziách v súboroch stagingových resekcí**

Incidental pelvic lymphangiomyomatosis in case of uterine carcinoma. Report of the case and search for similar lesions in series of staging lymphadenectomies

**Environmentálny estrogén bisfenol A a poruchy fertility u žien**

Environmental oestrogen bisphenol A and disorders in woman fertility

**Monitoring EBV infekcie u detských pacientov po transplantácii krvotvorných buniek (TKB)**

Monitoring EBV infection in children patients after Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT)

**Ojedinelý prípad infekcie spôsobenej *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 v klinickej praxi na Slovensku**

The rare care of infection caused by *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 in clinical practice in Slovakia

**newslab** – recenzovaný časopis laboratórnej medicíny ponúka autorom priestor na uverejnenie výsledkov ich vedecko-výskumnej práce formou prehľadových článkov, pôvodných prác, noviniek v odbore alebo kazuistík.

newslab už deväť rokov prináša čitateľom najnovšie poznatky z oblasti vedy a výskumu. Jeho hlavnou cieľovou skupinou sú lekári, vedecko-výskumní pracovníci na univerzitách a laboratórni pracovníci. Je distribuovaný aj do všetkých dôležitých vedeckých knižníc.

Časopis má pridelenú citačnú skratku, čo v praxi znamená, že autorom sa ich príspevky započítavajú do publikačnej činnosti. Zároveň je indexovaný v Bibliographia Medica Slovaca (BMS) a citácie sú spracované v CiBaMed.

**Všetky uverejnené príspevky autorov sú recenzované a honorované.**

**Vydavateľ:** MEDIREX GROUP ACADEMY n. o.  
**Redakcia:** MEDIREX GROUP ACADEMY n. o.  
**Periodicita:** 2x ročne  
**Počet strán:** 70 – 100  
**Náklad:** 5 000 ks

Aktuálne vydanie nájdete na stránke [www.newslab.sk](http://www.newslab.sk).

**V prípade záujmu o publikovanie nás kontaktujte na e-mailovej adrese: [redakcia@newslab.sk](mailto:redakcia@newslab.sk).**



## Milí priatelia, milí čitatelia,

minulý rok vo Filadelfii zomrel vo veku 91 rokov Eugen Garfield. Človek, ktorého meno možno mnohým z vás nič nehovorí. Bol to však človek, ktorého celoživotná práca a jej výsledky ovplyvňujú aj v súčasnosti život každého vedca. Spolu s Joshuom Lederbergom stáli za vznikom SCI indexu (Science Citation Index), ktorý je súčasťou Clarivate Analytics Web of Science. Indexov, bez ktorých by sme si dnešnú vedu ani nevedeli predstaviť. Eugen Garfield pochopil cenu informácie. Pochopil to, že výsledky výskumu, ktoré nie sú dostupné, nemajú žiadny význam.

Dostupnosť bola v minulom storočí veľký problém. Množstvo informácií sa zvyšovalo s rastúcim počtom odborných publikácií. Nájsť tie správne, ktoré by boli dôležité pre prácu každého vedca, však bolo náročné. Eugen Garfield už krátko po druhej svetovej vojne navrhol systematicky zhromažďovať a indexovať dostupné vedecké publikácie. Bol špecialistom na vedecké informácie. Chápal aktuálne potreby vedcov. A bol vizionárom. Cítil, že táto potreba bude v budúcnosti ešte nástojčivejšia. V júli 1955 publikoval v Science článok „Citačné indexy pre vedu, nová dimenzia v dokumentácii prostredníctvom asociácie myšlienok“, v ktorom opísal svoju víziu. Eugen Garfield založil Inštitút pre vedecké informácie (ISI), ktorý začal poskytovať službu Current Contents. Tá pravidelne pripravovala sumár aktuálneho obsahu vedeckých časopisov a umožnila v ňom vyhľadávať, hodnotiť ho, indexovať a filtrovať. Tým sprostredkoval informácie širokej vedeckej verejnosti a každý mal šancu nájsť tie články, ktoré práve potreboval, ktoré boli pre jeho prácu relevantné.



Napriek tomu, že v súčasnosti už internet umožnil jednoduchý dosah prakticky na čokoľvek, stále sú tie časopisy, ktoré sú spracovávané Current Contents (karentové časopisy), považované za hodnotnejšie, majúce väčší dosah na vedeckú komunitu. Zaradenie titulu do tejto databázy je prestížnou záležitosťou, každý kandidátny časopis podstupuje prísne hodnotenie kvality obsahu, spracovania, renomovanosti redakčnej rady aj podmienok recenzného konania a dodržiavania etických hodnôt. Current Contents však nie je jediná, aj keď historicky najznámejšia databáza. Existujú aj iné indexy (Scopus, Web of Science, Index Copernicus). Dostať do nich časopis však nie je jednoduché. Predstavuje to dôležitý krok pre to, aby sa články autorov dostali k svojim adresátom. Jedným z najdôležitejších ukazovateľov kvality vedeckého článku je počet jeho citácií v iných odborných publikáciách. Analýzy, ktoré uskutočnili renomované vydavateľstvá, ukázali, že články indexované v kvalitných databázach, ako je napríklad Web of Science, sú len zriedkavo bez citácií (menej ako 10 percent). Málokedy sa stane, že by zostali nepovšimnuté.

Za posledné roky podstúpil náš časopis veľké zmeny a urobil značný pokrok. Z pôvodne firemného časopisu sa stal plnohodnotným vedeckým časopisom prístupným odbornej verejnosti a prinášajúcim hodnotný obsah všetkým, ktorí ho otvoria. Cieľové spektrum sa orientuje najmä na problematiku laboratórnej medicíny, biochémie, mikrobiológie, imunológie, hematológie, genetiky a histopatológie. Ide o odbory, ktoré sa vyvíjajú veľmi rýchlo a pri ktorých je veľmi dôležitý prísun aktuálnych informácií. Posledné vydania jednoznačne ukázali, že časopis je životaschopný a dokáže zabezpečiť kvalitný obsah, ktorý v ničom nezaostáva za oveľa staršími a renomovanejšími časopismi. Táto úroveň je zaväzujúca. Verím, že aj v tomto čísle nájdete veľa zaujímavých informácií. Zakladáme si pritom na otvorenosti. Chceme, aby informácie, ktoré budú uverejnené v našom časopise, sa dostali k čo najširšej skupine čitateľov. Aby nezostali zabudnuté. Aby snaha všetkých autorov mala čo najväčší dosah na poznanie.

Za redakčnú radu môžem prisľúbiť, že toto všetko je len začiatok. Čaká nás ešte dlhá cesta, na ktorej konci, ako dúfame, sa newslab pridá k časopisom majúcim široký dosah v celom svete. Kvalita prác to predurčuje.

MUDr. Pavol Janega, PhD.



## Pôvodné práce

- Mature ovarian teratoma with pneumatosis cystoides-like appearance – morphological and immunohistochemical study** 5  
Zuzana Čierna, Ľudovít Danihel
- Incidental pelvic lymphangiomyomatosis in case of uterine carcinoma. Report of the case and search for similar lesions in series of staging lymphadenectomies** 8  
Michal Zámečník, Jana Němečková, Pavel Bartoš, Peter Kaščák
- Incidence and association of the human papilloma virus (HPV) and four selected bacterial sexually transmitted pathogens with normal, non-neoplastic and neoplastic cervical cytology** 12  
Katarína Dubayová, Adriana Šprincová, Dáša Čandova, Iveta Lučková, Ján Sabo, Jozef Adam, Lubomír Kozelka, Kornélia Kilarska, Anton Karabinoš
- Prevalencia a citlivosť na antibiotiká *Ureaplasma urealyticum* a *Mycoplasma hominis* izolovaných z genitálnych a močových vzoriek vyšetrených v období rokov 2014 – 2017 v KNsP Čadca** 16  
Jozef Ficik, Jana Liščáková
- Monitoring EBV infekcie u detských pacientov po transplantácii krvotvorných buniek (TKB)** 21  
Katarína Kováčová, Daniela Hučková, Ivana Boďová, Júlia Horáková
- Prínos IČ spektroskopie do analýzy močových konkrementov v Medirexe, a. s.** 27  
Katarína Schenková, Iveta Gáboríková

## Prehľadové práce

- Liquid biopsy in clinical practice** 31  
Ondrej Pös
- Environmentálny estrogén bisfenol A a poruchy fertility u žien** 34  
Zora Lazúrová
- Nutričná genomika: nový prístup k liečbe obezity** 38  
Martina Pečimonová
- Pohľad na súčasnú klasifikáciu neuroendokrinných nádorov** 42  
Kristína Mikuš Kuracinová

## Kazuistiky

- Celulárny angiofibrom vulvy** 46  
Michal Zámečník
- Ojedinelý prípad infekcie spôsobenej *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 v klinickej praxi na Slovensku** 50  
Daniela Lacková, Martin Sojka

## Novinky, názory a pohľady

- Od medicíny renesancie k renesancii medicíny a späť** 54  
Ján Radvánszky

## Uspeli sme v zahraničí

- Ohliadnutie za 50. výročnou cytogenetickou konferenciou** 56  
Andrea Blahová

Ročník 9, 2018, číslo 1  
Vychádza 2x ročne  
Dátum vydania: apríl 2018

## Redakčná rada:

## Šéfredaktorka:

RNDr. Elena Tibenská, PhD.

## Členovia:

Dr. Domenico Pangallo, DrSc.  
Dr. Boris Klempa, DrSc.  
RNDr. Martin Radina  
Prof. MUDr. Milan Buc, DrSc.  
Prof. Ján Turňa, CSc.  
MUDr. Peter Bohuš  
MUDr. Eva Ďurovcová, PhD.  
MUDr. Ján Lazúr  
MUDr. Monika Czirfuszová, PhD.  
Mgr. Peter Baráth, PhD.  
MUDr. Pavol Janega, PhD.  
RNDr. Renata Lukačková  
MUDr. Emília Miková

## 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

## Výkonná redaktorka:

Mgr. Slavomíra Šindelářová

## 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.

## Mature ovarian teratoma with pneumatosis cystoides-like appearance – morphological and immunohistochemical study

Zuzana Čierna<sup>1,2</sup>, Ľudovít Danihel<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Department of Pathology, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava

Teratomas belong to germ cell tumors localized in gonads or extragonadally. Ovarian teratomas are mostly benign cystic tumors composed of mature tissues derived from one or more germ cell layers. Presence of multiple cystic spaces in the tumor wall known as *pneumatosis cystoides-like* pattern is common, but rarely described change. We present a case report of 56-year-old woman with an accidentally discovered ovarian tumor. Histological and immunohistochemical findings corresponded with diagnosis mature cystic teratoma with *pneumatosis cystoides-like* appearance.

**Keywords:** mature cystic teratoma, ovarian teratoma, pneumatosis cystoides-like pattern

### Zrelý ovariálny teratóm s obrazom podobným cystoidnej pneumatóze – morfológická a imunohistochemická štúdia

Teratómy patria medzi germinatívne nádory vyskytujúce sa v gonádach alebo extragonadálne. Ovariálne teratómy sú väčšinou benígne cystické nádory tvorené zrelými tkanivami vychádzajúcimi z jednej alebo viacerých zárodočných vrstiev. Početné cystické priestory v stene nádoru označované ako obraz *podobný cystoidnej pneumatóze* sú častou, no zriedka opisovanou zmenou. Prezентujeme prípad 56-ročnej ženy s náhodne nájdeným nádorom vaječníka. Histologické a imunohistochemické nálezy zodpovedali diagnóze zrelého cystického terátomu s obrazom *podobným cystoidnej pneumatóze*.

**Kľúčové slová:** zrelý cystický teratóm, ovariálny teratóm, obraz podobný cystoidnej pneumatóze

NewsLab, 2018; roč. 9 (1): 5 – 7

### Introduction

Ovarian teratomas are mostly benign tumors composed of mature tissues derived from one or more germ cell layers. The tumors can be solid; however, they typically form cystic structures. Multicystic appearance of ovarian teratoma known as *pneumatosis cystoides-like* pattern is common, but rarely described change<sup>(1)</sup>. It occurs in about one-third of ovarian mature cystic teratomas<sup>(2)</sup>. Only sporadically these cases are published.

### Case report

We present a case report of 56-year-old woman without any clinical symptomatology with an ovarian tumor detected accidentally during routine gynecological examination. Salpingo-oophorectomy was performed. The tissue was formalin fixed paraffin embedded, stained with hematoxylin-eosin (H & E) and examined immunohistochemically with different antibodies. We did not have frozen tissue, so we were unable to prove presence of fat.

Macroscopically ovarian tissue was only partially preserved with cystic tumor 4 cm in diameter. Cut section showed a unilocular cyst with smooth greyish white external surface. The cyst wall was 3 mm thick with focal thickening up to 10 mm without multicystic appearance noted on gross examination. The lumen of the cyst was filled with yellowish keratinaceous and sebaceous material with hairs. Fallopian tube was unremarkable.

Histologically cystic tumor was lined by only partially preserved keratinizing stratified squamous epithelium with hair follicles, pilosebaceous and sweat glands with desquamated squames in the cyst lumen. The cyst wall was composed of

fibrous tissue with multiple cystic spaces of varying size from less than 1 mm to 5 mm large lined partially or completely by one layer of mononuclear plump or flat cells and multinucleated giant cells of foreign body type with foamy cytoplasm (**Figure 1a – d**). The cystic spaces were either closely packed or separated by fibrous tissue with vessels, multinucleated giant cells and mild chronic lymphocytic inflammatory infiltrate.

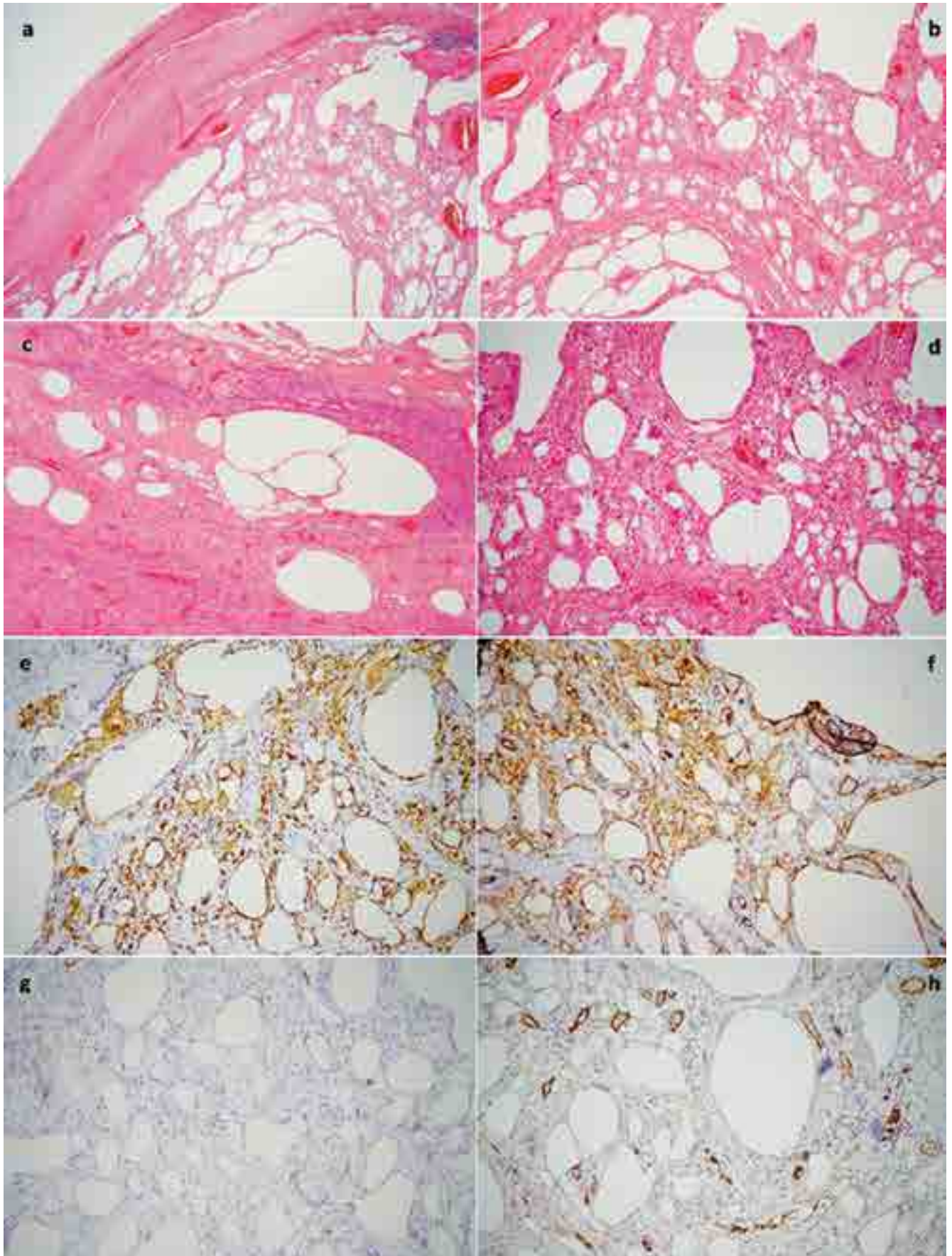
Immunohistochemical cytoplasmic CD68 and membranous CD31 positivity was present both in multinucleated giant and mononuclear cells (**Figure 1e – f**). The cells were negative for cytokeratin cocktail AE1/3, CD34, FVIII (factor VIII), D2-40 (**Figure 1g – h**) and S100, however the multinucleated giant cells exhibited weak cytoplasmic S100 positivity. Endothelial cells lining small thin-walled blood vessels were FVIII and CD34 positive. The lumen of cystic spaces was empty.

### Discussion

Teratomas belong to germ cell tumors localized either in gonads or primary extragonadally. Ovarian teratomas are tumors typical for women in reproductive age. They are mostly in the form of pure cystic tumors with benign biological behavior. Mature cystic teratomas, known as dermoid cysts are the most common germ cell tumors of ovaries accounting for 25% of all ovarian tumors, up to 70% of benign tumors in premenopausal women and 20% of postmenopausal ones<sup>(1,3)</sup>. Histologically they are composed of mature structures arising from one, two or all three embryonic germ layers, the ectoderm, mesoderm and endoderm. In some teratomas lipogranulomatous, fat necrosis-like, sieve-like or *pneumatosis cystoides-like* pattern can be present, even prominently<sup>(4)</sup>.



**Figure 1.** Mature cystic teratoma with pneumatosis cystoides-like appearance. Cystic spaces are empty and are partially or completely lined by mononuclear or multinucleated giant cells, a – d H & E (original magnification  $\times 50/\times 100/\times 200/\times 200$ ), e – h immunohistochemical staining (original magnification  $\times 200$ , DAB). (e) CD68 cytoplasmic positivity in mononuclear and multinucleated giant cells, (f) CD31 membranous positivity in mononuclear and multinucleated giant cells and in vessels, (g) D2-40 negativity, (h) FVIII negative in cells lining cystic spaces, FVIII positivity in endothelial cells.



Formation of macroscopically and microscopically empty cystic spaces filled with gas can be present in various organs. The most common location is in gastrointestinal tract known as *pneumatosis cystoides intestinalis*. Gas-filled cysts are rarely formed in genitourinary tract, especially in vaginal or urinary bladder wall referred to as emphysematous vaginitis or cystitis.

*Pneumatosis cystoides intestinalis* is a condition characterized by formation of multiple gaseous cysts in the wall of the small or large intestine either iatrogenically or spontaneously associated with another disease. The cysts are filled with nitrogen, hydrogen and carbon dioxide<sup>(5)</sup>. According to the mechanical theory the gas is pushed through mucosal defect into lymphatic channels during surgery, colonoscopy or trauma. The bacterial theory suggests production of gas by fermenting bacteria in submucosa. Accumulation of gas in bowel wall from ruptured alveoli in patients with chronic pulmonary diseases is the pulmonary theory of etiology of this condition. Association with autoimmune systemic collagen diseases is also described<sup>(5,6)</sup>.

In genitourinary system, different organs can be affected, leading to emphysematous nephritis, emphysematous pyelitis or emphysematous cystitis. Gas-producing bacteria are the most common causative factor, *E. coli* being the most important one, in association with diabetes mellitus or immunosuppression<sup>(7)</sup>. Emphysematous vaginitis is mostly caused by trichomonas infection with associated pregnancy or immunosuppression<sup>(8)</sup>.

The etiology of *pneumatosis cystoides-like* structures in ovarian teratomas is not clear. The first case of ovarian mature cystic teratoma with *pneumatosis cystoides-like* structures was published in 1989 by Maudsley and Zakhour<sup>(9)</sup>. Teratoma was an incidental finding in a 29-year-old pregnant woman found during caesarian section procedure. The authors considered the cystic spaces to be gas cysts similar to *pneumatosis cystoides intestinalis* because no recognizable cyst content was identified on routine staining. The cause for gas cysts formation is not known. The similarity of this condition to emphysematous vaginitis suggests the possibility of trichomonas infection or association with pregnancy as causative factor<sup>(9)</sup>.

## REFERENCES

1. Mathew M, Goel G, Kumar P. A Diagnostic Curiosity: Mature Cystic Teratoma of the Ovary with Pneumatosis Cystoides-like Appearance: Case Report and Review of Literature. *The Internet Journal of Gynecology and Obstetrics* 2008; 11(2).
2. Rubin A, Papadaki L. Multicystic structures appearing in mature cystic teratomas of the ovary: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Histopathology* 1990; 17(4): 359-363.
3. Sinha A, Ewies AA. Ovarian Mature Cystic Teratoma: Challenges of Surgical Management. *Obstet Gynecol Int* 2016; 2016: 2390178.
4. Talerman A, Vang R. Germ Cell Tumors of the Ovary, in Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract. Kurman RJ, Ellenson LH, Ronnett BM, Editors. 2011; Springer: New York: 845-907.
5. Azzaroli F, Turco L, Ceroni L, et al. Pneumatosis cystoides intestinalis. *World J Gastroenterol* 2011; 17(44): 4932-4936.

Some authors hypothesized that cystic spaces may be the result either of oleous or sebaceous material deposition in the cyst wall or in small vessels lumens with multinucleated foreign body type giant cells granulomatous response. This hypothesis was confirmed by fat staining, immunocytochemistry and electron-microscopy. Cyst content and cytoplasm of macrophages were positive for lipids, cells lining cystic spaces were positive for endothelial (FVIII) and macrophagic (Mac387) markers<sup>(2)</sup>. In our presented case the lining cells were FVIII and CD34 negative. CD31 positivity could partially confirm their endothelial origin, however this marker is also expressed by macrophages. CD68 positivity in mononuclear and multinucleated giant cells evidenced their histiocytic origin. Lipids may be reabsorbed by macrophages leaving a relatively acellular sieve-like structures without endothelial cells and macrophages lining the cysts and without fat staining of the cyst content and macrophage cytoplasm<sup>(2)</sup>. This may give the impression of gas cysts described earlier.

Formation of cystic spaces in mature teratoma can be due to dilatation of lymphatic vessels confirmed by FVIII positivity though only focal and weak<sup>(10)</sup>. We didn't find FVIII and D2-40 positivity of lining cells excluding their lymphatic origin in our case report.

## Conclusion

*Pneumatosis cystoides-like* appearance found in the ovarian tumor is so characteristic for cystic teratoma as to be diagnostic. Presence of these structures can be helpful, especially in a case of ovarian tumor diagnostic dilemma, when the total absence of squamous epithelium or other teratomatous tissues is found<sup>(2,10)</sup>.

**Acknowledgements:** This article was created with the support of the OP Research and Development for the project: Completion of the multidisciplinary center for biomedical research – BIOMEDIRES, ITMS 26210120041, co-financed by the European Regional Development Fund.

**Pod'akovanie:** Tento článok vznikol vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: Dobudovanie multidisciplinárneho centra pre biomedicínsky výskum - BIOMEDIRES, ITMS 26210120041.

6. Wada K, Takeuchi N, Emori M, et al. Two Cases of Pneumatosis Cystoides Intestinalis With Intraperitoneal Free Air. *Gastroenterology Res* 2017; 10(3): 208-211.
7. Chang CB, Chang CC. Emphysematous cystitis: a rare cause of gross hematuria. *J Emerg Med* 2011; 40(5): 506-508.
8. Leder RA, Paulson EK. Vaginitis emphysematosa: CT and review of the literature. *AJR Am J Roentgenol* 2001; 176(3): 623-625.
9. Maudsley G, Zakhour HD. Pneumatosis cystoides-like appearances in a mature cystic teratoma of the ovary. *Histopathology* 1989; 14(4): 420-422.
10. Canzonieri V, Volpe R, Gloghini A, et al. Sieve-like areas in mature cystic teratomas of the ovary. A histochemical and immunohistochemical study of 7 cases. *Pathologica* 1994; 86(1): 43-46.



**MUDr. Zuzana Čierna, PhD.**  
Department of Pathology, Faculty of Medicine, Comenius University  
Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, Slovakia  
e-mail: ciernaz@gmail.com



## Incidental pelvic lymphangioliomyomatosis in case of uterine carcinoma. Report of the case and search for similar lesions in series of staging lymphadenectomies

Michal Zámečník<sup>1,2</sup>, Jana Němečková<sup>2</sup>, Pavel Bartoš<sup>3</sup>, Peter Kaščák<sup>4,5</sup>

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

<sup>2</sup>AGEL, a. s., Laboratory of Surgical Pathology, Nový Jičín, Czech Republic

<sup>3</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Comprehensive Cancer Center, Nový Jičín, Czech Republic

<sup>4</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty Hospital, Trenčín, Slovak Republic

<sup>5</sup>Faculty of Health, Alexander Dubček University, Trenčín, Slovak Republic

A rare case of extrapulmonary nodal lymphangioliomyomatosis (LAM) is described. In 75-ys-old woman with uterine endometrioid carcinoma FIGO grade 2, stage II, two minute lesions were found in pelvic lymph nodes by examination of routinely sampled lymph nodes (for staging purposes). Both tumors were minute and histologically inconspicuous, resembling strongly a tangentially sectioned muscular vessel or a focal fibrosis with myofibroblasts. Immunophenotype was, however, typical of lymphangioliomyoma, with positivity for HMB45, smooth muscle actin, estrogen receptor and desmin, indicating perivascular epithelioid cell (PEC) differentiation. Additional clinical work-up did not show any signs of tuberous sclerosis, pulmonary lymphangioliomyomatosis or another PEC-oma. To ascertain an incidence of nodal lymphangioliomyomatosis in pelvic, retroperitoneal or peritoneal lymph nodes, a retrospective search for similar minute lesions was performed in a series which included 100 cases of gynecologic carcinomas and 25 cases of colorectal carcinomas in women. LAM was not found in any case, indicating that the lesion is very rare. Pathologic diagnosis and possible clinical significance of incidental lymphangioliomyomatosis are discussed.

**Keywords:** lymphangioliomyomatosis, lymph node, carcinoma, uterus, colon

### *Incidentálna pelvická lymfangioleiomatóza pri karcinóme maternice. Opis prípadu a pátranie po podobných léziách v súborech stagingových resekcii*

Opísaný je zriedkavý extrapulmonálny prípad lymfangioleiomatózy (LAM) lymfatických uzlín panvy, ktoré boli odstránené v rámci stagingovej operácie pre karcinóm uteru. Šlo o 75-ročnú pacientku s endometrioidným karcinómom tela maternice, FIGO grade 2, stage II. Lézie boli nájdené v dvoch pelvických uzlinách. Boli drobné, histologicky málo nápadné a napodobňovali hyperpláziu myofibroblastov puzdra uzliny alebo tangenciálny rez steny muskulárnej cievy. Imunohistochemia však ukázala expresiu HMB45, estrogénových receptorov a desmínu, čo svedčilo o „perivascular epithelioid cell“ (PEC) diferenciácii a viedlo k diagnóze lymfangioleiomatózy. Následné klinické vyšetrenia vylúčili u pacientky tuberóznú sklerózu, pulmonálnu lymfangioleiomatózu alebo iný PEC-óm. Kvôli zisteniu, ako často sa vyskytuje incidentálna lymfangioleiomatóza lymfatickej uzliny, bol vyšetrený archívny súbor prípadov, ktorý zahrnoval 100 prípadov karcinómov corpus uteri a ovária a 25 prípadov karcinómov hrubého čreva u žien. Nebol nájdený žiadny ďalší prípad, čo svedčí o raritnom charaktere lézie. V práci sa ďalej diskutuje o diagnóze incidentálnej LAM lymfatickej uzliny a klinickej významnosti tohto nálezu. **Kľúčové slová:** lymfangioleiomatóza, lymfatická uzlina, karcinóm, uterus, hrubé črevo

NewsLab, 2018; roč. 9 (1): 8 – 11

### Introduction

Lymphangioliomyomatosis (LAM) is a rare lesion composed of so-called perivascular epithelioid cells (PEC)<sup>(1-5)</sup>. LAM occurs typically in the lung of premenopausal women, and it is sometimes associated with tuberous sclerosis. LAM in extrapulmonary location is exceedingly rare, being reported in pelvis, retroperitoneum, uterus, mesentery, kidney hilus, and liver<sup>(6-9)</sup>. Recently, Rabban et al. and Schoolmeester and Park described new 44 cases of nodal LAM which had been found incidentally by examination of retroperitoneal and pel-

vic lymph nodes removed at staging surgery for gynecologic cancers<sup>(10,11)</sup>. In our practice, we have seen one similar incidental LAM in patient with uterine endometrioid carcinoma. We present this case here. In addition, we wondered whether minute and histologically inconspicuous LAM cannot be more frequent in lymph nodes, and therefore we search for it in our files, examining a series of lymph nodes removed for gynecologic and colorectal carcinomas. Our results show that incidental LAM in this clinico-pathological context represents a rare lesion.



## Material and methods

In the case of incidental LAM, routine examination of formalin fixed paraffin embedded tissue was performed. After finding of possible LAM in two lymph nodes, following immunohistochemical stains were performed: HMB-45 (clone HMB-45), melan-A (clone A123), alpha-smooth muscle actin, h-caldesmon, progesterone receptor, estrogen receptor, desmin, D2-40, CD31, pancytokeratin AE1/AE3, and S100 protein (all from Dako, Copenhagen, Denmark). Immunostaining was performed according to standard protocols using streptavidin-biotin complex labelled with peroxidase (Dako, Copenhagen, Denmark). The positive and negative controls were applied. The subsequently examined series of lymph nodes was selected from our routine files. We examined lymph nodes in 57 cases of uterine carcinoma and in 47 cases of ovarian carcinoma. Age of these gynecologic patients ranged from 40 to 83 years, average age was 63.3 years. Average number of lymph nodes per patient was 46, ranging from 12 to 99 nodes. In addition, lymph nodes of colorectal carcinomas of female patients were reviewed. This series included 25 women, with age range 50-87 years and average age 71.4 years. Altogether, 4595 lymph nodes were reviewed in the study. The capsule of lymph nodes often contains myoid cells and muscular appearing vessels, and this morphology mimics minute LAM. Therefore, in 32 selected lymph nodes from 32 patients, immunostains for HMB45 and melan-A were performed.

## Results

LAM was found incidentally in a 75-ys-old, para 2, gravida 2 patient. She underwent a hysteroscopy, dilatation and curettage for metrorrhagia. The medical history of the patient included complex endometrial hyperplasia without atypia diagnosed 18 years and 10 years ago, respectively. Histological examination of the current curettage specimen showed endometrioid carcinoma (EC) FIGO grade 2, and therefore a total hysterectomy with bilateral salpingo-oophorectomy was performed. Because an intraoperative biopsy showed EC infiltrating 60% of the myometrial thickness, the pelvic and paraaortic lymph nodes were removed. **Histologically**, the tumor was EC FIGO grade 2, with initial infiltration of the endocervix. No features of LAM were found in the myometrium. Both adnexa did not contain any tumor or microscopic LAM. Among 43 removed lymph nodes, lymphangioliomyoma was found in one of 9 right obturator nodes and in one of 7 left obturator nodes, respectively. The lesions measured 1,5 mm and 1 mm, respectively, and both were associated with lymph node capsule, mimicking strongly a focal reactive fibrosis or a tangentially sectioned wall of a muscular vessel. They were composed of spindle to ovoid cells, with bland appearing nuclei, small nucleoli, and without mitotic activity (**Figure 1**). A few of the nuclei were cigar shaped or showed mild symplastic-type pseudoatypia. The cytoplasm was eosinophilic to clear. The tumor cells created small groups and fascicles. In addition, the lesions contained numerous capillary sized, thin walled and partly dilated vessels. **Immunohistochemically**, the cells were positive for HMB45, alpha-smooth muscle actin, h-caldesmon, and estrogen receptor (**Figure 2**). Desmin was expressed only by scattered cells (**Figure 2e**). Endothelium of the vessels was positive for

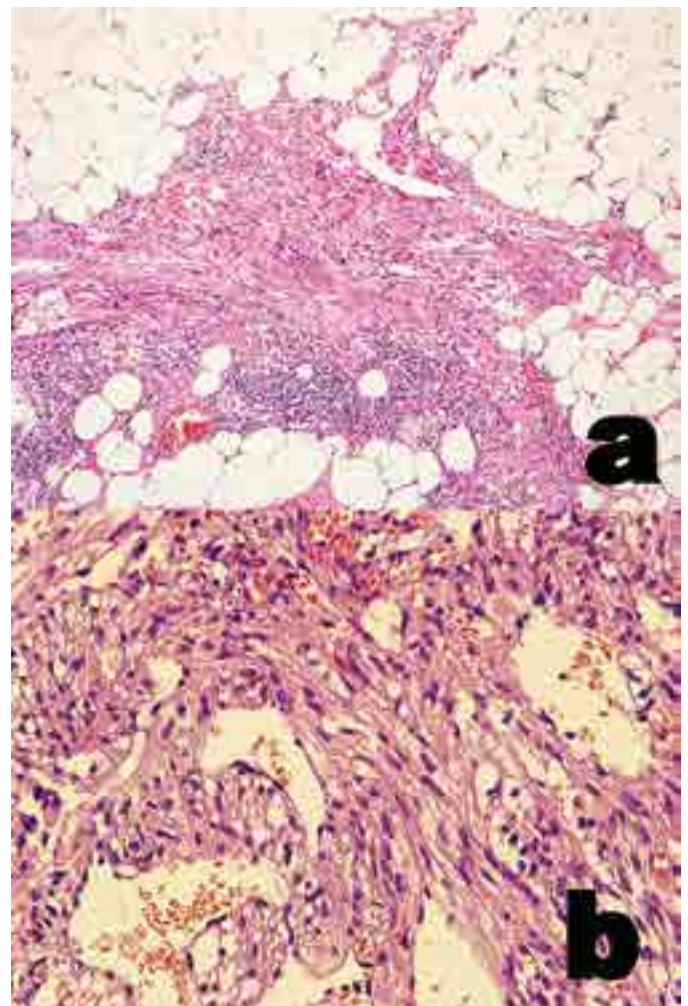
both CD31 and D2-40 (**Figure 2f**). Following antibodies gave negative results in tumor cells: pancytokeratin AE1/AE3, melan-A, progesterone receptor, S100 protein. A diagnosis of incidental LAM was rendered. Subsequent clinical examinations did not find any signs of tuberous sclerosis, pulmonary LAM or another PEC-oma. For EC, the patient received external adjuvant radiotherapy, and she is without recurrence 16 months after the surgery.

In the series of 100 gynecologic and 25 colorectal carcinomas, no case of LAM was found. We have often seen myoid cells and muscular appearing vessels in the region of the capsule of the lymph node, and this finding was sometimes suspicious for LAM. However, HMB45 and melan-A performed in 32 of such cases gave negative results.

## Discussion

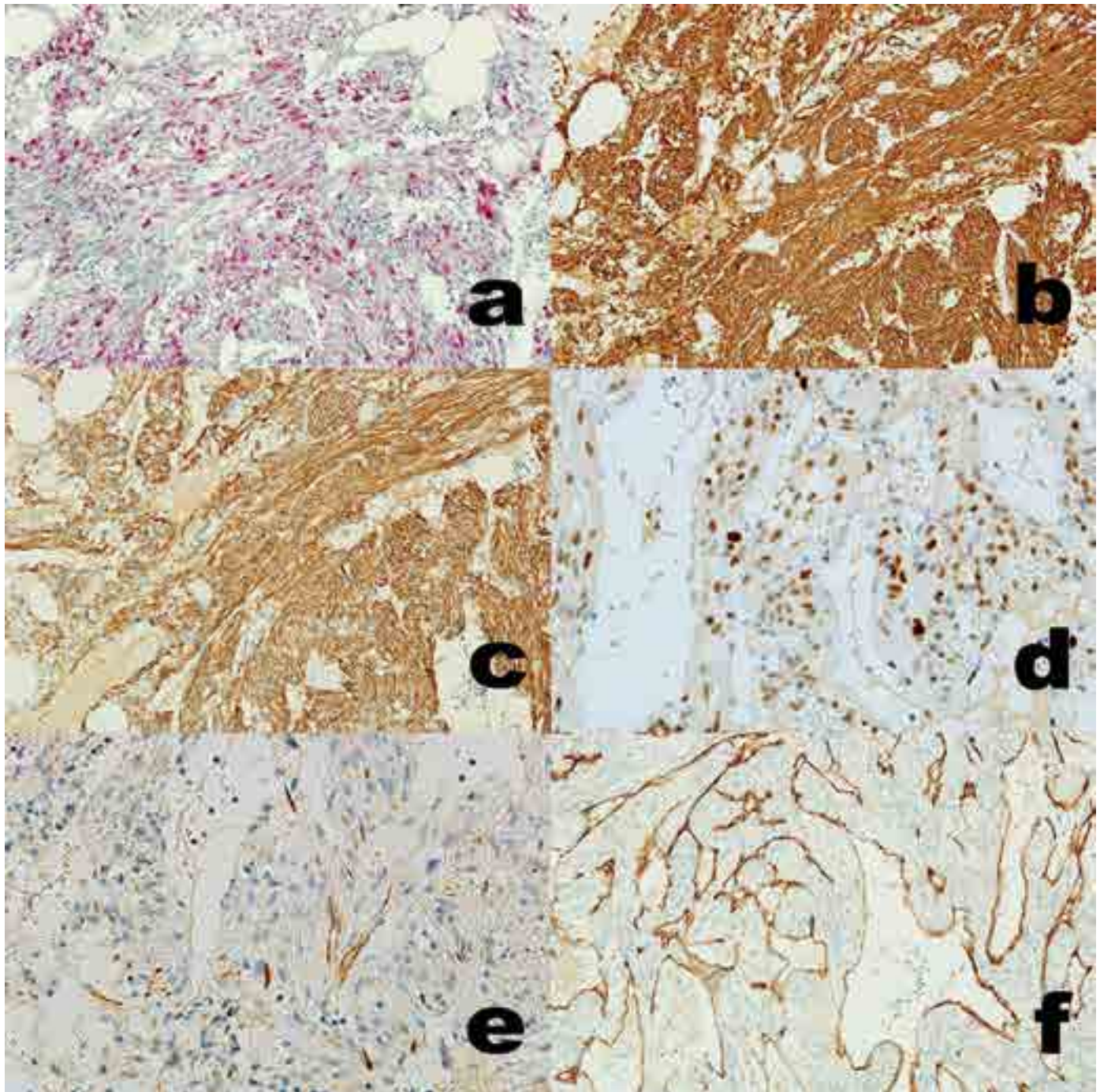
Lymphangioliomyomatosis (LAM) is an abnormal proliferation of PECs around lymphatic vessels (PEC)<sup>(1-5)</sup>. PEC is an enigmatic cell that has no normal counterpart and that shows myomelanotic phenotype with expression of melanocytic and myoid antigens<sup>(1-4)</sup>. In addition to LAM, PEC differentiation occurs in several other tumors, all of which can be associated with tuberous sclerosis complex<sup>(1-5)</sup>. This PEComa

**Figure 1.** Histological features of nodal LAM. (a) At low power, the spindle cell lesion resembles a reactive fibrous thickening of the capsule of lipomatous lymph node. (b) High-power shows spindle and epithelioid cells with numerous vessels.





**Figure 2.** Immunohistochemical features of nodal LAM. **(a)** HMB-45 positivity. **(b)** Alpha-smooth muscle actin positivity. **(c)** H-caldesmon expression. **(d)** Estrogen receptor positivity. **(e)** Desmin expression is seen in scattered cells. **(f)** D2-40 is positive in the endothelium of the vessels.



“family” includes LAM, renal and extrarenal angiomyolipoma, pulmonary and extrapulmonary sugar tumor, myomelanotic tumor of the falciform ligament/ligamentum teres, abdominopelvic sarcoma of PECs, renal capsular leiomyoma, and other tumors with similar features at various sites and with various biological behavior (an excellent review of PEComas was done recently by Thway and Fisher)<sup>(2)</sup>. In our case, morphological finding of myoid-appearing spindle cells, rich lymphatic vasculature and immunohistochemical proof of PEC differentiation are typical for LAM. As mentioned above, extrapulmonary LAM is rare lesion which can be associated with tuberous sclerosis and/or with pulmonary LAM<sup>(7)</sup>.

Schoolmeester and Park and Raban et al. found recently, that LAM is sometimes present in lymph nodes removed at staging surgery for gynecologic carcinomas. Our case of incidental LAM is quite similar to those described by Schoolmeester and Park and Raban et al.<sup>(10,11)</sup>. After these studies were published in October 2015, we started to search for minute LAM by examination of all lymph nodes removed in gynecologic staging procedures. In addition, we performed retrospective search in our archive. Finally, our series included 100 cases of gynecologic carcinomas and 25 cases of female colorectal carcinomas. However, we did not find any additional incidental LAM. Thus, our results show that the lesion must be

rare. Schoolmeester and Park and Raban et al.<sup>(10,11)</sup> described together 44 cases and this number could indicate that incidental LAM is quite frequent. However, abovementioned two group of authors did not study incidence of incidental LAM, because their data did not include overall number of their resectates. Schoolmeester and Park<sup>(10)</sup> found 18 cases among their resections performed over 11-year period in Memorial Sloan Kettering Cancer Center in New York, probably the institution with busy gynecologic surgery service. In study of Raban et al.<sup>(11)</sup>, many of their 26 cases were examined in consultation, and this fact can explain relatively high number of their cases.

Our experience with incidental LAM shows that it is quite inconspicuous or occult by microscopic examination. Microscopic LAM can be easily overlooked, because it has bland spindle cell and reactive appearance, and, moreover, the pathologists are focused by examination of lymph nodes on search for metastatic carcinoma. Histologically, the lesions resemble reactive foci composed of bland myofibroblasts, with myoid-appearing spindle cells and rich vasculature. Small focus of LAM can also mimic tangentially sectioned wall of small muscular vessel. However, at least some cells show epithelioid or clear cell morphology of PEComa in addition to predominant myoid cells, and their immunophenotype indicates PEC differentiation, with positivity for HMB-45, melan-A, smooth muscle actin, desmin, and beta-catenin<sup>(1-5,10,11)</sup>.

The clinical significance of incidental LAM in retroperitoneal/pelvic lymph nodes seems to be marginal in the context of present gynecologic malignancy. However, the finding is certainly not fully insignificant. The patient with extrapulmonary LAM has still a small risk for tuberous sclerosis and/or pulmonary LAM<sup>(7)</sup>. Although in Schoolmeester and Park

series of incidental LAM none of the patients had tuberous sclerosis or pulmonary LAM, the series of Raban et al. includes two cases with tuberous sclerosis complex<sup>(11)</sup>. In sum, only two of 45 cases of incidental nodal LAM reported till now (including our case) were associated with tuberous sclerosis complex, which represents a risk 4.4%. Although this risk is low, we concur with Raban et al.<sup>(11)</sup> that patient with incidental LAM should be formally examined for tuberous sclerosis and pulmonary LAM.

In conclusion, we have described incidental LAM in pelvic lymph nodes. Our case shows that minute LAM can be quite inconspicuous by microscopic examination and that immunohistochemistry is very helpful for diagnosis. In addition, we searched for incidental LAM in series of 125 staging lymphadenectomies performed for gynecologic and colorectal carcinomas. We did not find any further case of LAM, and this result indicates that incidental LAM represents rare finding.

**Acknowledgement:** *The authors acknowledge the support provided by OP Research and Development: Building additional technical infrastructure in research of diagnostic procedures and methodology in early diagnostics of most frequent oncological diseases in women, project ITMS 26210120026, using the financial assistance from the European Regional Development Fund.*

**Podakovanie:** *Tento článok vznikol vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: Dobudovanie technickej infraštruktúry v oblasti výskumu diagnostických postupov a metód v rámci včasnej diagnostiky najčastejších onkologických ochorení u žien, ITMS 26210120026, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.*

## REFERENCES

1. Bonetti F, Pea M, Martignoni G, et al. PEC and sugar. *Am J Surg Pathol* 1992; 16: 307-308.
2. Thway K, Fisher C. PEComa: morphology and genetics of a complex tumor family. *Ann Diagn Pathol* 2015; 19: 359-368.
3. Harari S, Torre O, Moss J. Lymphangioliomyomatosis: what do we know and what are we looking for? *Eur Respir Rev* 2011; 20: 34-44.
4. Martignoni G, Pea M, Reghellin D, et al. PEComas: the past, the present and the future. *Virchows Arch* 2008; 452: 119-132.
5. Zamboni G, Pea M, Martignoni G, et al. Clear cell "sugar" tumor of the pancreas. A novel member of the family of lesions characterized by the presence of perivascular epithelioid cells. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 722-730.
6. Song DH, Choi IH, Ha SY, et al. Extrapulmonary lymphangioliomyoma: Clinicopathological analysis of 4 cases. *Korean J Pathol* 2014; 48: 188-192.
7. Matsui K, Tatsuguchi A, Valencia J, et al. Extrapulmonary lymphangioliomyomatosis (LAM): Clinicopathologic features in 22 cases. *Hum Pathol* 2000; 31: 1242-1248.
8. Han JM, Lee KH, Kim SJ, et al. A case of lymphangioliomyomatosis originated in the pelvic cavity. *J Gynecol Oncol* 2008; 19: 195-198.
9. Fu W, Li Y, Li H, et al. Solitary extrapulmonary lymphangioliomyomatosis of the liver: A case report and literature review. *Exp Ther Med* 2016; 12: 1499-1502.
10. Schoolmeester JK, Park KJ. Incidental nodal lymphangioliomyomatosis is not a harbinger of pulmonary lymphangioliomyomatosis: a study of 19 cases with evaluation of diagnostic immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 2015; 39: 1404-1410.
11. Rabban JT, Firetag B, Sangoi AR, et al. Incidental pelvic and para-aortic lymph node lymphangioliomyomatosis detected during surgical staging of pelvic cancer in women without symptomatic pulmonary lymphangioliomyomatosis or tuberous sclerosis complex. *Am J Surg Pathol* 2015; 39: 1015-1025.

**MUDr. Michal Zámečník**

**MEDIREX GROUP ACADEMY** n. o.  
Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava  
e-mail: zamecnikm@seznam.cz



## Incidence and association of the human papilloma virus (HPV) and four selected bacterial sexually transmitted pathogens with normal, non-neoplastic and neoplastic cervical cytology

Katarína Dubayová<sup>1</sup>, Adriana Šprincová<sup>1</sup>, Dáša Čandova<sup>1</sup>, Iveta Lučková<sup>1</sup>, Ján Sabo<sup>2</sup>, Jozef Adam<sup>3</sup>, Ľubomír Kozelka<sup>4</sup>, Kornélia Kilarska<sup>1</sup>, Anton Karabinoš<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>SEMBID, s. r. o. – Research Centre of Applied Biomedical Diagnostics, Košice, Slovakia

<sup>2</sup>Department of Medical Biophysics, Faculty of Medicine, P. J. Šafárik University in Košice, Slovakia

<sup>3</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, J. L. Reiman University Hospital, Prešov, Slovakia

<sup>4</sup>Cytolab, s. r. o., Prešov, Slovakia

In this work, we analysed the incidence of the human papilloma virus (HPV) and four sexually transmitted bacterial pathogens (bSTD; *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*) in 529 cervical samples from Slovakian women and evaluated its association with normal, non-neoplastic and neoplastic cervical cytology. The non-neoplastic cervical samples represented the largest (71%), while the normal cervical cytology samples the smallest (9%) group of investigated specimens. The majority of women with a normal or neoplastic cervical cytology were 29 years old or younger, in contrast to women with non-neoplastic cervical cytology, who were mostly older. The 50 year-old or older women represented the smallest group of patients with non-neoplastic (8%) and neoplastic (5%) cervical cytology, while none of these women was found with a normal cervical cytology. Women with normal cervical cytology were statistically significantly more likely to have a cervical HPV infection than women with non-neoplastic cervical cytology. On the other hand, women with neoplastic cervical cytology were significantly more likely to have a cervical HPV (and combined HPV/bSTD) infection than women with normal or non-neoplastic cervical cytology. Finally, *Ureaplasma* was found to be the most prevalent bSTD pathogen. Thus, these results are in good concordance with the published literature, however, analyses of new (genetically) defined abnormalities and/or new approaches are needed to improve the screening and diagnostics strategies of cervical pathology.

**Keywords:** cervical cytology, human papilloma virus (HPV), incidence, sexually transmitted disease (STD), statistical significance

### Výskyt a spojitost' ľudského papilomavírusu (HPV) a štyroch vybraných sexuálne prenosných bakteriálnych patogénov s normálnou, nonneoplastickou a neoplastickou cervikálnou cytológiou

V uvedenej práci sme analyzovali výskyt ľudského papilomavírusu (HPV) a štyroch vybraných sexuálne prenosných bakteriálnych patogénov (bSTD; *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*) v 529 cervikálnych vzorkách slovenských žien a hodnotili sme ich spojitost' s normálnou nonneoplastickou a neoplastickou cervikálnou cytológiou. Najväčšiu skupinu vyšetrovaných vzoriek (71 %) predstavujú nonneoplastické vzorky, zatiaľ čo tou najmenšou (9 %) sú vzorky s normálnou cytológiou. Väčšina žien s normálnou alebo neoplastickou cervikálnou cytológiou je vo veku 29 rokov alebo mladšia na rozdiel od žien, väčšinou starších, s non-neoplastickým výsledkom cervikálnej cytologie. Ženy vo veku 50 a viac rokov reprezentujú najmenšiu skupinu spomedzi žien s nonneoplastickou (8 %) alebo neoplastickou (5 %) cytológiou, zatiaľ čo žiadna žena s normálnym výsledkom cervikálnej cytologie nemá 50 a viac rokov. Ženy s normálnou cervikálnou cytológiou mali štatisticky častejšie HPV infekciu v porovnaní so ženami s nonneoplastickou cytológiou. Na druhej strane ženy s neoplastickou cervikálnou cytológiou boli štatisticky významne viac postihnuté HPV (a kombinovanou HPV/bSTD) infekciou ako ženy s normálnou alebo nonneoplastickou cervikálnou cytológiou. Navyše, *Ureaplasma* bola v tejto štúdii zachytená ako najčastejší bSTD patogén. Tieto výsledky sú vo všeobecnosti v dobrom súlade s publikovanou literatúrou, avšak analýzy nových (genetických) abnormalít a/alebo nové prístupy sú potrebné na vylepšenie skríningových a diagnostických stratégií cervikálnej patológie.

**Kľúčové slová:** cervikálna cytológia, ľudský papilomavírus (HPV), incidencia, sexuálne prenosné ochorenia (STD), štatistická významnosť

NewsLab, 2018; roč. 9 (1): 12 – 15

## Introduction

Cervical cancer is the second most common cancer in women worldwide and one of the leading causes of cancer-related death among women in developing countries (see for example 1 and references therein). Cervical cancer mostly occurs in the proliferation region between the columnar epithelium of the endocervix and the stratified squamous epithelium of the exocervix. Careful cervical cytology monitoring stays our basic tool in prevention of cervical neoplasia<sup>(2)</sup>.

The carcinogenic human papilloma virus (HPV) is the most important risk factor of cervical cancer (see for example 3 and references therein). Oncogenicity in tumours caused by HPV is due to the prevalence of early genes E6 and E7 which disrupt normal cell growth and inhibit tumour-suppressor proteins (for review see for example 4). The HPV infection might lead to a latent co-existence of HPV with a host over long periods of time. Immune suppression in humans usually leads to activation of latent infection and to development of various non-neoplastic or neoplastic lesions (for review see for example 5). However, the extended time gap between initial HPV infection and onset of cancer and a relatively minor fraction of infection resulting in neoplasia suggests that there are other factors that contribute to malignant progression of the initial lesions. Interesting candidates for such factors are sexually transmitted disease (STD) bacteria like *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma hominis* or *Ureaplasma urealyticum*, which are often associated with genital and mucosal HPV infection and might therefore act in synergy with HPV to induce neoplasia<sup>(6-9)</sup>. In this work, we analysed the incidence of HPV and four latter bacterial STD pathogens in 529 cervical samples and evaluated its association with normal, non-neoplastic and neoplastic cervical cytology.

## Patients and methods

In this study, we analysed cervical samples of 529 women attending local gynaecology ambulances in the Presov area of East Slovakia, between 2009 and 2012. Cervical samples were collected with a Dacron swab. One part of the cervical sample provided smears, which were subjected to cytological investigation in the CytoLab, s. r. o. laboratory in Presov. Each cytological diagnosis was established according to the 2001 Bethesda system criteria<sup>(2)</sup> and investigated cervical samples were classified into the three cytology groups: a.) normal cervical cytology; b.) non-neoplastic cervical cytology (involves inflammation, atrophy, reactive cellular changes associated with inflammation) and c.) neoplastic cervical cytology (involves atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS), low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) and high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL)). Another part of the cervical material was subjected to isolation of DNA and to genetic analyses in the SEMBID, s. r. o. laboratory in Kosice. HPV DNA of carcinogenic risk HPV genotypes [16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 and 59] was detected using the AmpliSens HPV HCR screen-titre-FRT PCR kit according to manufacturer instructions. The nested PCR protocols were used to detect the *Neisseria gonorrhoeae*<sup>(10)</sup> and *Chlamydia trachomatis*<sup>(11)</sup> DNA, while the single PCR protocols were used to detect the *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma*

*urealyticum*<sup>(12)</sup> DNA. Statistical analyses were performed using a chi-square test at [www.socscistatistics.com](http://www.socscistatistics.com). A *P* value of <0,05 was deemed statistically significant.

## Results

### Age-dependent incidence of different cytology results in 529 cervical samples

From the 529 cervical samples involved in this study we detected normal cytology in 46 (9%) cases; non-neoplastic cytology in 374 (71%) cases, while the neoplastic cytology results were found in 109 (20%) of analysed specimens (**Table 1**). The age-dependent incidence of patients within the investigated normal, non-neoplastic and neoplastic cytology is presented in **Table 1**.

### Detection of HPV and selected bacterial pathogens in samples with normal, non-neoplastic and neoplastic cytology

Next, we investigated the 529 cervical samples, described above, for presence or absence of DNA from HPV and the four bacterial STD-pathogens (bSTD) *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum*. The sample containing DNA from HPV and at least the one bacterial pathogens, described above, was depicted as HPV- and bSTD-positive, respectively, while the sample containing both the HPV DNA and DNA from at least one bacterial pathogen was depicted as HPV/bSTD-positive. All other samples were described as negative. **Table 1** provides a summary of this analysis.

When we compared the age-dependent incidence of the investigated HPV and bSTD positive or negative cervical

**Table 1.** Incidence of HPV and four selected bacterial STD (bSTD) pathogens in 529 cervical samples with different cytology

Patient age	negative	HPV+	bSTD+	HPV/ bSTD+	total	total (%)
<b>Cervical samples with normal cytology</b>						
≤ 29 y	5	<b>9</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	22	48
30-39 y	<b>13</b>	2	1	2	18	39
40-49 y	5	1	0	0	6	13
≥ 50 y	0	0	0	0	0	0
<b>total</b>	23	12	3	8	46	100
<b>total (%)</b>	50	26	7	17	100	
<b>Cervical samples with non-neoplastic cytology</b>						
≤ 29 y	47	28	19	<b>14</b>	108	29
30-39 y	<b>85</b>	<b>33</b>	<b>23</b>	11	152	40
40-49 y	55	10	13	7	85	23
≥ 50 y	20	5	2	2	29	8
<b>total</b>	207	76	57	34	374	100
<b>total (%)</b>	56	20	15	9	100	
<b>Cervical samples with neoplastic cytology</b>						
≤ 29 y	<b>16</b>	<b>20</b>	<b>4</b>	<b>18</b>	58	53
30-39 y	11	10	<b>4</b>	7	32	29
40-49 y	7	4	2	1	14	13
≥ 50 y	3	2	0	0	5	5
<b>total</b>	37	36	10	26	109	100
<b>total (%)</b>	34	33	9	24	100	

The highest number of cervical samples within the particular analysed negative, HPV positive (HPV+), bSTD positive (bSTD+) and HPV/bSTD positive (HPV/bSTD+) group are depicted in bold

samples in the three different cytology groups, described above, the majority of the normal cytology samples with bSTD-, HPV- or HPV/bSTD- positivity were derived from women younger as 29 years of age, in contrast to the negative samples, of which the majority were derived from women between 30-39 years of age (**marked in bold in Table 1**). Similarly, the majority of patients with non-neoplastic cervical cytology and the HPV/bSTD-positivity were younger than 29 years of age, in contrast to the three other groups which were mostly derived from women between 30-39 years of age (**marked in bold in Table 1**). Finally, as described above, the majority of patients with neoplastic cervical cytology with or without HPV- and/or bSTD-positivity were younger than 29 years of age (**marked in bold in Table 1**).

**Association between cytology and various other parameters of investigated cervical samples**

Table 2 presents the chi-squared test analysing the association between the cytology results and the age-, HPV- and bSTD-profiles of the normal versus non-neoplastic cervical cytology samples (the first panel from the left), the normal versus neoplastic cervical cytology samples (the second panel from the left) and the non-neoplastic versus neoplastic cytology samples (the third panel from the left).

**Discussion**

In this work, we used the cervical cytology and genetics (see Patients and methods) to analyse the age-dependent incidence of HPV and four selected bacterial STD pathogens (*Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Neisseria gonorrhoeae*) and to evaluate its association with normal, non-neoplastic and neoplastic cytology in a group of 529 cervical samples.

The non-neoplastic cervical cytology samples represent the largest (71%), while the normal cervical cytology samples the smallest (9%) group of samples investigated in this study. A low number of women in this study with a normal cytology result probably indicates that women attending gynaecology ambulances for a preventive check-up are in the minority. In addition, no woman of 50 years or older was found in the latter group (Table 1), indicating that older women are probably almost absent in the gynaecologic prevention program of cervical cancer. However, more data are needed to better explore this speculation.

Curiously, HPV DNA was found in 43% of normal cervical samples but in only 29% of non-neoplastic cervical samples often associated with inflammation (see Patients and methods). This somehow protective association between a positive HPV status and a decreased risk for non-neoplastic cervical lesions might be of an artificial origin, due to a low number of cervical samples with normal cytology in this analysis. However, more analyses are needed to explore this option in more detail. On the other hand and as expected (despite a low number of cervical samples with normal cytology), neoplastic cervical samples had statistically a significantly higher risk profile for HPV infection that other cervical samples (Tables 1, 2; see for example 1,13 and references therein). Moreover, a majority of HPV positive women with normal and neoplastic cytology were up to 29 years of age (Table 1), which supports a previously documented tendency of HPV to preferentially appear in younger patients close to the age of sexual debut (9 and references therein).

At least one of four bacterial STD pathogens selected in the present study, was found in 33%, 24% and 24% of women with neoplastic, normal and non-neoplastic cervical cytology, respectively (Tables 1,2). However, the latter increase in neoplastic versus normal/non-neoplastic samples was not statistically significant (Table 2). The co-infection of HPV and at least one of the four bacterial STD pathogens selected in the present study, was found in 17% and 9% of women with normal and non-neoplastic cervical cytology, respectively, while a statistically significantly higher occurrence (24%) was found in women with neoplastic cervical cytology (Tables 1,2). The reported higher co-incidence of HPV and bacterial STD pathogens in neoplastic cervical samples here is fully in agreement with previous studies (see for example 8,9).

**Table 2.** Chi-square analysis of different parameters of cervical samples with normal (N) and non-neoplastic (NNE), N and neoplastic (NE) and NNE and N cytology

	cytology								
	N (%)	NNE (%)	P*	N (%)	NE (%)	P*	NNE (%)	NE (%)	P*
<b>Patient age</b>									
≤ 29 y	22(48)	108(29)		22(48)	58(53)		108(29)	58(53)	
30-39 y	18(39)	152(40)		18(39)	32(29)		152(40)	32(29)	
40-49 y	6(13)	85(23)	<b>0,027</b>	6(13)	14(13)	0,451	85(23)	14(13)	<b>0,003</b>
<b>HPV</b>									
positive	20(43)	110(29)		20(43)	62(57)		110(29)	62(57)	
negative	26(57)	264(71)	<b>0,039</b>	26(57)	47(43)	<b>0,047</b>	264(71)	47(43)	<b>0,00006</b>
<b>bSTD</b>									
positive	11(24)	91(24)		11(24)	36(33)		91(24)	36(33)	
negative	35(76)	283(76)	1	35(76)	73(67)	0,158	283(76)	73(67)	0,158
<b>bSTD**</b>									
Ct	3(18)	17(17)		3(18)	6(15)		17(17)	6(15)	
Mh	4(23)	17(17)		4(23)	6(15)		17(17)	6(15)	
Uu	10(59)	64(65)	0,545	10(59)	26(67)	0,298	64(65)	26(67)	0,259
<b>HPV+bSTD</b>									
positive	8(17)	34(9)		8(17)	26(24)		34(9)	26(24)	
negative	38(83)	340(91)	0,092	38(83)	83(76)	0,220	340(91)	83(76)	<b>0,004</b>

\*Data with p < 0,05 are shown in bold types



Finally, the *Ureaplasma urealyticum* was found to be a most prevalent bacterium from four investigated bacterial STD pathogens (*Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Neisseria gonorrhoeae*; **Table 2**), in line with the published literature (for review see 7). On the other hand, in contrast to the previously documented association between *Chlamydia trachomatis* and cervical neoplasia<sup>(8,14-17)</sup>, we did not find any specific association between the individual investigated bacterial pathogen and the sample cytology (**Table 2**). This was probably due to a small number of samples in this study; but more analyses are needed to explore it in more detail. However, in this respect we note also some previous studies which did not observe a direct causal association between *Chlamydia trachomatis* and cervical neoplasia<sup>(18,19)</sup>, or suggested only an increasing susceptibility to carcinogenic HPV infection among women with a positive *Chlamydia trachomatis* status<sup>(9)</sup>.

## Conclusion

Despite the study limitations, described above, we have found here a good congruence with the published literature on the incidence and association of HPV and HPV/bSTD pathogens with cervical pathology (**see Tables 1, 2 and text above**). This approach helps us to identify patients with higher

risk for cervical pathology (i.e. persistent carcinogenic HPV or carcinogenic HPV/bSTD DNA positivity) and to involve them in more accurate medical care (see for example 13). However, we find here a relatively high portion of women with an HPV and/or HPV/bSTD negative result on the one hand and a neoplastic cervical cytology on the other hand (**Table 1 and text above**). Similarly, the recent paper by Tracht et al. also reported that the HPV-negative samples with positive cytology exist and may be missed by primary HPV screening<sup>(20)</sup>. Thus, the analysis of other defined differences (i.e. ethnicity; see for example 1) in women attending gynaecology ambulances and/or completely new approaches are needed to improve the screening and/or diagnostics strategies of cervical pathology. Our group is trying to explore this suggestion by a complex metabolomic approach using the fluorescent concentration matrix technology<sup>(21)</sup>.

## Acknowledgements

This work was funded by the European Regional Development OPVaV-2009/2.2/05-SORO (ITMS code: 26220220143).

## Pod'akovanie

Táto práca vznikla vďaka podpore Európskeho Fondu Regionálneho Rozvoja OPVaV-2009/2.2/05-SORO (ITMS kód: 26220220143).

## REFERENCES

- Soto-De Leon S, Camargo M, Sanches R, et al. Distribution patterns of infection with multiple types of human Papillomaviruses and their association with risk factors. PLoS ONE 2011; 6(2): doi:10.1371/journal.pone.0014705.
- Solomon N, Nayar R. The Bethesda system for reporting cervical cytology: definitions, criteria, and explanatory notes. Springer.
- Harris M, Wang XG, Jiang Z, et al. Radioimmunotherapy of experimental head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) with E6-specific antibody using a novel HPV-16 positive HNSCC cell line. Head Neck Oncol 2011; 3(1): doi: 10.1186/1758-3284-3-9.
- Tungteakkhun SS, Duerksen-Hughes PJ. Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. Arch Virol 2008; 153: 397-408.
- Dunne EF, Markowitz LE. Genital human papillomavirus infection. Clin Infect Dis 2006; 43(5): 624-629.
- Bachmann LH, Desmond RA, Stephens J, et al. Duration of persistence of Gonococcal DNA detected by ligase chain reaction in men and women following recommended therapy for uncomplicated gonorrhoea. J Clin Microbiol 2002; 40(10): 3596-3601.
- Volgmann T, Ohlinger R, Panzig B. *Ureaplasma urealyticum*-harmless commensal or underestimated enemy of human reproduction? A review. Arch Gynecol Obstet 2005; 273(3):133-139.
- Finan RR, Musharrafieh U, Almawi WY. Detection of *Chlamydia trachomatis* and herpes simplex virus 1 and 2 in cervical samples in human papilloma virus (HPV)-positive and HPV-negative women. Clin Microbiol Infect 2006; 12(9): 927-930.
- Safaeian M, Quint K, Schiffman M, et al. *Chlamydia trachomatis* and risk of prevalent and incident cervical premalignancy in a population-based cohort. J Natl Cancer Inst 2010; 102(23): 1794-1804.
- Farrell DJ. Evaluation of Amplicolor *Neisseria gonorrhoeae* PCR using cpxB nested PCR and 16S rRNA PCR. J Clin Microbiol 1999; 37(2): 386-390.
- Mahony JB, Luinstra KE, Sellors JW, Chernesky MA. Comparison of plasmid- and chromosome-based polymerase chain reaction assays for detecting *Chlamydia trachomatis* nucleic acid. J Clin Microbiol 1993; 31(7): 1753-1758.
- Cultrera R, Seraceni S, Germani R, Contini C. Molecular evidence of *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* colonization in preterm infants during respiratory distress syndrome. BMC Infect Dis 2006; 6: 166.
- Johansson H, Bjelkenkrantz K, Darlin L, et al. Presence of high-risk HPV mRNA in relation to future high-grade lesions among high-risk HPV DNA positive women with minor cytological abnormalities. PLoS ONE 2015; 10(4): doi:10.1371/journal.pone.0124460.
- Anttila T, Saikku P, Koskela P, et al. Serotypes of *Chlamydia trachomatis* and risk for development of cervical squamous cell carcinoma. JAMA 2001; 285(1): 47-51.
- Smith JS, Munoz N, Herrero R, et al. Evidence for *Chlamydia trachomatis* as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer in Brazil and the Philippines. J Infect Dis 2002; 185(3): 324-331.
- Smith JS, Bosetti C, Munoz N, et al. *Chlamydia trachomatis* and invasive cervical cancer: a pooled analysis of the IARC multicentric case-control study. Int J Cancer. 2004; 111(3): 431-439.
- Madeleine MM, Anttila T, Schwartz SM, et al. Risk of cervical cancer associated with *Chlamydia trachomatis* antibodies by histology, HPV type and HPV cofactors. Int J Cancer 2007; 120(3): 650-655.
- Yoshikawa H, Nagata C, Noda K, et al. Human papillomavirus infection and other risk factors for cervical intraepithelial neoplasia in Japan. Br J Cancer 1999; 80(3-4): 621-624.
- Castle PE, Escoffery C, Schachter J, Rattray C, Schiffman C, et al. *Chlamydia trachomatis*, herpes simplex virus 2, and human T-cell lymphotropic virus type I are not associated with grade of cervical neoplasia in Jamaican colposcopy patients. Sex Transm Dis 2003; 30(7): 575-580.
- Tracht JM, Davis AD, Fasciano DN, et al. Discrepant HPV/cytology contesting results: Are there differences between cytology-negative versus HPV-negative cervical intraepithelial neoplasia? Cancer Cytopathol 2017; 125(10): 795-805.
- Dubayova K, Luckova I, Sabo J, Karabinos A. A novel way to monitor urine concentration: Fluorescent concentration matrices. J Clin Diagn Res 2015; 9(1): BC11-BC14.



MUDr. Anton Karabinoš, PhD.  
SEMBID, s. r. o. – Research Centre of Applied Biomedical Diagnostics  
Magnezitárska 2/C, 040 13 Košice, Slovakia  
e-mail: sembid.pp@gmail.com

## Prevalencia a citlivosť na antibiotiká *Ureaplasma urealyticum* a *Mycoplasma hominis* izolovaných z genitálnych a močových vzoriek vyšetrených v období rokov 2014 – 2017 v KNsP Čadca

Jozef Ficik<sup>1</sup>, Jana Liščáková<sup>2</sup>

<sup>1,2</sup>Oddelenie laboratórnej medicíny, úsek klinickej mikrobiológie a centrálnej sterilizácie KNsP Čadca

Urogenitálne mykoplazmy a ureaplazmy, konkrétne *Mycoplasma hominis* (*M. hominis*) a *Ureaplasma urealyticum* (*U. urealyticum*) sú oportúnne bakteriálne patogény vyvolávajúce urogenitálne infekcie u detí aj dospelých. V tejto práci bola vyhodnotená prevalencia a citlivosť na antibiotiká *M. hominis* a *U. urealyticum* izolovaných z genitálnych a močových vzoriek vyšetrených počas 3 rokov, v období rokov 2014 – 2017 v KNsP Čadca.

Z výsledkov vyplýva, že zastúpenie týchto mikroorganizmov v patogenéze urogenitálnych infekcií je najčastejšie vo fertilnom veku u žien a u mužov vo vekovej kategórii nad 60 rokov. Z celkového súboru 4 736 vyšetrených biologických vzoriek bol zaznamenaný výskyt urogenitálnych mykoplaziem a ureaplaziem u 1 308 pacientov, čo predstavuje 27,6 % (23,7 % u žien a 3,9 % u mužov). Najčastejšie bola identifikovaná *U. urealyticum*, 77,6 %, menej *M. hominis*, iba na úrovni 4,5 %. Prítomnosť oboch mikroorganizmov sme dokázali pri 17,9 % vyšetrených biologických vzoriek. Pozitívne nálezy urogenitálnych mykoplaziem a ureaplaziem boli testované na vybrané skupiny antimikrobiálnych látok, ktoré majú v ich liečbe terapeutický význam. Sú to antibiotiká makrolidového a tetracyklínového radu, chinolóny druhej a tretej generácie, zastúpené boli aj linkozamidy (klindamycín) a streptogramíny (pristinamycín).

V testovanom súbore vzoriek zo spádovej oblasti KNsP Čadca možno v terapii odporučiť v prvom rade antibiotiká tetracyklínového radu, napr. doxycyklín.

**Kľúčové slová:** citlivosť na antibiotiká, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*

### *Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* isolated from genital and urinary samples examined in the period 2014-2017 in KNsP Čadca*

Urogenital mycoplasmas and ureaplasmas, namely *Mycoplasma hominis* (*M. hominis*) and *Ureaplasma urealyticum* (*U. urealyticum*) are opportunistic bacterial pathogens causing urogenital infections in children and adults. The aim of this study was to evaluate the prevalence and antimicrobial susceptibility of *M. hominis* and *U. urealyticum* isolated from genital and urinary samples examined during the period 2014-2017 in KNsP Čadca.

The results show that the presence of these microorganisms in the pathogenesis of urogenital infections is most common in fertile age in women and in men aged over 60 years. Of the total of 4736 investigated biological samples, the incidence of urogenital mycoplasmas and ureaplasmas was recorded in 1,308 patients, representing 27.6% (23.7% for women and 3.9% for males). Most commonly *U. urealyticum* was identified, 77.6%, less *M. hominis*, only 4.5%. The presence of both microorganisms was demonstrated in 17.9% of the tested samples. All urogenital mycoplasmas and ureaplasmas identified, have been tested to selected groups of antimicrobials that have therapeutic significance in their treatment. They are macrolide and tetracycline antibiotics, second and third generation quinolones, linkosamides (clindamycin) and streptogramins (pristinamycin).

Tetracycline antibiotics, for example doxycycline, may be recommended in therapy for the tested population from the catchment area of KNsP Čadca.

**Keywords:** antimicrobial susceptibility, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*

NewsLab, 2018; roč. 9 (1): 16 – 20

### Úvod

Urogenitálne mykoplazmy a ureaplazmy patria do triedy Mollicutes, ktorá je charakterizovaná malou veľkosťou bakteriálnych buniek, chýbajúcou bunkovou stenou a extrémne náročnými rastovými požiadavkami „in vitro“. *U. urealyticum* a *M. hominis* sú oportúnne intracelulárne patogény, ktoré majú afinitu k epitelovým bunkám slizníc, sú lokalizované pericelulárne, i keď môžu penetrovať aj do vnútra buniek<sup>(1)</sup>. Vyskytujú sa v urogenitálnom trakte pacientov trpiacich príznakmi zahŕňajúcimi infertilitu, orchitídu, epididymitídu,

prostatitídu alebo negonokokovú uretritídu<sup>(2)</sup>. Možno ich však izolovať aj od asymptomatických jedincov<sup>(3)</sup>. Cieľom práce bolo stanoviť prevalenciu a citlivosť na antibiotiká *M. hominis* a *U. urealyticum* izolované z genitálnych a močových vzoriek od pacientov z nemocničných oddelení a zo spádových ambulancií KNsP Čadca. Ochorenia môžu byť spôsobené aj inými druhmi urogenitálnych mykoplaziem a ureaplaziem (napr. *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma parvum*), ktoré však použité diagnostické súbory neidentifikujú.

## Materiál a metódy

Do súboru boli zaradené endocervikálne, vaginálne a uretrálne výtery a moč. Biologické vzorky pochádzali od pacientov s príznakmi infekcie urogenitálneho traktu zo spádovej oblasti KNsP Čadca (okres Čadca a Kysucké Nové Mesto) od 1. júla 2014 do 30. júna 2017 (3 roky). Z celkového počtu 4 736 vyšetrených vzoriek bolo 3 661 od žien. Priemerný vek bol  $38,2 \pm 17,9$  roka, (rozsah 0 – 90 rokov, 95 % CI 18 – 75 rokov).

Na identifikáciu, semikvantifikáciu a stanovenie citlivosti urogenitálnych mykoplaziem a ureaplaziem na antimikrobiálne látky boli použité dve diagnostické súbory, s ktorými sme mali možnosť pracovať v rôznych časových obdobiach. Používali sme MYCOPLASMA TEST® (ALL.DIAG, Štrasburg, Francúzsko) od začiatku sledovaného obdobia, t. j. od 1. júla 2014 s prestávkami do 20. júla 2016 (spolu 1 rok a 7 mesiacov). Mycoplasma IST 2 test (Biomérieux, Marcy l'Étoile, Francúzsko) sme používali v obdobiach od 18. septembra 2014 s prestávkami do konca sledovaného obdobia, t. j. 30. júna 2017 (spolu 1 rok a 5 mesiacov). Podľa výrobcov oba typy súprav vykazujú prakticky identickú senzitivitu (92,9 %) a špecifickosť (86,7 %). Pomocou oboch diagnostických súprav bola v biologických vzorkách dokazovaná prítomnosť *U. urealyticum* a *M. hominis*, spolu s odhadovanou koncentráciou jednotlivých mikroorganizmov [ $> 10^1 / > 10^4$  colony-forming units (CFU)/ml], pričom klinický význam môžu mať obe koncentrácie, keďže z testovania nebol vylúčený nikto, a teda ani tí, ktorí už užívali antibiotiká (ATB). Ak v mechanizme ATB nebola aktivita proti bunkovej stene, ale iný mechanizmus, (napr. inhibícia syntézy bielkovín či nukleových kyselín), takéto ATB mohli byť účinné aj v liečbe ešte nediagnostikovaných urogenitálnych mykoplaziem a ureaplaziem. To mohlo mať za následok nižšiu záchytnosť sledovaných mikroorganizmov. Ďalej bola zisťovaná kvalitatívna citlivosť na antimikrobiálne látky. MYCOPLASMA TEST® umožňuje stanovovať citlivosť na 10 antimikrobiálnych látok (ciprofloxacín, josamycín, klindamycín, minocyklín, roxitromycín, erytromycín, klaritromycín, levofloxacín, ofloxacín a tetracyklín). V Mycoplasma IST 2 teste bola zisťovaná citlivosť urogenitálnych mykoplaziem a ureaplaziem na 9 antimikrobiálnych látok (azitromycín, doxycyklín, josamycín, ofloxacín, tetracyklín, ciprofloxacín, erytromycín, klaritromycín a pristinamycín).

Obidva testy boli hodnotené po inkubácii pri 37 °C v dĺžke 48 hodín a druhýkrát po 72 hodinách. Identifikácia urogenitálnych mykoplaziem a ureaplaziem je založená na ich biochemických a metabolických vlastnostiach. V prípade *U. urealyticum* dochádza k rozloženiu urey ureázou za uvoľnenia  $\text{NH}_3^3$ , *M. hominis* rozkladá arginín pomocou arginázy, pričom sa uvoľní  $\text{NH}_3$ , čo zvýši v tekutom kultivačnom médiu pH. Výsledok identifikácie sa posudzuje podľa farebnej zmeny pH indikátora. Interpretácia a stanovenie citlivosti na antimikrobiálne látky sa zakladá na inhibícii uvedenej enzymatickej aktivity a výsledok sa podobne odčíta podľa farebnej zmeny pH indikátora. Pre každú antimikrobiálnu látku s výnimkou pristinamycínu sa používajú dve jamky s rozdielnou koncentráciou antimikrobiálnej látky. Výsledok citlivosti sa odčítal kvalitatívne ako citlivý, intermediárne citlivý alebo rezistentný podľa odporúčaní výrobcov diagnostických súprav.

Pre štatistické analýzy bol použitý štatistický softvér SPSS 22 pre Windows (Statistical Package for Social Sciences inc,

Chicago, USA). Na porovnanie prípadov výskytu kmeňov citlivých na rôzne antimikrobiálne látky alebo rezistentných proti nim bol použitý Pearsonov chí-kvadrátový test dobrej zhody. Za štatisticky významnú bola považovaná hodnota pravdepodobnosti  $p < 0,05$ .

## Výsledky

### Vyšetrované biologické materiály

V rokoch 2014 – 2017 boli medzi vyšetrované vzorky zaradené: moč (3 902 vzoriek), endocervikálne výtery (545 vzoriek), vaginálne výtery (214 vzoriek) a uretrálne výtery (75 vzoriek).

Positívne materiály boli v nasledovnom zastúpení: moč (82,6 %), endocervikálne výtery (11,3 %), vaginálne výtery (5,4 %) a uretrálne výtery (0,7 %). Pôvod odobraného biologického materiálu a najčastejšie zastúpené diagnózy sú zhrnuté v **tabuľke 1**.

### Prevalencia *U. urealyticum* a *M. hominis* v biologických vzorkách z urogenitálneho traktu

Z celkového počtu 4 736 vyšetrených biologických vzoriek (3 661 od žien a 1 075 od mužov) boli urogenitálne mykoplazmy a ureaplazmy identifikované u 1 308 pacientov (27,6 %). V skupine pozitívnych pacientov bolo 1 123 žien (85,9 %) a 185 mužov (14,1 %). *U. urealyticum* bola izolovaná u 1 015 pacientov (77,6 %) a *M. hominis* u 59 pacientov (4,5 %). V 234 vzorkách sa zachytili obidva patogénny v ko-infekcii (17,9 %). U pozitívnych žien bola prevalencia urogenitálnych mykoplaziem a ureaplaziem nasledovná: *U. urealyticum* 79,9 %, *M. hominis* 3,9 % a koinfekcia *U. urealyticum/M. hominis* 16,2 %. U mužov bola celková pozitivita 3,9 %. Prítomnosť *U. urealyticum*, *M. hominis* a *U. urealyticum/M. hominis* zmiešanej infekcie bola 63,8 %, 8,1 %, 28,1 % v tomto poradí (**tabuľka 2**). U žien ani u mužov sa nepreukázal signifikantný rozdiel v prítomnosti urogenitálnych mykoplaziem a ureaplaziem medzi jednotlivými rokmi sledovaného obdobia ( $p > 0,05$ ). Počas celého sledovaného obdobia 2014 – 2017 prevládala monoinfekcia *U. urealyticum* nad monoinfekciou *M. hominis* a zmiešanou infekciou *U. urealyticum/M. hominis* (**graf 1**).

**Tabuľka 1.** Pôvod vzoriek biologického materiálu a zastúpené diagnózy

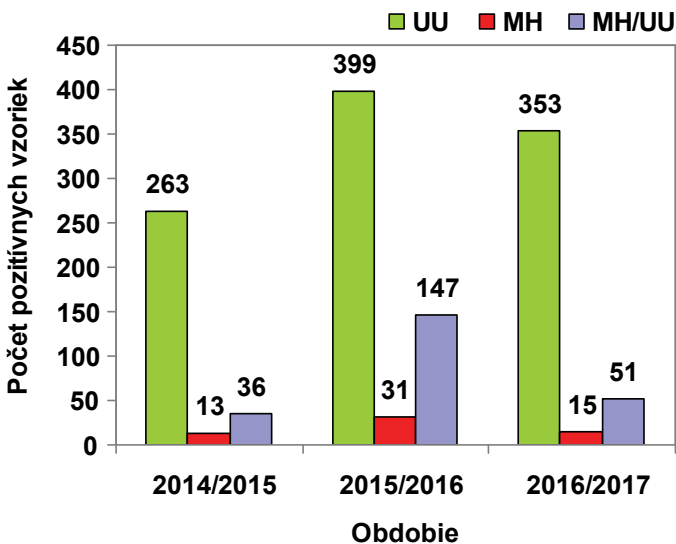
Pôvod vzoriek	Celkovo	Ženy	Muži
Gynekologická ambulancia	433 (33,1 %)	433 (38,6 %)	–
Urologická ambulancia	275 (21 %)	175 (15,6 %)	100 (54 %)
Obvodná ambulancia pre dospelých	256 (19,6 %)	216 (19,2 %)	40 (21,6 %)
Nefrologická ambulancia	223 (17 %)	207 (18,4 %)	16 (8,6 %)
<b>Zastúpené diagnózy</b>			
Akútna cystitída (N.30)	405 (31 %)	322 (28,7 %)	83 (44,9 %)
Subakútna a chronická vaginitída (N76.1)	148 (11,3 %)	148 (13,2 %)	–
Akútna tubulointerstiálna nefritída (N10)	117 (8,9 %)	111 (9,9 %)	6 (3,2 %)
Nešpecifikovaná cystitída (N30.9)	116 (8,9 %)	102 (9,1 %)	14 (7,6 %)



**Tabuľka 2.** Výskyt urogenitálnych mykoplazmiem a ureaplazmiem u pozitívnych žien a mužov

	Celkovo	Ženy	Muži
Počet pozitívnych vzoriek	1 308	1 123 (85,6 %)	185 (14,1 %)
Positivita <i>U. urealyticum</i>	1015 (77,6 %)	897 (79,9 %)	118 (63,8 %)
Positivita <i>M. hominis</i>	59 (4,5 %)	44 (3,9 %)	15 (8,1 %)
Positivita koinfekcií <i>U. urealyticum/M. hominis</i>	234 (17,9 %)	182 (16,2 %)	52 (28,1 %)

**Graf 1.** Výskyt urogenitálnych mykoplazmiem a ureaplazmiem v jednotlivých obdobiach



UU – *U. urealyticum*; MH – *M. hominis*

## Výskyt urogenitálnych mykoplazmiem a ureaplazmiem v rôznych vekových skupinách

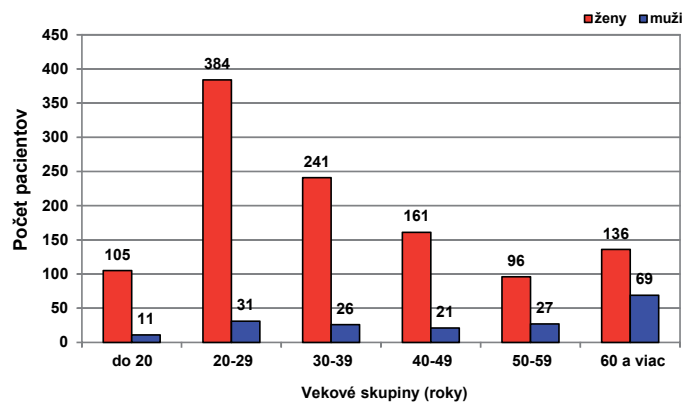
Celková pozitivita urogenitálnych mykoplazmiem vo vekových kategóriách 20 – 40 rokov bola relatívne vyššia (46,8 %) v porovnaní s ostatnými vekovými skupinami. Najvyššia pozitivita u žien bola detegovaná vo vekovej skupine 20 – 29 rokov počas celého sledovaného obdobia (34,2 %). Takmer 40 % mužov s pozitívnymi urogenitálnymi mykoplazmami a ureaplazmami v sledovanom období bolo vo vekovej kategórii nad 60 rokov (37,3 %) (**graf 2**).

Zastúpenie jednotlivých urogenitálnych mykoplazmiem a ureaplazmiem podľa vekových kategórií znázorňuje **graf 3**. Monoinfekcia *U. urealyticum* bola najčastejšia u pacientov (muži + ženy) vo veku 20 – 29 rokov. Najviac zmiešaných infekcií *U. urealyticum/M. hominis* bolo vo vekovej kategórii nad 60 rokov u oboch pohlaví (38,9 %). Monoinfekcia *M. hominis* mala približne rovnomerný výskyt vo všetkých vekových kategóriách.

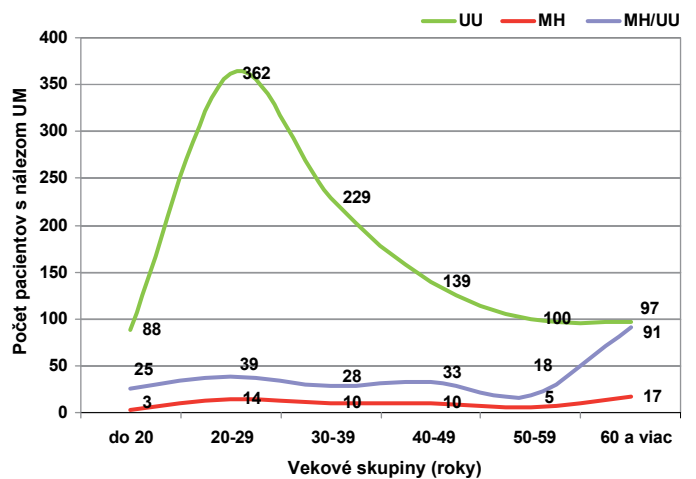
## „In vitro“ citlivosť urogenitálnych mykoplazmiem a ureaplazmiem na antimikrobiálne látky

Infekcie *U. urealyticum* vykazovali rezistenciu proti makrolidovým ATB na úrovni 7,3 %, na tetracyklínové ATB (minocyklín a doxycyklín) 3,5 %, okrem tetracyklínu (17,4 %). Rezistencia proti levofloxacinu bola 14,2 %, rezistencia proti ofloxacinu 38,2 % a proti ciprofloxacínu 68,2 %. Rezistencia *M. hominis* proti roxitromycínu, erytromycínu a klaritromycínu bola 64,6 %. Rezistencia proti azitromycínu bola 77,8 %,

**Graf 2.** Celkový výskyt urogenitálnych mykoplazmiem a ureaplazmiem v rôznych vekových kategóriách u žien a mužov



**Graf 3.** Zastúpenie jednotlivých urogenitálnych mykoplazmiem a ureaplazmiem podľa vekových kategórií



proti josamycínu 32,2 %. Rezistencia proti tetracyklínu a minocyklínu bola 35,8 %, proti doxycyklínu 11,1 % a proti pristamycínu 22,2 %. Rezistencia proti chinolónom dosiahla 41,4 %, proti klindamycínu bola 41,5 %.

U pacientov s kombinovanou infekciou *U. urealyticum/M. hominis* sme pri vyšetrení zmiešanej kultúry zaznamenali vysokú rezistenciu proti makrolidovým ATB a chinolónom, na úrovni 74,7 %, okrem azitromycínu (56,7 %). Rezistencia proti tetracyklínovým ATB bola 67,2 %, okrem doxycyklínu (38,3 %). Pri kombinovaných infekciách *U. urealyticum/M. hominis* bola rezistencia proti väčšine testovaných antimikrobiálnych látok vyššia ako 60 %, čo naznačuje, že koinfekcie *U. urealyticum/M. hominis* môžu byť ťažšie liečiteľné ako samotné infekcie, keďže pri nich môže dôjsť k selekcii skríženej rezistencie na antimikrobiálne látky<sup>(4)</sup> (**tabuľka 3**). Štatistický rozdiel pri všetkých antimikrobiálnych látkach bol  $p < 0,001$ .

## Diskusia

Do tejto práce boli zaradené biologické vzorky z endocervixu, pošvy, moču a uretry mužov a žien všetkých vekových skupín, pochádzajúce zo spádovej oblasti KNŠP Čadca. Dokazovaná bola prítomnosť *U. urealyticum* a *M. hominis* pomocou diagnostických súprav používaných v našom laboratóriu v období od 1. 7. 2014 do 30. 6. 2017, teda počas 3 rokov.

Tabuľka 3. Rezistencia urogenitálnych mykoplazmiem a ureaplazmiem proti antimikrobiálnym látkam

Antibiotikum	U. urealyticum		M. hominis		U. urealyticum/M. hominis		Štatistický rozdiel
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	
Ciprofloxacín	692	(68,2)	25	(42,4)	181	(77,4)	p < 0,001
Ofloxacín	388	(38,2)	25	(42,4)	158	(67,5)	p < 0,001
Levofloxacín	75	(14,2)	15	(38,5)	118	(68,2)	p < 0,001
Klindamycín	404	(74)	17	(41,5)	148	(85,1)	p < 0,001
Erytromycín	97	(9,6)	39	(66,1)	190	(81,2)	p < 0,001
Josamycín	45	(4,5)	19	(32,2)	157	(67,1)	p < 0,001
Azitromycín	31	(6,6)	14	(77,8)	34	(56,7)	p < 0,001
Klaritromycín	62	(6,1)	39	(66,1)	191	(82)	p < 0,001
Roxitromycín	51	(9,6)	24	(61,5)	137	(79,2)	p < 0,001
Tetracyklín	177	(17,4)	21	(35,6)	152	(67,9)	p < 0,001
Minocyklín	21	(4)	14	(35,9)	115	(66,5)	p < 0,001
Doxycyklín	14	(3)	2	(11,1)	23	(38,3)	p < 0,001
Pristinamycín	20	(4,2)	4	(22,2)	29	(50,9)	p < 0,001

Základnou podstatou vykonaných vyšetrení bola kultivácia a identifikácia *U. urealyticum* a *M. hominis*, založená na princípe využitia ich metabolických a biochemických vlastností. Pri pozitívnej kultivácii bola stanovovaná ich kvalitatívna citlivosť na antimikrobiálne látky. I keď sú tieto mikroorganizmy často iba neškodné komenzály, ktoré kolonizujú urogenitálny trakt mužov a žien, čoraz viac sa ukazuje, že môžu byť zodpovedné za rôzne, najmä chronické ochorenia spomínaného systému<sup>(5)</sup>.

Hoci v našom súbore bola najčastejšou diagnózou asociovanou s nálezom urogenitálnych mykoplazmiem a ureaplazmiem akútna cystitída (31 %), štúdie iných autorov uvádzajú skôr asociáciu týchto mikroorganizmov s intersticiálnou cystitídou<sup>(6)</sup>. Možným vysvetlením by mohlo byť, že spomínaná akútna cystitída je len začiatkom intersticiálnej cystitídy, ktorá sa môže pri neadekvátnej liečbe u týchto pacientov vyvinúť.

Zaujímavý je vzťah medzi mykoplazmovými a ureaplazmovými infekciami a vekom pacientov. Najvyššia prevalencia urogenitálnych mykoplazmiem a ureaplazmiem bola zaznamenaná u žien vo veku 20 – 40 rokov a u mužov vo vekovej kategórii nad 60 rokov. Zmiešané infekcie sa najčastejšie vyskytovali u oboch pohlaví vo veku nad 60 rokov. Predstavovali až 48,6 %. Na pozitivitu urogenitálnych mykoplazmiem a ureaplazmiem vo vyššom veku poukazujú aj štúdie iných autorov z celého sveta<sup>(7,8)</sup>. Je na úvahu, či tu ide o nediagnostikované infekcie, prípadne kolonizujúce infekcie, ktoré si pacienti nesú z mladosti, alebo ide o novovzniknuté infekcie v teréne chronických zápalových zmien urogenitálneho traktu, v súčinnosti s oslabeným imunitným systémom<sup>(9)</sup>.

Urogenitálne mykoplazmy a ureaplazmy patria medzi bežnú flóru, ktorá sa vyskytuje na genitálnych slizniciach u zdravých dospelých ľudí<sup>(1)</sup>. Ich výskyt je však spájaný aj s patologickými procesmi, ako je mimomaternicová gravidita, hlboký panvový zápal či predčasný pôrod<sup>(10)</sup>. Najčastejšia forma prenosu urogenitálnych mykoplazmiem je pohlavný styk, preto je dôležité v prípade infekcie preliečiť všetkých sexuálnych partnerov. Možný je tiež prenos z matky na dieťa počas pôrodu a u pacientov po transplantácii orgánov<sup>(11)</sup>. Z tohto pohľadu je dôležité monitorovať výskyt urogenitálnych mykoplazmiem a ureaplazmiem v populácii.

Pozitívne nálezy urogenitálnych mykoplazmiem sme testovali na vybrané skupiny antimikrobiálnych látok, ktoré majú v ich liečbe terapeutický význam. Sú to ATB makrolidového a tetracyklínového radu, z chemoterapeutík chinolóny druhej a tretej generácie, zastúpené boli aj linkozamidy (klindamycín) a streptogramíny (pristinamycín).

Mykoplazmy a ureaplazmy nemajú bunkovú stenu, a teda sú rezistentné proti beta-laktámovým ATB. Nie sú citlivé ani na sulfonamidy či trimetoprim pre ich neschopnosť syntetizovať kyselinu listovú. Môžu byť rezistentné aj proti iným antimikrobiálnym látkam, napr. linkosamidom, makrolidom, fluorchinolónom či tetracyklínom, čo súvisí s vývojom rôznych mechanizmov rezistencie<sup>(2)</sup>. Môže ísť o zmenu cieľových štruktúr, ako aj eflux antimikrobiálnej látky, čo môže byť výsledkom genetickej mutácie alebo prenesenia nových génov na transpozónoch. Napríklad chinolónová rezistencia môže nastať mutáciou v cieľovom enzýme (DNA gyráza, topozoméraz IV) a takisto alteráciou permeability bunkovej membrány baktérie pre antimikrobiálnu látku. Rezistencia *M. hominis* na makrolidové ATB je výsledkom mutácie génov ribozomálnych proteínov a taktiež antibiotického efluxu<sup>(12)</sup>. Podobné mechanizmy sa predpokladajú aj pri rezistencii urogenitálnych mykoplazmiem a ureaplazmiem proti tetracyklínom<sup>(12)</sup>.

Nie je vždy jednoduché rozlíšiť, či urogenitálne mykoplazmy a ureaplazmy sú vyvolávatelom akútnej urogenitálnej infekcie, alebo ide o kolonizáciu týmito mikroorganizmami. Pri cieľenej antimikrobiálnej terapii recidivujúcich infekcií je však dôležité myslieť aj na tieto mikroorganizmy. Na zníženie rizika zlyhania empirickej liečby sa odporúča regionálne testovanie „in vitro“ citlivosti na antimikrobiálne látky, pretože v antibiotickej rezistencii existujú geografické rozdiely. Podľa údajov SNARS (Slovak National Antimicrobial Resistance Surveillance System) bola v roku 2016 citlivosť *U. urealyticum* na pristinamycín, doxycyklín, tetracyklín a josamycín viac ako 90 %. Rezistencia *U. urealyticum* proti ciprofloxacínu dosiahla 47 %. Pri *M. hominis* bola citlivosť viac ako 90 % na pristinamycín, doxycyklín a tetracyklín. Rezistencia *M. hominis* proti ciprofloxacínu bola 34 %<sup>(13)</sup>.

V testovanom súbore vzoriek zo spádovej oblasti KNSP Čadca možno v terapii odporučiť v prvom rade doxycyklín,

keďže pristinamycín, josamycín a minocyklín nie sú na Slovensku registrované. Pre naše kmene bola potvrdená aj významná rezistencia *U. urealyticum* proti ciprofloxacínu a klindamycínu. Klindamycín je semisyntetický derivát linkomycínu, proti ktorému je *U. urealyticum* prirodzene rezistentná. Vysoká rezistencia proti ciprofloxacínu sa dá vysvetliť regionálnymi pomermi a lokálnymi zvyklosťami pri preskripcii antimikrobiálnych látok. To isté sa dá povedať aj o azitromycíne a tetracyklínoch, proti ktorým sme zaznamenali vyššiu rezistenciu u *M. hominis*. Vysoká preskripcia a časté používanie ciprofloxacínu pri urogenitálnych, respiračných, ale aj iných infekciách môže viesť k progresii rezistencie proti tomuto chemoterapeutiku hlavne pri urogenitálnych mykoplazmách a ureaplazmách<sup>(14)</sup>.

Výskyt urogenitálnych infekcií súvisí s vekom pacientov a častejšie sú diagnostikované u žien vo fertilnom veku, kde sa môžu vyskytovať aj v koinfekcii s chlamýdióvymi

infekciami<sup>(15)</sup>. U mužov je záchytnosť vyššia najmä vo vekovej kategórii nad 60 rokov, kde však častejšie ide o kolonizáciu bez klinických príznakov<sup>(16)</sup>.

### Záver

V súčasnosti sa na liečbu mykoplazmových a ureaplazmových infekcií používajú tri skupiny antimikrobiálnych látok, a to fluorochinolóny, tetracyklínové a makrolidové ATB. Naše výsledky demonštrujú skutočnosť, že ženy vo fertilnom veku majú vyššiu pozitivitu urogenitálnych mykoplazmiem a ureaplazmiem. Vek a pohlavie pacienta sú rizikovými faktormi výskytu urogenitálnych infekcií a terapia týchto vyvolávateľov infekcií by sa optimálne mala iniciovať na základe klinických príznakov pacienta a následne stanovenej „in vitro“ antibiotickej citlivosti. V prípade empirickej liečby je nevyhnutné prihliadať na aktuálne regionálne trendy rezistencie proti antimikrobiálnym látkam.

### LITERATÚRA

1. Bednář M, Fraňková V, Schindler J, a spol. Lékařská mikrobiologie. 1. vydání. Praha, Marvil 1996; s: 319.
2. Leli C, Mencacci A, Bombaci JC, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in a population of Italian and immigrant outpatients. *Infez Med* 2012; 20(2): 82-87.
3. Tibaldi C, Cappello N, Latino MA, et al. Vaginal and endocervical microorganisms in symptomatic and asymptomatic non-pregnant females: risk factors and rates of occurrence. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15(7): 670-679.
4. Vargovic M, Pasini M, Papic N, et al. Antimicrobial susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis*. *Sex Transm Infect* 2014; 90(1): 69.
5. Latthe PM, Toozs-Hobson P, Gray J. *Mycoplasma* and *ureaplasma* colonisation in women with lower urinary tract symptoms. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, July 2008; 28(5): 519-521.
6. McDonald MI, Lam MH, Birch DF, et al. *Ureaplasma urealyticum* in patients with acute symptoms of urinary tract infection 1982; *J Urol* 128: 517-519.
7. Skiljevic D, Mirkov D, Vukicevic J. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in genital samples collected over 6 years at a Serbian university hospital. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2016; 82(1): 37-41.
8. Wang QY, Li RH, Zheng LQ, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in female outpatients, 2009–2013. *J Microbiol Immunol Infect* 2014; 49(3): 359-362.
9. Mouton CP, Bazaldua OV, Pierce B, et al. Common Infections in Older Adults. *Am Fam Physician* 2001; 15, 63(2): 257-269.
10. Taylor-Robinson D, Lamont R. *Mycoplasmas* in pregnancy. *BJOG* 2011; 118: 164-174.
11. Bayraktar MR, Ozerol IH, Gucluer N, et al. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in pregnant women. *Int J Infect Dis* 2010; 14(2): e90-e95.
12. Bayraktar MR, Ozerol IH, Gucluer N, et al. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in pregnant women. *Int J Infect Dis* 2010; 14(2): e90-e95.
13. Public Health Authority of the Slovak Republic. 2017; Dostupné na internete: <https://www.snars.sk>.
14. Xie X, Zhang J. Trends in the rates of resistance of *Ureaplasma urealyticum* to antibiotics and identification of the mutation site in the quinolone resistance-determining region in Chinese patients. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 259: 181-186.
15. Jarčuška P, Balogová L, Šuleková L, a spol. Infekcie vyvolané chlamýdiami. *Via practica* 2009; 6(4): 147-152.
16. Mouton CP, Bazaldua OV, Pierce B, et al. Common Infections in Older Adults. *Am Fam Physician* 2001; 15, 63(2):257-269.



### MUDr. Jozef Ficik

Kysucká nemocnica s poliklinikou Čadca  
Palárikova 2311, 022 16 Čadca  
e-mail: [jozef.ficik@gmail.com](mailto:jozef.ficik@gmail.com)



## Monitoring EBV infekcie u detských pacientov po transplantácii krvotvorných buniek (TKB)

Katarína Kováčová<sup>1</sup>, Daniela Hučková<sup>1</sup>, Ivana Boďová<sup>2</sup>, Júlia Horáková<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Klinika detskej hematológie a onkológie LF UK a NÚDCH, TJKD, Bratislava

Epsteinov-Barrovej vírus (EBV) je ubikvitárne rozšírený  $\gamma$ -herpes vírus. Po infikovaní imunokompetentných jedincov zväčša navodí celoživotnú asymptomatickú infekciu, avšak u imunokompromitovaných pacientov môže spôsobiť vážne komplikácie. U príjemcov krvotvorných buniek po alogénnej transplantácii (alo-TKB) môže EBV infekcia viesť k vzniku posttransplantačného lymfoproliferatívneho ochorenia (PTLD). EBV-PTLD je životohrožujúca komplikácia s vysokou mortalitou 80 – 90 % a incidenciou medzi 0,5 – 1,3 %. U 71 detských pacientov po alo-TKB transplantovaných na Klinike detskej hematológie a onkológie LF a UK, Transplantačnej jednotke kostnej drene v Bratislave v období rokov 2013 až 2017 bola sledovaná hladina EBV DNA v súvislosti s výskytom EBV infekcie, možnými rizikovými faktormi jej vzniku a rozvoja EBV-PTLD. Kvantitatívna real-time PCR metóda bola uskutočnená zo vzoriek nezrazenej krvi u všetkých pacientov. Vysoká hladina EBV DNA v krvi bola pozorovaná v 57 % prípadov z aktívne infikovaných príjemcov (52 %). Zhodný nepríbuzenský darca a CMV reaktivácia boli asociované s vysokou vírusovou hladinou EBV DNA. U 2 pacientov sa rozvinulo EBV-PTLD ochorenie. Kľúčom včasnej liečby PTLD je pravidelné sledovanie hladiny EBV DNA metódou kvantitatívnej PCR v korelácii s rizikovými faktormi a klinickými príznakmi pacienta. Imunoterapeutická intervencia zahŕňa redukciu imunosupresie a podávanie anti-CD20 monoklonálnej protilátky (rituximab), adoptívnu imunoterapiu s podávaním EBV-špecifických T-buniek alebo infúzie darcovských lymfocytov.

**Kľúčové slová:** Epsteinov-Barrovej vírus (EBV), posttransplantačné lymfoproliferatívne ochorenie (PTLD), transplantácia krvotvorných buniek (TKB), rituximab

### *Monitoring EBV infection in children patients after Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT)*

Epstein-Barr Virus (EBV) is a ubiquitous  $\gamma$ -herpesvirus. EBV usually established a lifelong asymptomatic infection in immunocompetent people. On the other hand, EBV can cause severe problems in immunocompromised patients. In recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplant (allo-HSCT), EBV infection may progress to the onset of a post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD). EBV-PTLD is a life-threatening complication with a high mortality rate of 80-90 % and incidence between 0.5 – 1.3 %. In 71 paediatric allogeneic allo-HSCT recipients transplanted at Department of Paediatric Haematology and Oncology, Haematopoietic Stem Cell Transplantation Unit, Comenius University Children's Hospital, Bratislava between 2013 and 2017, there were investigated the impact of routine EBV DNA monitoring the incidence of EBV infection, the potential risk factors and the development of EBV-PTLD. Quantitative real-time PCR assay was performed on all blood samples for all patients. High EBV DNAemia levels were observed in 57 % of the actively infected recipients (52 %). Matched-unrelated donor transplant and CMV reactivation were associated with the high viral load. Two patients developed EBV PTLD. The key to the initiation of early treatment is regular EBV DNA PCR monitoring in correlation with clinical symptoms and presence of risk factors. Immunotherapeutic intervention includes reduction of immunosuppression and administration of anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab), adoptive immunotherapy with the administration of EBV-specific T-cells or donor lymphocyte infusion (DLI).

**Keywords:** Epstein-Barr Virus, post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD), Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT), rituximab

**NewsLab, 2018; roč. 9 (1): 21 – 26**

### Úvod

Epsteinov-Barrovej vírus (EBV) patrí medzi ľudské herpetické vírusy (ľudský herpes vírus 4, HHV-4). Človek je jediným prirodzeným hositeľom. Ide o ubikvitárne rozšírený vírus s výskytom viac ako 90 % v dospeljej populácii. Zdrojom nákazy je chorý jedinec alebo bezpríznakový nosič, ktorý vylučuje vírus slinami. Zaznamenal sa však aj prenos materským mliekom, krvou, transplantátmi a pohlavným stykom<sup>(1)</sup>.

Ochorenie vyvolané infekciou EBV nie je preventabilné očkovaním a nie sú k dispozícii ani iné hromadné preventívne opatrenia na zabránenie prenosu EBV. Primárna infekcia EBV u detí vo väčšine prípadov prebieha asymptomaticky alebo ju sprevádzajú nešpecifické syndrómy. Vývoj syndrómu infekčnej mononukleózy je charakteristický pre primoinfekciu v adolescentnom veku, keď sú mladí dospelí infikovaní EBV prostredníctvom bozkávania (kissing disease). Inkubačný

čas trvá obyčajne 6-8 týždňov. Hlavnými cieľovými bunkami EBV sú B-lymfocyty, ktoré sú napádané po tom, čo sa vírus namnoží v epiteliálnych bunkách orofaryngu. Infikované B-lymfocyty aktivujú imunitnú odpoveď, sprostredkovanú predovšetkým cytotoxickými T-lymfocytmi a NK bunkami, ktoré sú schopné zlikvidovať väčšinu infikovaných buniek. Napriek tomu malá časť napadnutých B-lymfocytov preživa a stáva sa rezervoárom doživotnej perzistencie vírusu v organizme. Ťažkosti spojené s reaktiváciou EBV alebo s chronickou perzistentnou infekciou sú častejšie prítomné u pacientov s oslabenou imunitnou odpoveďou. EBV infekcia sa často dáva do súvislostí s niektorými druhmi lymfómov a neoplázií (Burkittov lymfóm endemický, Hodgkinov lymfóm asociovaný s AIDS, non-Hodgkinov lymfóm mozgu asociovaný s AIDS, periférny T-bunkový lymfóm, extranodálny NK-/T-lymfóm, niektoré typy karcinómu nosohltana, zažívacieho traktu a zriedka i karcinómu prsníka).

### Posttransplantačné lymfoproliferatívne ochorenie (PTLD)

Posttransplantačné lymfoproliferatívne ochorenie (PTLD) je heterogénna skupina ochorení. Príčinou vzniku PTLD je potlačenie imunitného systému a súčasne chronická antigénna stimulácia zo strany transplantátu. Svetová zdravotnícka organizácia na základe morfológických, imunofenotypických, genetických a klinických vlastností definuje 4 hlavné kategórie PTLD: 1. včasné (skoré) lézie, 2. polymorfná PTLD, 3. monomorfná PTLD a 4. klasický Hodgkinov lymfóm – typu PTLD. Približne 80 % PTLD vzniknutých po transplantácii krvotvorných buniek (TKB) alebo solídnych orgánov (SOT) má spojitosť s EBV. Pred rokom 2000 bola mortalita na PTLD približne 85 %<sup>(2)</sup>. V súčasnosti umiera približne jedna tretina z diagnostikovaných PTLD pacientov<sup>(3)</sup>. Infikované B-lymfocyty nekontrolovateľne proliferujú a imunosuprimované T-lymfocyty nie sú schopné zvládnuť infekciu. Ide o reaktiváciu vírusu po transplantácii alebo o primárnu infekciu získanú od darcu. Približne 20 % PTLD je EBV-negatívnych, ich etiológia nie je celkom objasnená. EBV-pozitívne PTLD vznikajú skôr, väčšinou 6 – 10 mesiacov po transplantácii, zatiaľ čo EBV-negatívne PTLD neskôr, 4-5 rokov po transplantácii<sup>(4)</sup>. Priemerný výskyt PTLD po alogénnej transplantácii krvotvorných buniek sa pohybuje okolo 3 %. U detských pacientov je vo všeobecnosti incidencia PTLD vyššia ako u dospelých, pravdepodobne z dôvodu vyššej incidence negatívneho EBV sérostatusu<sup>(5)</sup>. U príjemcov po prijatí štepu sa pohybuje od 1,2 % v prípade zhodného príbuzenského darcu, do 2,8 % od nezhodného príbuzenského darcu a od 4,0 % v prípade zhodného nepríbuzenského darcu, do 11,2 % v prípade nezhodného nepríbuzenského darcu<sup>(3)</sup>. Frekvencia PTLD u príjemcov solídnych orgánov závisí od typu transplantovaného orgánu. Najnižšie riziko je pri transplantácii obličky (1-2 %), stredné riziko (2-3 %) sa uvádza pri transplantácii pečene a srdca a najvyššie riziko vzniku PTLD majú príjemcovia srdce – pľúca (7 – 9 %) alebo pečeň – črevo (7 – 11 %)<sup>(6)</sup>. Väčšina PTLD u príjemcov orgánového transplantátu má pôvod v B-lymfocytoch príjemcu, zatiaľ čo u príjemcov kmeňových krvotvorných buniek má PTLD pôvod väčšinou v darcovských B-lymfocytoch<sup>(7)</sup>. Frekvenciu a závažnosť PTLD ovplyvňujú rôzne rizikové faktory, medzi ktoré patria: detský alebo vyšší vek pacienta (deti do 5. roka života, pacienti nad 50 rokov), EBV

sérostatus príjemcu a darcu, primárne imunodeficity (hlavne X viazané lymfoproliferatívne ochorenie, Wiskottov-Aldrichov syndróm, familiárna hemofagocytová lymfohistiocytóza), in vivo alebo in vitro T-bunková deplécia, redukovaný prípravny režim s použitím anti-tymocytového globulínu (ATG) alebo použitím alemtuzumabu (anti-CD52), nepríbuzná/nezhodná transplantácia, pupočníková transplantácia, choroba štepu proti hostiteľovi GVHD (graft versus host disease), CMV infekcia.

### Diagnostika

Včasná diagnóza EBV-PTLD je kľúčom adekvátneho terapeutického zásahu a má dominantné postavenie vo výbere liečebného postupu, pretože EBV-PTLD máva rýchly a progresívny priebeh. V diagnostike EBV-PTLD okrem klinických príznakov, ktoré môžu byť často nešpecifické (horúčka, lymfadenopatia, hepatosplenomegália, respiračné zlyhávanie, CNS symptomatológia, multiorgánové zlyhávanie) a orgánového postihnutia, má dôležité postavenie sledovanie hladiny EBV DNA metódou PCR. Táto metóda má vysokú senzitivitu, ale samotný vzostup hladiny EBV DNA nemusí byť vždy špecifický pre rozvoj EBV-PTLD. Pri interpretácii a hodnotení výsledku EBV DNA nálož je potrebné zohľadniť aj vyšetrovaný materiál, v ktorom bola nálož EBV DNA stanovená – vyšetrovanie z plnej krvi, z plazmy, zo séra alebo z mononukleárných buniek v periférnej krvi pacienta. Incidencia EBV DNA-émie sa pohybuje medzi 0,1 – 63 % a závisí od typu transplantátu, senzitivity metódy, definovanej hladiny DNA-émie a načasovaniu monitorovania EBV DNA.

Podľa odporúčaní z ECIL-6 (European Conference on Infection in Leukemia-6) je potrebné týždenné monitorovanie hladiny EBV DNA minimálne 4 mesiace po transplantácii<sup>(8)</sup>. Cut-off hladiny EBV DNA pre riziko vzniku PTLD nie sú definované. V literatúre sa uvádzajú nasledujúce hodnoty na podanie preemptívnej terapie: viac ako 50 000 EBV kópií/ml séra<sup>(9)</sup>, viac ako 10 000 kópií/μg PBMC<sup>(10)</sup>, 1 000 kópií/ml<sup>(11)</sup> alebo viac ako 300 kópií/10<sup>5</sup> PMNC<sup>(12)</sup>.

Samotná prítomnosť EBV DNA v krvi pacienta nemusí znamenať EBV asociované PTLD ochorenie. Na definitívne potvrdenie je nevyhnutný histologický dôkaz z patologického ložiska postihnutého orgánu. Odporúčanou metódou, ktorá má veľkú senzitivitu a špecifickosť je detekcia RNA kódovanej EBV pomocou *in situ* hybridizácie (EBER-ISH) so značenými fluorescenčnými sondami. Metóda imunohistochemického dôkazu vírusových proteínov má dobrú špecifickosť, ale nižšiu senzitivitu, vírusové proteíny sú variabilne exprimované v PTLD biopsiách. Detekcia EBV DNA metódou PCR v patologických ložiskách má vysokú senzitivitu, ale nízku prediktívnu hodnotu<sup>(13)</sup>.

### Terapia

Včasná a adekvátna liečba EBV-PTLD u imunodeficientných pacientov vychádza z aktuálnych výsledkov sledovanej nálož EBV DNA metódou kvantitatívnej PCR v korelácii s rizikovými faktormi a klinickými príznakmi. U rizikových pacientov sa odporúča profylaktická antivírusová liečba (acyklovir, gancyklovir) s pravidelným podávaním sérových imunoglobulínov, ktorá však pri rozvinutom PTLD už nemá terapeutický význam. Preemptívna liečba, ako aj samotná liečba EBV-PTLD, zahŕňa imunoterapeutickú intervenciu, pri

ktorej v prvom kroku sa odporúča redukcia imunosupresie v prípade, ak pacient nemá závažnú GVHD. Zníženie alebo vysadenie imunosupresie vedie k urýchlenej regenerácii imunitného systému. Ak sa znížením imunosupresie u pacienta navodí aspoň parciálna úprava imunitného systému, môže byť úspešná aj eradikácia EBV infikovaných B-lymfocytov. Následne v druhom kroku v závislosti od klinického štádia sa začína podávanie anti-CD20 monoklonálnej protilátky (rituximab) v monoterapii, prípadne v kombinácii s chemoterapiou, v dávke 375 mg/m<sup>2</sup>, raz do týždňa do negativity EBV DNA. Zvyčajne sú potrebné 1 – 4 dávky rituximabu. Terapeutická odpoveď samotného rituximabu sa udáva 90 % pri pre-emptívnej liečbe, 65 % pri samotnej liečbe PTLD a v kombinácii s redukciami imunosupresie dosahuje vyše 80 %. Rituximab by sa mal použiť v pre-emptívnej terapii PTLD len vtedy, ak sa predpokladá rýchly a agresívny priebeh PTLD, pretože podávanie rituximabu u pacientov ešte viac prehĺbi imunodeficienciu. Antivirotiká, ktoré sa používajú pri liečbe iných herpetických vírusov (napr. acyklovir, gancyklovir) majú na EBV obmedzený účinok, keďže pôsobia len pri replikácii DNA vírusu. Proliferujúce bunky v PTLD lézii sú predominantne latentne infikované, preto je liečba PTLD neefektívna. Pre rizikových pacientov sa antivirotiká používajú v profylaxii. V terapii sa využíva aj infúzia donorských lymfocytov (DLI), ktorá u séropozitívnych darcov obsahuje aj EBV-špecifické T-bunky. Veľkou nevýhodou DLI je zvýšené riziko vzniku ťažkej až fatálnej GVHD. Terapia pomocou podávania EBV-špecifických T-buniek je vysokoefektívna, viac ako v 90 % v prípade pre-emptívnej liečby a približne v 75 % pri liečbe PTLD. Na rozdiel od DLI nemá závažnejšie komplikácie. Jej nevýhodou je sťažená dostupnosť v mnohých transplantáčnych centrách. Rádioterapia sa používa výnimočne, využitie má len pri kontrolovanej lokálnej lézii PTLD. Jednoznačnou indikáciou na začatie chemoterapie je progresia PTLD u pacientov, ktorí neodpovedali na imunoterapeutickú intervenciu a liečbu rituximabom. Chemoterapia musí byť dôkladne zvážená pre jej toxicitu, zvýšené riziko infekčných komplikácií a riziko potlačenia alogénneho štepu. Z novších terapeutických postupov sa skúša podávanie monoklonálnych protilátok anti-CD19, anti-CD21, anti-CD24, anti-CD30.

## Materiál a metódy

### Metóda

Vzorky boli vyšetřované v týždenných intervaloch počas prvých asi 100 dní po transplantácii, neskôr s nižšou frekvenciou a v závislosti od klinického stavu pacienta. Monitorovanie EBV infekcie sa uskutočnilo zo vzorky plnej krvi (komerčná odberová skúmavka s EDTA). DNA bola izolovaná z 200 µl krvi s použitím komerčnej izolačnej súpravy MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (ROCHE, Nemecko) a s využitím prístroja MagNA Pure LC 2.0 (ROCHE, Nemecko). Následne sa uskutočnila amplifikácia, detekcia a kvantifikácia EBV DNA pomocou real-time PCR s použitím diagnostickej súpravy Epstein-Barr Virus (EBV) PCR Kit (GeneProof, Česká republika) na analyzátoře Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research, Austrália). Detekcia EBV je založená na princípe amplifikácie špecifickej sekvencie DNA génu kódujúceho nukleárny antigén 1 (EBNA 1) a merania nárastu koncentrácie amplifikačného produktu v priebehu PCR pomocou fluores-

cenčne značených sond. Hladina EBV DNA bola vyjadrená v kópiách/ml krvi. Pacienti boli rozdelení na základe hodnoty EBV DNA do nasledujúcich rizikových skupín: nízke riziko s negatívnym nálezom EBV DNA a hladinou EBV DNA nižšou ako 10 000 kópií/ml, stredné riziko s hladinou 10 000 – 100 000 kópií/ml a vysoké riziko pre hladinu EBV DNA vyššiu ako 100 000 kópií/ml. Okrem stanovenia EBV DNA boli pacienti monitorovaní pre CMV infekciu.

### Štatistická analýza

Boli porovnávané výsledky stanovenia EBV DNA s výskytom rizikových faktorov u pacientov. Údaje boli analyzované pomocou štatistického softvéru OpenEpi, verzia 3.01 ([http://www.openepi.com/Menu/OE\\_Menu.htm](http://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm)) a chí-kvadrát test bol použitý na vyhodnotenie štatistických rozdielov. P hodnota menšia ako 0,05 bola považovaná za indikátor štatistickej významnosti.

### Súbor pacientov

V období od roku 2013 až po október 2017 bolo u 93 det-ských pacientov (59 chlapcov a 34 dievčat) uskutočnená transplantácia krvotvorných buniek na Transplantačnej jednotke kostnej drene na Klinike detskej hematológie a onkológie LF a UK v Bratislave. Priemerný vek pacientov v čase transplantácie bol 8 rokov (v rozsahu od 0 až 20 rokov) s mediánom 7 rokov. Z celkového počtu 93 pacientov (100 transplantácií) bola u 22 (22 %) pacientov uskutočnená autológna transplantácia u 71 (78 %) pacientov alogénna transplantácia. Sedem pacientov podstúpilo alogénnu transplantáciu krvotvorných buniek dvakrát (3 chlapci a 4 dievčatá). EBV sérostatus pacientov po autológnej transplantácii bol nasledujúci: 8 EBV séronegatívny, 12 séropozitívny, u 2 nebol údaj dostupný. EBV sérostatus príjemca/darca (R/D = recipient/donor) v čase alogénnej transplantácie bol u 71 pacientov nasledujúci: R+/D+ u 42 (59 %) pacientov, R+/D– u 5 (7 %) pacientov, R–/D– u 3 (4 %) pacientov, R–/D+ u 6 (9 %) pacientov. EBV sérostatus darcu nebol dostupný v 15 (21 %) prípadoch, z nich 13 (18 %) R+/D? a 2 (3 %) R–/D. Najčastejšími diagnózami pacientov po alogénnej transplantácii boli lymfatická leukémia 26 (37 %) a myeloická leukémia 14 (20 %). Prehľad diagnóz udáva **tabuľka 1**.

U pacientov po alogénnej transplantácii bol v 17 (24 %) prípadoch zhodný v HLA príbuzenský darca (darca – súrodenec, len v jednom prípade matka) a v 54 (76 %) prípadoch zhodný v HLA nepríbuzenský darca. Zdrojom krvotvorných buniek bola v 45 (63 %) prípadoch kostná dreň, 26 (37 %) periférne bunky. Prípravný režim s redukovanou intenzitou (RIC = reduced-intensity conditioning) malo 19 (27 %) pacientov a myeloablatívny prípravný režim (MAC = myeloablative

**Tabuľka 1.** Zastúpenie diagnóz u 71 pacientov po alogénnej TKB

č. dg.	názov diagnózy	počet
C91	Lymfatická leukémia	26
C92	Myeloická leukémia	14
D61	Iné aplastické anémie	8
D81	Kombinovaná imunitná nedostatočnosť	7
D46	Myelodysplastické syndrómy	6
C93	Monocytočná leukémia	2
	Ostatné	8



conditioning) malo 51 (73 %) pacientov. U pacientov, ktorí podstúpili dve transplantácie, 6 z nich malo myeloablatívny prípravny režim a 1 pacient redukovaný prípravny režim.

## Výsledky

Počas obdobia roku 2013 až po október 2017 bola realizovaná transplantácia krvotvorných buniek u 93 pacientov, z toho 22 (24 %) podstúpilo autológnu a 71 (76 %) alogénnu transplantáciu. V skupine pacientov po autológnej transplantácii bolo vyšetrených 116 vzoriek, s priemerom 5 vyšetrení na pacienta. U žiadneho pacienta z tejto skupiny nenastala EBV primoinfekcia ani EBV reaktivácia v sledovanom období. V skupine pacientov po alogénnej transplantácii bolo uskutočnených 1 710 vyšetrení, s priemerom 24 vyšetrení na pacienta. U 34 (48 %) pacientov nenastala EBV primoinfekcia ani EBV reaktivácia. EBV DNA pozitívita bola zaznamenaná u 37 (52 %) pacientov. U 16 (23 %) pacientov bola hladina EBV DNA menej ako 10 000 kópií/ml s mediánom 1 800 kópií/ml (rozsah: 360 – 8 100 kópií/ml). Hladinu EBV DNA v rozmedzí 10 000 až 100 000 kópií/ml malo 11 (15 %) pacientov s mediánom 23 400 kópií/ml (rozsah: 12 000 – 85 000 kópií/ml). V prípade 10 (14 %) pacientov dosiahla hladina EBV DNA hodnotu vyššiu ako 100 000 kópií/ml s mediánom 292 000 kópií/ml (rozsah: 107 000 – 6 000 000 kópií/ml) (**graf 1**).

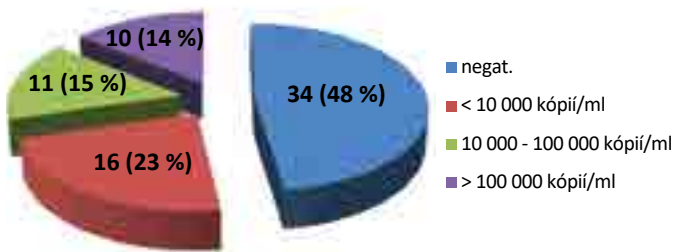
Reaktivácia EBV nastala v rozmedzí 14 až 355 dní po transplantácii s mediánom 41 dní po transplantácii. U pacientov,

u ktorých hladina EBV DNA nepresiahla 10 000 kópií/ml, bol medián času reaktivácie 57 dní (rozsah: D+21 až D+355), u pacientov s hladinou EBV 10 000 až 100 000 kópií/ml bol medián 34 dní (rozsah: D+18 až D+254) a u pacientov s hladinou viac ako 100 000 kópií/ml bol medián 31 dní (rozsah: D+14 až D+110) (**graf 2**).

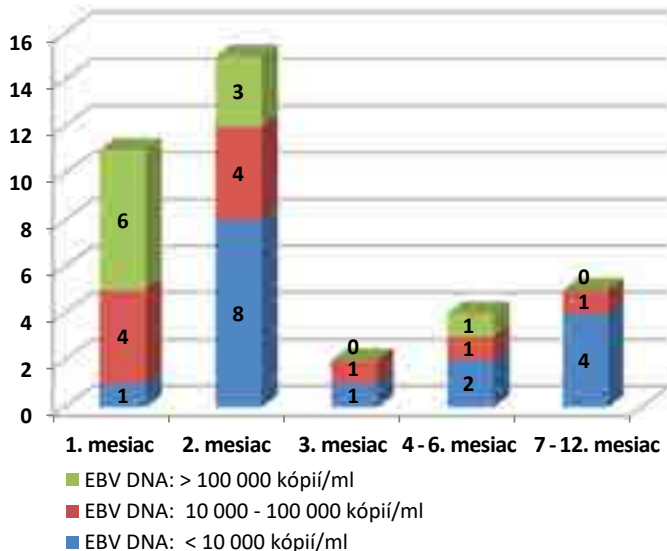
Dĺžka trvania EBV virémie sa pohybovala v rozmedzí 1 až 210 dní s mediánom trvania 25 dní. U pacientov, u ktorých hladina EBV DNA nepresiahla 10 000 kópií/ml, bol medián dĺžky trvania virémie 11 dní (rozsah: 1 až 210 dní), u pacientov s hladinou EBV 10 000 až 100 000 kópií/ml bol medián 55 dní (rozsah: 14 až 189 dní) a u pacientov s hladinou viac ako 100 000 kópií/ml bol medián 28 dní (rozsah: 17 až 57 dní) (**graf 3**).

Pre hodnotenie súvislosti charakteristík pacienta a rizikových faktorov s rizikom reaktivácie EBV DNA boli pacienti rozdelení do skupiny s hladinou EBV DNA menej ako 10 000 kópií/ml, resp. viac ako 10 000 kópií/ml. Zvýšené riziko reaktivácie EBV sa nepotvrdilo v súvislosti s pohlavím ( $P = 0,249$ ), s diagnózou ( $P = 0,801$ ), s pôvodom štepu ( $P = 0,480$ ), s EBV sérostatusom príjemca/darca ( $P = 0,215$ ) a s typom prípravného režimu ( $P = 0,1486$ ). Naopak chí-kvadrát test ukázal významnú asociáciu medzi hladinou EBV DNA viac ako 10 000 kópií/ml a typom darcu ( $P = 0,014$ ) a výskytom CMV reaktivácie ( $P = 0,005$ ).

**Graf 1.** Kvantitatívne stanovenie EBV DNA u pacientov po alogénnej TKB



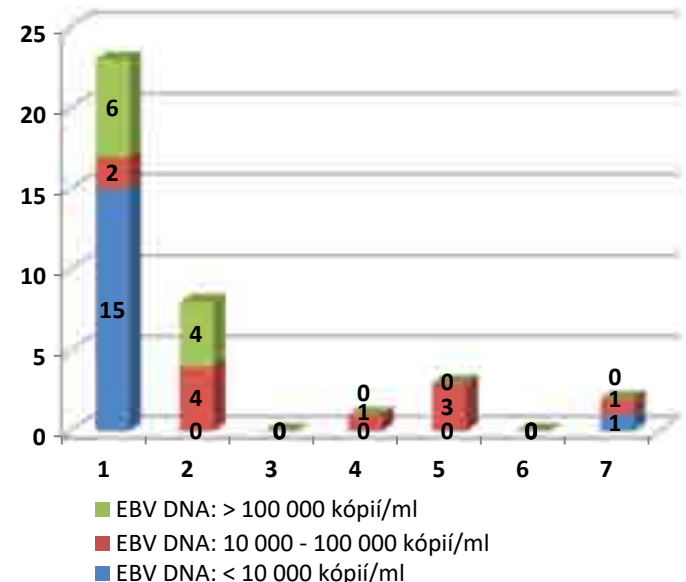
**Graf 2.** Nástup EBV reaktivácie po TKB



## Diskusia

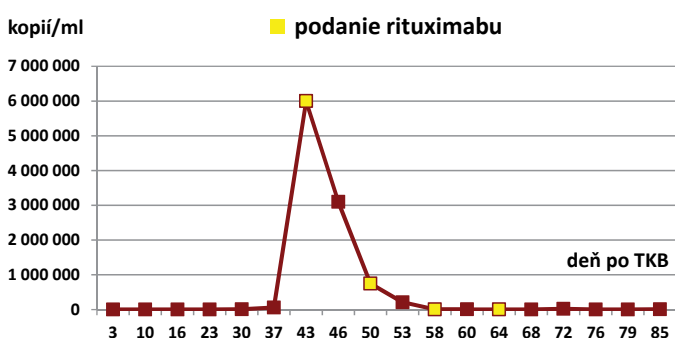
EBV-PTLD je vzácna, ale často fatálna komplikácia po alogénnej transplantácii krvotvorných buniek. Rýchla diagnostika je nutná pre začatie terapie s cieľom zabrániť vzniku samotného ochorenia. Súčasné liečebné stratégie, ako podávanie anti-CD20 monoklonálnej protilátky (rituximab) a EBV-špecifických cytotoxických T-lymfocytov, významne znižujú riziko smrti po rozvoji EBV PTLD ochorenia. V období od roku 2013 do októbra 2017 na Transplantačnej jednotke kostnej drene na Klinike detskej hematológie a onkológie LF a UK v Bratislave bolo transplantovaných 93 detských pacientov. Autológna transplantácia sa uskutočnila

**Graf 3.** Dĺžka EBV virémie po TKB v mesiacoch



u 22 pacientov a alogénna transplantácia u 71 pacientov. Monitoring EBV infekcie bol realizovaný u všetkých pacientov pomocou kvantitatívnej real-time PCR. Ako materiál na vyšetrenie bola použitá nezrazená krv s EDTA. U 34 (48 %) pacientov po autológnej transplantácii nenastala EBV primoinfekcia ani EBV reaktivácia. Ako uvádzajú aj iné štúdie<sup>(14,15)</sup> incidencia EBV DNA v krvi je po alogénnej transplantácii vysoká, v sledovanom súbore bola 52 %. Podľa odporúčaní z ECIL-6 (European Conference on Infection in Leukemia-6) je potrebné týždenné monitorovanie hladiny EBV DNA minimálne 4 mesiace po transplantácii<sup>(8)</sup>. V sledovanom súbore k reaktivácii EBV dochádzalo najčastejšie v prvých dvoch mesiacoch (70 %) po transplantácii. Medián času pre rozvoj EBV PTLD po TKB sa udáva 2 až 4 mesiace. Rozvoj PTLD neskôr ako po 12 mesiacoch po TKB sa opisuje len v 4 % prípadov. Prípady PTLD vyskytujúce sa viac ako po 5 rokoch od TKB sú extrémne vzácné<sup>(8)</sup>. V našom súbore sa vyskytli 2 prípady pacientov s EBV PTLD ochorením, u oboch so začiatkom v druhom mesiaci po TKB. V literatúre sa uvádzajú rôzne hladiny EBV DNA pre podanie preemptívnej terapie od 1 000 kópií/ml až 50 000 kópií/ml<sup>(9,10,11,12)</sup>. Vzhľadom na to boli pacienti v sledovanom súbore rozdelení do 3 rizikových skupín. Hladina EBV DNA nižšia ako 10 000 kópií/ml predstavovala nízke riziko rozvoja PTLD, hladina 10 000 až 100 000 kópií/ml stredné riziko a hladina vyššia ako 100 000 kópií/ml vysoké riziko. U všetkých 16 pacientov, u ktorých hladina EBV DNA nepresiahla 10 000 kópií/ml, samovoľne poklesla do negativity. Pacienti nemali žiadne klinické príznaky EBV infekcie a nebola im podávaná terapia. V skupine 11 pacientov s hladinou EBV DNA medzi 10 000 – 100 000 kópií/ml, 10 pacienti nevykazovali žiadne symptómy EBV infekcie a nebola im podaná terapia. Hladina EBV DNA u nich postupne klesla do negativity. Len v jednom prípade bola pacientovi podaná preemptívne terapia pri hladine 62 000 kópií/ml EBV DNA v 3 dávkach rituximabu (D+56, D+63, D+71). Na 75. deň od transplantácie nastala negativita EBV DNA. U 10 pacientov s hladinou vyššou ako 100 000 kópií/ml sa prejavovali známky EBV infekcie, dvom z nich nebola podaná terapia rituximabom, 6 pacientom bola preemptívne podaná terapia. Dvaja pacienti, u ktorých bolo histologicky potvrdené EBV-PTLD ochorenie, podstúpili cieľenú terapiu. Prvým z nich bol štvorročný chlapec po alogénnej nepríbuzenskej transplantácii kostnej drene s lymfatickou leukémiou, s EBV sérostatusom R+/D?, so zhodou v HLA systéme 9/10, s MAC režimom. Posttransplantačnou komplikáciou bola akútna GVHD

**Graf 4.** Monitoring EBV DNA u štvorročného pacienta s EBV-PTLD

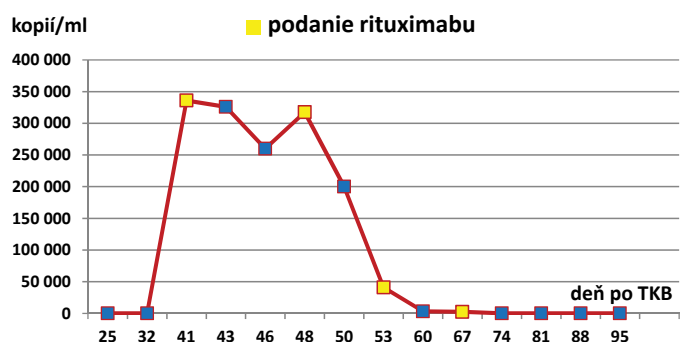


(D+26). Pozitívny nález EBV DNA bol prvýkrát zaznamenaný na 30 deň po TKB. Od D+41 nastalo zväčšenie lymfatických uzlín, febrility a hepatosplenomegália. V D+43 bola zaznamenaná maximálna hladina EBV DNA (6 000 000 kópií/ml), čo viedlo k podozreniu na lymfoproliferatívne ochorenie asociované s EBV. Bola podaná prvá dávka rituximabu. Na D+45 sa vykonala exstirpácia lymfatickej uzliny a histologický nález potvrdil difúzny veľkobunkový B-lymfóm. Na D+50 pri hladine EBV DNA 745 000 kópií/ml bola podaná už cieľene druhá dávka rituximabu, na D+58 tretia a na D+64 štvrtá dávka rituximabu, následkom čoho poklesla hladina EBV DNA až do negativity. Na D+90 nastali ďalšie komplikácie ako respiračná insuficiencia, trombocytopenia, hepatosplenomegália a pacient bol so zhoršeným klinickým stavom preložený na ARO. Na D+95 pacient v dôsledku multiorgánového zlyhania exitoval. Na **grafe 4** je znázornená hladina EBV DNA v závislosti odo dňa po TKB.

Druhým pacientom bol osemnásťročný chlapec po alogénnej nepríbuzenskej transplantácii periférnych buniek s myelickou leukémiou, s EBV sérostatusom R-/D+, v zhode v HLA systéme 10/10, s MAC režimom. Posttransplantačnou komplikáciou bola CMV a EBV reaktivácia. 32 dní po TKB bol pacient EBV DNA negatívny. Od D+41 nastalo zväčšenie lymfatických uzlín a febrility. V D+41 bola prvýkrát zaznamenaná prítomnosť EBV DNA v krvi a zároveň bola aj maximálna (336 000 kópií/ml). Bola podaná prvá dávka rituximabu. Na D+47 bolo histologicky potvrdené EBV PTLD. Na D+48 pri hladine EBV DNA 317 500 kópií/ml bola podaná cieľene druhá dávka rituximabu, na D+55 tretia a na D+63 štvrtá dávka. Hladina EBV DNA poklesla v D+74 až do negativity. Na **grafe 5** je znázornená hladina EBV DNA v závislosti odo dňa po TKB.

Pravdepodobnosť reaktivácie EBV a prípadne rozvoja PTLD môžu zvyšovať niektoré charakteristiky pacienta a rizikové faktory, medzi ktoré patria: detský alebo vyšší vek pacienta, EBV sérostatus príjemcu a darcu, primárne imunodeficity, in vivo alebo in vitro T-bunková deplécia, redukovaný prípravny režim s použitím anti-tymocytového globulínu (ATG) alebo použitím alemtuzumabu (anti-CD52), nepríbuzná/neshodná transplantácia, pupočníková transplantácia, ochorenie GVHD, CMV infekcia. U príjemcov štepu po nepríbuzenskej transplantácii je incidencia EBV-PTLD 2,6 – 3,3 % pre myeloablatívny prípravny režim (MAC) a 7 – 12,9 % pre prípravny režim s redukovanou intenzitou (RIC). Oboja pacienti, u ktorých sa rozvinulo EBV-PTLD, podstúpili myeloablatívny prípravny režim. V zhode s predchádzajúcou štúdiou<sup>(16)</sup> sme

**Graf 5.** Monitoring EBV DNA u osemnásťročného pacienta s EBV-PTLD



potvrdili, že zvýšené riziko reaktívácie EBV DNA je aj u príjemcov po TKB od nepríbuzenského darcu. Zvýšenú hladinu EBV DNA nad 10 000 kópií/ml malo 20 (37 %) z 54 pacientov po nepríbuzenskej transplantácii a len 1 (6 %) pacient zo 17 po príbuzenskej transplantácii krvotvorných buniek, čo môže súvisieť s použitím anti-tymocytového globulínu (ATG), ktorý je asociovaný s rizikom vzniku EBV infekcie aj s rizikom rozvoja PTLD<sup>(2,17,18)</sup>. Preukázala sa významná asociácia medzi hladinou EBV DNA vyššou ako 10 000 kópií/ml a výskytom CMV reaktívácie. V skupine pacientov, v ktorej nastala CMV reaktívacia, bola EBV DNA viac ako 10 000 kópií/ml dokázaná v 10 z 18 (56 %) prípadov, zatiaľ čo v skupine pacientov bez CMV reaktívácie sa zvýšená hladina EBV DNA objavila v 11 (21 %) z 53 prípadov. Zvýšené riziko reaktívácie EBV sa nepotvrdilo v súvislosti s pohlavím, diagnózou, pôvodom štepu, s EBV sérostatusom príjemca/darca a s typom prípravného režimu pred transplantáciou.

### LITERATÚRA

1. Odumade OA, Hogquist KA, Balfour HH Jr. Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections. *Clin Microbiol Rev* 2011; 24(1):193-209.
2. Curtis RE, Travis LB, Rowlings PA, et al. Risk of lymphoproliferative disorders after bone marrow transplantation: a multi-institutional study. *Blood* 1999; 94: 2208-2216.
3. Styczynski J, Gil L, Tridello G, et al. Response to rituximab-based therapy and risk factor analysis in Epstein Barr Virus-related lymphoproliferative disorder after hematopoietic stem cell transplant in children and adults: a study from the Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Clin Infect Dis* 2013; 57(6): 794-802.
4. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al. Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon : IARC Press 2001; 264-269.
5. Green M, Michaels MG. Epstein-Barr virus infection and posttransplant lymphoproliferative disorder. *Am J Transplant* 2013; 13(Suppl 3): 41-54.
6. Allen UD, Preiksaitis JK; AST Infectious Diseases Community of Practice. Epstein-Barr virus and posttransplant lymphoproliferative disorder in solid organ transplantation. *Am J Transplant* 2013;13(Suppl 4): 107-120.
7. Spiro IJ, Yandell DW, Li C, et al. Brief report: lymphoma of donor origin occurring in the porta hepatis of a transplanted liver. *N Engl J Med* 1993; 329: 27-29.
8. Styczynski J, van der Velden W, Fox CHP, et al. Management of Epstein-Barr Virus infections and post-transplant lymphoproliferative disorders in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Sixth European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-6) guidelines. *Haematologica* 2016; 101(7): 803-811.
9. Aalto SM, Juvonen E, Tarkkanen J, et al. Epstein-Barr viral load and disease prediction in a large cohort of allogeneic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis*, 2007; 45: 1305-1309.
10. Hoshino Y, Kimura H, Tanaka N, et al. Prospective monitoring of the Epstein-Barr virus DNA by a real-time quantitative polymerase chain reaction after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2001; 115: 105-111.

### Záver

PTLD ochorenie asociované s EBV sa vyskytuje u pacientov po alogénnej transplantácii krvotvorných buniek a po orgánovej transplantácii. Je to pomerne zriedkavá posttransplantačná komplikácia, avšak vyznačuje sa vysokou mortalitou. Rýchlosť stanovenia správnej diagnózy môže byť rozhodujúca pri výbere adekvátnej liečby. Monitoring hladiny EBV DNA metódou kvantitatívnej PCR v pravidelných intervaloch minimálne počas 4 mesiacov po alogénnej transplantácii je nevyhnutnou súčasťou starostlivosti o transplantovaných pacientov. Včasné zachytenie nárastu hladiny EBV DNA a preemptívne podanie anti-CD20 monoklonálnej protilátky (rituximab) môže zabrániť vzniku a progresii PTLD, a tak odvrátiť prípadné fatálne následky.

11. Sica S, Metafuni E, Bellesi S, Chiusolo P. Epstein-barr virus related lymphoproliferations after stem cell transplantation. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2009; 1(2): e2009019. doi: 10.4084/MJHID.2009.019.
12. Cesaro S, Murrone A, Mengoli C, et al. The realtime polymerase chain reaction-guided modulation of immunosuppression enables the preemptive management of Epstein-Barr virus reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2005; 128: 224-233.
13. van der Velden WJ, Mori T, Stevens WB, et al. Reduced PTLD-related mortality in patients experiencing EBV infection following allo-SCT after the introduction of a protocol incorporating pre-emptive rituximab. *Bone Marrow Transplant* 2013; 48(11): 1465-1471.
14. Carpenter B, Haque T, Dimopoulou M, et al. Incidence and dynamics of Epstein-Barr virus reactivation after alemtuzumab-based conditioning for allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. *Transplantation* 2010; 90(5): 564-570.
15. Dominiotto A, Tedone E, Soracco M, et al. In vivo B-cell depletion with rituximab for alternative donor hemopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2012; 47(1): 101-106.
16. Chierighin A, Prete A, Belotti T, et al. Prospective Epstein-Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disorder prevention program in pediatric allogeneic hematopoietic stem cell transplant: virological monitoring and first-line treatment. *Transpl Infect Dis* 2016; 18(1): 44-54.
17. Sundin M, Le Blanc K, Ringdén O, et al. The role of HLA mismatch, splenectomy and recipient Epstein-Barr virus seronegativity as risk factors in post-transplant lymphoproliferative disorder following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2006; 91(8): 1059-1067.
18. Wachowiak J, Grund G. Infectious complications in children conditioned for allogeneic haematopoietic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning or with treosulfan-based reduced toxicity preparative regimen. *Rep Pract Oncol Radiother* 2007; 12(3): 175-179.



**Mgr. Ing. Kováčová Katarína**  
Medirex, a. s.  
Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava  
e-mail: katarina.kovacova@medirex.sk



## Prínos IČ spektroskopie do analýzy močových konkrementov v Medirexe, a. s.

Katarína Schenková, Iveta Gáboríková

Medirex, a. s., Bratislava

Infračervená (IČ) spektroskopia umožňuje relatívne presnú a spoľahlivú analýzu chemického zloženia močového konkrementu, čo je nevyhnutný predpoklad pre správnu konzervatívnu liečbu a prevenciu recidív. V roku 2016 sme touto metódou analyzovali v Medirexe, a. s., 812 konkrementov. V našom súbore sme zaznamenali výraznú prevahu mužov oproti ženám (2,3 : 1). Urolitiáza postihuje hlavne vekovú kategóriu 30- až 69-ročných, s vrcholom vo veku 60 – 69 rokov. Najčastejšími nálezmi v našom súbore bol whewellit v 28 % prípadov, dvojjložkový whewellit – weddellit v 23 %, trojjložkový whewellit – weddellit – apatit v 14 % a jednozložkový uricit v 13 %. Iné typy močových konkrementov sa vyskytli výrazne zriedkavejšie. Zavedenie metodiky IČ spektroskopie výrazne spresnilo analýzu močových konkrementov.

**Kľúčové slová:** urolitiáza, močový konkrement, IČ spektroskopia

### *The benefit of IR spectroscopy for urine stone analysis in Medirex, a. s.*

Infrared spectroscopy allows relatively accurate and reliable analysis of the chemical composition of urinary stones, which is crucial for correct conservative treatment and prevention of recurrence of urinary stones. In 2016 we analyzed 812 stones in Medirex, a. s. There was a strong man dominance over women in our group of patients (2.3:1). Urolithiasis mainly affects the age group 30 – 69-years, with a peak of 60 – 69 years. The most frequent findings in our group of patients were whewellite in 28% of cases, whewellite – weddellite in 23%, whewellite – weddellite – calcium phosphate in 14% and uric acid in 13%. Other types of urinary stones occurred significantly more rarely. The establishment of the IR spectroscopy method significantly improved the analysis of urinary stones.

**Keywords:** urolithiasis, urinary stone, IR spectroscopy

newslab, 2018; roč. 9 (1): 27 – 30

### Úvod

Urolitiáza je časté ochorenie vyskytujúce sa v priemyselne vyspelých krajinách, a to vo všetkých vekových kategóriách, pričom relatívne vysoké percento pacientov má sklon k recidívam. Tvorba močového kameňa je výsledkom viacstupňového procesu, v ktorom je rovnováha medzi faktormi umožňujúcimi kryštalizáciu solí moču a faktormi, ktoré ju inhibujú, narušená.

Urolitiáza vzniká ako následok metabolickej poruchy, infekcie močových ciest alebo ako následok morfológických a funkčných zmien uropoetického systému. Konzervatívna liečba rovnako ako prevencia recidív spočíva v úprave metabolických porúch, ktoré mohli vznik močového konkrementu spôsobiť alebo podporiť. Preto sa veľký dôraz v terapii a prevencii recidív urolitiázy kladie na presné určenie chemického zloženia močového konkrementu<sup>(1)</sup>.

Mokrú cestu analýzy, ktorá je založená na chemickom dôkaze jednotlivých funkčných skupín a iónov prítomných v močovom kameni, poskytuje veľa falošne pozitívnych aj falošne negatívnych výsledkov. Vykazuje vysokú nespoľahlivosť, preto ju Európska asociácia pre urológiu (EAU) neakceptuje ako metódu na identifikáciu chemického zloženia močového konkrementu<sup>(2)</sup>.

Infračervená (FT-IR) spektroskopia je metóda odporúčaná touto asociáciou ako fyzikálna metóda na identifikáciu jednotlivých zložiek močových konkrementov. Právom sa pokladá za zlatý štandard medzi dostupnými metódami v laboratórnych podmienkach pre svoju presnosť, spoľahlivosť a rýchlosť vyhotovenia<sup>(2,3)</sup>. Ide o nedeštruktívnu analytickú metódu, pri ktorej vzorka nie je analýzou poškodená, ale poskytuje informácie o svojom zložení.

Podstatou IČ spektroskopie je interakcia infračerveného žiarenia so študovanou hmotou. V prípade pohltienia fotónu hovoríme o absorpčnej infračervenej spektroskopii. Energia fotónov infračerveného žiarenia (1 – 60 kJ/mol) nepostačuje na excitáciu elektrónov v molekulových orbitaloch, ale je dostatočná na zmenu vibračného a rotačného stavu molekuly. Získané hodnoty vibračných energií súvisia s pevnosťou chemických väzieb, s molekulovou geometriou, hmotnosťou jadier a slúžia na identifikáciu molekulovej štruktúry danej látky.

IČ spektroskopia poskytuje informácie o semikvantitatívnom, poprípade kvantitatívnom zastúpení majoritných aj minoritných zložiek močového konkrementu<sup>(4)</sup>.

Poznáme asi 40 látok, ktoré môžu byť súčasťou močového konkrementu. Zloženie a názvy močových konkrementov sú uvedené v **tabuľke 1**<sup>(5)</sup>.

## Metodika

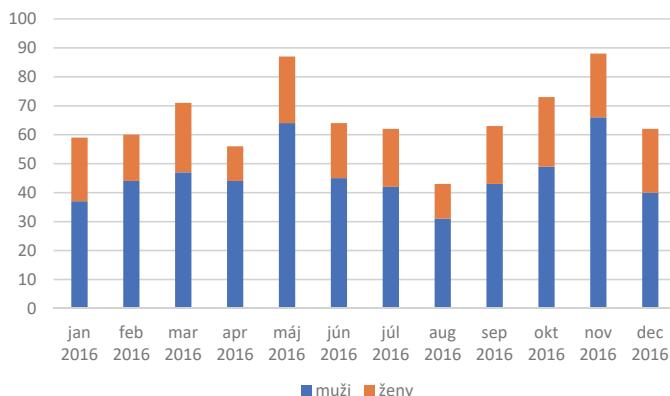
FT-IR analýza vyžaduje prípravu tabletky s priemerom 13 mm, ktorá vznikne zmiešaním jemného prášku kameňa (0,1 – 0,5 mg) so suchým bromidom draselným – KBr (približne 200 mg). Zmes je v špeciálnej forme pod tlakom asi 500 MPA spracovaná do priehľadnej KBr tabletky. Po jej vložení do kyvetového držiaka spektrometra Nicolet iS10 (Thermo Scientific Inc.) sa začína merať IČ spektrum v oblasti od 4 000 do 400  $\text{cm}^{-1}$  (32 skenov), pričom ako pozadie spektra (64 skenov – blank) je meraný vzduch.

Interferogramy neznámych vzoriek sme spracovali aplikáciou SW OMNIC9 (Thermo Scientific Inc.) a získané dáta sme porovnali s referenčným spektrom dostupnej knižnice (Kidney Stone Library-Basic, Kidney Stone coded – Nicolet CZ, s. r. o.).

**Tabuľka 1.** Zloženie a mineralogický názov močových konkrementov

Konkrementy	Mineralogický názov
<b>Kalciumoxaláty</b>	
kalciumoxalát-monohydrát	whewellit
kalciumoxalát-dihydrát	weddellit
<b>Močová kyselina</b>	
močová kyselina	uricit
močová kyselina-dihydrát	
<b>Uráty</b>	
natrium-monohydrát	
amoniumhydrogenurát	
<b>Kalciumfosfáty</b>	
hydroxylapatit	apatit
$\beta$ -trikalciumfosfát	whitlockit
monokalciumfosfát-dihydrát	brushit
<b>Infekčné kamene</b>	
karbonátapatit	dahlit
magnesiumamoniumfosfát-hexa-hydrát (tripelfosfát)	struvit
<b>Geneticky podmienené</b>	
cystín	
xantín	
<b>Organické kamene</b>	
fibrín	
artefakty	
<b>Liekové kamene</b>	

**Graf 1.** Analyzované močové konkrementy v jednotlivých mesiacoch roku 2016 v závislosti od pohlavia



Výsledok automatického porovnania na identifikáciu spektra bol poskytnutý ako súbor možností s najväčšou zhodou, pravdepodobnosťou konkrétneho výsledku, pričom 99 % a vyššia pravdepodobnosť indikujú perfektnú zhodu neznámeho a referenčného spektra. V každom prípade sme vizuálne porovnali vybrané spektrá použitej knižnice so vzorkou a konečný výsledok sme vydali v podobe percentuálneho zastúpenia jednotlivých zložiek močového konkrementu.

## Výsledky

V roku 2016 sme metódou IČ spektroskopie analyzovali spolu 812 konkrementov, z toho 24 (3 %) bolo od zvierat. Zo 788 vzoriek ľudského pôvodu bol jeden konkrement zo stolice doččaťa, ostatné boli močové konkrementy. U 7 pacientov nebolo možné vydať výsledok z rôznych dôvodov (málo materiálu, interferencia).

Mesačne sme analyzovali priemerne 67,6 vzorky, najviac bolo v novembri (92 vzoriek), najmenej v auguste (65 vzoriek).

V našom súbore sme zaznamenali výrazný rozdiel medzi pohlaviami. Muži (552 močových kameňov – 70 %) mali výraznú prevahu oproti ženám (236 močových kameňov – 30 %). Tento rozdiel medzi pohlaviami je evidentný v každom mesiaci roku 2016 (**graf 1**), rovnako ako vo všetkých vekových kategóriách nad 30 rokov, v mladších vekových skupinách je menej výrazný (**graf 2**).

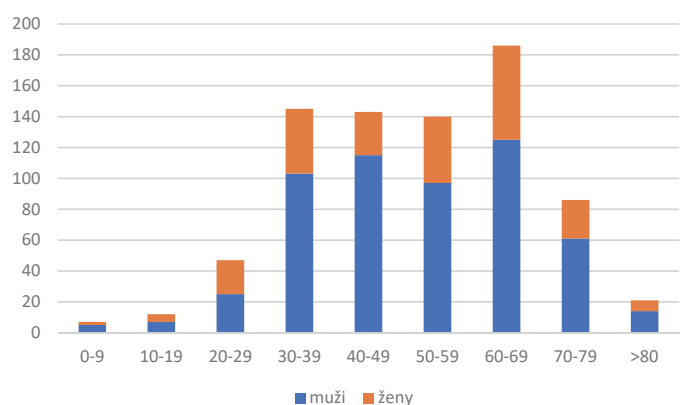
Zvýšený výskyt močových konkrementov sme zaznamenali vo vekovom rozmedzí 30 – 69 rokov. Najviac zastúpenou vekovou skupinou je kategória 60- až 69-ročných pacientov. Najmladší pacient bol 2-ročný chlapec s močovým konkrementom, najstarším pacientom v našom súbore bola 91-ročná žena. Veková distribúcia v našom súbore spolu s rozdielmi medzi pohlaviami je znázornená v **grafe 2**.

Výskyt jednotlivých typov močových konkrementov v našom súbore spolu s frekvenciou ich výskytu znázorňuje **tabuľka 2**.

Najčastejším nálezom boli jednozložkové močové konkrementy – 354 pacientov (45 %). Dvozzložkové kamene sme zaznamenali u 263 pacientov (34 %), trozzložkové boli v 162 prípadoch (21 %) a viac ako tri zložky u 1 pacienta (0,1 % – **tabuľka 2**).

V jednozložkových konkrementoch sme najčastejšie diagnostikovali whewellit – 28 %. Druhý najčastejší pri jednozložkovom močovom konkrememente bol kameň z kyseliny močovej (uricit), v 13 %. Čistý weddellit sme zaznamenali len u 1 %

**Graf 2.** Veková distribúcia pacientov v našom súbore v závislosti od pohlavia



pacientov. Iné zloženie jednozložkového konkrémentu bolo raritné. Tieto zriedkavé typy spolu s počtom a percentuálnym zastúpením sú znázornené **v tabuľke 2**.

Najčastejším dvojsložkovým močovým konkrémentom bol whewellit – weddellit, v 23 % prípadov. Okrem toho sme relatívne často zaznamenali kombináciu whewellit – uricit v 3 %, whewellit – apatit v 2,5 % a dahlit – struvit u 2 % pacientov. U 3 % pacientov sme diagnostikovali dvojsložkový konkrément s iným, raritnejším chemickým zložením – **tabuľka 2**.

**Tabuľka 2.** Výskyt jednotlivých typov močových konkrémentov v našom súbore

Frekvencia výskytu jednotlivých močových konkrémentov		
Jednozložkové kamene	n	%
Whewellit	219	28 %
Weddellit	10	1 %
Močová kyselina	102	13 %
Proteín	8	< 1 %
Dahlit	5	< 1 %
Cystín	4	< 1 %
Brushit	4	< 1 %
artefakty (tehla, keramika)	2	< 1 %
<b>Spolu</b>	<b>354</b>	<b>45 %</b>
Dvojsložkové kamene		
Whewellit – weddellit	180	23 %
Whewellit – uricit	25	3 %
Whewellit – apatit	20	2,50 %
Dahlit – struvit	16	2 %
Whewellit – dahlit	5	< 1 %
Weddellit – dahlit	5	< 1 %
Weddellit – apatit	3	< 1 %
Struvit – amoniumhydrogenurát	2	< 1 %
Calciumfosfát amorfný – struvit	2	< 1 %
Kalciumbilirubinát, bilirubín	1	< 1 %
Natrium-monohydrát – amoniumhydrogenurát	1	< 1 %
Kyselina močová – whitlockit	1	< 1 %
Weddellit – kyselina močová	1	< 1 %
Whewellit – kalcit	1	< 1 %
<b>Spolu</b>	<b>263</b>	<b>34 %</b>
Trojzložkové kamene		
Whewellit – weddellit – apatit	110	14 %
Whewellit – weddellit – dahlit	13	2 %
Struvit – dahlit – whewellit	6	< 1 %
Struvit – dahlit – calciumfosfát amorfný	5	< 1 %
Struvit – dahlit – amoniumhydrogenurát	4	< 1 %
Struvit – dahlit – whitlockit	4	< 1 %
Whewellit – weddellit – kyselina močová	4	< 1 %
Weddellit – dahlit – brushit	3	< 1 %
Whewellit – weddellit – amorfný kalciumfosfát	3	< 1 %
Struvit – dahlit – weddellit	2	< 1 %
Whewellit – dahlit – brushit	2	< 1 %
Dahlit – whitlockit – weddellit	2	< 1 %
Natrium-monohydrát – whewellit – kyselina močová	1	< 1 %
Amoniumhydrogenurát – weddellit – kyselina močová	1	< 1 %
Whewellit – kyselina močová – amorfný kalciumfosfát	1	< 1 %
Whewellit – weddellit – amoniumhydrogenurát	1	< 1 %
<b>Spolu</b>	<b>162</b>	<b>21 %</b>
Viac ako tri zložky		
whewellit – weddellit – apatit – struvit	1	< 1 %
<b>780</b>		

Pri trojsložkových konkrémentoch bolo najčastejšie chemické zloženie whewellit – weddellit – apatit, v 14 % prípadov. Oveľa zriedkavejšia bola kombinácia whewellit – weddellit – dahlit (2 %). Iné zloženie trojsložkového močového konkrémentu sme zaznamenali u 5 % pacientov – jednotlivé trojkombinácie spolu s percentuálnym zastúpením sú znázornené **v tabuľke 2**.

Viac zložiek ako tri sme diagnostikovali len v jednom prípade – išlo o 36-ročnú ženu a močový konkrément mal zloženie whewellit – weddellit – apatit – struvit.

V jednom, už spomínanom prípade nepochádzal kameň z močových ciest, ale išlo o koprolit u dvojmesačného dojččaťa. Jeho chemické zloženie sme identifikovali ako trikalciumpdicitráttetrahydrát.

IČ spektroskopia umožňuje aj identifikáciu artefaktov. Pri analýze močových konkrémentov sme v jednotlivých prípadoch našli spektrá typické pre tehlu a surový materiál pre keramiku.

Močové konkrémenty od zvierat sme analyzovali v 24 prípadoch (3 % zo všetkých vzoriek). Od psa pochádzalo 22 močových kameňov, jeden od králika a jeden od mačky.

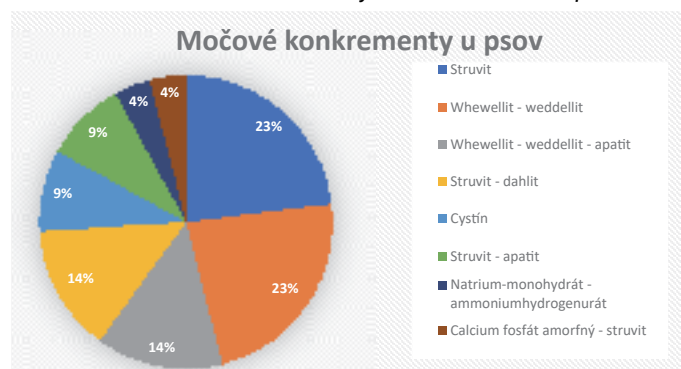
Z hľadiska chemického zloženia močových konkrémentov u psov mal najčastejšie zastúpenie struvit (5 prípadov – 23 %) spolu s dvojsložkovým kalciumoxalátovým konkrémentom – whewellit – weddellit (rovnako 5 prípadov – 23 %). Okrem toho sme v troch prípadoch (14 %) zaznamenali trojsložkový konkrément whewellit – weddellit – apatit a dvojsložkový kameň v zložení struvit – dahlit. V dvoch prípadoch (9 %) sa vyskytol čistý cystínový konkrément a dvojsložkový kameň zložený zo struvitu a z apatitu. Jednotlivé typy močových konkrémentov u psov spolu s percentuálnym zastúpením znázorňuje **graf 3**.

Jedna vzorka močového konkrémentu (100 % uhličitan vápenatý – kalcit alebo vaterit) pochádzala od králika a jedna od mačky (trojsložkový whewellit – weddellit – apatit).

### Diskusia

Nahradenie zastaraného spôsobu analýzy močových konkrémentov mokrou cestou IČ spektroskopiou prinieslo výrazný pokrok do tejto analýzy. IČ spektroskopia spresnila analýzu konkrémentov, umožnila identifikáciu viacerých zložiek pri viaczložkových močových konkrémentoch spolu s ich percentuálnym zastúpením, identifikáciu aj tých typov kameňov, ktoré boli starým spôsobom analýzy neidentifikovateľné (uhličitan vápenatý), zachytávanie aj atypických a zriedkavých foriem močových konkrémentov (proteínové kamene).

**Graf 3.** Chemické zloženie močových konkrémentov u psov





IČ spektroskopia má však svoje limity: presnosť analýzy môže byť rôzna v závislosti od typu konkrémentu, jeho zloženia a prítomnosti nečistôt. Ani výsledok nie je spoľahlivý v prípade, ak sa komponent vyskytuje v objeme < 10 %.

Najčastejším močovým konkrémentom v našom súbore boli kalciumoxalátové kamene (100 % whewellit, dvojzložkový konkrément whewellit – weddellit, resp. trojzložkový v kombinácii s apatitom). Častý bol aj konkrément z kyseliny močovej. Zápalovú zložku sme pozorovali asi u 9 % pacientov. Tento nález je v súlade s literárnymi zdrojmi: Daudon<sup>(6)</sup> udáva 71,8 % kalciumoxalátových konkrémentov a 12,8 % konkrémentov z kyseliny močovej. Rovnako sú naše dáta porovnateľné s českou populáciou<sup>(5)</sup>.

V súbore sme zaznamenali výraznú dominanciu mužov oproti ženám (2,33 : 1), ktorá je evidentná hlavne po 30. roku života. V nižších vekových kategóriách je rozdiel medzi pohlaviami menej výrazný, v skupine 20- až 30-ročných je dokonca pomer M/Ž len 1,13 : 1. Tento jav je opisovaný aj v dostupných publikáciách: Daudon udáva vo francúzskej populácii pomer M/Ž 2,1 : 1<sup>(6)</sup>, Hossain v japonskej populácii pomer M/Ž 2,68 : 1<sup>(7)</sup> a Sanchez-Martin v španielskej populácii pomer M/Ž 1,26 : 1<sup>(8)</sup>. Nižší výskyt urolitiázy u žien je pravdepodobne spôsobený viacerými faktormi. Za hlavné sa považuje nízka hladina testosterónu v krvi a vyššia koncentrácia citrátov v moči<sup>(9)</sup>.

Výskyt urolitiázy je najčastejší medzi 40. – 50. rokom života<sup>(9)</sup>, resp. medzi 20. – 60. rokom<sup>(10)</sup>. V našom súbore je však evidentný posun do vyššieho veku, kde medzi 30. – 60. rokom života je relatívne rovnomerné rozloženie pacientov (približne 18 % v každej dekáde), ale vo vekovej skupine 60- až 69-ročných pozorujeme vrchol výskytu (24 % pacientov) a pokles nastáva až v ďalšej dekáde.

Zaujímavý je záchyt niektorých konkrémentov s raritným chemickým zložením. Za zmienku stojí nález konkrémentu

uhličitanu vápenatého u 76-ročnej ženy, kde bolo jadro konkrémentu zložené zo 100 % whewellitu a obal zo 100 % kalcitu (uhličitanu vápenatého). Kalcit je extrémne vzácny (0,01 – 0,25 % zo všetkých konkrémentov), vyskytuje sa v kombinácii s oxalátmi (42 – 59 %), urátmi (13 – 26 %) alebo fosfátmi (13 %)<sup>(11,12,13,14)</sup>. Naopak, relatívne často ho nájdeme u zvierat (kôň, koza, morča, králik), kde je uhličitan vápenatý ako prímies krmných zmesí. V našom súbore sme zachytili takýto konkrément u králika.

Rovnako raritný je nález močového konkrémentu u 69-ročného muža zloženého z 85 % z kalciumbilirubinátu a z 15 % z bilirubínu. V tomto prípade sa nám, bohužiaľ, nepodarilo dopátrať ku klinickým podrobnostiam.

Ďalšiu zaujímavú skupinu predstavujú proteínové konkrémenty. Organický matrix (bielkoviny, lipidy, karbohydráty) je súčasťou každého močového konkrémentu, jeho podiel je 2 – 10 %. Práve bielkovinová zložka sa považuje za rozhodujúcu v procese kryštalizácie<sup>(15)</sup>. V našom súbore sme našli 8 konkrémentov s prevažujúcou proteínovou zložkou, ktorá je najčastejšie tvorená najviac zastúpeným proteínom v moči – albumínom. Iné bielkoviny, ako hemoglobín, osteopontín, protrombín alebo fibrín môžu rovnako tvoriť močový konkrément, a to najčastejšie pri infekciách močového traktu alebo u hemodialyzovaných pacientov.

Zaujímavé je, že sa nám doposiaľ nepodarilo identifikovať žiadny liekový konkrément napriek tomu, že liekové kamene by mali byť zastúpené v 1-2 %<sup>(16)</sup>.

## Záver

Zavedenie metodiky IČ spektroskopie výrazne spresnilo analýzu močových konkrémentov, umožnilo identifikovať ich chemické zloženie a prispelo k cielenej konzervatívnej liečbe a prevencii recidívy urolitiázy.

## LITERATÚRA

1. Milichovský I, Kron I, Valanský L. Urolitiáza v ambulantnej a klinickej praxi. *Via pract* 2005; 2(10): 389-393.
2. Türk C, Knoll T, Petrik A et al. Guidelines on Urolithiasis. European Association of Urology, 2015.
3. Benramdane L, Bouatia M, Idrissi MOB et al. Infrared analysis of urinary stones, using a single reflection accessory and a KBr pellet transmission. *Spectroscopy Letters* 2008; 41(2): 72-80.
4. Singh I. Renal geology (quantitative renal stone analysis) by 'Fourier transform infrared spectroscopy'. *International Urology and Nephrology* 2008; 40(3): 595-602.
5. Masopust J. *Klinická biochemie*. Nakladatelství Karolinum Praha 1998. ISBN 80-7184-649-3.
6. Daudon M, Traxer O, Lechevallier E et al. Épidémiologie des lithiases urinaires.
7. *Prog Urol* 2008; 18(12): 802-814.
8. Hossain RZ, Ogawa Y, Hokama S, et al. Urolithiasis in Okinawa, Japan: a relatively high prevalence of uric acid stones. *Int J Urol* 2003; 10: 411-415.
9. Sanchez-Martin FM, Millan RF, Esquena FS, et al. Incidence and prevalence of published studies about urolithiasis in Spain. A review. *Actas Urol Esp* 2007; 31(5): 511-520.
10. Stejskal D. Urolitiáza v roce 2003. Etiopatogeneze, diagnostika, terapie. OLM a interní oddělení Nemocnice Šternberk. Dostupné na [www.laborator.nemsne.cz/odbornici/biochemie/urolitiiza.doc](http://www.laborator.nemsne.cz/odbornici/biochemie/urolitiiza.doc)
11. Mello MF, Marchini GS, Camara C. A large 15-years database analysis on the influence of age, gender, race, obesity and income on hospitalization rates due to stone disease. *Int Braz J Urol* 2016; 42(6): 1150-1159.
12. Daudon M, Donsimoni R, Hennequin C, et al. Sex- and age-related composition of 10617 calculi analyzed by infrared spectroscopy. *Urol Res* 1995; 23: 319-326.
13. Miller NL, Lingeman JE. Management of kidney stones. *BMJ* 2007; 334: 468-472.
14. Schubert G. Stone analysis. *Urol Res* 2006; 34: 146-150.
15. Leusmann DB, Blaschke R, Schmandt W. Results of 5,035 stone analyses: contribution to epidemiology of urinary stone disease. *Scand J Urol Nephrol* 1990; 24: 205-210.
16. Pramanik R, Asplin JR, Jackson ME, et al. Protein content of human apatite and brushite kidney stones: significant correlation with morphological measures. *Urol Res* 2008; 36(5): 251-258.
17. Daudon M, Frochet V, Bazin D, et al. Drug-induced kidney stones and crystalline nephropathy: pathophysiology, prevention and treatment. *Drugs* 2017. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0853-7>



**MUDr. Katarína Schenková**

Medirex, a. s.

Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava

e-mail: [katarina.schenkova@medirex.sk](mailto:katarina.schenkova@medirex.sk)

## Liquid biopsy in clinical practice

Ondrej Pös

Vedecký park Univerzity Komenského, Bratislava

In current clinical practice in Slovakia, histological examination of tumor tissue is used for the analysis of cancer diseases. However, this approach is not a perfect solution because it requires a very invasive procedure, nevertheless the obtained information is not always sufficiently representative. Appropriate solution is a liquid biopsy, which appears to be a representative and less invasive method. Blood plasma analysis get attention, since free circulating nucleic acids, proteins, cells and extracellular vesicles from the whole body are delivered to the bloodstream. Previous results suggest that introducing this approach to routine clinical practice would be a tremendous contribution to improving and personalizing anticancer therapy.

**Keywords:** cancer, liquid biopsy, blood plasma, personalization, therapy

### *Tekutá biopsia v klinickej praxi*

V súčasnej klinickej praxi sa pre analýzu nádorových ochorení na Slovensku využíva histologické vyšetrenie tumorového tkaniva. Tento prístup však nie je ideálnym riešením, pretože vyžaduje veľmi invazívny zákrok a aj napriek tomu nie je získaná informácia vždy dostatočne reprezentatívna. Vhodným riešením je tekutá biopsia, ktorá sa javí ako reprezentatívna a oveľa menej invazívna metóda. Veľkú pozornosť púta najmä analýza krvnej plazmy, pretože do krvného riečiska sa dostávajú voľné cirkulujúce nukleové kyseliny, proteíny, bunky a extracelulárne vezikuly, ktoré pochádzajú z celého organizmu. Doterajšie výsledky naznačujú, že zavedenie tohto prístupu do rutínnej klinickej praxe by bolo obrovským prínosom pre zlepšenie a personalizáciu protinádorovej terapie. **Kľúčové slová:** nádorové ochorenie, tekutá biopsia, krvná plazma, personalizácia, terapia

NewsLab, 2018; roč. 9 (1): 31 – 33

### Introduction

Cancer is among the main causes of morbidity and mortality in the Slovak Republic. From all countries of the European Union, Slovakia is one of the most affected countries by this disease with a death rate 324.05 people per 100,000 residents<sup>(1)</sup> (**Table 1**). Cancer affects patients and their relatives as well, therefore it leads to serious health and social problems. In addition, it also has an impact on the financing of health care and the national economy of the country.

Due to the asymptomatic onset of cancer, most oncological patients are identified at advanced stage of disease and many times only by random diagnoses<sup>(2)</sup>. This significantly worsens the outcome of antitumor therapy, which already varies between patients. In addition, during tumor therapy, tumor cells are under strong selection pressure, therefore their genome is dynamically evolving, and within one tumor, different cell populations can be formed that can be resistant to the selected therapy<sup>(3)</sup>. Due to the heterogeneity between various parts of the tumor, information obtained through tissue biopsy is often misrepresenting. Therefore, it would be necessary to obtain a tissue sample from multiple parts of the tumor and from all tumors that are present in the organism. This requires a very invasive procedure that leads to physical and mental burden on patients<sup>(4)</sup>. These findings suggest that key factor for successful cancer treatment is early diagnosis of patient before the onset of the aggressive phenotype of disease. Consequently, it is important to determine the appropriate treatment for each patient to minimize the side effects and it is also necessary to continuously and effectively monitor the progression of the disease in order to respond as quickly as possible to the developing cells.

These are reasons why there is a rising need for biomarkers to diagnose cancer, to monitor cancer progression and to predict patient response to therapy<sup>(5)</sup>. Appropriate solution are biomarkers usable for a liquid biopsy, which appears to be sufficiently representative, and much less invasive method compared to tissue biopsy. Liquid biopsy consists of the analysis of body fluids such as blood, urine, saliva, or cerebrospinal fluid that contain genetic information derived from tumor tissue. The most attention is currently attributed to the analysis of blood plasma because nucleic acids, proteins, cells and extracellular vesicles (EVs) gets to the bloodstream from all parts of the human body and in a case of oncological patients also from the tumor tissue<sup>(6)</sup> (**Figure 1**). In the future, this area of medicine could be called "Liquid Dynamic Medicine". This concept represents this methodological approach because it describes the dynamic changes in tumor development that we must take into account in tumor therapy, whereas information about these changes is obtained from the body fluids of patient<sup>(3)</sup>.

### Cell-free DNA

Cell free DNA (cfDNA) represent 150-180 bp long fragments which are released from cells into the bloodstream through apoptosis and necrosis. It has been shown that higher levels of cfDNA are found in the blood of oncological patients than in healthy subjects<sup>(7)</sup>. cfDNA that is released from tumor cells (ctDNA) contain the molecular characteristics of primary tumors and therefore their analysis could have a potential for the diagnosis and monitoring of cancer by liquid biopsy<sup>(8)</sup>. Experimental studies have confirmed that tumor-specific mutations can be detected with high sensitivity

**Table 1.** Standardized rate of mortality in the European Union countries in 2014. Table describe the total number of deaths; the number of deaths caused by cancer and the ratio of deaths due to cancer. (Data is standardized per 100,000 residents)

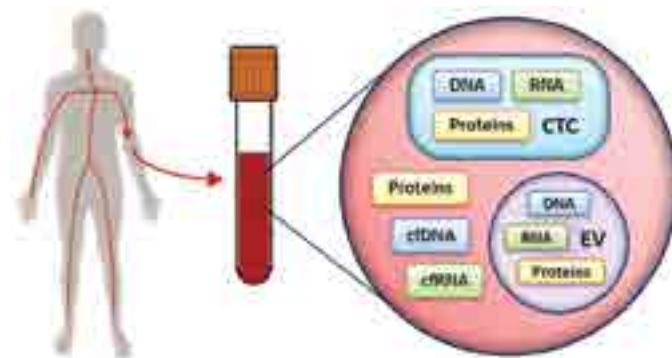
	Deaths per 100 000 residents		
	Total	Cancer	Ratio
European Union	1 003.06	261.5	26%
Belgium	970.63	252.61	26%
Bulgaria	1 646.45	242.41	15%
Czech Republic	1 237.32	284.55	23%
Denmark	1 028.33	300.61	29%
Germany	1 017.07	253.23	25%
Estonia	1 269.27	299.41	24%
Ireland	981.07	288.29	29%
Greece	966.64	249.32	26%
Spain	837.46	232.7	28%
France	829.86	245.41	30%
Croatia	1 355.92	336.39	25%
Italy	854.06	246.55	29%
Cyprus	980.1	200.39	20%
Latvia	1 502.96	299.33	20%
Lithuania	1 449.22	276.22	19%
Luxembourg	917.54	260.71	28%
Hungary	1 455.45	348.14	24%
Malta	939.38	233.53	25%
Netherlands	957.96	282.2	29%
Austria	957.15	249.28	26%
Poland	1 241.04	292.31	24%
Portugal	991.4	242.14	24%
Romania	1 531.08	273.21	18%
Slovenia	1 018.63	299.91	29%
Slovakia	1 353.43	324.05	24%
Finland	994.74	218.57	22%
Sweden	922.1	234.75	25%
United Kingdom	971.17	278.43	29%

by massive parallel sequencing (MPS) in ctDNA<sup>(7)</sup>. In a breast cancer patient, mutation profile of ctDNA, primary tumor and metastasis was compared by targeted MPS. In metastatic lesion, there were identified mutations that could not be detected in the primary tumor. However, sequencing of ctDNA could capture all mutations that were present in both the primary tumor and metastases. This study provided evidence that ctDNA contains representative tumor genetic material and can solve the problem of intra-tumor heterogeneity<sup>(9)</sup>. Whole genome sequencing approaches have also been published to identify tumor-specific chromosomal abnormalities in cfDNA of breast and colorectal cancer patients. It has been shown that using this approach, ctDNA with concentration of  $\geq 0.75\%$  can be detected in the blood of oncological patients with a 90% sensitivity and  $> 99\%$  specificity<sup>(10)</sup>. Both the targeted and whole genome analysis of ctDNA has been proven, but because of the high cost of whole genome analysis, the research focuses on targeted MPS analyzes that are more cost-effective for routine diagnostic practice.

### Cell-free RNA

Cell-free RNAs (cfRNAs) are instable molecules that are subjected to degradation, resulting in relatively low levels

**Figure 1.** Liquid biopsy scheme. Blood of oncological patients contains analytes such as circulating tumor cells (CTC); extracellular vesicles (EV); cell-free DNA (cfDNA); cell-free RNA (cfRNA) and proteins that can be used as biomarkers for cancer.



in the blood. Because of these limitations, cfRNA is poorly explored and do not receive much attention. However, a recent study has shown that circulating mRNA and microRNA can be used as effective diagnostic markers for prostate cancer. Four circulating candidate molecules (miR-200c, miR-200 b, OR51E2 and SIM2) were used to predict cancer risk, which were able to diagnose prostate cancer with 67% sensitivity and 75% specificity<sup>(11)</sup>.

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNA molecules that play a significant role in regulating important physiological processes in the human body. Cell-free miRNA can be enclosed in EVs, especially exosomes, but also occurs in complexes with ribonucleoproteins Argonaute 2 or Nucleomorfin 1. These ribonucleoprotein complexes protect miRNAs from degradation so they represent stable circulating biomarkers<sup>(12,13,14)</sup>. Many studies have shown that impaired expression of some miRNAs is associated with the development of cancer, therefore quantification of these molecules could be an effective non-invasive tool for the detection and monitoring of tumor diseases<sup>(7,15,16)</sup>. In addition, experiments on animal models have shown that if the impaired levels of certain miRNA molecules recover to normal values, it is possible to alleviate the symptoms of the disease or even eliminate the disease. Thus, miRNA molecules have potential in cancer therapy<sup>(17)</sup>.

### Extracellular vesicles

EVs are membrane structures that mediate intercellular communication<sup>(18)</sup>. Based on their size and origin, they are divided into several categories including exosomes, microvesicles and apoptotic bodies<sup>(19)</sup>. These vesicles can be released from both healthy and tumor cells, but tumor cells have been shown to release more EVs compared to normal cells. EVs that are released from tumor cells are called oncosomes because they contain various oncogenic components in the form of oncoproteins and nucleic acids<sup>(20,21)</sup>. When oncosome is introduced into recipient cells, oncogenic factors trigger signaling pathways that can transfer the aggressive phenotype of tumor cells to idle cells<sup>(19)</sup>. Since EVs serve as carriers of macromolecules, they contain proteins, lipids and nucleic acids that are protected from degradation<sup>(22)</sup>. So, this is the reason why high-quality RNA molecules can be extracted



by exosomes. Another benefit of these vesicles is, that they originate from living cells, so they represent the active processes running in the cell<sup>(7)</sup>.

## Conclusion

Statistical data of mortality showed that the current situation in the field of cancer is very poor in Slovakia and also within the European Union. In 2014, up to 24% of all deaths were caused by cancer. Outdated procedures used in clinical

practice are also responsible for the worse situation in Slovakia. Therefore, it is necessary to introduce methods for detection and monitoring of tumor diseases that would help to early identification of oncological patients and avoiding the side effects of therapy. The introduction of liquid biopsy method and next generation sequencing technology for routine clinical practice should contribute to the overall improvement and personalization of anticancer therapy.

## REFERENCES

1. [http://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/show.do?dataset=hlth\\_cd\\_asdr2 & lang=en](http://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/show.do?dataset=hlth_cd_asdr2 & lang=en)
2. Maroto P, Rini B. Molecular biomarkers in advanced renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2014; 20(8): 2060-2071.
3. Silvestris N, Ciliberto G, De Paoli P, et al. Liquid dynamic medicine and N-of-1 clinical trials: a change of perspective in oncology research. *J Exp Clin Cancer Res* 2017; 36(1): 128.
4. Ngo TC, Wood CG, Karam JA. Biomarkers of renal cell carcinoma. *Urol Oncol* 2014; 32(3): 243-251.
5. Zheng J, Wang L, Peng Z, et al. Low level of PDZ domain containing 1 (PDZK1) predicts poor clinical outcome in patients with clear cell renal cell carcinoma. *EBioMedicine* 2017; 15: 62-72.
6. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, et al. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017; 14(9):531-548.
7. Brock G, Castellanos-Rizaldos E, Hu L, et al. Liquid biopsy for cancer screening, patient stratification and monitoring. *Translational Cancer Research* 2015; 4(3): 280-290.
8. Chang Y, Tolani B, Nie X, et al. Review of the clinical applications and technological advances of circulating tumor DNA in cancer monitoring. *Ther Clin Risk Manag* 2017; 13: 1363-1374.
9. De Mattos-Arruda L, Weigelt B, Cortes J, et al. Capturing intra-tumor genetic heterogeneity by de novo mutation profiling of circulating cell-free tumor DNA: a proof-of-principle. *Ann Oncol* 2014; 25(9): 1729-1735.
10. Leary RJ, Sausen M, Kinde I, et al. Detection of chromosomal alterations in the circulation of cancer patients with whole-genome sequencing. *Sci Transl Med* 2012; 4(162): 162ra154.
11. Souza MF, Kuasne H, Barros-Filho MC, et al. Circulating mRNAs and miRNAs as candidate markers for the diagnosis and prognosis of prostate cancer. *PLoS One* 2017; 12(9): e0184094.
12. Huang X, Yuan T, Tschannen M, et al. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics* 2013; 14: 319.
13. Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circ Res* 2012; 110: 483-495.
14. Desgagné V, Guérin R, Guay SP, et al. Changes in high-density lipoprotein-carried miRNA contribution to the plasmatic pool after consumption of dietary trans fat in healthy men. *Epigenomics* 2017; 9: 669-688.
15. Morello M, Minciocchi VR, de Candia P, et al. Large oncosomes mediate intercellular transfer of functional microRNA. *Cell Cycle* 2013; 12(22): 3526-3536.
16. Londin E, Loher P, Telonis A.G, et al. Analysis of 13 cell types reveals evidence for the expression of numerous novel primate- and tissue-specific microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112(10): E1106-15.
17. Wahid F, Shehzad A, Khan T, et al. MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1803(11): 1231-1243.
18. Wan Y, Cheng G, Liu X, et al. Rapid magnetic isolation of extracellular vesicles via lipid-based nanoprobe. *Nat Biomed Eng* 2017;1. pii: 0058.
19. Wu K, Xing F, Wu SY, et al. Extracellular vesicles as emerging targets in cancer: Recent development from bench to bedside. *Biochim Biophys Acta* 2017; pii: S0304-419X(17)30149-X.
20. Di Vizio D, Kim J, Hager MH, et al. Oncosome formation in prostate cancer: association with a region of frequent chromosomal deletion in metastatic disease. *Cancer Res*. 2009; 69(13): 5601-5609.
21. Choi D, Lee TH, Spinelli C, et al. Extracellular vesicle communication pathways as regulatory targets of oncogenic transformation. *Semin Cell Dev Biol* 2017; 67: 11-22.
22. Contreras-Naranjo JC, Wu HJ, Ugaz VM. Microfluidics for exosome isolation and analysis: enabling liquid biopsy for personalized medicine. *Lab Chip* 2017; doi: 10.1039/c7lc00592j.



**Mgr. Ondrej Pös**

Vedecký park Univerzity Komenského  
Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava  
e-mail: [ondrejpos.sk@gmail.com](mailto:ondrejpos.sk@gmail.com)

## Environmentálny estrogén bisfenol A a poruchy fertility u žien

Zora Lazúrová

IV. interná klinika UNLP a UPJŠ LF, Košice

Prevalencia porúch mužskej a ženskej fertility je v súčasnosti veľmi vysoká, postihuje približne 10-15 % párov. Na stúpajúcom trende výskytu neplodnosti sa okrem iného podieľajú najmä environmentálne faktory. Ľudstvo je čoraz viac exponované rôznym priemyselným chemikáliám, v najväčšom množstve ide o látky charakteru tzv. environmentálnych estrogénov, z ktorých najrozšírenejším je bisfenol A (BPA). Nachádza sa najmä v plastových fľašiach, rôznych potravinových obaloch, potrubí, oblečení a v niektorých druhoch papiera. Vďaka štruktúrnej podobnosti endogénnym estrogénom zasahuje do fyziologických pochodov v organizme a uplatňuje sa v etiopatogenéze viacerých morfológických alebo funkčných zmien reprodukčného systému, ktoré môžu viesť k infertilitě. Účinky BPA závisia od času, dĺžky a intenzity expozície. Najcitlivejšie je obdobie vývoja jedinca, keď aj malé dávky BPA môžu zanechať trvalé následky nielen na plodnosť.

**Kľúčové slová:** bisfenol A, environmentálne estrogény, infertilita, ovária, xenoestrogény

### *Environmental oestrogen bisphenol A and disorders in woman fertility*

Prevalence of male and female fertility disorders is very high, affecting approximately 10-15% of couples. Environmental factors contribute to this rapidly increasing tendency. The population is still more exposed to a variety of industrial chemical substances, mostly to the group of them called environmental oestrogens. Bisphenol A (BPA) is one of the most common. It is found in plastic bottles, food packages, pipes, clothes or certain types of paper. Due to its structural similarity to endogenous oestrogens BPA can interfere with physiological processes in the human organism, which leads to infertility. Its effects are influenced by time, length and intensity of exposure. The developmental stage is the most sensitive period when even small doses can leave irreversible consequences on fertility.

**Keywords:** Bisphenol A, environmental oestrogens, infertility, ovary, xenoestrogens

NewsLab, 2018; roč. 9 (1): 34 – 37

### Úvod

Prevalencia porúch mužskej a ženskej fertility má neustále narastajúci trend. V súčasnosti postihuje približne 10-15 % párov, pričom v 20 – 35 % je príčinou infertilita u ženy, v 20 – 30 % u muža, v 25 – 40 % je problém na oboch stranách, u 10 – 20 % je príčina neobjasnená. Príčiny neplodnosti môžu byť rôzne, ale na celkovom výslednom náraste sa predpokladá najmä podiel environmentálnych faktorov a životného štýlu, ktoré spolu často úzko súvisia. Ľudstvo je čoraz viac exponované syntetickým látkam využívaným v priemysle, v najväčšom množstve ide o chemikálie charakteru tzv. environmentálnych estrogénov. Na základe toho sa niekedy hovorí aj o „globálnom hyperestrogenizme“<sup>(1)</sup>.

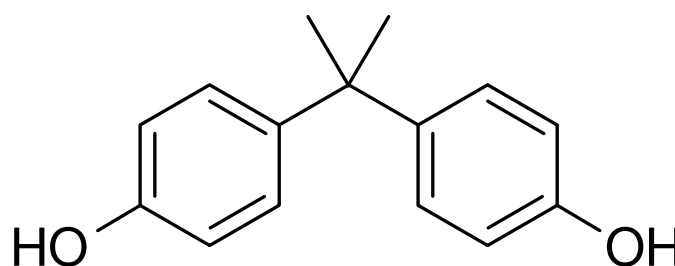
### Bisfenol A

Bisfenol A (BPA) je jedným z najrozšírenejších predstaviteľov environmentálnych estrogénov, nazývaných aj xenoestrogény. Sú to syntetické látky, ktoré majú štruktúru molekuly podobnú estrogénom (**obrázok 1**). Väzbou na estrogénové receptory zasahujú do mnohých fyziologických pochodov v organizme.

BPA je organická zlúčenina, ktorá patrí do skupiny bisfenolov, termostabilných látok, nerozpustných vo vode, ktoré sa používajú ako komponenty polymerizačných reakcií pri výrobe plastov na zvýšenie ich pevnosti a termostability. BPA bol objavený v roku 1891 a spočiatku bol používaný

na urýchlenie rastu dobytka a hydiny. Neskôr, keď sa zistili jeho endokrinné účinky, začal sa aplikovať ako náhrada estrogénov u žien. Od 50. rokov 20. storočia sa používa na výrobu plastov. Je bežnou súčasťou plastových fliaš, nádob na potraviny, plechových konzerv s povrchovou úpravou, potrubia, zubárskych materiálov, kancelárskych papierov, bankoviek, CD a DVD nosičov, oblečenia a podobne, z ktorých sa uvoľňuje do vody, jedla, ovzdušia alebo sa do tela dostáva cez pokožku<sup>(2)</sup>. Jeho hlavné mechanizmy účinku sú sprostredkované väzbou na estrogénové receptory. S oveľa nižšou afinitou sa BPA viaže aj na receptory pre iné hormóny, napríklad androgénové receptory, na ktoré má antiandrogénové účinky, alebo na receptory tyroidálnych hormónov. Väzbou na mnohé iné receptory, ako napríklad PPAR-gama (peroxisome pro-

**Obrázok 1.** Chemický vzorec bisfenolu A



liferator-activated receptor gamma), pregnán-X receptory, progesterónové receptory, AhR (aryl hydrocarbon receptor), dokáže ovplyvňovať ďalšie procesy v organizme priamo alebo prostredníctvom týchto receptorov len modulovať syntézu ďalších receptorov<sup>(3)</sup>. Okrem väzby na receptory pre viaceré hormóny alebo iónové kanály boli dokázané aj jeho účinky na genetickej a epigenetickej úrovni. BPA nie je v organizme metabolizovateľný, na jeho elimináciu sú využívané len všeobecné detoxikačné konjugačné mechanizmy, predovšetkým glukuronidácia a sulfurácia. Pre lipofilný charakter molekuly sa v značnej miere akumuluje v tukovom tkanive.

Expozícia ľudstva BPA je v súčasnosti veľmi veľká. Iba v USA sa vyprodukuje viac než 6 biliónov kilogramov ročne. Podľa odporúčaní FDA je bezpečná denná dávka BPA  $\leq 50$  ug/kg/deň<sup>(1)</sup>. Toto množstvo nie je veľké, avšak je dokázané, že účinky BPA sa dostávajú už pri koncentráciách niekoľko piko- až nanomólov. Aspoň v minimálnych merateľných hodnotách bol zistený v moči až 93 % populácie<sup>(4)</sup>. V inej štúdií boli dokázané až 1 200x vyššie hladiny BPA v moči bezprostredne po konzumácii polievky z plechovej konzervy<sup>(5)</sup>. Expozícia týmto xenoestrogénom v rôznej miere je škodlivá v každom veku, avšak najrizikovejšie je prenatálne a včasné postnatálne obdobie vývoja.

### Vplyv BPA na poruchy ženskej fertility

Infertilita u žien je definovaná ako neschopnosť dosiahnuť graviditu v priebehu 12 mesiacov, resp. neschopnosť donosiť plod. Štatisticky je v 35 % príčinou neplodnosti páru porucha reprodukčných funkcií u ženy. K výrazne narastajúcemu trendu v prevalencii infertility v súčasnosti prispieva najmä životné prostredie<sup>(1)</sup>. BPA sa podieľa na ženskej neplodnosti spôsobenej organickými, ale aj funkčnými zmenami reprodukčného systému. V literatúre sa vyskytuje mnoho prác zaoberajúcich sa hladinami BPA u infertilných pacientok. Caserta et al. namerali signifikantne vyššie hodnoty sérového BPA u pacientok trpiacich neplodnosťou z rôznych príčin, v porovnaní s kontrolnou skupinou fertílých žien<sup>(6)</sup>.

BPA pôsobí na intrauterinný vývoj ovárií, alteruje syntézu steroidných hormónov a v dospelosti ovplyvňuje dozrievanie folikulov. Považuje sa za jednu z možných príčin syndrómu polycystických ovárií a rôznymi ďalšími mechanizmami pôsobí negatívne na fertilitu. Bolo dokázané aj negatívne pôsobenie na úrovni implantácie a nidácie už oplodneného vajíčka, ako aj poruchy včasnej embryogenézy. Menej preskúmaný je vplyv na ďalšie reprodukčné orgány, avšak doterajšie štúdie zaznamenali patologické zmeny aj na vajčkovodoch a maternici, ktoré sú asociované s pôsobením BPA<sup>(7)</sup>.

BPA spôsobuje poruchy reprodukčných funkcií u žien nasledujúcimi mechanizmami:

#### 1. Pôsobenie na ováriá

BPA negatívne ovplyvňuje fertilitu žien vznikom morfológických zmien v ováriách a tiež zásahom do steroidogenézy a poruchami ich endokrinnnej funkcie. Efekt BPA závisí od času, dĺžky a miery expozície. Už prenatálne pôsobenie môže zanechať závažné dôsledky na plodnosti ženy zásahom do oogenézy alebo syntézy pohlavných hormónov.

### A. Oogenéza a ovariálna rezerva

Viaceré *in vitro* a zvieracie *in vivo* štúdie potvrdili zásah BPA do prenatálnej oogenézy na dvojakej úrovni – narušením prvého meiotického delenia vo fetálnom ovárii a ovplyvnením folikulogenézy.

BPA spôsobuje alteráciu meiózy nondisjunkciou alebo poruchami rekombinácie medzi homológnyimi chromozómami. Štúdiom množstva BPA vo folikulárnej tekutine dospelých žien sa zistilo, že vyšší výskyt porúch prvého meiotického delenia bol asociovaný so zvýšenými hladinami BPA, čoho následkom boli rôzne chromozomálne abnormality až aneuploidia<sup>(8)</sup>.

Druhý mechanizmus účinku BPA je tvorba neuzatvorených oocytov a vznik multioocytových folikulov. BPA je tiež zodpovedný za zníženie celkového počtu primordiálnych folikulov a zmnoženie primárnych, sekundárnych a antrálnych folikulov, čo vedie k zníženiu celkovej ovariálnej rezervy<sup>(9)</sup>. Pôsobenie tohto xentoestrogénu aj na zrelé folikuly urýchľuje ich diferenciáciu na antrálne folikuly<sup>(10)</sup>. Nadmerná folikulárna atrézia a regresia corpus luteum môžu byť taktiež spôsobené aktiváciou kaspázy-3, jedného z kľúčových enzýmov pre reguláciu apoptózy<sup>(11)</sup>.

Väčšina týchto zmien sa dostavila už po expozícii nízkymi množstvami BPA. Vysoké dávky BPA môžeme považovať za vyslovene ovotoxické.

### B. Steroidogenéza

BPA ako environmentálny estrogén vďaka svojej hormonálnej aktivite interferuje s produkciou pohlavných hormónov v ováriách. Ovplyvnením syntézy enzýmov zapojených do steroidogenézy a inhibíciou 5-alfa-hydroxylázy spôsobuje zvýšenie hladiny celkového testosterónu. Na hladiny estrogénov pôsobí v závislosti od dávky – v nízkych množstvách pôsobí proestrogénne, avšak vysoké dávky potláčajú syntézu estrogénov.

V experimentálnej štúdií na luteálnych bunkách získaných od žien, ktoré podstúpili operácie z indikácií nie gynekologických, sa po expozícii BPA *in vitro* zistilo aj výrazné zníženie produkcie progesterónu<sup>(12)</sup>. Diskrepantné boli výsledky práce realizovanej na myšiacich antrálnych folikuloch, kde autori poukázali na signifikantné zníženie syntézy progesterónu, dehydroepiandrosterónu, androstendiónu, estrónu, testosterónu a estradiolu po pôsobení BPA<sup>(13)</sup>.

### C. Syndróm polycystických ovárií(PCOS)

PCOS (Steinov-Leventhalov syndróm) predstavuje jednu z najčastejších endokrinopatií u žien vo fertílom veku s prevalenciou v rozmedzí 5 – 10 %. Asi u 15 až 20 % infertilných žien sa považuje za príčinu neplodnosti a je najčastejšou príčinou porúch menštruačného cyklu<sup>(14)</sup>.

PCOS je charakterizovaný zvýšenou ovariálnou a adrenálnou produkciou androgénov, klinickým a/alebo biochemickým hyperandrogenizmom a prítomnosťou polycystických ovárií pri ultrasonografickom vyšetrení. Stúpajúca prevalencia tohto ochorenia sa dáva do súvislosti s expozíciou environmentálnymi estrogénmi. Mnohé štúdie zaznamenali vyššie hladiny BPA u pacientok s týmto ochorením. BPA zohráva úlohu v etiológii PCOS, ale ovplyvňuje aj jeho ďalšie fenotypové prejavy<sup>(3,14)</sup>.



Experimentálne výskumy dokázali, že u potkanov v prenatálnom a neonatálnom období, vystavených nízkym dávkam BPA, došlo neskôr k tvorbe ovariálnych cýst a tiež k poruchám menštruačného cyklu a nadmernej sekrécii testosterónu. Vysoké dávky BPA podávané počas intrauterinného vývoja viedli k vzniku cýst na ováriách a k akumulácii veľkých antrálnych folikulov<sup>(15)</sup>. Mechanizmy účinku nie sú zatiaľ plne objasnené. Potvrdil sa priamy efekt BPA na ovariálne tekáľno-intersticiálne bunky, ktoré následne produkovali väčšie množstvo testosterónu. BPA zároveň zvyšuje frakciu voľného, hormonálne aktívneho testosterónu, keďže sa správa ako možný ligand molekuly SHBG (sex hormone binding globulin), na ktorej obsadzuje väzobné miesta<sup>(16)</sup>. Zistili sa výrazne vyššie hodnoty BPA v sére/moči pacientok s PCOS v porovnaní s kontrolným súborom zdravých žien, pričom BPA koreloval s množstvom celkového aj voľného testosterónu, dehydroepiandrosterónsulfátu a tiež s Ferrimano-vým-Gallowayovej skóre používaným na určenie stupňa hirsutizmu<sup>(17)</sup>.

Na elevácii hladín BPA u týchto pacientok sa podieľa aj samotný hyperandrogénny stav. Metabolizmus BPA v značnej miere interferuje s metabolizmom androgénov v pečeni, čo potvrdzujú epidemiologické štúdie dokazujúce signifikantne zvýšené hodnoty BPA u mužov v porovnaní so zdravými ženami. Zvýšené hladiny BPA sú teda nielen príčinou, ale aj dôsledkom PCOS, vzniká tak určitý začarovaný kruh<sup>(18)</sup>.

## 2. Uterus, tuba uterina

V literatúre sa nachádza aj niekoľko prác zaoberajúcich sa pôsobením BPA na vajíčkovody a maternicu. V experimentálnych štúdiách bol dokázaný rozvoj progresívnych proliferatívnych lézií epitelu v tuba uterina, ktoré sa vyskytli už pri expozícii minimálnym dávkam BPA. Podobné proliferatívne lézie sa vyskytovali aj v endometriu, spolu s vyšším výskytom stromálnych polypov a endometriózy<sup>(1)</sup>.

## 3. Hypotalamus a hypofýza

BPA ovplyvňuje steroidogézu nielen priamo na úrovni ovárií, ale aj zásahom do centrálnej regulácie syntézy hormónov. Vysoké dávky (500 ug/kg/deň) môžu vyvolať irreverzibilnú centrálnu amenoreu, nižšie množstvá spôsobujú len individuálne rozdielnu hormonálnu dysreguláciu. Po expozícii BPA dochádza k útlmu transkripcie génu pre kisspeptín, ktorý je hlavným regulátorom a spúšťačom pulznej sekrécie gonádoliberínu (GnRH). Navyše BPA priamo utlmuje tvorbu

GnRH v hypotalame a gonádotropných hormónov v hypofýze. Štúdium morfológických zmien v hypotalamo-hypofýzovej oblasti u zvierat v experimente po expozícii BPA však preukázalo paradoxne zvýšenie počtu gonádotropných buniek v adenohypofýze<sup>(1)</sup>.

## BPA a IVF (*in vitro* fertilizácia)

Autori viacerých prác publikovali vyššie hodnoty sérového BPA u žien trpiacich neplodnosťou z rôznych príčin, navyše sa zistila nižšia úspešnosť *in vitro* fertilizácie u pacientok s vyššími hladinami BPA v moči alebo v sére<sup>(19)</sup>. BPA má negatívny vplyv na implantáciu a nidáciu oplodneného vajíčka do uteru, znížená receptivita endometria na funkciu placenty a vývoj embrya, čo môže viesť k častejším potratom, predovšetkým v prvom trimestri.

Práca Sugiura-Ogasawara a kolektívu sa zaoberala meraním hladín BPA u pacientok s opakovanými (2 a viac) spontánnymi potratmi. Zistili signifikantne vyššie množstvá BPA v sére týchto žien v porovnaní so zdravými kontrolami, pričom ďalšími vyšetreniami vylúčili prítomnosť akéhokoľvek iného ochorenia, ktoré by mohlo zapríčiniť opakované aborty<sup>(20)</sup>. V inej štúdii na pacientkach podstupujúcich IVF bola jednoznačne dokázaná znížená úspešnosť implantácie oplodneného vajíčka u tých pacientok, ktoré mali vyššie hladiny BPA v sére.

## Záver

Na stúpajúcom výskyte porúch fertility sa okrem iného v značnej miere podieľajú environmentálne estrogény. BPA je jedným z najrozšírenejších a zároveň je najviac preskúmaný jeho vplyv na ľudský organizmus. Najnebezpečnejšia je prenatálna expozícia, ktorá môže zanechať trvalé následky, ale aj pôsobenie počas života je asociované so vznikom rôznych ochorení. Okrem porúch fertility u žien a mužov na podklade hormonálnych, morfológických alebo funkčných patogenetických mechanizmov BPA zohráva významnú úlohu pri vzniku mnohých ďalších ochorení, ako sú napr. ochorenia kardiovaskulárneho systému, diabetes mellitus 2. typu, tyreopatie či viaceré onkologické, neurologické a autoimunitné choroby<sup>(2,21)</sup>. Pre dôkaz o významnej patogenite bisfenolu A v mnohých krajinách začínajú platiť rôzne obmedzenia v jeho používaní, predovšetkým pri výrobe predmetov určených pre deti, preto začína byť nahradzovaný inými, novšími bisfenolmi (bisfenol S, AF, B...), ktoré zatiaľ nie sú zakázané, avšak sú pre človeka omnoho viac toxické.

## LITERATÚRA

1. Huo X, Chen D, He Y, et al. Bisphenol-A and Female Infertility: A Possible Role of Gene-Environment Interactions. *Int J Environ Res Public Health* 2015; 12: 11101–11116.
2. Lazúrová Z et Lazúrová I. The environmental estrogen bisphenol A and its effects on the human organism. *Vnitr Lek* 2013; 59(6): 466-471.
3. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, et al. Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews* 2009; 30(4): 293-342.
4. Calafat AM, Ye X, Wong LY, et al. Exposure of the U.S. Population to Bisphenol A and 4-tertiary-Octylphenol: 2003 – 2004. *Environ Health Perspect* 2008; 116(1): 39-44.
5. Carwile JL, Ye X, Zhou X, et al. Canned Soup Consumption and Urinary Bisphenol A: A Randomized Crossover Trial. *JAMA* 2011; 306(20): 2218-2220.

6. Caserta D, Bordi G, Ciardo F, et al. The influence of endocrine disruptors in a selected population of infertile women. *Gynecol Endocrinol* 2013; 29: 444-447.
7. Adewale HB, Jefferson WN, Newbold RR, et al. Neonatal bisphenol-A exposure alters rat reproductive development and ovarian morphology without impairing activation of gonadotropin-releasing hormone neurons. *Biol Reprod* 2009; 81: 690-699.
8. Hunt PA, Koehler KE, Susiarjo M, et al. Bisphenol A exposures causes meiotic aneuploidy in the female mouse. *Curr Biol* 2003; 13: 546-553.
9. Susairo M, Hassold TJ, Freeman E, et al. Bisphenol A exposure in utero disrupts early oogenesis in the mouse. *PLoS Genet* 2007; 12: 3.
10. Rodriguez HA, Santambrosio N, Santamaria CG, et al. Neonatal exposure to bisphenol A reduces the pool of primordial follicles in the rat ovary. *Reprod Toxicol* 2010; 4: 550-557.

11. Lee SG, Kim JY, Chung JY, et al. Bisphenol A exposure during adulthood causes augmentation of follicular atresia and luteal regression by decreasing  $17\beta$ -estradiol synthesis via downregulation of aromatase in rat ovary. *Environ Health Perspect* 2013; 121: 663-669.
12. Romani F, Tropea A, Scarinci E, et al. Endocrine disruptors and human corpus luteum: in vitro effects of phenols on luteal cells function. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2013; 31: 170-180.
13. Peretz J, Gupta RP, Singh J, et al. Bisphenol A impairs follicle growth, inhibits steroidogenesis, and downregulates rate-limiting enzymes in the estradiol biosynthesis pathway. *Toxicol Sci* 2011; 119: 209-217.
14. Glintborg D et Andersen M: An update on the pathogenesis, inflammation and metabolism in hirsutism and polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol* 2010; 26: 281-296.
15. Fernández M, Bourguignon N, Lux-Lantos V, et al. Neonatal exposure to bisphenol A and reproductive and endocrine alterations resembling the polycystic ovarian syndrome in adult rats. *Environ Health Perspect* 2010; 118: 1217-1222.
16. Kandaraki E, Chatzigeorgiou A, Palioura E, et al. Endocrine disruptors and polycystic ovary syndrome (PCOS): elevated serum levels of bisphenol A in women with PCOS. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 480-484.
17. Akin L, Kendirci M, Narin F, et al. The endocrine disruptor bisphenol A may play a role in the aetiopathogenesis of polycystic ovary syndrome in adolescent girls. *Acta Paediatr* 2015; 104(4): 171-177.
18. Takeuchi T, Tsutsumi O, Ikezuki Y, et al. Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction. *Endocr J* 2004; 51(2): 165-169.
19. Machtinger R et Orvieto R. Bisphenol A, oocyte maturation, implantation, and IVF outcome: review of animal and human data. *Reprod Biomed Online* 2014; 29(4): 404-410.
20. Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Sonta S, et al. Exposure to bisphenol A is associated with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2005; 20(8): 2325-2329.
21. Jochmanova I, Lazurova Z, Rudany M, et al. Environmental estrogen bisphenol A and autoimmunity. *Lupus* 2015; 24(4-5): 392-399.

**MUDr. Zora Lazúrová**

IV. interná klinika UNLP a UPJŠ LF  
Rastislavova 43, 040 01 Košice  
e-mail: lazurova\_zora@yahoo.com

## Nutričná genomika: nový prístup k liečbe obezity

Martina Pečimonová

Geneton, s. r. o., Bratislava

Príjem potravy má významný vplyv na zdravotný stav jedinca. Živiny z potravy sú schopné interagovať s génmi a regulovať génovú expresiu, čo v konečnom dôsledku môže viesť k zmene metabolických dráh a zvýšenému riziku rozvoja chronického ochorenia, ako je napr. obezita. Predikcia náchylnosti jedinca na ochorenie, prevencia ochorenia a utlmenie jeho progresu sú hlavnými cieľmi nutričnej genomiky. Hľadá súvis medzi genómovým profilom jednotlivca a jeho zdravotným stavom a sústredí sa na optimalizáciu zdravia pomocou personalizovanej výživy.

**Kľúčové slová:** nutričná genomika, obezita, interakcia gén – diéta, personalizovaná výživa

### *Nutritional genomics: a new approach to the treatment of obesity*

Food intake has a significant impact on the health of the individual. Food nutrients can interact with genes regulating their expression what results in the changes in metabolic pathways leading to an increased chronic disease risk, such as obesity. The prediction of individual disease susceptibility, disease prevention and the attenuation of disease progression are the primary goals for nutritional genomics. It seeks for the association between the individual's genomic profile and his or her health status, and it focuses on the health optimisation using personalized nutrition.

**Keywords:** nutritional genomics, obesity, gene-diet interaction, personalized nutrition

**NewsLab, 2018; roč. 9 (1): 38 – 41**

### Úvod

Príjem potravy a prostredie sú dva hlavné faktory ovplyvňujúce zdravotný stav jedinca<sup>(1)</sup>. Živiny, mikroživiny a fytochemikálie z potravy majú schopnosť interagovať s génmi, pričom môže dochádzať k zmene expresie génov a následne i molekulárnych mechanizmov príslušných fyziologických funkcií organizmu ako odpoveď na prostredie<sup>(2)</sup>. Nevyvážená diéta mení interakciu medzi génmi a živinami, čím sa zvyšuje riziko rozvoja chronického ochorenia, ako je napr. diabetes, obezita a pod. Esenciálne živiny, ako sú karbohydráty, aminokyseliny, mastné kyseliny, vápnik, zinok, selén, kyselina listová, vitamíny A, C, E, a neesenciálne bioaktívne komponenty môžu ovplyvňovať génovú expresiu priamo ako ligandy pre transkripčné faktory alebo nepriamo ako živiny metabolizované primárnou alebo sekundárnou dráhou, kde môže dochádzať k modifikácii bunkových procesov asociovaných so zdravotným stavom<sup>(3,4)</sup>.

Po skompletizovaní sekvencie ľudského genómu nastal rozvoj nových technológií a metodológií v biologickej i medicínskej sfére. Spolu s pokrokmi v bioinformatike nastávali aj pokroky v omics technológiách, ako genomika, transkriptomika, proteomika a metabolomika, a systémovej biológie, ktorá kombinuje omics technológie na štúdium genómu, transkriptómu, proteómu a metabolómu s bioinformatickými modeláciami a analýzami<sup>(5,6)</sup>. Vnesenie princípov nutričnej vedy do genomiky dalo vznik nutričnej genomike, ktorej hlavnou úlohou je skúmať, ako genetické faktory ovplyvňujú odpoveď na diétu, pričom tento vedný odbor kombinuje celé omics pole na definovanie „zdravého“ fenotypu<sup>(7)</sup>.

### Nutričná genomika

Nutričná genomika je vedný odbor kombinujúci dve výskumné oblasti, nutrigenomiku a nutrigenetiku. Obe polia sú veľmi úzko prepojené a hoci využívajú rozličné metodológie v pochopení vzťahu medzi génmi a diétou, resp. nutrientmi z potravy, ich spoločným cieľom je optimalizácia zdravia pomocou personalizovanej výživy, v rámci ktorej sa diéta predpisuje na základe unikátneho genetického profilu jedinca<sup>(3,7)</sup>.

Nutrigenomika študuje vplyv dietetických faktorov na génovú expresiu jedinca a následný vplyv na transkriptóm, proteóm a metabolóm buniek, tkanív, orgánov alebo organizmu v určitom čase<sup>(4,5)</sup>. Skúma spôsob interakcie medzi génmi, proteínmi a metabolitmi a jeho aplikáciu v personalizovanej výžive<sup>(8)</sup>.

Nutrigenetika identifikuje a charakterizuje génové varianty asociované s rozdielnymi odpoveďami na živiny. Dvaja rozliční jedinci majú na 99,9 % identický genóm na úrovni sekvencie génov a iba 0,1 % tvoria odlišnosti v genóme, ktorých dôsledkom môžu byť rozdiely v génovej expresii a pozmenená aktivita makromolekúl, čím môže dochádzať k rozličným fenotypovým prejavom a rozdielnym náchylnostiam na určité ochorenia. Z týchto odlišností 90 % tvoria jednonukleotidové zámety (SNP), zvyšných 10 % je tvorených inými štruktúrnymi zmenami DNA, ako sú inzercie, delécie, translokácie, zmeny v počte kópií alebo segmentálne duplikácie. V ľudskom genóme sa nachádza viac než 10 miliónov bežných SNP. Niektoré z týchto SNP, prípadne interakcia viacerých SNP, môžu ovplyvňovať syntézu a funkciu proteínov, čím dochádza k zmene metabolickej odpovede na nutričné prostredie, a preto sú hlavným determinantom rozdielov v prípade individuálnej potreby živín<sup>(3)</sup>.



## Variety asociované s obezitou

Obezita je komplexné ochorenie asociované so závažnými sprievodnými ochoreniami, ako je cukrovka 2. typu (T2D – type 2 diabetes), vysoký krvný tlak, ischemická choroba srdca a niektoré formy rakoviny. Môže byť podmienená vplyvom genetických alebo environmentálnych faktorov, ako je stravovanie, fyzická aktivita a iné. Dedičnosť prispieva k 30 až 70 % variability telesnej hmotnosti a je do nej zapojených vyše 600 chromozomálnych oblastí, pričom pokroky v nutrigenomickom výskume pomáhajú identifikovať stále nové kandidátne gény a genetické varianty asociované s obezitou<sup>(9)</sup>.

V roku 2007 bol prvýkrát asociovaný SNP polymorfizmus vo *FTO* géne s telesnou hmotnosťou u ľudí. 16 % jedincov homozygotných pre rizikóvu A-alelu vo variante rs9939609 malo 1,67x zvýšené riziko obezity a vážilo priemerne o 3 kilogramy viac v porovnaní s tými, ktorí túto alelu neniesli<sup>(10)</sup>. Brunkwall a spol. tieto zistenia ďalej potvrdili, keď asociovali A-alelu s vyššou telesnou hmotnosťou a BMI a tiež rs9939609 spojili s určitými preferenciami v stravovaní. Jedinci homozygotní pre A-alelu mali signifikantne zvýšený príjem proteínov<sup>(11)</sup>, u T2D pacientov s rovnakým genotypom bol zistený zvýšený príjem tukov a znížený príjem vlákniny nezávisle na BMI<sup>(12)</sup>. Prenášači rizikovej A-alely sú menej responzívni na interné signály presýtenia v porovnaní s jedincami nesúcimi TT genotyp<sup>(11)</sup>. Vysoký príjem tukov a nízky príjem karbohydrátov a vlákniny zvyrazňuje asociáciu medzi rs9939609 a zvýšeným rizikom obezity<sup>(13,14)</sup>, ktorá môže byť ešte viac zdôraznená nízkou fyzickou aktivitou<sup>(13)</sup>. Kilpeläinen a spol. identifikovali interakciu medzi minoritnou A-alelou rs9939609 a fyzickou aktivitou s tým, že riziko obezity je o 27 % nižšie u fyzicky aktívnych ľudí v porovnaní s inaktívnymi<sup>(15)</sup>.

Adherenciou na stredomorskú diétu možno utlmiť rozličné poruchy asociované s metabolickým syndrómom cez interakciu gén – diéta. *FTO*-rs9939609 bol asociovaný s vyšším rizikom T2D pri nízkej adherencii na túto diétu nezávisle od BMI, zatiaľ čo vysoká adherencia oslabuje túto asociáciu. Rovnaká interakcia s adherenciou na stredomorskú diétu ako pri rs9939609 bola pozorovaná pri rs17782313 v géne *MC4R*. Ortega-Azorín a spol. pri testovaní genetického skóre rs9939609 a rs17782313 zistili, že tieto dva polymorfizmy majú aditívny efekt na interakciu gén – diéta<sup>(16)</sup>. Polymorfizmus rs3812316 v géne *MLXIPL* bol asociovaný s rozličnými kardiometabolickými výstupmi. Homozygoti pre GG mali nižšie koncentrácie triglyceridov v krvi a tiež nižšie riziko T2D, pričom G-alela má pri vysokej adherencii na stredomorskú diétu protektívny efekt na hypertriglyceridémiu. Tiež bol pozorovaný zvýšený benefičný efekt tejto alely na kardiovaskulárne ochorenia<sup>(17)</sup>. *TCF7L2*-rs7903146 je silným genetickým determinantom rizika T2D a zvýšených koncentrácií krvnej glukózy. Jedinci homozygotní pre rizikóvu T-alelu mali vyššie riziko T2D, vyššie koncentrácie glukózy a boli náchylní na zvýšené hladiny cholesterolu, LDL a triglyceridov v krvi v porovnaní s inými genotypmi. Vysoká adherencia na stredomorskú diétu u TT jedincov utlmovala nárast koncentrácie glukózy a znižovala riziko mŕtvice v porovnaní s jedincami, ktorí túto diétu nedodržiavali. Adherencia na stredomorskú diétu redukovala riziko mŕtvice u náhodne vybraných ľudí nesúcich TT v rs7903146, ktorým bola táto diéta predpísaná<sup>(18)</sup>.

Kým predchádzajúce výskumy prezentovali benefičné účinky diéty ako celku a nie iba konkrétnych jej zložiek, nasledujúce štúdie demonštrujú vplyv príjmu tukov na stratu telesnej hmotnosti a rozvoj metabolického syndrómu. Stocks a spol. preukázali interakciu medzi rs987237 polymorfizmom v géne *TFAP2B* a stratou hmotnosti pri energeticky reštrikčnej diéte s rozdielnym podielom tuku. Jedinci nesúci genotyp AA mali vyššiu stratu hmotnosti pri konzumácii nízkokalorickej diéty s nízkym podielom tukov a, naopak, jedinci s GG genotypom strácali viac telesnej hmotnosti pri nízkokalorickej diéte s vyšším obsahom tukov<sup>(19)</sup>. Schüler a spol. odhalili vplyv interakcie medzi príjmom tukov a polymorfizmom rs4343 v géne *ACE* na metabolizmus glukózy, inzulínovú rezistenciu a riziko T2D u zdravých a neobéznych jedincov. V prípade, že u jedincov homozygotných pre G-alelu tvoril príjem tukov 37 % energie a viac, bolo u nich zistené zvýšené riziko poruchy glukózového metabolizmu a T2D<sup>(20)</sup>. Bola nájdená interakcia medzi polymorfizmom rs12970134 v *MC4R* géne a západným dietetickým vzorom a s ním spojeným príjmom tukov na rozvoj metabolického syndrómu asociovaného s T2D a kardiovaskulárnymi ochoreniami. Prenášači A-alely v rs12970134 v *MC4R* géne mali vyššie riziko metabolického syndrómu pri vysokom príjme nasýtených mastných kyselín v potrave (14 % z energetického príjmu) v porovnaní s jedincami s GG genotypom, u ktorých konzumácia vyššieho množstva nasýtených mastných kyselín nemala žiaden vplyv. Tiež bol zistený modifikujúci efekt zelenej zeleniny, nealkoholických nápojov, červeného mäsa s príjmom železa z potravy na hladiny HDL a plazmatické hladiny glukózy a triglyceridov. Včasné obmedzenie západného dietetického vzoru a príjem väčšieho množstva zeleniny je vhodnou stratégiou na prevenciu metabolického syndrómu<sup>(21)</sup>.

Variety rs76353203, rs138326449, rs147210663, rs140621530 v géne *APOC3* boli asociované s efektmi na hladinu triglyceridov v krvi. V porovnaní s neprenášačmi prenášači rizikovej alely v niektorom z týchto štyroch variantov mali o 39 % nižšie plazmatické hladiny triglyceridov, o 22 % vyšší HDL cholesterol, o 16 % nižší LDL cholesterol, hladiny cirkulujúcich *APOC3* o 46 % nižšie a redukované riziko koronárneho ochorenia srdca o 40 %. Tieto výsledky naznačujú, že strata funkcie *APOC3* má ateroprotektívne účinky<sup>(22)</sup>.

Príkladom vplyvu génovej dávky na adipozitu je gén *AMY1* kódujúci slinnú amylázu. Zvýšený počet kópií *AMY1* bol pozitívne asociovaný s hladinou enzýmov *AMY1*, zatiaľ čo nízky počet kópií *AMY1* spôsobuje znížené hladiny slinnej amylázy, čo zvyšuje riziko obezity aj hodnotu BMI<sup>(23)</sup>.

## Personalizovaná výživa

Nutričná genomika je desaťročia používaná na utlmenie škodlivých efektov vrodenej metabolických chýb, ako je napr. fenylnketonúria, laktózová intolerancia, celiakia a iné, pre ktoré sú špecificky navrhnuté dietetické postupy<sup>(24)</sup>. Je snaha priniesť podobné princípy na prevenciu a liečbu bežných chronických ochorení. Nutričné vedy študovali efekty živín v rámci „priemernej“ odpovede, ktorá sa vo všeobecnosti považuje za „normálnu“, bez ohľadu na interindividuálne rozdiely vo vyžadovaní živín. Väčšina dietetických odporúčaní je rozdelených na základe pohlavia a veku, avšak to nie sú jediné faktory, ktoré by mali byť brané do úvahy v prípade

navrhovania stravovacieho režimu. Jedna diéta nesedí všetkým a rovnaký prísun nutrientu môže spôsobiť rôzne odpovede u rozličných osôb, čo je spôsobené interakciou genetických, metabolických a environmentálnych faktorov<sup>(8,25,26)</sup>.

Cieľom personalizovanej výživy je inkorporácia biologickej individuality do dietetických odporúčaní. Na jej získanie sú potrebné informácie o pacientovom genotype, epigenóme, transkriptóme a proteóme v príslušných tkanivách a telesných tekutinách. Základom je poznať panel vybraných DNA variantov, ktoré udávajú, ako budú dietetické komponenty absorbované, metabolizované a ďalej využité<sup>(26)</sup>.

Goni a spol. (2015) sledovali interakciu medzi hodnotou genetického rizika (GRS – genetic risk score), diétou a predikciou obezity. Na základe počtu rizikových alel 16 vybraných variantov génov, ktoré boli predošle asociované s obezitou alebo narušeným metabolizmom lipidov (*FTO*-rs9939609, *MC4R*-rs17782313, *MTHFR*-rs1801133, *PPARA*-rs1800206, *PPARG*-rs1801282, *APOA5*-rs662799, *APOE*-rs429358, *APOE*-rs7412, *LIPC*-rs1800588, *PLIN1*-rs894160, *NOS3*-rs1799983, *GCKR*-rs1260326, *LPL*-rs328, *CELSR2*-rs12740374, *CETP*-rs1800777, *LIPG*-rs4939883), boli jedinci rozdelení do dvoch skupín. Skupina s vysokým rizikom obezity (GRS > 7) mala vyššie hodnoty v znakoch súvisiacich s obezitou v porovnaní so skupinou klasifikovanou ako nízkoriziková (GRS ≤ 7). Vyšší príjem energie bol asociovaný s vyšším percentom telesného tuku v oboch skupinách, pričom efekt na adipozitu bol vo vysokorizikovej skupine vyšší. Tieto výsledky naznačujú, že interakcia medzi GRS a diétou uľahčuje predpísanie individualizovanej výživy na základe genotypu<sup>(27)</sup>.

Podľa zistení štúdie zameranej na testovanie adherencie na stredomorskú diétu bolo skóre tejto adherencie vyššie v skupine jedincov, ktorým bola diéta predpísaná na základe genotypu v porovnaní s kontrolnou skupinou, ktorá dostala nepersonalizované dietetické odporúčania. Brali sa do úvahy lokusy asociované s BMI, telesnou hmotnosťou a obvodom pásu (*FTO*-rs9939609), omega-3 polynenasýtenými mastnými kyselinami (*FADS1*-rs174546), príjmom tuku (*TCF7L2*-rs7903146), nasýtených tukov (*ApoE*(e4)-rs429358/rs7412) a folátu (*MTHFR*-rs1801133). Tieto výsledky ilustrujú, ako personalizovaná diéta navrhnutá na mieru podľa genetickej informácie jedinca môže viesť k významným zmenám v jeho dietetických zvykoch v porovnaní so všeobecnými dietetickými odporúčaniami<sup>(8,28)</sup>.

Personalizovaná výživa môže vylepšiť zdravotný štýl tým, že predpovedá náchylnosť jedinca na určité ochorenia, poskytuje informácie, ako predchádzať týmto ochoreniam, a tiež je nástrojom na zmiernenie progresu ochorenia<sup>(26)</sup>. Navrhnutie dietetických odporúčaní na základe genómového profilu jedinca je v súčasnosti dostupné i na Slovensku, či už objednaním priameho testu od zahraničnej spoločnosti, alebo cez domáce spoločnosti, ktoré takéto analýzy dokážu vykonať, interpretovať a sprostredkovať. Pri interpretácii a aplikácii výsledkov ponúkaných testov je však potrebné mať vždy na zreteli povahu a rozsah vykonaných genetických testov, ako aj ich limitácie, či už technického, alebo biologického charakteru. Ich interpretáciu a aplikáciu by mal preto vykonávať vždy erudovaný odborník s potrebnými skúsenosťami v danom odbore, prípadne v kombinácii dotknutých odborov.

## LITERATÚRA

- Ronteltap A, van Trijp JCM, Renes RJ. Consumer acceptance of nutrigenomics-based personalised nutrition. *British Journal of Nutrition* 2009; 101(1): 132-144.
- Harland JL. Nutrition and genetics. Mapping individual health. ILSI Europe Concise Monograph Series 2005.
- Kaput J, Rodriguez RL. Nutritional genomics: the next frontier in the postgenomic era. *Physiol Genomics* 2004; 16(2): 166-177.
- Trujillo E, Davis C, Milner J. Nutrigenomics, proteomics, metabolomics, and the practice of dietetics. *J Am Diet Assoc* 2006; 106: 403-413.
- Dalmiel L, Vargas T, Molina AR. Nutritional genomics for the characterization of the effect of bioactive molecules in lipid metabolism and related pathways. *Electrophoresis Journal* 2012; 33(15): 2266-2289.
- Westerhoff HV, Verma M, Nardelli M, a spol. Systems biochemistry in practice: experimenting with modelling and understanding, with regulation and control. *Biochem Soc Trans* 2010; 38(5): 1189-1196.
- Fenech M, El-Sohemy A, Cahill L, a spol. Nutrigenetics and nutrigenomics: viewpoints on the current status and applications in nutrition research and practice. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2011; 4(2): 69-89.
- de Toro-Martín J, Arsenaault BJ, Després JP, a spol. Precision Nutrition: A Review of Personalized Nutritional Approaches for the Prevention and Management of Metabolic Syndrome. *Nutrients* 2017; 9(8): 913.
- Martinez-Hernandez A, Enriquez L, Moreno-Moreno MJ, a spol. Genetics of obesity. *Public Health Nutr* 2007; 10: 1138-1144.
- Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, a spol. A Common Variant in the *FTO* Gene Is Associated with Body Mass Index and Predisposes to Childhood and Adult Obesity. *Science* 2007; 316(5826): 889-894.
- Brunkwall L, Ericson U, Hellstrand S, a spol. Genetic variation in the fat mass and obesity-associated gene (*FTO*) in association with food preferences in healthy adults. *Food Nutr Res* 2013; 57: 10.3402/fnr.v57i0.20028.
- Steemburgo T, Azevedo MJ, Gross JL, a spol. The rs9939609 polymorphism in the *FTO* gene is associated with fat and fiber intakes in patients with type 2 diabetes. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2013; 6(2): 97-106.
- Sonestedt E, Roos C, Gullberg B, a spol. Fat and carbohydrate intake modify the association between genetic variation in the *FTO* genotype and obesity. *Am J Clin Nutr* 2009; 90(5): 1418-1425.
- Lappalainen T, Lindström J, Paananen J, a spol. Association of the fat mass and obesity-associated (*FTO*) gene variant (rs9939609) with dietary intake in the Finnish Diabetes Prevention Study. *Br J Nutr* 2012; 108(10): 1859-1865.
- Kilpeläinen TO, Qi L, Brage S, a spol. Physical activity attenuates the influence of *FTO* variants on obesity risk: a meta-analysis of 218,166 adults and 19,268 children. *PLoS Med* 2011; 8(11): e1001116.
- Ortega-Azorín C, Sorlí JV, Asensio EM, a spol. Associations of the *FTO* rs9939609 and the *MC4R* rs17782313 polymorphisms with type 2 diabetes are modulated by diet, being higher when adherence to the Mediterranean diet pattern is low. *Cardiovasc Diabetol* 2012; 11: 137.
- Ortega-Azorín C, Sorlí JV, Estruch R, a spol. Amino acid change in the carbohydrate response element binding protein is associated with lower triglycerides and myocardial infarction incidence depending on level of adherence to the Mediterranean diet in the PREDIMED trial. *Circ Cardiovasc Genet* 2014; 7(1): 49-58.
- Corella D, Carrasco P, Sorlí JV, a spol. Mediterranean diet reduces the adverse effect of the *TCF7L2*-rs7903146 polymorphism on cardiovascular risk factors and stroke incidence: a randomized controlled trial in a high-cardiovascular-risk population. *Diabetes Care* 2013; 36: 3803-3811.
- Stocks T, Ångquist L, Banasik K, a spol. *TFAP2B* Influences the Effect of Dietary Fat on Weight Loss under Energy Restriction. *PLoS ONE* 2012; 7(8): e43212.
- Schüler R, Osterhoff MA, Frahnow T, a spol. Dietary Fat Intake Modulates Effects of a Frequent *ACE* Gene Variant on Glucose Tolerance with association to Type 2 Diabetes. *Scientific Reports* 2017; 7: 9234.
- Koochakpoor G, Daneshpour MS, Mirmiran P, a kol. The effect of interaction between Melanocortin-4 receptor polymorphism and dietary factors on the risk of metabolic syndrome. *Nutr Metab (Lond)* 2016; 13: 35.

22. The TG and HDL Working Group of the Exome Sequencing Project, National Heart, Lung, and Blood Institute. Loss-of-Function Mutations in *APOC3*, Triglycerides, and Coronary Disease. *N Engl J Med* 2014; 371(1): 22-31.
23. Falchi M, El-Sayed Moustafa JS, Takousis P, a spol. Low copy number of the salivary amylase gene predisposes to obesity. *Nat Genet* 2014; 46(5): 492-497.
24. Bouchard C, Ordovas JM. Fundamentals of nutrigenetics and nutrigenomics. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2012; 108: 1-15.
25. Ferguson JF, Allayee H, Gerszten RE, a spol. Nutrigenomics, the Microbiome, and Gene-Environment Interactions: New Directions in Cardiovascular Disease Research, Prevention, and Treatment: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circ Cardiovasc Genet* 2016; 9(3): 291-313.
26. Betts JA, Gonzalez JT. Personalised nutrition: What makes you so special? *Nutr Bull* 2016; 41(4): 353-359.
27. Goni L, Cuervo M, Milagro FI, a spol. A genetic risk tool for obesity predisposition assessment and personalized nutrition implementation based on macronutrient intake. *Genes Nutr* 2015; 10(1): 445.
28. Livingstone KM, Celis-Morales C, Navas-Carretero S, a spol. Effect of an Internet-based, personalized nutrition randomized trial on dietary changes associated with the Mediterranean diet: the Food4Me Study. *Am J Clin Nutr* 2016; 104(2): 288-297.

**Mgr. Martina Pečimonová**

Geneton, s. r. o.

Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava

e-mail: [martina.pecimonova@geneton.sk](mailto:martina.pecimonova@geneton.sk)



## Pohľad na súčasnú klasifikáciu neuroendokrinných nádorov

Kristína Mikuš Kuracinová

Ústav patologickej anatómie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

Nádory vychádzajúce z buniek neuroendokrinného systému vytvárajú samostatnú skupinu nádorov s charakteristickou histologickou stavbou a funkčnými vlastnosťami, vyskytujúcimi sa na rôznych miestach v organizme, najmä v oblasti gastrointestinálneho systému a pľúc. Aj keď ide o nádory, ktoré zo začiatku rastú pomaly a správajú sa indolentne. Všetky majú malígný potenciál, ktorý je v mnohých prípadoch ťažko predpovedateľný a môžu metastázovať, napriek malým rozmerom primárneho nádoru. V súčasnosti neexistuje jednotná univerzálna klasifikácia a terminológia neuroendokrinných neoplázií. Tá sa odlišuje v závislosti od lokalizácie nádoru a primárne vychádza z dvoch WHO klasifikácií, z klasifikácie neuroendokrinných neoplázií gastropankreatického systému z roku 2010 a pľúc aj týmusu z roku 2015. Prognosticky je dôležitá primárna lokalizácia nádoru a jeho veľkosť, ako i histologické vlastnosti, najmä proliferatívna aktivita charakteristická prítomnosťou mitóz a expresia markera Ki-67.

**Kľúčové slová:** neuroendokrinné neoplázie; klasifikácia; histologická charakteristika nádorov

### *Overview of the present classification on the neuroendocrine tumors*

Tumors of the neuroendocrine system represent a separate group of tumors with a characteristic histological structure and functional properties occurring at various sites in the body, particularly in the gastrointestinal system and in the lungs. Although they are usually primary slowly growing tumors with the indolent behavior, all of them have malignant potential, which in many cases is difficult to predict and they can metastasise despite the small size of the primary tumor. At present, there is no uniform, universal classification and neuroendocrine neoplasms terminology. It differs depending on the location of the tumor and is based primarily on two WHO classifications, the classification of the neuroendocrine neoplasms from the gastropancreatic system from 2010 and the lungs and thymus from 2015. The prognosis depends on the primary tumor localization and its size, as well as on the histological properties, particularly on the proliferation activity characterized by the presence of mitoses and Ki67 expression.

**Keywords:** neuroendocrine neoplasms; classification; histological characteristics of tumors

**NewsLab, 2018; roč. 9 (1): 42 – 45**

### Úvod

Neuroendokrinný systém človeka tvorený bunkami so spoločnými vlastnosťami buniek nervového aj endokrinného systému predstavuje fascinujúcu skupinu buniek vyskytujúcich sa difúzne v mnohých orgánoch a tkanivách s dôležitou regulačnou úlohou. Napriek neustálemu pokračujúcemu výskumu od čias Nikolaja Kulčického zostávajú tieto bunky v mnohých ohľadoch záhadné a oprávnené aj v súčasnosti vzbudzujú pozornosť histopatológov. Sú to bunky s nejasným embryonálnym pôvodom, nespochybniteľným neural-like fenotypom a schopnosťou na základe rôznych stimulov vylučovať peptidové hormóny do krvi s dosahom na celý organizmus (endokrinná aktivita), prípadne ich hormonálna aktivita je limitovaná na okolie bunky (parakrinná aktivita)<sup>(1)</sup>.

Názov buniek vychádza z pôvodnej predstavy, že tieto bunky pochádzajú embryologicky z neurálnej lišty. Táto predstava bola už koncom minulého storočia spochybnená a v súčasnosti sa predpokladá, že bunky majú endodermálny pôvod. Ani táto predstava však nevysvetľuje všetky vlastnosti buniek a ponecháva priestor na rôzne úvahy poukazujúc na fakt, že napriek vedeckým pokrokom a súčasným technickým možnostiam zostávajú v histológii mnohé otázky nezodpovedané. Z praktického hľadiska však vzhľadom na fenotyp a funkčné vlastnosti buniek všetky klasifikácie naďalej používajú pri opise týchto buniek termín neuroendokrinný.

### Neuroendokrinné nádory

Bunky neuroendokrinného systému sú základom vzniku neuroendokrinných nádorov. Ide o nádory, ktoré sú všeobecne definované ako epitelové nádory s predominantne neuroendokrinnou diferenciáciou<sup>(2)</sup>. Frekvencia ich výskytu koreluje s hustotou neuroendokrinných buniek v tkanivách. Vo všeobecnosti sa v súčasnosti uznáva, že všetky NET majú malígný potenciál, ktorý je však v mnohých prípadoch ťažko predpovedateľný.

Ročná incidencia výskytu neuroendokrinných nádorov predstavuje 8,4 na 100 000, avšak predpokladá sa, že ich celková incidencia je vyššia, pretože mnohé ostávajú nedagnostikované<sup>(3)</sup>. NET sa typicky vyskytujú v gastrointestinálnom systéme a v pľúcach, boli však opísané aj v pohlavno-močovom systéme vrátane obličiek<sup>(4)</sup>, prostaty<sup>(5)</sup>, v ovariách<sup>(6)</sup>, prsníku<sup>(7)</sup> a v ďalších orgánoch. Neuroendokrinné nádory sa môžu klinicky prejavovať ako karcinoidový syndróm, ktorý vzniká v dôsledku zvýšeného vylučovania hormónov. Prejavuje sa vznikom záchvatovitého začervenania tváre (flush), hnačkami, bronchospazmom, môže viesť k poškodeniu srdca. Pozorujeme ho u 8 % až 35 % pacientov a je typicky asociovaný s prítomnosťou nádorov v tenkom čreve, ale aj v časti pľúcnych tumorov<sup>(8)</sup>.

V súčasnosti neexistuje jednotná univerzálna klasifikácia a terminológia neuroendokrinných nádorov. Tá sa odlišuje

v závislosti od lokalizácie nádoru. Historicky sa najdlhšie používal termín karcinoid (karcinoid, teda podobný karcinómu). Ten prvýkrát použil Siegfried Oberdorfer v roku 1907 pri opise morfológicky veľmi špecifického typu nádoru čreva pozostávajúceho z uniformných malých buniek. Aj keď sa v literatúre používanie tohto termínu opakovane kritizuje, zostal súčasťou WHO klasifikácie neuroendokrinných nádorov v pľúcach a niekedy sa nesprávne používa aj ako synonymum v bežnej komunikácii pre NET G1 v ostatných lokalizáciách<sup>(2)</sup>.

Neuroendokrinné nádory môžeme všeobecne v závislosti od gradingu zaradiť do troch skupín:

1. G1, alebo low grade, dobre diferencované neuroendokrinné tumory;
2. G2, alebo intermediate grade, dobre diferencované neuroendokrinné tumory;
3. G3, alebo high grade, slabo diferencované neuroendokrinné karcinómy.

Kritériá na zaradenie nádoru do jednotlivých skupín sú však odlišné v závislosti od lokalizácie tumoru (**tabuľka 1-3**).

Podľa výskytu rozlišujeme 3 najčastejšie skupiny neuroendokrinných nádorov, tie, ktoré vychádzajú z buniek gastrointestinálneho traktu (okrem pankreasu), z pankreasu (tiež známe ako tumory buniek ostrovčekov pankreasu) a neuroendokrinné nádory, ktoré vyrastajú z bronchopulmonálneho systému. V minulosti sa často používala aj schéma rozdelenia nádorov podľa rôznych úsekov embryonálneho čreva na karcinoidy predného (foregut), stredného (midgut) a zadného (hindgut) čreva. Aj keď je táto klasifikácia v súčasnosti už prekonaná, poukazuje na vzťah medzi morfológiou a topografiou výskytu, ktorý má význam aj v súčasnosti.

Súčasná terminológia vychádza primárne z dvoch WHO klasifikácií, a to z:

1. klasifikácie gastroenteropankreatických neuroendokrinných nádorov z roku 2010<sup>(9)</sup> (**tabuľka 1**)
2. klasifikácie neuroendokrinných nádorov pľúc a týmusu z roku 2015<sup>(10)</sup> (**tabuľka 1**).

Problematické je aj používanie pojmov karcinóm a tumor, ktoré v literatúre často nie je jednotné. WHO odporúča vo svojich klasifikáciách používať pojem karcinóm len pre high grade neuroendokrinné nádory.

Okrem čistých NET rozoznávame zmiešané tumory s neuroendokrinnými a epitelovými vlastnosťami, napr. zmiešané adenoneuroendokrinné karcinómy (MANEC), v ktorých každý komponent tvorí viac ako 30 % tumoru. Opísané sú aj dlaždicovobunkové karcinómy koexistujúce s neuroendokrinnými tumorami<sup>(9)</sup>.

Prognóza jednotlivých skupín súvisí najmä s gradingom, ktorý závisí hlavne od proliferatívnej aktivity nádoru. Tá je podmienená počtom mitotických figúr na 10 HRF, resp. pozitívitou imunomarkera Ki-67.

### Neuroendokrinné nádory gastrointestinálneho traktu

Gastrointestinálne neuroendokrinné nádory predstavujú geneticky rôznorodú skupinu nádorov, vyrastajú z buniek, produkujúcich hormóny koordinujúce funkciu čriev a spôsobujúce charakteristický hormonálny syndróm. V závislosti od hormonálnej produkcie môžu byť tieto nádory klinicky symptomatické „funkčné“ alebo tiché „nefunkčné“. Incidencia nádorov závisí od lokalizácie, najčastejšie sú pozorované v tenkom čreve a pankrease (39 %), apendixe (26 %) a rekte (15 %); najmenej často postihujú hrubé črevo (5 – 7 %) a žalúdok (2 – 4 %) <sup>(11,12)</sup>. V GIT existuje najmenej 13 typov neuroendokrinných buniek produkujúcich bioaktívne peptidy alebo amíny. Tvorba jednotlivých hormónov je často závislá od lokalizácie primárneho nádoru. Štúdie však nepreukázali jednoznačne prediktívnu hodnotu hladiny príslušných hormónov v sére v korelácii s malígnym potenciálom nádoru<sup>(8)</sup>.

Kým v minulosti sa nádory označovali súborne ako karcinoidy (WHO klasifikácia z roku 1980), súčasná klasifikácia z roku 2010 rozpoznáva neuroendokrinné tumory grade 1 a 2, neuroendokrinné karcinómy grade 3 a zmiešané nádory (**tabuľka 1**). Zaradenie tumoru do klasifikácie a jeho prognóza závisia od definovaných histologických vlastností, ako je veľkosť tumoru, lymfovaskulárna invázia, prerastanie do

**Tabuľka 1.** Klasifikácia neuroendokrinných neoplázií pochádzajúcich z gastropankreatického systému podľa WHO z roku 2010 a pľúc aj týmusu podľa WHO z roku 2015<sup>(9, 13-15)</sup>

	WHO klasifikácia gastrointestinálnych neuroendokrinných neoplázií (2010)	WHO klasifikácia neuroendokrinných neoplázií pľúc a týmusu (2015)
<b>Grade 1 low grade</b>	NET G1 Neuroendokrinný tumor grade 1	Typický karcinoid
<b>Grade 2 intermediate grade</b>	NET G2 Neuroendokrinný tumor grade 2	Atypický karcinoid
<b>Grade 3 high grade</b>	NEC Malobunkový neuroendokrinný karcinóm Veľkobunkový neuroendokrinný karcinóm Zmiešaný adenoneuroendokrinný karcinóm (MANEC)	Malobunkový karcinóm Veľkobunkový neuroendokrinný karcinóm Kombinovaný veľkobunkový neuroendokrinný karcinóm

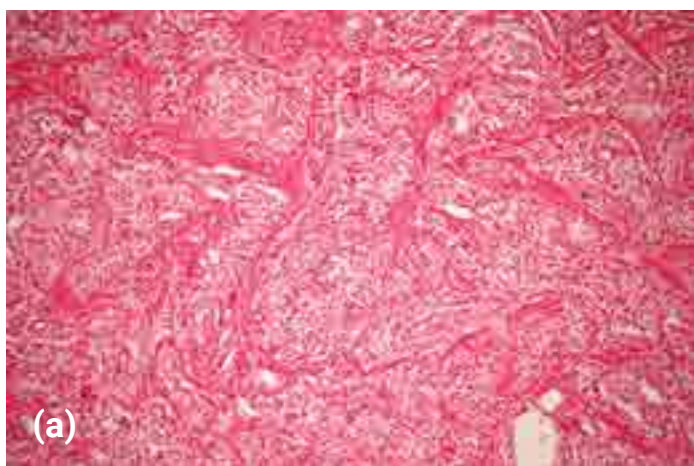
**Tabuľka 2.** Grading a charakteristika neuroendokrinných nádorov z gastropankreatického systému<sup>(9)</sup>

	NET G1 Neuroendokrinný tumor grade 1	NET G2 Neuroendokrinný tumor grade 2	NEC Neuroendokrinný karcinóm
Počet mitóz/10 HPF	< 2	2 – 20	> 20
Pozitivita Ki-67	< 2 %	3 % – 20 %	> 20 %

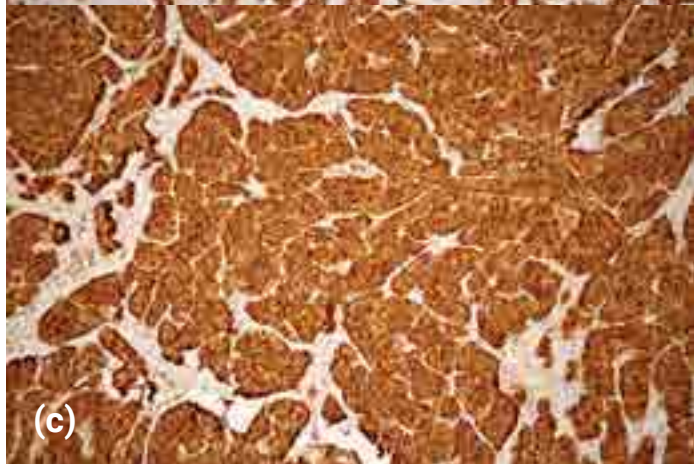
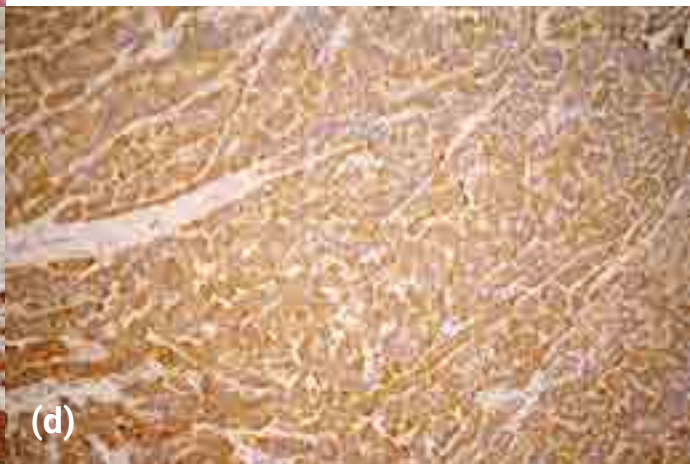


**Tabuľka 3.** Grading a charakteristika neuroendokrinných nádorov pľúc<sup>(10)</sup>

	Typický karcinoid	Atypický karcinoid	Veľkobunkový neuroendokrinný karcinóm	Malobunkový karcinóm
Počet mitóz/10 HPF	< 2	2 – 10	> 10	> 10
Nekrózy	chýbajú	ložiskovo	+ rozsiahle	+ rozsiahle
Morfológia	Uniformné, Polygonálne bunky usporiadané v trabekulách alebo v hniezdach	Polygonálne bunky usporiadané v trabekulách alebo v hniezdach	Veľké bunky, menej cytoplazmy, okrúhle jadro, jadierka, neuroendokrinná morfológia (hniezda, palisádovanie, rozety)	Malé bunky, malé množstvo cytoplazmy, bez jadierok, zrnitý chromatin jadier
IHC (synaptofyzín, chromogranín, CD56)	+	+	+ 80 – 90 %	+ 80 – 90 %
IHC (TTF1)	väčšinou negatívne	väčšinou negatívne	+ 50 %	+ 85 %



**Obrázok 1.** Neuroendokrinný tumor žalúdka grade 1 (NET G1). Dobre diferencovaný neuroendokrinný tumor žalúdka, s tvorbou typických nádorových hniezd bez výraznejšej mitotickej aktivity (a). Imunohistochemicky vykazujú bunky pravidelnú silnú pozitívitu cytokeratínov AE1/3 (b), chromogranínu (c) a stredne silnú pozitívitu synaptofyzínu (d). Proliferačná aktivita Ki-67 je menšia ako 1 % (e). IHC, polymer-Ms-HRP, DAB, 200x.





susedných orgánov, a od prítomnosti metastáz; z histopatologického hľadiska je však rozhodujúci počet mitóz a percento Ki-67 pozitívnych buniek (**tabuľka 2**)<sup>(9)</sup>.

### Neuroendokrinné nádory pľúc a týmusu

Primárne pľúcne neuroendokrinné nádory predstavujú pomerne heterogénnu skupinu tumorov, čo môže spôsobovať problémy pri diagnostike. Nové poznatky o neuroendokrinných nádoroch pľúc viedli v predchádzajúcom období k zásadným zmenám pohľadu na túto skupinu pľúcnych nádorov.

Súčasná klasifikácia z roku 2015 rozlišuje viacero skupín. V klasifikácii zostal zachovaný termín karcinoid. Kým typický a atypický karcinoid patria medzi malígne nádory s nízkym a so stredným stupňom malignity (grade 1 a 2), veľkobunkový a malobunkový neuroendokrinný karcinóm sú príkladom nádorov s vysokým stupňom malignity. Hranica medzi typickým a atypickým karcinoidom je definovaná počtom nájdených mitóz (**tabuľka 3**). Odlíšenie týchto dvoch tumorov je veľmi dôležité vzhľadom na to, že predstavujú závažný prognostický faktor. Atypický karcinoid častejšie metastázuje, 5-ročné prežívanie je 90 % v prípadoch typického a 60 % v prípadoch atypického karcinoidu<sup>(13)</sup>. Malobunkový a veľkobunkový

neuroendokrinný karcinóm majú na rozdiel od nich veľmi zlú prognózu s 2-ročným prežívaním 10 % v prípade metastatickej choroby. Aj keď sú podobné biologickým správaním, ide o morfológicky, fenotypicky aj geneticky odlišné klinické jednotky s prekrývajúcimi sa črtami. Zaujímavý je vzťah medzi nálezom nádorov a fajčením. Kým približne 40 % pacientov s karcinoidom sú nefajčiari, prakticky všetci pacienti s neuroendokrinným karcinómom sú ťažkí fajčiari<sup>(14)</sup>.

Histologické diagnostické kritériá pľúcnych neuroendokrinných nádorov sú presne definované a korelujú s klinickým správaním nádoru. Morfológia je síce charakteristická, najmä v prípade veľkobunkového NEC je však nutné aj imunohistochemické potvrdenie. Kľúčovým v histopatologickej diagnostike je dôkaz pozitivity markerov synaptofyzínu, chromogranínu a CD56, ktoré však v prípade high grade tumorov nemusia byť prítomné konštantne<sup>(13)</sup>.

**PodĎakovanie:** Tento článok vznikol vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: Dobudovanie multidisciplinárneho centra pre biomedicínsky výskum – BIOMEDIRES, ITMS 26210120041.

### LITERATÚRA

- Rosai J. The origin of neuroendocrine tumors and the neural crest saga. *Mod Pathol* 2011; 24(Suppl 2): S53-7.
- Klimstra DS, Modlin IR, Coppola D, et al. The pathologic classification of neuroendocrine tumors: a review of nomenclature, grading, and staging systems. *Pancreas* 2010; 39(6): 707-712.
- Salyers WJ, Vega KJ, Munoz JC, et al. Neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract: Case reports and literature review. *World J Gastrointest Oncol* 2014; 6(8): 301-310.
- Dvorackova J, Macak J, Brzula P, et al. Primary neuroendocrine carcinoma of the kidney. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2013; 157(3): 257-260.
- Li Z, Chen CJ, Wang JK, et al. Neuroendocrine differentiation of prostate cancer. *Asian J Androl* 2013; 15(3): 328-332.
- Aslam MF, Choi C, Khulpateea N. Neuroendocrine tumour of the ovary. *J Obstet Gynaecol* 2009; 29(5): 449-451.
- Rehman A. Primary neuroendocrine carcinoma of the breast. *J Coll Physicians Surg Pak* 2013; 23(4): 282-284.
- Ardill J. Circulating markers for endocrine tumours of the gastrointestinal tract. *Annals of Clinical Biochemistry* 2008; 45.
- Rindi G, Arnold RS, Bosman FT, et al. Nomenclature and classification of neuroendocrine neoplasms of the digestive system, in WHO classification of tumors of the digestive system. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, et al., Editors. 2010; IARC: Lyon: 13-14.
- Travis WD, Brambilla E, Burke AP, et al. WHO classification of tumors of the lung, pleura, thymus and heart. 4th ed. WHO classification of tumors. 2015; Lyon: IARC: 411.
- Tebbi CK, MD. Carcinoid Tumor. *Pediatrics: General Medicine* 2011; <http://emedicine.medscape.com/article/986050-overview>.
- Oberg KE. Gastrointestinal neuroendocrine tumors. *Ann Oncol* 2010; 21(Suppl 7): vii72-80.
- Beasley MB, Brambilla E, Chirieac LR, et al. Carcinoid tumour, in WHO classification of tumors of the lung, pleura, thymus and heart. Travis WD, Brambilla E, Burke AP, et al., Editors. 2015; IARC: Lyon: 73-77.
- Brambilla E, Beasley MB, Austin JHM, et al. Neuroendocrine tumors: small cell carcinoma, in WHO classification of tumors of the lung, pleura, thymus and heart. Travis WD, Brambilla E, Burke AP, et al., Editors. 2015; IARC: Lyon: 63-68.
- Brambilla E, Beasley MB, Chirieac LR, et al. Large cell neuroendocrine carcinoma, in WHO classification of tumors of the lung, pleura, thymus and heart. Travis WD, Brambilla E, Burke AP, et al., Editors. 2015; IARC: Lyon: 69-72.

MUDr. Kristína Mikuš Kuracinová

Ústav patologickej anatómie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave  
Špitálska 24, 813 72 Bratislava  
e-mail: kristina.kuracinova@gmail.com

## Celulárny angiofibróm vulvy

Michal Zámečník<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup>Laboratoře AGEL, a. s., oddělení patologie, Nový Jičín, Česká republika

Prezentovaný je zriedkavý prípad celulárneho angiofibrómu vulvy u 51-ročnej ženy. Išlo o 1,5-centimetrový tumor labium maius I. dx. Histologický obraz a imunohistochemický nález boli podobné väčšine doposiaľ opísaných prípadov. Okrem opisu nálezov sa diskutuje o diferenciálnej diagnóze angiomyxoidných lézií vulvy a ich histogenezu, s podaním stručného prehľadu literatúry.

**Kľúčové slová:** angiomyo-fibroblastóm, celulárny angiofibróm, superficiálny myofibroblastóm, vretenobunkový lipóm, vulva

### Cellular angiofibroma of the vulva. A case study report

A rare case of cellular angiofibroma of the vulva in a 51-ys-old woman is presented. It was a 1.5 cm tumour of the right maior labium. Histological and immunohistochemical findings were similar to those described previously. The tumour cells expressed vimentin, CD99, estrogen and progesterone receptor. They were negative for EMA, desmin, h-caldesmon, S100 protein, CD34, CD10, and bcl-2. Besides the case presentation, differential diagnosis and histogenesis of angiomyxoid lesions of the lower genital tract is discussed, and a brief overview of the literature is added.

**Keywords:** angiomyo-fibroblastoma, cellular angiofibroma, spindle cell lipoma, superficial myofibroblastoma, vulva

NewsLab, 2018; roč. 9 (1): 46 – 49

### Úvod

Celulárny angiofibróm (CAF) predstavuje jednu zo zriedkavých mezenchymálnych lézií vulvy a vagíny, u ktorých je diagnostika sťažená vzájomnou podobnosťou doposiaľ opísaných jednotiek<sup>(1-3)</sup>. Pre celú skupinu týchto tumorov je typická dominancia angiomyxoidnej morfológie, pričom ďalšie rozdiely medzi jednotlivými jednotkami sú často len subtílné. Okrem CAF patria do tejto skupiny angiomyxoidných lézií predovšetkým angiomyo-fibroblastóm<sup>(4)</sup> superficiálny myofibroblastóm<sup>(5)</sup>, stromálny polyp<sup>(6,7)</sup> superficiálny angiomyxóm<sup>(8)</sup> a hlboký (agresívny) angiomyxóm<sup>(9-11)</sup>. Okrem toho celý rad ďalších mezenchymálnych lézií môže mať prevahu myxoidnej zmeny strómy a výrazné zrnčenie vaskularizácie, čo ich zaraďuje taktiež do diferenciálnej diagnózy. Prezentujeme prípad CAF vulvy z našej praxe.

### Opis prípadu

Išlo o léziu labium major I. dx. u 51-ročnej pacientky. Klinicky bola supponovaná cysta a lézia bola odstránená marginálnou excíziou. Makroskopicky šlo o 15-milimetrový ohraničený nodulus mäkkej konzistencie, na reze fibromyxoidného vzhľadu. **Histologicky (obrázok 1-3)** bol tumor tvorený ohraničenou proliferáciou ovoidných až vretenovitých buniek, s jemnou fibrilárnou a myxoidnou strómou (až neuroidného vzhľadu). Dominantným rysom boli početné kapiláry, ktoré zriedka vykazovali miernu hyalinizáciu steny. V stróme bolo okrem jemných kolagénových fibríl niekoľko hrubších trám-cov kolagénu (**obrázok 3**) a nepočetné mastocyty. Jadrá boli blandné, ovoidné, s veľmi málo zreteľnými jadierkami alebo bez jadierok. Usporiadanie buniek bolo nepravidelné, bez tvorby zväzkov, zriedka bolo naznačené retiazkovité radenie

jadier. **Imunohistochemicky** bol tumor pozitívny na vimentín, CD99 (**obrázok 4**), estrogénové receptory (ER) (**obrázok 5**) a progesterónové receptory (PR). Negatívne boli CD34 (**obrázok 6**), alfa-hladkosvalový aktín, desmín, h-caldesmon, S100 proteín, EMA, p16, p53, CD10 a bcl-2. MIB1 exprimovalo menej ako 2 % buniek. Histologický a imunohistochemický nález svedčí pre CAF<sup>(1-3,12)</sup>.

### Diskusia

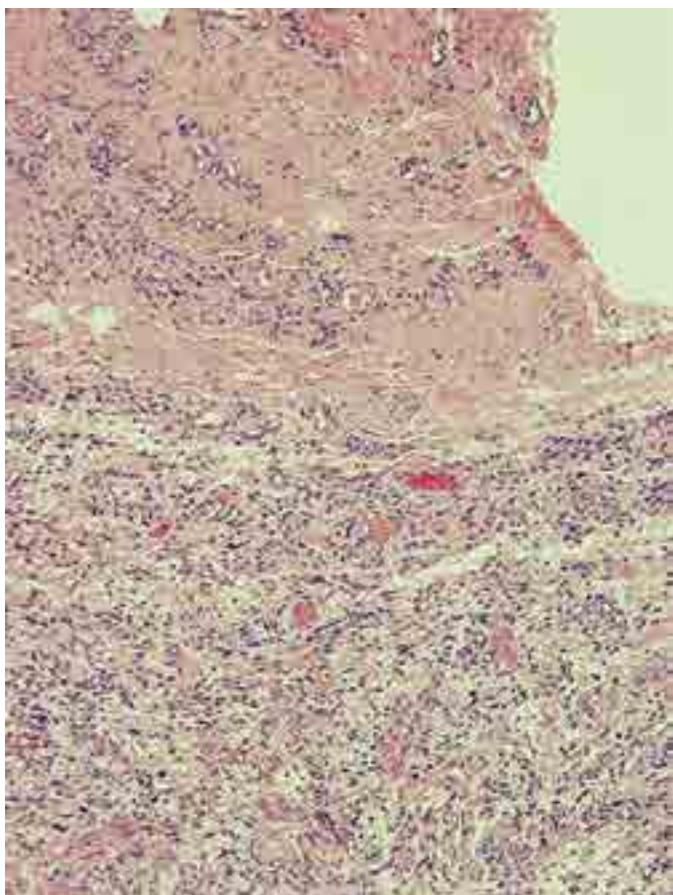
CAF v r. 1997 opísal Nucci a Fletcher<sup>(1)</sup>. Následne pribudli do písomníctva ďalšie prípady a do r. 2014 bolo opísaných vo vulvárnej lokalizácii 35 prípadov<sup>(12)</sup>. Okrem vulvy boli CAF pozorované aj vo vagíne a inguine, zriedka v extragenitálnych lokalizáciách ako retroperitoneum, anus, uretra, orálna mukóza, mihalnica, koleno<sup>(12,13)</sup>. Laskin et al. opísali tento tumor u mužov v inguinálno-skrotálnej oblasti pod názvom „angiomyo-fibroblastoma-like tumor“<sup>(14)</sup>. V najnovšej WHO klasifikácii je táto lézia zaradená do jednotky CAF<sup>(15)</sup>.

**Klinicky** ide o ženy priemerného veku 46 rokov a lézia je zväčša v labium major. Gynekológova diagnóza je najčastejšie cysta Bartholiniho žľazy či iná cysta, lipóm, leiomyóm alebo fibróm. Priemerná veľkosť opísaných lézií je 3,6 cm, v rozpätí od 0,6 do 12,3 cm. Po excízii je recidíva veľmi zriedkavá<sup>(12)</sup>. Extrémne raritné sú opisy sarkomatóznej zmeny v CAF<sup>(12,13)</sup>. Počas pomerne krátkeho „follow-up“ však tieto dediferencované tumory nerekurzovali, pozorovaní je však stále príliš málo.

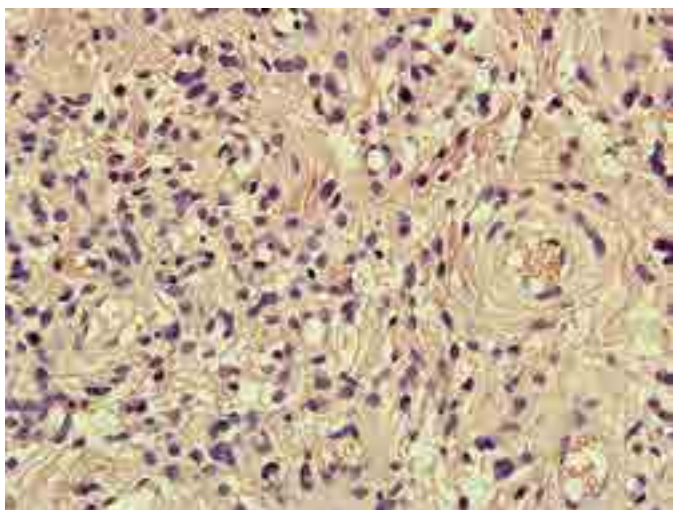
**Histologicky** je CAF ohraničená lézia. Dominujú blandné, ovoidné až vretenovité bunky a veľmi početné cievy. Bunky sú usporiadané nepravidelne, len zriedka je naznačená fascikulárna štruktúra. Jadrá sú monotónne pravidelné, ovoidné,



**Obrázok 1.** Celulárny angiofibróm. V dolnej časti celulárna štruktúra tumoru, ostro ohraničená od natívnej cievnej strómy, ktorá je zachytená v hornej časti obrázka

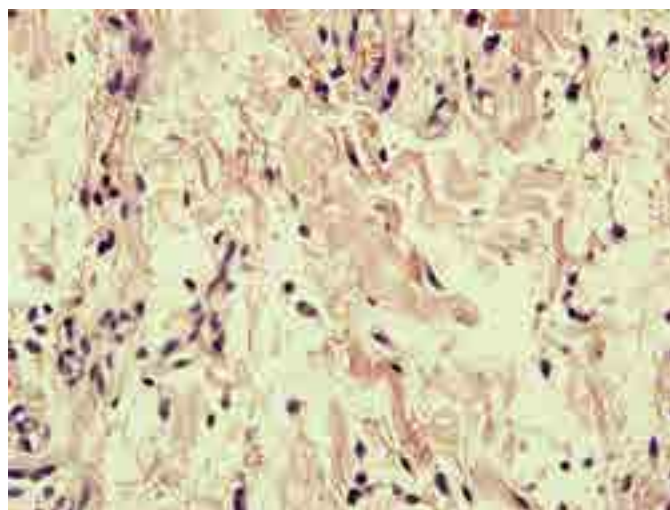


**Obrázok 2.** Celulárny angiofibróm. Časť s vyššou celularitou a ojedinelou miernou hyalinizáciou steny cievy (vpravo)



len niekedy je prítomná pseudoatypická hyperchromázia podobná symlastickej zmene v leiomyómoch. Cievny sú často hyalinizované, ale tento znak nie je konštantný, čo sme pozorovali aj v našom prípade. Podobne aj McCluggage et al. našli hyalinizáciu ciev len v 4 zo 7 prípadov<sup>(14)</sup>. Stróma je typicky jemná, fibrilárna, čo niekedy robí dojem až neurogénneho nádoru. Častá je prítomnosť adipocytov, a tak lézie pripomínajú

**Obrázok 3.** Celulárny angiofibróm. Časť s prevahou myxoidnej zmeny. V centre je zreteľný hrubší „keloid-like“ trámec kolagénu



**Obrázok 4.** Celulárny angiofibróm. Difúzna pozitivita CD99.



vretenobunkový lipóm. **Imunohistochemia** CAF je pomerne variabilná. Vždy je pozitívny vimentín, približne polovica tumorov exprimuje CD34, niektoré sú pozitívne na aktín, desmín, EMA, CD10 a CD99. Bežná je expresia ER a PR. MIB1 ukáže minimálnu proliferáciu, čo je v súlade s pozorovanou benignitou léziou. Negatívny je h-caldesmon. P16 expresia bola opísaná len v sarkomatóznej transformácii<sup>(12)</sup>.

**Diferenciálna diagnóza** zahŕňa angiomyxoidné lézie, ktoré sú buď typické pre dolnú časť genitálneho traktu, alebo ide o lézie vyskytujúce sa všeobecne v mäkkých tkanivách rôznych lokalizácií. Z prvej skupiny je to angiomyxofibroblastóm<sup>(4)</sup>, superficiálny myofibroblastóm dolného genitálneho traktu<sup>(8)</sup>, stromálny polyp<sup>(6,7)</sup>, hlboký (agresívny) angiomyxóm<sup>(9-11)</sup>, stromálny endometrioidný tumor<sup>(17)</sup>. Z druhej skupiny ide o vretenobunkový lipóm, solitárny fibrózny tumor, superficiálny angiomyxóm, nodulárnu fascitídu, neurofibróm, myxoidný dermatofibrosarcoma protuberans, dobre diferencovaný a myxoidný liposarkóm<sup>(15,18)</sup>.

Angiomyxofibroblastóm je blandnej angiomyxoidnej štruktúry, ale na rozdiel od CAF má epiteloidnú/plazmocytoidnú cytomorfológiu a myxoidnú diferenciáciu s pozitivitou desmínu<sup>(4)</sup>.



**Obrázok 5.** Celulárny angiofibróm. Expresia estrogénových receptorov vo väčšine jadier nádoru

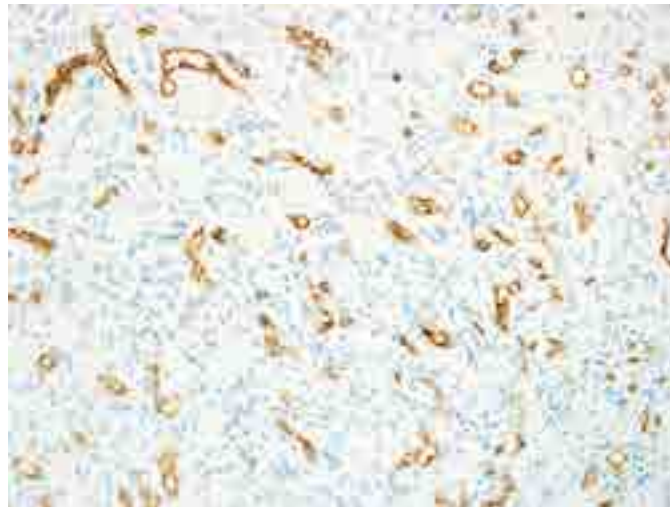


Superficiálny myofibroblastóm môže mať početné cievy, ale bunky sú viac vretenovité a zväčša sú vo fascikulárnom usporiadaní. Imunofenotyp je myofibroblastický, s expresiou desmínu a aktínu<sup>(3,4,8,16)</sup>. Stromálny polyp netvorí ohraničený nodulus, ale polypoidnú proliferáciu dosahujúcu až po epitel. Ďalej sa stromálny polyp líši od CAF myofibroblastickou diferenciáciou, podobne ako myofibroblastóm, s ktorým má pravdepodobne spoločnú histogénezu<sup>(6,7)</sup>. Agresívny angiomyxóm obsahuje početné cievy a monotónnu populáciu desmín-pozitívnych myofibroblastov. Cievy sú však usporiadané v skupinách, pričom zo stien niektorých ciev „vychádzajú“ smerom do okolitej strómy izolované hladkosvalové vlákna (dobre zreteľné v metodike na desmín)<sup>(9-11)</sup>.

Endometrioidný stromálny tumor vulvy je vo svojom fibroznom alebo myxoidnom variante veľmi podobný CAF<sup>(17)</sup>. V odlišení pomôže jeho infiltratívny spôsob rastu, výrazná pozitivita CD10 a negativita CD34. Vretenobunkový lipóm je jednotka pravdepodobne rovnakej histogénezy ako CAF. Líši sa len menším počtom ciev, častejšou „keloid-like“ kolagenizáciou a menej častou expresiou ER a PR<sup>(15,18)</sup>. Solitárny fibrózny tumor má vaskularizáciu vzhľadu hemangiopericytómového, t. j. ide o vetvené cievy, rozdielne od kapilár v CAF. CD34 a CD99 sú pri ňom pozitívne častejšie, ako to býva v CAF<sup>(15,18)</sup>. Na rozdiel od CAF je negatívny na ER a PR. Superficiálny angiomyxóm je multilobulárny, obsahuje konštantne infiltrát polynukleárov a často sú v ňom aj epitelové štruktúry (epidermoidné cysty, skvamoidný a/alebo bazaloidný epitel). Je len zriedka CD34-pozitívny a neexprimuje ER a PR<sup>(3,15,18)</sup>. Nodulárna fascitída má cytomorfológiu vretenovitých fibroblastov s jadierkami (podobnú bunkám v tkanivovej kultúre), obsahuje menej ciev, často sú v nej extravazáty a má myofibroblastický imunofenotyp negatívny na ER i PR<sup>(15,18)</sup>.

Neurofibróm zriedka obsahuje viac ciev, je pozitívny na S100 proteín a negatívny na ER a PR<sup>(15,18)</sup>. Myxoidný dermatofibrosarcoma protuberans sa líši infiltráciou okolitého tkaniva, zväčša vo forme jazykovitých výbežkov v kolagénom a tukovom väzive. Neexprimuje ER a PR<sup>(15,18-20)</sup>. Dobre diferencovaný liposarkóm s myxoidnou zmenou obsahuje lipoblasty a adipocyty, má menej ciev, exprimuje MDM2, CDK4, p16 a je negatívny na ER a PR<sup>(15,18)</sup>. Myxoidný liposarkóm má

**Obrázok 6.** Celulárny angiofibróm. CD34 sprehľadňuje vaskularizáciu lézie a je negatívna v bunkách strómy



cievy podstatne viac vetvené ako CAF, exprimuje málokedy CD34 a je negatívny na ER a PR<sup>(15,18)</sup>.

V **histogéneze** CAF sa predpokladá, že ide o tumor z fibroblastov špecializovanej strómy genitálnej oblasti. V súlade s tým sú aj pozorované expresie ER a PR<sup>(1-3)</sup>. Pri extragenitálnych léziách ide pravdepodobne o diferenciáciu fibroblastu na ER/PR pozitívny fenotyp v dôsledku pôsobenia hormonálnych faktorov<sup>(21)</sup>. Tieto fibroblastické bunky majú minimálnu alebo žiadnu myoidnú diferenciáciu (na rozdiel od myofibroblastómu a angiomyofibroblastómu). Pozoruhodná je ich častá asociácia so zrelými adipocytmi v rámci jednej lézie, čo potom spôsobuje podobnosť s vretenobunkovým lipómom. Tieto pozorovania viedli k predpokladu, že CAF a vretenobunkový lipóm sú len časťou morfológieho spektra jednej lézie<sup>(13,22)</sup>. Do tohto spektra pribudol neskôr mamárny a vulvovaginálny myofibroblastóm, ktoré sa taktiež prekrývajú s vretenobunkovým lipómom<sup>(13,22,23)</sup>. Často sa stáva, že spomenuté tumory vykazujú morfológiu a imunofenotyp hraničný medzi dvoma léziami a postupne pribúdajú opisy ďalších, menej vyhranených a variantných lézií<sup>(22,24-26)</sup> (čitateľ týchto prác musí čeliť strate prehľadu).

Metodika, ktorá by mala byť prínosom pre presnejšiu klasifikáciu týchto angiomyxoidných lézií, je molekulárna genetika. Genetické štúdie ukázali, že CAF, myofibroblastóm a vretenobunkový lipóm majú deléciu na chromozóme 13, so stratou FOXO1 lokusu (13q14)<sup>(12,22,23)</sup>, čo možno považovať za prejav spoločnej histogénezy. Z tejto skupiny angiomyxoidných lézií s absenciou FOXO1 bol vyradený angiomyofibroblastóm, ktorý danú zmenu nemá<sup>(24)</sup>. V deletovanom úseku chromozómu 13 sa nachádza okrem FOXO1 ďalší supresorový gén RB1, ktorý kóduje retinoblastómový (Rb) proteín. Tento proteín je detegovateľný imunohistochemicky, preto sa recentne odporúča zaradiť ho do diagnostického panelu<sup>(27)</sup>. Budúce štúdie prinesú naisto ďalšie upresňovanie klasifikácie. V prípade CAF by mohlo dôjsť k deleniu jednotky na molekulárne geneticky definované varianty (napr. nie je genetický rozdiel medzi CD34-pozitívnym a CD34-negatívnym CAF?; lézie so sarkomatóznou transformáciou nemajú už od začiatku špecifickú genetiku?; aký je vzťah benígnych angiomyxoidných lézií k neklasifikovateľným sarkómom vulvy?).

V kazuistike sme prezentovali celulárny CAF a diskutovali o jeho diagnostike. CAF môže klinicky aj histologicky napodobňovať iné angiomyxoidné tumory vulvy (benígne i malígne). Spomedzi imunohistochemických vyšetrení má najväčší význam dôkaz chýbajúcej, resp. len minimálnej myoidnej diferenciácie, hlavne absencia expresie desmínu. Novším prínosom by mala byť imunohistochemia retinoblastómového proteínu a genetická detekcia absencie supresorov FOXO1 a RB1. Z klinického hľadiska sa CAF v skupine benígnych angiomyxoidných lézií vulvy odlišuje od ostatných jednotiek schopnosťou sarkómovej dediferenciácie<sup>(12)</sup>.

#### LITERATÚRA

1. Nucci MR, Granter SR, Fletcher CD. Cellular angiofibroma: a benign neoplasm distinct from angiofibroma and spindle cell lipoma. *Am J Surg Pathol* 1997; 21(6): 636-644.
2. Iwasa Y, Fletcher CD. Cellular angiofibroma: clinicopathologic and immunohistochemical analysis of 51 cases. *Am J Surg Pathol* 2004; 28(11): 1426-1435.
3. Nucci MR, Fletcher CD. Vulvovaginal soft tissue tumours: update and review. *Histopathology* 2000; 36(2): 97-108.
4. Fletcher CD, Tsang WY, Fisher C, et al. Angiofibroma of the vulva. A benign neoplasm distinct from aggressive angiofibroma. *Am J Surg Pathol* 1992; 16(4): 373-382.
5. Laskin WB, Fetsch JF, Tavassoli FA. Superficial cervicovaginal myofibroblastoma: fourteen cases of a distinctive mesenchymal tumor arising from the specialized subepithelial stroma of the lower female genital tract. *Hum Pathol* 2001; 32(7): 715-725.
6. Norris HJ, Taylor HB. Polyps of the vagina. A benign lesion resembling sarcoma botryoides. *Cancer* 1966; 19(2): 227-232.
7. Zamecnik M, Sucansky R. Synchronous superficial myofibroblastoma and stromal polyp of the vagina: report of a case supporting common histogenesis of both lesions. *J Interdiscipl Histopathol* 2015; 3(2): 63-67.
8. Laskin WB, Fetsch JF, Tavassoli FA. Superficial cervicovaginal myofibroblastoma: fourteen cases of a distinctive mesenchymal tumor arising from the specialized subepithelial stroma of the lower female genital tract. *Hum Pathol* 2001; 32(7): 715-725.
9. Steeper TA, Rosai J. Aggressive angiofibroma of the female pelvis and perineum. Report of nine cases of a distinctive type of gynecologic soft-tissue neoplasm. *Am J Surg Pathol* 1983; 7(5): 463-475.
10. Skalova A, Michal M, Husek K, et al. Aggressive angiofibroma of the pelvioperineal region. Immunohistological and ultrastructural study of seven cases. *Am J Dermatopathol* 1993; 15(5): 446-451.
11. Zamecnik M, Skalova A, Michal M, et al. Aggressive angiofibroma with multinucleated giant cells: a lesion mimicking liposarcoma. *Am J Dermatopathol* 2000; 22(4): 368-371.
12. Mandato VD, Santagni S, Cavazza A, et al. Cellular angiofibroma in women: a review of the literature. *Diagn Pathol* 2015; 19(10): 114-124.
13. Flucke U, van Krieken JH, Mentzel T. Cellular angiofibroma: analysis of 25 cases emphasizing its relationship to spindle cell lipoma and mammary-type myofibroblastoma. *Mod Pathol* 2011; 24(1): 82-89.
14. Laskin WB, Fetsch JF, Mostofi FK. Angiofibromatous tumor of the male genital tract: analysis of 11 cases with comparison to female angiofibroma and spindle cell lipoma. *Am J Surg Pathol* 1998; 22(1): 6-16.
15. Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F. (eds.) World Health Organization Classification of tumours: pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone. Lyon: IARC, 2002.
16. McCluggage WG, Ganesan R, Hirschowitz L, et al. Cellular angiofibroma and related fibromatous lesions of the vulva: report of a series of cases with a morphological spectrum wider than previously described. *Histopathology* 2004; 45(4): 360-368.
17. Oliva E, Young RH, Clement PB, et al. Myxoid and fibrous endometrial stromal tumors of the uterus: a report of 10 cases. *Int J Gynecol Pathol* 1999; 18(4): 310-319.
18. Miettinen M. (ed) Modern Soft Tissue Pathology: Tumors and Non-Neoplastic Conditions. New York, USA: Cambridge University Press, 2010.
19. Frierson HF, Cooper PH. Myxoid variant of dermatofibrosarcoma protuberans. *Am J Surg Pathol* 1983; 7(5): 445-450.
20. Zamecnik M, Michal M. Myxoid variant of dermatofibrosarcoma protuberans with fibrosarcomatous areas. *Zentralbl Pathol* 1993; 139(4-5): 373-376.
21. Cheah A, Billings S, Goldblum J, et al. Spindle cell/pleomorphic lipomas of the face: an under-recognized diagnosis. *Histopathology* 2015; 66(3): 430-437.
22. Hameed M, Clarke K, Amer HZ, et al. Cellular angiofibroma is genetically similar to spindle cell lipoma: a case report. *Cancer Genet Cytogenet* 2007; 177(2): 131-134.
23. Magro G, Caltabiano R, Kacerovská D, et al. Vulvovaginal myofibroblastoma: expanding the morphological and immunohistochemical spectrum. A clinicopathologic study of 10 cases. *Hum Pathol* 2012; 43(2): 243-253.
24. Magro G, Righi A, Caltabiano R, et al. Vulvovaginal angiofibromatous: morphologic, immunohistochemical, and fluorescence in situ hybridization analysis for deletion of 13q14 region. *Hum Pathol* 2014; 45(8): 1647-1655.
25. Hara N, Kawaguchi M, Koike H, et al. Angiofibroid tumor with an intermediate feature between cellular angiofibroma and angiofibroma in the male inguinal region. *Int J Urol* 2005; 12(8): 768-772.
26. Luis PP, Quinonez E, Nogales FF, et al. Lipomatous variant of angiofibroma involving the vulva: report of 3 cases of an extremely rare neoplasm with discussion of the differential diagnosis. *Int J Gynecol Pathol* 2015; 34(2): 204-207.
27. Chen BJ, Mariño-Enríquez A, Fletcher CD, et al. Loss of retinoblastoma protein expression in spindle cell/pleomorphic lipomas and cytogenetically related tumors: an immunohistochemical study with diagnostic implications. *Am J Surg Pathol* 2012; 36(8): 1119-1128.

**MUDr. Michal Zámečník**  
**MEDIREX GROUP ACADEMY** n. o.  
 Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava  
 e-mail: zamecnikm@seznam.cz

## Ojedinelý prípad infekcie spôsobenej *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 v klinickej praxi na Slovensku

Daniela Lacková<sup>1</sup>, Martin Sojka<sup>2,3</sup>

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

<sup>2</sup>NRC pre *Vibrionaceae*, Regionálny úrad verejného zdravotníctva so sídlom v Komárne

<sup>3</sup>Ústav mikrobiológie, Lekárska fakulta, Slovenská zdravotnícka univerzita, Bratislava

Baktéria *V. cholerae* je ľudským patogénom, ale aj prirodzeným obyvateľom vodného prostredia. V posledných rokoch sú čoraz častejšie zaznamenané infekcie spôsobené *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 (NOVC) s intestinálnymi alebo extraintestinálnymi klinickými prejavmi. U imunokompetentných jedincov sa prejavujú infekcie ako self-limited gastroenteritída alebo ako infekcie uší a rán. Predkladaný článok prezentuje prípad gastroenteritídy u 44-ročnej ženy s akútnou hnačkou, s abdominálnymi bolesťami, horúčkou a prejavmi dehydratácie. Z výteru z rekta bol izolovaný kmeň *V. cholerae* non-O1, non-O139, ktorého prítomnosť potvrdila infekčnú príčinu klinických príznakov u pacientky. Na základe výsledkov mikrobiologickej analýzy bola odporučená terapia antibiotikami: perorálny ciprofloxacín v dávke 500 mg 2x d á 12 h a vhodná rehydratačná terapia. Po počiatočnom zlepšení sa vodnatá hnačka opäť objavila a s menšími prestávkami trvala niekoľko týždňov. Pacientka sa úplne vyliečila až po 2 mesiacoch. Infekcia bola získaná v domácom prostredí, pacientka konzumovala kontaminovanú vodu zo studne. Analýza vzorky vody v Národnom referenčnom centre (NRC) pre *Vibrionaceae* potvrdila zdroj infekcie. NOVC sa môžu vyskytovať aj vo vodách s nízkou salinitou, ako sú alkalické jazerá, odtoky vody a kanalizácie. Hoci všetky infekcie spôsobené *Vibrio* spp. podliehajú povinnému hláseniu, mnoho prípadov nie je odhalených aj z dôvodu, že kmene vibrií nie je jednoduché identifikovať na bežných kultivačných pôdach.

**Kľúčové slová:** akútna gastroenteritída, *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139, prvý potvrdený prípad na Slovensku, klinický význam, kontaminovaná voda

### *The rare case of infection caused by Vibrio cholerae non-O1, non-O139 in clinical practice in Slovakia*

*V. cholerae* is both a human pathogen and a natural inhabitant of aquatic environments. *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 (NOVC) are increasingly frequently observed ubiquitous microorganisms occasionally responsible for intestinal and extra-intestinal infections. Most cases involve self-limiting gastroenteritis or ear and wound infections in immunocompetent patients. We describe a case of NOVC severe gastroenteritis in 44 year old female subject suffering from acute diarrhea, abdominal pain, fever and dehydration. Strains *V. cholerae* non-O1, non-O139 have been isolated from rectal swab and confirmed infectious causality of the clinical symptoms. In published case of NOVC gastroenteritis antimicrobial therapy was recommended, the optimal treatment strategy was oral ciprofloxacin (500 mg every 12h) and appropriate oral fluid rehydration. There was initial improvement, but the watery diarrhoea recurred and had been lasting for a few weeks. The patient recovered fully after 2 months. This infection was defined as domestically acquired, patient was exposed to the contaminated water from water well. The analysis of the water by National reference centre for *Vibrionaceae* confirmed the source of infection. NOVC may occur also in water with low salinity such as alkaline lakes, artificial waterways and sewers. Although all *Vibrio* infections are nationally notifiable, many cases are likely not recognized because *Vibrios* are not easily identified on routine enteric cultivation media.

**Keywords:** acute gastroenteritis, *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139, clinical significance, first confirmed case in Slovakia, contaminated water

NewsLab, 2018; roč. 9 (1): 50 – 53

### Úvod

Predkladaný článok opisuje prípad pacientky s akútnou gastroenteritídou, keď pôvodcom ochorenia bol potvrdený raritný patogénny mikroorganizmus *V. cholerae* non-O1, non-O139. Bola to prvá laboratórne potvrdená identifikácia tejto baktérie v klinickej vzorke na našom pracovisku a podľa našich informácií aj na Slovensku. Infekcia sa prejavila u zdravej imunokompetentnej ženy po konzumácii vody zo studne a mala ťažší a dlhotrvajúci priebeh.

### Kazuistika pacientky

Štyridsaťštyriročná pacientka navštívila koncom júna 2017 svoju obvodnú lekárku s príznakmi silnej hnačky, s abdominálnymi bolesťami sprevádzaným tenezmami a vysokými teplotami okolo 38,5 °C. Pacientka bola dehydratovaná, pochudnutá, príznaky vracania sa nevyskytovali. V ambulancii boli urobené odbery biologických vzoriek vrátane výteru z rekta. Štandardné biochemické analýzy aj krvný obraz boli u pacientky v norme, avšak kultivačná analýza výteru



z rekta potvrdila infekčnú príčinu jej klinických prejavov. Vo vzorke boli identifikované baktérie druhu *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139. Keďže ide o patogénny mikroorganizmus, ktorý sa v našom regióne v klinických vzorkách ešte nevykytol a jeho identifikácia je z nášho pohľadu raritná, upovedomili sme o tejto skutočnosti ošetrojúceho lekára, infektológa a príslušného epidemiológa. Pacientka bola liečená ambulantne, nebola hospitalizovaná. Naordinovaná jej bola symptomatická liečba Smecta, Hylak Forte a rehydratačný nápoj Fluidex. Vzhľadom na pretrvávajúce ťažkosti, ku ktorým sa pridalo aj vracanie, bola v polovici júla 2017 naordinovaná cieleňá antibiotická terapia podľa stanovenej citlivosti – ciprofloxacín 500 mg 2x d á 12 h počas 10 dní. Po počiatočnej úľave sa jej klinický stav opäť zhoršil, trpela nechutenstvom, problémami s trávením, občasnými hnačkami. Liečbu antibiotikami prerušila a pokračovala v symptomatickej liečbe. Prítomnosť patogénnej baktérie *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 bola potvrdená v stolici pacientky ešte aj v septembri 2017. Po trojnásobnom selektívnom namnožení v alkalickej peptónovej vode bola kultivačne dokázaná aj prítomnosť *V. metschnikovii*, čo je blízky príbuzný *V. cholerae* s negatívnou cytochrómoxidázovou aktivitou. Klinický stav pacientky sa zlepšoval veľmi pomaly, dlhodobo pretrvávalo nechutenstvo, abdominálne bolesti, hnačky, ktoré sa striedali s obdobiami relatívnej úľavy od ťažkostí. Od októbra 2017 je pacientka bez klinických príznakov infekcie. Zdroj infekcie bol potvrdený epidemiologickým vyšetrením, bola ním voda zo studne, ktorú v domácnosti z dôvodu absencie vodovodu používali.

### Epidemiologické vyšetrenie zdroja infekcie

Na základe odporúčania pracovníkov odboru epidemiológia RÚVZ so sídlom v Leviciach boli vykonané kontrolné odbery vzoriek od ostatných členov rodiny, u ktorých neboli prítomné žiadne klinické príznaky ani ťažkosti. Výsledky kontrolných odberov biologických vzoriek zostali negatívne. Keďže najčastejším faktorom prenosu infekcie je voda alebo potraviny, na objasnenie bolo nutné došetriť riziko konzumácie infikovaného jedla alebo vody v priebehu 7 dní pred objavením klinických príznakov. Pacientka neabsolvovala pobyt v zahraničí, vylúčila konzumáciu morských živočíchov, ako sú mušle, ustrice, kraby a pod., nekúpala sa v prírodnom jazere. Jediným rizikovým faktorom bola používaná voda, keďže v domácnosti nebol zavedený vodovodný systém a rodina používala vodu zo svojej studne. Vzorky vody boli odobraté podľa platných noriem a zaslané na cieleňé vyšetrenie do NRC pre *Vibrionaceae* so sídlom v Komárne. NRC potvrdilo vo vzorkách vody prítomnosť baktérie *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139. Všetky prípady infekcií spôsobených séro skupinami *V. cholerae* a ďalšími patogénnymi druhmi rodu *Vibrio* spp. podliehajú povinnému systému hlásenia u nás aj celosvetovo (CDC).

### Klinický význam infekcií spôsobených *Vibrio cholerae*

Infekcie spôsobené rôznymi séro skupinami *Vibrio cholerae* sa vo vyspelých krajinách, napr. v EÚ, vyskytujú veľmi zriedka. V súčasnosti je známych viac ako 200 séro skupín druhu *V. cholerae*, ktoré sa líšia somatickým O antigénom<sup>(2)</sup>. Klinický priebeh ochorenia závisí z veľkej miery od séro skupiny, ktorou je pacient infikovaný. *V. cholerae* toxigénna

séro skupina O1 alebo O139 (endemicky sa vyskytuje v Ázii, vyskytli sa viaceré importované prípady aj vo svete) je vyvolávateľom prudkého a závažného ochorenia – cholery, ktorá prebieha vo forme epidémie. Cholera sa vyskytuje v menej rozvinutých krajinách, ako je Ghana, India, Pakistan, Haiti a podľa WHO každoročne spôsobuje 28 000 – 142 000 úmrtí. Do Európy ju importujú v ojedinelých prípadoch cestovatelia vracajúci sa z rizikových oblastí. Podľa Európskeho centra na prevenciu a kontrolu chorôb (ECDC) bolo v roku 2014 v krajinách EÚ potvrdených len 16 prípadov cholery. Menej závažné ochorenia, tzv. vibriózy, sú spôsobené inými séro skupinami *V. cholerae*, ktoré sú označované ako *V. cholerae* non-O1 a non-O139, alebo inými patogénnymi druhmi: *V. parahemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*. Vibriózy sa prejavujú intestinálnou (gastroenteritídou) alebo extraintestinálnou (infekcie uší a rán) manifestáciou. Infekcie vznikajú primárne po konzumácii tepelne neupravených morských živočíchov, po požití kontaminovanej vody alebo po kúpaní v kontaminovanej vode. Vznik ochorenia je závislý od virulentnosti kmeňa aj od zdravotného stavu pacienta. Gastrointestinálne ochorenia spôsobené *V. cholerae* non-O1, non-O139 na rozdiel od cholery prebiehajú menej prudko a nemajú epidemický potenciál. Klinické príznaky týchto infekcií môžu byť menej závažné: od asymptomatickej formy cez miernu hnačku až po závažné ochorenie podobné cholere. Prítomná je aj silná dehydratácia a vysoké horúčky, ale ochorenie má dobrú prognózu. U pacientov s predispozíciou na bakteriémiu, ako sú imunokompromitovaní pacienti s ochoreniami pečene, alkoholi, diabetici a onkologickí pacienti, sa infekcia môže prejavovať aj vo forme sepsy s vysokou mortalitou. Pacienti by nemali konzumovať tepelne neupravené morské živočíchov ani kúpať sa v potenciálne kontaminovaných vodách v letných mesiacoch<sup>(6)</sup>. Vysoká mortalita pri sepse je pravdepodobne spôsobená oneskorenou diagnostikou, neadekvátnou terapiou antibiotikami aj dĺžkou terapie<sup>(4)</sup>. V odbornej literatúre je zaznamenaný narastajúci trend potvrdených infekcií spôsobených *V. cholerae* non-O1, non-O139, pričom ich celkový počet vo vyspelých krajinách napr. Európskej únie zostáva stále nízky a infekcie sú ojedinelé<sup>(1)</sup>.

### Materiál a metódy

#### Laboratórna identifikácia baktérií rodu *Vibrio* spp.

Rod *Vibrio* patrí do čeľade *Vibrionaceae*. Sú to halofilné fakultatívne anaeróbne gramnegatívne paličky zakrivené na pozdĺžnej osi. Ochorenia spôsobené vibriami sú v súčasnosti poddiagnostikované, jednak zo strany ošetrojúcich lekárov, ktorí na takúto etiológiu nemyslia, a jednak zo strany laboratórií, ktoré bežne nepoužívajú selektívne pôdy na izoláciu baktérií rodu *Vibrio*<sup>(6)</sup>. Pri odbere biologického materiálu od pacienta je potrebný odber z charakteristického miesta v počiatočnom alebo rozvinutom štádiu príznakov ochorenia ešte pred začatím ATB terapie. Vhodné biologické vzorky pri podozrení na infekciu sú stolica, výter z rekta, vývratky, výter z rany; v prípade sepsy (spôsobovanej hlavne *V. vulnificus*) aj krv na hemokultiváciu. V prípade vyšetrovanej pacientky nebola stanovená jasná diagnóza, preto bol použitý rutinný postup spracovania biologickej vzorky bez použitia selektívnej pôdy pre vibriá (napr. tiosíran – citran – žlč – sacharózový agar – TCBS). Suspektný kmeň bol izolovaný len

na selektívnej pôde pre *Yersinia* spp. Identifikácia izolovaného kmeňa prebehla na základe hlavných biochemických vlastností (napr. oxidáza) komerčne dodávanou súpravou Enterotest a pomocou hmotnostnej spektrometrie MALDI-TOF. Vzhľadom na raritný nález patogénneho mikroorganizmu *Vibrio* spp. vo vzorke bol kmeň zaslaný na definitívnu identifikáciu na špecializované pracovisko NRC pre *Vibrionaceae*.

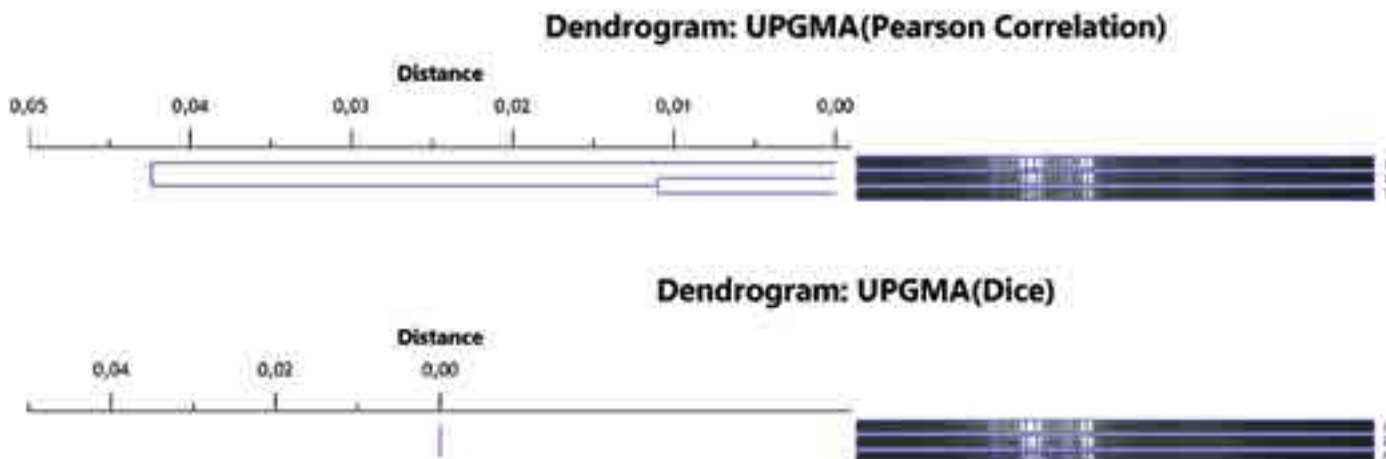
### Nadstavbová diagnostika v NRC pre *Vibrionaceae*

Potvrdenie nálezu a definitívny výsledok identifikácie bol vykonaný v NRC pre *Vibrionaceae* na RÚVZ so sídlom v Komárne. Kmeň bol potvrdený ako *Vibrio* spp. na základe mikroskopického nálezu zahnutých gramnegatívnych paličiek, pozitívnej cytochrómoxidázovej aktivity, pozitívneho string-testu, typického rastu na selektívnom TCBS-agar a citlivosti na vibriostatikum O129. Biochemicky, pomocou klasických skúmvkových testov s prídavkom 1 % NaCl, bol bližšie identifikovaný ako *V. cholerae*. Pomocou latexovej aglutinácie nebola dokázaná príslušnosť k séroskupine O1 ani O139. Napriek tomu bol kmeň testovaný metódou reverznej pasívnej latexovej aglutinácie na prípadnú produkciu cholerového toxínu s negatívnym výsledkom. Baktéria bola finálne identifikovaná ako netoxinogénny kmeň *V. cholerae* non-O1, non-O139.

Metódou selektívneho namnoženia v alkalickéj peptónovej vode bolo *V. cholerae* non-O1, non-O139 izolované aj zo vzorky studničnej vody. Vzorka vody sa podľa štandardných postupov odoberá do sterilných vzorkovník (sklenených alebo plastových) v objeme 0,5 až 1 liter. Chladenie vzorky počas prepravy môže izoláciu vibrií sťažiť alebo znemožniť – navodenie prechodu do tzv. VBNC (viable but non-culturable) stavu. Z tohto dôvodu sa chladenie vzorky pri preprave neodporúča a vzorka vody by sa mala spracovať v deň odberu.

Všetky tri izoláty boli podrobené zisťovaniu príbuznosti metódou (GTG)5 PCR s následnou klastrovou analýzou získaných profilov v softvéri Phoretix1D Pro za využitia dvoch rôznych prístupov – Diceov algoritmus a Pearsonova korelácia. Obe analýzy ukázali veľmi blízku príbuznosť/totožnosť izolovaných kmeňov, ktoré teda môžu byť považované za jeden kmeň (**obrázok 1**).

**Obrázok 1.** Klastrová analýza (GTG)5 PCR profilov získaných izolátov *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139, dráha 1 – izolovaný kmeň zo stolice – Medirex, a. s., dráha 2 – izolovaný kmeň zo stolice – NRC-V, dráha 3 – izolovaný kmeň zo studničnej vody. Z oboch metód klastrovania je zrejماً blízka príbuznosť/totožnosť izolátov



### Stanovenie citlivosti na antibiotiká a liečba infekcie

Hnačka spôsobená *V. cholerae* (toxigénnymi aj netoxigénnymi kmeňmi) je riešená primárne rehydratáciou a cieľnou terapiou antibiotikami. Najdôležitejšia je náhrada tekutín a elektrolytov, ktoré sa počas ochorenia strácajú, jednak perorálnou formou, jednak intravenózne. Antibiotická terapia v prípade cholery je presne stanovená. Tetracyklín a azitromycín sú antibiotikami prvej voľby. Skracujú čas vylúčovania baktérií a redukujú objem stolice o 50 %<sup>(5)</sup>. V prípade gastrointestinálnych infekcií *V. cholerae* non-O1, non-O139 sa podanie antibiotík odporúča v prípade komplikovaných ochorení a u imunokompromitovaných pacientov. V analógii s choleroou sú to tetracyklíny, ktoré inhibujú syntézu proteínov, čím znižujú produkciu toxínu, alebo skupina fluorochinolónov. Rozhodnutie o terapii závisí aj do lokálneho stavu citlivosti na antibiotiká, resp. rezistencie. Pri izolovanom kmeni bolo stanovenie citlivosti vykonané diskovým difúznym testom na Muellerových-Hintonových agarových pôdach a komerčne dodávanými antibiotickými diskmi podľa štandardných postupov EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Keďže aktuálne normy EUCAST neobsahujú interpretačné kritériá pre *V. cholerae*, boli použité kritériá pre *Enterobacteriaceae*. Izolovaný kmeň bol rezistentný proti kotrimoxazolu, intermediárne citlivý na ampicilín a gentamicín a citlivý na ciprofloxacín a tetracyklín. Dĺžka terapie závisí od zdravotného stavu pacienta, priebehu a závažnosti ochorenia. Medián je 14 dní. Na základe stanovenej citlivosti bol v terapii cielene použitý perorálny ciprofloxacín v dávke 0,5 g 2x denne. Pôvodne bol navrhnutý na 10 dní, ale pacientka nebola schopná dodržať dĺžku terapie vzhľadom na ťažší priebeh ochorenia. Vakcína proti infekciám spôsobeným *V. cholerae* non-O1, non-O139 v súčasnosti neexistuje.

### Diskusia

Napriek tomu, že ochorenie vypuklo u imunokompetentnej pacientky, jeho priebeh bol vážny a klinické príznaky pretrvávali dlhodobo. Identifikácia *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 ako príčiny ochorenia bola prekvapujúca, ale umožnila nastavenie adekvátnej a cielenej terapie. Prírodným prostredím vibrií je more a pobrežné vody, ale *V. cholerae*, *V. metchnikovii*

a *V. mimicus* dokážu osídľovať aj vody s nízkou salinitou, ako sú jazerá (napr. Neziderské jazero, Rakúsko, ale aj viaceré slovenské jazerá), povrchové a odpadové vody. Vibriá sú schopné prežívať niekoľko týždňov aj vo výkaloch, ich počet narastá najmä v letných mesiacoch, keď sa teplota vody zvyšuje. Zdroj infekcie u pacientky bol potvrdený. Infekcia bola spôsobená konzumáciou, resp. používaním kontaminovanej vody z plytkej kopanej studne, ktorú v domácnosti denne využívali. Príčina kontaminácie vody v studni zostáva nejasná, dôvodom môže byť kontaminácia a presakovanie z okolitého prostredia do studne a množenie infekčných agensov v letných mesiacoch. Napriek tomu, že baktérie sa vyskytujú v prostredí, zostávajú infekcie spôsobené vibriami ojedinelé a raritné. Prezentovaný prípad infekcie potvrdzuje, že treba venovať zvláštnu pozornosť zdravotnej bezchybnosti pitnej a úžitkovej vody, odstraňovaniu výkalov a odpadkov a tiež potravinám konzumovaným v surovom stave. V prípade rodiny bolo nutné nainštalovať k zdroju vody (studni) filtračný systém, ktorý v budúcnosti vylúči riziko vzniku podobnej infekcie. Je vhodné upozorniť ošetrojúcich lekárov aj v krajinách s miernym podnebí, ako je Slovenská republika, na riziko výskytu infekcií spôsobených *Vibrio cholerae* a ostatných druhov *Vibrio* spp. a v prípade gastroenteritíd (napr. po konzumácii vody zo studne) žiadať analýzu prítomnosti týchto baktérií v biologickej vzorke. Vďaka moderným metódam identifikácie patogénnych mikroorganizmov vo vzorkách,

napr. pomocou hmotnostnej spektrometrie MALDI-TOF, sa diagnostika črevných nákaz v posledných rokoch v laboratóriách Medirex, a. s., výrazne skvalitňuje.

### Záver

Predložená kazuistika pacientky bola prvým potvrdeným prípadom infekcie *V. cholerae* non-O1, non-O139 v našom regióne aj na Slovensku. Prípad potvrdzuje potrebu promptnej a kvalitnej diagnostiky týchto infekcií v laboratóriách klinickej mikrobiológie a neustále zvyšovanie erudovanosti klinických mikrobiológov. Je tiež dôležité zvýšiť povedomie a informovať o možnosti výskytu takýchto ochorení na Slovensku aj odbornú lekársku verejnosť. Identifikácia vibrií izolovaných z klinických materiálov by mala byť vždy potvrdená v NRC pre *Vibrionaceae* pri RÚVZ v Komárne, ktoré rovnako v prípade výskytu *V. cholerae* vykonáva dôkaz príslušnosti k séro skupinám s vysokým potenciálom epidemického výskytu a dôkaz produkcie cholerového toxínu. NRC tieto vyšetrenia vykonáva s pôsobnosťou pre celú SR.

### Podakovanie

Táto práca bola čiastočne vytvorená realizáciou projektu Centrum excelentnosti environmentálneho zdravia, ITMS č. 26240120033, na základe podpory operačného projektu Výskum a vývoj, financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

### LITERATÚRA

1. Engel MF, Muijsken MA, Mooi-Kokenberg E, et al. *Vibrio cholerae* non-O1 bacteraemia: description of three cases in the Netherlands and a literature review. 2016.
2. Versalovic J, Carroll KC, Funke G, et al. Manual of clinical microbiology. Washington, DC: ASM Press; 2011.
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). CDC Laboratory Methods for the Diagnosis of *Vibrio cholerae*. Laboratory Methods for the Diagnosis of *Vibrio cholerae*. Ch 6. Atlanta: CDC. [Accessed 13 Apr 2016]. Available from: <http://www.cdc.gov/cholera/pdf/Laboratory-Methods-for-the-Diagnosis-of-Vibrio-cholerae-chapter-6.pdf>
4. Ou TY, Liu JW, Leu HS. Independent prognostic factors for fatality in patients with invasive *Vibrio cholera* non-O1 infections. *J Microbiol Immunol Infect* 2003; 36: 117-122.
5. Leibovici-Weissman Y, Neuberger A, Bitterman R, et al. Antimicrobial drugs for treating cholera. *Cochrane Database Sys Rev* 2014; 6: CD008625.
6. Deshayes S, Daurel C, Cattoir V, et al. Non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* bacteraemia: case report and literature review. *Springerolus* 2015; 4: 575.



**RNDr. Daniela Lacková, PhD.**

Medirex, a. s.

Nábřežná 3, 934 01 Levice

e-mail: [daniela.lackova@medirex.sk](mailto:daniela.lackova@medirex.sk)



## Od medicíny renesancie k renesancii medicíny a späť

Ján Radvánszky

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

NewsLab, 2018; roč. 9 (1): 54 – 55

Priznám sa, že s výberom témy pre aktuálne vydanie som mal menšie problémy. Počas posledného obdobia ma totiž zaujalo niekoľko zaujímavých tém, ktorým by sa oplatilo venovať medzi novinkami, ako možnosť vývoja nanorobotov pracujúcich v našich telách, napr. na dopravenie spermií so zníženou pohyblivosťou na „liečbu“ určitých typov neplodnosti, alebo výsledky druhej fázy veľkého mikrobiómového projektu človeka, prípadne prehľad histórie sekvenovania DNA, čo tiež oslavovalo výročie. Nakoniec moja voľba padla na inú tému, ktorá však tak trochu súvisí s predchádzajúcimi dvoma. Ale poďme pekne po poriadku. Keď som počas svojich stredoškolských štúdií čítal životopisy „slávnych“, vždy ma fascinovalo, ako mohol niekto (jediný človek) študovať teológiu, medicínu, právo, históriu, filozofiu, umenie, prípadne, ako mohol byť jeden človek zároveň maliarom, sochárom, architektom, lekárom, vynálezcom, geológom, biológom, filozofom, atď. Vždy ma fascinovali obrazy pracovní a alchymistických pivníc, kde na jednej strane sú steny plné knižnic prepchatých starými knihami a pergamenmi (poriadne zaprášenými), inde je položená psia lebka (na ktorej sedí obrovský pavúk), v rohu vypreparované zviera (to je jedno aké, len nech je tam), niekoľko rôznych minerálov poukladaných v peknom slede na polici (ale môžu byť aj na hromade v kúte, vysypané z prevráteného koša), inde na stene (ale aj na dajakom vedľajšom stole a, prirodzene, pod stolom a okolo neho) rôzne náčrty, projekty, mapy, poznámky (ako aj mnoho iných vecí, ktoré sa dajú naniest' na papier). A v neposlednom rade, v strede takejto miestnosti nemôže chýbať rozpitvaná mŕtvola človeka (dajakého chudáka ukradnutého pred dvoma dňami z miestneho cintorína) s jeho orgánmi starostlivo uloženými v sklenených nádobách naplnených konzervačnou tekutinou a, prirodzene, ešte starostlivejšie odváženými a zapísanými na zožltnuté listy polorozpadajúceho sa zošita s koženou väzbou. Áno, nechal som sa uniesť fantáziou, ale to len a len kvôli tomu, aby som mohol načrtnúť svoju predstavu „renesančného človeka“, ktorého síce na takomto obraze nevidíme, ale presne vieme, že tam je, že tam pracuje, a ešte aj to presne vieme, ako vyzerá (ale to už nechám na predstavivosť každého z vás). A hlavne, že všetky tie „rôzne“ veci tam má nazhromaždené preto, lebo podľa definície, „jeho záujem a expertíza pokrývajú väčší počet odlišných vedných a/alebo spoločenských oblastí“, pričom vie pracovať s komplexnými vedomosťami na vyriešenie určitého problému. A keď slovné spojenie „renesančného človeka“ nahradíme iným, napr. „polyhistorom“, tak s pokojným svedomím môžeme v našich predstavách zanechať renesančne „osvietené“ severotalianske mestá a môžeme sa presunúť prakticky hocikam, od antického „filozofického“ Grécka až po „dickensovský“ Londýn viktoriánskeho Anglicka. Okrem tej

zlatej éry „modernej vedy“ 20. storočia, vyhlasujúcej rigoróznú „redukcionistickú“ vedeckú metódu za absolútne potrebnú a nevyhnutnú, v ktorej celé vedecké skupiny začali sústreďovať svoju pozornosť na jedinú konkrétnu vec záujmu, ale to s dovedty nevidanou hĺbkou a precíznosťou. Keď som prišiel na univerzitu, všetky „zložky“ opísaného obrazu som videl na vlastné oči, ale málo z nich sa nachádzalo na jednom mieste a ani náhodou sa im nevenoval jediný človek. Všetko bolo na svojej fakulte, na svojej katedre, na svojom oddelení, prípadne sa tomu venovala jedna výskumná skupina, čo ma pomaličky presvedčilo, že počas toho 20. storočia nadobro odzvonilo obdobiu polyhistorov a „renesančných ľudí“.

Prišlo však 21. storočie a medicína spolu s laboratórnou diagnostikou sa podľa všetkého chystajú spraviť veľký skok v rámci bežne existujúcich kontinuálnych zmien. Chystajú sa vrátiť tak trochu k „holistickejšiemu“ koreňom, ale s „redukcionistickou“ rigoróznosťou. A v tomto celom procese by som chcel upriamiť pozornosť na jednu štúdiu, ktorá vyšla v augustovom vydaní časopisu Nature Biotechnology<sup>(1)</sup> a ktorá mala aj jednoduchší, popularizačnejší štýlom napísaný „sprevádzajúci“ článok<sup>(2)</sup>. Ide o „wellness štúdiu“, v ktorej sa zbierali a hodnotili osobné medicínske údaje 108 pacientov počas 9-mesačného obdobia. Niektoré údaje, ako prehľad histórie zdravotných záznamov, životospráva alebo genomická informácia vo forme celogenómového sekvenovania, sa stanovili raz, na začiatku štúdie. Z genomických dát sa vypočítalo rizikové skóre pre 127 častých, polygénne determinovaných ochorení alebo kvantitatívnych znakov. Iné analýzy, ako rôzne klinické testy, metabolómová, proteómová, a mikrobiómová analýza sa uskutočnili trikrát počas trvania štúdie v trojmesačných odstupoch. Na analýzy sa využili biologické vzorky ako krv, stolica, ranný moč a sliny. V každom stanovenom čase, čiže každý tretí mesiac, sa u každého jedinca uskutočnilo 218 klinických laboratórnych testov aj meranie 643 metabolitov, 262 proteínov, spolu s hodnotením abundancie 4 616 operačných taxonomických jednotiek v rámci črevného mikrobiómu. Na týždennej báze zase účastníci zaznamenávali údaje ako hmotnosť, krvný tlak a srdcový tep, pričom merania fyzickej a spánkovej aktivity jedincov sa uskutočnili ešte s vyššou frekvenciou, pomocou nositeľného fitnessového náramku. Vcelku sofistikovanými štatistickými analýzami sa spracovali zozbierané dáta, vytvorili sa inter-omické korelačné siete, či už prierezové, alebo delta-korelačné (meniace sa časom). Tu by som podotkol, že grafické znázornenia výsledkov nemajú významný len „výsledkový“ aspekt, ale aj estetický (rozumej tomu: sú naozaj veľmi pekné na pohľad). Potvrdilo sa niekoľko už aj doteraz známych korelácií, napr. medzi určitým genetickým rizikom (vypočítaným vo forme polygénneho rizikového

skóre) a konkrétnymi biomarkermi, prípadne sa identifikovali aj nové potenciálne biomarkery pre rôzne ochorenia, ako je diabetes, zápalové črevné ochorenia, kardiovaskulárne ochorenia alebo rakovina močového mechúra. Významným faktorom je identifikácia viacerých korelácií medzi mierou genetického rizika a konkrétnymi meranými markermi, čo by mohlo predstavovať odhalenie molekulárnych dráh vedúcich k manifestácii špecifických genetických predispozícií. Aby to malo aj praktické aspekty, súčasťou štúdie boli tiež osobné stretnutia hodnotených jedincov s vhodným expertom na interpretáciu dát, na ktorých sa preberali osobné výsledky každého z nich spolu s odporúčaniami a diskusiami týkajúcimi sa možností zmien životosprávy, prípadne terapie na zlepšenie ich zdravia. V prípade potreby boli tiež odporúčané ďalšie klinické postupy. Hlavným fókusom boli zdravotné oblasti, ako kardiovaskulárne ochorenia, diabetes, zápal a výživa, pričom hlavné skupiny odporúčaní zahŕňali fyzické cvičenia, manažment stresu, stravu a potravinové doplnky. Tento prístup mal za cieľ zmeniť hodnoty vychýlených biomarkerov aj kompenzáciu zistených genetických predispozícií na základe individuálnych dát, životosprávy a schopností/možností konkrétnych jedincov. Tento cieľ sa vo viacerých prípadoch podarilo dosiahnuť, špecificky v prípade vychýlených hladín vitamínu D, ortuti, glykovaného hemoglobínu, cholesterolu, inzulínu, glukózy, zápalových interleukínov atď. Medzi zaujímavé nálezy patrila hemochromatóza u jedného pacienta, identifikovaná na základe prehľadu klinických záznamov, zvýšenej nameranej hladiny feritínu v krvi a identifikovaného kauzatívneho genetického podkladu, pričom následná klinická akcia viedla k náprave hladín feritínu v krvi počas celého zvyšku štúdie. Podarilo sa identifikovať vyše tritisíc štatisticky významných prierezových korelácií a vyše dvetisíc delta korelácií. Čo však mňa osobne prekvapilo, bola nízka miera dodržiavania tých meraní, ktoré boli na strane zahrnutých jedincov. Iba 64 % z nich bolo schopných napr. splniť 40-dňové

kontinuálne používanie fitnessového náramku. Ale čo je určite pozitívne prekvapenie, autorský kolektív plánuje rozšírenie tejto ich štúdie, nazvanej „Pilotná 100 wellness štúdia“, na úroveň 100 tisíc zahrnutých pacientov, a to do roku 2020.

Čo je z opísanej štúdie asi najlepšie si zapamätať? Asi to, že využitie takýchto „personálnych, hustých, dynamických dátových cloudov“ (personal, dense, dynamic data clouds) by umožnilo identifikáciu rôznych perturbácií v individuálnych profiloch jedincov, ktoré by mohli naznačovať predispozície na špecifické ochorenia alebo už aj ich konkrétny nábeh. To by znamenalo mať diagnostický postup na včasnú identifikáciu nielen rizika na určité ochorenie, ale aj počiatočnú fázu jeho prepuknutia, a tiež dizajn a výber terapeutického/intervenčného postupu zameraného na konkrétny molekulárny základ konkrétneho ochorenia u konkrétneho pacienta. V skratke, uvedené postupy by mohli predstavovať niečo, čo by malo byť základnou a esenciálnou metodikou tej ospevovanej personalizovanej medicíny.

Na záver musím s pokorou konštatovať, že sa nemení iba medicína. Neustále sa menia aj moje svetonázory. Teraz si myslím, že obdobie polyhistorov je asi naspäť a začína nás „strašiť“ slovnými spojeniami ako „systémová medicína“, „P4 medicína“ (prediktívna, preventívna, personalizovaná, participatórna), prípadne „personálne, husté, dynamické dátové cloudy“. Pracovne a alchymistické pivnice sú už prakticky virtuálne a ich binárne priestory sú naplnené už len unikátnymi kombináciami dvoch znakov, „0“ a „1“. Zatiaľ si myslím, že to rozpitvané telo v centre pozornosti je ešte stále ľudské, a preto verím tomu, že stojíme na prahu novej renesancie medicíny. Ale vôbec nie som si istý v tom, akého „majstra“ si mám predstaviť do týchto moderných virtuálnych pracovných prostredí. Kto je schopný spracovať takéto množstvo extrémne heterogénnych dát? Silno pochybujem, že tým moderným „renesančným človekom“ je stále ešte ľudská bytosť. Ale to je možno príbeh na pokračovanie...

#### REFERENCIE

1. Price ND, Magis AT, Earls JC, et al. A wellness study of 108 individuals using personal, dense, dynamic data clouds. *Nat Biotechnol* 2017; 35(8): 747-756.

2. Butte AJ. Big data opens a window onto wellness. *Nat Biotechnol* 2017; 35(8): 720-721.



**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

### Ohliadnutie za 50. výročnou cytogenetickou konferenciou

**Andrea Blahová**

Medirex, a. s., Bratislava

**NewsLab, 2018; roč. 9 (1): 56 – 58**

V dňoch 7. – 8. 9. 2017 sa konala v Prahe-Dejviciach pod záštitou rektora Karlovej Univerzity prof. MUDr. Tomáša Zimu, DrSc., jubilejná 50. cytogenetická konferencia s medzinárodnou účasťou. Spoločnosť lekárskej genetiky je súčasťou Českej lekárskej spoločnosti Jana Evangelistu Purkyňu a ako samostatná spoločnosť začala svoju činnosť v roku 1967 a jej vznik je úzko spojený s rozvojom genetiky vo vtedajšom Československu. Prvá časť konferencie bola preto venovaná histórii a mapovala uplynulých 50 rokov v českej a slovenskej genetike. Ďalšia časť konferencie bola rozdelená na onkocytogenetiku, prenatálnu a postnatálnu genetiku a kolegovia z rôznych pracovísk prezentovali svoje najnovšie práce a výsledky z nich.

Na konferencii sme sa zúčastnili aktívne a naše oddelenie genetiky sme prezentovali tromi posterami. Prvý od RNDr. Marty Bombarovej, PhD., Mgr. Aleny Žákovičovej, Mgr. Dominiky Veselyňiovej a kol. s názvom „Chronická myeloidná leukémia (CML) v chronickej fáze s extramedulárnym myelosarkómom – kazuistika“ opisuje kazuistiku 39-ročného muža, ktorý trpel silnými bolesťami chrbtice v krížovej oblasti. Po vyšetrení v neurologickej ambulancii bol pre vysokú leukocytózu odoslaný aj do onkohematologickej, v ktorej vyslovili podozrenie na diagnózu MPN/CML. Tá bola po prvotnom cytogenetickom a FISH vyšetrení kostnej drene potvrdená, keď boli detegované dva Ph pozitívne patologické klony – je-

den s klasickou translokáciou t(9;22) a druhý klon s variantnou translokáciou t(9;22;11), do ktorej okrem chromozómov 9 a 22 bol zahrnutý tretí chromozóm – 11. MRI vyšetrenie odhalilo extramedulárny myelosarkóm, čo je z klinického hľadiska zaujímavý nález, pretože v chronickej fáze CML je manifestovaný veľmi zriedka. V súčasnosti je pacient, napriek horšej prognóze, po neurochirurgickom odstránení tumorovej masy v kompletnej hematologickej remisii (**obrázok 1**).

Druhý poster s názvom „Parciálna monoizómia 9p u 4-ročného dieťaťa – kazuistika“ vypracovali kolegyne z neonkologickej a prenatálnej cytogenetiky RNDr. Csilla Kozmér, PhD., RNDr. Vladimíra Verchovodková a kol. Cytogenetickou analýzou bola u pacienta trpiaceho autizmom odhalená delécia krátkych ramienok chromozómu 9 a bol stanovený karyotyp 46,XY,del(9)(p22). Pomocou array-CGH boli miesta zlomov spresnené – 9p24.3-23 a bola potvrdená delécia s veľkosťou 13 Mb. U rodičov bol stanovený normálny karyotyp. Fenotyp pacienta koreluje s fenotypom publikovaných prípadov s deléciou 9p (mentálna retardácia, vývojové zaostávanie, psychomotorické poruchy, faciálna dysmorfia, u niektorých chlapcov aj porucha vývoja pohlavných orgánov). Kazuistika poukazuje aj na výhody kombinácie cytogenetických a molekulových metód, ako napríklad array-CGH, nielen kvôli spresneniu nálezu, ale poskytujú nám tiež možnosť predikcie zdravotného stavu pacienta do budúcnosti (**obrázok 2**).

**Obrázok 1.** Mgr. Alena Žákovičová pri svojom poster



**Obrázok 2.** RNDr. Csilla Kozmér, PhD., a RNDr. Vladimíra Verchovodková po prezentácii príspevku





# NEBALANSOVANÁ PRESTAVBA der(18)t(9;18)(p12;p11) U PACIENTKY S POLYCYTÉMIOU VERA (kazuistika)

RNDr. Andrea Blahová, Mgr. Kristína Lengyelová, Mgr. Alena Žákovičová, Mgr. Kristína Juríková, Mgr. Jakub Petrik, RNDr. Miroslav Tomka, PhD., RNDr. Renata Lukačková  
Odd. klinickej genetiky, Medirex a.s., Bratislava

## ÚVOD

Myeloproliferatívne neoplázie sú klonálne ochorenia charakteristické zvýšenou produkciou zreplých krvných buniek.

MPN Philadelphia negatívne predstavujú heterogénnu skupinu ochorení s niekoľkými podjednotkami:

- > Pravá polycytémia (PV)
- > Esenciálna trombocytémia (ET)
- > Primárna myelofibróza (PMF)

Rozdiely medzi nimi sú v diagnostike, výskyte komplikácií, v klinickej stratifikácii a v manažmente a liečbe choroby.

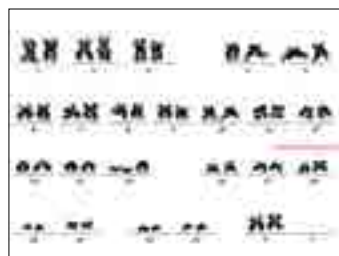
**Polycytémia vera (pravá polycytémia, PV)** je charakteristická zvýšenou produkciou erytrocytov v kostnej dreň, čo má za následok zníženie prietoku krvi. Ochorenie sa môže transformovať do myelofibrózy alebo akútnej leukémie. Medián prežívania je 8 – 11 rokov a priemerný vek v čase diagnózy je nad 60 rokov, zriedka sa ochorenie vyskytne u mladších ako 30 rokov. Príčina polycytémie vera je neznáma.

Ochorenie je zvyčajne získané, vo vzácných prípadoch môže byť dedičné. U približne 95% všetkých ľudí trpiacich týmto ochorením sa v krvných bunkách vyskytuje mutácia V617F JAK2 génu. Gén JAK2 je lokalizovaný na chromozóme 9p24 a jeho produktom je proteín tyrozín kináza. Enzym Janusova kináza 2 je súčasťou signálnej dráhy vedúcej spôsobik tvorbe krvných buniek. Keď telo potrebuje viac krvných buniek, vyšle signál JAK2, a ten následne signalizuje bunkám, aby začali rásť a deliť sa. Mutácia, že sa JAK2 stane trvalo aktívnym, čo znamená, že nedokáže prestať vysielat bunkám signál, aby rástli a delili sa, hoci organizmus už nové bunky nepotrebuje. Je to chronické ochorenie, ktoré nemožno vyliečiť, ale správnu liečbou je možné ju dlhodobo efektívne zvládať.

## O polycytémii vera svedčí aj nález:

- > Mutácia V617F JAK2 – v približne 95% prípadov.
- > Nízka hladina hormónu erythropoetínu (EPO), ktorý je zodpovedný za produkciu červených krviniek.
- > Zmnoženie krvných buniek v kostnej dreňi zistené biopsiou kostnej drene.

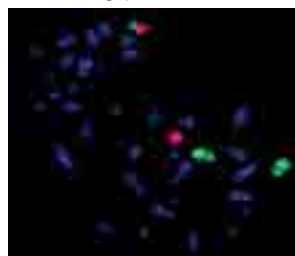
**Obr. 1.:** G- band po 24hodinovej kultivácii kostnej drene. V metafáze šípkou označený derivovaný chromozóm.



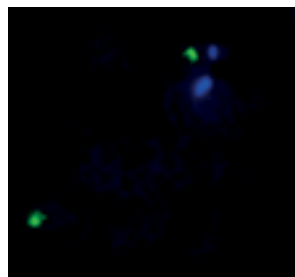
**Obr. 3.:** FISH analýza za použitia sondy CDKN2 SG/CEP 9 SO



**Obr. 2.:** FISH analýza pomocou celochromozómových sond wcp 9 (spectrum Green) a wcp 18 (spectrum Orange)



**Obr. 4.:** FISH analýza so sondou XA X/Y/18



## KAZUISTIKA

V marci 2017 bola 79 ročná pacientka odoslaná obvodným lekárom na odd. hematológie pre polyglobúliu, bolesti hlavy, miernu hyperémiu tváre. Pacientka nemala žiadne závažné predchorenie, bola len liečená pre artériovú hypertenziu. Pacientke bola stanovená diagnóza polycytémia vera.

Zároveň sme na naše odd. klinickej genetiky prijali vzorky kostnej drene a periférnej krvi od pacientky, ktoré sme vyšetrili dostupnými genetickými metódami.

## METÓDY a VÝSLEDKY

### Cytogenetika

Na cytogenetickej úrovni sme uskutočnili 24-hodinovú kultiváciu kostnej drene. Po spracovaní a zafarbení sme zhodnotili 20 metafáz. V ôsmych sme zaznamenali zriedkavú prestavbu medzi chromozómom 9 a 18. Stanovili sme karyotyp 46,XX,der(18)t(9;18)(p12;p11)[8]/46,XX[12] (obr.1). Následkom prestavby je trizómia krátkych ramien chromozómu 9 a monozómia krátkych ramien chromozómu 18.

### FISH analýza

**FISH analýza bola uskutočnená na vzorkách kostnej drene po 24-hodinovej kultivácii pomocou sond:**

- > celochromozómových wcp 9 a wcp 18 (Metasystems, Alogo) (obr.2),
- > Ysis CDKN2A SG/ CEP 9 SO FISH so Probe Kit (Zytovision), ktorá hybridizuje do oblastí 9p21 a centromerovej 9p11-q11 (obr.3),
- > centromerovej XA X/Y/18 (Metasystems, Alogo) (obr.4).

Pomocou uvedených sond sme upresnili a potvrdili prítomnosť derivovaného chromozómu 18.

### Molekulová analýza

Molekulovú analýzu JAK2 génu sme uskutočnili metódou RT PCR – alelická diskriminácia, pomocou kitu JAK2 Mutascreeen (Qiagen) a potvrdili sme prítomnosť mutácie V617F v géne JAK2. Zároveň sme stanovili kvantitu pozitívnej JAK2 alely na 10,06%.

Vyšetrili sme aj BCR-ABL zlomy, ktoré nepotvrdili prítomnosť BCR-ABL transkriptu.

## ZÁVER

V čase diagnózy máva väčšina pacientov prítomný normálny karyotyp, chromozómové zmeny sa objavujú zväčša s progresiou ochorenia. Výskyt popisovanej nebalansovanej prestavby der(18)t(9;18)(p12;p11) je v čase diagnózy zriedkavý. Aktivačná JAK2 V617F mutácia je prítomná u väčšiny PV pacientov a predpokladá sa, že má primárnu úlohu v patogenéze myeloproliferatívnych ochorení. JAK2 gén je lokalizovaný do oblasti 9p24 a preto pacienti s trizómiou 9p majú navyše jednu kópiu génu, či už v normálnej alebo mutovanej forme, čoho následkom je zvýšenie expresie génu (gain of function).

Súčasný výskyt chromozómovej prestavby s mutáciou JAK V617F zapríčiňuje proliferatívny fenotyp ochorenia s vysokou pravdepodobnosťou transformácie do postpolycytemickej myelofibrózy a potenciálne do akútnej leukémie.

Pacientka je t.č. nastavená na liečbe Hydroxyureou v dávke 1-1-1 s dobrou toleranciou a účinnosťou. Redukcia cefaley je o 75%. Napriek tomu, že spoločný výskyt chromozómovej prestavby der(18)t(9;18) s mutáciou JAK2 V617F je v literatúre spájaný s progresiou ochorenia, je pacientka v stabilizovanom stave a má sa dobre.

## LITERATÚRA

1. CASE REPORTS in HAEMATOLOGY. 2. (Paper co-edited with the European LeukemiaNet)Unbalanced rearrangement der(9;18)(p10;q10) in a patient with polycythemia vera Xinjie Xu, Xueyan Chen, Elizabeth A Rauch, Eric B Johnson, Kate J Thompson, Jennifer JS Laffin, Gordana Raca, Daniel F Kurtycz,2010-04. 3. CASE REPORTS in HAEMATOLOGY. 4. (Paper co-edited with the European LeukemiaNet)Unbalanced rearrangement, der(9;18)(p10;q10) in a patient with myeloproliferative neoplasm. Case 0001M. Kavita S Reddy,2011-03. 5. CASE REPORTS in HAEMATOLOGY. 6. (Paper co-edited with the European LeukemiaNet)Unbalanced rearrangement der(9;18)(p10;q10) and JAK2 V617F mutation in a patient with AML following post-polycythemic myelofibrosis. Francesca Cambos, Giuseppina Fogu, Paola Maria Campus, Claudio Fozza, Luigi Podda, Andrea Montella, Maurizio Longinotti.2011-09

Tretí poster pod názvom „Nebalansovaná prestavba der(18)t(9;18)(p12;p11) u pacientky s polycytémia vera (kazuistika)“ od RNDr. Andrey Blahovej a kol. predstavuje prípad 79-ročnej pacientky, ktorej hematológ stanovil diagnózu polycytémia vera (PV). Vyšetřili sme vzorku kostnej drene a molekulovou analýzou sme detegovali prítomnosť mutácie V617F v géne *JAK2*. Cytogenetickou a FISH analýzou sme odhalili zriedkavú prestavbu karyotypu – 46,XX,der(18)t(9;18)(p12;p11), následkom ktorej je prítomná trizómia krátkych ramien chromozómu 9 a monoizómia krátkych ramien chromozómu 18. Aktivačná *JAK2* V617F mutácia je prítomná u väč-

šiny PV pacientov a predpokladá sa, že má primárnu úlohu v patogenéze myeloproliferatívnych ochorení. *JAK2* gén je lokalizovaný do oblasti 9p24, preto súčasný výskyt danej chromozómovej prestavby s mutáciou *JAK2* V617F zapríčiňuje proliferatívny fenotyp ochorenia s vysokou pravdepodobnosťou transformácie do postpolycytemickej myelofibrózy a potenciálne do akútnej leukémie (**obrázok 3**).

Poznanky z konferencie sú veľkým prínosom pre našu ďalšiu prácu, umožňujú nám zlepšovať diagnostiku ochorení a pomáhajú vyriešiť nové zaujímavé prípady, ktoré budeme môcť prezentovať na ďalších kongresoch.



**RNDr. Andrea Blahová**

Medirex, a. s.

Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava

e-mail: andrea.blahova@medirex.sk

## Autodidaktický test 1/2018



Autodidaktický test, zostavený na základe článkov tohto vydania newslabu, sa nachádza na webovej stránke [www.medirexgroupacademy.sk](http://www.medirexgroupacademy.sk). Na tejto stránke nájdete pokyny a test môžete vypíňať jednoducho online. AD test je akreditovaný a podľa úspešnosti riešenia je ohodnotený kreditmi. Môžete ho riešiť od 15. apríla 2018 počas nasledujúcich šiestich mesiacov.

# LIQUID-BASED CYTOLÓGIA (LBC)

## DÔLEŽITÁ SÚČASŤ PREVENTÍVNEJ GYNEKOLOGICKEJ PREHLIADKY

Najmodernejšie cytologické vyšetrenie na spoľahlivý záchyt nádorových zmien buniek krčka maternice už v ich včasných štádiách.

**L**iquid **B**ased **C**ytology

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

V laboratóriách Medicyt používame pri vyhodnocovaní cytologických preparátov ako jediní na Slovensku počítačom riadený automatický mikroskop, ktorý pracuje nepretržite 24 hodín denne a rozpozná aj tie najmenšie zmeny, ktoré by mohli ľudskému oku uniknúť. Spoľahlivý výsledok vyšetrenia tak prechádza dvojitou kontrolou – automatického mikroskopu aj lekára cytológa.





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

