

Ročník IX.

newslab

časopis laboratórnej medicíny

2
2018

Geneticky významné aberácie u pacientov s myelodysplastickým syndrómom a spôsoby ich detekcie

Genetically important aberrations in patients with myelodysplastic syndrome and laboratory methods of their detection

Molekulovogenetická diagnostika ľudského papilomavírusu (HPV) a monitorovanie pacientok s HPV

Molecular – genetic diagnostics of Human Papillomavirus (HPV) and monitoring of HPV patients

Možnosti laboratórnej diagnostiky infekcií vyvolaných Clostridium difficile

Laboratory diagnostic possibilities for Clostridium difficile infections

Chorangióza placenty – postihnutie placenty nejasnej etiológie (kazuistika a prehľad súčasného poznania)

Chorangiomas of Placenta - Disorder of Unclear Etiology (Case Report and Overview of Current Knowledge)

Cirkulujúca nádorová DNA a jej využitie ako markera s prognostickou, prediktívnou a diagnostickou hodnotou u pacientov s nádorovými ochoreniami

Circulating tumor DNA and its utilization as marker with prognostic, predictive and diagnostic value in patients with oncological diseases

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.

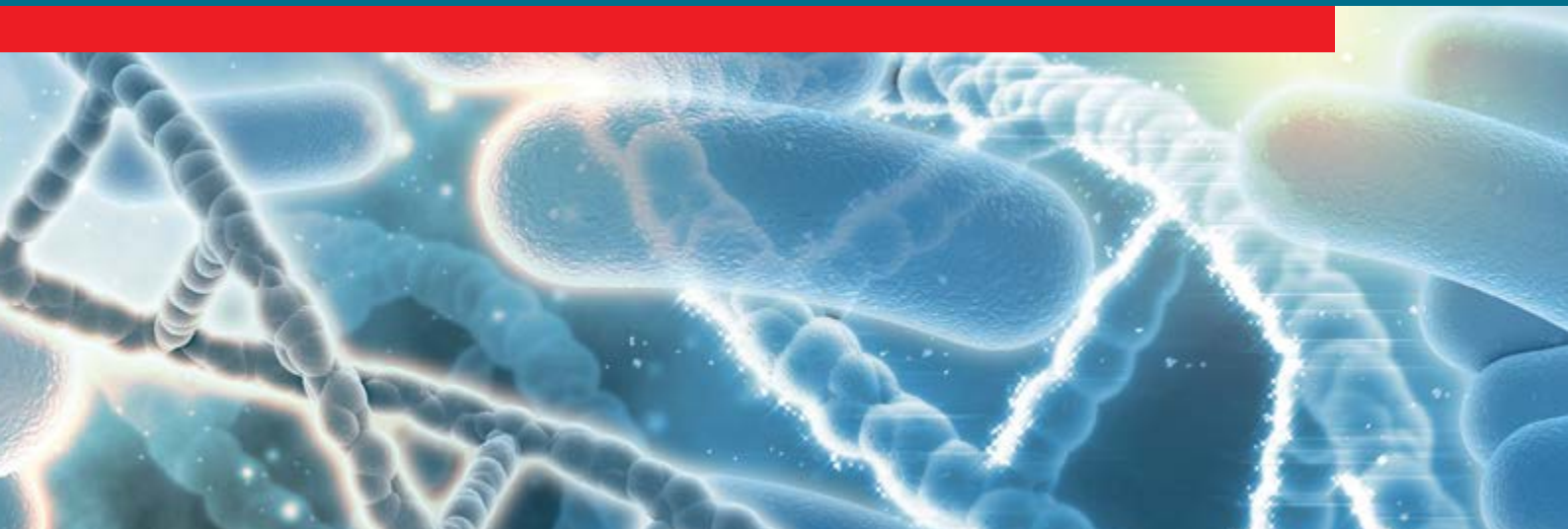
Časopis má pridelenú citačnú skratku, čo v praxi znamená, že autorom sa ich príspevky započítavajú do publikačnej činnosti. Zároveň je indexovaný v Bibliographia Medica Slovaca (BMS) a citácie sú spracované v CiBaMed.

Všetky uverejnené príspevky autorov sú recenzované.

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.

V prípade záujmu o publikovanie nás kontaktujte na e-mailovej adrese: redakcia@newslab.sk.



GeneFiction

Mnoho rokov už nie sú paragrafy o manželstve v ústave a úrady, ktoré vedú tzv. matriky, v nich už dávnejšie nezaznamenávajú, kto s kým má partnerský vzťah. Ukázalo sa však, že treba evidovať páry podľa toho, či sa rozhodli pre enhansované, alebo len pre ľudské potomstvo.

Spočiatku sa používalo len mäkké enhansovanie. Diskutovalo sa, či študenti smú užívať ALCAR (acetyl-L-karnitín) na podporu učenia a pamäti, alebo či sa má odobrať medaila za víťazstvo v silovom dvojboji ženám, ktoré užívali androgény. Dnes už nie je témou, či transplantujeme mozog telu, alebo telo mozgu. Nedesia nás ľudsko-zvieracie hybridy a na Mars posielame ľudí s okom muchy, ktorého fazetovanie je výhodnejšie pri pohľade cez uhlovo obmedzený priezor prilby. „Trans“, ako sa kedysi hovorilo „ako keby enhansovaný“ zmenám pohlavia, znie v dnešných súvislostiach ako nedorozumenie.

Na účely tohto editoriálu hovorím preto o transčloveku (transľuďoch) v zmysle poľudskej (po ľuďoch nasledujúcej, posthumánnej) evolúcie a pojmom človek (ľudia) budem označovať tých, ktorí ostali v pôvodnom biologickom ľudskom móde ako neenhansovaní na „trans“.

Časopis Nature (v tom čase ešte ľudský) uverejnil v roku 2000 priekopnícky príspevok Teda Chianga s názvom *Catching crumbs from the table*⁽¹⁾. T. Chiang sa pokúsil opísať konvenčnou ľudskou rečou inak prakticky nepriepustnú hranicu medzi ľuďmi a enhansovanými transľuďmi.

Po tomto významnom impulze sa znova rozbehol genetický a behaviorálny výskum ľudskými metódami, ktoré by inak ďalej zapadli prachom. Sugimotova⁽²⁾ metóda génovej „terapie“ totiž umožnila enhansovať kmeňové bunky embryonálneho mozgu. Výsledkom boli „transľudské“ alebo prinajmenšom „mimoľudské“ mentálne vlastnosti a ľuďom nedostupné komunikačné schopnosti „transľuďí“ (opisované ako DNT, *Digital Neuronal Transfer*).

Pár, ktorý sa rozhodne splodiť potomka transľudskej budúcnosti, musí požiadať príslušnú zdravotnú poisťovňu s pôsobnosťou na území Slovenska o aplikovanie OPAR (**O**sobitná **P**rocedúra **A**sistovanej **R**eprodukcie). OPAR znamená IVF (*In Vitro Fertilizácia*), pri ktorej sa vo včasnej fáze brázdnenia oplodneného vajíčka aplikuje Sugimotova metóda génovej terapie. *In vivo* by sa musel tento zákrok robiť vo vajíčkovode, lebo metóda nie je použiteľná ani v neskorších fázach intrauterinného vývinu, ani postnatálne. Ľudskí partneri tak splodia potomka, ktorý je transčlovekom a dakedy medzi 5. mesiacom a prvým rokom života sa tak začne správať. Partneri mu doprajú budúcnosť enhansovaného transčloveka, ktorému však nebudú stačiť a nikdy s ním nenadviažu ľudský vzťah. Naopak, rozhodnutie neenhansovať, teda buď nesúhlasiť s aplikáciou Sugimotovej metódy, alebo dokonca splodiť potomstvo bez použitia metód asistovanej reprodukcie (tzv. prirodzenou cestou), znamená dieťa s osobným ľudským kontaktom. Ale dieťa bez budúcnosti (T. Chiang ho prirovnáva k blúdiacemu Kašparovi Hauserovi⁽³⁾ našich čias).

Sme smrteľní, ak ostaneme ľuďmi, vyhynieme. Azda takto vyhynuli aj neandertálci, keď sme ich postupne nahrádzali my transneandertálci, teda dnešní výbehoví ľudia. Niektorí ľudia budú mať prospech z toho, že prežili so svojimi deťmi ľudský život. Daktorí sa budú nádejať, že ich transľudské deti žijú šťastný život za horizontom skúsenosti, ktorý oni sami nikdy neprekročia. Aká bude v tejto situácii spoločenská objednávka? Kto bude mať záujem na prekonaní Sugimotovej metódy⁽⁴⁾? Kto bude investovať do toho, aby sme išli ďalej, prekračovali hranice, ale aby sme, hoci ako transľudia, ostali ľuďmi?

MUDr. Peter Križan, CSc., klinický genetik

LITERATÚRA

1. Ted Chiang *Catching crumbs from the table* <https://www.nature.com/articles/35014679.pdf>
2. Gene Therapy, Yoshikazu Sugimoto, <http://k-ris.keio.ac.jp/Profiles/179/0017900/profile.html>
3. Kašpar Hauser, https://cs.wikipedia.org/wiki/Ka%C5%A1par_Hauser

4. Hiroshi Sugimoto, *Lost Human Genetic Archive and the end of mankind*, 2016 <http://www.sigma-sein.com/en/curator/HiroshiSugimotosLostHumanGeneticArchiveandtheendofmankind/> <http://www.artsobserver.com/2014/06/17/the-miraculous-beauty-of-hiroshi-sugimotos-last-supper/> <https://www.guggenheim.org/artwork/10930>



Pôvodné práce

Geneticky významné aberácie u pacientov s myelodysplastickým syndrómom a spôsoby ich detekcie 65

Andrea Blahová, Nikola Chovanová, Kristína Lengyelová, Alexandra Oravcová, Gabriela Veselá, Alena Žákovičová, Kristína Juríková, Jakub Petřík, Michaela Patáková-Zrubcová, Renata Lukačková

Molekulovogenetická diagnostika ľudského papilomavírusu (HPV) a monitorovanie pacientok s HPV 72

Alexandra Oravcová, Andrea Kucková, Renata Lukačková

Metanephries in urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry 81

Magdalena Rajska, Petra Prochazková, Peter Loučka, Martin Radina

Možnosti laboratórnej diagnostiky infekcií vyvolaných *Clostridium difficile* 86

Martina Kreheľová, Eva Sinajová

Prehľadové práce

Vírus Zika 92

Katarína Briestenská, Jela Mistríková

Diagnostika cystickej fibrózy so zameraním na molekulárnogenetickú analýzu CFTR génu 98

Mária Giertlová, Adriana Šprincová

Cirkulujúca nádorová DNA a jej využitie ako markera s prognostickou, prediktívnou a diagnostickou hodnotou u pacientov s nádorovými ochoreniami 102
Gabriel Minárik, Tatiana Sedláčková

Cirkulujúce nádorové bunky ako markery využiteľné pri manažmente pacientov s nádorovými ochoreniami 108

Tatiana Sedláčková, Gabriel Minárik

Štítna žláza v tehotenstve 113
Drahomíra Springer, Tomáš Zima

Kazuistiky

Chorangióza placenty – postihnutie placenty nejasej etiológie (kazuistika a prehľad súčasného poznania) 121

Kristína Mikuš-Kuracinová, Zuzana Čierna, Andrea Janegová

Novinky, názory a pohľady

Potenciál novej generácie sekvenovania pri skríningu Lynchovho syndrómu 125

Ondrej Pös, Mária Haršanyová, Tomáš Szemes

Multiomická triangulácia alebo potenciálne využitie omických analýz v diagnostickej praxi 128

Ján Radvánszky

Predstavujeme

Parazitológom z Medirexu, a. s. uverejnili odborný dokument v uznávanom medzinárodnom časopise Vojtech Boldiš 130

Ročník 9, 2018, číslo 2
Vychádza 2x ročne
Dátum vydania: október 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.

Ing. Pavol Suló, CSc.

Dr. Bálint Nagy, PhD.

MUDr. Peter Bohuš

MUDr. Eva Ďurovcová, PhD.

MUDr. Ján Lazúr

Mgr. Peter Baráth, PhD.

MUDr. Pavol Janega, PhD.

RNDr. Ján Radvánszky, 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.

Citáčna 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.

Geneticky významné aberácie u pacientov s myelodysplastickým syndrómom a spôsoby ich detekcie

Andrea Blahová¹, Nikola Chovanová², Kristína Lengyelová¹, Alexandra Oravcová¹, Gabriela Veselá¹, Alena Žákovičová¹, Kristína Juríková¹, Jakub Petřík¹, Michaela Patáková-Zrubcová¹, Renata Lukačková¹

¹Lekárska genetika, Medirex, a. s., Bratislava

²Prírodovedecká fakulta, UK, Bratislava

Myelodysplastický syndróm (MDS) tvorí heterogénnu skupinu klonálnych hematopoetických ochorení kostnej drene. Ochorenie definuje neefektívna hematopoéza, dysplastické zmeny krvných buniek a prítomnosť cytopénie v periférnej krvi. Pacienti majú zväčša vyšší vek a približne 30 % všetkých pacientov neskôr transformuje do akútnej myeloidnej leukémie (AML). Klonálne chromozómové abnormality sú detegované približne u 50 % pacientov s primárnym MDS a u viac ako 80 % pacientov so sekundárnym MDS. Na základe konkrétnych chromozómových abnormalít sa dá predpovedať prognóza pacienta, jeho celkové prežívanie a podanie vhodnej liečby. Na vyšetrenie pacientov a na dokázanie týchto abnormalít sme použili cytogenetickú analýzu karyotypu, fluorescenčnú in situ hybridizáciu (FISH) a multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA).

Kľúčové slová: myelodysplastický syndróm, chromozómové aberácie, diagnostika

Genetically important aberrations in patients with myelodysplastic syndrome and laboratory methods of their detection

The myelodysplastic syndrome (MDS) is a heterogeneous group of clonal haematopoietic disorders originated in the bone marrow. It is characterized by ineffective haematopoiesis, dysplastic changes in blood cells and cytopenia in peripheral blood. Patients are mostly older, and around 30% of all patients later transform to acute myeloid leukemia (AML). One of the essential parameters in diagnosis is an evidence of chromosomal aberrations characteristic for this disease. Chromosomal changes are detected in approximately 50% of patients with primary MDS, and more than 80% patients are detected with secondary MDS. According to specific chromosomal abnormalities, it is possible to predict a patient's prognosis, his overall survival and an appropriate treatment. We detected these abnormalities by cytogenetic method using conventional banding techniques, fluorescence in situ hybridization (FISH) and multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA).

Keywords: myelodysplastic syndrome, chromosomal aberrations, diagnostics

NewsLab, 2018; roč. 9 (2): 65 – 70

Úvod

Myelodysplastický syndróm (MDS) predstavuje heterogénnu skupinu chronických myeloidných ochorení s pôvodom v kostnej dreni. Ide o klonálnu poruchu krvotvorby ako dôsledok mutácií vznikajúcich v pluripotentných kmeňových bunkách. Vplyvom mutácií dochádza k nedostatočnej maturácii, diferenciacii, resp. porušenej proliferácii, a k morfologickej dysplázii krvných elementov. Tieto zmeny vedú k vzniku inefektívnej dysplastickej hematopoézy s potenciálnym rizikom transformácie MDS do akútnej myeloblastovej leukémie (AML) až v 30 % všetkých prípadov. Spoločným znakom ochorenia je hypercelulárna kostná dreň a prítomnosť rôzneho stupňa periférnej cytopénie. Typická je prítomnosť anémie, ale aj leukopénie a trombocytopénie a ich vzájomná kombinácia⁽¹⁾.

MDS patrí medzi časté hematologické malignity v Európe s celkovým výskytom približne 4 prípady na 100 000 obyvateľov za rok. Výskyt prudko stúpa so zvyšujúcim sa vekom najmä vo vekovej skupine nad 60 rokov a vo veku \geq 80 rokov je incidencia ochorenia až 50 prípadov/100 000 obyvateľov ročne. Medián veku pri nástupe choroby je okolo 70 rokov, pričom z celkového počtu pacientov len 10 % tvoria pacienti s vekom pod 50 rokov⁽²⁾. Deti sú postihnuté zriedkavo, priebeh ochorenia a cytogenetické nálezy sú odlišné od dospelých pacientov⁽³⁾.

Príčiny vzniku MDS

Vývoj MDS je viacstupňový proces, pri ktorom dochádza k zmenám v genetickom materiáli pluripotentnej hematopoetickej kmeňovej bunky. Tá je morfologicky a funkčne odlišná a získava rastovú výhodu. Mechanizmus patogenézy MDS nie je v súčasnosti úplne objasnený, predpokladá sa postihnutie génov regulujúcich rast, diferenciaciu a zánik bunky. Takto pozmenená bunka proliferuje a postupne jej klony nahrádzajú zdravé kmeňové bunky, čím nastáva útlm alebo zastavenie normálnej krvotvorby⁽⁴⁾. Rozoznávame dva typy MDS – primárny a sekundárny. O primárnom hovoríme, keď nie je známa príčina ochorenia. Predstavuje 85 % zo všetkých MDS a postihuje hlavne staršiu populáciu s priemerným vekom 60-70 rokov. V posledných rokoch stúpa incidencia primárneho MDS, a to vzhľadom na lepšie diagnostické metódy, starnutie populácie a pôsobenie faktorov prostredia⁽⁵⁾. Pri sekundárnom MDS (~ 15 %) vieme objasniť príčiny vzniku ochorenia. Môže ich byť viacero, napríklad chemoterapia, rádioterapia alebo vplyv environmentálnych toxínov⁽⁶⁾.

Prognóza ochorenia

Priebeh ochorenia je veľmi variabilný, od najľahších foriem s priemerným prežívaním niekoľko rokov až po najťažšie formy s prežívaním nižším ako 5 mesiacov⁽⁷⁾. Z hľadiska

prognózy existuje niekoľko prognostických systémov, ktoré na základe súvisiacich znakov triedia pacientov do rizikových kategórií⁽⁶⁾. V súčasnosti sa používa **Revidovaný medzinárodný prognostický skórovací systém – IPSS-R**, ktorý delí pacientov do 5 rizikových kategórií v súlade s konkrétnymi parametrami udávajúcimi prognostický význam a podľa ktorých prebieha liečba. IPSS-R zahŕňa aj **MDS Cytogenetický skórovací systém (tabuľka 1)**, ktorý určuje prognostickú skupinu pacienta na základe cytogenetických nálezov v karyotype⁽⁹⁾.

Chromozómové aberácie

Chromozómové aberácie zohrávajú dôležitú úlohu v patogenéze, prognóze a diagnostike ochorenia. Pri primárnom MDS sa zaznamenali pri 40 – 60 % pacientoch. Pacienti so sekundárnym MDS majú spravidla viac zmien v genotype, až v 80 – 90 % sú pozorované chromozómové prestavby⁽⁶⁾. Komplexný karyotyp s viac ako tromi aberáciami naraz je pozorovaný približne u 15 % *de novo* MDS oproti 50 % pri sekundárnom MDS⁽¹⁰⁾.

Medzi najčastejšie zmeny patria **del(5q)/-5, 01507/del(7q), +8, del(20q)** a **-Y**. Menej často sa vyskytuje **-17/del(17p)/i(17q), -18/del(18q), +21, +19, inv/t/del(3q), -13/del(13q), -21, t(5q), +11, +1/+1q, del(12p), del(11q), t(7q), +mar** a iné^(7,11).

Podľa prítomných zmien v bunkách môžeme predpokladať prognózu ochorenia. U pacientov s dobrou prognózou nachádzame normálny karyotyp, prípadne len jednoduché zmeny. Priebeh ochorenia je mierny, dlhotrvajúci s prežívaním niekoľko rokov a liečba je väčšinou symptomatická. Čím je prognóza horšia, tým je kratší čas prežívania pacientov, sú prítomné rôzne genetické zmeny a je väčšia aj pravdepodobnosť leukemickej transformácie⁽¹²⁾.

Spôsoby detekcie genetických zmien

1. Cytogenetická analýza

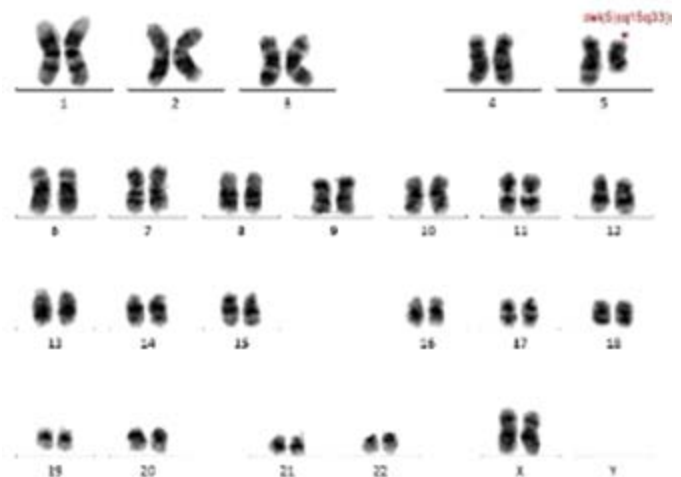
K základným metódam na detekciu aberácií patrí cytogenetická analýza chromozómov. Umožňuje sledovať numerické a štruktúrované prestavby karyotypu (**obrázok 1**). Veľkou výhodou metódy je možnosť vyšetriť všetky chromozómy v jednom pohľade. Nevýhodou je neschopnosť identifikovať submikroskopické zmeny pod detekčným limitom metódy a zároveň potreba metafáz.

2. FISH metóda

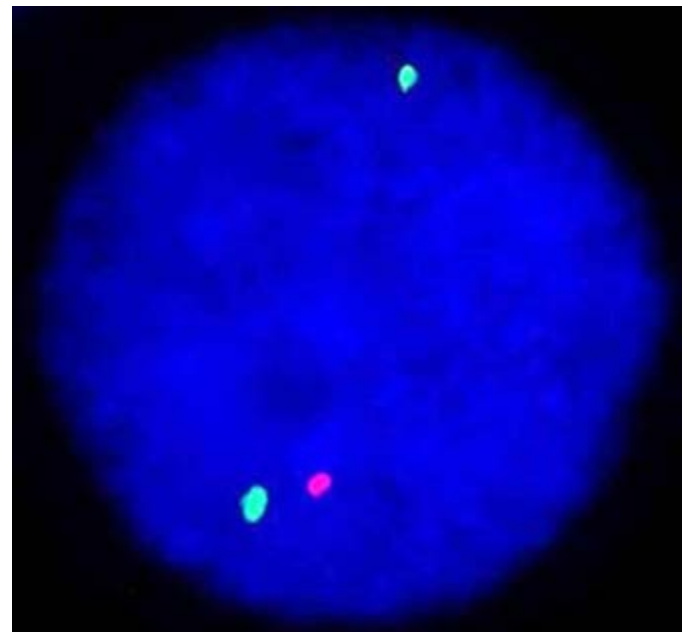
Fluorescenčná in situ hybridizácia (FISH) je bežnou metódou v cytogenetických laboratóriách a k jej výhodám patrí možnosť analýzy buniek nielen v metafáze, ale aj v interfáze, keď nie je nutná kultivácia buniek. Ďalšou výhodou je rýchle

analyzovanie veľkého množstva buniek. Zároveň umožňuje odhaliť aberácie aj asi v 15 % cytogeneticky negatívnych prípadov a pomáha objasňovať komplexné prestavby. Limitujúcim faktorom metódy je možnosť identifikácie len tých úsekov DNA, pri ktorých sú použité sondy. Na relevantnú detekciu treba mať vo vzorke aspoň 1 – 5 % aberantných interfázových jadier (**obrázok 2**).

Obrázok 1. Karyotyp pacienta s MDS, 46,XX,del(5)(q15q33) (G-band, archív Medirex, a. s.)



Obrázok 2. FISH analýza s lokusovou špecifickou sondou pre oblasti 5p12 (zelený signál) a 5q31 (červený signál) potvrdzujúca deléciu 5q31 (archív Medirex, a. s.)



Tabuľka 1. MDS Cytogenetický skórovací systém^(9, upravené)

Prognostická skupina	Cytogenetické abnormality	Medián prežívania (roky)	Medián progresie do AML (roky)
Veľmi dobrá	-Y, del(11q)	5,4	nedosiahnutý
Dobrá	normálny karyotyp, del(5q), del(12p), del(20q), dvojité zahŕňajúce del(5q)	4,8	9,4
Stredná	del(7q), +8, +19, i(17q), akékoľvek iné samostatné alebo dvojité nezávislé klony	2,7	2,5
Zlá	-7, inv(3)/t(3q)/del(3q), dvojité zahŕňajúca -7/del(7q), komplex 3 abnormalít	1,5	1,7
Veľmi zlá	komplex > 3 abnormalít	0,7	0,7

3. MLPA analýza

Podobne ako FISH aj molekulárno-cytogenetická metóda MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification) využíva naviazanie oligonukleotidových sond na cieľovú sekvenciu DNA na základe ich komplementarity. Oproti FISH je táto metóda schopná identifikovať naraz viac ako 40 rôznych sekvencií DNA v jednej reakcii⁽¹³⁾. Sonden využívané pri MLPA metóde majú kratšiu dĺžku (50 – 70 bp) a umožňujú citlivú detekciu aj iných klinicky relevantných MDS abnormalít s nižšou frekvenciou. Výhodou MLPA je odlišenie sekvencií, ktoré sa navzájom líšia rozdielom jedného nukleotidu (**obrázok 3**). Nevýhodou techniky je potreba mať vo vzorke aspoň 30 % mutovaných buniek na spoľahlivú detekciu abnormalít⁽¹⁴⁾.

Cieľom našej práce bolo:

1. Vytvoriť a analyzovať súbor pacientov s diagnózou MDS vyšetrených na našom oddelení genetiky v čase od februára 2016 do apríla 2018.
2. Zistiť prítomnosť chromozómových aberácií, charakterizovať ich, určiť ich incidenciu v súbore a rozdeliť pacientov podľa prítomných aberácií.
3. Zhodnotiť vzťah medzi výsledkami vyšetrení a prognózou.
4. Stanoviť prínos jednotlivých metód pri hodnotení chromozómových aberácií a porovnanie úspešnosti použitých metód – klasická cytogenetika, metóda FISH a metóda MLPA.

Súbor pacientov a metódy

Do práce sme zaradili pacientov s diagnózou MDS, ktorí boli vyšetrení v našom laboratóriu genetiky od februára 2016 do apríla 2018. Kritériom na zaradenie pacienta bola

diagnóza stanovená lekárom na žiadanke. Celkovo sme analyzovali 620 vzoriek pacientov, z toho 383 vzoriek kostnej drene (KD) a 237 vzoriek periférnej krvi (PK). V práci sme použili nasledovné metódy: cytogenetika, FISH a MLPA.

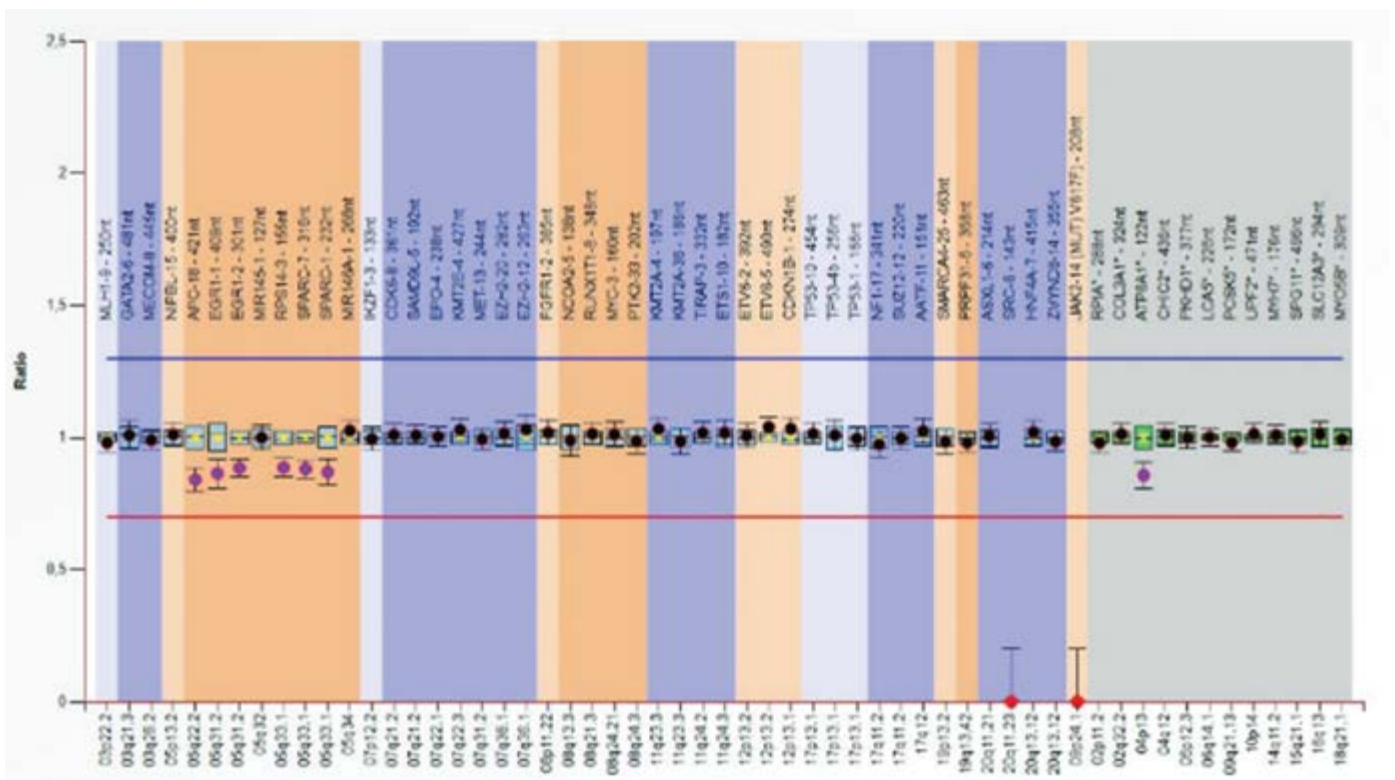
Preparáty na vyšetrenie karyotypu boli pripravené 24-hodinovou kultiváciou buniek KD v kompletnom médiu a spracované podľa štandardných postupov. U 360 pacientov bolo analyzovaných, ak to bolo možné, 20 metafáz a bol stanovený cytogenetický zápis podľa ISCN (International System of Chromosome Nomenclature). Pri metóde FISH sa ako vstupný materiál použila kultivovaná KD a/alebo PK pacienta pripravená priamym spracovaním. Následne prebehla hybridizácia s príslušnou sondou a hodnotenie preparátov pod fluorescenčným mikroskopom. Spolu bolo zhodnotených 521 vzoriek, 380 KD a 141 PK. Vstupným materiálom na analýzu MLPA bola izolovaná DNA zo vzorky KD a/alebo PK dodaná v EDTA. Na analýzy sa použil kit SALSA MLPA P414-B1 MDS probemix (MRC – Holland) na detekciu 46 špecifických chromozómových oblastí s amplifikačnými produktmi od 122 do 469 nukleotidov. Sonden sú navrhnuté na najrozšírenejšie a na prognosticky relevantné aberácie pri MDS podľa IPSS-R. Toto metódou sa vyšetřilo 398 pacientov (214 KD a 184 PK).

Výsledky

1. Charakteristika a analýza súboru pacientov

Súbor zahŕňa vzorky kostnej drene alebo periférnej krvi od 620 pacientov a pozostáva z 289 (46,6 %) pacientov mužského a 331 (53,4 %) ženského pohlavia. Vekový medián pacientov v čase určenia diagnózy bol 69 rokov s vekovým

Obrázok 3. Grafický výsledok MLPA analýzy odhaľujúci deléciu 5q22.2-5q33.1 (archív Medirex, a. s.)

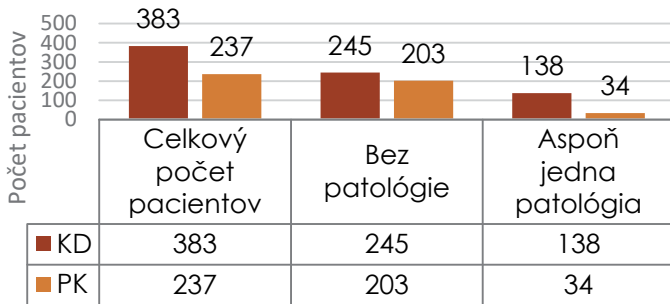


rozpätím 13 až 93 rokov. Pacienti vyšetrení zo vzorky kostnej drene mali patológie v 36 % prípadoch, pacienti vyšetrení zo vzorky periférnej krvi len v 14 % prípadoch (**obrázok 4**).

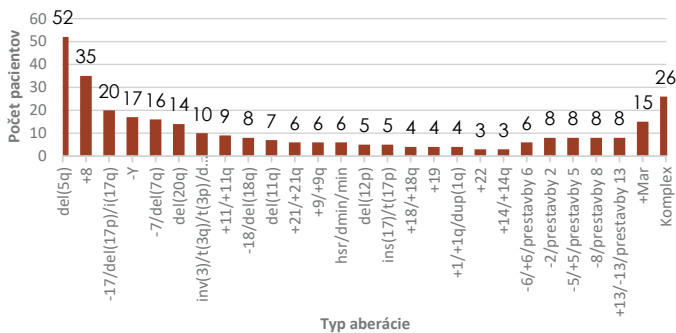
2. Incidencia chromozómových abnormalít

Z výsledkov vzoriek kostnej drene 383 pacientov, ktorí boli vyšetrení cytogeneticky, metódou FISH a/alebo MLPA, sme charakterizovali a následne stanovili výskyt najčastejších abnormalít (**obrázok 5**). Detegovali sme spolu 287 chromozómových aberácií, pričom u 99 % pacientov boli použité aspoň dve metódy na vyšetrenie. Na grafe (**obrázok 6**) je znázornené jednotlivé zastúpenie aberácií ako izolované abnormality v genóme a ako abnormality, ktoré sa vyskytli v kombinácii s inými patológiami.

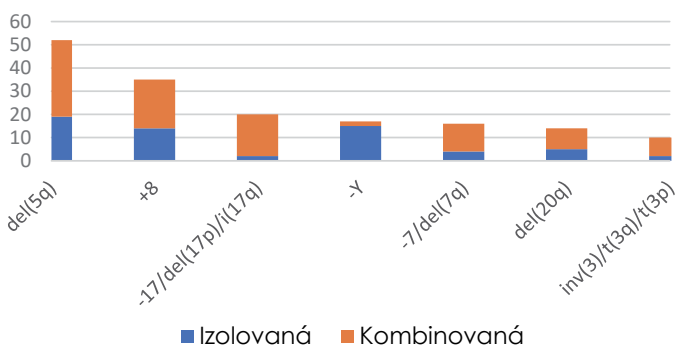
Obrázok 4. Podiel vyšetrených pacientov; graf zobrazuje celkový podiel pacientov vyšetrených zo vzorky kostnej drene (KD) a periférnej krvi (PK); podiel pacientov bez prítomnej patológie a podiel pacientov aspoň s jednou patológiou v genóme



Obrázok 5. Výskyt najčastejších abnormalít u pacientov s MDS (vzorky kostnej drene)



Obrázok 6. Grafické znázornenie výskytu najčastejších aberácií izolovane (modrá) a v kombinácii s ďalšími aberáciami (oranžová)



3. Určenie prognózy pacientov

Pomocou výsledkov vyšetrení z analýz vzoriek kostnej drene získaných metódami cytogenetiky, FISH a/alebo MLPA bola stanovená prognóza a medián prežívania 383 pacientom (**obrázok 7, tabuľka 2**). Hodnotené bolo zastúpenie jednotlivých pacientov v prognostických skupinách a ich celkové prežitie.

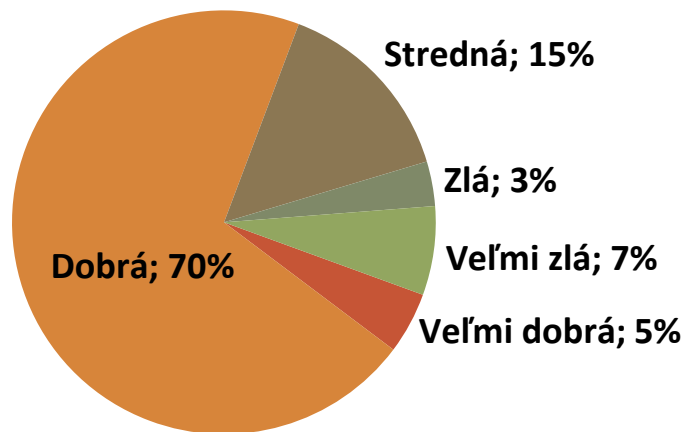
Medián prežívania sme vypočítali štatistickou Kaplanovou-Meierovou metódou spoločne pre 351 pacientov, od ktorých sme mali dostupné informácie o prežívaní, resp. úmrtí. Úspešne sme stanovili medián v skupinách: *stredná, zlá a veľmi zlá*. V skupinách *veľmi dobrá* a *dobrá* mali pacienti vyššie prežitie a pri ich prognózach neklesla pravdepodobnosť prežitia pod 0,5 (50 %). Nezískali sme teda relevantné dáta, keďže veľká časť pacientov ešte stále žije (**obrázok 8**). Grafické zobrazenie demonštruje, že s horšou prognózou klesá aj prežitie pacientov. V **tabuľke 3** je zhrnutie údajov z jednotlivých rizikových skupín. Zobrazené sú počty pacientov v skupinách, počet úmrtí a žijúcich v danej skupine a percento prežívania skupiny.

4. Stanovenie úspešnosti použitých metód

Všetkými troma metódami súčasne bolo vyšetrených 80 pacientov. Tento súbor slúžil na porovnanie úspešnosti použitých metód (**obrázok 9**). Porovnávali sme počet úspešných analýz jednotlivých metód, ktoré potvrdili aspoň jednu chromozómovú abnormalitu u konkrétnych pacientov.

FISH metóda zachytila chromozómové zmeny pri 66 (83 %) analýzach. Ukázala sa ako najcitlivejšia metóda na odhľadanie prítomnosti aberácií. Analýza karyotypu bola pozitívna pri 60 (75 %) prípadoch. Skrínigová metóda MLPA preukázala porovnateľnú úspešnosť ako cytogenetická analýza. Znamenala pozitívny nález u 59 (74 %) pacientov.

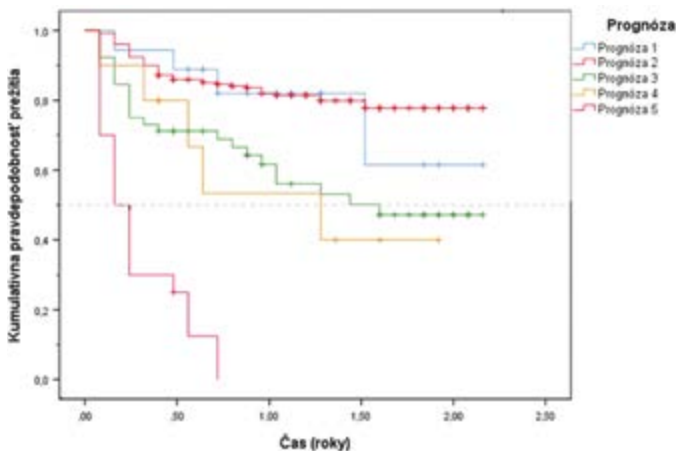
Obrázok 7. Grafické zobrazenie distribúcie prognostických skupín pacientov s MDS



Tabuľka 2. Rozdelenie pacientov do prognostických skupín podľa MDS cytogenetického skórovacieho systému

Prognostická skupina	Počet pacientov (%), n = 383	Medián prežívania (roky), n = 351
Veľmi dobrá	18 (5 %)	-
Dobrá	270 (70 %)	-
Stredná	56 (15 %)	1,6
Zlá	13 (3 %)	1,3
Veľmi zlá	26 (7 %)	0,2

Obrázok 8. Graf zobrazuje pravdepodobnosť prežitia pacientov v jednotlivých rizikových skupinách; prognóza 1 – **veľmi dobrá**, prognóza 2 – **dobrá**, prognóza 3 – **stredná**, prognóza 4 – **zlá**, prognóza 5 – **veľmi zlá**; pacientom s prognózou 1,2 pravdepodobnosť prežitia neklesla pod 0,5



Tabuľka 3. Súhrn dát pre jednotlivé rizikové skupiny

Prognostická skupina	Počet pacientov			Percento prežívania
	spolu	úmrtie	žijúci	
Veľmi dobrá	18	4	14	77,8 %
Dobrá	251	48	203	80,9 %
Stredná	52	24	28	53,8 %
Zlá	10	5	5	50 %
Veľmi zlá	20	19	1	5 %
Celkovo	351	100	251	71,5 %

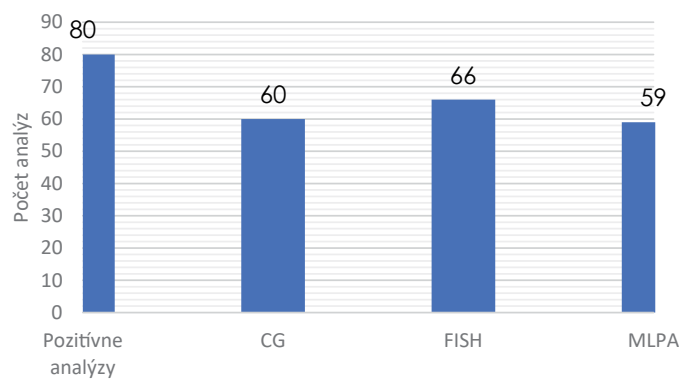
Diskusia

MDS je ochorenie prevažne starších ľudí s mediánom 70 rokov v čase diagnózy, skupinu pod 50 rokov tvorí ~ 10 % pacientov⁽²⁾. V našej práci bol vekový medián 69 rokov a počet pacientov mladších ako 50 rokov bol 15 %. Incidencia MDS rapídne stúpa s vekom nad 60 rokov. Greenberg a kol.⁽⁹⁾ uvádzajú, že až 77 % pacientov je v čase určenia diagnózy starších ako 60 rokov. V našej práci tvorili pacienti s vekom nad 60 rokov podiel 74 %.

Na štandardné analýzy bolo použitých 383 vzoriek kostnej drene a 237 vzoriek periférnej krvi. Pacienti vyšetrení zo vzorky kostnej drene mali patológie v 138 (36 %) prípadoch, pacienti vyšetrení zo vzorky periférnej krvi len v 34 (14 %) prípadoch. V literatúre sa udáva záchyt patológií v kostnej dreni pacientov v rozsahu od 37 do 55 %^(9,11,12). Ostatní pacienti mali negatívny nález. Štúdie, ktoré by uvádzali záchyt abnormalít z plnej periférnej krvi, nie sú k dispozícii. Na základe našich výsledkov môžeme konštatovať, že kostná dreň je oproti periférnej krvi vhodnejším biologickým materiálom na analýzy. Tu samotné ochorenie vzniká, je tu vyšší výskyt patologických buniek, a tým aj vyšší záchyt aberácií.

Z výsledkov vzoriek kostnej drene 383 pacientov, ktorí boli vyšetrení minimálne dvomi metódami z metód cytogenetiky, FISH a MLPA, boli charakterizované prítomné abnormality a následne bol stanovený výskyt tých najčastejších. V **tabuľke 4** sú porovnané naše údaje výskytu jednotlivých patológií so štúdiou s dostupnými údajmi. Naše údaje sa s literatúrou vo veľkej miere zhodujú. Tiež pomery izolovaných a kombinovaných chromozómových zmien sa zhodujú. Vzniknuté

Obrázok 9. Stanovenie úspešnosti jednotlivých metód; CG – cytogenetická analýza karyotypu



Tabuľka 4. Porovnanie výskytu aberácií v našom súbore MDS so štúdiou z roku 2007

Abnormalita	Náš výsledok (%), n = 383	Haase a kol., 2007 (%), n = 2 072
del(5q)	13,6 %	15,1 %
Izolovaná	5 %	7 %
Kombinovaná	8,6 %	8,1 %
+8	9,1 %	8,4 %
Izolovaná	3,7 %	3,9 %
Kombinovaná	5,4 %	4,5 %
-17/del(17p)	4,7 %	2 %
Izolovaná	0,5 %	0,1 %
Kombinovaná	4,7 %	1,9 %
-Y	4,4 %	2,8 %
Izolovaná	3,9 %	2 %
Kombinovaná	0,5 %	0,8 %
-7/del(7q)	4,2 %	11,1 %
Izolovaná	1 %	4,2 %
Kombinovaná	3,1 %	6,9 %
del(20q)	3,7 %	3,6 %
Izolovaná	1,3 %	1,7 %
Kombinovaná	2,3 %	1,9 %

rozdiely môžu byť spôsobené rôznou veľkosťou porovnávaných súborov. Použitím výsledkov z vyšetrení získaných metódami cytogenetiky, FISH a MLPA bola stanovená prognóza pacientov. Hodnotené bolo zastúpenie pacientov v prognostických skupinách a ich medián prežívania. Prognóza pacientov bola určená prítomnosťou daných abnormalít v genóme. Porovnaním našich dát so štúdiami vypracovanými na iných pracoviskách bola pozorovaná významná korelácia dosiahnutých výsledkov. Naše výsledky prognóz pacientov porovnané s inými štúdiami sú uvedené v **tabuľke 5**. Spolu s prognózou sme vypočítali medián prežívania 351 pacientom v jednotlivých rizikových skupinách. Výpočtom sme získali relevantné výsledky pre skupiny: stredná, zlá a veľmi zlá. Pre skupiny s veľmi dobrým a dobrým rizikom sme nemali postačujúce údaje. Naš súbor pacientov bol sledovaný počas 2 rokov a pacienti z týchto skupín často dosahujú prežívanie vyššie než 2 roky, priemerne od 5,3 do 8,7 roka⁽¹⁹⁾. Štatistiky sme pre tieto dve skupiny dosiahli prognostickú hodnotu, pri ktorej neklesla pravdepodobnosť prežitia pod 0,5 (50 %). Medián prežívania v strednej prognostickej skupine tvoril 1,6 roka. V zlej prognostickej skupine bol 1,3 roka a vo veľmi zlej prognostickej skupine mal hodnotu len 0,2 roka. Naše dosiahnuté výsledky a porovnanie s inými štúdiami sú zobrazené v **tabuľke 6**.

Tabuľka 5. Porovnanie našich výsledkov zastúpenia pacientov v prognostických skupinách s výsledkami štúdií z roku 2012 (podľa IPSS-R)

Prognostická skupina	Počet pacientov (%)		
	Naše výsledky (n = 383)	Greenberg a kol., 2012 (n = 7 012)	Schanz a kol., 2012 (n = 2 754)
Veľmi dobrá	18 (5 %)	255(4 %)	83 (3 %)
Dobrá	270 (70 %)	5069(72 %)	1817 (66 %)
Stredná	56 (15 %)	947(13 %)	523 (19 %)
Zlá	13 (3 %)	283(4 %)	138 (5 %)
Veľmi zlá	26 (7 %)	458(7 %)	193 (7 %)

Dôvodom, prečo nám vyšli nižšie hodnoty mediánu prežívania a nedosiahli sme výsledky pre skupiny s veľmi dobrou a dobrou prognózou, môže byť krátke obdobie sledovania pacientov. Naše výsledky potvrdili, že so zhoršovaním prognózy sa skraca celkové prežívanie pacientov.

Porovnávali sme tiež úspešnosť použitých diagnostických metód. Vyhodnocovali sme súbor pacientov, ktorí boli naraz vyšetrení všetkými tromi metódami. Pacienti nemohli mať negatívny nález a metódy museli zachytiť aspoň jednu abnormalitu.

FISH metóda sa ukázala ako najcitlivejšia na odhalenie prítomnosti patológií. Úspešne zachytila patológiu v 85 % prípadov. FISH má vysokú citlivosť a špecifitu k cieľovej oblasti v DNA. Deteguje abnormality s rozlíšením od 100 kb do 1 Mb, ale zachytí len oblasť chromozómu, pri ktorej je použitá sonda. Analýza karyotypu (75 %) a metóda MLPA (74 %) preukázali porovnateľnú úspešnosť. Karyotypová analýza zachytáva numerické a štruktúrne aberácie naraz na všetkých chromozómoch do detekčného limitu okolo 5 Mb a je obmedzená neúspešnou kultiváciou buniek v médiu⁽²⁰⁾.

LITERATÚRA

- Vondráková J. Myelodysplastický syndrom, diagnostika a liečba. Interni Med 2010; 12(11): 535-539.
- Germing U, Kobbe G, Haas R, Gattermann N. Myelodysplastic syndromes: diagnosis, prognosis and treatment. Dtsch Arztebl Int 2013; 110(46): 783-790. doi: 10.3238/arztebl.2013.0783.
- Rau ATK, Shreedhara AK, Kumar S. Myelodysplastic Syndromes in Children: Where Are We Today? Ochsner J. 2012; 12(3): 216-220.
- Neuwirtová R. Myelodysplastický syndrom: onkohematologické onemocnění vyššího věku. Čes Ger Rev 2005; 3(2): 21-28.
- Adès L, Itzykson R, Fenaux P. Myelodysplastic syndromes. Lancet 2014; 383(9936): 2239-2252.
- Larson RA. Therapy-related myeloid neoplasms. Haematologica 2009; 94(4): 454-459.
- Haase D, Germing U, Schanz J, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. Blood 2007; 110(13): 4385-4395.
- Jonas BA, Greenberg PL. MDS prognostic scoring systems – past, present, and future. Best Pract Res Clin Haematol 2015; 28(1): 3-13.
- Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. Blood 2012; 120(12): 2454-65.
- Zatkova A, Merk S, Wendehack M, et al. AML/MDS with 11q/MLL Amplification Show Characteristic Gene Expression Signature and Interplay of DNA Copy Number Changes. GENES, CHROMOSOMES & CANCER 2009; 48: 510-520.
- Haase D. Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. Ann Hematol 2008; 87(7): 515-526.

Tabuľka 6. Porovnanie našich výsledkov mediánu prežívania pacientov v jednotlivých prognostických skupinách s výsledkami štúdií z roku 2012 (podľa IPSS-R)

Prognostická skupina	Medián prežívania (roky)		
	Naše výsledky (n = 383)	Greenberg a kol., 2012 (n = 7 012)	Schanz a kol., 2012 (n = 2 754)
Veľmi dobrá	-	5,4	5,1
Dobrá	-	4,8	4,1
Stredná	1,6	2,7	2,2
Zlá	1,3	1,5	1,3
Veľmi zlá	0,2	0,7	0,5

Metóda MLPA umožňuje súčasne skrining 46 špecifických oblastí, v ktorých sú zahrnuté aj menej frekventované MDS abnormality. Jej obmedzením je však to, že nedokáže zachytiť balansované genetické prestavby a potrebuje aspoň 25 – 30 % postihnutých buniek vo vzorke⁽²¹⁾.

Záver

Incidencia MDS v súčasnosti v Európe stúpa a predpokladá sa každoročne nárast o 25 000 nových prípadov. Dôvodom je nielen starnutie populácie, ale aj nárast znečistenia prostredia. Preto je veľmi dôležitá presná diagnostika pacientov, správne stanovenie prognózy a následne nastavenie vhodnej terapie. V diagnostike aberácií sa dnes využívajú štandardné genetické metódy ako cytogenetické vyšetrenie karyotypu, metóda FISH a MLPA analýza, z ktorých má každá svoje nezameniteľné miesto a ich vzájomná kombinácia je zárukou zachytenia čo najväčšieho počtu aberácií v genóme pacienta s MDS.

- Schanz J, Tuechler H, Solé F, et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. J Clin Oncol 2012; 30(8): 820-829.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. Nucleic Acids Res 2002; 30(12): e57.
- Donahue AC, Abdool AK, Gaur R, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification for detection of chromosomal abnormalities in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. Leuk Res 2011; 35(11): 1477-83.
- Sidney LE, Branch MJ, Dunphy SE, et al. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. Stem Cells 2014; 32(6): 1380-89.
- Marisavljevic D, Kraguljac-Kurtovic N. Biological implications of circulating CD34(+) cells in myelodysplastic syndromes. J BUON 2010; 15(4): 753-757.
- Liang X, Xu K, Xu J, et al. Preparation of immunomagnetic nanoparticles and their application in the separation of mouse CD34+ hematopoietic stem cells. Journal of Magnetism and Magnetic Materials 2009; 321(12): 1885-88.
- Demirel GS, Okur AC, Kizilel S. Synthesis and design of biologically inspired biocompatible iron oxide nanoparticles for biomedical applications. J Mater Chem B 2015; 3: 7831-7849.
- <https://www.mds-foundation.org/wp-content/uploads/2011/12/2-Revised-InternationalPrognosticScoringSystem.pdf>
- https://www.biomnis.com/wpcontent/uploads/2016/04/56-INTGB-Focus_Karyotyping_SNP_array.pdf
- http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormDBData.aspx?Tag=_G1U3P-YAOzf2SFuaxkq4YjrUAlwx3T3q8uAJJ_V-Vs



RNDr. Andrea Blahová

Lekárska genetika, Medirex, a. s.
Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava
e-mail: andrea.blahova@medirex.sk



human



onco



prenatal



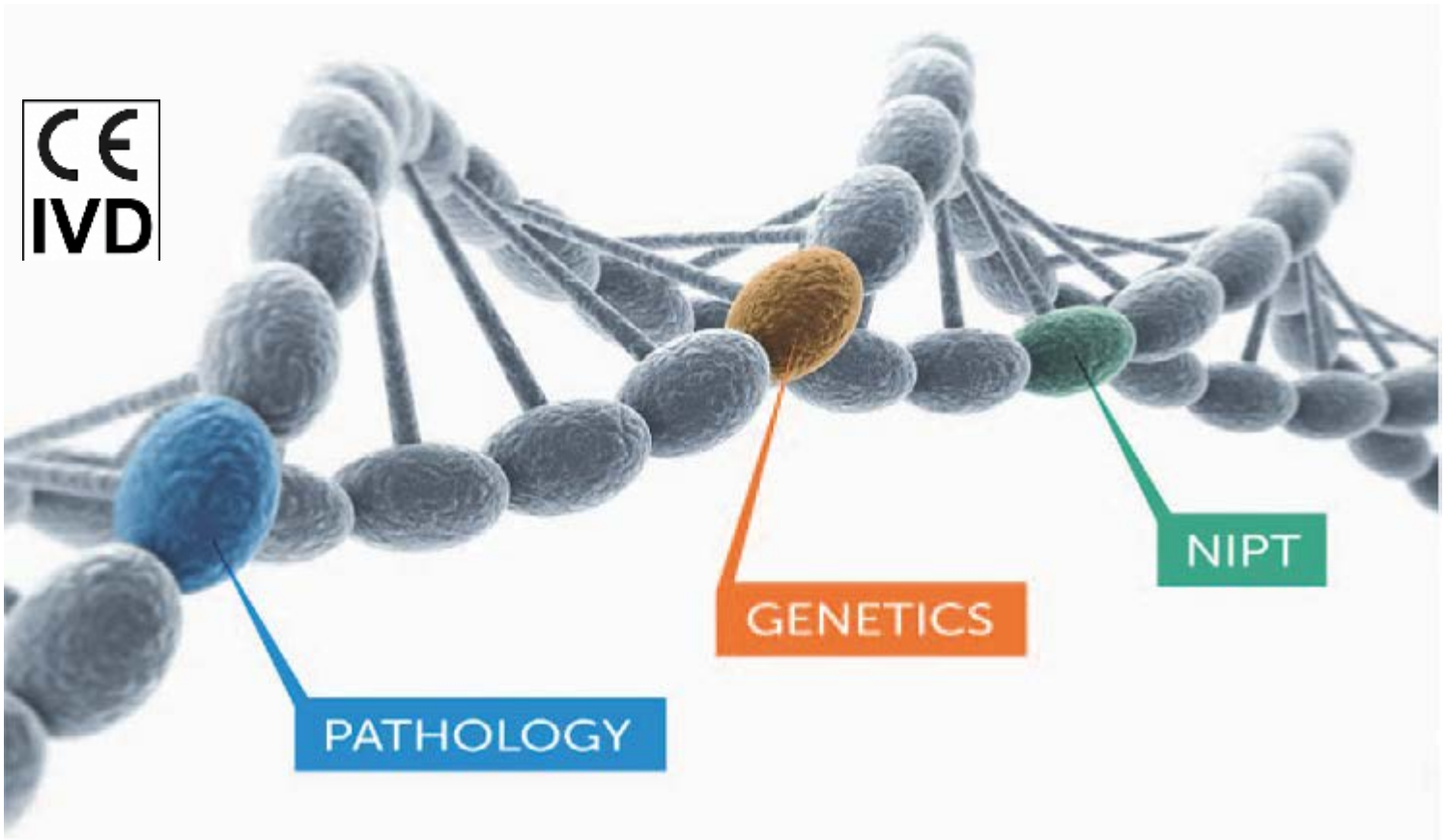
Multiplicom

A part of **Agilent Technologies**



Enabling personalized medicine

CE
IVD



PATHOLOGY

GENETICS

NIPT

MASTR

NGS

REPORTER

HERMES
Lab Systems

Agilent
Dako



Agilent

Authorized
Distributor

Molekulovogenetická diagnostika ľudského papilomavírusu (HPV) a monitorovanie pacientok s HPV

Alexandra Oravcová, Andrea Kucková, Renata Lukačková

Lekárska genetika, Medirex, a. s., Bratislava

Ľudské papilomavírusy (HPV) sa považujú za závažný etiologický faktor, zodpovedný za viac ako 99,7 % všetkých cervikálnych karcinómov, pričom 14 typov HPV je považovaných za onkogénne. Práve perzistentná infekcia vysokorizikovými HPV typmi vedie k zmene epitelových buniek, k vývoju prekancerózných lézií, prípadne až k vzniku cervikálneho karcinómu. Za obdobie od 1. januára do 31. decembra 2017 sme mali k dispozícii 3 463 pacientok, ktoré podstúpili cervikálne cytologické vyšetrenie a následne molekulovogenetickú diagnostiku HPV na báze DNA, testom cobas® 4 800 HPV (Roche Molecular Diagnostics, CA, USA), a na báze mRNA, testom Aptima HPV Assay (Hologic, CA, USA). Cieľom našej štatistickej analýzy bolo vyhodnotenie expresie hrHPV pri oboch molekulových metódach, a zároveň sledovať koreláciu s jednotlivými cytologickými nálezmi. V budúcnosti by práve skorá detekcia HPV v bunkách krčka maternice zaručila lepšiu prognózu a následne aj efektívnejšiu liečbu prekanceróz u pacientky.

Kľúčové slová: HPV, CIN, cobas® 4800 HPV, Aptima HPV Assay, skrining rakoviny krčka maternice

Molecular – genetic diagnostics of Human Papillomavirus (HPV) and monitoring of HPV patients

Human papillomaviruses (HPV) are considered to be a significant etiological factor responsible for over 99.7 % of all cervical carcinomas, while 14 of HPV types being considered as oncogenic. Persistent infection by high-risk HPV types leads to epithelial cell changes, to the development of precancerous lesions, eventually to cervical carcinoma. For the period from January 1 to December 31, 2017, we analysed 3463 patients who underwent of cervical cytology examination and then DNA-based HPV molecular diagnostics were screened by cobas® 4800 HPV (Roche Molecular Diagnostics, CA, USA) and based mRNA, were screened by Aptima HPV assay (Hologic, CA, USA). Our statistical analysis aimed to evaluate the expression of hrHPV in both molecular methods and their correlation with individual cytological findings. In the future, early detection of HPV in cervical cells would ensure better prognosis and, consequently, more effective treatment of precancerous conditions in a patient.

Keywords: HPV, CIN, cobas® 4800 HPV, Aptima HPV Assay, cervical screening

NewsLab, 2018; roč. 9 (2): 72 – 79

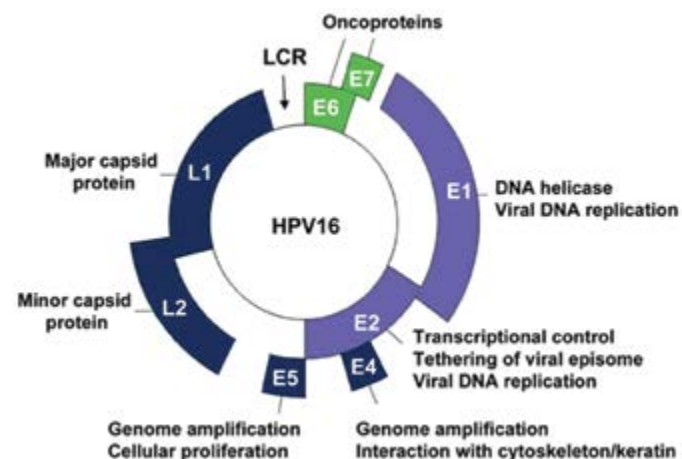
Úvod

V súčasnosti sa ľudský papilomavírus (HPV – Human Papillomavirus) považuje za základný etiologický faktor spôsobujúci rakovinu krčka maternice, pretože bez infekcie HPV nie je možný vývoj prekancerózných stavov s následným progresom do cervikálneho karcinómu. Ľudské papilomavírusy sa zaraďujú do čeľade *Papillomaviridae*, pričom ide o malé neobalené dvojlátkové DNA vírusy s genómom veľkosti približne 8 000 bp. Patria medzi epiteliotropné vírusy zodpovedné za cytopatický efekt kožného a slizničného epitelu. Genóm vírusu (**obrázok 1**) obsahuje 8 – 10 génov a skladá sa z troch funkčných oblastí – nekódujúca regulačná oblasť (LCR – long control region), oblasť so skoro prepisujúcimi sa génmi (Early genes) E1, E2, E3, E4, E5, E6 a E7 a oblasť s neskor prepisujúcimi sa génmi (Late genes) – L1 a L2, ktoré kódujú majoritný a minoritný vírusový kapsidový proteín a tvoria až 85 – 90 % celkovej hmotnosti vírusu. Regulačná oblasť obsahuje väzbové miesta pre vírusové proteíny E1 a E2, promotory (P1, P2, P3 a P4) a väzbové miesta pre transkripčné faktory. Oblasť so skoro prepisujúcimi sa génmi obsahuje gény pre regulačné proteíny E1 – E8. Proteíny E1 a E2 sú zodpovedné za replikáciu a transkripciu vírusu, E4 je neskorý proteín, ktorý uvoľňuje nové vírusové častice

z hostiteľskej bunky. Multifunkčný proteín E5 spolu s onkogénnymi proteínmi E6 a E7 ovplyvňuje mechanizmus regulácie bunkového cyklu^(1,2).

Celkovo existuje viac ako 200 rôznych druhov HPV schopných infikovať ľudský organizmus⁽³⁾, z toho 30 – 40 druhov je sexuálne prenosných, schopných infekcie predovšetkým

Obrázok 1. Genóm HPV 16⁽⁵⁾



viacvrstvého dlaždicového epitelu krčka maternice, kde sa následne podieľajú na vzniku nádorových procesov v anogenitálnej oblasti. Na základe typu hyperplastickej lézie epitelu možno HPV rozdeliť do dvoch skupín – HPV infikujúce kožu a HPV infikujúce sliznicu. Na základe stupňa korelácie medzi infekciou HPV a vývojom rakoviny krčka maternice sú jednotlivé typy papilomavírusov rozdelené do dvoch kategórií – 1. lrHPV (nízkorizikové typy HPV) a 2. hrHPV (vysokorizikové typy HPV). LrHPV sú zodpovedné za vznik benígnych nádorov vo forme genitálnych bradavicovitých výrastkov, papilómov a kondylómov. Najčastejšie vyskytujúce sa LrHPV typu 6 a 11 sú prítomné vo viac ako 70 % *condylomata accuminata*, pričom ostatných 30 % kondylómov spôsobujú zvyšné LrHPV. HrHPV dávajú podklad vzniku cervikálnych dysplázií, prípadne až invazívneho karcinómu krčka maternice⁽¹⁾. Taktiež sú spájané s orálnymi alebo inými anogenitálnymi malignitami. Zo všetkých 14 hrHPV typov (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68) je známe, že typy HPV 16 a HPV 18 predstavujú približne 70 % prípadov rakoviny krčka maternice⁽⁴⁾. Bolo zistené, že hrHPV zohrávajú dôležitú úlohu nielen pri vzniku cervikálneho karcinómu, ale aj v etiológii iných malignít, karcinómu penisu, konečníka, kože, prípadne niektorých malignít horných dýchacích ciest.

Korelácia medzi HPV infekciou a rakovinou krčka maternice

Je preukázané, že ľudský papilomavírus zodpovedá za viac ako 99,7 % všetkých prípadov cervikálneho karcinómu⁽⁶⁾. Samotná infekcia cervikálnych epitelových buniek vysokorizikovými typmi HPV má odlišné formy. Môže ísť o prechodnú infekciu, ktorá je asymptomatická a nepreukazuje žiadnu prítomnosť patologických zmien v epitelových bunkách krčka maternice, respektíve preukazuje len prítomnosť benígnych bradavíc až po vysokoinvazívny cervikálny karcinóm, ktorý je výsledkom práve perzistentnej či transformujúcej sa infekcie. Práve perzistentná infekcia je základnou príčinou cervikálneho karcinómu a jeho prekursorov – cervikálnych intraepitelových neoplázií (CIN), ktoré predstavujú zmenu v bazálnych epitelových bunkách s následným vývojom prekancerózných lézií a v konečnom dôsledku aj so vznikom cervikálneho karcinómu⁽¹⁾.

Hoci perzistentná infekcia hrHPV sa považuje za hlavnú príčinu cervikálneho karcinómu a jeho prekursorových lézií, veľmi nízke percento infekcií hrHPV sa vyvinie až do štádia cervikálneho karcinómu. Sexuálne prenosná infekcia ľudským papilomavírusom nie je v žiadnom prípade ojedinelou záležitosťou, avšak vo viac ako v 90 % prípadov infikovaných žien vznikne imunitná odpoveď, ktorá následne potlačí infekciu v priebehu 6 až 24 mesiacov bez akýchkoľvek dlhodobých zdravotných následkov⁽⁷⁾. Infekcia ktorýmkoľvek typom HPV môže vyvolať vznik cervikálnych intraepitelových neoplázií, ktoré však po potlačení infekcie imunitným systémom zvyčajne zaniknú. Vzhľadom na to, že vírus je v populácii prenosný jednoduchým spôsobom, infekcia HPV je pomerne častá záležitosť, pričom sa odhaduje, že až 80 % sexuálne aktívnej populácie je infikovaných ešte pred dosiahnutím 50. roku života⁽⁶⁾. Čo sa týka prevalencie HPV, tá je najvyššia u mladých žien do 25 rokov⁽⁸⁾, avšak najvyšší výskyt rakoviny krčka maternice je u žien okolo 40. roku života.

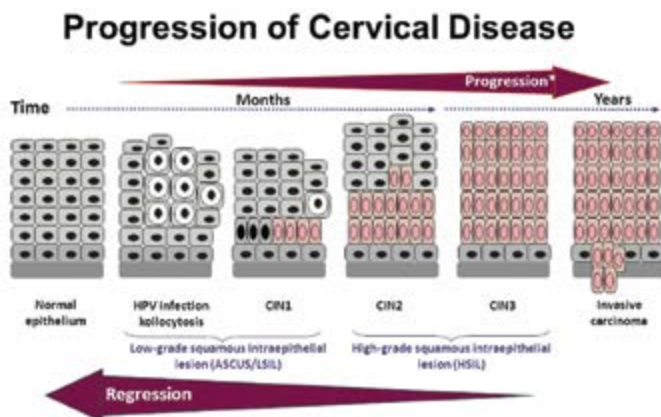
Rakovina krčka maternice sa zaraďuje medzi druhé najčastejšie onkologické ochorenie u žien v celosvetovom rebríčku a tretie v Európe, pričom je jedným z ochorení, ktoré postihuje vo všeobecnosti najmä ženy v produktívnom veku⁽⁹⁾. Je považované za ochorenie, ktoré je ako jedno z mála onkologických ochorení ľahko diagnostikovateľné a rovnako aj efektívne liečiteľné. Takmer 90 % všetkých úmrtí na rakovinu krčka maternice prislúcha práve rozvojovým krajinám, čo odráža rozdiely v dostupnosti cervikálneho skríningu a prevalencie infekcie HPV. Hlavným rizikovým faktorom vzniku cervikálneho karcinómu je vysoká promiskuita, s ktorou súvisí sexuálne prenosná infekcia HPV. Medzi ďalšie rizikové faktory patrí aj tehotenstvo v nízkom veku, fajčenie, trvalé užívanie antikoncepcie, socioekonomický status a imunitná odpoveď⁽¹⁰⁾.

Cervikálna intraepitelová neoplázia a karcinogenéza

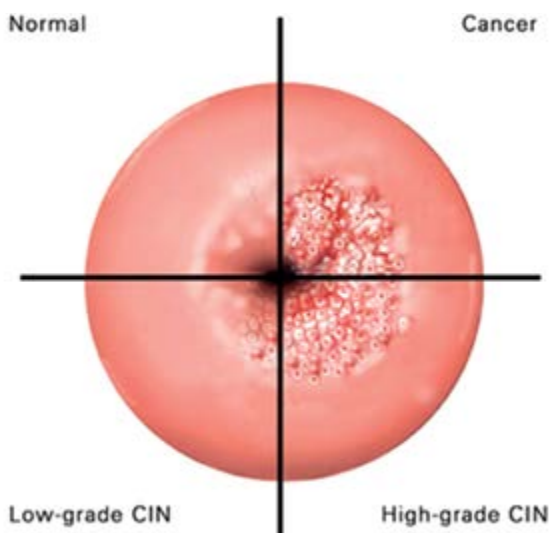
Karcinogenéza cervikálneho karcinómu je niekoľkostupňový proces, v prvom rade sprevádzaný infekciou HPV, perzistenciou vírusu vo forme epizómu a jeho následnou linearizáciou a integráciou do hostiteľského genómu. Len čo je genóm HPV v priebehu karcinogenézy integrovaný do chromozómu hostiteľskej bunky, výsledkom je okamžitá expresia onkogénnych proteínov E6 a E7. Nadmerná expresia onkogénneho proteínu E6 zrýchľuje degradáciu nádorového supresorového proteínu p53 a väzba onkogénneho proteínu E7 inaktivuje tumorsupresorový proteín pRB. Schopnosť proteínov E6 a E7 viazať a deregulovať bunkové regulátory proteínových komplexov vedie počas proliferácie k aktivácii malígnej transformácie indukovanej HPV⁽¹¹⁾. Strata funkcie nádorových supresorov prispieva k procesu malígnej transformácie, pretože vo vysokej miere ovplyvňujú proliferáciu buniek a následnú diferenciáciu a apoptózu. Z tohto dôvodu onkogénne proteíny E6 a E7 prispievajú k progresii karcinómu krčka maternice, avšak ich transkripčná schopnosť bola preukázaná výlučne pri hrHPV, pri ostatných typoch HPV ich onkogénna aktivita preukázaná nebola⁽¹¹⁾. Malígna transformácia je proces sprevádzaný vývojom cez cervikálne intraepitelové neoplázie (CIN) charakterizované abnormálnou bunkovou proliferáciou.

Prekancerózne zmeny krčka maternice sú sledované prostredníctvom cervikálneho cytologického vyšetrenia zo steru buniek z krčka maternice. Najčastejším miestom vzniku spomínaných prekancerózných lézií, respektíve nádorových stavov, je miesto medzi dlaždicovým a cylindrickým epitelom v mieste transformačnej zóny, kde vírus infikuje bunky bazálnej vrstvy epitelu cez mikroskopické poranenia alebo priamym kontaktom⁽¹²⁾. Takéto zmeny sú na základe histológie klasifikované ako cervikálne intraepitelové neoplázie (CIN), ktoré sa rozdeľujú do troch štádií: CIN I (dysplázia mierneho stupňa), CIN II (dysplázia stredného stupňa) a CIN III (ťažká dysplázia zahrňujúca aj karcinóm *in situ*) (**obrázok 2**). Pri histologickom náleze CIN I sú viditeľné zmeny v dolnej tretine epitelu s porušením diferenciácie buniek. Pri CIN II sa nachádzajú abnormálne bunky v dolných dvoch tretinách epitelu, pričom zmeny v epitelových bunkách sú rovnaké ako pri histologickom štádiu CIN I. V prípade ťažkej dysplázie označovanej ako CIS (*carcinoma in situ*) alebo CIN III/CIS ide o poruchu diferenciácie buniek v celej vrstve epitelu⁽¹¹⁾ (**obrázok 3**).

Obrázok 2. Progresia cervikálnych lézií po infekcii HPV⁽¹³⁾



Obrázok 3. Porovnanie jednotlivých nálezov na krčku maternice⁽²⁰⁾



Cytologický cervikálny skrining

Rakovina krčka maternice sa vo všeobecnosti považuje za ochorenie skriningom dobre sledovateľné, pretože prekancerózy sa vyvíjajú v pomerne dlhom časovom horizonte a sú ľahko liečiteľné. V súčasnosti sú k dispozícii prebiopické metódy ako cytologický skrining, respektíve sledovanie prítomnosti infekcie HPV, ktoré slúžia na diagnostiku prekanceróz. Ide o pomerne lacné, pacientku nezaťažujúce a zároveň dostatočne efektívne metódy. Jednou z nich je práve cytologický cervikálny skrining, ktorý slúži na vyšetrenie populácie žien s cieľom detekcie bunkových abnormalít skôr, ako môžu progredovať až na úroveň prekanceróz alebo ranných štádií cervikálneho karcinómu. Spolu s kolposkopiou a diagnostikou prítomnosti hrHPV patria medzi diagnostické metódy podieľajúce sa na odhalení dysplastických zmien na krčku maternice. Štandardné cytologické vyšetrenie náteru epitelových buniek krčka maternice (PAP test) je už mnoho rokov štandardnou skriningovou metódou znižujúcou výskyt rakoviny krčka maternice o 60 – 90 % a úmrtnosť až o 90 %. Obmedzením tohto testu je však pomerne nízka senzitivita, ktorá sa približuje k 50 %, a to najmä v interpretácii atypických skvamóznych buniek neznámeho pôvodu

(ASC-US) a skvamózne intraepitelových lézií nízkeho stupňa (L-SIL)⁽¹⁸⁾, ako aj výrazný podiel nehodnotiteľných vzoriek. Z tohto dôvodu bol ako súčasť cervikálneho skriningu, ktorý interpretuje jednotlivé nálezy podľa Bethesda systému⁽¹⁴⁾, zaradený test na detekciu prítomnosti vysokorizikových typov ľudských papilomavírusov. Základom cervikálnej cytológie je ster špeciálnou odberovou kefkou, ktorý obsahuje epitelové bunky z povrchu endocervixu, exocervixu, epitelové bunky transformačnej zóny. Dnes máme k dispozícii dva odlišné spôsoby cytologického vyšetrenia. Klasická (konvenčná) cytológia zahŕňa odber buniek z transformačnej zóny krčka maternice sterom pomocou odberových špachtlí a štetčiek, následným natretím buniek na cytologické podložné sklíčko, kde nasleduje okamžitá fixácia buniek na báze alkoholických roztokov (metylalkohol, izopropylalkohol) a v laboratóriu polychromatické farbenie podľa Papanicolaouovej metódy. Ako súčasť cytologického vyšetrenia sa dnes dostáva do popredia inovatívny typ cytologického vyšetrenia – Liquid Based Cytology (LBC) alebo cytológia na tekutom základe. Tento druh odberového systému posunul cytologické vyšetrenie na vyššiu úroveň, pretože výhodou tejto metódy je čistejší cytologický materiál v porovnaní s klasickou (konvenčnou) cytológiou, rovnako to, že 2- až 4-násobne zvyšuje záchyt premalígných lézií. Výhodou je takisto fakt, že z materiálu tej istej vzorky možno vyšetriť HPV, aj HSV, *Chlamydia trachomatis* alebo *Neiserie gonorrhoeae*.

V podmienkach Slovenskej republiky (SR) má každá pacientka vo veku 23 – 64 rokov v rámci preventívnej gynekologickej prehliadky nárok na cervikálny cytologický skrining, pričom periodicita je nasledovná: prvé dva odbory cervikálnej cytológie sú v ročnom intervale. V prípade negativity týchto dvoch cytologických nálezov sa pokračuje v trojročnom intervale do veku 64 rokov. Skrining sa vo veku 64 rokov ukončí, ak budú posledné tri cytologické nálezy negatívne. V prípade pozitívneho nálezu je interval kontrolnej cytológie 3 až 6 mesiacov, respektíve je odporučené kolposkopické vyšetrenie, histologické vyšetrenie a testovanie prítomnosti vysokorizikových typov ľudských papilomavírusov⁽¹⁵⁾.

Laboratórna diagnostika ľudského papilomavírusu (HPV)

Diagnostika prítomnosti infekcie HPV prostredníctvom molekulo-genetickej laboratórnej diagnostiky môže byť realizovaná testovaním na báze DNA alebo mRNA. V oboch prípadoch HPV testovania je sledovaná prítomnosť 14 vysokorizikových typov HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68). HPV je na Slovensku diagnostikované ženám nad 30 rokov s cytologickým nálezom ASC-US, po konizačných a ablačných výkonoch na krčku maternice, ktoré boli vykonané z dôvodu liečby dysplázie alebo mikroinvazívneho karcinómu cervix, respektíve v iných prípadoch podľa indikácie lekára so špecializáciou onkológia v gynekológii.

cobas® 4800 HPV

Prítomnosť HPV infekcie na úrovni DNA je testovaná prostredníctvom molekulo-genetickej laboratórnej diagnostiky technológiou cobas® 4800 HPV (Roche Molecular Diagnostics, CA, USA), ktorý deteguje amplikóny HPV DNA dlhé 200 bp majoritného kapsidového proteínu L1 u 14 hrHPV typov (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68) zo steru

epitelových buniek krčka maternice⁽¹⁶⁾. Identifikovaná prítomnosť oblasti vírusovej DNA potvrdzuje prítomnosť HPV, čo však neznamená jednoznačne aktivitu vírusu a v mnohých prípadoch môže byť samovoľne potlačený imunitným systémom hostiteľa bez akýchkoľvek sprievodných príznakov, čo na druhej strane často vedie k falošne pozitívnym výsledkom metódy. Ide o automatizovaný kvalitatívny test na použitie *in vitro* detekcie hrHPV. Založený je na súbežnej extrakcii HPV a celulárnej DNA, amplifikácii PCR sekvencií cieľovej DNA so súčasným použitím HPV a β -globínových špecifických komplementárnych prímernov a na detekcii flouorescenčne značených HPV a β -globínových špecifických oligonukleotidových detekčných sond prostredníctvom Real-Time PCR technológiou LightCycler® 480⁽¹⁶⁾. Následne sa extrakciu, amplifikáciu a detekciu β -globínu testovací proces ukončí. Vo výsledku sú typy HPV 16 a 18 detegované samostatne ako pozitívne alebo negatívne a ostatných 12 hrHPV typov je detegovaných spoločne.

Test je indikovaný ako súčasť skríningu pacientov s cytologickým nálezom ASC-US na určenie potreby kolposkopie, respektíve na identifikáciu prítomnosti genotypov HPV 16 a HPV 18, pretože ich detekcia je odporúčaná na sledovanie žien, ktoré sú pozitívne na hrHPV a zároveň s cytologicky negatívnymi výsledkami, žien vo veku nad 30 rokov spolu s PAP testom ako súčasť cervikálneho skríningu, ako aj na určenie prítomnosti hrHPV a na identifikáciu prítomnosti typov HPV 16 a HPV 18⁽¹⁶⁾.

Aptima HPV Assay

Aptima HPV Assay je amplifikačný test cieľovej sondy nukleovej kyseliny na *in vitro* kvalitatívnu detekciu E6 a E7 vírusovej mRNA zo 14 hrHPV typov (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68)⁽¹⁷⁾. Test nerozlišuje medzi 14 hrHPV, nezisťuje prítomnosť HPV DNA, ale deteguje integráciu vírusového genómu a genetické zmeny v epitelových bunkách krčka maternice. Inak povedané, deteguje prítomnosť hrHPV, ktorých DNA sa už v hostiteľských bunkách exprimuje a v plnej miere sa môže prejaviť karcinogénny efekt vírusu. V tomto prípade ide o detekciu perzistentnej infekcie hrHPV, pri ktorej je takmer istý progres nádorového procesu v epitelových bunkách krčka maternice. Keďže expresia onkogénnych proteínov E6 a E7 pri hrHPV typoch mení funkcie bunkových proteínov p53 a pRB, je dôležité sledovať ich expresiu, pretože vedie k narušeniu kontrolných bodov bunkového cyklu v zmysle malígnej transformácie. Aj z tohto dôvodu sú mRNA testy vhodnejšie pri predikcii CIN2.

Mechanizmus Aptima HPV Assay zahŕňa tri hlavné kroky, ktoré sa vykonávajú v jednej skúmavke: zachytenie cieľa a jeho amplifikácia pomocou transkripčne sprostredkovanej amplifikácie (Transcription – Mediated Amplification – TMA), následná detekcia amplikónov pomocou testu hybridizačnej ochrany (Hybridization Protection Assay – HPA)⁽¹⁷⁾. Detekcia amplikónov je realizovaná próbou jednoreťazovej nukleovej kyseliny chemiluminiscenčne a značené próby špecificky hybridizujú a amplikónom. Značené sondy nukleovej kyseliny hybridizujú špecificky s amplikónom. Selektívna reagencia následne rozlišuje hybridizovanú sondu od nehybridizovanej deaktiváciou značenia nehybridizovanej sondy. Počas detekčného kroku je svetlo vyžarované z označených

hybridov RNA : DNA, merané ako fotónové signály v luminoimetrii, a intenzita je hlásená ako relatívne svetelné jednotky (RLU). Výsledok je interpretovaný ako pozitívny, negatívny alebo invalidný.

Použitie testu je indikované pri nejasných cytologických nálezoch ASC-US, ASC-H alebo u žien starších ako 30 rokov aj pri opakovanom náleze L-SIL. Taktiež po liečbe prekanцерóz, na posúdenie konečného výsledku liečby, respektíve na posúdenie, či je u pacientok vhodné pokračovať v ďalšej diagnostike kolposkopiou alebo biopsiou.

Materiál a metódy

Výber a charakteristika súboru

Do súboru bolo zaradených spolu 3 463 pacientok, ktoré boli vyšetované v časovom období od 1. januára 2017 do 31. decembra 2017. Z celkového ročného súboru pacientok, ktoré v našom laboratóriu diagnostikovali na prítomnosť hrHPV metódou na báze DNA alebo mRNA, boli do súboru zaradené len tie, ktoré podstúpili diagnostiku HPV raz za rok bez ohľadu na opakovaný odber. Štatistická analýza taktiež zahŕňala iba pacientky testované na prítomnosť hrHPV, ktorých bunkové stery z endocervixu a exocervixu boli odobraté do odberovej súpravy ThinPrep Pap Test (Preserv Cyt® Solution), pričom pri vyšetrení prítomnosti HPV bolo takmer každá pacientka podstúpila cervikálne cytologické vyšetrenie a cytologické výsledky boli interpretované podľa Bethesda klasifikačného systému.

Testovanie na báze DNA bolo realizované na 2 126 vzorkách a testovanie na báze mRNA bolo uskutočnené na 1 337 vzorkách. Molekulovogenetickú analýzu zameranú na detekciu prítomnosti L1 génu metódou na úrovni DNA sme vykonali u každej z nich, pričom cytologické vyšetrenie bolo uskutočnené celkovo u 2 113 pacientok. V 6 prípadoch nebolo cytologické vyšetrenie realizované a v 7 prípadoch bola adekvátnosť vzorky nedostačujúca na uskutočnenie analýzy z dôvodov prítomnosti krvi, zápalových elementov, hlienov, pomliaždených buniek, prípadne nesprávnym odberom.

Molekulovogenetickú analýzu zameranú na detekciu prítomnosti perzistentnej HPV infekcie metódou na úrovni mRNA sme vykonali u každej z nich, pričom cytologické vyšetrenie bolo uskutočnené u 1 327 pacientok. V 7 prípadoch bolo cytologické vyšetrenie nere realizované vôbec a v 7 prípadoch bola adekvátnosť vzorky nedostačujúca na uskutočnenie analýzy.

Odber biologického materiálu

Biologický materiál na molekulovogenetickú diagnostiku prítomnosti hrHPV možno odobrať do odberovej súpravy Thin Prep Pap Test (Preserv Cyt® Solution) alebo do odberovej súpravy Aptima® Cervical Specimen Collection Kit. Vzorky odobraté do odberových nádobiek Preserv Cyt® Solution sú stabilné a vhodné na HPV analýzu maximálne 30 dní po odbere. LBC sa uchováva pri laboratórnej teplote. Vzorky odobraté do prepravnej súpravy Aptima® sú stabilné a vhodné na HPV analýzu maximálne 30 dní po odbere, ak sú uchovávané pre teplotu 2 – 8 °C, a maximálne 14 dní po odbere, ak sú uchovávané pri laboratórnej teplote.

Metódy

Na oddelení lekárskej genetiky v Medirexe, a. s., máme dostupné dve testovacie platformy, platformu cobas® 4800 HPV od firmy Roche Molecular Diagnostics (CA, USA) a Aptima HPV Assay z firmy Hologic (CA, USA), pričom obe metódy sú schopné detegovať prítomnosť 14 hrHPV typov (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68). Prístroj cobas® 4800 deteguje amplicóny HPV DNA dlhé 200 bp majoritného kapsidového proteínu L1 metódou Real-Time PCR. Aptima HPV Assay test deteguje HPV E6 a E7 mRNA onkogénnych transkriptov. Pokým cobas® 4800 deteguje hrHPV na úrovni DNA, Aptima HPV Assay deteguje hrHPV onkogénnu mRNA expresiu a je navrhnutý na špecifickejšie vyhodnotenie pri identifikácii významných hrHPV infekcií, ktorá vedie k CIN 2 až CIN 3⁽¹⁸⁾.

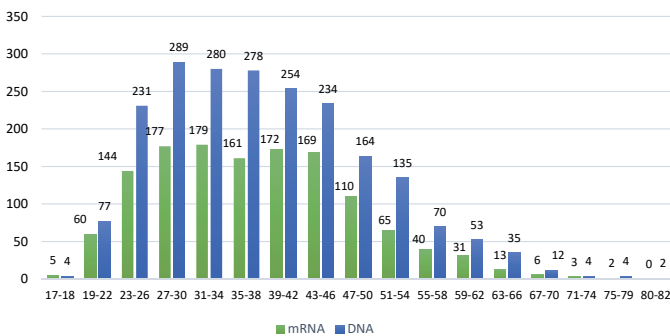
Výsledky a štatistické vyhodnotenie

Cieľom štatistického vyhodnotenia bolo monitorovanie jednotlivých nálezov HPV infekcie a korelácia s cytologickými nálezmi u pacientok analyzovaných molekulovogenetickou diagnostickou metódou cobas® 4800 HPV a Aptima HPV Assay.

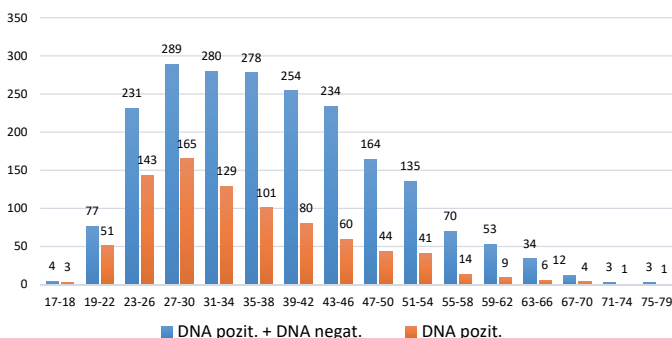
Diskusia

Predmetom našej štatistickej analýzy bolo vyhodnotenie prítomnosti HPV infekcie pacientok s prítomnou, respektíve neprítomnou vysokorizikovou infekciou HPV. Infekcia hrHPV typmi je zodpovedná za vznik cervikálneho karcinómu, ktorého incidencia a mortalita je napriek mnohým preventívnym a skrínovým vyšetreniam stále vysoká.

Graf 1. Počet a vekové rozloženie pacientok testované DNA a mRNA HPV testom



Graf 2. Pomer zastúpenia pacientok v rámci vekových skupín vzhľadom na DNA pozitívne pacientky v porovnaní so všetkými pacientkami testovanými na prítomnosť HPV DNA



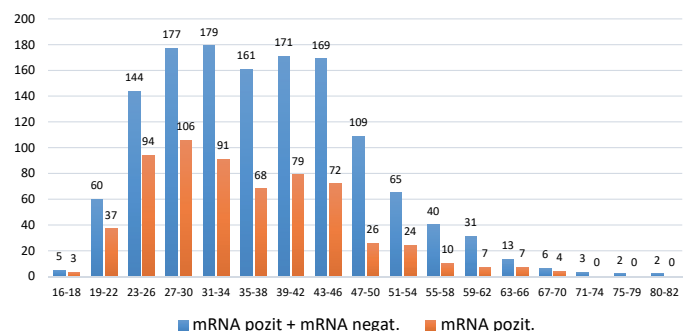
HPV testovanie

V predloženej súbore sme analyzovali spolu 3 463 pacientok, pričom so známym výsledkom z cytologického vyšetrenia sme analyzovali celkovo 3 440 pacientok. Molekulovogenetickú analýzu cobas® 4800 HPV sme použili na identifikáciu prítomnosti hrHPV, a to v kategórii HPV 16, HPV 18 a ostatných hrHPV typov, prípadne infekcie viacerými hrHPV typmi súčasne. V druhom prípade sme vyšetřovali naše pacientky metódou Aptima HPV Assay, s cieľom zistenia prítomnosti perzistentnej formy vírusovej infekcie prostredníctvom detekcie expresie onkogénnych proteínov E6 a E7 mRNA HPV. V roku 2017 sme však nezaznamenali na našom oddelení žiadnu pacientku, ktorá by mala pozitívny nádorový nález – Ca (PAP V). Pre obe testovacie platformy boli celkové pomery hrHPV pozitívnych približne rovnaké a signifikantne podobné rovnako, ako udáva súbor podľa Ovestad et al., 2011⁽¹⁸⁾.

Prevalencia 14 hrHPV typov identifikovaných pomocou oboch detekčných metód viditeľne klesá s rastúcim vekom. Najväčšie zastúpenie mali pacientky vo veku 27 – 34 rokov, čo môžeme sledovať **na grafe 1**, ktorý porovnáva počet a vekové rozloženie pacientok testovaných DNA HPV testom a mRNA HPV testom. Na druhej strane môžeme sledovať, že najnižšia prevalencia HPV pacientok je 67 – 79 rokov. S porovnateľnými údajmi sme sa stretli aj pri pilotnej štúdií, kde autori poukazujú na to, že prevalencia HPV identifikovaná prístrojom cobas® 4800 HPV taktiež klesá s rastúcim vekom⁽²¹⁾. Pri identifikácii HPV bola prítomnosť hrHPV identifikovaná u 30,5 % žien vo veku 21 – 24 rokov, ale vo veku 40 – 44 rokov prevalencia klesla na 7,6 % a pri ženách nad 70 rokov klesla prevalencia HPV na 5 %. Podobné zníženie prevalencie HPV s rastúcim vekom zistili aj pri detekcii HPV 16 a HPV 18⁽¹⁹⁾.

Práve **graf 1** poukazuje na to, že v našom súbore sa nachádzali ženy od 17 do 79 rokov, pričom priemerný vek nami vyšetřených žien bol v čase odberu vzorky 38 rokov. Najširšie zastúpenie v analýze mali ženy vo veku 27 – 46 rokov. Na druhej strane **graf 2** zobrazuje zastúpenie jednotlivých vekových skupín a poukazuje na prítomnosť vírusovej infekcie potvrdenej testovaním prítomnosti DNA HPV vzhľadom na počet všetkých testovaných vzoriek. Prítomnosť vírusovej infekcie bola DNA HPV testom potvrdená pri 853 vzorkách, čo zodpovedalo 40 % všetkých vyšetřovaných vzoriek, **graf 3** poukazuje na prítomnosť aktívnej formy vírusovej infekcie detegovanej metódou na úrovni mRNA, ktorá bola potvrdená

Graf 3. Pomer zastúpenia pacientok v rámci vekových skupín vzhľadom na mRNA pozitívne pacientky v porovnaní so všetkými pacientkami testovanými na prítomnosť mRNA HPV

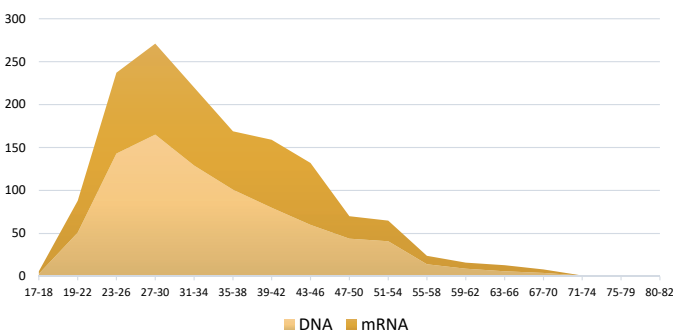


celkovo pri 628 vzorkách, čo predstavovalo 47 % všetkých vyšetovaných vzoriek. Najväčšie zastúpenie HPV pozitívnych pacientok bolo vo vekovej kategórii od 23 do 24 rokov, a to pri oboch testovacích platformách. Priemerný vek sa však mierne odlišoval, a to nasledovne: pri DNA HPV teste bol priemerný vek v čase odberu vzorky 33 rokov (minimálny vek: 17, maximálny vek: 79) a pri mRNA HPV teste bol priemerný vek v čase odberu vzorky 35 rokov (minimálny vek: 17, maximálny vek: 82) (**graf 4**).

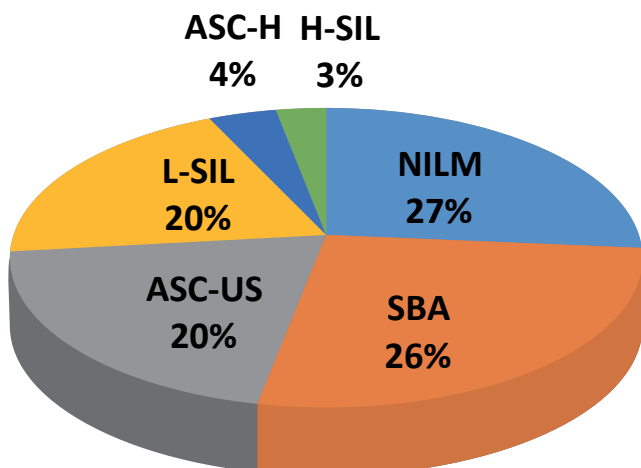
Cytológia vs HPV testovanie

Celkovo bolo v našom súbore zaznamenaných až 53 % vzoriek, ktoré mali výsledky z cervikálnej cytológie negatívne (**graf 5**). Z tohto počtu 27 % vzoriek malo negatívny cytologický nálež NILM a 26 % vzoriek bolo s cytologickým nálezom abnormálnych skvamózných buniek, čo sa však považuje za negatívne vzhľadom na neprítomné cervikálne intraepitelové neoplázie (CIN). V porovnaní so štúdiou, kde bolo analyzovaných 46 887 žien vo vekovom rozpätí 21 – 93 rokov, boli nálezy vo viac ako 90 % negatívne v zmysle intraepitelovej lézie a malignity⁽¹⁹⁾. Prevalencia cytologického nálezu ASC-US a L-SIL bola 20 %, pričom najnižšiu prevalenciu mali cytologické nálezy ASC-H a H-SIL, 4 % a 3 %. V porovnaní so štúdiou máme vyššie percento pacientok s nálezom H-SIL a ASC-H, čo je však spôsobené omnoho nižším počtom analyzovaných vzoriek.

Graf 4. Počet a vekové rozloženie výlučne pozitívnych pacientok testovaných na prítomnosť HPV (DNA) a testovaných na prítomnosť aktívnej formy vírusovej infekcie (mRNA)



Graf 5. Porovnanie jednotlivých cytologických náleзов bez ohľadu na výsledok molekulovogenetického vyšetrenia HPV

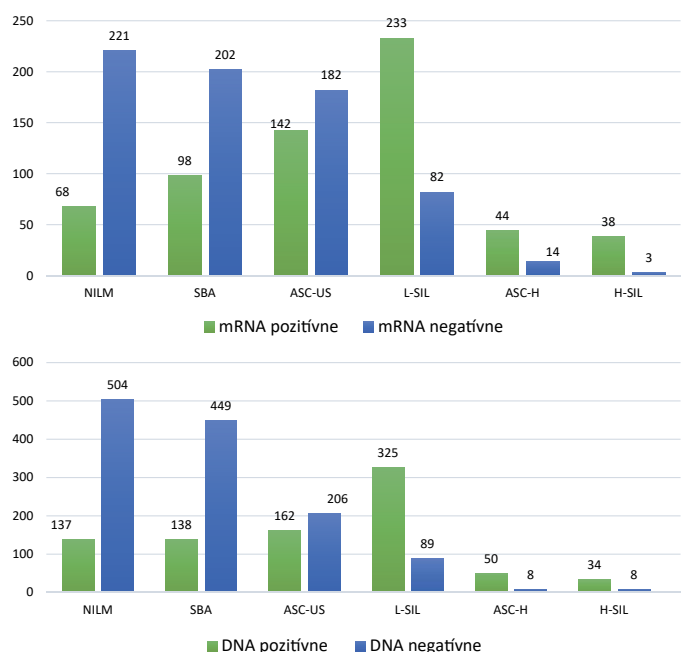


Podiel žien pozitívnych na prítomnosť vírusovej infekcie identifikovanej DNA HPV testom stúpa s nárastom stupňa cervikálnej cytológie. Ženám s cytologickým nálezom L-SIL, ASC-H a H-SIL je preukázaný vyšší počet pozitívnych prípadov oproti negatívnym prípadom (**graf 6**). Z celkového počtu 441 žien s nálezom L-SIL, bola HPV DNA pozitivita zaznamenaná v 80 % prípadov a mRNA HPV pozitivita v 74 % prípadov. Taktiež pri náleze ASC-H sme zaznamenali 86 % (DNA) a 76 % (mRNA) a náleze H-SIL – 81 % (DNA) a 93 % (mRNA). Takisto v porovnaní so štúdiou, kde ženy s nálezom CIN 1 predstavovali 65,5 % a s nálezom CIN 2 83,3 % a CIN 3 92,6 %.

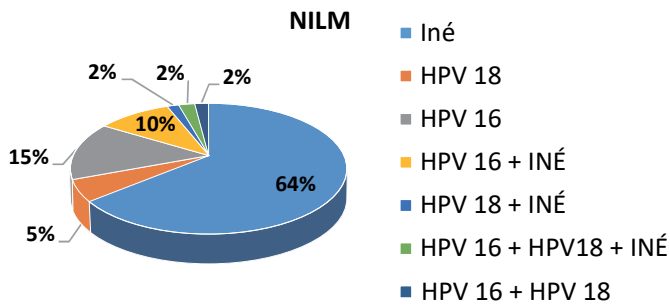
V analyzovanom súbore pacientok bola hrHPV DNA detegovaná v 846 prípadoch, čo predstavuje 40 % z celkového súboru. U žien s cytologickými nálezmi NILM, SBA, ASC-US prevažujú HPV negatívne výsledky. Najčastejšie bola detegovaná kategória tzv. iných HPV v 513 prípadoch, čo predstavuje 61 %. Ďalšia najčastejšie detegovaná bola infekcia typom HPV 16 a koinfekcia HPV 16 spolu s niektorým z iných hrHPV. Kombinácia HPV 16 a HPV 18 bola prítomná len u 0,7 % všetkých pacientok. Pomocou molekulárno-genetického testu cobas® 4800 HPV u pacientok s negatívnou cytológiou (NILM) nebola hrHPV DNA identifikovaná vo väčšine prípadov. V 90 prípadoch bola prítomná DNA ostatných hrHPV, v 2 prípadoch prislúchal výsledok kombinácii HPV 18 s ostatnými hrHPV a kombinácii HPV 16 a HPV 18 (**graf 7**).

U cytologicky negatívnych pacientok bola z celkového súboru 641 žien prítomná infekcia HPV u 137. HrHPV boli diagnostikované v 90 prípadoch, naproti tomu HPV 18 s ostatnými hrHPV a HPV 16 s HPV 18 len v 2 prípadoch. Cytologické výsledky SBA (**graf 8**) korelujú s cytologickými výsledkami NILM. No s týmto výsledkom sa v žiadnom z prípadov nevykytla kombinácia HPV 16, HPV 18 a iných hrHPV. HPV negatívne výsledky predstavujú 76 %.

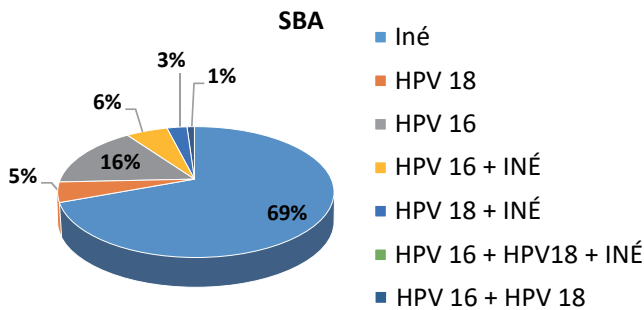
Graf 6. Zastúpenie pozitívnych a negatívnych HPV pacientok vzhľadom na jednotlivé cytologické nálezy



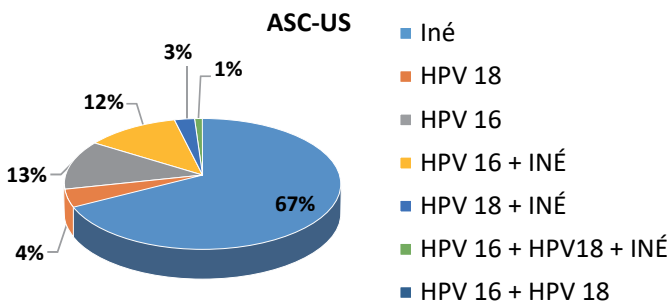
Graf 7. Rozloženie prítomnosti HPV 16, HPV 18 a iných hrHPV typov detegovaných DNA HPV testom pri cytologickom náleze NILM



Graf 8. Rozloženie prítomnosti HPV 16, HPV 18 a iných hrHPV typov detegovaných DNA HPV testom pri cytologickom náleze SBA



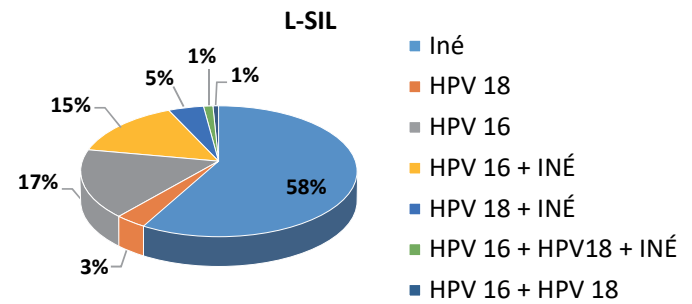
Graf 9. Rozloženie prítomnosti HPV 16, HPV 18 a iných hrHPV typov detegovaných DNA HPV testom pri cytologickom náleze ASC-US



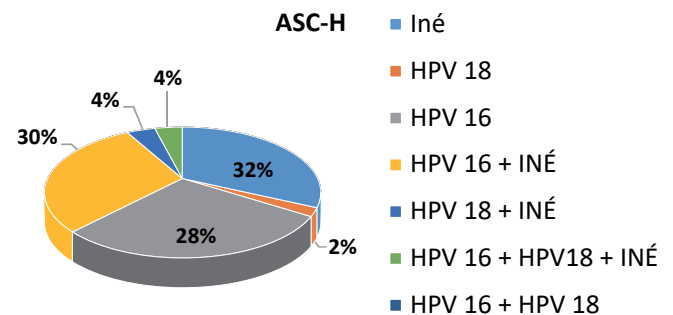
V 364 steroch cytologicky diagnostikovaných ako **ASC-US** bola identifikovaná vírusová DNA ostatných hrHPV v 109 prípadoch, v 20 prípadoch HPV 16 a HPV 16 s ostatnými hrHPV, v 7 prípadoch HPV 18, v 5 prípadoch kombinácia HPV 18 a ostatných hrHPV. Len v 1 prípade kombinácia všetkých hrHPV. Kombinácia HPV 16 s HPV 18 sa nevyskytla u žiadnej pacientky (**graf 9**). Najviac však boli HPV negatívne pacientky.

U 414 pacientok s diagnostikovaným **L-SIL** nebola hrHPV detegovaná v 89 prípadoch, v 190 bola preukázaná DNA ostatných hrHPV a len v jednom prípade kombinácia HPV 16 s HPV 18 (**graf 10**). U pacientok s cytologickým nálezom **ASC-H** sa približne v rovnakom zastúpení vyskytovali ostatné hrHPV, HPV 16 a HPV 16 v kombinácii s hrHPV. Ani

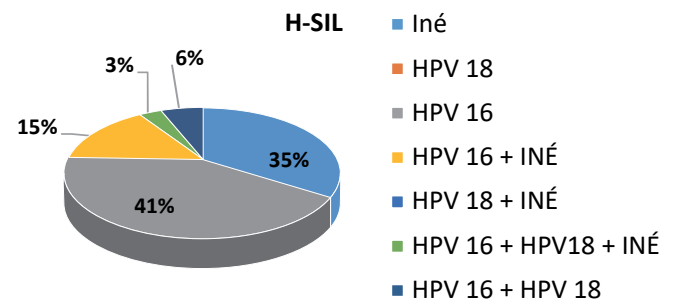
Graf 10. Rozloženie prítomnosti HPV 16, HPV 18 a iných hrHPV typov detegovaných DNA HPV testom pri cytologickom náleze L-SIL



Graf 11. Rozloženie prítomnosti HPV 16, HPV 18 a iných hrHPV typov detegovaných DNA HPV testom pri cytologickom náleze ASC-H



Graf 12. Rozloženie prítomnosti HPV 16, HPV 18 a iných hrHPV typov detegovaných DNA HPV testom pri cytologickom náleze H-SIL



u jednej z pacientok sa nedetegovala súčasná prítomnosť HPV 16 s HPV 18 (**graf 11**). Cytologický nález **H-SIL** bol najviac asociovaný s prítomnosťou HPV 16. V žiadnom výsledku nebola pozorovaná prítomnosť HPV 18 a HPV 18 v kombinácii s ostatnými hrHPV (**graf 12**).

Z našich výsledkov vyplýva, že test Aptima HPV Assay má významne vyššiu špecificitu v predikcii CIN 2 v porovnaní s testom cobas® 4800 HPV (2,6 % vs 1,6 %) ⁽¹⁸⁾. Rovnaká priaznivá špecificita zistená oboma testovacími platformami bola potvrdená aj u Ge et al., 2017. Neustále nové vznikajúce štúdie naznačujú, že mRNA HPV testy sú vo všeobecnosti špecifickejšie (97 %) ako DNA testy, najmä pri detekcii cervikálnych lézií vyšších stupňov ^(16,19).

Záver

Napriek tomu, že cytológia je zatiaľ neoddeliteľnou súčasťou skríningu rakoviny krčka maternice, má niekoľko limitov. Patrí tam pomerne nízka reprodukovateľnosť pri nálezoch ASC-US a L-SIL, nízka špecifickosť ASC-US pre kancerózne nálezy, nutnosť vyššej frekvencie skríninových kontrol, ktorá musí byť minimálne 2 – 3 roky a falošná negativita až do 30 %. V porovnaní s cytológiou má HPV test vyššiu a dlhšie trvajúcu prediktívnu hodnotu, znižuje incidencia karcinómu už počas 4-5 rokov, má o 20 – 45 % vyššiu senzitivitu pre detekciu CIN, ale nižšiu špecifitu (HPV pozitivita je asi 2x

častejšia)⁽²²⁾. Negatívny výsledok DNA HPV testu taktiež poskytuje istotu, že CIN 3 sa nevyvinie v priebehu 3 rokov, na rozdiel od negatívnej cytológie.

V blízkej budúcnosti však môžeme očakávať zmenu v skríninovom programe rakoviny krčka maternice. Cytologické vyšetrenie bolo za posledné roky pre mnohé ženy základným bodom prevencie, avšak z dôvodu nízkej senzitivity tohto vyšetrenia pri detekcii závažných prekanceróz bude nahradené senzitívnejším skríninovým molekulovogenetickým vyšetrením, ktoré deteguje prítomnosť hrHPV typov u pacientky.

LITERATÚRA

1. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical science* 2006; 110(5): 525-541.
2. Belleudi F, Nanni M, Raffa S, Torrisi MR. HPV16 E5 deregulates the autophagic process in human keratinocytes. *Oncotarget* 2015; 6(11): 9370.
3. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al., Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324(1): 17-27.
4. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *The lancet oncology* 2010; 11(11): 1048-1056.
5. <https://benthamopen.com/FULLTEXT/TOVJ-5-80/FIGURE/F1/>
6. Bzhalava D, Guan P, Franceschi S, et al. A systematic review of the prevalence of mucosal and cutaneous human papillomavirus types. *Virology* 2013; 445(1-2): 224-231.
7. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clinical microbiology reviews* 2003; 16(1): 1-7.
8. Workowski KA, Bolan GA. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. *MMWR. Recommendations and reports: Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports* 2015; 64(RR-03): 1.
9. Burchell AN, Winer RL, de Sanjosé S, Franco EL. Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine* 2006; 24: S52-61.
10. Ogbonna FS. Knowledge, attitude, and experience of cervical cancer and screening among Sub-saharan African female students in a UK University. *Annals of African medicine* 2017; 16(1): 18.
11. Gadducci A, Barsotti C, Cosio S, et al. Smoking habit, immune suppression, oral contraceptive use, and hormone replacement therapy use and cervical carcinogenesis: a review of the literature. *Gynecological Endocrinology* 2011; 27(8): 597-604.
12. Barbosa MS, Vass WC, Lowy DR, Schiller JT. In vitro biological activities of the E6 and E7 genes vary among human papillomaviruses of different oncogenic potential. *Journal of virology* 1991; 65(1): 292.
13. <https://slideplayer.com/slide/6096296/>
14. Chorny JA, Frye TC, Fisher BL, Remmers CL. Human papillomavirus detection with genotyping by the cobas and Aptima assays: Significant differences in HPV 16 detection?. *Diagn Cytopathol* 2018; 46(7): 568-571.
15. Redecha M, Korbel M. Rakovina maternicového krčka a možnosti jej prevencie. *Ambulantná terapia* 2007; 5(3-4): 176-180.
16. http://www.roche.sk/content/dam/roche_slovakia/sk_SK/documents/cobas_4800_HPV_test_sk.pdf
17. https://www.hologic.com/sites/default/files/package-insert/AW-14517-001_003_01.pdf
18. Ovestad IT, Vennestrøm U, Andersen L, et al. Comparison of different commercial methods for HPV detection in follow-up cytology after ASCUS/LSIL, prediction of CIN2–3 in follow up biopsies and spontaneous regression of CIN2–3. *Gynecologic oncology* 2011; 123(2): 278-283.
19. Wright Jr TC, Stoler MH, Behrens CM, et al. The ATHENA human papillomavirus study: design, methods, and baseline results. *American journal of obstetrics and gynecology* 2012; 206(1): 46-e1.
20. <https://www.kkh.com.sg/HealthPedia/Pages/GynaecologicalCancersCervical.aspx>
21. Schiffman M, Wentzensen N, Wacholder, et al. Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 2011; 103(5): 368-383.
22. Rebolj M, Bonde J, Preisler S, et al. Human papillomavirus assays and cytology in primary cervical screening of women aged 30 years and above. *PLoS One* 2016; 11(1): e0147326.
23. Arbyn M, Roelens J, Cuschieri K, et al. The APTIMA HPV assay versus the Hybrid Capture 2 test in triage of women with ASC-US or LSIL cervical cytology: a meta-analysis of the diagnostic accuracy. *International journal of cancer* 2013; 132(1): 101-108.

Mgr. Alexandra Oravcová

Lekárska genetika, Medirex, a. s.

Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava

e-mail: alexandra.oravcova@medirex.sk

Atellica® Solution

Flexibilné, škálovateľné, automatizované imunochemické a biochemické analyzátory.

Jednoduchosť
Kontrola
Lepšie výsledky

Zažite silu Atellica!

Nové diagnostické portfólio naurhnuté so zameraním na kontrolu, jednoduchosť a lepšie výsledky.



Atellica® COAG 360 System

Plne automatizovaný vysokoobjemový koagulačný systém spájajúci päť testovacích metódik.



Atellica® 1500 Automated Urinalysis System

Plne automatizované analyzátory kombinujúce analýzu močového sedimentu a chemickú analýzu moča.



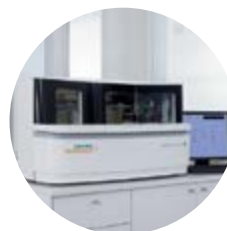
Atellica® MDX 160 Molecular System*

Flexibilný, automatizovaný molekulárny systém s maximálnou produktivitou pre viaceré typy vzoriek.



Atellica® PM 1.0 Software**

Softvér na riadenie procesou pre optimalizáciu laboratórných operácií prostredníctvom analýzy dát a vizualizácie.



Atellica® NEPH 630 System

Stredne-objemový, nefelometrický systém pre ďalšie zjednodušenie testovania špecifických proteínou.

healthcare.siemens.com

SIEMENS
Healthineers

*Vo vývoji. Nie je k dispozícii na predaj. Dostupnosť produktu sa líši podľa krajín.

**Prístroje vyžadujú grafický program Virtual Network Computing (VNC) alebo funkciu Pripojenia vzdialenej pracovnej plochy (Remote Desktop). Nie sú dostupné na všetkých systémoch.

Dostupnosť produktu sa líši podľa krajín. Atellica a všetky ostatné súvisiace značky sú ochranné známky spoločnosti Siemens Healthcare Diagnostics Inc. alebo jej pridružených spoločností. Všetky ostatné ochranné známky a značky sú majetkom ich príslušných vlastníkov.

Metanephrines in urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry

Magdalena Rajska, Petra Prochazková, Peter Loučka, Martin Radina

SPADIA LAB, a. s., Ostrava, Czech Republic

Neuroendocrine tumors represent a clinically and etiologically diverse group of disorders. These tumors exhibit excessive catecholamines production. Free metanephrines in plasma are prioritized for differential diagnosis of pheochromocytoma due to their highest diagnostic sensitivity and specificity but in routine practice physicians often require parallel determination of urinary metabolites, metanephrine (MN) and normetanephrine (NMN). The aim of this work was development and implementation of method for determination of metanephrines in urine by the liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) suitable for routine practice in diagnostic laboratory which overcomes inconveniences related with classical liquid chromatography approaches, while the main aspects are: simple sample preparation, short runtimes and required analytical parameters.

Keywords: urinary metanephrines, pheochromocytoma, LC-MS/MS

Stanovení metanefrinů v moči metodou kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí

Neuroendokrinní tumory představují heterogenní skupinu onemocnění s různou klinickou symptomatologií a etiopatogenezí. Tyto tumory vykazují nadměrnou produkci katecholaminů. Volné metanefriny v plazmě jsou preferovány pro diferenciální diagnostiku feochromocytomu vzhledem k jejich vysoké diagnostické senzitivitě a specifitě, nicméně v rutinní praxi lékaři často vyžadují paralelní stanovení metabolitů v moči, metanefrinu (MN) a normetanefrinu (NMN). Cílem této práce byl vývoj a implementace metody stanovení metanefrinů v moči pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií, která je vhodná pro rutinní použití v diagnostické laboratoři. Prezentovaná metoda eliminuje nevýhody klasických chromatografických technik, přičemž zásadními aspekty jsou: jednoduchá příprava vzorku, krátká doba analýzy a požadované analytické parametry.

Klíčová slova: metanefrin v moči, feochromocytom, LC-MS/MS

NewsLab, 2018; roč. 9 (2): 81 – 84

Introduction

Neuroendocrine tumors (NETs), such as pheochromocytoma or paraganglioma, which arise from chromaffin cells of the adrenal medulla or from sympathetic ganglia represent a diverse group of disorders with various clinical symptomatology and etiopathogenesis. Patients with NETs are mostly suffering from sustained or episodic hypertension, as a result of elevated catecholamine levels. Such hypertensive crises are life-threatening for the patient and may lead to stroke, heart attack or renal failure^(5,8). Early diagnosis based on biochemical proof of elevated levels of catecholamines and their metabolites is of significant importance. When diagnosis is precisely and early set there is a chance for successful treatment in 90% of cases⁽²⁾. And even though the first step in the diagnosis of NETs is based on measurement of metanephrines in plasma in routine practice physicians also often require parallel determination of urinary metabolites, metanephrine (MN) and normetanephrine (NMN)^(1,3).

Conventional methods for measurement of urinary metanephrines such as HPLC (liquid chromatography) with UV, fluorescent or electrochemical (ECD) detection or GC (gas chromatography) or immunoassays have a lot of restrictions and inconveniences, e. g. multi-step sample preparation and long runtime for HPLC, time-consuming step of derivatization for GC methods and cross-reactivity, nonspecific binding or interferences for immunoassays^(1,4). Presented LC-MS/MS method overcomes above mentioned inconveniences.

Materials and methods

Sampling

Prior to 24h urine collection, special dietary precautions had to be taken. Diet rich in tyrosine had to be discarded and, after consultation with the physician, some drugs had to be discontinued^(6,7). Urine was collected into the special 2,5 l polypropylene container containing 15 ml of hydrochloric acid to preserve samples for the measurements as described in pre-analytical manual⁽⁷⁾. The content of the container was mixed, using indicator strip pH value was checked and adjusted if needed to value pH = 1-2 and two acidified aliquots of urine were stored at -20 °C for measurement. Prior to analysis, the urine samples were tempered to the room temperature and centrifuged for 5 min at 4000 g to remove the sediment.

Materials

Lyophilised control materials ClinChek®Urine Controls for biogenic Amines (RECIPE Chemicals, Germany); Catecholamine Mix 2 solution, Metanephrine-d3 solution, Normetanephrine-d3 solution (Sigma-Aldrich, USA); Ph. Eur. grade hydrochloric acid 37% (Vitrum VWR, Czech Republic), solvents – LC-MS grade acetonitrile, methanol and water (Vitrum VWR, Czech Republic); Indicator strips (Lach-ner, s.r.o, Czech Republic).

Instruments

An Agilent 6490 Triple Quadrupole LC/MS system with 1290 Infinity LC system was used for LC-MS/MS measurements of metanephrines in urine. Chromatographic data were processed with MassHunter Workstation software version B 06. 00. Separation was performed using SeQuant®ZIC®HILIC HPLC 3,5 mm, 100Å, PEEK 100 x 2,1 mm metal-free HPLC Column (Merck). A Coulochem III HPLC System, ESA Biosciences Inc. was used for HPLC measurements of metanephrines in urine. Chromatographic data were processed with Clarity™ Chromatography station version 4. 0. 2.784.

Sample preparation for LC-MS/MS method

Urine samples, calibrator and control samples for measurement were processed as follows: 15 µl of internal standard (containing 15 ng MN-d3 and 15 ng NMN-d3) was added into 150 µl of sample (calibrator, control, urine) and mixed shortly. pH value was checked whether it is in the range pH ≤ 1. If necessary, the pH value was adjusted using conc. HCl. For acidic hydrolysis samples were incubated for 30 minutes at 95 °C. To 40 µl of incubated material tempered to the room temperature 360 µl of 80% ACN was added. Samples were mixed for 30 seconds on a vortex and centrifuged for 5 minutes at 10000 g.

LC-MS/MS analysis

After centrifugation, 0,5 µl of the solution was injected to chromatographic system. Chromatographic separation was performed on SeQuant®ZIC®HILIC HPLC 3,5 mm, 100Å, PEEK 100 x 2,1 mm metal-free HPLC Column with gradient elution of mobile phases A (50mM NH₄COOH in water) and B (acetonitrile) with the flowrate 0,3 ml/min and temperature 45 °C with MS detection (ion source parameters and MRM transitions – **Table 1**). The runtime was 6 min with retention times 2,36min for MN and 2,57min for NMN (**Figure 1**).

Figure 1. Chromatogram of MN and NMN

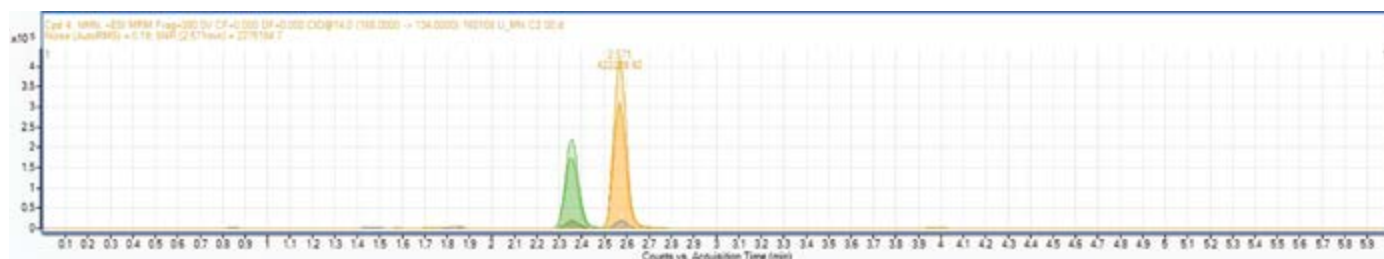


Table 1. Mass spectrometry and mass transition conditions

Ion source parameters			Precursor (m/z)	Product (m/z)	Frag	CE	
AJS ESI	positive		MN*	180	165	380	11
Gas temp.	135	°C	MN	180	148	380	11
Gas flow	12	l/min	MN-d3*	183	151	380	11
Nebulizer	45	Psi	MN-d3	183	168	380	11
Sheath gas temp.	400	°C	NMN*	166	134	380	14
Sheath gas flow	10	l/min	NMN	166	106	380	18
Capillary	4000	V	NMN-d3*	169	137	380	14
Nozzle voltage	0	V	NMN-d3	169	109	380	18

*quantifier

Commercially available IVD diagnostic Kit for HPLC with ECD detection

For commercial method sample preparation and chromatographic evaluation were processed as described in ClinREP®HPLC Complete Kit Metanephrines in Urine Instruction Manual®.

Results

To define analytical characteristics of LC-MS/MS method, both lyophilized commercially available materials and patient samples were used. The analytical performance of the new developed LC-MS/MS method was satisfactory. Calibration range for MN was 0,020 – 10,140 µmol/l with limit of quantification 0,020 µmol/l (CV = 2,6%). Calibration range for NMN was 0,021 – 10,890 µmol/l with limit of quantification 0,021 µmol/l (CV = 1,5%). The intra-assay and inter-assay coefficients of variation (CV) were below 10%. Recoveries determined by standard addition ranged from 85 to 101%. This method fulfilled requirements for validation parameters for both analytes (**Table 2**).

To assess the suitability of the developed method for routine use in clinical diagnostic laboratory the comparison of developed LC-MS/MS method with reference HPLC method was performed. For this purpose 10 patient samples, 2 control samples and 2 EQAS samples were prepared

Table 2. Analytical parameters – interassay and intraassay precision

Precision	Unit	Intraassay (n = 10)		Interassay (n = 10)			
		MN	NMN	MN	NMN	MN	NMN
Cteor	µmol/l	–	–	0,842	5,160	1,780	8,560
MEAN	µmol/l	0,905	1,657	0,887	5,322	1,734	8,227
SD	µmol/l	0,034	0,075	0,036	0,306	0,102	0,729
CV	%	3,8	4,5	4,1	5,8	5,9	8,9

and parallelly measured using those two methods. Statistical analysis was performed using the MedCalc 16.1 (Medcalc Software bvba, Belgium) and results are shown in **Table 3**. Normal distribution of dataset was tested using D'Agostino-Pearson test with the result „reject Normality“ so non-parametric Wilcoxon test was used for further comparison. For methods comparison Passing-Bablok nonparametric regression (**Figure 2**) and Bland-Altman plot were applied

Table 3. The parameters of statistical analysis for HPLC and LC-MS/MS methods

	MN (n = 14)		NMN (n = 14)	
	HPLC	LC-MS/MS	HPLC	LC-MS/MS
Mean $\mu\text{mol/l}$	0,720	0,737	1,630	1,555
Median $\mu\text{mol/l}$	0,185	0,197	0,684	0,862
Lowest value $\mu\text{mol/l}$	0,044	0,075	0,144	0,145
Highest value $\mu\text{mol/l}$	5,230	5,185	8,797	8,095
p (Wilcoxon test)	0,41		0,50	
Passing- Bablok regression				
Intercept A	-0,012		-0,016	
95% CI	(-0,035 – 0,011)		(-0,133 – 0,066)	
Slope B	1,010		1,091	
95% CI	(0,949 – 1,061)		(0,831 – 1,153)	

(**Figure 3**). For graphic presentation of dataset box-and-whisker graphs were used (**Figure 4**).

Comparison of two methods – reference HPLC method and developed LC-MS/MS method

As the reference method the commercially available HPLC Kit dedicated for HPLC with ECD detection was used. Results of Passing-Bablok regression are shown in **Table 3**. For the intercept A, for MN and NMN, the 95% confidence interval contains the value 0, this fact excludes the presence of a systematic error of the measurement system throughout the measurement range. For the slope B, for MN and NMN, the 95% confidence interval contains the value 1, this fact excludes the presence of a proportional error of measurement. The Bland-Altman difference plot was used to assess differences between obtained results. The plot has shown equal distribution of the values, there is no trend that would indicate the presence of a systematic error (one outlying point for MN, one for NMN). 95% confidence interval of the mean difference contains value 0, pointing that there is no statistical difference between methods. Using Wilcoxon paired test we reached the same conclusion ($p = 0,41$ for MN, $p = 0,50$ for NMN). Graphic presentation of dataset as box-and-whisker graphs supports the results of above described statistical analysis (**Figure 4**).

Figure 2. Passing-Bablok regression – comparison of HPLC and LC-MS/MS methods

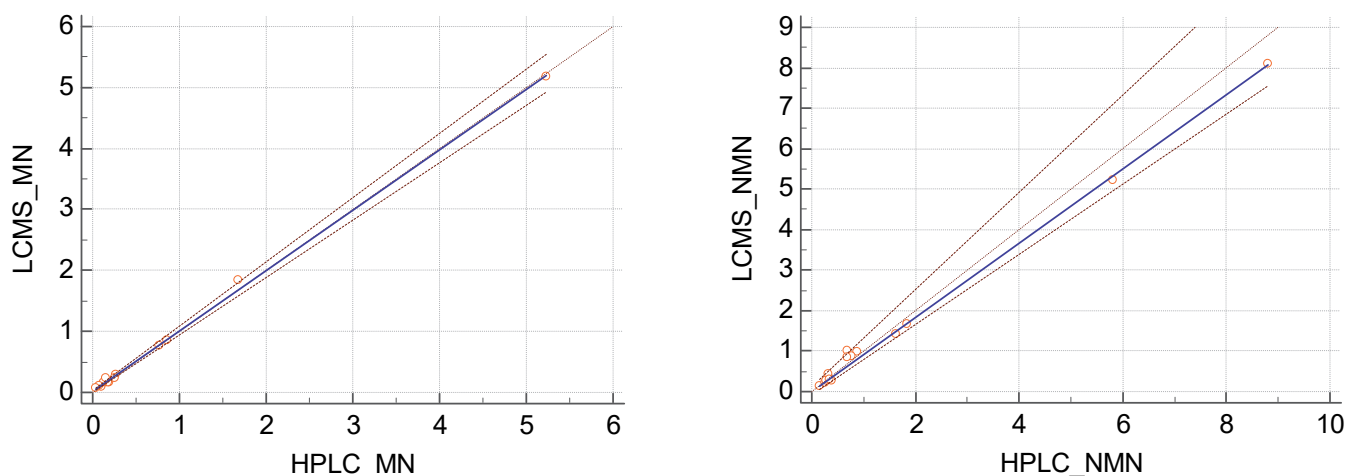


Figure 3. Blandt-Altman difference graph for HPLC and LC-MS/MS methods

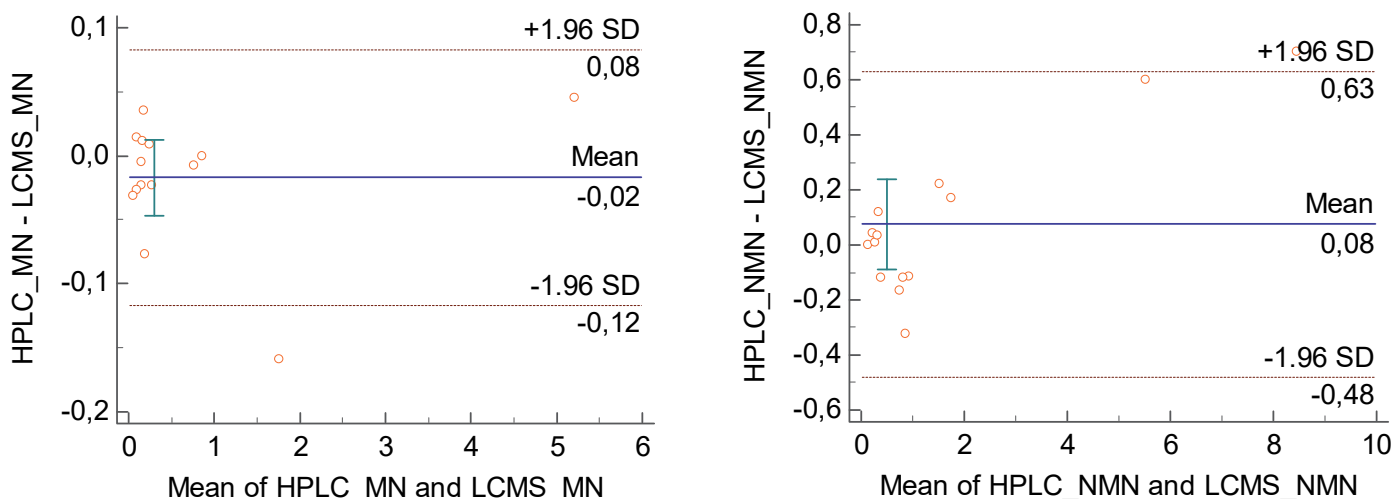
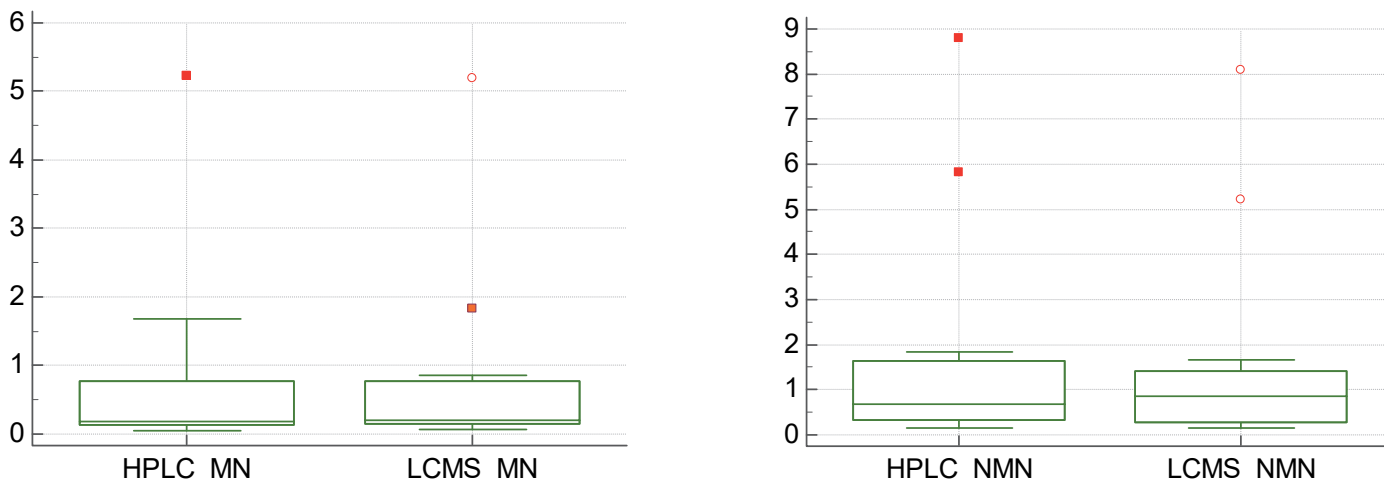


Figure 4. Box-and-whisker graphs for HPLC and LC-MS/MS methods



Discussion

The early settled diagnosis of pheochromocytoma is crucial for treatment and for surgical intervention. Diagnostic algorithm for NETs is based on several aspects: clinical symptomatology, laboratory diagnostics and as the last step the exact localisation of the tumor using imaging techniques.

Excessive production of catecholamines and their metabolites is considered a hallmark in the biochemical diagnosis of catecholamine-producing tumors. The measurement of catecholamine levels has a lot of limitations: elevated catecholamine levels may not be specific for pheochromocytoma (sympathetic nervous system activity), the presence of „silent pheochromocytoma“ or episodic secretion of catecholamines. Regarding those limitations plasma concentrations of free metanephrines are better indices than other

manifestations of catecholamine excess but measurements of metanephrines in urine are still commonly used for the diagnosis of pheochromocytoma^(2,4,5).

The aim of the presented work was to develop an analytical method and to assess the suitability of the developed method for use in clinical diagnostic laboratory. As advantages of presented method we can highlight undemanding sample preparation, short runtimes and required analytical parameters. Statistical analysis performed by using the Passing-Bablok regression and Bland-Altman diagram confirmed the suitability of this approach for the measurement of metanephrines in urine in routine diagnostic laboratory. This approach eliminates inconveniences related with previously used classical HPLC method with ECD detection, such as extensive sample preparation and long runtimes (20 min).

REFERENCES

1. de Jong W, de Vries E, Kema IP. Current status and future developments of LC-MS/MS in clinical chemistry for quantification of biogenic amines. *Clinical Biochemistry* 2011; 44: 2011: 95-103.
2. Stejskal D, Lacnak B, Vaclavik J, Zuber R. Volné plazmatické metanefriny a jejich využití v diagnostice feochromocytomu. *Klin Biochem Metab* 2005; 13 (34), No. 4: 201-206.
3. Marney LC, Laha TJ, Baird GS, et al. Isopropanol Protein Precipitation for the Analysis of Plasma Free Metanephrines by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry* 2008; 54(10): 1729-1732.
4. Brabcová Vranková A, Portyčová L, Nyvltová Z, a kol. Vývoj nového kitu pro stanovení volných plazmatických metanefrinů. Sborník přednášek mezinárodní odborné konference XXXV. Moderní elektrochemické metody 2015: 13-16.
5. Willemsen JJ, Ross HA, Lendes JWM, et al. Stability of urinary fractionated metanephrines and catecholamines during collection, shipment and storage of samples. *Clinical Chemistry* 2007; 53(2): 268-272.
6. <https://www.mayomedicallaboratories.com/test-catalog/Clinical+and+Interpretive/83006>
7. https://www.spadia.cz/SiteCollectionDocuments/Laboratorni-prirucka/Laboratorni_prirucka_SPADIA.pdf (strana 41).
8. Instruction Manual ClinREP®HPLC Complete Kit Metanephrines in Urine

Mgr. Magdalena Rajska

SPADIA LAB, a. s.

Dr. Slabihoudka 6232/11, 708 52 Ostrava, Czech Republic

e-mail: magdalena.ajska@spadia.cz

ABL série | Acidobazické analyzátořy



Stolní i kazetové systémy • Vhodné do laboratoře a všech typů klinických oddělení • Progresivní senzory bez interferencí • Nejnižší objem vzorku (již od 45 μ l pro celé spektrum) • Sofistikovaný automatický systém kontroly AQC • Podavač nebo mixér pro minimalizaci preanalytických chyb • Kompletní firemní IT řešení



pH	cCl ⁻	cGlu	ctBil	FCOHb
pCO ₂	cCa ²⁺	cLac	ctHb	FMetHb
pO ₂	cK ⁺	cUrea	sO ₂	FHHb
	cNa ⁺	cCrea	FO ₂ Hb	FHbF

www.radiometer.cz/produkty/testovani-krevnich-plynu



- ABL | Acidobazická rovnováha
- TCM | Transkutánní monitoring
- HemoCue | Monitorování glukózy
- AQT | POC imunochemie

WORLD LEADER
IN ACUTE CARE
TESTING

Možnosti laboratórnej diagnostiky infekcií vyvolaných *Clostridium difficile*

Martina Krehelová, Eva Sinajová

Klinická mikrobiológia, Medirex, a. s., Košice

Clostridium difficile s produkciou toxínov je najčastejším pôvodcom nozokomiálnych črevných infekcií. Kolitída vyvolaná *C. difficile* je infekčné ochorenie s rôznym stupňom závažnosti, môže prebiehať ako obyčajné hnačkové ochorenie, pseudomembranózna kolitída, ale tiež ako stav ohrozujúci život, sprevádzaný paralytickým ileom prechádzajúcim do sekundárnej sepsy. Ochorenie vzniká najčastejšie v súvislosti s liečbou širokospektrálnymi antibiotikami, ktoré eliminujú normálnu črevnú flóru. Prenos *C. difficile* sa uskutočňuje pomocou spór fekálno-orálnou cestou. Včasná diagnostika infekcií vyvolaných *C. difficile* je dôležitá z dôvodu začatia adekvátnej terapie a tiež protiepidemických opatrení zamedzujúcich ďalšiemu šíreniu spór v nemocničnom prostredí.

Kľúčové slová: infekcie vyvolané *Clostridium difficile*, pseudomembranózna kolitída, laboratórna diagnostika, glutamátdehydrogenáza, toxigénny kmeň

Laboratory diagnostic possibilities for *Clostridium difficile* infections

Clostridium difficile with toxin production is the most common cause of nosocomial gastrointestinal infections. *Clostridium difficile* infection can manifest as mild diarrhea, pseudomembranous colitis but also as a life-threatening illness accompanied by paralytic ileus developing into secondary sepsis. The disease is generated in relation with a broad-spectrum antibiotic therapy which eliminates normal gut microbiota. Transmission of *Clostridium difficile* is done by spores following the faecal-oral route. Early diagnosis of *Clostridium difficile* infections is essential for proper initiation of an antibiotics therapy and also for anti-epidemic measures which prevent spore spreading in hospitals.

Keywords: *Clostridium difficile* infections, pseudomembranous colitis, laboratory diagnostics, glutamátdehydrogenase, toxigenic strain

NewsLab, 2018; roč. 9 (2): 86 – 90

Úvod

Clostridium difficile je grampozitívna anaeróbna baktéria (**obrázky 1, 2**) bežne sa vyskytujúca v prírode, povrchových a odpadových vodách a s rôznou frekvenciou tiež v tráviacom trakte ľudí a zvierat. Za nepriaznivých podmienok tvorí metabolicky inaktívne formy – spóry, ktoré sú výrazne odolné proti vysokým teplotám a ďalším fyzikálnym vplyvom, taktiež proti väčšine dezinfekčných prostriedkov (vrátane alkoholových preparátov používaných na dezinfekciu plôch, povrchov a rúk). To zvyšuje riziko ich dlhodobého pretrvávania v prostredí, ďalšieho šírenia a pravdepodobnosť kolonizácie nemocničných pacientov, ktorá môže byť nasledovaná rozvojom infekcie. *C. difficile* nepatrí medzi invazívne patogény, na začiatku ochorenia iba adheruje na sliznicu hrubého čreva. Jeho patogenita vyplýva zo schopnosti tvoriť veľmi účinné exotoxíny považované za hlavné faktory virulencie. Toxigénne kmene produkujú vo vegetatívnej fáze termolabilné proteínové toxíny A a B, ktoré sa do prostredia uvoľňujú rozpadom buniek. Obidva toxíny pôsobia synergicky a ich produkcia je spojená s poškodením epitelu čreva i hlbších štruktúr črevnej steny. Gény kódujúce toxín A (gén *tcdA*) a toxín B (gén *tcdB*) sú umiestnené na tzv. lokuse patogenity (pathogenity locus – *PaLoc*) s veľkosťou 19,6 kb, a to spolu s tromi ďalšími génmi regulujúcimi expresiu toxínov. Toxín A je enterotoxín, vyvoláva apoptózu enterocytov a aktivuje zápalovú reakciu. Toxín B je cytotoxín, spôsobuje deštrukciu buniek poškodených toxínom A. Okrem toxínov A a B produkujú niektoré kmene aj tretí, tzv. binárny to-

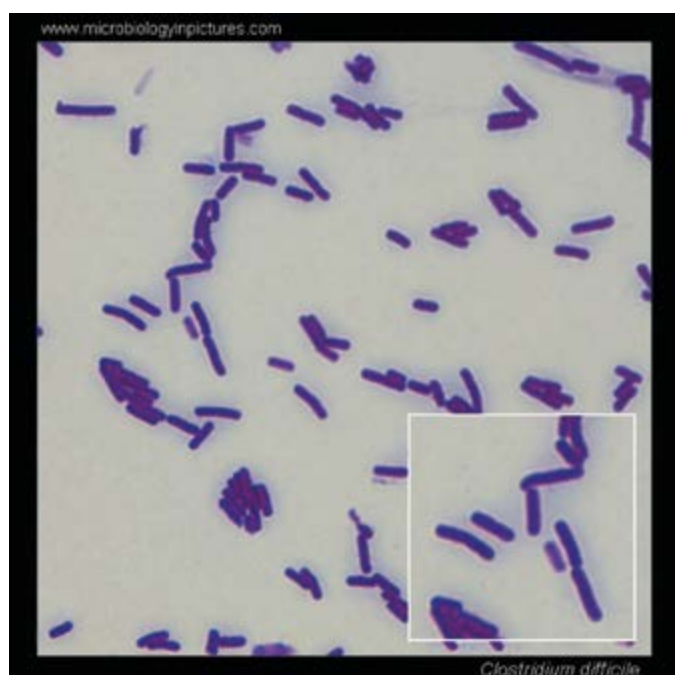
xín. Gény kódujúce binárny toxín (géны *cdtA* a *cdtB*) sú umiestnené mimo *PaLoc* lokus⁽⁸⁾. Jeho úloha v patogenéze ochorenia nie je zatiaľ celkom objasnená, ale prítomnosť toxínov A a B súčasne s binárnym toxínom zhoršuje priebeh ochorenia a sťažuje jeho liečbu (väčšina epidemických PCR ribotypov produkuje aj binárny toxín). Netoxigénne kmene *C. difficile* (neprodukujúce toxín A a B) sú nepatogénne a nepredstavujú ohrozenie ani pre vnímavého jedinca⁽⁹⁾.

Patogenéza ochorenia

Infekcie vyvolané *C. difficile* (*Clostridium difficile* infections – CDI) vykazujú široké spektrum klinických prejavov od miernej hnačky cez pseudomembranóznu kolitídu až po toxický megakolon s úmrtnosťou 30 – 50 %⁽¹⁾. Ochorenie najčastejšie vzniká v súvislosti s liečbou širokospektrálnymi antibiotikami (ATB), ktoré eliminujú normálnu črevnú flóru, príp. aj ako nozokomiálna infekcia. Na prepuknutie CDI sú potrebné dve podmienky: strata ochrannej črevnej flóry (tzv. kolonizačná rezistencia) a infekcia toxigénnymi kmeňmi *C. difficile*. Mechanizmus účinku oboch toxínov na bunky črevného epitelu je odlišný. Toxín A (*TcdA*) je typický enterotoxín, ktorý poškodzuje bunky črevného epitelu a spôsobuje kumuláciu tekutín v čreve, čo má za následok vznik vodnatých, niekedy hemoragických hnačiek. Toxín B (*TcdB*) svojím cytotoxickým účinkom vedie k nekróze napadnutých buniek. Na črevnej sliznici vznikajú početné, typické ostrovčekovité (mapovité) ulcerácie pokryté plablami, dobre viditeľné pri

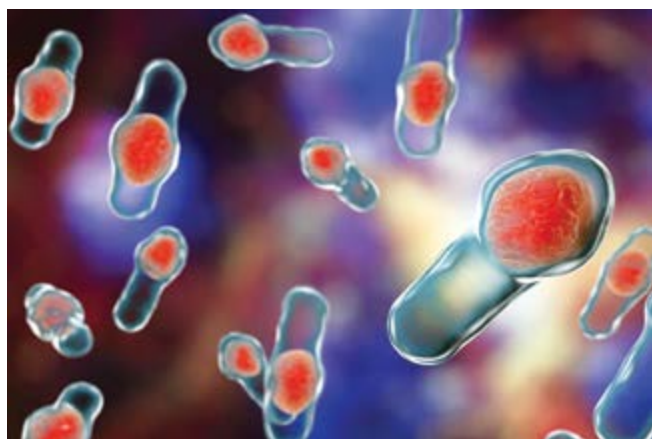
endoskopickom vyšetrení⁽¹⁷⁾. Pôsobením toxínu B na hladkú svalovinu a vegetatívne nervstvo v stene hrubého čreva dochádza k spomaleniu až zastaveniu peristaltiky a rozvoju ilea, čím zároveň vzniká ideálne prostredie na množenie mikroorganizmov. Takéto poškodenie môže vyústiť až do perforácie čreva. Terminálne štádium choroby sa vyznačuje enormnou distenziou hrubého čreva (megakolon) a postupnou stratou bariérovej funkcie črevnej sliznice s následným prienikom črevných baktérií do hlbších tkanív a potom do krvi. Vzniká sepsa, najčastejšie gramnegatívna, s rýchlym rozvojom septického šoku s vysokou úmrtnosťou⁽¹⁾. Diagnóza tohto ochorenia sa stanovuje na základe anamnézy, klinického obrazu, endoskopického nálezu pseudomembranóznej kolitídy a laboratórneho dôkazu toxínov *C. difficile* v stolici.

Obrázok 1. *Clostridium difficile* – farbenie podľa Grama



zdroj: <https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-micrographs/gram-stain/gram-positive/clostridium-difficile.jpg>

Obrázok 2. *Clostridium difficile* – spóry

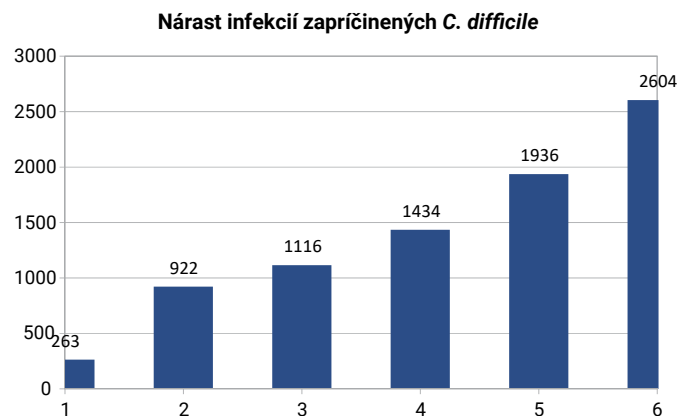


zdroj: https://www.google.com/search?q=clostridium+difficile+photos&client=firefox-b&source=Inms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwj-hu63jwvPbAhXqZpoKHZBSB8QQ_AUICigB&biw=1908 &bih=959#imgrc=z_Jz6gXYgAU4xM

Epidemiológia ochorenia

CDI majú celosvetovo a rovnako na Slovensku narastajúcu tendenciu výskytu. Asi 90 % všetkých foriem CDI vzniká v nadväznosti na predchádzajúcu alebo súbežnú antimikrobiálnu terapiu, hlavne systémovo podávanými antibiotikami. Ich nárast súvisí aj s vyšším vekom pacientov (nad 65 rokov), polymorbiditou, dlhodobou hospitalizáciou, častým užívaním antisekrecčných liekov a inhibítorov protónovej pumpy, so záškrobmi na hrubom čreve, s hypomobilitou čreva a mnohými ďalšími faktormi. O narastajúcej incidencii svedčia aj údaje poskytnuté Úradom verejného zdravotníctva SR (**graf 1**). Kým v roku 2011 bolo v SR hlásených 136 prípadov ochorení vyvolaných *C. difficile*, v roku 2017 ich počet stúpol na 2 604 prípadov. Reálny výskyt infekcií je však vyšší. Mnoho prípadov je nezachytených alebo poddiagnostikovaných, chýba štandardizácia poskytovaných údajov. Z uvedeného vyplýva dôležitosť venovať patričnú pozornosť diagnostike CDI. *C. difficile* je bežnou súčasťou črevného mikrobiómu u 50 % detí do 2 rokov a u 2 – 5 % bežnej populácie. Je najčastejším vyvolávateľom nozokomiálnej hnačky. Veľká časť infikovaných pacientov zostáva asymptomatických a stáva sa najväčším rezervoárom mikróba⁽⁴⁾. Odhaduje sa, že 7 – 11 % hospitalizovaných pacientov, 5 – 7 % pacientov sociálnych zariadení a menej ako 2 % ambulantných pacientov sú nosičmi kmeňov *C. difficile* produkujúcich toxíny. Na zvyšujúcej sa incidencii ochorení spôsobených *C. difficile* sa podieľa vysoká preskripcia antibiotík, ako aj objavenie sa hypervirulentných kmeňov⁽⁵⁾. Na prelome rokov 2002 – 2003 boli v Severnej Amerike opísané epidémie CDI vyvolané kmeňom 027/NAP1/B1. Tento hypervirulentný kmeň je charakteristický vysokou produkciou toxínov (A aj B), schopnosťou tvoriť viac spór ako kontrolné kmene (ľahšie šírenie v nemocničnom prostredí) a rezistenciou na fluorochinolóny⁽¹⁾. Spomínaný ribotyp (RT) 027 sa následne rozšíril aj do západnej Európy. V Spojenom kráľovstve v rokoch 2008 – 2009 spôsobil až polovicu všetkých nozokomiálnych CDI. Následne boli opísané ďalšie epidemické RT, napr. RT 001, 014, 017, 078, 176. Podľa výsledkov celogenómového sekvenovania je RT 176 (označovaný ako 027-like) geneticky blízky príbuzný hypervirulentnému RT 027 a vykazuje aj podobné fenotypové vlastnosti⁽¹⁶⁾. Produkuje binárny toxín považovaný za prognostický marker pre vznik

Graf 1. Výskyt hnačkovitých ochorení vyvolaných *C. difficile*. Podľa údajov ÚVZ SR



zdroj: www.uvzs.sk

rekurentných epizód CDI⁽¹⁵⁾ a klinický priebeh ochorenia vyvolaný týmto RT je rovnako závažný ako pri RT 027⁽¹⁰⁾. Identifikácia izolátov *C. difficile* a znalosť lokálnej epidemiologickej situácie je dôležitá pre zavedenie opatrení zamedzujúcich šíreniu epidemiologicky významných kmeňov v rámci nemocníc, resp. oddelení.

Terapia

Liečebné postupy CDI sú zakotvené v slovenských odporúčaniach na diagnostiku a liečbu kolitídy spôsobenej *C. difficile*⁽⁷⁾. Všeobecné odporúčania v liečbe ľahkých foriem CDI sú: ukončenie ATB liečby, ktorá infekciu vyvolala (ak je to možné), rehydratácia, bezzvyšková diéta. Pri nízkej hladine albumínu u pacienta je potrebná jeho parenterálna substitúcia. Lieky tlmiace črevnú peristaltiku (spazmolytiká, opiáty) sú kontraindikované. Na liečbu stredne ťažkých, ťažkých foriem a rekurentných foriem CDI sa odporúča medikamentózna antibiotická liečba: metronidazol, vankomycín a nové makrocyclické antibiotikum fidaxomicín. Ako ďalšie možnosti podpornej liečby sa využívajú probiotiká a v poslednom období aj tzv. fekálna bakterioterapia. Transplantácia stolice je oficiálne odporúčanou metódou pri liečbe viacpočetných rekurencií CDI s vysokým percentom úspešnosti, ktorým prekonáva aj existujúce antibiotické režimy⁽¹³⁾.

Laboratórna diagnostika CDI

Na mikrobiologickú diagnostiku CDI sa dnes využíva viacero metód. Každá z nich má inú mieru citlivosti a špecificity, preto sa odporúča ich kombinácia. Cielené mikrobiologické vyšetrenie stolice je indikované u pacientov s klinickým podozrením na CDI. Naopak, nie je indikované u pacientov s formovanou stolicou a bežne sa nerobí ani u detí do 1 – 2 rokov veku.

Dôkaz antigénu *C. difficile*

Glutamátdehydrogenáza (GDH) je špecifický antigén – exoenzým, produkovaný všetkými kmeňmi *C. difficile* (toxigénnymi aj netoxigénnymi). Dôkaz antigénu je možný priamo zo stolice, špecifickosť testu je 80 – 100 %. Má vysokú negatívnu prediktívnu hodnotu (NPV), t. j. negatívny výsledok s veľkou pravdepodobnosťou vylučuje možnosť klostrídiovej infekcie. Test však neodlíši toxigénne kmene od netoxigénnych. Jeho nevýhodou je aj možnosť skříženej reakcie s inými druhmi *Clostridium spp.* prítomnými v stolici (falošne pozitívny výsledok v 20 %). GDH môže byť stanovená samostatne alebo je súčasťou testov dokazujúcich zároveň toxíny *C. difficile*.

Dôkaz toxínov *C. difficile* (A/B)

Na dôkaz toxínov A/B sa používajú diagnostické súbory založené na princípe enzýmovej imunoanalýzy alebo imunochromatografie. Na trhu je v súčasnosti k dispozícii celý rad komerčných súprav s rôznou citlivosťou a špecifickosťou. Ich výhodou je cenová dostupnosť, rýchlosť, vysoká špecifickosť, jednoduché vyhotovenie s jednoznačnou interpretáciou dôkazu toxigenity kmeňa. Test má vysokú pozitívnu prediktívnu hodnotu (PPV), t. j. pozitívny výsledok s veľkou pravdepodobnosťou dokazuje klostrídióvu infekciu. Nevýhodou je relatívne nízka citlivosť (90 %), čo v niektorých prípadoch vedie k falošne negatívnym výsledkom.

Anaeróbna kultivácia

Anaeróbna kultivácia *C. difficile* je pomerne náročná a zdĺhavá (2-3 dni). Na kultiváciu sa používajú selektívne pôdy s obsahom cefoxitínu a cykloserínu, ktoré potláčajú sprievodnú flóru. Konfirmácia kultivačného nálezu je možná mikroskopicky (orientačne), biochemicky (komerčnými anaerotestami), latexovým aglutinačným testom, príp. použitím novších techník (PCR – polymerase chain reaction, MALDI TOF MS – matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry). Kultivačné vyšetrenie sa považuje za nevyhnutné pri všetkých vzorkách stolice, pri ktorých bola potvrdená pozitivita GDH vrátane toxín-negatívnych stolíc. Na dôkaz toxínov z narastenej kultúry možno použiť imunochémické testy alebo PCR. Výhodou kultivačného vyšetrenia je jeho vysoká výťažnosť, možnosť uloženia izolovaných kultúr, stanovenia citlivosti na antibiotiká (ATB), príp. molekulárna typizácia (epidemiologické účely).

Dôkaz cytotoxicity na tkanivových kultúrach

Dôkaz cytotoxicity na tkanivových kultúrach má skôr historický význam. Táto metóda je náročná na čas, laboratórne vybavenie a interpretačné skúsenosti, jej nevýhodou je aj riziko falošnej positivity. Senzitivita sa uvádza 94 – 100 %. Cytotoxín možno dokázať v stolici alebo z izolovaného kmeňa *C. difficile* na tkanivových kultúrach fibroblastov, kde dochádza k cytotopickému efektu.

PCR – dôkaz génov toxicity

Zavedenie PCR metód, či už ako skrínigových alebo konfirmačných metód, do diagnostiky CDI je európsky trend. Vyznačujú sa vysokou citlivosťou (99 – 100 %) a špecifickosťou, významne skracujú čas získania výsledku. Hodnota PPV je tu paradoxne znížená, pretože PCR je taká citlivá, že vo vzorke dokáže i malé množstvo toxigénnych *C. difficile* prítomných pri bežnej kolonizácii, nerozlíši teda kolonizáciu od infekcie⁽¹⁴⁾. Dnes máme k dispozícii komerčné súbory (na princípe realtime PCR) na dôkaz génu pre tvorbu toxínu B, génu pre binárny toxín, súbory na detekciu delécií typických pre niektoré epidemické PCR ribotypy (napr. 027, 176). PCR má význam najmä pri verifikácii ťažkých foriem CDI a pri potvrdení nejasných výsledkov predchádzajúcich testov.

Typizácia *C. difficile* na epidemiologické účely

Medzi metódy nadstavbovej diagnostiky patrí ribotypizácia a toxinotypizácia, ktorých základom je PCR a makroreštrikčná analýza pulznou gélovou elektroforézou⁽²⁾. Pri ribotypizácii *C. difficile* dochádza k amplifikácii úseku medzi génmi pre 16S a 23S rRNA (tzv. Intergenic Spacer Region). Medzi jednotlivými ribotypmi je rozdiel v počte prítomných alel týchto génov aj v dĺžkach úsekov medzi alelami⁽⁶⁾. Každý RT tvorí špecifický elektroforetický profil, podľa ktorého je následne identifikovaný. Na určenie konkrétneho RT sú získané elektroforeogramy porovnávané s rakúskou webovou databázou <https://webribo.ages.at/>. Celkovo bolo objavených viac než 800 PCR ribotypov a 24 toxinotypov.

Odporúčaný diagnostický postup

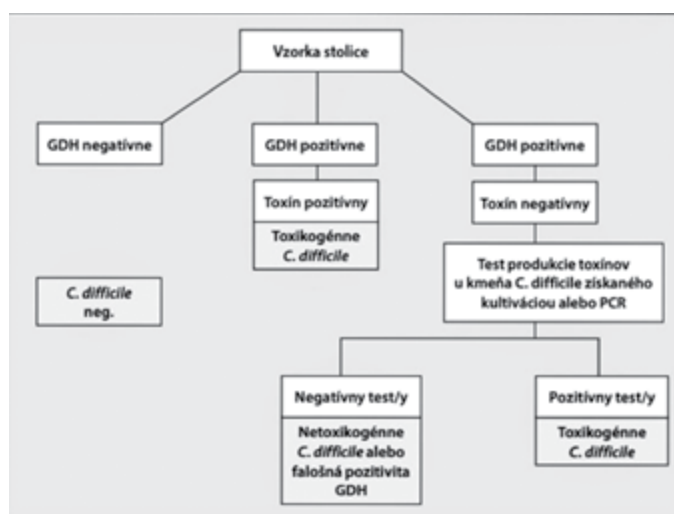
Základný diagnostický algoritmus vychádza z dôkazu GDH alebo dôkazu génu/génov pre produkciu toxínov pomocou PCR a v prípade positivity následnej detekcie toxínov A/B

imunoenzymatickou metódou (EIA)⁽³⁾. Hovoríme o tzv. 2-stupňovom diagnostickom algoritme. GDH negatívne vzorky možno interpretovať ako definitívne negatívne na prítomnosť *C. difficile* a nie je potrebné ich ďalej testovať. Ak je test GDH pozitívny, je nutné potvrdiť alebo vylúčiť toxigenitu kmeňa *C. difficile* (dôkaz toxínov). V prípade pozitivity GDH a negativity toxínov A/B je interpretácia nejednoznačná. Môže ísť o prítomnosť netoxigénneho kmeňa alebo falošne negatívny výsledok podmienený obmedzenou senzitivitou metódy na dôkaz toxínov. V tomto prípade sú potrebné ďalšie laboratorné vyšetrenia ako PCR alebo kultivácia s následným overením toxigenity izolovaného kmeňa. Hovoríme o tzv. 3-stupňovom diagnostickom algoritme. Vzhľadom na rozdielnu citlivosť rôznych používaných metód je podľa súčasných odporúčaní preferovaná kombinácia minimálne dvoch alebo viacerých testov. Hlavným cieľom použitia doplnujúcich metód je získanie čo najspoľahlivejšieho výsledku, teda vylúčenie alebo potvrdenie prítomnosti toxikogénneho kmeňa *C. difficile*. Príklad algoritmu kombinujúceho rôzne metodiky je uvedený v **schéme 1**⁽⁷⁾. Pri závažných formách CDI a z epidemiologických dôvodov je vhodná kultivácia stolice a následná molekulárna typizácia izolovaného kmeňa. Interpretáciu laboratorných nálezov treba vždy hodnotiť v súvislosti s klinickým nálezom u konkrétneho pacienta, s aktuálnou epidemiologickou situáciou a ostatnými laboratornými parametrami.

Materiál a metodika

Naša štúdia prebiehala od mája do septembra 2017. Celkovo 481 hnačkovitých stolíc bolo vyšetrených 3-stupňovým diagnostickým algoritmom. V prvom kroku boli všetky vzorky testované na prítomnosť GDH kvalitatívnym imunochromatografickým testom Rapid-Viditest *C. difficile* Ag (Vidia). V druhom kroku boli všetky GDH pozitívne vzorky analyzované na prítomnosť toxínov A/B pomocou imunochromatografického testu RIDA®QUICK *Clostridium difficile* Toxin A/B (R-Biopharm). Vo všetkých GDH pozitívnych vzorkách stolice bola zároveň založená anaeróbna kultivácia po predchádzajúcom „alkoholovom šoku“: vzorka stolice zmiešaná s 96 % etanolom v pomere 1 : 1, po dôkladnom premiešaní na vortexe je inkubovaná pri laboratornej teplote asi 30 minút až

Schéma 1. Príklad 3-stupňového algoritmu pri dôkaze *C. difficile* v stolici



1 hodinu. Následne sa 1-2 kvapky suspenzie inokulujú na selektívny agar pre *C. difficile* (Brazier, Oxoid) a v anaeróbnej atmosfére kultivujú 48 – 72 hodín pri teplote 35 – 37 °C. Vykultivované suspektné kolónie *C. difficile* boli identifikované pomocou hmotnostnej spektrometrie MALDI-TOF MS. Izoláty *C. difficile* vykultivované z GDH pozitívnych a toxín-negatívnych vzoriek boli znovu testované na prítomnosť toxínov A/B (toxigénna kultivácia – TC) rovnakým imunochromatografickým testom ako v prípade stanovenia toxínov v stolici (3. diagnostický stupeň). Molekulárna analýza kmeňov identifikovaných ako *C. difficile* bola vykonaná v spolupráci s Ústavom lekárskej mikrobiológie FN v Motole v Prahe, Česká Republika. Zahŕňala stanovenie génov pre produkciu toxínov A/B (*tcdA/tcdB*), binárneho toxínu (*cdtA, cdtB*) a ribotypizáciu izolátov *C. difficile*. Prítomnosť génov pre produkciu toxínov bola stanovená pomocou multiplex PCR⁽¹²⁾.

Odber biologického materiálu a transport do laboratória

Na mikrobiologické vyšetrenie stolice na prítomnosť *C. difficile* je potrebné odobrať minimálne 2 ml stolice do sterilnej nádoby. Stolica má byť spracovaná a vyšetrená do dvoch hodín, pretože toxíny sú pomerne nestabilné, rýchlo sa rozpadávajú a výsledkom môže byť falošná negativita. Ak nemožno vyšetriť stolicu hneď po odbere, je vhodné vzorku uchovať pri chladničkej teplote (asi 5 °C), vtedy je stabilita toxínu zabezpečená na 48 hodín. Na dlhodobé uchovávanie vzoriek treba vzorku stolice hlboko zmraziť na –70 °C.

Výsledky

V priebehu 5 mesiacov bolo vyšetrených celkovo 481 hnačkovitých stolíc z 3 nemocníc. Prehľad jednotlivých oddelení, z ktorých pochádzali vyšetované vzorky, je uvedený v **tabuľke 1**. Z celkového počtu vyšetrených stolíc bolo 104 vzoriek GDH pozitívnych (21,6 %). Po odstránení neúspešne kultivovaných, duplicitných, resp. triplicitných vzoriek ostalo

Tabuľka 1. Prehľad oddelení, z ktorých pochádzali vyšetované vzorky stolíc

máj – september 2017	Celkový počet vyšetrených stolíc
FNsP J.A. Reimana Prešov	
Interné odd. (vrátane JIS)	88
Odd. dlhodobo chorých	43
Odd.klinickej onkológie (vrátane onkoamb.)	22
Detské odd. (vrátane JIS)	16
Infekčné odd. (vrátane infektolog.amb.)	59
gastroambulancia FNsP	60
Letecká vojenská nemocnica Košice	
Odd. dlhodobo chorých	27
Geriatra	6
gastroambulancia LVN	24
Detská fakultná nemocnica Košice:	
Klinika detí a dorastu	64
Infekčné odd.	1
Detská onkológia	4
gastroambulancia DFN	21
Ostatné:	
Iné oddelenia	17
ambulancie	29
Spolu:	481

v súbore 66 vzoriek (66 pacientov). Izoláty *C. difficile* z týchto stolíc boli podrobené molekulárnej typizácii. Z počtu 66 vzoriek bolo 58 (87,9 %) toxigénnych (prítomné gény *tcdA* a *tcdB*), z nich 6 izolátov malo navyše gény pre binárny toxín (*cdtA*, *cdtB*). Zvyšných 8 vzoriek zo súboru (12,1 %) bolo netoxigénnych, t. j. nebola v nich preukázaná prítomnosť žiadneho z génov pre produkciu toxínov. Pomocou 3- stupňového diagnostického algoritmu a kombináciou ďalších metód (imunochromatografické stanovenie toxínov a detekcia toxigenity metódou PCR) bolo zistené, že z počtu 58 toxínovo pozitívnych stolíc malo 35 vzoriek pozitívny toxín priamo zo stolice a v 23 vzorkách (toxín-negatívnych zo stolice) až toxigénna kultivácia potvrdila pozitívnosť toxínov (**tabuľka 2**).

Záver

Rýchla a včasná diagnostika *C. difficile* je dôležitá nielen pre liečbu samotného pacienta, ale aj z dôvodu prevencie nozokomiálnych nákaz. Aj keď je mikrobiologické vyšetrenie pre konfirmáciu CDI kľúčové, neslúži na kontrolu účinnosti liečby ani ako argument pre izolačné opatrenia, ak už u pacienta nie je hnačka prítomná. Hlavným kritériom vyliečenia CDI je ústup klinických príznakov, nie negatívita mikrobiologického vyšetrenia. Pozitívne výsledky klasických a molekulárnych vyšetrení môžu pretrvávajúť dlhodobo po ukončení liečby (kolonizácia *C. difficile*) a nie sú dôvodom na ďalšiu ATB terapiu. Aj v tomto prípade je dôležitý klinický stav pacienta. Neodporúča sa ani opakované vyšetrenie v intervale kratšom ako 7 dní u pacientov, u ktorých predchádzajúce

Tabuľka 2. Sumár výsledkov vyšetřovaného súboru vzoriek (n=66)

Počet vzoriek	GDH	Toxín zo stolice	Toxín z kultivácie	Gény toxicity
66	+			
35	+	+		+
23	+	-	+	+
8	+	-	-	-

vyšetrenie na *C. difficile* bolo negatívne, s výnimkou situácií, ak dôjde k progresii ochorenia a boli vylúčené aj iné príčiny⁽³⁾. Naše výsledky ukazujú, že ani 2-stupňový diagnostický algoritmus nie je v mnohých prípadoch postačujúci. Takmer 40 % GDH pozitívnych vzoriek v našom súbore bolo určených ako toxigénne až použitím 3-stupňového diagnostického algoritmu. Preto je potrebné zvážiť jeho zavedenie a/alebo kombináciu viacerých metód aj do rutínnej laboratórnej praxe. Riešenie problematiky CDI v nemocničných zariadeniach si vyžaduje komplexný prístup vrátane adekvátnej špecifickej ATB terapie zameranej na redukciu najrizikovejších skupín ATB (chinolóny, širokospektrálne cefalosporíny, potenciované aminopenicilíny), správnu indikáciu laboratórneho vyšetrenia, dodržiavanie hygienicko-epidemiologických opatrení na zamedzenie šírenia spór, dôslednú izoláciu všetkých infikovaných pacientov s CDI, ale hlavne dôsledné dodržiavanie bariérovej ošetrovateľskej techniky všetkými zainteresovanými zdravotníkmi pracovníkmi.

LITERATÚRA

1. Beneš J, Husa P, Nyč O, a spol. Doporučený postup diagnostiky a léčby kolitidy vyvolané *Clostridium difficile*. Klin Mikrobiol Infekc Lek 2014; 20: 56-66.
2. Brazier JS. The epidemiology and typing of *Clostridium difficile*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 1998; 41: 47-57.
3. Crobach MJ, Planche T, Eckert C, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. Clin Microbiol Infect 2016; 22(4): 63-81.
4. Gerding DN. *Clostridium difficile* – associated diarrhea and colitis. Infect Control Hosp Epidemiol 1995; 16(8): 459-477.
5. Hedge DD. New advances in the treatment of *Clostridium difficile* infection. Ther Clin Risk Manag 2008; 4(5): 949-964.
6. Indra A, Huhulescu S, Schneeweis M, et al. Characterization of *Clostridium difficile* isolates using capillary gel electrophoresis-based PCR ribotyping. J Med Microbiol 2008; 57(Pt 11): 1377-1382.
7. Jarčuška P, Bátorový M, Drgoňa L, a spol. Odporúčaný postup diagnostiky a léčby kolitidy spôsobenej *Clostridium difficile*. Via pract 2015; 1: 1-12.
8. Lesa FC, Gould CV, Macdonald LC. Current status of *Clostridium difficile* infection epidemiology. Clin Infect Dis 2012; 55: 65-70.
9. Natarajan M, Walk ST, Young VB, et al. A clinical and epidemiological review of non-toxicogenic *Clostridium difficile*. Anaerobe 2013; 22(8): 1-5.

10. Nyč O, Pituch H, Matějková J, a spol. *Clostridium difficile* PCR ribotype 176 in the Czech Republic and Poland. Lancet 2011; 377(9775): 1407.
11. O'Connor, et al. *Clostridium difficile* infection caused by the epidemic BI/NAP1/027 strain. Gastroenterology 2009; 136: 1913-1924.
12. Persson S, Torpdahl M, Olsen KEP. New multiplex PCR method for the detection of *Clostridium difficile* toxin A (*tcdA*) and toxin B (*tcdB*) and the binary toxin (*cdtA/cdtB*) genes applied to a Danish strain collection. Clinical Microbiology and Infection 2008; 14(11): 1057-1064.
13. Polák P, Freibergová M, Husa P, et al. Fekální bakterioterapie v léčbě rekurentní kolitidy způsobené *Clostridium difficile* na klinice infekčních chorob fakultní nemocnice Brno v letech 2010 – 2014 – prospektivní studie. Epidemiol Mikrobiol Imunol 2015; 64: 232-5.
14. Surawicz ChM, Brandt LJ, Binion DG, et al. Guidelines for diagnosis, treatment and prevention of *Clostridium difficile* infections. Am J Gastroenterol 2013; 108(4): 478-498.
15. Stewart DB, Berg A, Hegarty J. Predicting recurrence of *C. difficile* colitis using bacterial virulence factors: binary toxin is the key. J Gastrointest Surg 2013; 17: 118-125.
16. Valiente E, Dawson LF, Cairns MD, et al. Emergence of new PCR ribotypes from the hypervirulent *Clostridium difficile* 027 lineage. J Med Microbiol 2012; 61: 49-56.
17. Voth ED, Ballard DJ, Jimmy D. *Clostridium difficile* Toxins: Mechanism of Action and Role in Disease. Clinical Microbiology Reviews 2005; 18(2): 247-263.

RNDr. Martina Krehelová

Klinická mikrobiológia, Medirex, a. s.
Magnezitárska 2/C, 040 01 Košice
e-mail: martina.krehelova@medirex.sk



BD BACTEC™ Automatické hemokultivačné systémy

Spôľahlivé riešenie na presnú, efektívnu a kvalitnú starostlivosť.

BD, líder vo vývoji hemokultivačných prístrojov a médií počas posledných 40 rokov, poskytuje nové riešenia testovania hemokultúr vo Vašom laboratóriu.

Systémy BD BACTEC FX sú založené na overenej fluorescenčnej technológii detekcie rastu mikroorganizmov, výnimočnej kvalite médií a vysokej spoľahlivosti prístrojov BD BACTEC 9000.

Teraz navyše v kombinácii s:

- najefektívnejší, **INTUITÍVNY** pracovný postup výrazne redukuje čas obsluhy;
- najkompaktnejší, **INOVATÍVNY** ergonomický dizajn maximalizujúci využitie priestoru;
- **INTELIGENTNÝ** novátorský manažment dát podporujúci zdieľanie informácií o hemokultúrach v laboratóriu a navzájom medzi laboratóriami.



BD BACTEC FX & BD BACTEC FX40

BD BACTEC FX ponúka kapacitu 200 a 400 kultivačných pozícií. Nový BD BACTEC FX40 s kapacitou 40 pozícií môže byť jednoducho samostatne umiestnený na rôznych nemocničných oddeleniach na satelitnú hemokultiváciu. Všetky systémy sú plne zapojiteľné.

Vírus Zika

Katarína Briestenská¹, Jela Mistríková^{1,2}

¹Katedra mikrobiológie a virológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

²Virologický ústav, Biomedicínske centrum, Slovenská akadémia vied, Bratislava

Vírus Zika (ZIKV) je flavivírus prenášaný komármi, ktorý bol prvýkrát izolovaný zo sentinelového makaka rézusa v ugandskom lese Zika v roku 1947. Tento doposiaľ málo známy vírus bol v poslednej dekáde príčinou rozsiahlych epidémií v krajinách západnej pologule. Infekcia ZIKV má zvyčajne mierny priebeh s nešpecifickými symptómami, zahŕňajúcimi horúčku, makulopapulárnu vyrážku, artralgiu a konjunktivitídu. Boli evidované aj prípady pacientov so závažnejším priebehom infekcie, asociovaným s neurologickými komplikáciami. Najväčšie obavy však ZIKV vzbudzuje pre spojitosť medzi infekciou v tehotenstve a fetálnou mikrocefáliou, prípadne inými kongenitálnymi malformáciami.

Kľúčové slová: vírus Zika, arbovírusy, *Flaviviridae*, transplacentárny prenos, kongenitálne malformácie

Zika virus

Zika virus (ZIKV) is a mosquito-transmitted flavivirus that was first isolated from a sentinel rhesus macaque in the Zika Forest in Uganda in 1947. Over the last decade, ZIKV has emerged from a relatively obscure status to causing large epidemics in countries in the Western Hemisphere. While ZIKV infection symptoms are typically nonspecific and mild, consisting of fever, maculopapular rash, arthralgia and conjunctivitis, there have been reports of more severe reactions associated with neurological complications. Much of the concern surrounding ZIKV has focused on the link between infection in pregnancy and foetal microcephaly and other congenital malformations.

Keywords: Zika virus, arboviruses, *Flaviviridae*, transplacental transmission, congenital malformations

NewsLab, 2018; roč. 9 (2): 92 – 97

Úvod

Vírus Zika (ZIKV) je arbovírus zaradený do čeľade *Flaviviridae* a rodu *Flavivirus*. Až do roku 2015 bol vírus Zika (ZIKV) považovaný za málo známy tropický vírus. Do povedomia sa dostal pre vysoký nárast prípadov mikrocefálie u novorodencov v Brazílii. Vzhľadom na šíriacu sa epidémiu ZIKV a závažnosť vrodených vývinových anomálií vyhlásila Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) 1. februára 2016 celosvetový núdzový stav, ktorý trval do novembra 2016. ZIKV však stále predstavuje globálnu hrozbu^(1,2).

História

V 40. rokoch 20. storočia prebiehal vo východnej Afrike program, ktorý bol zameraný na zvýšenie kontroly nad šírením vírusu žltej horúčky. Do ugandského lesa Zika bola umiestnená sentinelová opica druhu makak rézus (*Macaca mulatta*), u ktorej sa rozvinulo febrilné ochorenie. V roku 1947 bol v krvi tohto makaka detegovaný nový vírus. Ten dostal názov podľa oblasti, v ktorej bol prvýkrát identifikovaný – vírus Zika. Nasledujúci rok bol ZIKV izolovaný z komára *Aedes africanus*, ktorý pochádzal z rovnakej oblasti^(1,3,4).

Prvá infekcia ZIKV u ľudí bola zaznamenaná v roku 1952 počas sérologických výskumov u obyvateľov Ugandy a Tanzánie. O dva roky bol prvý ľudský ZIKV izolát získaný z 10-ročného dievčaťa z Nigérie. Počas nasledujúcich desaťročí sa tento vírus šíril Afrikou a tropickými časťami Ázie, kde sporadicky spôsoboval epidémie s podobnými príznakmi ako pri

infekcii vírusom dengue (DENV). Počas týchto období však ZIKV nebol považovaný za nebezpečný⁽⁵⁾. V Ázii bol ZIKV prvýkrát zaznamenaný v Malajzii v roku 1966, keď bol izolovaný z komára *Aedes aegypti*^(6,7).

V 50. rokoch 20. storočia bol uskutočnený experimentálny prenos ZIKV z infikovaného jedinca na komára *A. aegypti*. Po tomto úspešnom pokuse bol celosvetovo rozšírený komár *A. aegypti* označený za pravdepodobného vektora ZIKV. Prítomnosť ZIKV bola neskôr potvrdená aj pri niekoľkých ďalších druhoch komára rodu *Aedes* vrátane komára tigrovaného (*A. albopictus*)⁽¹⁾.

Prvá vážnejšia epidémia ZIKV prepukla v roku 2007 na tichomorskom ostrove Yap v Mikronézii. Epidémia trvala od apríla do júla. Zahŕňala 49 potvrdených prípadov a 59 pravdepodobných prípadov⁽⁸⁾. Po epidémii na ostrove Yap niekoľko rokov neboli zaznamenané žiadne vážnejšie epidémie ZIKV. Sporadicky boli potvrdené prípady infekcie ZIKV u turistov, ktorí cestovali do Juhovýchodnej Ázie. V októbri 2013 prepukla veľká epidémia ZIKV vo Francúzskej Polynézii. Odhaduje sa, že infekcia sa rozšírila medzi 66 % celkového obyvateľstva. Epidémia trvala do apríla 2014. Následne sa ZIKV rozšíril na ďalšie ostrovy v južnej časti Tichého oceána vrátane Novej Kaledónie, Cookových ostrovov a Veľkonočného ostrova. Na konci roku 2014 sa vírus dostal do Brazílie, kde s rozšírením infekcie ZIKV stúpol aj počet novorodencov s mikrocefáliou a počet pacientov s Guillainovým-Barrého syndrómom (GBS)⁽¹⁾.

Epidemiológia

Všeobecne platí, že ZIKV pochádza z Afriky, konkrétne z územia Ugandy. Odtiaľ sa vírus pravdepodobne rozšíril do ďalších oblastí afrického kontinentu a taktiež na ostrovy južného Pacifiku a do Juhovýchodnej Ázie⁽⁴⁾. Dôkazom je existencia dvoch geograficky izolovaných vývojových línií ZIKV. Jednou z nich je africká línia a druhou je ázijsko-americká línia, ktorá je zodpovedná za epidémie v Južnej Amerike a na tichomorských ostrovoch⁽²⁾. Odhaduje sa, že ZIKV sa dostal z Afriky do Juhovýchodnej Ázie na začiatku 20. storočia⁽¹⁾. Prostredníctvom štúdií genómu ZIKV a fylogenetických analýz bolo zistené, že kmeň vírusu, cirkulujúci v Južnej Amerike, je na viac ako 99 % identický s kmeňom, ktorý bol izolovaný počas epidémie vo Francúzskej Polynézii. Zároveň bolo zistené, že s africkým kmeňom je tento vírus identický na 89 %. Iné zdroje uvádzajú až tri samostatné vývojové línie: západoafrická, východoafrická a ázijská⁽⁹⁾. V Ugande, kde bol vírus objavený, neboli evidované choroby vyvolané ZIKV. Napriek tomu bol výskyt protilátok proti ZIKV v sére obyvateľov asi 10 – 20 %⁽³⁾. Ázijská vývojová línia vznikla následkom hromadenia mutácií v genóme africkej línie ZIKV. Tieto mutácie spôsobili zmeny v interakcii vírusu s hosťateľskými bunkami, v patogenite vírusu, v schopnosti prenosu prostredníctvom vektora, ako aj zvýšený epidemický potenciál⁽⁹⁾.

Americké Centrum pre kontrolu a prevenciu chorôb (CDC) hlásilo od decembra 2015 približne 440 000 – 1 300 000 pravdepodobných prípadov infekcie ZIKV v Brazílii, Salvádore, Venezuele, Kolumbia, Brazília, Surinam, Francúzska Guyana, Honduras, Mexiko a Panama boli od januára 2016 považované za krajiny, v ktorých pretrvávala epidémia ZIKV⁽⁸⁾. Existujú rôzne teórie, podľa ktorých vírus expandoval z ostrovov južného Pacifiku do Južnej Ameriky počas niektorých športových podujatí, a to napríklad počas majstrovstiev sveta v kanoistike 2014 v Brazílii. Na súťaži sa zúčastnili aj krajiny južného Pacifiku, kde sa vírus predtým vyskytoval. To je však zanedbateľné, pretože Brazília víta ročne okolo 6 miliónov turistov. Veľké množstvo cestujúcich otvára brány na занесenie vírusu do nových oblastí. Od 2. februára 2016 boli hlásené prípady infekcií ZIKV z mnohých krajín a ostrovov Južnej a Strednej Ameriky. Medzi ne patrili: Americká Samoa, Barbados, Bolívia, Brazília, Kolumbia, Honduras, Kostarika, Ekvádor, Salvádor, Svätý Martin, Fidži, Francúzska Guyana, Guadeloupe, Guatemala, Guyana, Haiti, Jamajka, Maldivy, Martinik, Mexiko, Nová Kaledónia, Nikaragua, Panama, Paraguaj, Portoriko, Dominikánska republika, Samoa, Surinam, Venezuela a Americké Panenské ostrovy. Prípady boli hlásené aj z Thajska a ostrovov Tonga, Vanuatu a Šalamúnových ostrovov. Neobvyklá závažnosť epidémie a vplyv na obyvateľstvo na západnej pologuli je výsledkom náhodného zavlečenia vírusu do rozsiahlej populácie bez predošlej získanej imunity^(1,8).

Na začiatku roku 2015 boli registrované prvé prípady lokálneho prenosu ZIKV prostredníctvom vektora v severovýchodnej časti Brazílie. V rovnakom čase rapídne stúpol počet novorodencov s mikrocefáliou v častiach Brazílie infikovaných ZIKV. Táto skutočnosť odhalila hrozbu vertikálneho prenosu ZIKV z matky na plod. Do februára 2016 bolo zaevidovaných viac ako 4 000 prípadov mikrocefálie u novorodencov. V súvislosti s týmto faktom prebehli retrospektívne štúdie epidémie vo Francúzskej Polynézii. Tieto štúdie ukázali rovnako zvýšený výskyt mikrocefálie u novorodencov počas epidé-

mie v rokoch 2013 a 2014. Kmeň ZIKV z Francúzskej Polynézie je geneticky najviac príbuzný kmeňom izolovaným počas epidémií na ostrove Yap v roku 2007 a v Kambodži v roku 2010. Z Francúzskej Polynézie sa vírus rozšíril aj do susedných ostrovov južnej časti Tichého oceánu – do Novej Kaledónie, Cookových ostrovov a Veľkonočných ostrovov. Vírus bol odtiaľto zavlečený taktiež do Austrálie, Japonska, Talianska a Nórska⁽³⁾. Počas vzniknutej epidémie v Južnej Amerike sa predpokladalo, že ZIKV sa rozšíri aj do Severnej Ameriky. Prvé prípady prenosu ZIKV komármi boli hlásené z Floridy v júli 2016. Do januára 2017 bolo v tejto oblasti potvrdených 211 prípadov. V novembri 2016 boli hlásené prípady lokálneho prenosu ZIKV v Texase. Do januára 2017 bolo v Texase potvrdených ďalších 5 prípadov. K 10. januáru 2017 bolo v USA zaevidovaných 37 novorodencov s vrodeným defektom a 5 potratov asociovaných so ZIKV⁽¹⁰⁾. Sú predpoklady, že ZIKV sa v nasledujúcich rokoch rozšíri na území USA. Najviac by mali byť zasiahnuté južné oblasti ako Texas a Florida vzhľadom na podnebie vhodné na šírenie vektorov⁽¹¹⁾. Avšak skúsenosti s podobnými arbovírusmi (DENV a vírus chikungunya) predpovedajú, že ZIKV sa nedokáže rozšíriť v oblastiach USA⁽¹⁾. Existuje určité riziko, že ZIKV sa bude ďalej šíriť po svete vzhľadom na rozvinutý turizmus. V Európe zatiaľ neboli známky lokálneho prenosu ZIKV vektormi. Prípady infekcie v Európe boli zaevidované u cestujúcich z krajín postihnutých epidémiou⁽⁶⁾.

Prenos, klinické príznaky a patogenéza

Rovnako ako iné arbovírusy sa i ZIKV šíri prostredníctvom vektora v džungľovom cykle, pričom človek je iba náhodným hosťateľom ZIKV. Je všeobecne známe, že džungľový cyklus je udržiavaný prostredníctvom nehumánnych primátov, ktoré slúžia ako amplifikačný hosťateľ. Podľa niektorých štúdií však ZIKV koluje aj medzi inými zvieratami, ako sú napr. kozy, slony, ovce a pod., u ktorých boli nájdené protilátky proti ZIKV⁽¹³⁾.

Najvýznamnejším vektorom ZIKV je komár *A. aegypti*. Druhým najvýznamnejším vektorom je stredomorský komár *A. albopictus*. Vírus bol detegovaný aj pri ďalších druhoch komára rodu *Aedes* vrátane *A. africanus*, *A. apicoargenteus*, *A. vitattus*, *A. furcifer*, *A. luteocephalus*, *A. hensilli*⁽⁸⁾.

Bol potvrdený aj sexuálny prenos vírusu a prenos prostredníctvom transfúzie krvi. Vírus sa taktiež môže šíriť transplantárne a infikovať plod ženy v prvom trimestri gravidity. Vírus bol doposiaľ detegovaný v krvi, moči, slinách, ejakuláte, nervovom tkanive, plodovej vode, ale aj v materskom mlieku infikovaných matiek. Po inokulácii materského mlieka na Vero bunky sa však nenašli stopy replikácie vírusu^(1,9).

V minulosti sa infekcia ZIKV prejavovala u ľudí ako mierne, spontánne odznievajúce ochorenie s príznakmi chrípky, pričom tieto príznaky sa objavili asi u 20 % infikovaných pacientov. Po nedávnych epidémiách sa však infekcia ZIKV dáva do súvislosti aj so závažnými ochoreniami vrátane multiorgánového zlyhania a trombocytopenickej purpury⁽¹²⁾.

Inkubačná lehota ochorenia sa pohybuje od 3 do 12 dní. Symptomatický priebeh infekcie môže byť sprevádzaný akútnym nástupom horúčky, makulopapulárnou vyrážkou, myalgiou, artralgiou, poruchami gastrointestinálneho traktu, bolesťami hlavy, vracaním alebo rôznymi oftalmologickými komplikáciami. Konjunktivitídu vyvoláva asi u 15 % infikovaných jedincov. Dôvodom je pravdepodobne počiatočná infek-

cia zrakového orgánu. U niektorých infikovaných jedincov sa vyskytli aj závraty, opuch, bolesť za očami, zápal dúhovky, lymfadenopatia, krv v ejakuláte, problémy so sluchom, trombocytopenia a podkožné krvácanie. Akútny syndróm vyvolaný ZIKV zvyčajne odznie po 1 – 2 týždňoch, no artralgia môže pretrvávať aj niekoľko týždňov po odznení choroby^(3,8,9,12). Takéto klinické príznaky neboli v 50. rokoch 20. storočia v Afrike evidované. Z toho vyplýva, že evolúcia ZIKV so sebou priniesla zvýšenú patogenitu⁽⁹⁾. V niektorých prípadoch môže mať infekcia ZIKV dokonca fatálne následky, a to najmä u pacientov s predošlými zdravotnými komplikáciami alebo u imunodeficientných jedincov⁽¹⁾. V porovnaní s ostatnými flavivírusmi (napr. západonílsky vírus) je ZIKV u dospelých ľudí iba zriedkavo neuroinvasívny. Sporadicky spôsobuje meningitídu alebo encefalitídu⁽¹²⁾.

Vírus možno izolovať z krvi približne 10 dní po infekcii. V 99 % prípadov vírus vymizne zhruba po 24 dňoch. V moči môže vírus zotrvať 12 alebo viac dní po infekcii, v ejakuláte aj viac ako 60 dní. Tehotenstvo môže ovplyvniť dĺžku trvania vylučovania vírusu. V jednom prípade bola žena vo viremickkej fáze minimálne 10 týždňov počas tehotenstva, no 11 dní po ukončení vírus vymizol. Protilátky proti ZIKV možno detegovať približne 9 dní po infekcii. Zatiaľ nie je známe, na aký dlhý čas sa zachováva získaná imunita proti ZIKV. Môže však byť celoživotná ako pri ostatných flavivírusoch. Komár sa stáva infekčným zhruba po 10 dňoch od bodnutia infikovaného človeka. ZIKV u komára pretrváva pravdepodobne až do smrti⁽¹⁾.

Pri bodnutí komárom ZIKV po preniknutí do kože človeka infikuje fibroblasty v podkožnom tkanive, keratinocyty a Langerhansove bunky. Tieto bunky obsahujú povrchové štruktúry, ktoré slúžia ako receptory na prichytenie viriónov ZIKV. Sú to konkrétne receptory DC-SIGN, AXL, Tyro3 a TIM-1. Infekcia ZIKV v týchto bunkách spôsobuje zvýšenie expresie mRNA pre toll-like receptor 3 (TLR3). TLR3 indukuje syntézu interferónov α a β , čím vzniká imunitná odpoveď proti vírusu⁽¹³⁾. Aby sa však ZIKV mohol v bunkách replikovať, musí túto imunitnú odpoveď zdolať. Deje sa tak prostredníctvom neštruktúrneho proteínu NS5, ktorý podporuje proteazomálnu degradáciu transkripčného faktora STAT2. Ten pôsobí ako aktivátor transkripcie génov pre interferóny⁽¹²⁾. ZIKV taktiež zvyšuje schopnosť svojej replikácie indukciou autofágie v hostiteľských bunkách. Po replikácii v kožnom tkanive sa vírus šíri prostredníctvom krvného riečiska do regionálnych lymfatických uzlín. Odtiaľto sa môže vírus rozšíriť do ďalších orgánov a tkanív, napríklad do orgánov centrálnej nervovej sústavy (CNS) a srdcového svalu^(1,13).

Mikrocefália

Počas brazílskej epidémie ZIKV sa infekcia týmto vírusom začala dávať do súvisu s mikrocefáliou. Ide o vzácnu poruchu plodu, resp. novorodenca. Je definovaná zmenšenou veľkosťou hlavy (**obrázok 1**) oproti ostatným zdravým plodom (novorodencom) rovnakého veku, pohlavia a etnika.

Mikrocefália je často spájaná s poruchami intelektu⁽¹⁵⁾. Je sprevádzaná zníženou schopnosťou učiť sa a negatívne ovplyvňuje fungovanie každodenného života. Postihnutí nie sú schopní samostatne vykonávať každodenné potreby – najesť sa, starať sa o osobnú hygienu a podobne. Majú tiež poruchy zraku a sluchu. Môže nastať oneskorenie vo vývine rečového prejavu dieťaťa a takisto v jeho pohybovom vývine.

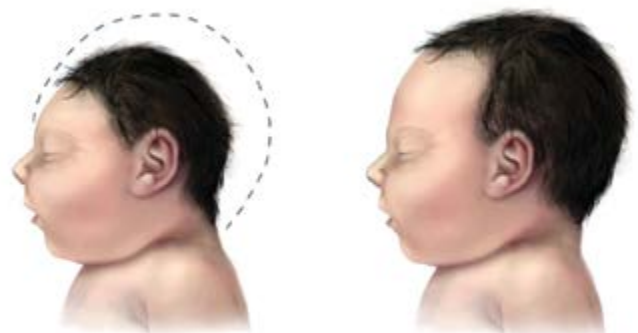
Deti s mikrocefáliou majú problémy so sedením, vstávaním a s krácaním. Stav môže byť smrteľný a tieto osoby dokážu prežiť len vďaka lekárskeму dohľadu⁽¹⁶⁾.

Existujú dva druhy mikrocefálie. Primárna mikrocefália nastáva už počas vnútro maternicového vývinu plodu, preto býva označovaná ako kongenitálna mikrocefália. Sekundárna mikrocefália sa nazýva postnatálna, pretože sa prejavuje až po narodení. Zatiaľ čo primárna mikrocefália je spôsobená úbytkom množstva neurónov produkovaných počas neurogenézy, sekundárnu mikrocefáliu podľa všetkého spôsobuje úbytok synaptických spojení a pokles vo vedení nervových vzruchov. Už v minulosti bola primárna mikrocefália asociovaná s vírusovou infekciou, konkrétne s infekciou vírusom rubeoly a cytomegalovírusom⁽³⁾.

ZIKV prioritne infikuje a poškodzuje nervové progenitorové bunky (NPC), z ktorých diferenciaciou vznikajú maturované neuróny. To môže vysvetľovať príčinu nedostatočného vývoja mozgu u novorodencov s mikrocefáliou⁽¹²⁾. Centrozomálne abnormality v infikovaných bunkách môžu byť taktiež asociované s mikrocefáliou. Centrozómy sú bunkové organely, ktoré slúžia na organizovanie mikrotubulov v živočíšnych bunkách. Majú dôležitú úlohu počas mitózy a počas vezikulárneho transportu molekúl medzi organelami. Zvýšené množstvo centrozómov môže spôsobiť poruchy mitotického delenia buniek a taktiež vyvolávať apoptózu. To môže viesť k nedostatkom počas vývoja neurónov a v konečnom dôsledku k poklesu množstva mozgového tkaniva. Zatiaľ nie je potvrdené, či ZIKV priamo ovplyvňuje vývoj centrozómov v bunke. Jedným z dôkazov by však mohla byť existencia špecifických proteínov, ktoré sa zúčastňujú na vývoji centrozómov, ale aj autofágie, do ktorej ZIKV zasahuje⁽⁴⁾. Vírusové neštruktúrne proteíny NS4A a NS4B sú inhibítormi bunkovej signálnej dráhy Akt-mTOR (**obrázok 2**). Spôsobujú tak abnormality v autofágii a smrť NPC buniek⁽¹⁷⁾.

Súvis ZIKV s mikrocefáliou podporujú laboratórne analýzy, pri ktorých bol detegovaný vírus alebo bola stanovená vírusová génová expresia v plodovej vode, alebo rôznych tkanivách plodov s mikrocefáliou. Analyzované boli tiež tkanivá detí, ktoré zomreli počas pôrodu alebo následkom potratu (**tabuľka 1**). Špecifické IgM protilátky proti ZIKV boli detegované v mozgovomiechovom moku a v sére novorodencov s mikrocefáliou. Súvis potvrdzuje aj štúdia, pri ktorej 13 z 32 novorodencov s mikrocefáliou bolo infikovaných ZIKV,

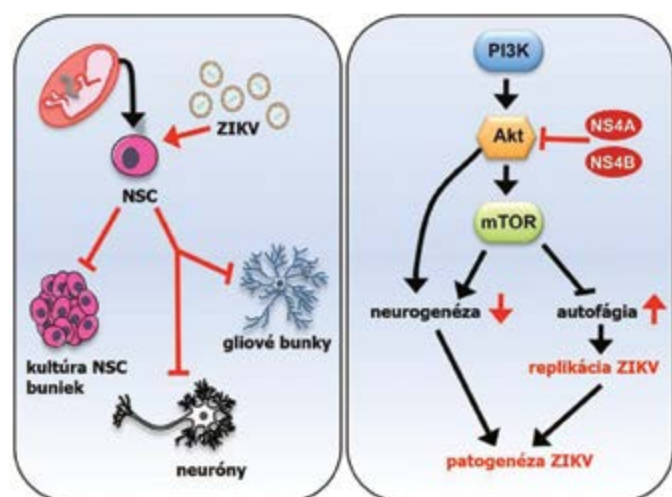
Obrázok 1. Vpravo – hlava zdravého dieťaťa, vľavo – hlava dieťaťa postihnutého mikrocefáliou⁽¹⁴⁾



príčom ani jeden zo 62 kontrolných zdravých novorodencov nebol pozitívny na ZIKV⁽³⁾.

Pokus infikovať novorodené myši senegalským izolátom ZIKV viedol k 30 % úmrtnosti. Pri ďalšom experimente boli novorodené myši infikované klinickým izolátom ZIKV z Portorika. Testované myši vykazovali vážne neurologické poruchy a stratu hmotnosti, pričom časť z nich zahynula. Ďalšia štúdia bola zameraná na infekciu 6-týždňových myší, ktorým

Obrázok 2. ZIKV infekcia NSC buniek (neural stem cells), resp. NPC buniek (neural progenitor cells), plodu vedie k inhibícii signálnej dráhy Akt-mTOR, čo má za následok prerušenie neurogenézy a indukciu autofágie⁽¹⁸⁾



chýbali tri regulačné transkripčné faktory pre interferóny. Tieto myši boli vnímavejšie na infekciu ZIKV izolátom z Kambožde. U myší nastala infekcia CNS, ktorá viedla k apoptóze NPC buniek. V inej štúdiu bol gravidným samicím myší subkutánne aplikovaný izolát ZIKV z Francúzskej Polynézie. Vírus infikoval rôzne trofoblasty, endotelové bunky placenty a napokon cez placentu infikoval hlavu plodu. Kongenitálna infekcia u imunodeficientných myší mala za následok obmedzený vnútro maternicový rast plodu a v konečnom dôsledku jeho úmrtie. Väčšina pokusov na myšiach bola opakovaná aj na nehumánnych primátoch. Infekcia gravidných samíc makaka sviňochvostého (*Macaca nemestrina*) kambodžským izolátom ZIKV mala za následok tvorbu lézií na mozgu a hypopláziu bielej hmoty⁽¹²⁾.

Guillainov-Barrého syndróm

Retrospektívne štúdie udávajú 20násobný nárast prípadov GBS vo Francúzskej Polynézii počas rokov 2013 a 2014. Ochorenie sa dáva do súvisu práve s epidémiou ZIKV, ktorá v týchto rokoch na ostrove prepukla. Ide o autoimunitné ochorenie, pri ktorom imunitné bunky napádajú periférny nervový systém. To má za následok trpnutie, svalové ochabnutie, paralýzu či dokonca smrť. GBS bol v minulosti asociovaný s infekciami DENV a vírusom chikungunya. Počas nedávnej epidémie ZIKV v Severnej a Južnej Amerike bol taktiež zaznamenaný zvýšený počet prípadov GBS. Štúdia na pacientoch s GBS potvrdila výskyt anti-ZIKV IgM alebo IgG protilátok u 41 zo 42 pacientov s GBS⁽³⁾. V Kolumbii sa počas epidémie ZIKV výskyt prípadov GBS strojnásobil oproti

Tabuľka 1. Zhrnutie zaznamenaných prípadov asociácie ZIKV so zdravotnými komplikáciami⁽⁹⁾

Krajina	Rok	Počet pacientov	Symptómy	Skúmaná vzorka	Metóda detekcie ZIKV
Slovinsko	2015	1	PM	mozgové tkanivo plodu	qRT-PCR
Havaj	2015	1	PM	skúmaná vzorka neuvedená	laboratórne potvrdené (metóda neuvedená)
Brazília	2015	2	PM	mozgové tkanivo plodu	RT-PCR, anti-ZIKV ELISA
Brazília	2015	2	PM	plodová voda	qRT-PCR, ZIKV sekvenovanie
Brazília	2015	1	PM	tkanivo a krv plodu	molekulárno-biologická metóda (bližšie neopísaná)
Brazília	2015	2	potrat	tkanivo placenty	RT-PCR, anti-ZIKV ELISA
Brazília	2015	1	PM	mozgová kôra, predĺžená miecha a mozgovomiechový mok plodu, plodová voda	qPCR
Brazília	2015	12	PM	mozgovomiechový mok plodu	anti-ZIKV IgM ELISA
Brazília	2015 – 2016	12	abnormality plodu	moč a/alebo krv matky	qRT-PCR
Brazília	2016	1	PM	mozgové tkanivo plodu, plodové obaly, placenta, pupočník	qRT-PCR
Francúzska Polynézia	2013	1	GBS	sérum	anti-ZIKV IgG ELISA, PRNT
Francúzska Polynézia	2013 – 2014	42	GBS	sérum	VNT, anti-ZIKV IgG/IgM ELISA
Martinik	2015	2	GBS	moč	RT-PCR
Brazília	2015	7	GBS	skúmaná vzorka neuvedená	laboratórne potvrdené (metóda neuvedená)
Brazília	2015	4	GBS	sérum alebo mozgovomiechový mok	RT-PCR a/alebo anti-ZIKV IgM ELISA
Surinam	2015	2	GBS	skúmaná vzorka neuvedená	RT-PCR
Portoriko	2015 – 2016	5	GBS	sérum	RT-PCR a/alebo anti-ZIKV IgM ELISA
Venezuela	2016	6	GBS	skúmaná vzorka neuvedená	RT-PCR
Venezuela	2016	1	GBS	sérum, mozgovomiechový mok	qRT-PCR

Skratky: ELISA – enzýmová imunoabsorbentová analýza; GBS – Guillainov-Barrého syndróm; Ig – imunoglobulín; PM – prenatálna mikrocefália; PRNT – plak-redukčný neutralizačný test; RT-PCR – polymerázová reťazová reakcia s reverznou transkripciou; qRT-PCR – kvantitatívna RT-PCR; VNT – vírus neutralizačný test; ZIKV – vírus Zika

počiatočnému výskytu ochorenia. Vo Venezuele bol taktiež zaznamenaný súvis GBS s epidémiou ZIKV.

Doposiaľ nebol opísaný presný mechanizmus, akým ZIKV vyvoláva GBS. Predpokladá sa však, že opakované arbovírusové infekcie dráždia imunitný systém a spúšťajú imunopatologické procesy, ktoré atakujú periférne nervy⁽¹⁹⁾. Existuje niekoľko hypotéz, ktoré vysvetľujú mechanizmus vzniku GBS, zapríčineného infekciou ZIKV. Jedna z nich sa opiera o autoimunitnú reakciu mechanizmom molekulárnych mimikry. Polyproteín ZIKV totiž pripomína proteíny asociované s myelinizáciou, funkciou axónov a vývojom nervov. Neutralizačné protilátky proti ZIKV môžu teda vykazovať skríženú reaktivitu s proteínmi periférnych nervov, čo môže viesť k ničeniu nervových spojov imunitným systémom. Ďalším mechanizmom vzniku GBS je protilátkami zosilnená infekcia (*antibody-mediated enhancement*, ADE) ZIKV. Takýto fenomén môže nastať po predošlej infekcii iným flavivírusom, napríklad DENV. Napriek takmer 40 % genetickej odlišnosti vykazujú protilátky proti DENV a protilátky proti ZIKV skříženú reaktivitu⁽²⁰⁾. Vo všeobecnosti sa protilátky naviažu na vírusové častice, a tým ich neutralizujú, čo ma za následok ich rozpoznanie a pohltenie fagocytmi⁽²¹⁾. Pri ADE sa však protilátky iba čiastočne naviažu na virióny ZIKV, čo sprostredkuje endocytózu prostredníctvom Fc-receptora do dendritových buniek, monocytov alebo makrofágov. Vírus je následne schopný replikovať sa vnútri týchto buniek, čo vedie k zvýšenej produkcii vírusových častíc⁽²²⁾. V endemických oblastiach DENV, v ktorých bola zaznamenaná taktiež epidémia ZIKV, predošlá infekcia DENV môže u pacienta takýmto mechanizmom zosilniť replikáciu ZIKV. Ďalší hypotetický mechanizmus môže zahŕňať imunitnú odpoveď T-lymfocytov, spúšťanú ZIKV. T-lymfocyty môžu v tomto prípade zacieliť neurálne, axonálne a myelínové antigény aj antigény Schwannových buniek. Táto hypotéza vychádza z nálezu perineurálnych infiltrátov T-lymfocytov v nervovom tkanive počas autopsie jedincov s GBS. Štvrtým možným mechanizmom vzniku GBS je priamy efekt vírusovej infekcie na bunky periférneho nervového systému. Infekcia môže viesť k akútnej motorickej axonálnej neuropatii (AMAN) alebo k akútnej zápalovej demyelinizačnej polyradikuloneuropatii (AIDP)⁽²⁰⁾.

Ďalšie neurologické ochorenia, asociované s vírusom Zika

Okrem mikrocefálie a GBS sú so ZIKV spájané ďalšie neurologické ochorenia. Ich súvis s vírusovou infekciou je však diskutabilný, pretože je doložený iba 1-2 prípadmi. U 81-ročného muža infikovaného ZIKV sa po 10 dňoch od príchodu z Novej Kaledónie prejavila vysoká horúčka a strata vedomia. Tieto symptómy a snímky z magnetickej rezonancie naznačovali meningoencefalitídu. ZIKV bol potvrdený pomocou polymerázovej reťazovej reakcie s reverznou transkripciou (RT-PCR), ale aj kultivačným vyšetrením mozgovomiechového moku. Bol opísaný aj prípad fatálnej meningoencefalitídy u pacienta infikovaného ZIKV, ktorému boli podané imunosupresíva po transplantácii srdca. Infekcia ZIKV bola potvrdená pomocou RT-PCR, imunohistochemickým vyšetrením, imu-

nofluorescenciou a elektrónovou mikroskopiou mozgového parenchýmu a mozgovomiechového moku. Pätnásťročnému dievčaťu z Guadeloupe lekári diagnostikovali akútnu myelitídu 7 dní po expozícii ZIKV. Prítomnosť vírusovej RNA bola potvrdená metódou RT-PCR v mozgovomiechovom moku, v sére a v moči. Prítomnosť ZIKV v mozgovomiechovom moku poukazuje na skutočnosť, že vírus je vysokoneurotropný⁽²³⁾. Je pravdepodobné, že s pokrokom vo výskume budú známe ďalšie neurologické, ale aj iné ochorenia asociované so ZIKV⁽³⁾.

Profylaxia a terapia

Napriek tomu, že symptomatická infekcia ZIKV má väčšinou ľahký priebeh, pacienti by mali byť monitorovaní vzhľadom na možné nebezpečenstvo koagulopatie a zlyhania orgánov. Zatiaľ neexistuje žiadne ciele antivirotoikum proti tomuto vírusu. V symptomatických prípadoch sa využíva iba symptomatická liečba (napr. antipyretiká alebo antihistaminiká). Neodporúča sa aplikovať nesteroidné antiflogistiká a aspirín pre nebezpečenstvo krvácania⁽⁶⁾.

Najväčšou výzvou je v súčasnosti vývoj efektívnej vakcíny proti ZIKV. Vývoj vakcín proti flavivírusom je limitovaný povahou epidémií, ktoré sú sporadické a nepredvídateľné. To je hlavnou prekážkou aj pri rapídnom vývoji vakcín s cieľom zabrániť šíreniu ZIKV. Preventívne očkovanie obyvateľstva na zabránenie vzniku epidémie sa navyše môže javiť ako neprímerane drahé. Začiatkom roka 2016 sa objavili správy o tom, že istá indická biotechnologická spoločnosť ohlásila vývoj dvoch kandidátskych vakcín, ktoré čakali na predklinické skúšky⁽⁹⁾. Americká spoločnosť SynCon Pharmaceuticals vyvinula DNA vakcínu proti ZIKV, ktorá mala podstúpiť prvú fázu klinických štúdií do konca roka 2016. DNA vakcínu a živú atenuovanú vakcínu vyvinuli v americkom Národnom inštitúte pre alergie a infekčné choroby (NIAID). V súčasnosti prebiehajú klinické štúdie týchto vakcín. Vedci NIAID pracujú aj na vývoji mRNA vakcín, ktoré mali vstúpiť do klinických štúdií koncom roka 2017^(13,24).

Pre *in vitro* výskum cielej antivírusovej liečby ZIKV boli pripravené ľudské NPC bunky. Vzhľadom na príbuznosť ZIKV a DENV by mohlo byť mnoho poznatkov o DENV aplikovaných aj pri vývoji antivirotoika proti ZIKV. Najpodstatnejšou úlohou by však mal byť výskum cielej liečby pre infikované tehotné ženy⁽⁹⁾.

Medzi preventívnymi opatreniami nesmie chýbať dohľad nad vektormi. V oblastiach výskytu ZIKV je dôležitá ochrana pred uštipnutím komárom. Ľudia, ktorí cestovali do oblastí, zamorených ZIKV, by mali zvážiť darovanie krvi⁽⁶⁾. Muži, ktorí cestovali do oblastí s výskytom ZIKV, by sa mali vyvarovať nechráneného pohlavného styku s tehotnou partnerkou. Cestujúcim z týchto krajín, ktorí nevykazujú žiadne známky ochorenia, sa odporúča používať antikoncepciu 28 dní od návratu. V oblastiach s lokálnym výskytom ZIKV poskytujú zdravotnícke orgány prístup k antikoncepcii, predpôrodnej starostlivosti a v prípade komplikácií k vykonaniu bezpečnej interrupcie⁽⁹⁾.

LITERATÚRA

1. Lessler J, Chaisson LH, Kucirka LM, et al. Assessing the global threat from Zika virus. *Science* 2016; 353(6300): aaf8160.
2. Mlacker S, Shafa G, Aldahan AS, et al. Origin of the Zika virus revealed: a historical journey across the world. *Int J Dermatol* 2016; 55(12): 1369-1372.
3. Song BH, Yun SI, Woolley M, et al. Zika virus: History, epidemiology, transmission and clinical presentation. *J Neuroimmunol* 2017; 308: 50-64.
4. Chang C, Ortiz K, Ansari A, et al. The Zika outbreak of the 21st century. *J Autoimmun* 2016; 68: 1-13.
5. Shragai T, Tesla B, Murdock C, et al. Zika and chikungunya: mosquito-borne viruses in a changing world. *Ann N Y Acad Sci* 2017; 1399(1): 61-77.
6. Sharma S, Tandel K, Dash PK, et al. Zika virus: A public health threat. *J Med Virol* 2017; 89(10): 1693-1699.
7. Teng Y, Bi D, Xie G, et al. Model-informed risk assessment for Zika virus outbreaks in the Asia-Pacific regions. *J Infect* 2017; 74(5): 484-491.
8. Demir T, Kilic S. Zika virus: a new arboviral public health problem. *Folia Microbiol* 2016; 61(6): 523-527.
9. Shrama A, Lal SK. Zika Virus: Transmission, Detection, Control, and Prevention. *Front Microbiol* 2017; 8: 110.
10. Yun SI, Lee YM. Zika virus: An emerging flavivirus. *J Microbiol* 2017; 55(3): 204-219.
11. Valentine G, Marquez L, Pammi M. Zika virus epidemic: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2016; 14(12): 1127-1138.
12. Miner JJ, Diamond MS. Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. *Cell Host Microbe* 2017; 21(2): 134-142.
13. Aziz H, Zia A, Anwer A, et al. Zika Virus: Global Health Challenge, threat and current situation. *J Med Virol* 2016; 89(6): 943-951.
14. <https://en.wikipedia.org/wiki/Microcephaly>
15. Wu J, Huang DY, Ma JT, et al. Available Evidence of Association between Zika Virus and Microcephaly. *Chin Med J* 2016; 129(19): 2347-2356.
16. Rather IA, Lone JB, Bajpai VK, et al. Zika Virus Infection during Pregnancy and Congenital Abnormalities. *Front Microbiol* 2017; 8: 581.
17. Souza BSF, Sampaio GLA, Pereira CS, et al. Zika virus infection induces mitosis abnormalities and apoptotic cell death of human neural progenitor cells. *Sci Rep* 2016; 6: 39775.
18. Liang Q, Luo Z, Zeng J, et al. Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Downregulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. *Cell Stem Cell* 2016; 19(5): 663-671.
19. Blázquez AB, Saiz JC. Neurological manifestations of Zika virus infection. *World J Virol* 2016; 5(4): 135-143.
20. Muñoz LS, Barreras P, Pardo CA. Zika Virus-Associated Neurological Disease in the Adult: Guillain-Barré Syndrome, Encephalitis and Myelitis. *Semin Reprod Med* 2016; 34(5): 273-279.
21. Tsunoda I, Omura S, Sato F, et al. Neuropathogenesis of Zika Virus Infection: Potential Roles of Antibody-Mediated Pathology. *Acta Med Kinki Univ* 2016; 41(2): 37-52.
22. Vatti A, Monsalve DM, Pacheco Y, et al. Original antigenic sin: A comprehensive review. *J Autoimmun* 2017; 83: 12-21.
23. Russo FB, Jungmann P, Beltrão-Braga PCB. Zika infection and the development of neurological defects. *Cell Microbiol* 2017; 19(6): e12744.
24. <https://www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/zika-vaccines>



RNDr. Katarína Briestenská

Univerzita Komenského v Bratislave
Prírodovedecká fakulta
Katedra mikrobiológie a virológie
Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava
e-mail: briestensk10@uniba.sk

GUTTA

GUTTA Slovakia spol. s r. o. je obchodná spoločnosť zameraná na distribúciu, prenájom a servis špeciálnej zdravotníckej techniky a materiálu. Patrí jej popredné miesto v oblasti denzitometrie, mamografie a laboratórnej diagnostike na slovenskom, českom a maďarskom trhu.

UZATVORENÉ/VÁKUOVÉ
ODBEROVÉ SYSTÉMY

VACUSERA® vákuový systém na odber krvi a moču, odberové ihly, systém najvyššej kvality s vysokou úrovňou bezpečnosti.

BIOPTICKÝ SPOTREBNÝ
MATERIÁL

VIGEO produktová rada predstavuje riešenia pre oblasť intervenčnej rádiológie, urológie, onkológie, starostlivosti o prsia, hematológie a iné.



LASEROVÁ ABLÁCIA

ECHOLASER je unikátny systém na perkutánnu alebo endoskopickú laserovú abláciu nádorov plne integrovateľný na ultrazukové systémy (prípadne MR), aktuálne používaný na pečeň, pľúca, prostatu alebo prsia.

Diagnostika cystickej fibrózy so zameraním na molekulárnogenetickú analýzu CFTR génu

Mária Giertlová, Adriana Šprincová

Lekárska genetika, Medirex, a. s., Košice

Cystická fibróza (CF) je ako jedno z najčastejších závažných geneticky podmienených ochorení odôvodnene objektom výskumu s neustálym rozvojom diagnostiky a liečby. Najvýznamnejším pokrokom v starostlivosti o CF pacientov za posledných desať rokov je včasné zachytenie ochorenia už v novorodeneckom veku vďaka plošnému zavedeniu novorodeneckého skríningu. Genetická diagnostika umožnila navyše rozvoj špecifickej terapie viazanej na konkrétne mutácie.

Kľúčové slová: CFTR, cystická fibróza, molekulárna diagnostika, novorodenecký skríning, IRT, imunoreaktívny trypsinogén

Trends in cystic fibrosis diagnostic with focus on the molecular analysis of CFTR gene

Cystic fibrosis (CF), one of the most frequent genetic diseases, is rationally the subject of research resulting in permanent improvement in diagnostic and therapy. In the last decade, the most important improvement in clinical management of CF patients has been the early diagnosis in newborns by extensive newborn screening in many countries. In addition, routine genetic diagnostics allows development and implementation of mutation-specific therapy.

Keywords: CFTR, cystic fibrosis, molecular diagnostics, newborn screening, IRT, immunoreactive trypsinogen.

NewsLab, 2018; roč. 9 (2): 98 – 101

Prvé historické zmienky o tomto ochorení siahajú do stredoveku, keď sa slaný pot u detí spájal s poruchami pankreasu a rizikom včasného úmrtia a tieto deti boli považované za obeť bosoráctva. Exaktný medicínsky pohľad na cystickú fibrózu medzi prvými priniesla americká patologička a pediatrička Dorothy Andersenová v roku 1938, keď opísala toto ochorenie v pitevnom náleze ako „cystickú fibrózu pankreasu“. Pre diagnostiku CF bol dôležitý objav zvýšenej koncentrácie chloridov v pote Paulom di Sant' Agnesom, ktorý sa stal základom dodnes používaného potného testu zavedeného v roku 1953.

O desať rokov sa Dr. Andersenová podieľala aj na vývoji potného testu, ktorý má odvtedy nezastupiteľné miesto v diagnostike CF. Ďalšími významnými míľnikmi bola identifikácia poruchy chloridového kanála ako základného patofyziologického mechanizmu (1983) a následne objav CFTR génu (1989). Odvtedy sa diagnostika a klinický manažment CF rozvíja míľovými krokmi, čo sa odrazilo na výraznom zlepšení kvality a predĺžení života. Medián veku vo vyspelých krajinách aktuálne dosahuje 37 rokov⁽¹⁾.

Novorodenecký skríning CF na Slovensku

Skríning cystickej fibrózy sa na Slovensku zaviedol od 1. 9. 2009. Princípom metódy je stanovenie imunoreaktívneho trypsinogénu (IRT) v suchej kvapke krvi podľa algoritmu IRT/IRT, teda dvojstupňového stanovovania hladiny IRT. Trypsinogén je pankreatický proteín – neaktívny prekurzor trypsinu, ktorý sa v dôsledku obštrukcie pankreatických kanálikov pri CF dostáva do krvného obehu. Hraničný limit (cut-off) pre prvý odber (IRT/1) vo vzorke odobratej v 72. – 96. hodine života je 70 ng/ml (99. percentil) a pre druhý odber (IRT/2) medzi 14. – 21. dňom života hodnota 60 ng/ml. Pri celoplošnom novorodeneckom skríningu CF musí byť zohľadňovaný aj

etnický pôvod dieťaťa. Skúsenosti z národného referenčného skríningového centra preukázali, že novorodenci rómskeho etnika majú často falošne pozitívne výsledky skríningu a signifikantne vyššie hladiny IRT (až o 34 %) v porovnaní s majoritnou populáciou. Pre rómske etnikum sa preto zvýšila hraničná hodnota IRT/1 na 84 ng/ml a IRT/2 na 72 ng/ml⁽⁴⁾. Podobná situácia je dokumentovaná v USA u detí afro-američanov.

Celosvetovo sa pri skríningu cystickej fibrózy uvádza falošná negativita 5 až 9 %^(2,3), preto pri zodpovedajúcom klinickým náleze je potrebné zvážiť možnosť CF aj u detí, ktoré absolvovali novorodenecký skríning s negatívnym výsledkom. Nešpecifické zvýšenie hladiny IRT je opísané u novorodencov s perinatálnou asfyxiou a môže viesť k falošnej pozitivite.

Vďaka novorodeneckému skríningu sa priemerný vek pri diagnostike ochorenia znížil na 6 až 8 týždňov oproti 14 mesiacom pred zavedením skríningu⁽³⁾. Identifikácia pacientov s CF novorodeneckým skríningom a skorá liečba vedú k významne lepšej prognóze.

Klinické prejavy cystickej fibrózy

CF je multiorgánové ochorenie, príznaky ochorenia môžu byť u každého pacienta vyjadrené v rôznej intenzite a postihovať rozličné orgány. V novorodeneckom veku je asi u 1/5 detí s CF prítomný tzv. mekóniový ileus. Typické sinopulmonálne príznaky sú chronická rinosínusitída, nosná polypóza, atelektázy, bronchiektázie, paličkovité prsty, perzistujúce infekcie patogénmi typickými pre CF a pľúcne mykobakteriázy, pneumotorax, hemoptýza a alergická bronchopulmonálna aspergilóza. Z prejavov mimo respiračného traktu potom dominujú poruchy tráviaceho traktu: mekóniový ileus, insuficiencia exokrinného pankreasu a recidivujúce pankreatitídy, diabetes mellitus, gastroezofágový reflux, syndróm obštrukcie distálneho čreva, biliárna cirhóza až cirhóza pečene,

cholelitiáza, malnutrícia, metabolická kostná choroba a deficit vitamínov rozpustných v tukoch (A, D, E, K). Abnormality v mineralograme a acidobázickej rovnováhe sú dôležitými príznakmi CF. Pri akútnej hyponatriemickej dehydratácii dochádza k anorexii, vracaniu, hmotnostnému úbytku s rizikom rozvoja poruchy vedomia a kŕčov. Chronická metabolická alkalóza s hypokaliémiou bola opísaná u dospelého pacienta ako prvý príznak cystickej fibrózy⁽⁵⁾.

Diagnostika CF

Pri klinickej suspekcii alebo pozitívnom/hraničom výsledku novorodeneckého skríningu je indikovaný potný test. Tento test je založený na stanovení koncentrácie chloridov v pote pilokarpínovou ionoforézou a má senzitivitu asi 95 %. Hodnoty nad 60 mmol/l sú diagnostické pre CF, hodnoty 30 – 59 mmol/l sú označované ako hraničné a diagnóza CF je možná, pri hodnotách pod 30 mmol/l je CF nepravdepodobná. Test a jeho laboratórne vyhodnotenie musia prebiehať podľa stanovených minimálnych štandardov⁽¹⁾. Následne je indikované molekulárno-genetické vyšetrenie *CFTR* génu, štandardne sa v prvom kroku vyšetruje panel mutácií najčastejších v danej populácii (**tabuľka 1**).

Ochorenia príbuzné *CFTR*

Klinické jednotky s dysfunkciou *CFTR*, ktoré nespĺňajú klinické kritériá pre cystickú fibrózu, sú súhrnne označované ako poruchy príbuzné *CFTR* (*CFTR*-related disorders, *CFTR*-Rds)⁽⁶⁾. Podľa aktuálne platných odporúčaní Nadácie pre cystickú fibrózu (Cystic Fibrosis Foundation) z roku 2017 sú definované tri poruchy príbuzné *CFTR*: rekurentná pankreatitída, kongenitálna bilaterálna agenéza vas deferens (CBAVD) a chronické získané bronchiectázie⁽⁷⁾.

Pre prípady pozitívneho novorodeneckého skríningu a intermediárnych hodnôt potného testu sa v USA používa pojem metabolický syndróm príbuzný *CFTR* (CF transmembrane conductance regulator-related metabolic syndrome, CRMS), ktorý sa prekrýva s jednotkou pozitívny skrínung CF, nejednoznačná diagnóza (CF screen positive, inconclusive diagnosis, CFSPID), používanou v ostatných krajinách. U väčšiny detí s poruchami príbuznými *CFTR* sa v prvých rokoch života nerozvinie obraz cystickej fibrózy. V malej časti sa však rozvíja CF a zatiaľ nie sú dostupné údaje o dlhodobej prognóze týchto pacientov^(8,9).

CFTR-Rds a CRMS/CFSPID nahrádzajú nejasné označenia atypická, neklasická alebo neskorá CF používané v minulosti.

Gén *CFTR*

Gén zodpovedný za CF je označovaný ako *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). Je lokalizovaný na 7q31.2, dlhý 250 kb, zložený z 27 exónov dlhých 38 bp až 724 bp⁽¹⁰⁾. Gén kóduje mRNA dlhú 6,5 kb, ktorá je prepisovaná do polypeptidu zloženého z 1 480 aminokyselín.

Proteín *CFTR*, štruktúra a funkcia

Za fyziologických okolností je *CFTR* transmembránový proteín fungujúci ako chloridový kanál s regulačnou funkciou pre niektoré ďalšie iónové kanály. Je zložený z piatich funkčných domén, a to z dvoch transmembránových domén TMD1 a TMD2, dvoch domén NBD1 a NBD2 viažucich ATP a jednej veľkej regulačnej domény R, ktorá spája obe polovice polypeptidu. Proteín *CFTR* je zakotvený v lipidickej dvojvrstve sekretorických buniek, orientovaný je do cytoplazmy (**obrázok 1**).

Varianty v géne *CFTR*

V súčasnosti je opísaných takmer 2 000 variantov v géne *CFTR*, z toho viac než 1 200 patogénnych. Databáza Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium Database CFGAC (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>) obsahuje aktuálny stav variantov *CFTR*. Jednoznačná väčšina variantov je veľmi zriedkavá a ich výskyt je obmedzený na malé izolované populácie. Len 30 variantov v géne *CFTR* sa vyskytuje s podielom viac než 0,1 %.

Najčastejším variantom v géne *CFTR* a prvým identifikovaným⁽¹²⁾ je F508del (označovaný aj ako delta-F508, skrátene ΔF508). Je spôsobený deléciou troch báz v 11. exóne génu *CFTR*, čoho dôsledkom je strata jednej aminokyseliny – fenylalanínu v proteíne *CFTR* na pozícii 508. Výsledný proteín je nefunkčný. Podiel tohto variantu predstavuje na Slovensku od 59,4 do 66,8 %⁽¹³⁾.

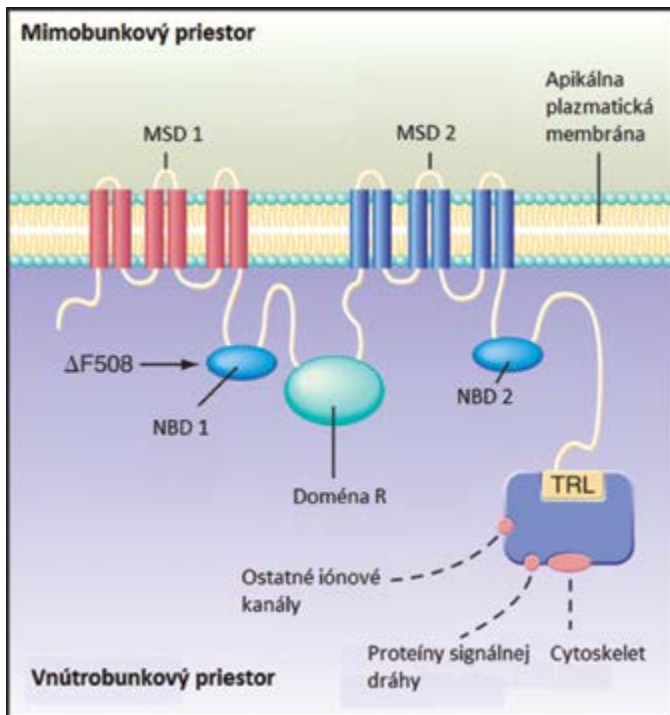
Molekulárna patológia

Zastúpenie rôznych variantov v jednotlivých funkčných doménach *CFTR* je nerovnomerné. Zvýšené množstvo variantov bolo pozorované v doméne R a NBD1. Rôzne typy variantov majú rôzny efekt na priebeh ochorenia. Dôsledkom

Tabuľka 1. Vyšetrované varianty v *CFTR* géne

3120+1G>A	711+1G>T	621+1G>T	1717-1G>A	CFTRdele2,3(21 kb)
3849+10kbC>T	2789+5G>A	1898+1G>A	G542X	G85E
Y1092X(C>A)	G551D	R553X	3659delC	N1303K
R560T	R117H	R1162X	L1077P	R117C
R1066C	L1065P	W1282X	R347H	R347P
I507del	T338I	F508del	I336K	1677delTA
R334W	3272-26 A>G	1078delT 31	2183AA>G	2184insA
2143delT	5 T (9-13TG), 7 T, 9 T	M1V	P5L2	CFTR-dele22
Q39X	Dele17a_18	S549R	Q552X	852del22
CFTRdele1	D110E	R1066H	D110H	G1244E
c.1584+18672 A>G	1259insA	D1152H	2184delA	711+5G->A
R352Q	R1158X	G178R	D579G	E585X
1898+3 A->G	CFTRdele22,23	4382delA	4016insT	Dele14b_17b
Dele2ins182	Dele22_24	G1349D		

Obrázok 1. Štruktúra CFTR. Mechanizmus funkcie CFTR kanálu je založený na fosforylácii R domény, čím sa stimuluje interakcia ATP s NBD doménami. Po hydrolýze ATP sa vytvorí dimér z NBD domén, čím sa zmení konformácia TMD domén a dôjde k otvoreniu kanála.



(MSD – membrane-spanning domain; NBD – nucleotide-binding domain). Zdroj: *The New England Journal of Medicine*⁽¹¹⁾

širokej škály variantov v géne *CFTR* je veľká fenotypová variabilita CF, ku ktorej prispieva aj vplyv vonkajšieho prostredia a genetického pozadia jedinca.

Mechanizmy vplyvu rôznych variantov na funkčnosť proteínu CFTR môžeme rozdeliť do 5 skupín:

1. Netvorí sa žiaden proteín CFTR alebo len zanedbateľné množstvo z dôvodu predčasnej terminácie translácie z dôvodu predčasných stop kodónov: napr. G542X, 621+1G>T, 390insT.
2. Poruchy posttranslačných úprav, v ktorých dôsledku dochádza k predčasnej degradácii polypeptidov: napr. F508del, N1303K, I507del.
3. Poruchy v regulácii spôsobené konformačnými zmenami proteínu CFTR: napr. G551D, G551S, S1255P.
4. Porucha vodivosti chloridového kanála: napr. R117H, R334W, R347P.
5. Znížená hladina transkriptu mRNA a následne aj proteínu: napr. 3849+10kbC>T, 1811+1,6kbA>C.

LITERATÚRA

1. Castellania C, Duff AJA, Belle SC, et al. ECFS best practice guidelines: the 2018 revision. *J Cyst Fibros* 2018; 17: 153-178.
2. Dluholucký S, Knapková M. Ročná správa novorodeneckého skríningu za rok 2013. *Monitor medicíny SLS* 2014; (3-4): 20-24.
3. Lysinová M, Knapková M, Dluholucký S. Novorodenecký skrínning v súčasnosti. *Pediatr prax* 2015; 16(5): 188-191.
4. Urbanová V, Feketeová A, Podracká L. Pseudo-Bartterov syndróm ako prvý prejav cystickej fibrózy. *Čes-slov Pediatr* 2015; 70(1): 33-36.

Molekulárno-genetická analýza génu *CFTR*

Molekulovo-genetická analýza sa realizuje zo vzorky periférnej krvi odobratej do sterilnej skúmavky s EDTA. Molekulárna diagnostika CF je založená na identifikácii kauzálnych variantov, ale existencia takmer 2 000 variantov rozptýlených po celom géne *CFTR* môže spôsobiť falošne negatívny výsledok. Metódou multiplexnej alelovo špecifickej PCR sa vyšetruje 67 variantov v *CFTR* géne, ktoré predstavujú v našej populácii viac ako 90 % všetkých CF variantov (**tabuľka 1**).

Na analýzu celého génu *CFTR* sa využívajú metódy ako dHPLC (denaturing high performance liquid chromatography), HRM (high resolution melting) alebo celogénové sekvenovanie.

Indikácie na testovanie *CFTR* génu

Indikácie na molekulárnogenetickú analýzu *CFTR* génu^(upravené podľa 14):

1. Diagnostické testovanie pri typických prejavoch CF, pri atypických klinických prejavoch a/alebo hraničných hodnotách potného testu, pri mužskej infertilite s CBAVD a pri ostatných *CFTR*-RDs u dospelých.
2. Prenatálna diagnostika (napr. v prípade nosičstva mutácií *CFTR*, pri gravidite s verifikovanou CF u jedného z rodičov alebo u plodu s hyperechogénnym črevom a/alebo dilatáciou črevných kľučiek).
3. Testovanie nosičstva pre CF u jedincov s pozitívnou rodinnou anamnézou. V niektorých krajinách je testovanie nosičstva pre CF zavedené aj u jedincov bez pozitívnej rodinnej anamnézy v rámci vyšetrovania nosičstva pre najčastejšie genetické ochorenia alebo u neplodných párov (neplatí pre SR).

Záver

Genetika v súčasnej dobe predstavuje odbor, ktorý výrazne mení náš pohľad na patofyziológiu ochorení. Cystická fibróza, ako relatívne časté ochorenie, je veľmi podrobne preštudovaná z molekulovo-genetického pohľadu. Od samotného potvrdenia klinickej diagnózy sa dostávame k novorodeneckému skríningu, prenatálnej diagnostike, určovania nosičstva u asymptomatických jedincov, či predimplantačnej diagnostike embryí. Navyše, určenie prítomnosti konkrétnych mutácií nám umožňuje zvoliť najefektívnejšiu liečbu. Cystická fibróza sa takto stáva modelovým ochorením a ukazuje nám potenciál genetickej diagnostiky aj u menej častých monogénových ochorení.

5. Fila L. Cystická fibróza u dospelých. *Interní Med* 2014; 16(2): 54-60.
6. Bombieri C, Claustres M, De Boeck K, et al. Recommendations for the classification of diseases as *CFTR*-related disorders. *J Cyst Fibros* 2011; 10: S86-S102.
7. Farrell PM, Terry B. White, et al. Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. *J Pediatr* 2017; 181S: S4-15.

8. Ren CL, Borowitz DS, Gonska T. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-Related Metabolic Syndrome and Cystic Fibrosis Screen Positive, Inconclusive Diagnosis. *J Pediatr* 2017; 181: S45-S51.
9. De Boeck K, Vermeulen F, Dupont L. The diagnosis of cystic fibrosis. *Presse Med* 2017; 46: e97-e108.
10. Zielanski J, Bozon D, Kerem BS, et al. Identification of mutations in exons 1 through 8 of the Cystic Transmembrane Conductance Regulator (*CFTR*) gene. *Genomics* 1991; 10: 229-235.
11. Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Cystic Fibrosis. *The New England Journal of Medicine* 2005; 352: 1992-2001.

12. Kerem BS, Rommens JM, Buchanan JA et al. Identification of the cystic fibrosis gene: Genetic analysis. *Science* 1989; 245: 1073-1080.
13. Kádasi L, Poláková H, Začková A, et al. Distribution of 9 common mutations in the *CFTR* gene in Slovak cystic fibrosis patients. *Gene Geogr* 1997; 11: 51-56.
14. Dequeker E, Stuhmann M, Morris MA, et al. Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and *CFTR*-related disorders – updated European recommendations. *European Journal of Human Genetics* 2009; 17: 51-65.



MUDr. Mária Giertlová, PhD.
Lekárska genetika, Medirex, a. s.
Magnezitárska 2/C, 040 13 Košice
e-mail: maria.giertlova@medirex.sk

DYNEX = KOMPLETNÍ ŘEŠENÍ



Reagencie

Včetně diagnostických souprav pro detekci patogenů a genetické testování

- ◆ DNA, RNA a proteinové technologie
- ◆ PCR technologie
- ◆ Epigenetická analýza
- ◆ Reagencie pro NGS aplikace

Přístroje

- ◆ Biohazardní a laminární boxy
- ◆ Malé laboratorní přístroje
- ◆ Izolační a pipetovací automaty
- ◆ PCR cykly

Služby

- ◆ Aplikační podpora a servis přístrojů
- ◆ Akreditovaná kalibrační laboratoř pipet
- ◆ Demo laboratoř pro molekulárně biologické metody
- ◆ Zkušební laboratoř DYNEX akreditovaná ČIA pro laminární boxy



DYNEX
 ČR: Lidická 977, 273 43 Buštěhrad, Česká republika
 Tel.: +420 220 303 600, e-mail: office@dynex.cz
 SR: Nové Kalište 17, 974 04 Banská Bystrica, Slovenská republika
 Tel.: +421 484 155 045, e-mail: dynex@isternet.sk
 www.dynex.cz

Cirkulujúca nádorová DNA a jej využitie ako markera s prognostickou, prediktívnou a diagnostickou hodnotou u pacientov s nádorovými ochoreniami

Gabriel Minárik¹, Tatiana Sedláčková²

¹Lekárska genetika, Medirex, a. s., Bratislava

²Univerzita Komenského Lekárska fakulta, Bratislava

Zistenie prítomnosti nádorovej DNA v cirkulácii onkologických pacientov prinieslo nové možnosti ich využitia v klinickodiagnostickej praxi. V nadväznosti na etablovanie nových metód umožňujúcich ich vysokosenzitívnu a dostatočne špecifickú detekciu boli realizované mnohé štúdie poukazujúce na ich rozsiahly potenciál v klinickom manažmente onkologických pacientov. Aj preto sme za posledné roky svedkami enormného úsilia o implementáciu výsledkov týchto štúdií do rutinej klinickej praxe, pričom podľa aktuálnych poznatkov možno s ich využitím počítať v rámci skorej diagnostiky, prognostiky, skorej detekcie relapsu ochorenia či ako biomarkera pre výber klinickej terapie a to všetko v neinvasívnom prevedení, teda vo forme tzv. tekutej biopsie.

Kľúčové slová: cirkulujúca DNA, cirkulujúca nádorová DNA, nádorové ochorenia, tekutá biopsia

Circulating tumor DNA and its utilization as marker with prognostic, predictive and diagnostic value in patients with oncological diseases

Identification of the presence of tumor DNA in circulation of oncological patients has brought new possibilities for their use in clinical-diagnostic practice. Following the utilization of new methods, that enabled highly sensitive and sufficiently specific detection of circulating tumor DNA, many studies have been published demonstrating the vast potential of detection and quantification of circulating tumor DNA in clinical management of oncological patients. That is why we have seen enormous efforts in recent years to implement results of these studies into routine clinical practice and, according to current knowledge, we can look forward for their use in early diagnosis, prognosis, early detection of disease relapse, or as a biomarker for the selection of clinical therapy all in so-called non-invasive manner, in the form of liquid biopsy.

Keywords: circulating DNA, circulating tumor DNA, oncological diseases, liquid biopsy

NewsLab, 2018; roč. 9 (2): 102 – 107

Cirkulujúca nádorová DNA

Zvýšená hladina cirkulujúcich nukleových kyselín u pacientov s rakovinou bola prvýkrát opísaná už v roku 1977⁽¹⁾. Trvalo ďalších 10 rokov, pokým Stroun a kol. preukázali prítomnosť neoplastických charakteristík v cirkulácii, keď zistili, že cirkulujúca DNA vykazuje určitú dvojvláknovú instabilitu, ktorá je špecifická pre nádorovú DNA⁽²⁾. Definitívny dôkaz, že voľná cirkulujúca DNA v plazme onkologických pacientov je nádorového pôvodu, bol dosiahnutý po tom, ako Sorenson a kol. a Vasioutkin a kol. detegovali KRAS mutácie v cirkulácii pacientov s rakovinou pankreasu⁽³⁾, respektíve NRAS mutácie u pacientov s akútnou myeloidnou leukémiou⁽⁴⁾. Týmto objavmi sa otvorila možnosť potenciálneho využitia cirkulujúcej nádorovej DNA (ctDNA) ako molekulárneho markera v diagnostike a monitorovaní nádorových ochorení.

Pôvod cirkulujúcej nádorovej DNA

Zdrojom ctDNA v cirkulácii onkologických pacientov sú malígne bunky primárneho nádoru alebo nádorových metastáz (**obrázok 1**). Podobne ako v prípade cirkulujúcich nádorových buniek (CTCs) aj ctDNA sa do obehu môže dostať buď pasívnym, alebo aktívnym spôsobom. Pasívny spôsob uvoľňovania ctDNA sa spája s apoptózou a nekrotizáciou nádorových buniek, ktoré boli fagocytované makrofágmi a inými čistiacimi bunkami⁽⁵⁾.

V prípade aktívneho uvoľňovania boli publikované viaceré štúdie s cieľom objasniť, prečo životaschopné nádorové bunky aktívne uvoľňujú DNA do cirkulácie. Dôvodom je pravdepodobne schopnosť nádorových buniek ovplyvniť transformáciu vnímavých buniek na vzdialených miestach v procese genometastázy^(6,7).

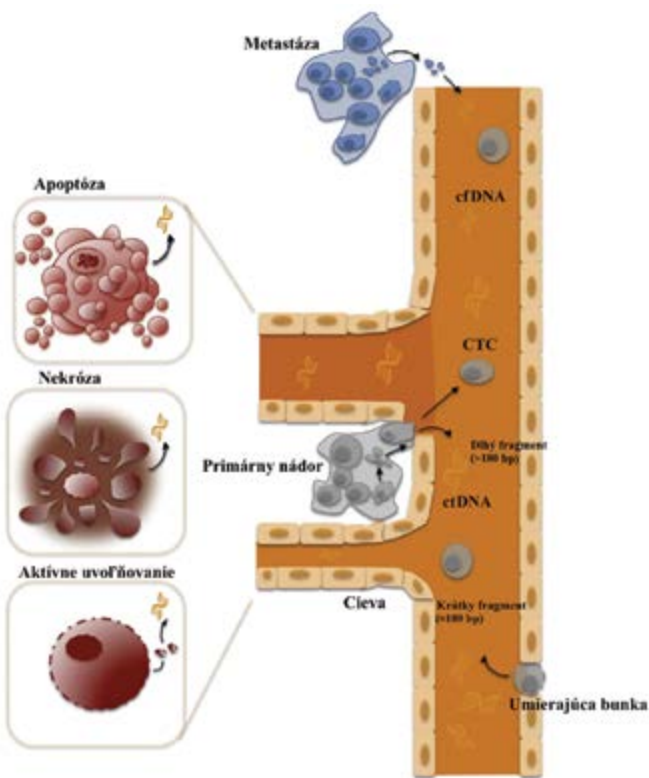
Ďalším zdrojom ctDNA sú CTCs prítomné v krvi, avšak v počte CTCs a množstve ctDNA v krvi je značný nesúlad. Pretože jedna ľudská bunka obsahuje 6 pg DNA a mililiter plazmy onkologických pacientov obsahuje priemerne 17 ng DNA⁽⁸⁾, bolo by potrebných viac ako 2 000 CTCs na ml plazmy v prípade, že by CTCs boli primárnym zdrojom ctDNA. V zmysle publikovaných štúdií však 10 ml krvi obsahuje 1 – 10 CTCs u väčšiny onkologických pacientov⁽⁹⁾.

Vlastnosti cirkulujúcej nádorovej DNA

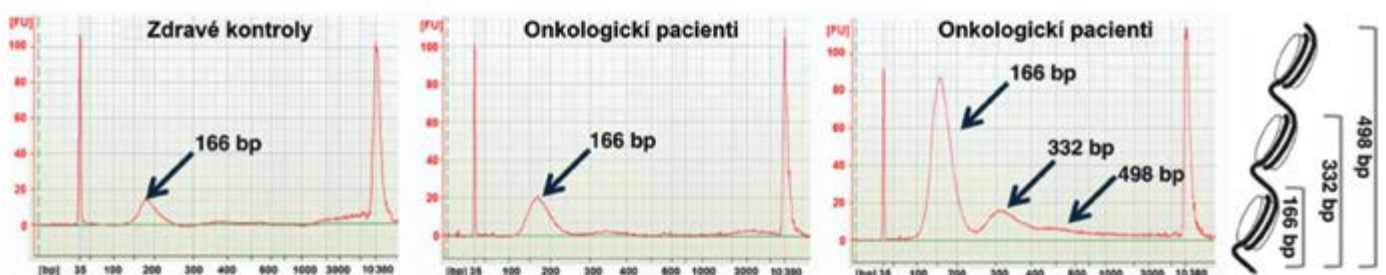
DNA v cirkulácii je dvojvláknová a fragmentovaná s výrazne nižšou molekulovou hmotnosťou v porovnaní s genomickou DNA. Dĺžka fragmentov v krvi cirkulujúcej voľnej DNA (cfDNA) sa pohybuje medzi krátkymi fragmentmi s dĺžkou 70 – 200 bp a fragmentmi dlhými približne 21 kilobáz⁽¹¹⁾ v závislosti od toho, akým mechanizmom bola cirkulujúca DNA uvoľnená do obehu. Krátke fragmenty pochádzajú z buniek, ktoré prešli procesom apoptózy. Ide o programovanú bunkovú smrť, počas ktorej je DNA štiepená nukleázami

na špecifických miestach, medzi nukleozómami. V súlade s apoptotickým pôvodom a dĺžkou vlákna DNA ovinutého okolo nukleozómu vrátane spojovacích oblastí je distribúcia dĺžok cfDNA fragmentov prevažne vo veľkosti 166 bp (alebo jej násobkov) (**obrázok 2**). Viacero štúdií preukázalo, že DNA prítomná v plazme vykazuje očakávaný vzor fragmentácie (vzor „rebríka“), pripomínajúci DNA štiepenú nukleázami v miestach medzi nukleozómami, ktorý je typický práve pre apoptické bunky^(11,12). Naopak, nekróza je nekontrolovaná bunková smrť, v dôsledku ktorej sú komponenty bunky nekontrolovane uvoľňované do prostredia bunky, čo vedie k poškodeniu bunky, a tým aj k uvoľneniu DNA fragmentov do

Obrázok 1. Pôvod cirkulujúcich nukleových kyselín v krvnom riečisku. Cirkulujúca DNA môže byť do obehu uvoľňovaná rôznymi spôsobmi a môže pochádzať z rozličných zdrojov – môže byť uvoľnená z umierajúcich buniek každého orgánu tela alebo z nádoru, ktorý môže rásť kdekoľvek. Upravené podľa Schwarzenbach a kol., 2011⁽¹⁰⁾.



Obrázok 2. Veľkosť fragmentov cfDNA pochádzajúcich z plazmy onkologických pacientov a zdravých kontrol. Všetky vzorky vykazovali výrazné zastúpenie fragmentov s dĺžkou 166 bp, čo zodpovedá DNA apoptotického pôvodu. U časti pacientov možno pozorovať aj dlhšie, avšak očakávané DNA fragmenty s dĺžkou v násobkoch 166 bp. Upravené podľa Heitzer a kol., 2015⁽¹⁴⁾.



cirkulácie. Tie sú však výrazne dlhšie v porovnaní s fragmentmi pochádzajúcimi z apoptických buniek. V nedávno publikovanej štúdií zameranej na určenie dĺžky fragmentov nádorovej DNA autori Underhill a kol. preukázali na animálnom modeli ľudského glioblastómu a hepatocelulárneho karcinómu, že najčastejšie zastúpené fragmenty ctDNA sú dlhé 134 a 144 bp, zatiaľ čo v normálnej cfDNA bol najčastejšie prítomný 167 bp dlhý fragment. Tieto zistenia boli zopakované u pacientov s melanómom. Navyše autori práce ukázali, že frekvencia mutovanej alely u pacientov s rakovinou pľúc bola vyššia vo frakcii, ktorá obsahovala kratšie DNA fragmenty, najmä ak distribúcia fragmentov cirkulujúcej DNA u onkologických pacientov bola podobná distribúcii DNA fragmentov u zdravých kontrol. Okrem toho pozorovali aj ~10 bp periodicitu v dĺžke fragmentov, ktorá je veľmi dobre opísaná v súvislosti s nukleázovou aktivitou⁽¹³⁾, čo je v súlade s predchádzajúcimi zisteniami, že ctDNA aj cfDNA sú spojené najmä s apoptózou buniek⁽¹¹⁾.

Koncentrácia cirkulujúcej nádorovej DNA

Za normálnych fyziologických podmienok je cfDNA v periférnej krvi degradovaná DNázovou aktivitou, čo u zdravých jedincov vedie k nízkej koncentrácii cfDNA (menej ako 1 – 100 ng/ml plazmy). V prípade onkologických pacientov je DNázová aktivita v ich krvnej plazme v porovnaní so zdravými jedincami znížená, čo u nich vedie k zvýšenej koncentrácii cirkulujúcich nukleových kyselín (celkovej cfDNA obsahujúcej aj ctDNA) (viac ako 1 000 ng/ml plazmy)^(11,15). Okrem toho sa predpokladá, že u onkologických pacientov je zvýšená miera apoptózy a nekrózy samotných nádorových buniek a okolitých normálnych buniek a ako nádor zväčšuje svoj objem, zvyšuje sa aj počet apoptotických a nekrotických buniek v dôsledku zvýšenej bunkovej premeny. Za normálnych podmienok sú zvyšky týchto buniek odstraňované v procese fagocytózy, avšak tá v nádorovej mase nefunguje efektívne, čo má za následok akumuláciu bunkových zvyškov a ich následné uvoľnenie do cirkulácie. Výsledkom je nerovnováha medzi uvoľňovaním a elimináciou cfDNA. Koncentrácia cfDNA medzi jednotlivcami značne varíruje a mení sa v čase, pričom onkologickí pacienti vykazujú vysokú variabilitu v množstve celkovej cfDNA a ctDNA frakcie, ktorá sa pohybuje v rozmedzí od menej ako 1 % až do viac ako 90 % v závislosti od počtu a veľkosti nádorových ložísk, proliferáčného štádia, úrovne vaskularizácie, druhu a dĺžky trvania liečby, odpovede na liečbu atď.^(14,16).

Klinické využitie cirkulujúcej nádorovej DNA

ctDNA predstavuje do budúcnosti jeden z najslubnejších nástrojov pre klinickú aplikáciu, pričom môže slúžiť ako biomarker prognózy a recidívy nádorových ochorení, môže indikovať, či je špecifická liečba v danom prípade aplikovateľná, alebo sa zníži riziko recidívy a progresie nádorového ochorenia (obrázok 3).

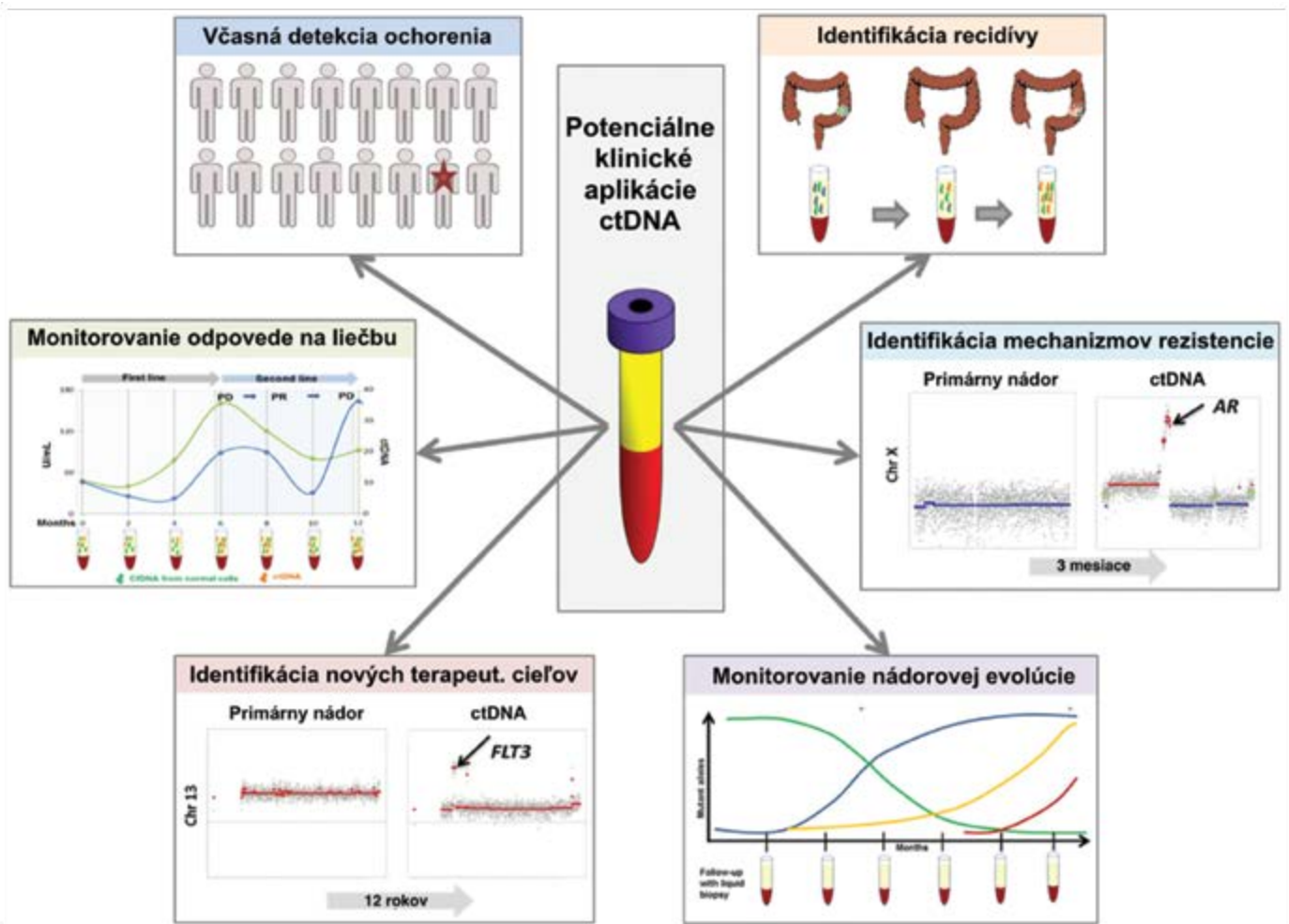
ctDNA ako diagnostický biomarker. Jednými z prvých a najviac študovaných genetických zmien vo vzťahu k nádorovým ochoreniam sú mutácie *KRAS* génu. *KRAS* je protoonkogén z rodiny *Ras* génov a mutácie v tomto géne vedú ku konstitutívnej aktivácii EGFR signalizačnej dráhy, ktorá vedie k nekontrolovateľnej bunkovej proliferácii. Mutácie v tomto géne sa bežne vyskytujú u pacientov s rakovinou pľúc a gastrointestinálneho traktu^(17,18). Mutácie *KRAS* génu v plazme alebo sére pacientov sú relatívne špecifickým markerom, pretože sú detegovateľné s vysokou špecificitou a senzitivitou u pacientov s kolorektálnym karcinómom⁽¹⁹⁾ a bola preukázaná 83 % zhoda medzi výsledkami zo vzoriek z plazmy a tými, ktoré boli získané analýzou nádorového tkaniva⁽²⁰⁾. Navyše v prípade niektorých pacientov boli mutácie v cirkulujúcej DNA *KRAS* génu prítomné ešte pred prejavom neoplastického ochorenia, čo naznačuje, že by takéto mutácie mohli predstavovať vysoké riziko vyvinutia tumoru⁽²¹⁾. Podobne *KRAS* mutácie boli detegované aj u pacientov

s rakovinou pankreasu 5 – 14 mesiacov pred diagnózou tumoru a nevyskytovali sa u pacientov s benígnymi patológiami pankreasu ani u zdravých osôb⁽²²⁾.

Hladina expzie niektorých kľúčových génov asociovaných s rakovinou môže byť zmenená nielen v dôsledku genetických zmien, ale aj v dôsledku epigenetických modifikácií. Metylácia CpG ostrovčekov v promótorovej oblasti tumor-supresorových génov (TSG) spúšťa lokálne utlmenie expzie génu. Nadmerná metylácia tumor-supresorového génu *p16* bola nájdená v sére pacientov s rakovinou pečene⁽²³⁾, pľúc⁽²⁴⁾ a prsníka⁽²⁵⁾. Metylácia TSG predstavuje jednu z prvotných príčin formovania tumoru, čím sa otvára možnosť využitia analýzy metylácie cirkulujúcej DNA tumorového pôvodu na skríning rakoviny v jej skorom štádiu. Fujiwara a kol. ukázali, že detekcia statusu metylácie TSG v sére je senzitívnejšia ako konvenčné markery používané na skorú diagnostiku rakoviny pľúc⁽²⁶⁾. Dokonca kombináciou cytologického vyšetrenia spúta a detekciou metylačného statusu *p16* génu v plazme bolo možné identifikovať 92 % pacientov s rakovinou pľúc⁽²⁷⁾.

ctDNA ako prognostický biomarker. Viaceré štúdie preukázali štatisticky významnú koreláciu medzi štádiom ochorenia a prítomnosťou nádorovo asociovaných genetických zmien v krvi pacientov s nádorom prsníka, vaječníkov, pankreasu a kolorektálnym karcinómom. U pacientov

Obrázok 3. Prehľad potenciálnych klinických aplikácií analýzy cfDNA/ctDNA pri nádorových ochoreniach. Upravené podľa Perkins a kol., 2012⁽⁹⁾.



s kolorektálnym karcinómom boli realizované štúdie zamerané na detekciu *hotspot* mutácií v *KRAS* géne a hypermetyláciu promótoru *CDKN2A* (kinázový inhibítor 2 A dependentný od cyklínu). Zistilo sa, že u 100 % pacientov s kolorektálnym karcinómom (CRC), bez detekcie *KRAS* mutácií a hypermetylácie promótoru *CDKN2A* v ctDNA, bola miera prežitia dva roky. Tieto výsledky naznačujú, že ctDNA prítomná v plazme je relevantným prognostickým markerom v prípade pacientov s CRC a takýto marker môže byť použitý na identifikáciu pacientov, u ktorých je vysoké riziko recidívy⁽²⁸⁾. Tieto výsledky boli potvrdené v ďalšej štúdií, keď u pacientov s detegovateľnou ctDNA v plazme nastala recidíva ochorenia v priebehu jedného roka po odstránení nádoru. Navyše vysoká koncentrácia cfDNA a detekcia *KRAS* mutácií sú jasným ukazovateľom nepriaznivej prognózy u pacientov s metastatickým CRC⁽²⁹⁾. Podobné výsledky boli získané aj v prípade pacientov s rakovinou prsníka⁽³⁰⁾. Na základe multivariačnej analýzy prítomnosť *KRAS* mutácií v plazme 256 pacientov s nemalobunkovým karcinómom pľúc (NSCLC) v pokročilom štádiu korelovala so zlou prognózou u pacientov dostávajúcich prvú líniu chemoterapie. Prítomnosť *KRAS* mutácií v plazme bola vyhodnotená aj v súbore 44 pacientov s rakovinou pankreasu s cieľom určiť prognózu ochorenia u týchto pacientov. Napriek nízkej senzitivite testu (27 %) bolo preukázané, že pacienti, u ktorých bola detegovaná prítomnosť *KRAS* mutácií, mali signifikantne zníženú pravdepodobnosť prežitia v porovnaní s pacientmi bez uvedených mutácií (17 % vs 41 % v prípade 6 mesiacov a 0 % vs 24 % v prípade 12 mesiacov)⁽³¹⁾.

Detekcia návratu ochorenia. Sľubnou klinickou aplikáciou tekutej biopsie je skorá detekcia návratu ochorenia po liečbe. V tomto ohľade bola dôležitá štúdia, v ktorej monitorovanie nádorovo špecifických zmien (vrátane *APC*, *TP53* a *KRAS*) u pacientov s CRC, ktorí podstúpili operáciu, viedlo k identifikácii návratu ochorenia s takmer stopercentnou senzitivitou a špecifitou. Na základe pretrvávania tumor-asociovaných genetických zmien v cfDNA bezprostredne po operácii boli identifikované aj všetky prípady neúplnej resekcii u pacientov s reziduálnou chorobou. Následné štúdie preukázali konzistentný vzťah medzi návratom ochorenia a opakovaným objavením určitých nádorových zmien vrátane *APC*, *TP53* a *KRAS* mutácií, ako aj alelovej nerovnováhy⁽³²⁻³⁴⁾.

Dormancia je bežným javom mnohých nádorových ochorení a nemožno ju detegovať štandardnými metódami. Sledovanie tumorovo špecifických zmien v počte kópií genomických oblastí u 50 pacientov s rakovinou prsníka pred operáciou aj po operácii preukázalo, že tieto aberácie môžu v plazme pretrvávajúť až do 12 rokov po diagnóze nádorového ochorenia⁽³⁵⁾.

Predikcia odpovede na liečbu. V súčasnosti sa výber cieľenej terapie v klinickej praxi riadi prítomnosťou alebo absenciou jedinej genetickej zmeny v nádorovej DNA. Molekulárna analýza však býva často vykonávaná na archivovaných tkanivových vzorkách nádorov, čo nie je optimálny prístup, keďže nemusí odrážať aktuálne genetické pozadie ochorenia. V prípadoch, keď nemožno vykonať novú biopsiu, by ctDNA mohla slúžiť ako ideálny biomarker aktuálneho molekulárneho stavu ochorenia. Napríklad pre manažment pacientov s rakovinou prsníka je rozhodujúce vyhodnotenie HER2 statusu. Na detekciu HER2 amplifikácie v ctDNA u pacientov s metastatickým karcinómom prsníka Gevensleben a kol. optimalizovali metódu digitálnej PCR, pričom na vývoj metó-

dy bola použitá skupina 65 pacientov a na validáciu iná nezávislá skupina 58 pacientov. Pacienti s metastatickým ochorením, ktorí boli identifikovaní ako HER2 pozitívni, tak mohli profitovať z HER2 cieľenej terapie trastuzumabom. Dokonca traja pacienti s metastatickým karcinómom prsníka zahrnutí do tejto štúdie získali pri recidíve ochorenia pozitívny HER2 status napriek tomu, že boli predtým na základe biopsie tkaniva klasifikovaní ako HER2 negatívni⁽³⁶⁾.

Na predikciu odpovede na liečbu možno použiť aj detekciu zvýšeného množstva kópií iných génov, ako napr. *MET* amplifikáciu na predpovedanie odpovede na anti-EGFR terapiu v prípade rakoviny pľúc⁽³⁷⁾. Ako jasný indikátor odpovede na liečbu cetuximabom a irinotekanom pri metastatickom kolorektálnom karcinóme je prítomnosť, resp. kvantifikácia mutácií *KRAS* v plazme, pričom zvýšené množstvo koreluje so zlou prognózou. U niektorých pacientov s nízkou hladinou *KRAS* mutácií v plazme možno anti-EGFR terapiou dosiahnuť určitú úroveň stabilizácie ochorenia⁽²⁹⁾. Podobné výsledky boli opísané aj v prípade 64 pacientov s metastatickým kolorektálnym karcinómom, u ktorých bol na liečbu použitý temsirolimus a irinotekan buď samostatne, alebo v kombinácii. Pacienti so zvýšeným podielom *KRAS* mutácií v plazme liečení monoterapiou mali 77 % riziko skorej progresie ochorenia v porovnaní so 43 % rizikom v prípade pacientov, u ktorých bolo množstvo *KRAS* mutácií v plazme nízke⁽³⁸⁾.

Biomarker druhotnej rezistencie. Vývoj sekundárnej (získanej) rezistencie v dôsledku mutácie je bežným dôsledkom cieľenej terapie u väčšiny pacientov s nádorovým ochorením. Príkladom je T790M substitúcia v membránovom receptore EGFR, ktorá má za následok rezistenciu proti gefitinibu a erlotinibu asi u 50 % pacientov s rakovinou pľúc⁽³⁹⁾. Mutácia bola najskôr zistená u pacientov s relapsom a neskôr potvrdená neinvazívnou analýzou vzoriek plazmy, čím bola potvrdená možnosť využitia tekutej biopsie na monitorovanie rezistencie na cieľnú terapiu^(40,41).

Podobne sekundárna rezistencia proti anti-EGFR protilátkam cetuximabu a panitumumabu, ktoré sa využívajú na liečbu kolorektálneho karcinómu, je výsledkom vzniku *KRAS* mutácií v bunkách nádoru⁽⁴²⁾. Detekciou mutácií *KRAS* v krvi pacientov počas liečby cetuximabom a panitumumabom tak možno detegovať vznik rezistentných alel až o 10 mesiacov skôr ako so štandardnými metódami^(42,43). Diaz a kol. zistili v sére 9 z 24 pacientov s CRC, ktorých nádory boli spočiatku bez *KRAS* mutácií, prítomnosť detegovateľných mutácií *KRAS* génu, pričom pri troch z nich boli detegované viaceré rozdielne mutácie. Výskyt týchto mutácií bol veľmi konzistentný, všeobecne nastal päť až šesť mesiacov po terapii⁽⁴³⁾.

Záver

Na záver môžeme skonštatovať, že detekcia nádorovo špecifických zmien vychádzajúca z analýzy cfDNA, resp. ctDNA, predstavuje obrovský prínos v diagnostike a prognostike onkologických ochorení. Sú zároveň nádejnou cestou aj na zlepšenie ich liečby nielen vďaka tomu, že predstavujú neinvazívnu alternatívu výrazne menej zaťažujúcu pacienta aj zdravotné pracovisko pri odbere vzoriek, ale i preto, že majú možnosť lepšie charakterizovať aktuálny priebeh nádorového ochorenia, ktorého heterogenita je štandardnými postupmi identifikovateľná len vo veľmi obmedzenom rozsahu. V budúcnosti možno počítať s tým, že analýza cfDNA,

resp. ctDNA bude doplnkom ku klasickej histopatologickej analýze nádorového tkaniva, ale že v prípade, že bude možné jej potenciál využiť naplno, sa, naopak, histopatologická analýza stane doplnkovou analýzou k primárnej analýze cfDNA, resp. ctDNA.

LITERATÚRA

1. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977; 37(3): 646-650.
2. Stroun M, Anker P, Maurice P, et al. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* 1989; 46(5): 318-322.
3. Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, et al. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; 3(1): 67-71.
4. Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, et al. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 1994; 86(4): 774-779.
5. Diehl F, Li M, Dressman D, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(45): 16368-16373.
6. Garcia-Olmo DC, Dominguez C, Garcia-Arranz M, et al. Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells. *Cancer Res* 2010; 70(2): 560-567.
7. Trejo-Becerril C, Perez-Cardenas E, Taja-Chayeb L, et al. Cancer progression mediated by horizontal gene transfer in an in vivo model. *PLoS One* 2012; 7(12): e52754.
8. Perkins G, Yap TA, Pope L, et al. Multi-purpose utility of circulating plasma DNA testing in patients with advanced cancers. *PLoS One* 2012; 7(11): e47020.
9. Alix-Panabieres C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat Rev Cancer* 2014; 14(9): 623-631.

Grantová podpora: Táto publikácia vznikla s podporou grantov Agentúry na podporu výskumu a vývoja – APVV-14-0273 a APVV-14-0327.

10. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2011; 11(6): 426-437.
11. Jahr S, Hentze H, Englisch S, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001; 61(4): 1659-1665.
12. Ellinger J, Wittkamp V, Albers P, et al. Cell-free circulating DNA: diagnostic value in patients with testicular germ cell cancer. *J Urol* 2009; 181(1): 363-371.
13. Underhill HR, Kitzman JO, Hellwig S, et al. Fragment Length of Circulating Tumor DNA. *PLoS Genet* 2016; 12(7): e1006162.
14. Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clin Chem* 2015; 61(1): 112-123.
15. Mouliere F, Robert B, Arnau Peyrotte E, et al. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PLoS One* 2011; 6(9): e23418.
16. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 2014; 6(224): 224ra224.
17. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319(9): 525-532.
18. Slebos RJ, Kibbelaar RE, Dalesio O, et al. K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med* 1990; 323(9): 561-565.
19. Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, et al. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; 3(1): 67-71.



Vaše komplexné diagnostické riešenie

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

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



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

Testy Idylla™



Idylla MSI test coming soon!

20. Kopreski MS, Benko FA, Kwee C, et al. Detection of mutant K-ras DNA in plasma or serum of patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 1997; 76(10): 1293-1299.
21. Kopreski MS, Benko FA, Borys DJ, et al. Somatic mutation screening: identification of individuals harboring K-ras mutations with the use of plasma DNA. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(11): 918-923.
22. Mulcahy HE, Lyautey J, Lederrey C, et al. A prospective study of K-ras mutations in the plasma of pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res* 1998; 4(2): 271-275.
23. Wong IH, Lo YM, Zhang J, et al. Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients. *Cancer Res* 1999; 59(1): 71-73.
24. Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, et al. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res* 1999; 59(1): 67-70.
25. Silva JM, Dominguez G, Villanueva MJ, et al. Aberrant DNA methylation of the p16INK4a gene in plasma DNA of breast cancer patients. *Br J Cancer* 1999; 80(8): 1262-1264.
26. Fujiwara K, Fujimoto N, Tabata M, et al. Identification of epigenetic aberrant promoter methylation in serum DNA is useful for early detection of lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11(3): 1219-1225.
27. Liu Y, An Q, Li L, et al. Hypermethylation of p16INK4a in Chinese lung cancer patients: biological and clinical implications. *Carcinogenesis* 2003; 24(12):1897-1901.
28. Lecomte T, Berger A, Zinzindohoue F, et al. Detection of free-circulating tumor-associated DNA in plasma of colorectal cancer patients and its association with prognosis. *Int J Cancer* 2002; 100(5): 542-548.
29. Spindler KL, Pallisgaard N, Vogelius I, et al. Quantitative cell-free DNA, KRAS, and BRAF mutations in plasma from patients with metastatic colorectal cancer during treatment with cetuximab and irinotecan. *Clin Cancer Res* 2012; 18(4): 1177-1185.
30. Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2013; 368(13): 1199-1209.
31. Castells A, Puig P, Mora J, et al. K-ras mutations in DNA extracted from the plasma of patients with pancreatic carcinoma: diagnostic utility and prognostic significance. *J Clin Oncol* 1999; 17(2): 578-584.
32. Frattini M, Gallino G, Signoroni S, et al. Quantitative and qualitative characterization of plasma DNA identifies primary and recurrent colorectal cancer. *Cancer Lett* 2008; 263(2): 170-181.
33. Hamana K, Uzawa K, Ogawara K, Shiiba M, Bukawa H, Yokoe H, Tanzawa H. Monitoring of circulating tumour-associated DNA as a prognostic tool for oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2005; 92(12): 2181-2184.
34. Hsieh JS, Lin SR, Chang MY, et al. APC, K-ras, and p53 gene mutations in colorectal cancer patients: correlation to clinicopathologic features and post-operative surveillance. *Am Surg* 2005; 71(4): 336-343.
35. Shaw JA, Page K, Blighe K, et al. Genomic analysis of circulating cell-free DNA infers breast cancer dormancy. *Genome Res* 2012; 22(2): 220-231.
36. Gevensleben H, Garcia-Murillas I, Graeser MK, et al. Noninvasive detection of HER2 amplification with plasma DNA digital PCR. *Clin Cancer Res* 2013; 19(12): 3276-3284.
37. Bean J, Brennan C, Shih JY, et al. MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(52): 20932-20937.
38. Spindler KL, Sorensen MM, Pallisgaard N, et al. Phase II trial of temsirolimus alone and in combination with irinotecan for KRAS mutant metastatic colorectal cancer: outcome and results of KRAS mutational analysis in plasma. *Acta Oncol* 2013; 52(5): 963-970.
39. Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, et al. Analysis of epidermal growth factor receptor gene mutation in patients with non-small cell lung cancer and acquired resistance to gefitinib. *Clin Cancer Res* 2006; 12(19): 5764-5769.
40. Nakamura T, Sueoka-Aragane N, Iwanaga K, et al. Application of a highly sensitive detection system for epidermal growth factor receptor mutations in plasma DNA. *J Thorac Oncol* 2012; 7(9): 1369-1381.
41. Taniguchi K, Uchida J, Nishino K, et al. Quantitative detection of EGFR mutations in circulating tumor DNA derived from lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 2011; 17(24): 7808-7815.
42. Misale S, Yaeger R, Hobor S, et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* 2012; 486(7404): 532-536.
43. Diaz LA, Jr., Williams RT, Wu J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 2012; 486(7404): 537-540.



RNDr. Gabriel Minárik, PhD.

Lekárska genetika, Medirex, a. s.
Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava
e-mail: gabriel.minarik@medirex.sk

Cirkulujúce nádorové bunky ako markery využiteľné pri manažmente pacientov s nádorovými ochoreniami

Tatiana Sedláčková¹, Gabriel Minárik²

¹Univerzita Komenského Lekárska fakulta, Bratislava

²Lekárska genetika, Medirex, a. s., Bratislava

Nádorové bunky majú schopnosť špecifickej dediferenciácie a vďaka tomu môžu získať vlastnosti umožňujúce ich uvoľnenie z primárneho nádoru do cirkulácie, kde dokážu dlhodobo prežívať a stávajú sa z nich cirkulujúce nádorové bunky. Tie majú preukázateľný potenciál vytvárať metastázy, a to vo forme jednotlivých buniek aj ako ich aglomeráty. Možnosť ich identifikácie a kvantifikácie má preto významnú prognostickú hodnotu, pričom tá sa na základe už dostupných metód schválených autoritami vo vyspelom svete využíva v rámci prognostiky, napr. u pacientov s rakovinou prsníka. V súčasnosti bežia viaceré klinické štúdie, ktoré s veľkou pravdepodobnosťou preukážu aj prediktívnu hodnotu analýzy prítomnosti a množstva cirkulujúcich nádorových buniek u pacientov s rôznymi onkologickými ochoreniami a prispievajú k rozvoju neinvazívnych analýz prostredníctvom tzv. tekutej biopsie. **Kľúčové slová:** cirkulujúce nádorové bunky, metastázovanie, tekutá biopsia

Circulating tumour cells as markers usable in management of patients with oncological diseases

Tumour cells have the ability of specific form of dedifferentiation, and thus they can acquire properties enabling their release from the primary tumour to circulation, where they can survive for a long time and become circulating tumour cells. These have the demonstrable potential to produce metastases, both in the form of single cells as well as their agglomerates. The possibility of their identification and quantification has, therefore, a significant prognostic value, which is based on already available and authority-approved methods also used in clinical routine, e. g. in patients with breast cancer. Moreover, there are ongoing several clinical trials that are likely to prove the predictive value of such analysis in patients with various oncological diseases and will contribute to the development of non-invasive tests working as part of the tests performed as so-called liquid biopsies.

Keywords: circulating tumour cells, cancer metastasis, liquid biopsy

NewsLab, 2018; roč. 9 (2): 108 – 112

Cirkulujúce nádorové bunky

Cirkulujúce nádorové bunky (CTC) sú bunky uvoľňované do krvného riečiska z primárneho nádoru už včasne počas jeho formovania a rastu a/alebo jeho metastázami. Sú preukázateľne asociované s metastázovaním, pričom sú schopné invázie do okolia cez extracelulárnu matrix a vrstvy stromálnych buniek, nasleduje intravazácia týchto buniek do lúmenu ciev, ich transport krvným riečiskom, zachytenie v inej vzdialenej lokalite a následná extravazácia do parenchýmu vzdialeného tkaniva. Bunky ďalej prežívajú v novom mikroprostredí a majú potenciál tvorby mikrometastáz, ak znovu spustia svoj proliferatívny program na danom mieste, čím dávajú vznik makroskopickým, klinicky detegovateľným neoplastickým útvarom⁽¹⁾.

Z cytologického pohľadu sú CTCs heterogénnou skupinou buniek obsahujúcou životaschopné, apoptické, dormantné (spiace) bunky, ako aj bunky schopné založiť metastázu. Ich vnútrobunkové zmeny môžu viesť k vzniku diseminovaných nádorových buniek (DTCs), ktoré sú považované za samotné mikrometastázy. Kým CTCs sú nádorové bunky prítomné v krvnom obehú onkologických pacientov, DTCs sú nádorové bunky, ktoré sa už usídlili v cieľovom tkanive, napríklad v kostnej dreni. DTCs sú najčastejšie detegované a opísané práve v kostnej dreni onkologických pacientov. Jedným z dôvodov je aj to, že tento orgán je ľahšie prístupný pre biopsiu

v porovnaní s inými orgánmi, ako je pečeň, pľúca alebo mozog. DTCs môžu zostať v spiacom stave aj niekoľko rokov po odstránení primárneho nádoru a následne vyvolať vznik metastáz⁽²⁾. Navyše, DTCs z týchto metastáz sa môžu opätovne uvoľniť do krvného obehu a šíriť sa jeho prostredníctvom do ďalších vzdialených tkanív a vytvárať tak sekundárne metastázy. Dokonca takéto DTCs konvertované späť na CTCs môžu kolonizovať primárny nádor a už existujúce metastázy v procese nazývanom samovýsev (self-seeding), čím dávajú možnosť vzniku agresívnych typov metastáz⁽³⁾.

Koncentrácia CTCs

Predpokladá sa, že jeden gram nádorovej masy uvoľňuje denne desaťtisíce CTCs do krvného obehu⁽⁴⁾. Ich životnosť v cirkulácii je však časovo veľmi obmedzená a pohybuje sa v rozmedzí 1 – 2,4 hodiny⁽⁵⁾. Odhaduje sa, že len asi 1 z 1 000 buniek zostáva v cirkulácii životaschopných a len 1 z 10 000 z týchto CTCs je schopných vytvoriť metastázy⁽⁶⁾. Je to tak pre nutnosť prekonania vplyvu hemodynamických síl a pôsobenia buniek imunitného systému (predovšetkým NK buniek)⁽⁴⁾. Navyše k tomu prispieva strata kontaktu s okolitými bunkami, a tým spôsobená smrť v procese anoikózy. Vo výsledku sú preto CTCs v periférnej krvi prítomné vo veľmi nízkej koncentrácii, ktorá sa pohybuje medzi 1 – 10 bunkami na 10 ml krvi u väčšiny onkologických pacientov⁽⁷⁾.

Prechod CTCs do cirkulácie a epiteliálno-mezenchymálny prechod

CTCs sa môžu do cirkulácie dostať dvomi spôsobmi, a to aktívne – vycestovaním buniek so zvýšeným migračným potenciálom, alebo pasívne – uvoľňovaním buď jednotlivých buniek, prípadne bunkových zhlukov. Biologicky významnejšie sú práve tie CTCs, ktoré sú schopné aktívne vycestovať, čo je spojené s ich vstupom do procesu epiteliálno-mezenchymálneho prechodu (EMT)⁽⁸⁾.

Epiteliálno-mezenchymálny prechod je proces, ktorý sa fyziologicky uplatňuje počas embryogenézy a zahŕňa migráciu ektodermálnych buniek v embryu počas gastrulácie za vzniku mezodermu (EMT typu I)⁽⁹⁾. V neskoršom období hrá veľmi dôležitú úlohu počas hojenia rán, regenerácie tkanív a fibrózy orgánov (EMT typu II)⁽¹⁰⁾ a z pohľadu nádorového tkaniva je spojený s metastatickým šírením (EMT typu III). Umožňuje diferencovaným epitelovým bunkám, ktoré interagujú s bazálnou membránou prostredníctvom ich povrchu, podstúpiť také biologické zmeny, ktoré im umožňujú získať fenotyp mezenchymálnych buniek. Ten zahŕňa zvýšenú migračnú kapacitu, invazívnosť, zvýšenú odolnosť proti apoptóze a značne zvýšenú produkciu zložiek extracelulárnej matrix (ECM)⁽⁸⁾. Dokončenie EMT je signalizované degradáciou bazálnej membrány a vytvorením mezenchymálnych buniek, ktoré sú schopné migrovať z epitelovej vrstvy, z ktorej vznikli (**obrázok 1**).

EMT je zložitý proces, do ktorého je zapojených viacero signálnych dráh, pretože bunky musia prejsť funkčnými aj morfológickými zmenami. EMT môže byť indukovaný

rôznymi mechanizmami, medzi ktoré patrí zápal, acidóza, hypoxia, rastové faktory a v neposlednom rade aj vplyv mikroprostredia nádoru, ktoré môže stimulovať bunkovú migráciu a inváziu. Na druhej strane však ide o reverzibilný proces, keď cirkulujúce nádorové bunky po dosiahnutí vzdialeného orgánu a extravazácii do jeho parenchýmu získavajú znovu fenotyp epiteliálnych buniek v procese nazývanom mezenchymálno-epiteliálny prechod (MET), aby mohli ďalej proliferovať ako epiteliálne metastatické depozity.

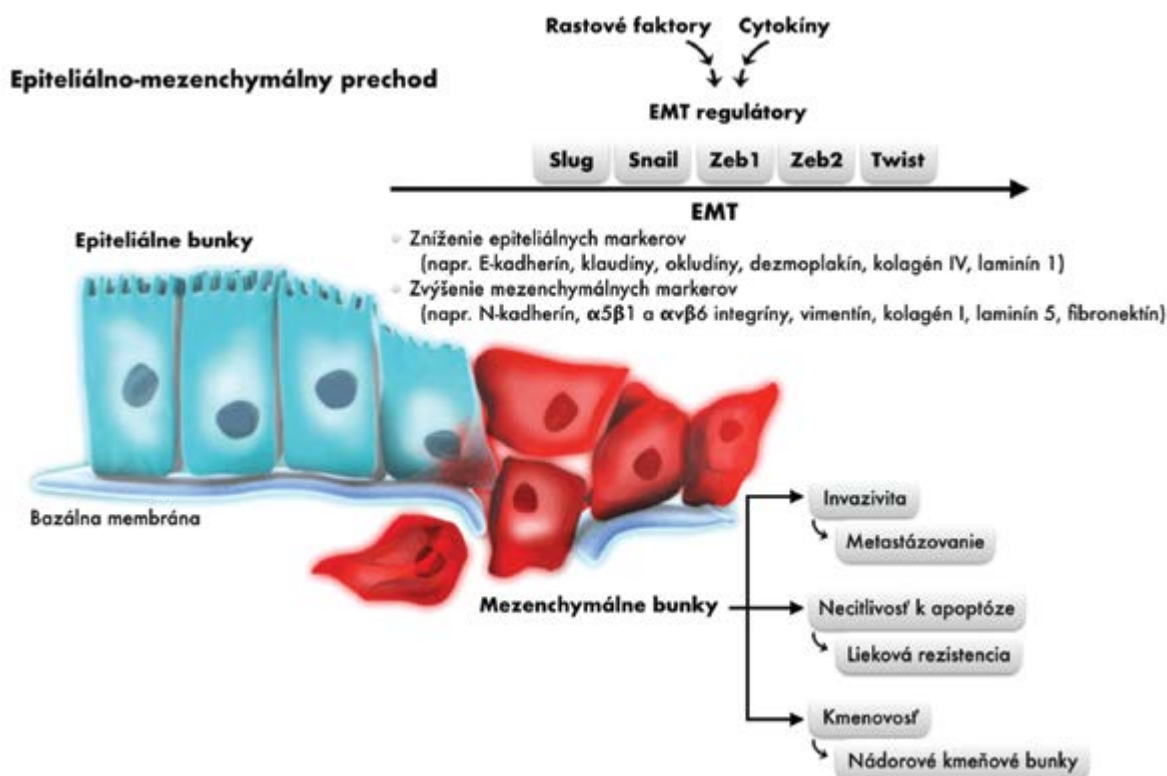
Nádorové kmeňové bunky

Malá časť nádorových buniek vykazuje vlastnosti dospelých kmeňových buniek, čiže majú schopnosť samoobnovenia, sú multipotentné a dávajú tak možnosť vzniku diferencovaných nádorových buniek a sú schopné iniciovať rast nádoru. Tieto bunky sú označované ako nádorové kmeňové bunky (CSCs), bunky podobné kmeňovým bunkám, prípadne ako bunky iniciujúce nádor a sú spájané s mezenchymálnym fenotypom.

Cirkulujúce nádorové mikroembólie

Cirkulujúce nádorové bunky môžu v obehu cirkulovať ako samostatné bunky alebo z primárneho tumoru sa môže odlúčiť zároveň viacero buniek, ktoré potom putujú v zhlukoch. Tie môžu obsahovať od dvoch do viac ako 50 buniek a označujú sa ako cirkulujúce nádorové mikroembólie (CTMs). CTMs tvoria buď len nádorové bunky, alebo môžu byť spojené s inými typmi buniek, ako sú fibroblasty, leukocyty, endotelálne bunky, pericyty, krvné doštičky⁽¹²⁾. O významnosti CTC

Obrázok 1. Schematický prehľad epiteliálno-mezenchymálneho prechodu. Proces EMT je spustený cytokínmi, ktoré regulujú aktivitu efektorových transkripčných faktorov. V dôsledku ich pôsobenia dochádza k významným zmenám cytoskeletu a vo vylučovaní proteínov extracelulárnej matrix, čo sa využíva pri ich detekcii. Upravené podľa Shih a kol., 2011⁽¹¹⁾.



zhlukov sa dlho diskutovalo, avšak CTMs pochádzajúce od pacientov s malobunkovým karcinómom pľúc vykazovali neprítomnosť apoptických buniek, čo im dávalo výhodu v prežívaní, a tiež nízky podiel proliferatívnych buniek, čím sa stávali rezistentnejšími proti chemoterapii⁽¹³⁾. Dôležitým zistením tiež bolo, že bunky nachádzajúce sa v CTMs nevznikli de novo jedinej migrujúcej bunky, ale sú oligoklonálneho pôvodu a hoci sa v cirkulácii vyskytujú oveľa zriedkavejšie ako samostatné CTCs, majú signifikantne vyšší metastatický potenciál (23- až 50x) a ich prítomnosť je spojená so zhoršeným celkovým prežívaním⁽¹⁴⁾.

Detekcia CTCs

Identifikácia a charakterizácia CTCs si vyžaduje vysokosenzitívne a špecifické metódy, keďže CTCs sa v cirkulácii nachádzajú vo veľmi nízkej koncentrácii, navyše s vysokým pozadím iných krvných buniek (na jednu CTC pripadajú milióny iných krvných buniek). Pri ich detekcii ide zvyčajne o kombináciu izolačných a detekčných metód. Na izoláciu CTCs sa využívajú rôzne technológie, ktoré sú založené na rôznych vlastnostiach CTCs, ktoré ich odlišujú od normálnych hematopoetických buniek. Ide o vlastnosti fyzikálneho (veľkosť, denzita, elektrický náboj, tvarová flexibilita) aj biologického charakteru (expresia proteínov na povrchu buniek, životaschopnosť).

Výhodou technológií využívajúcich fyzikálne vlastnosti je separácia CTCs bez ich farbenia. Patrí sem napr. centrifugácia v hustotnom gradiente (Ficoll, OncoQuick), filtrácia cez špeciálne filtre na základe veľkosti CTCs (ISET), všestranný biočip využívajúci jedinečné rozdiely vo veľkosti a deformovateľnosti nádorových buniek (zachytávané sú väčšie a tuhšie CTCs v porovnaní s krvnými bunkami), fotoakustická prietoková cytometria, dielektroforéza (DEP)⁽¹⁵⁾.

Medzi technológie využívajúce biologické vlastnosti CTCs patria imunofluorescenčné metódy. V tomto prípade sa používajú protilátky proti nádorovo asociovaným antigénom, keď ide o pozitívnu selekciu, alebo protilátky proti bežnému leukocytovému antigénu CD45, keď ide o negatívnu selekciu. Protilátky proti danému antigénu sú naviazané na magnetických partikulách, ktoré umožňujú separáciu CTCs naviazaných na antigén pôsobením magnetického poľa. Pri pozitívnej selekcii sa zvyčajne využívajú protilátky proti adhezívnej molekule epitelových buniek (EpCAM). CTCs sú následne detegované imunocytologicky protilátkami na cytokeratíny (CKs). Medzi metódy využívajúce na separáciu CTCs EpCAM protilátky patrí systém CellSearch® (Janssen Diagnostics, Raritan, NJ, USA). Tento systém umožňuje stanoviť početnosť CTCs epitelálneho pôvodu použitím magnetických partikul pokrytých molekulami EpCAM a CTCs identifikuje podľa morfológických charakteristík, pozitívnej expresie cytokeratínov 8, 18 a/alebo 19 a absencie hematopoetických antigénov CD45⁽¹⁶⁾. Ide o jediný systém, ktorý schválil americký Úrad pre kontrolu liekov a potravín (FDA) ako prostriedok na určenie prognózy u pacientov s metastatickou rakovinou prsníka, prostaty a kolorekta⁽¹⁷⁻¹⁹⁾.

Novými sľubnými metódami založenými na EpCAM sú platformy využívajúce mikrofluidickú technológiu, najmä CTC-čip, Herringbone čip, iCHIP, IsoFlux⁽¹²⁾, ktoré umožňujú spracúvať vzorky s veľmi malým objemom.

Biologický význam CTCs epitelálneho pôvodu (EpCAM a bunky pozitívne na cytokeratín) je zrejmy z prognostickej

dôležitosti CTCs, ktoré boli zachytené CellSearch® systémom v rôznych typoch nádorov⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. Ak však nejaká časť cirkulujúcich nádorových buniek podstúpi EMT, keď sú downregulované epitelálne markery, a, naopak, upregulované tie mezenchymálne, dôležitá subpopulácia CTCs nemusí byť metódami, ktoré sú závislé od expresie EpCAM a cytokeratínov, zachytená. Z tohto dôvodu sa na zachytenie CTCs neexprimujúcich EpCAM využíva kokteil protilátok proti rôznym iným epitelálnym povrchovým antigénom, napr. proti receptoru 2 ľudského epidermálneho rastového faktora (HER2), receptoru pre epidermálny rastový faktor (EGFR), mucín-1 (MUC1) a protilátkam proti mezenchymálnym a kmeňovým bunkovým antigénom (c-MET, N-kadherín, CD318 a antigén mezenchymálnych kmeňových buniek)⁽²⁰⁾.

Bez ohľadu na výber izolačnej metódy ani jednou jednorokovou platformou nemožno dosiahnuť izoláciu čistých CTCs. CTC frakcia obvyčajne stále obsahuje aj značný počet leukocytov. Z tohto dôvodu je potrebná následná identifikácia CTCs na úrovni buniek použitím metód umožňujúcich odlišiť nádorové bunky od normálnych krvných buniek. Tieto metódy sú založené buď na detekcii proteínov, alebo expresii antigénov asociovaných tumor pomocou kvantitatívnej RT-PCR.

V súčasnosti na detekciu viabilných CTCs získaných od onkologických pacientov existujú dva rozdielne *in vitro* testy. Prvým je EPISPOT, ktorý deteguje špecifické proteíny vylučované CTCs do prostredia⁽²¹⁾, druhým je invazívny test, ktorý skúma schopnosť CTCs tráviť fluorescenčne značenú bunkovú matrixu⁽⁷⁾.

Na detekciu viabilných CTCs možno tiež použiť metódu kvantitatívnej RT-PCR, keď sa vyhodnocuje expresia špecifických mRNA molekúl. V prípade rakoviny prsníka sa najčastejšie využíva mRNA kódujúca CK19. Nevýhodou však je, že táto metóda neumožňuje stanovenie početnosti buniek a navyše mnoho transkriptov (napr. kódujúce CK18, CK19, CK20, MUC1, karcinoembryonálny antigén, prostatický špecifický antigén) je v malom množstve exprimovaných aj v normálnych krvných bunkách a bunkách kostnej drene⁽²²⁾, preto pre správne vyhodnotenie a detekciu viabilných CTCs je potrebná validácia *cut-off* hodnoty.

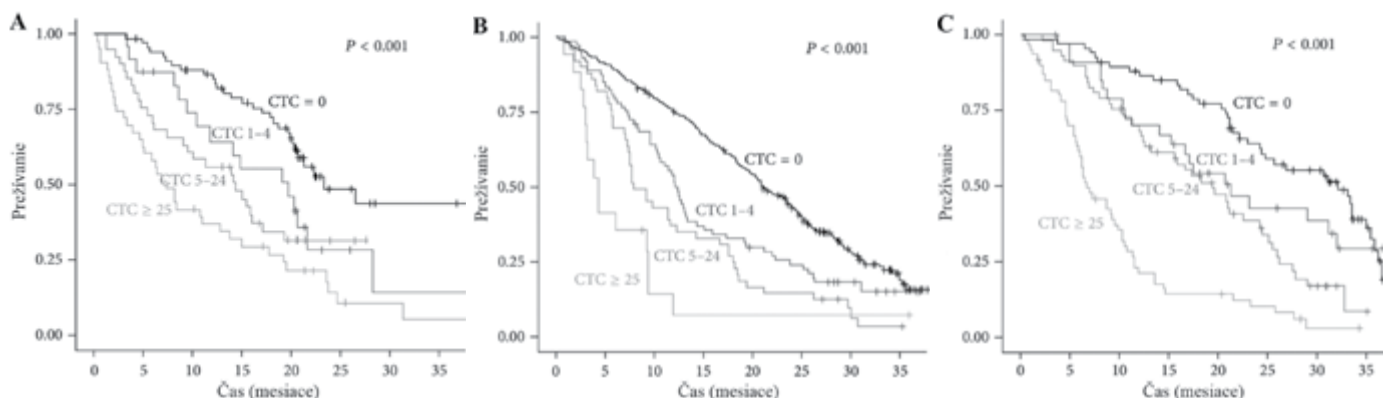
Klinické využitie cirkulujúcich nádorových buniek

Potenciálne využitie CTCs v klinickej praxi je rozsiahle, od prognostického a prediktívneho využitia až po detekciu minimálnej reziduálnej choroby a monitorovania ochorenia (**obrázok 2**).

CTCs ako prognostický a farmakodynamický biomarker.

FDA schválila stanovenie početnosti CTCs s presnými *cut-off* hodnotami a s využitím CellSearch® systému ako prognostický marker vybraných nádorových ochorení. V prípade rakoviny prsníka a prostaty je prítomnosť piatich CTCs na 7,5 ml krvi spojená s kratším prežívaním pacientov, pri kolorektálnom karcinóme (CRC) sú to 3 bunky na 7,5 ml krvi⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. Prognostická využiteľnosť enumerácie CTCs s využitím CellSearch® systému bola preukázaná aj v prípade nemalobunkového karcinómu pľúc (NSCLC) (*cut-off* hodnota 5 CTCs na 7,5 ml krvi)⁽²⁴⁾ a malobunkového karcinómu pľúc (SCLC), pri ktorom sú CTCs prítomné vo vyššom množstve než v ostatných typoch nádorových ochorení (0 – 44 896 buniek na 7,5 ml krvi s *cut-off* hodnotou 50 CTCs na 7,5 ml krvi)⁽¹³⁾.

Obrázok 2. Kaplanove-Meierove krivky získané pri sledovaní početnosti CTCs u pacientov s metastatickým nádorom prsníka (A), kolorekta (B) a prostaty (C). Súbory pacientov reprezentujú skupiny s identifikáciou 0, 1 – 4, 5 – 24 a > 24 CTC na 7,5 ml krvi pred začiatkom terapie. Upravené podľa Wit, Dalum a Terstappen, 2014⁽²³⁾.



Okrem použitia CTCs ako markerov prognózy nádorového ochorenia môžu byť CTCs využité ako **farmakodynamické biomarkery**. V reakcii na liečbu bol zaznamenaný pokles buď celkového počtu CTCs^(13,17,18,24) alebo ich subpopulácie⁽²⁵⁻²⁷⁾. V prípade väčšiny pacientov s SCLC, bolo podstatne znížené množstvo CTCs po jedinom cykle chemoterapie^(13,28) v súlade s vysokou mierou odpovede na liečbu na báze platiny⁽²⁹⁾. Bolo preukázané, že tieto zmeny sú nezávisle asociované s dobrou prognózou⁽¹³⁾. Naopak, nárast počtu CTCs po chemoterapii z priaznivej na nepriaznivú úroveň je spojený s celkovým kratším prežívaním pacientov s rakovinou prsníka, prostaty a CRC^(17,18,30). Ďalšie očakávané využitie CTC enumerácie je v ranom štádiu vzniku rakoviny, keď prítomnosť CTCs môže pomôcť vybrať pacientov, u ktorých je pravdepodobnosť, že budú mať prospech z adjuvantnej liečby.

CTCs ako prediktívny biomarker. V ideálnom prípade by CTCs bunky mohli byť využité ako tekuté biopsie, keď by bol výber špecifickej personalizovanej terapie uskutočnený na základe molekulárnych vlastností nádoru pacienta, zistených analýzou CTCs. Táto schéma bola vysvetlená v štúdiu analy-

zujúcich vzorky od pacientov s NSCLC pozitívnych na *EGFR* mutáciu, v ktorej bola u 19 z 20 pacientov identifikovaná očakávaná (na základe tkanivovej biopsie) aktívujúca *EGFR* mutácia⁽³¹⁾. Ďalším príkladom je analýza prešmyku EML4-ALK, ktorá sa vyskytuje u 3 – 5 % pacientov s NSCLC. Približne 60 % pacientov má dobrú odpoveď na inhibíciu ALK^(32,33). V ďalších štúdiách bola hodnotená expresia HER2 v CTCs v prípade rakoviny prsníka⁽³⁴⁾ a expresia androgénového receptora v prípade rakoviny prostaty^(35,36), ktoré by tiež mohli byť potenciálne využité ako prediktívne biomarkery. Niektoré ženy vykazovali rozdielny HER2 status v CTCs (pozitívny) a v primárnom nádore (negatívny), pričom prosperovali z terapie trastuzumabom⁽³⁷⁾. Toto zistenie potvrdzuje názor, že vlastnosti CTC buniek sú relevantnejším terapeutickým cieľom, keďže tieto bunky sú zodpovedné za vznik metastáz.

Grantová podpora

Táto publikácia vznikla s podporou grantov Agentúry na podporu výskumu a vývoja – APVV-14-0273 a APVV-14-0327.

LITERATÚRA

- Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(6): 453-458.
- Uhr JW, Pantel K. Controversies in clinical cancer dormancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(30): 12396-12400.
- Kim MY, Oskarsson T, Acharyya S, Nguyen DX, Zhang XH, Norton L, Massague J. Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell* 2009; 139(7): 1315-1326.
- Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(4): 239-252.
- Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, et al. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res* 2004; 10(24): 8152-8162.
- Fidler IJ. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst* 1970; 45(4): 773-782.
- Alix-Panabieres C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat Rev Cancer* 2014; 14(9): 623-631.
- Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; 119(6): 1420-1428.
- Edelman GM, Gallin WJ, Delouee A, et al. Early epochal maps of two different cell adhesion molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80(14): 4384-4388.
- Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, et al. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(35): 13180-13185.
- Shih JY, Yang PC. The EMT regulator slug and lung carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2011; 32(9): 1299-1304.
- Krebs MG, Metcalf RL, Carter L, et al. Molecular analysis of circulating tumour cells-biology and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol* 2014; 11(3): 129-144.
- Hou JM, Krebs MG, Lancashire L, et al. Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2012; 30(5): 525-532.
- Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell* 2014; 158(5): 1110-1122.
- Alix-Panabieres C, Schwarzenbach H, Pantel K. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Annu Rev Med* 2012; 63: 199-215.
- Riethdorf S, Fritsche H, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res* 2007; 13(3): 920-928.
- de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14(19): 6302-6309.
- Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26(19): 3213-3221.

19. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004; 351(8): 781-791.
20. Pecot CV, Bischoff FZ, Mayer JA, et al. A novel platform for detection of CK+ and CK-CTCs. *Cancer Discov* 2011; 1(7): 580-586.
21. Ramirez JM, Fehm T, Orsini M, et al. Prognostic relevance of viable circulating tumor cells detected by EPISPOT in metastatic breast cancer patients. *Clin Chem* 2014; 60(1): 214-221.
22. Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(5): 329-340.
23. de Wit S, van Dalum G, Terstappen LW. Detection of circulating tumor cells. *Scientifica (Cairo)* 2014; 2014: 819362.
24. Krebs MG, Sloane R, Priest L, et al. Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29(12): 1556-1563.
25. de Bono JS, Attard G, Adjei A, et al. Potential applications for circulating tumor cells expressing the insulin-like growth factor-I receptor. *Clin Cancer Res* 2007; 13(12): 3611-3616.
26. Liu Z, Fusi A, Schmittl A, et al. Eradication of EGFR-positive circulating tumor cells and objective tumor response with lapatinib and capecitabine. *Cancer Biol Ther* 2010; 10(9): 860-864.
27. Riethdorf S, Muller V, Zhang L, et al. Detection and HER2 expression of circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant GeparQuattro trial. *Clin Cancer Res* 2010; 16(9): 2634-2645.
28. Hiltermann TJ, Pore MM, van den Berg A, et al. Circulating tumor cells in small-cell lung cancer: a predictive and prognostic factor. *Ann Oncol* 2012; 23(11): 2937-2942.
29. Evans WK, Osoba D, Feld R, Shepherd FA, Bazos MJ, DeBoer G. Etoposide (VP-16) and cisplatin: an effective treatment for relapse in small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1985; 3(1): 65-71.
30. Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, et al. Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clin Cancer Res* 2006; 12(14 Pt 1): 4218-4224.
31. Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N Engl J Med* 2008; 359(4): 366-377.
32. Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2013; 368(25): 2385-2394.
33. Camidge DR, Bang YJ, Kwak EL, et al. Activity and safety of crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: updated results from a phase 1 study. *Lancet Oncol* 2012; 13(10): 1011-1019.
34. Hayes DF, Walker TM, Singh B, et al. Monitoring expression of HER-2 on circulating epithelial cells in patients with advanced breast cancer. *Int J Oncol* 2002; 21(5): 1111-1117.
35. Attard G, Swennenhuis JF, Olmos D, et al. Characterization of ERG, AR and PTEN gene status in circulating tumor cells from patients with castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res* 2009; 69(7): 2912-2918.
36. Jiang Y, Palma JF, Agus DB, et al. Detection of androgen receptor mutations in circulating tumor cells in castration-resistant prostate cancer. *Clin Chem* 2010; 56(9): 1492-1495.
37. Liu Y, Liu Q, Wang T, et al. Circulating tumor cells in HER2-positive metastatic breast cancer patients: a valuable prognostic and predictive biomarker. *BMC Cancer* 2013; 13:202.



RNDr. Gabriel Minárik, PhD.

Lekárska genetika, Medirex, a. s.
Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava
e-mail: gabriel.minarik@medirex.sk



ALL YOU NEED FOR PROTEOMICS

- Protein expression
- Protein extraction
- Protein purification
- Protein analysis & detection



Request your copy from your local VWR sales office or sk.vwr.com

Štítná žláza v tehotenství

Drahomíra Springer, Tomáš Zima

Ústav lékařské biochemie a laboratorní medicíny, Všeobecná fakultní nemocnice
a 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha, Česká republika

Tyreoidální hormony hrají při vývoji plodu zásadní úlohu při růstu mnoha tkání, zvláště se to týká kostry a mozku. Během kritického období v prvním trimestru těhotenství je mateřský tyroxin pro tento vývoj zásadní, protože ke kompletnímu vývoji hypotalamu, hypofýzy a štítné žlázy dochází u plodu až okolo 12. – 14. týdne těhotenství. Pokud těhotná trpí nedostatečností štítné žlázy, je potřeba zahájit léčbu co nejdříve. Po 14. týdnu těhotenství už může být mozek plodu nenávratně poškozen nedostatkem tyreoidálních hormonů.

Prevalence manifestní hypotyreózy v těhotenství je asi 0,3-0,5 %. Prevalence subklinické hypotyreózy se podle literatury pohybuje mezi 2,5 až 17 % a je silně závislá na horním limitu TSH, který je pro těhotenství nastaven. Hyperthyreóza se vyskytuje asi u 0,1 – 1 % těhotenství. Pozitivita protilátek proti tyreoidální peroxidáze (TPOAb) u žen ve fertilním věku se pohybuje okolo 5,1 až 12,4 %. TPOAb-positivita může ovlivňovat proces otěhotnění i samotné těhotenství a těhotenské ztráty. Navíc TPOAb pozitivní ženy mají zřetelně vyšší riziko vzniku hypotyreózy v těhotenství i po porodu.

Laboratorní diagnostika poruch štítné žlázy je postavena na vyšetření hladiny TSH, pro který musí být v těhotenství stanoveny vlastní referenční intervaly, protože hladina TSH je v těhotenství fyziologicky nižší.

Všeobecný screening hypotyreózy v těhotenství je kontroverzní a jeho zavedení se v jednotlivých zemích liší. V současné době je i ve světových doporučeních preferováno vyšetřování pouze rizikové skupiny žen, ale mnoho studií poukazuje na to, že až jedna polovina žen s poruchou funkce štítné žlázy při tomto systému vyšetřování unikne. Vyšetření štítné žlázy v těhotenství by mělo vždy zahrnovat stanovení TSH a TPOAb, bez ohledu na systém screeningu. Tento přehled shrnuje současný stav poznání ohledně dysfunkcí štítné žlázy v těhotenství a jejich vliv na těhotenství a vývoj plodu. Jsou zde uvedeny i používané analytické metody a referenční intervaly použitelné v těhotenství.

Klíčová slova: autoimunitní onemocnění, štítná žláza, těhotenství, screening, TSH, anti-TPO protilátky

Thyroid in Pregnancy

Thyroid hormones are crucial for the growth and maturation of many target tissues, especially the brain and skeleton. During critical periods in the first third of pregnancy, maternal thyroxine is essential for the foetal development as it supplies the thyroid hormone-dependent tissues. The ontogeny of mature thyroid function involves organogenesis and maturation of the hypothalamus, pituitary, and the thyroid gland; and it is almost complete by the 12th – 14th gestational weeks. In case of maternal hypothyroidism, substitution with levothyroxine must start in the early pregnancy. After the 14th gestational week, the foetal brain development may already be irreversibly affected by lack of thyroid hormones.

The prevalence of manifest hypothyroidism in pregnancy reaches about 0.3-0.5%. The prevalence of subclinical hypothyroidism varies between 4-17%, strongly depending on the definition of the upper TSH cut-off limit. Hyperthyroidism occurs in 0.1%–1% of all pregnancies. Positivity for antibodies against thyroid peroxidase (TPOAb) is common in women of childbearing age and has been reported between 5.1% and 12.4%. TPOAb-positivity may be regarded as a manifestation of a general autoimmune state which may alter the fertilization and implantation process or cause early missed abortions. Women positive for TPOAb are at a significant risk of developing hypothyroidism during pregnancy and postpartum.

The laboratory diagnosis of thyroid dysfunction during pregnancy is based upon serum TSH concentration. Results of multiple international studies point towards creation of trimester-specific reference intervals for TSH in pregnancy. TSH in pregnancy is physiologically lower compared to the non-pregnant population.

Screening for hypothyroidism in pregnancy is controversial, and its implementation varies from a country to a country. Until now, the case-finding approach of screening of the high-risk women is preferred in most countries. However, numerous studies have shown that one-third to one-half of women with thyroid disorders escape the case-finding approach. Screening for thyroid disorders in pregnancy should include assessment of both TSH and TPOAb, regardless the screening approach.

The present review summarizes the current knowledge on the causes of thyroid dysfunction in pregnancy and its effects on pregnancy course and foetal development. We display an overview of the analytical methods and their reference intervals in pregnancy.

Keywords: autoimmune thyroid disease, pregnancy, screening, thyroid-stimulating hormone, anti-thyroperoxidase antibodies

NewsLab, 2018; roč. 9 (2): 113 – 119

Těhotenství je komplexní fyziologický proces, při kterém probíhá řada hormonálních a metabolických změn. Těmito změnami i zátěží, která je na štítnou žlázu během těhotenství kladena, může být iniciována porucha její funkce⁽¹⁾. Zvyšuje se potřeba tyreoidálních hormonů, což je důsledkem transplacentárního přenosu hormonů štítné žlázy matky k plodu. Hormony štítné žlázy jsou důležitým faktorem diferenciaci buněk během nitroděložního vývoje a působí zvláště na vývoj mozku⁽²⁾. Štítná žláza zdravé těhotné ženy s dostatečným příjmem jódu se na tyto požadavky adaptuje a je schopna se s nimi vyrovnat⁽³⁾. Do 14. týdne je plod zcela závislý na matčině produkci tyroxinu, později jen částečně.

V těhotenství indukují estrogény vzestup koncentrací globulinu vázajícího tyroxin (TBG); v důsledku toho stoupá i koncentrace celkového T3 a T4. Zvětšuje se distribuční prostor hormonů štítné žlázy díky zvyšujícímu se objemu plazmy, metabolický obrat tyroxinu je zrychlen, potřeba hormonů štítné žlázy stoupá až o 50 %. V prvním trimestru gravidity dochází k vysokému nárůstu hladiny choriového gonadotropinu (hCG), který je ve vysoké koncentraci stimulatorem tvorby tyreoidálních hormonů prostřednictvím receptorů pro TSH⁽⁴⁾ a vede tak fyziologicky ke zvyšování produkce mateřského T4 a T3 v době kritického vývoje mozkové kůry (11. – 14. týden).

Na produkci tyreoidálních hormonů má kromě výše zmíněných fyziologických podmínek vliv také dostatečné zásobení organismu jódem.

Potřeba jódu v těhotenství

Buňka tyreoidy aktivně vychytává potřebný jód v podobě jodidového iontu z krve. Světová zdravotnická organizace (WHO) stanovila doporučený denní příjem jódu pro netěhotné a nekojící ženy starší 14 let na 150 mg jódu denně⁽⁵⁾. Při příjmu menším než 50 mg/den není tyreoida schopna udržet přiměřenou hormonální sekreci, zvětšuje se a vzniká struma, někdy i hypotyreóza. Zásobní množství jódu je ve štítné žláze značné a je ochranou před obdobím eventuálního deficitu. V těhotenství stoupá potřeba jódu vzhledem k vyšší produkci tyroxinu, v pozdějším stádiu těhotenství se pokrývá i potřeba plodu pro jeho vlastní produkci tyreoidálních hormonů. Zvyšuje se i renální clearance jódu. Pro těhotné ženy se tedy doporučená dávka zvyšuje na 250 mg jódu denně⁽⁶⁾. Platí to v zemích, kde je dlouhodobě prováděna jodizace soli, mezi které patří i Česká republika a Slovensko, kde je úprava kuchyňské soli prováděna od padesátých let minulého století, takže populaci našich těhotných lze považovat za ženy s dobrým jódovým zásobením⁽⁷⁾.

Význam hormonů štítné žlázy pro plod

Vliv těžkého jodového deficitu nebo vrozené hypotyreózy na plod a novorozence je dlouhodobě znám, stejně jako vliv těžké mateřské hypotyreózy. Z mnoha současných studií ale plyne další závažný závěr, a to, že i mírná mateřská hypotyreóza může ovlivnit vývoj fetálního mozku^(8,9,10). Dostatečná produkce tyreoidálních hormonů je tak mimořádně významná zvláště na počátku těhotenství, protože hormony štítné žlázy jsou důležitým faktorem diferenciaci buněk během nitroděložního vývoje. Tyroxin je zásadně důležitý v mnoha aspektech vývoje mozku včetně neurogeneze, migrace neuronů, formace axonů a dendritů, myelinizace, synaptoge-

neze a regulace neurotransmiterů. K celému vývoji dochází během několika měsíců, ale kritickým obdobím je druhý trimestr těhotenství⁽¹¹⁾. Plod přitom začíná produkovat vlastní hormony štítné žlázy až od 20. týdne těhotenství.

Nepoznaná porucha funkce štítné žlázy spojená s hypotyreoxinemií matky, která nemusí ohrozit průběh gravidity, může mít negativní vliv na psychomotorický vývoj dítěte. Včasná a správná diagnóza a léčba jsou spolehlivou prevencí následků⁽¹²⁾.

Poruchy funkce štítné žlázy v těhotenství

Podle mnoha rozsáhlých studií jsou poruchy funkce štítné žlázy v těhotenství spojené s vážnými mateřskými, fetálními a novorozeneckými komplikacemi: spontánní potraty, předčasné porody, preeklampsie, gestační diabetes, císařské řezy, delší pobyt na jednotce intenzivní péče, abrupce placenty nebo poporodní krvácení. Ženy s TSH vyšším než 6 mU/l ve druhém trimestru mají čtyřikrát vyšší riziko úmrtí plodu než ženy s TSH pod tímto limitem⁽²⁾.

Hypotyreóza

U zdravých těhotných žen jejich štítná žláza zvládá zvýšené nároky během těhotenství, ale u žen, jejichž štítná žláza má nějaká omezení, způsobená autoimunitním onemocněním nebo nedostatkem jódu, může dojít k rozvoji hypotyreózy^(1,13). Její klinické příznaky jsou stejné jako u netěhotných, ale někdy je těžké je odlišit od nespecifických potíží provázejících běžné těhotenství. U většiny žen je hypotyreóza objevena až po stanovení zvýšené koncentrace TSH při laboratorním vyšetření.

Těhotenská hypotyreóza je často autoimunitního původu, proto se při diagnostice vychází nejen z koncentrací TSH a FT4, ale stanovuje se také pozitivita protilátek proti tyreoidální peroxidáze (TPOAb), někdy i protilátek proti thyroglobulinu (TgAb). Manifestní hypotyreóza, která je typická zvýšenou hladinou TSH a sníženou hladinou tyroxinu, není u těhotných obvyklá (0,3-0,5 %), subklinická forma, kdy je sérová hladina TSH zvýšená, ale FT4 je v referenčním intervalu, se vyskytuje u minimálně 2,5 % těhotenství^(14,15).

U žen může být hypotyreóza spojena s neplodností a porodními komplikacemi. Nedostatek tyreoidálních hormonů může vést k nevratnému poškození plodu; nedostatečné diferenciaci nervových buněk, může být ovlivněn vývoj nervového systému i psychomotorických funkcí. Hypotyreóza matky může vést k narození dětí se signifikantně nižším IQ^(9,16) a hypotyreoxinémie může zapříčinit sníženou schopnost vyjadřování i neverbální komunikace^(17,18).

Hypertyreóza

Hypertyreóza (tyreotoxikóza) je definována jako klinický syndrom hypermetabolismu a hyperaktivity důsledkem vysokých hladin FT4 a/nebo FT3. Současně je TSH sníženo pod referenční interval. Gravesova-Basedowova choroba (GB) je nejčastější příčinou autoimunitní hypertyreózy v těhotenství a objevuje se u 0,1 – 1 % těhotných žen⁽¹³⁾. V první polovině těhotenství se nejčastěji vyskytuje (1 – 3 %) přechodná tyreotoxikóza, syndrom gestační hypertyreózy. Je definována hraničními nebo lehce zvýšenými hodnotami FT4 a téměř neměřitelným TSH, negativními protilátkami a výsledkem sonografie. Jde o vliv vysokých hladin hCG, který působí na TSH

receptorech, řeší se obvykle samovolně s poklesem hCG⁽⁴⁾. Pokud je u těhotné diagnostikována subklinická hypertyreóza, není spojena se zhoršeným výsledkem těhotenství^(18,19) a není nezbytné ji tedy ani léčit. Tyreotoxikóza GB typu je autoimunitního původu, vyskytuje se u 0,2 % těhotných žen. Nedostatečně kontrolovaná GB toxikóza v těhotenství může být komplikována preeklampsií, potratem, předčasným porodem, abrupcí placenty, malformacemi a nízkou porodní váhou plodu. Tyreotoxikóza GB typu má tendenci v průběhu těhotenství se zmírňovat. Pokud je diagnóza stanovena správně a včas zahájena léčba, je prognóza pro matku i plod velmi dobrá⁽²⁰⁾.

Autoimunitní onemocnění

U mladých žen bez klinických příznaků poruchy funkce štítné žlázy se často vyskytují pozitivní anti-TPO protilátky. Ženy s autoimunitní chorobou štítné žlázy, známou ještě před otěhotněním, by měly být sledovány pomocí TSH celé těhotenství. Poporodní tyreoiditida je syndrom přechodné nebo trvalé poruchy funkce štítné žlázy, který se objeví v prvním roce po porodu a je způsoben autoimunitním zánětem štítné žlázy. Incidence poporodních tyreoiditid se uvádí 5 – 9 % všech žen a hlavním rizikovým faktorem je přítomnost latentní autoimunitní tyreoiditidy⁽²⁰⁾. Poporodní tyreoiditida se obvykle nevyskytne u žen bez zvýšených protilátek proti štítné žláze; její výskyt byl pozorován u žen s pozitivními protilátkami a projeví se u 50 % z nich. Poporodní tyreoiditida pak přejde v trvalou hypotyreózu v 25 – 30 % případů^(21,22,23).

Malignity štítné žlázy se vyskytují v těhotenství jen výjimečně.

Stanovované parametry funkce štítné žlázy v těhotenství

Diagnostika poruch funkce štítné žlázy se provádí nejčastěji pomocí dvou laboratorních markerů TSH a FT4. Stanovení TSH je základní vyšetřovací metodou pro posouzení funkční poruchy štítné žlázy. Stanovení FT4 umožňuje zjistit množství biologicky dostupného tyroxinu pro těhotnou ženu i její plod a není ovlivněno koncentrací vazebných proteinů⁽²⁴⁾. Hladina FT4 je ovlivněna dostatečným množstvím jódu a také délkou těhotenství. Anti-TPO protilátky jsou markerem autoimunitního procesu probíhajícího ve štítné žláze a jejich stanovení je diagnosticky i prognosticky velmi významné. Přítomnost anti-TPO protilátek v těhotenství také naznačuje nebezpečí výskytu poporodní tyreoiditidy, proto je vhodné toto vyšetření provést současně se stanovením TSH a FT4⁽²⁵⁾.

Jodurie

Vhodným biomarkerem pro stanovení saturace jódem v populaci je stanovení koncentrace jodidového aniontu v moči (jodurie), které může eventuálně sloužit i k vyloučení intoxikace jódem jako příčiny hypertyreózy. Nejužívanější laboratorní metodou pro stanovení jodurie je Sandellova-Kolthoffova metoda založená na fotometrickém stanovení Ce^{3+} iontů, které vznikají v redox systému Ce^{4+}/As^{3+} katalytickým působením jodidových aniontů. Fotometrickému stanovení předchází mineralizace vzorku v kyselém prostředí. Metoda je časově náročná, nepříliš vhodná do současných klinických laboratoří. Stanovení jodurie není běžnou metodou a suplementace jódem je tak vyšetřována jen výjimečně⁽²⁶⁾.

Stanovení hormonů štítné žlázy a TSH

K vyšetřování koncentrací tyreoidálních hormonů se běžně používají imunoanalytická stanovení. Rozdílná kvalita používaných protilátek, nastavení metody na automatickém analyzátoru a odlišné výrobní postupy mohou vést k tomu, že analytické soupravy jednotlivých výrobců in vitro diagnostiky (IVD) poskytují často nesrovnatelné výsledky. Imunoanalýza může být také ovlivněna zkříženými reakcemi s podobnými sloučeninami nebo metabolity.

Naproti tomu kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC/MS/MS) nabízí výrazné zlepšení specifity a senzitivity stanovení tyreoidálních hormonů v porovnání s konvenčními imunoanalytickými metodami a pravděpodobně se v blízké době stane diagnostickým standardem⁽²⁷⁾. Při stanovení FT4 referenčním postupem je pro oddělení volné formy tyroxinu od vázané používána rovnovážná dialýza. Používanější, rychlejší a spolehlivější metodou, která byla zvolena i jako referenční metoda pro stanovení tyroxinu se ukázala metoda LC/MS/MS s izotopovou dilucí (ID). V současné době testujeme postup stanovení systémem LC/MS/MS bez zvláštní extrakce pouze po odstranění vazebných proteinů. Imunoanalýza a tandemová hmotnostní spektrometrie poskytují výsledky, které není možné zaměňovat. Tyto rozdíly jsou největší ve vyšších koncentracích. Ze srovnání IA a MS/MS metod plyne, že imunoanalýza nemá dostatečnou specifitu a také bývá často ovlivněna některými interferujícími látkami – od změněných vazebných proteinů po nespecifické heterofilní protilátky typické pro těhotenství. Nevýhodou použití MS/MS je požadavek zkušené a vyškolené obsluhy. Navíc rychlost odezvy není příliš vysoká a doba zdržení vzorku v laboratoři je také mnohem delší než u imunoanalýzy⁽²⁸⁾.

Stanovení referenčních intervalů pro parametry funkce štítné žlázy v těhotenství

Fyziologické změny štítné žlázy v těhotenství a působení vysokých hladin hCG jsou příčinou nezbytnosti stanovení referenčních intervalů v těhotenství. Zásadní je správně a včas identifikovat v těhotenství ženy, které by měly potenciálně užít z nasazení léčby. Referenční hodnoty TSH v graviditě se liší v závislosti na laboratorních metodách a existují rozdíly mezi různými populacemi. Na základě výsledků mnoha světových pracovišť je třeba konstatovat, že není možné používat jediné obecně platné referenční intervaly pro tyreoidální parametry v těhotenství⁽²⁹⁾.

Podle doporučení IFCC by měly být referenční intervaly založeny na stanovení 2,5 a 97,5 percentilu v populaci s dostatečným jódovým zásobením⁽²⁾. Stanovení neparametrického cut-off by mělo být provedeno v dostatečně velké, neselektované populaci zdravých kontrolních osob. U TSH a někdy i u FT4 existuje vysoká interindividuální variabilita a šikmé rozložení jejich hladin ve skupině těhotných. Pokud se jedná o stanovení referenčních intervalů pro TSH a FT4, je potřeba vybrat těhotné ženy, u kterých jsou vyloučeny faktory stimulační nebo inhibující funkci štítné žlázy. Preferována je populace anti-TPO negativních žen bez osobní či rodinné historie poruch štítné žlázy a dalších faktorů, jako je užívání některých léků nebo vícečetné těhotenství.

Různí autoři publikují poměrně širokou škálu referenčních intervalů pro TSH a FT4 během časného těhotenství vypočít-

taných dle mezinárodních doporučení z dostatečně velkých skupin anti-TPO negativních žen^(31,32,33). Horní hranice pro TSH je uváděna od 2,15 do 4,68 mU/l.

Klinicky je významný fakt, že při použití nevhodných limitů by docházelo ke zbytečné léčbě eutyroidních žen, případně nedostatečné léčbě při použití referenčních intervalů pro běžnou populaci. I když některé dřívější studie ukazovaly, že mezi výsledky získanými rozdílnými komerčními soupravami nejsou velké rozdíly, při porovnání referenčních intervalů pro těhotnou populaci jsou rozdíly poměrně značné, jak je možné vidět i v **tabulce 1** shrnující referenční intervaly stanovené různými pracovišti v Evropě, Asii i USA a zahrnující i rozdíly mezi rasově odlišnými populacemi⁽³⁴⁾.

Světová doporučení Endocrine Society⁽⁵⁾, American Thyroid Association (ATA)⁽¹³⁾ a European Thyroid Association (ETA)⁽²¹⁾ uvádí, že trimestr specifické referenční intervaly by měly být stanoveny v každém diagnostickém centru. Pokud to není možné, lze použít postup uvedený v **tabulce 2**.

Screening poruch štítné žlázy

Všeobecný screening tyreopatií v těhotenství je dlouhodobě kontroverzním tématem. Hlavní rozpory jsou v rozsahu screeningu (všeobecný nebo cílený na rizikové skupiny)^(45,46,72). V průběhu pokračujících diskusí se odborníci přiklánějí k všeobecnému screeningu stále častěji⁽⁴⁷⁾. Pro vyšetření funkce štítné žlázy jsou navrhovány tři sérové markery TSH, anti-TPO protilátky a FT4, přičemž každý z nich přináší jiné informace. Screening tyreopatií by měl být proveden u všech žen nejpozději v prvním trimestru gravidity. Za předpokladu suplementace všech těhotných žen jódem (100 mg denně) a s přihlédnutím k ekonomickým aspektům se pro těhotenský screening jeví jako nejvýhodnější

minimální kombinace TSH a anti-TPO protilátek⁽²⁶⁾. Ošetřující gynekolog by měl u všech těhotných žen zhodnotit rizikové faktory, uvedené dále, a při pozitivitě kteréhokoliv z nich provést vyšetření TSH a anti-TPO.

Rizikové faktory tyreopatie v těhotenství:

- Tyreopatie v osobní nebo rodinné anamnéze
- Věk nad 30 let
- Příznaky tyreoidální dysfunkce nebo struma
- Pozitivní anti-TPO
- DM 1. typu nebo jiné autoimunitní onemocnění
- Potrat, infertilita nebo předčasný porod v anamnéze
- Ozáření hlavy a/nebo krku v anamnéze
- Závažná obezita s BMI ≥ 40 kg/m²
- Užívání amiodaronu, lithia, aplikace cytokinů, nedávná aplikace jodového rtg. kontrastu
- Žena žije v oblasti se středním či těžkým jodovým deficitem

Doporučení Americké tyreoidologické společnosti (ATA) navrhuje cílený screening pouze u rizikových skupin žen⁽¹³⁾.

U žen s nově zachycenou hypotyreózou, žen již dříve léčených pro hypotyreózu, eutyroidních žen s pozitivními TPOAb léčených euthyroxinemickou léčbou nebo eutyroidních žen s pozitivními TPOAb neléčených se provádí kontroly TSH v 5., 10., 14., 20., někdy 30. týdnu gravidity a pak po šestinedělí a podle toho se upravuje nebo i zahajuje léčba levotyroxinem. Tyto kontroly obvykle provádí endokrinolog. U žen s hypertyreózou kromě TSH se monitoruje FT4 ve stejných intervalech jako u hypotyreózy. Zvýšenou péči v průběhu 1. roku po porodu vyžadují ženy s pozitivními TPOAb kvůli možnosti vývoje poporodní tyreoiditidy. Těhotné ženy s eutyroidními hladinami TSH i FT4 mají v případě

Tabulka 1. Referenční intervaly pro TSH během prvního trimestru těhotenství vypočítané dle mezinárodních doporučení u anti-TPO negativních žen (upraveno dle Medici 2015)⁽³⁴⁾

Studie a stát	Metoda	n	Týden těhotenství	TSH (mU/l)	
				Medián	2,5 – 97,5 percentil
Bestwick et al., Itálie 2014 (35)	AutoDELFA	5 505	< 16	1,70	0,04 – 3,19
Bestwick et al., UK 2014 (29)	Advia Centaur, Siemens	16 334	< 16	1,11	0,06 – 3,50
Bocos – Terraz et al., Španělsko 2009 (36)	Architect Abbott	481	< 14	0,94	0,41 – 2,63
Gilbert et al., Austrálie 2008 (30)	Architect Abbott	1 817	9 – 13	0,74	0,02 – 2,15
Hadow et al., USA 2004 (31)	Immulite 2000, Siemens	1 126	8 – 13	1,00	0,08 – 3,61
Lambert-Messerlian et al., USA 2008 (37)	Immulite 2000, Siemens	8 351	T1	1,00	0,12 – 3,37
La'ulu a Roberts, USA 2011 (38)	Architect Abbott	2 172	10 – 13	0,94	0,02 – 2,69
Li et al., Čína 2014 (39)	Cobas Elesys 601, Roche	640	7 – 12	1,47	0,10 – 4,34
Männistö et al., Finsko 2011 (40)	Architect Abbott	4 333	T1	1,11	0,08 – 3,54
Medici et al., Holandsko 2011 (41)	Vitros ECI Ortho c clinical diag.	5 186	8 – 18	1,30	0,03 – 4,04
Pearce et al., USA 2008 (42)	Advia Centaur, Siemens	585	< 14	1,10	0,04 – 3,60
Quinn et al., Rusko 2005 (43)	AxSYM Abbott	380	T1	1,66	0,09 – 4,67
Springer et al., Česká republika 2009 (44)	Advia Centaur, Siemens	4 337	9 – 11	1,21	0,06 – 3,67
Stricker et al., Švýcarsko 2007 (29)	Architect Abbott	575	6 – 12	0,95	0,07 – 2,82
Vaidya et al., UK 2007 (45)	Modular E 170, Roche	1 089	< 12	1,08	0,14 – 3,19

T1 – 1. trimestr těhotenství

Tabulka 2. Rozhodovací meze pro pozitivní kombinovaný tyreoidální test v graviditě

Test je pozitivní, je-li alespoň jeden z parametrů (TSH, TPOAb a FT4) mimo referenční interval specifický pro graviditu v dané laboratoři. Nejsou-li specifické referenční intervaly k dispozici, jsou za pozitivní považovány následující hodnoty:

- hodnota TSH větší než horní limit referenčního intervalu metody ponížený o 0,5 mU/l nebo hodnota TSH nižší než 0,1 mU/l
- hodnota TPOAb vyšší, než je dvojnásobek horního limitu udávaného výrobcem
- hodnota FT4 mimo referenční interval udávaný výrobcem

pozitivity anti-TPO protilátek asi 50% pravděpodobnost, že se u nich rozvine poporodní tyreoiditida, která přejde v trvalou hypotyreózu v 25 – 30 % případů.

Zkušenosti z České republiky

V České republice se už v roce 2006 objevilo úsilí o zavedení všeobecného vyšetřování štítné žlázy v těhotenství. Od té doby se uskutečnilo mnoho studií, přičemž všechny dospěly k závěru, že mezi těhotnými ženami jsou tyreopatie, zvláště autoimunitní, velmi rozšířené^(44,48,49,50).

V letech 2009 – 2010 jsme prováděli pilotní studii podporovanou Všeobecnou zdravotní pojišťovnou ve 13 českých regionech s dobrým laboratorním i endokrinologickým zájmem. Cílem projektu bylo zjistit prevalence tyreopatií a tyreoidálních autoimunit u těhotných žen a stanovit optimální kombinaci a výtěžnost diagnostických testů. Odběr krve byl spojen s vyšetřováním prvotrimestrálního testu pro stanovení rizika vývoje plodu s Downovým syndromem (9. – 13. týden těhotenství). Všechny tři testy TSH, FT4 a anti-TPO byly vyšetřeny celkem u 2 937 žen. Výsledky ukázaly, že 18 % asymptomatických žen mělo alespoň jeden patologický nález ve vyšetřovaných parametrech. Hypertyreóza byla prokázána u 0,5 % žen, další snížené hladiny byly způsobeny vysokou hladinou hCG. Hypotyreóza daná zvýšenou hladinou TSH a/nebo sníženou hladinou FT4 se projevila u 7,8 % žen. Významná hypotyreoxinémie byla nalezena ve 3,7 % případů. TPOAb pozitivitu mělo 8,9 % všech žen. V roce 2012 jsme tyto výsledky potvrdili širší studií, která zahrnuje 5 223 těhotných žen^(44,51). Projekt vedl k závěrům, že provádění všeobecného screeningu by mělo být v naší republice velmi významně doporučeno. Navíc se potvrdilo, že je možné vytvořit v republice síť endokrinologů, kteří jsou ochotni přijmout těhotnou do své ordinace během jednoho týdne.

Stanovení markerů funkce štítné žlázy různými analytickými systémy

Ošetřující lékař by měl mít přehled o tom, jaký imunoanalytický systém využívá jeho laboratoř a zda má stanovené specifické referenční intervaly pro těhotenství alespoň pro TSH. V roce 2014 jsme stanovili referenční intervaly pro TSH a FT4 v prvním trimestru těhotenství. Kontrolovali jsme hladinu anti-TPO protilátek, zda je možné používat cut-off doporučený výrobcem reagensů⁽⁵²⁾. Vyšetřovaná skupina zahrnovala 216 těhotných žen v 9. – 13. týdnu těhotenství, které potvrdily, že nemají v osobní ani rodinné anamnéze tyreopatii. Stanovili jsme hladinu TSH, FT4, a TPOAb v séru současně na sedmi odlišných imunoanalyzátozech, které reprezentují celosvět-

ově nejužívanější systémy. Pro TSH a FT4 jsme stanovili 95% referenční interval (2,5 – 97,5 percentilu) za použití parametrického přístupu; pro TPOAb jsme stanovili limit pozitivity jednoduchou neparametrickou metodou (95. percentil všech hodnot). Standardizace stanovení TPOAb je nemožná, proto by bylo vhodnější vyjadřovat výsledek stanovení těchto protilátek jako TPOAb-positivní nebo TPOAb-negativní. Společnou hodnotu není možné stanovit.

V tabulce 3 je přehled výsledků pro všech sedm analytických systémů.

Závěry

Poruchy štítné žlázy v těhotenství jsou časté a představují hlavní epidemiologické riziko týkající se současného a budoucího těhotenství, stejně jako vývoje dětí. Těhotné ženy se sníženou funkční rezervou kvůli jodové insuficienci nebo autoimunitě štítné žlázy nemohou potřebně zvýšit produkci hormonů štítné žlázy a vyvine se u nich subklinická nebo zjevná hypotyreóza.

Spojení mezi zjevnou hypotyreózou, gynekologickými komplikacemi a poruchami neuropsychologického vývoje dětí bylo jasně stanoveno, proto je léčba levotyroxinem všeobecně doporučena. Manifestní hypotyreóza postihuje minimálně 0,4 % těhotných žen. Při přepočtu na populaci 10 milionů obyvatel se 100 000 porody ročně, lze konstatovat, že 400 novorozenců ročně je ohroženo vážnými neuropsychologickými komplikacemi.

Screening tyreoidálních dysfunkcí by měl být v časných fázích těhotenství prováděn minimálně u rizikové populace, i když mnohé autority se přiklánějí ke screeningu všeobecnému. Stanovení TSH a anti-TPO protilátek není náročné a léčba levotyroxinem není drahá. Významné je užívání specifických referenčních intervalů pro TSH v těhotenství.

Na léčbu subklinické formy tyreopatií v těhotenství se názory odborníků rozcházejí. Některé celosvětově užívané imunoanalytické systémy poskytují odlišné výsledky a tím i referenční intervaly jsou vzájemně nesrovnatelné. Není možné používat jednotnou rozhodovací horní mez pro TSH.

Na základě mnoha studií je zřejmé, že těhotné anti-TPO pozitivní ženy by měly být sledovány v průběhu těhotenství kvůli riziku rozvoje hypotyreózy, proto je doporučeno vyšetřovat kromě TSH také anti-TPO protilátky, ať už jde o screening univerzální nebo cílený na rizikovou skupinu žen. Riziko rozvoje poporodní tyreoiditidy u anti-TPO pozitivních žen je podloženo dostatečným množstvím studií. Naproti tomu riziko neplodnosti, potratu, předčasného porodu a vrozených vad u plodu si zasluhuje ještě podrobnější potvrzení.

Tabulka 3. Referenční intervaly pro TSH, FT4 a TPOAb stanovené současně na sedmi rozdílných analytických systémech v jednom souboru 216 zdravých těhotných žen v 9. – 13. týdnu těhotenství⁽⁵²⁾

Analytický systém	FT4 (pmol/l)		TSH (mU/l)		TPOAb	(kU/l)
	Median	Referenční interval	Median	Referenční interval	Median	Cut-off
Architect i2000SR, Abbott	14,41	11,76 – 17,7	1,37	0,22 – 3,27	9	11,2
UniCel Dxl 800 Beckman Coulter	10,43	8,13 – 13,2	1,33	0,20 – 3,23	0,7	7,6
Immulin 2500 Siemens	12,95	10,44 – 16,39	1,16	0,17 – 2,83	5	16,7
Advia Centaur Siemens	14,59	11,83 – 18,37	1,39	0,22 – 3,34	7	54
Modular E170 Roche	14,66	11,49 – 18,62	1,56	0,25 – 3,81	33	20,1
AIA 2000 Tosoh Bioscience	13,4	9,97 – 17,25	1,09	0,18 – 2,78	5,7	7
RIA/IRMA Immunotech Beckman Coulter	15,18	12,31 – 18,67	1,53	0,25 – 3,91	0,26	14

V České republice byla prokázána proveditelnost všeobecného screening poruch funkce štítné žlázy s možností následné endokrinologické péče. Všeobecný screening autoimunitní tyreoiditidy je doporučen Českou endokrinologickou

společností ČLS JEP i Českou společností klinické biochemie ČLS JEP a je prováděn v některých velkých zdravotnických centrech.

LITERATURA

1. Abalovich M, Gutierrez S, Alcaraz G, et al. Overt and subclinical hypothyroidism complicating pregnancy. *Thyroid* 2002; 12: 63-68.
2. Allan WC, Haddow JE, Palomaki GE, et al. Maternal thyroid deficiency and pregnancy complications: implications for population screening. *Journal of medical screening* 2000; 7: 127-130.
3. Finken MJ, Van Eijsden M, Loomans EM, et al. Maternal Hypothyroxinemia in Early Pregnancy Predicts Reduced Performance in Reaction Time Tests in 5- to 6-Year-Old Offspring. *The Journal of Clinical Endocrinology* 2013; 98(4): 1417-1426.
4. Hershman JM. The role of human chorionic gonadotropin as a thyroid stimulator in normal pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2008, 93: 3305-3306.
5. De Groot L, Abalovich M, Alexander EK, et al. Management of thyroid dysfunction during pregnancy and postpartum: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: 2543-2565.
6. Alvarez-Pendrerol M, Guxens M, Mendez M, et al. Iodine levels and thyroid hormones in healthy pregnant women and birth weight of their offspring. *European Journal of Endocrinology* 2009; 160(3): 423-429.
7. Zamrazil V, Bilek R, Cerovska J, et al. The elimination of iodine deficiency in the Czech Republic: the steps toward success. *Thyroid* 2004; 14: 49-56.
8. Haddow JE, Palomaki GE, Allan WC, et al. Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child. *N Eng J Med* 1999; 341: 549-555.
9. Morreale de Escobar G, Obregon MJ, et al. Role of thyroid hormone during early brain development. *European journal of endocrinology/European Federation of Endocrine Societies* 2004; 151(Suppl 3): U25-37.
10. Henrichs J, Bongers-Schokking JJ, Schenk JJ, et al. Maternal thyroid function during early pregnancy and cognitive functioning in early childhood: the generation R study. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 4227-4234.
11. Lazarus JH, Bestwick JP, Channon S, et al. Antenatal Thyroid Screening and Childhood Cognitive Function. *N Eng J Med* 2012; 366: 493-501.
12. Korevaar TI, Muetzel R, Medici M, et al. Association of maternal thyroid function during early pregnancy with offspring IQ and brain morphology in childhood: a population-based prospective cohort study. *The lancet Diabetes & endocrinology* 2016; 4: 35-43.
13. Anagnostis P, Lefkou E, Goulis DG. Guidelines of the American Thyroid Association for the Diagnosis and Management of Thyroid Disease during Pregnancy and the Postpartum Thyroid 2017; 27(9): 1209-1210.
14. Negro R, Stagnaro-Green A. Diagnosis and management of subclinical hypothyroidism in pregnancy. *BMJ* 2014; 349: g4929-g4929.
15. Wilson KL, Casey BM, McIntire DD, et al. Subclinical Thyroid Disease and the Incidence of Hypertension in Pregnancy. *Obstetrics* 2012; 119(2, Part 1): 315-320.
16. Li Y, Shan Z, Teng W, et al. Abnormalities of maternal thyroid function during pregnancy affect neuropsychological development of their children at 25-30 months. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2010; 72: 825-829.
17. Morreale de Escobar G, Obregon MJ, Escobar del Rey F. Is neuropsychological development related to maternal hypothyroidism or to maternal hypothyroxinemia? *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(11): 3975-3987.
18. Glinoe D. The Systematic Screening and Management of Hypothyroidism and Hyperthyroidism During Pregnancy. *Trends in Endocrinology* 1998; 9(10): 403-411.
19. Burggraaf J, Lalezari S, Emeis JJ, et al. Endothelial Function in Patients with Hyperthyroidism Before and After Treatment with Propranolol and Thiamazol. *Thyroid* 2001; 11(2): 153-160.
20. American Association of Clinical Endocrinologists medical guidelines for clinical practice for the evaluation and treatment of hyperthyroidism and hypothyroidism. *Endocrine Practice* 2002; 8(6): 457-469.
21. Lazarus J, Brown RS, Daumerie C, et al. European Thyroid Association guidelines for the management of subclinical hypothyroidism in pregnancy and in children. *Eur Thyroid J* 2014; 3: 76-94.
22. Potluková E, Jiskra J, Telička Z, a kol. Pozitivita protilátek proti tyreoidální peroxidáze u eutyreózních těhotných žen jako rizikový faktor pozdějšího rozvoje dystyreózy. *Diabetologie – Metabolismus – Endokrinologie – Výživa* 2011; 14(1): 27-32.
23. Potluková E, Jiskra J, Springer D, a kol. Vývoj funkce štítné žlázy po porodu u žen zachycených v prvotrimestrálním screeningu tyreopatií. *Diabetologie – Metabolismus – Endokrinologie – Výživa* 2011; 14(2): 57-58.
24. Límanová Z, Pikner R, Springer D. Doporučení pro laboratorní diagnostiku funkčních a autoimunitních onemocnění štítné žlázy. *Klinická biochemie a metabolismus* 2011; 19(1): 48-61.
25. Walker JA, Illions EH, Huddleston JF, et al. Racial comparisons of thyroid function and autoimmunity during pregnancy and the postpartum period. *Obstet Gynecol* 2005; 106: 1365-1371.
26. Horáček J, Jiskra J, Límanová Z, a kol. Doporučení pro diagnostiku a léčbu onemocnění štítné žlázy v těhotenství a pro ženy s poruchou fertility. *Klinická biochemie a metabolismus* 2013; 21(42): 41-64.
27. Soldin JS, Soukhova N, Janicic N, et al. The measurement of free thyroxine by isotope dilution tandem mass spectrometry. *Clin Chem Acta* 2005; 358: 113-118.
28. Anckaert E, Poppe K, Van Uytvanghe K, et al. FT4 immunoassays may display a pattern during pregnancy similar to the equilibrium dialysis ID-LC/tandem MS candidate reference measurement procedure in spite of susceptibility towards binding protein alterations. *Clinica Chimica Acta* 2010; 411: 1348-1353.
29. Stricker R, Echenard M, Eberhart R, et al. Evaluation of maternal thyroid function during pregnancy: the importance of using gestational age-specific reference intervals. *Eur J Endocrinol* 2007; 157: 509-514.
30. Gilbert RM, Hadlow NC, Walsh JP, et al. Assessment of thyroid function during pregnancy: first-trimester (weeks 9 – 13) reference intervals derived from Western Australian women. *Med J Aust* 2008; 189: 250-253.
31. Haddow JE, Knight GJ, Palomaki GE, et al. The reference range and within-person variability of thyroid stimulating hormone during the first and second trimesters of pregnancy. *J Med Screen* 2004; 11: 170-174.
32. Panesar NS, Li LY, Rogers MG. Reference intervals for thyroid hormones in pregnant Chinese women. *Annals of Clinical Biochemistry* 2001; 38(4): 329-332.
33. Soldin OP, Soldin D, Sastoque M. Gestation-specific thyroxine and thyroid stimulating hormone levels in the United States and worldwide. *Ther Drug Monit* 2007; 29: 553-559.
34. Medici M, Korevaar TI, Visser WE, et al. Thyroid Function in Pregnancy: What Is Normal? *Clin Chem* 2015; 61: 704-713.
35. Bestwick JP, John R, Maina A, et al. Thyroid stimulating hormone and free thyroxine in pregnancy: expressing concentrations as multiples of the median (MoMs). *Clin Chim Acta* 2014; 430: 33-37.
36. Bocos-Terraz JP, Izquierdo-Alvarez S, Bancalero-Flores JL, et al. Thyroid hormones according to gestational age in pregnant Spanish women. *BMC Res Notes* 2009; 2: 237.
37. Lambert-Messerlian G, McClain M, Haddow JE, et al. First- and second-trimester thyroid hormone reference data in pregnant women: a FASTER (first- and second-trimester evaluation of risk for aneuploidy) research consortium study. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 199: 62 e1-6.
38. La'ulu SL, Roberts WL. Ethnic differences in first trimester thyroid reference intervals. *Clin Chem* 2011; 57: 913-915.
39. Li C, Shan Z, Mao J, et al. Assessment of thyroid function during first-trimester pregnancy: what is the rational upper limit of serum TSH during the first trimester in Chinese pregnant women? *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99: 73-79.
40. Mannisto T, Surcel HM, Ruokonen A, et al. Early pregnancy reference intervals of thyroid hormone concentrations in a thyroid antibody-negative pregnant population. *Thyroid* 2011; 21: 291-298.
41. Medici M, de Rijke YB, Peeters RP, et al. Maternal early pregnancy and newborn thyroid hormone parameters: the Generation R study. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 97: 646-652.

42. Pearce EN, Oken E, Gillman MW, et al. Association of first-trimester thyroid function test values with thyroperoxidase antibody status, smoking, and multivitamin use. *Endocr Pract* 2008; 14: 33-39.
43. Quinn FA, Gridasov GN, Vdovenko SA, et al. Prevalence of abnormal thyroid stimulating hormone and thyroid peroxidase antibody-positive results in a population of pregnant women in the Samara region of the Russian Federation. *Clinical Chemical Laboratory Medicine* 2005; 43(11): 1223-1226.
44. Springer D, Zima T, Limanova Z. Reference intervals in evaluation of maternal thyroid function during the first trimester of pregnancy. *European Journal of Endocrinology*, 2009; 160: 791-797.
45. Vaidya B, Anthony S, Bilous M, et al. Detection of thyroid dysfunction in early pregnancy: Universal screening or targeted high-risk case finding? *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2007; 92: 203-207.
46. Negro R, Schwartz A, Gismondi R, et al. Universal screening versus case finding for detection and treatment of thyroid hormonal dysfunction during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95:1699-707.
47. Dosiou C, Barnes J, Schwartz A, et al. Cost-effectiveness of universal and risk-based screening for autoimmune thyroid disease in pregnant women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2012; 97: 1536-1546.

48. Potlukova E, Potluka O, Jiskra J, et al. Is age a risk factor for hypothyroidism in pregnancy? An analysis of 5223 pregnant women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2012; 97: 1945-1952.
49. Bartáková J, Potluková E, Rogalewicz V, et al. Screening for autoimmune thyroid disorders after spontaneous abortion is cost-saving and it improves the subsequent pregnancy rate. *BMC Pregnancy Childbirth* 2013; 13: 217.
50. Horacek J, Spitalniková S, Dlabalova B, et al. Universal screening detects two-times more thyroid disorders in early pregnancy than targeted high-risk case finding. *Eur J Endocrinol* 2010; 163: 645-650.
51. Limanova Z, Springer D. Thyreopathy examination during pregnancy – results of pilot project]. *Casopis lekaru ceskych* 2011; 150: 389-393.
52. Springer D, Bartos V, Zima T. Reference intervals for thyroid markers in early pregnancy determined by 7 different analytical systems. *Scand J Clin Lab Invest* 2014; 74: 95-101.



doc. Ing. Drahomíra Springer, Ph.D.
 Ústav lékařské biochemie a laboratorní medicíny, Všeobecná fakultní nemocnice
 a 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha
 U Nemocnice 2, 128 00 Praha, Česká republika
 e-mail: springer@vfn.cz

ECOLAB®

Everywhere It Matters.™

Pomáhame Vám

- ▲ zabráňovať šíreniu infekcií
- ▲ aplikovať kompletne programové riešenia
- ▲ efektívne využívať dostupné zdroje
- ▲ vzdelávať personál v oblasti hygieny

VÁŠ PROFESIONÁLNY PARTNER V OBLASTI HYGIENY

Naše produkty a služby zahŕňajú nasledujúce oblasti:

- ▲ hygiena rúk a pokožky
- ▲ čistenie a dezinfekcia lekárskeho nástrojov
- ▲ dezinfekcia plôch a povrchov
- ▲ dávkovacie zariadenia
- ▲ sterilné krytia medicínskych prístrojov zn. Microtek



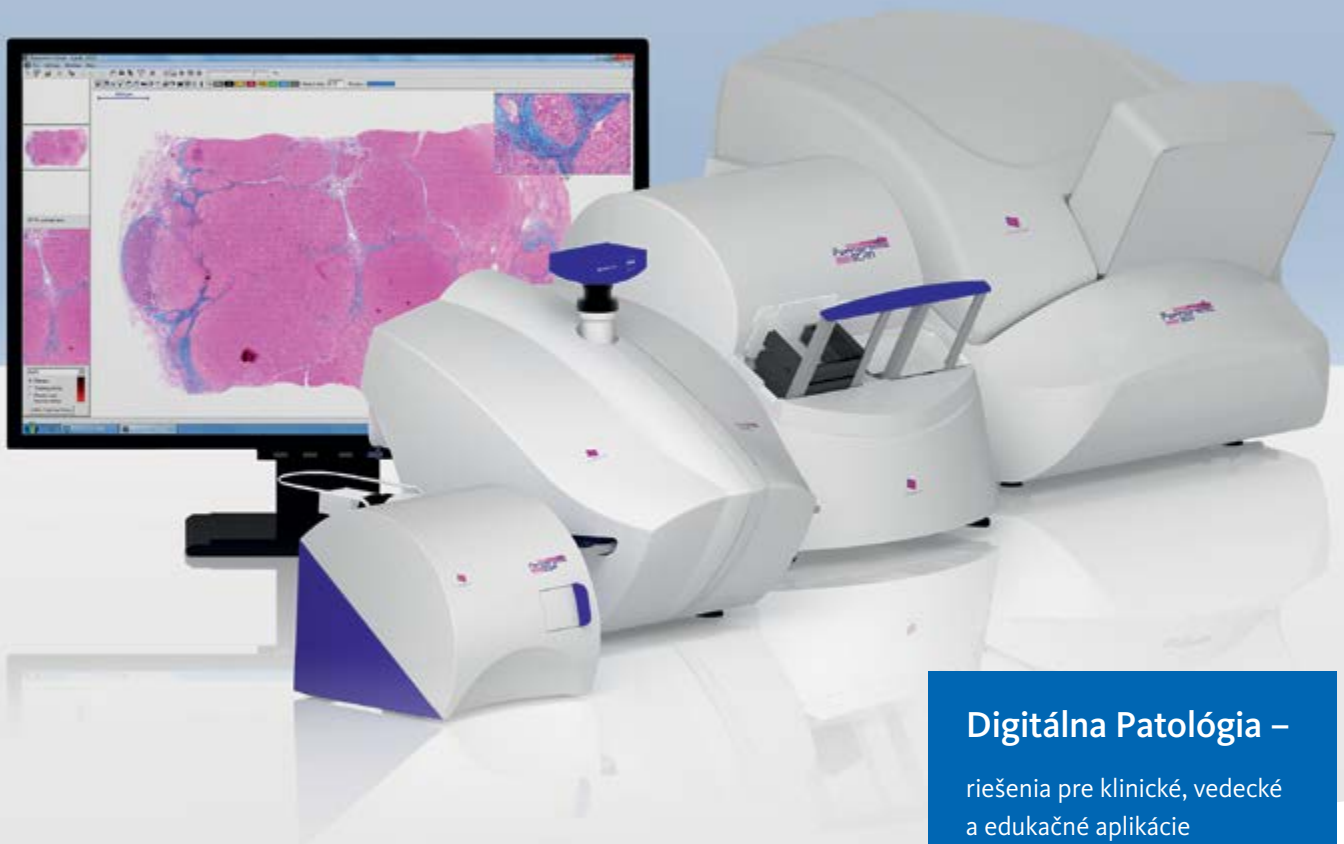
NIEKTORÉ NAŠE ZNÁME ZNAČKY:

- ▲ **INCIDIN** - spoľahlivé prostriedky na povrchovú dezinfekciu
- ▲ **SEKUSEPT** - najvhodnejšie prostriedky na dezinfekciu nástrojov
- ▲ **SKINMAN** - produkty na ruky s rovnováhou medzi dezinfekčným účinkom a kožnou znášanlivosťou
- ▲ **SILONDA** - vysoká kvalita v starostlivosti o pokožku



Kontakt: www.sk.ecolab.eu, 02/ 572 049 15-16, mail: objednavky@ecolab.com

Pannoramic Slide Scanners



Digitálna Patológia –

riešenia pre klinické, vedecké
a edukačné aplikácie

- automatizované skenovanie bioptických preparátov
- digitalizácia vo svetlom poli a fluorescencii
- tvorba digitálnych archívov, sieťová manipulácia, vzdialené hodnotenie – Digital Pathology Networking
- štandardizovaná kvantifikácia IHC, FISH a CISH preparátov

www.sysmex-europe.com

Distribútor Slovenská republika: Sysmex Slovakia s.r.o.

Trenčianska 47, 821 09 Bratislava, Slovenská republika · Telefón +421 2 6453 2881-2 · Fax +421 2 6428 1651 · office@sysmex.sk · www.sysmex.sk

Výrobca: 3DHitech Ltd

Óv utca 3, 1141 Budapešť, Maďarsko

Chorangióza placenty – postihnutie placenty nejasnej etiológie (kazuistika a prehľad súčasného poznania)

Kristína Mikuš-Kuracinová¹, Zuzana Čierna^{1,2}, Andrea Janegová^{1,3}

¹Ústav patologickej anatómie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

²MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o., Bratislava

³Patologicko-anatomické oddelenie, Fakultná nemocnica Trnava

Chorangióza je placentárna vaskulárna lézia postihujúca chorióvke klky, sprevádzaná vzostupom počtu ciev. Etiológia chorangiózy nie je úplne známa. Najviac uznávaná hypotéza však predpokladá súvis s dlhotrvajúcim stavom hypoxie v placente. Je to zriedkavé ochorenie asociované s rôznymi fetálno-maternálnymi a placentárnymi zmenami. Častejšie sa vyskytuje aj v súvislosti s preeklampsiou, hypertenziou alebo diabetom mellitom u matky. Opisujeme prípad 23-ročnej ženy s potratom v 25. týždni gravidity a s nálezom anomálie pupočníka a chorangiózy placenty.

Kľúčové slová: chorangióza, placenta, vaskularizácia klkov

Chorangiosis of Placenta - Disorder of Unclear Etiology (Case Report and Overview of Current Knowledge)

Chorangiosis is a placental vascular lesion affecting chorionic villi, accompanied by a rise in the number of vessels. The etiology of chorangiosis is not fully known. However, the widely accepted hypothesis is related to the long-term placental hypoxia. It is a rare disease associated with various feto-maternal and placental changes. It is also quite common in pre-eclampsia, hypertension, or diabetes mellitus in the mother. We are describing the case of a 23 year old woman with an abortion in the 25th week of pregnancy and with finding of umbilical anomaly and placental chorangiosis.

Key words: chorangiosis, placenta, chorionic villi vascularisation

NewsLab, 2018; roč. 9 (2): 121 – 123

Úvod

Za fyziologických okolností zachytíme na reze terminálnym klkom placenty 2 – 5 cievnych priestorov. Vilózna hypervaskularita je charakterizovaná zvýšeným počtom cievnych priestorov, nesúvisiacich s ich dilatáciou ani venostázou. V roku 1984 Altshuler definoval kritériá pre chorangiózu ako mnohopočetné kapilárne vaskulárne kľučky v koncových klkoch placenty s nálezom minimálne 10 cievnych lúmenov v 10 klkoch v 10 neinfarktových plochách placenty hodnotených pri zväčšení objektívu 10x v 3 a viacerých kotyledónoch⁽¹⁾.

Incidencia chorangiózy stúpa so zvyšujúcim sa štádiom gravidity⁽²⁾. Abnormality cievneho zásobenia placentárných klkov tvoria heterogénnu skupinu chorobných zmien placenty, vyžadujúcu pozorný prístup pri hodnotení a interpretácii patológom.

Kazuistika

Opisujeme prípad 23-ročnej prvorodičky, u ktorej došlo v 25. týždni tehotnosti k abrupcii placenty s následným potratom mŕtveho plodu. Makroskopicky bola placenta prekrvácaná s retroplacentárnou krvnou zrazeninou, rozmerov 14 x 12 x 2,5 cm a hmotnosti 222 g. Pupočník odstupoval centrálne, na reze boli prítomné dve cievy.

V mikroskopickom náleze sme pozorovali zväčšené klky s početnými cievami (10 a viac na jeden klk). Imunohistochemickým vyšetrením s použitím endotelového markera CD34 sme potvrdili zmoženie malých cievnych lúmenov

v jednotlivých klkoch. Na základe histologického a imunohistochemického nálezu bol nález uzavretý ako chorangióza placenty s nálezom dvojcievneho pupočníka.

Diskusia

Chorangióza je vaskulárna zmena placenty s nejasnou etiológiou. Definovaná je nálezom minimálne 10 cievnych lúmenov v 10 klkoch v 10 neinfarktových plochách placenty hodnotených pri zväčšení objektívu 10x v 3 a viacerých kotyledónoch⁽¹⁾. Aj keď pôvodné kritériá hovorili o hodnotení v terminálnych klkoch, boli neskôr upravené vzhľadom na skutočnosť, že je prakticky nemožné odlišiť hypervaskulárne terminálne klky od hypervaskulárných zreých intermediálnych klkov⁽³⁾.

Za fyziologických okolností obsahujú zrele terminálne klky placenty zvyčajne 2 – 5 kapilár, ktoré sú dilatované a vyplňajú časť klku⁽⁴⁾. Placenta zohráva kľúčovú úlohu v transporte plynov medzi materskou a fetálnou cirkuláciou. Formovanie a vznik nových kapilár v placente prebieha dvoma mechanizmami v závislosti od gestačného veku plodu. V skorom štádiu prvého trimestra vznikajú kapiláry vaskulogenezou, vytvorením endotelových progenitorových buniek – angioblastov v extraembryonálnom mezoderme. V neskorších štádiách tehotnosti vznikajú kapiláry angiogenezou z už existujúcich ciev⁽⁵⁾. Placenta je za normálnych okolností vysokovaskularizované tkanivo, dĺžka kapilárnej siete normálnej placenty je odhadovaná na 550 km⁽⁶⁾.

Spustenie obidvoch procesov novotvorby ciev závisí od pôsobenia viacerých rastových faktorov, s nenahraditeľnou úlohou rastového faktora pre endotel (VEGF), ktorý sa uvoľňuje z mezenchymálnych aj trofoblastových buniek vplyvom rôznych stimulov vrátane hypoxie. Predpokladá sa, že placenta má schopnosť adaptácie na nepriaznivé okolnosti prostredia a je schopná zvýšiť kapacitu výmeny plynov dôležitú pre vývoj plodu. Placenta sa takto môže prispôbiť napríklad hypoxickým podmienkam u obyvateľov v extrémnych nadmorských výškach prostredníctvom vaskulárnej hyperplázie v koncových choriových klkoch⁽⁷⁾.

Etiologicky sa preto uvažuje najmä o význame hypoxie v etiológii chorangiózy^(8,9). Toto tvrdenie by mohli podporovať práve poznatky o patofyziológii tvorby placentárnych ciev. Táto hypotéza však nebola nikdy jednoznačne potvrdená. V súlade s touto hypotézou je vyššia incidencia chorangiózy u žien žijúcich vo vyšších nadmorských polohách a u žien s ťažkými anemickými poruchami^(4,10). Iné štúdie však významnú spojitosť medzi hypoxiou a vznikom chorangiózy nenašli^(10,11). Zdá sa, že zmoženie kapilár nevyhnutne nezvyšuje schopnosť placenty zabezpečiť výmenu kyslíka⁽¹²⁾.

Chorangióza je často asociovaná s rôznymi fetálno-maternálnymi a placentárnymi zmenami, ako sú nálezy pupočníkových abnormalít vrátane prítomnosti len jednej umbilikálnej artérie⁽⁴⁾ aj vrodených vývojových chýb srdca plodu⁽¹³⁾. Častejšie sa vyskytuje v súvislosti s preeklampsiou, hypertenziou alebo diabetom mellitom u matky, kde sa dáva do súvislosti so zmenami produkcie VEGF⁽¹⁴⁾. Tieto stavy sú spojené so zvyšujúcou sa fetálnou a neonatálnou morbiditou aj mortalitou⁽¹⁵⁾. Zdá sa však, že chorangióza tu predstavuje skôr vedľajší nález, ktorý vzniká ako následok choroby matky. Rizikovým faktorom je aj fajčenie⁽¹⁶⁾. Jedna z ďalších príčin vzniku chorangiózy môže byť aj hyperkapilarizácia spojená so vzostupom tlaku ako následok obštrukcie pupočníkovej žily⁽¹⁰⁾. Možný je aj genetický alebo environmentálne získaný nesúlad medzi rastovými faktormi⁽¹⁷⁾. Opísaná je i kazuistika chorangiózy asociovaná so zvýšenou hladinou choriogonadotropného hormónu (hCG) v sére matky v neskoršom štádiu tehotnosti⁽¹⁸⁾.

Problém v diferenciálnej diagnostike môže predstavovať venostáza placenty spojená s dilatáciou ciev bez zvýšenia ich počtu. Samotná ischémia tkaniva taktiež môže viesť k zmenám klkov v podobe ich „zošúverenia“ (shrinkage), ktoré sťažujú hodnotenie vaskularizácie a môžu viesť k jej nadhodnoteniu⁽¹⁹⁾. Imunohistochemické farbenie endotelových markerov CD31 a CD34 umožňuje lepšie a presnejšie hodnotenie počtu kapilár v porovnaní so štandardným farbením hematoxylínom a eozínom. Problém pri hodnotení môže spôsobovať aj kolaps ciev po pôrode, často v súvislosti s nevhodnou fixáciou placenty⁽¹⁾.

Dôležité je aj odlíšenie chorangiózy od chorangiómu a chorangiomatózy. Chorangióm predstavuje dobre ohraničené ložisko vyrastajúce z kmeňového klku, podobajúce sa

kapilárnemu hemangiómu. V postihnutých klkoch dochádza k proliferácii kapilárnych štruktúr, prítomné sú endotelové bunky, pericyty aj myofibroblastové stromálne bunky⁽²⁰⁾. Cievne štruktúry pri chorangiomatóze majú hrubú stenu obsahujúcu hladkosvalové bunky pozitívne na aktín s podporným tkanivom tvoreným zvýšeným množstvom kolagénu, pričom nie sú viazané len na terminálne klky, ale obklopujú aj väčšie cievy v kmeňových klkoch⁽¹⁹⁾. Kapiláry sú taktiež ohraničené kontinuálnou vrstvou pericytov pozitívnych na špecifický svalový aktín, na rozdiel od chorangiózy, kde pericyty netvoria kontinuálnu vrstvu okolo kapilár⁽¹⁰⁾. Celkovo možno povedať, že všetky placenty s chorangiózou sú fokálne hypervaskulárne, ale nie všetky hypervaskulárne placenty vznikajú v dôsledku chorangiózy.

Opisuje sa, že chorangióm a fokálna alebo segmentálna chorangiomatóza sú častejšie prítomné v 32. – 36. týždni tehotnosti. Multifokálnu chorangiomatózu pozorujeme už v gestačnom veku nižšom ako 32. týždeň. Incidencia chorangiózy je nízka v 2. trimestri a stúpa v 3. trimestri, s maximom výskytu v neskorších štádiách tehotenstva^(3,21). Viacerí autori opísali, že chorangióza, ktorá vzniká v posledných štádiách tehotenstva a nie je sprevádzaná iným patologickým stavom, nevlýva negatívne na vývoj plodu ani na priebeh gravidity⁽³⁾.

Záver

Celková vaskularizácia klkov placenty stúpa so štádiom gravidity. Predpokladá sa, že chorangióza vyskytujúca sa bez nálezu iných príznakov hypoxie, fetálnej alebo maternálnej hypoperfúzie nepredstavuje riziko pre tehotnosť ani ju jednoznačne nemožno považovať za príčinu potratu alebo iných komplikácií tehotnosti. Naopak, rôzne choroby matky môžu zvyšovať pravdepodobnosť nálezu chorangiózy, ktorá by tak mohla predstavovať skôr faktor adaptácie placenty na zhoršené podmienky prostredia. Napriek všetkým teóriám ostáva príčina vzniku chorangiózy neznáma. Jej nález pri histologickom vyšetrení placenty by mohol napomôcť v úzkej spolupráci patológa a gynekológa pôrodníka pri odhalení chorôb matky, ktoré môžu komplikovať tehotnosť.

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 rámcičasnej diagnostiky najčastejších onkologických ochorení u žien, ITMS 26210120026, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

This article was created thanks to support of the OP Research and Development for the project: Completion of technical infrastructure in the field of research of diagnostic procedures and methods in early diagnosis of the most common oncological women diseases, ITMS 26210120026, 2013/1. 1./02-SORO, co-financed by the European Regional Development Fund.

LITERATÚRA

1. Altshuler G. Chorangiomas. An important placental sign of neonatal morbidity and mortality. Arch Pathol Lab Med 1984; 108(1): 71-74.
2. Stanek J. Comparison of placental pathology in preterm, late-preterm, near-term, and term births. Am J Obstet Gynecol 2014; 210(3): 234 e1-6.
3. Stanek J. Chorangiomas of Chorionic Villi: What Does It Really Mean? Arch Pathol Lab Med 2016; 140(6): 588-593.

4. Srinivasan AP, Omprakash BO, Lavanya K, et al. A prospective study of villous capillary lesions in complicated pregnancies. J Pregnancy 2014; 2014: 193925.
5. Chen DB, Zheng J. Regulation of placental angiogenesis. Microcirculation 2014; 21(1): 15-25.

6. Burton GJ, Jauniaux E. Sonographic, stereological and Doppler flow velocimetric assessments of placental maturity. *Br J Obstet Gynaecol* 1995; 102(10): 818-25.
7. Soma H, Murai N, Tanaka K, et al. Angiogenesis in villous chorangiomas observed by ultrastructural studies. *Med Mol Morphol* 2013; 46(2): 77-85.
8. Suzuki K, Itoh H, Kimura S, et al. Chorangiomas and placental oxygenation. *Congenit Anom (Kyoto)* 2009; 49(2): 71-76.
9. Staribratova D, Milchev N. [Placental chorangioma associated with abruption and hypoxia]. *Akush Ginekol (Sofia)* 2009; 48(5): 44-6.
10. Ogino S, Redline RW. Villous capillary lesions of the placenta: distinctions between chorangioma, chorangiomas, and chorangiomas. *Hum Pathol* 2000; 31(8): 945-954.
11. Stanek J, Biesiada J. Clustering of maternal-fetal clinical conditions and outcomes and placental lesions. *Am J Obstet Gynecol* 2012; 206(6): 493 e1-8.
12. Mayhew TM, Jackson MR, Haas JD. Microscopical morphology of the human placenta and its effects on oxygen diffusion: a morphometric model. *Placenta* 1986; 7(2): 121-131.
13. Rychik J, Goff D, McKay E, et al. Characterization of the Placenta in the Newborn with Congenital Heart Disease: Distinctions Based on Type of Cardiac Malformation. *Pediatr Cardiol* 2018.
14. Bhattacharjee D, Mondal SK, Garain P, et al. Histopathological study with immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor in placentas of hyperglycemic and diabetic women. *J Lab Physicians* 2017; 9(4): 227-233.
15. Gupta R, Nigam S, Arora P, et al. Clinico-pathological profile of 12 cases of chorangiomas. *Arch Gynecol Obstet* 2006; 274(1): 50-53.
16. Akbulut M, Sorkun HC, Bir F, et al. Chorangiomas: the potential role of smoking and air pollution. *Pathol Res Pract* 2009; 205(2): 75-81.
17. Bendon B. Chorangiomas? 2012.
18. Stroustrup Smith A, Huang WY, Wong G, et al. Placental chorangiomas associated with markedly elevated maternal chorionic gonadotropin. A case report. *J Reprod Med* 2003; 48(10): 827-830.
19. Caldarella A, Buccoliero AM, Taddei GL. Chorangiomas: report of three cases and review of the literature. *Pathol Res Pract* 2003; 199(12): 847-50.
20. Amer HZ, Heller DS. Chorangiomas and related vascular lesions of the placenta—a review. *Fetal Pediatr Pathol* 2010; 29(4): 199-206.
21. Stanek J, Biesiada J, Trzeszcz M. Clinicoplacental phenotypes vary with gestational age: an analysis by classical and clustering methods. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2014; 93(4): 392-398.



MUDr. Kristína Mikuš-Kuracinová, PhD.

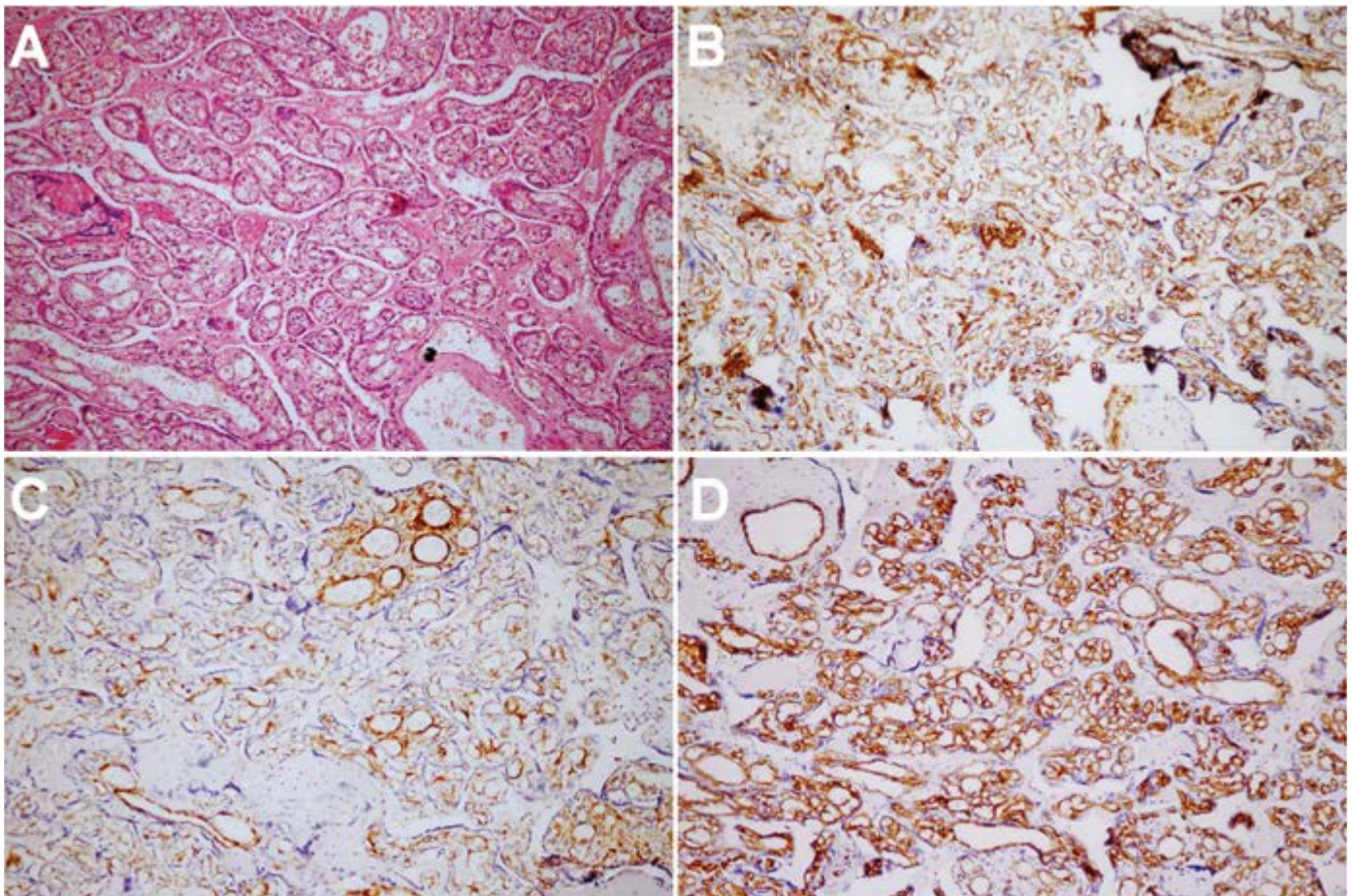
Ústav patologickej anatómie
Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave
Sasinkova 4, 811 08 Bratislava
e-mail: kristina.kuracinova@gmail.com

A: Placenta, HE, 200x

B: Placenta, protilátka CD 31, 200x

C: Placenta, svalový špecifický aktín (MSA), 200x

D: Placenta, protilátka CD 34, 200x





TRISOMYtest

Výpočtový softvér využívaný pre neinvazívny prenatálny TRISOMY test získal CE IVD certifikát.

CE označenie je potvrdením toho, že výrobok zodpovedá požiadavkám nového typu technickej harmonizácie Európskej únie.

CE IVD certifikát potvrdzuje, že výpočtový softvér TRISOMY testu je v súlade so všetkými európskymi smernicami, ktoré sa vzťahujú na in vitro diagnostické pomôcky a že zhoda bola preukázaná pomocou príslušného postupu posudzovania European In-Vitro Diagnostic Devices Directive (98/79/EC).

TRISOMY TEST MÁ PRE BUDÚCE MAMIČKY VIACERO VÝHOD:

- vysoká spoľahlivosť,
- najnižšia cena na trhu,
- slovenský produkt vyvinutý slovenskými vedcami,
- test vykonávaný v slovenských laboratóriách,
- vyšetrenie z krvi,
- najrýchlejšie výsledky už do 5 dní.

**TRISOMY test,
TRISOMY test XY
a TRISOMY test +**
sú neinvazívne vyšetrenia,
ktoré už v prvých troch
mesiacoch gravidity
dokážu vylúčiť vybrané
chromozómové
poruchy plodu.

Podrobné informácie nájdete
na www.trisomytest.sk.

Potenciál novej generácie sekvenovania pri skríningu Lynchovho syndrómu

Ondrej Pös, Mária Haršanyová, Tomáš Szemes
Vedecký park Univerzity Komenského, Bratislava

Lynchov syndróm je najčastejšou príčinou dedičnej formy kolorektálneho karcinómu, ktorý má celosvetovo najväčšiu incidenciu práve v slovenskej populácii mužov. Molekulárne metódy, ktoré sa v súčasnej klinickej praxi na Slovensku využívajú pri vyšetrovaní Lynchovho syndrómu, majú viacero limitácií, preto nie vždy sú správne diagnostikovaní všetci pacienti. Viaceré štúdie naznačujú, že pre skríning Lynchovho syndrómu majú veľký potenciál sekvenačné technológie novej generácie. Pri testovaní táto metóda preukázala vysokú senzitivitu i efektivitu a odporúča sa jej zavedenie do klinickej praxe, pretože by mala zlepšiť výsledky pacientov a pomôcť systému zdravotnej starostlivosti.

Kľúčové slová: Lynchov syndróm, kolorektálny karcinóm, sekvenovanie novej generácie

Potential of next generation sequencing in screening of Lynch syndrome

Lynch syndrome is the most common cause of hereditary colorectal carcinoma and the population of males in Slovakia have the highest incidence worldwide. Molecular methods used for examining of Lynch syndrome in current clinical practice in Slovakia have several limitations. Therefore, some patients are not always correctly diagnosed. Several studies suggest that next generation sequencing has significant potential for screening of Lynch syndrome. This method showed high sensitivity and efficiency, and its implementation into clinical practice is recommended as it should improve outcomes of patients and optimize health care system.

Keywords: Lynch syndrome, colorectal cancer, next generation sequencing

NewsLab, 2018; roč. 9 (2): 125 – 127

Lynchov syndróm

Lynchov syndróm (OMIM: #120435) (LS) je autozomálne dominantné dedičné ochorenie spôsobené heterozygotnými zárodočnými mutáciami v génoch mutL homolog 1 (*MLH1*), mutS homolog 2 (*MSH2*), mutS homolog 6 (*MSH6*) a PMS1 homolog 2 (*PMS2*), ktoré sa podieľajú na DNA mismatch opravách (MMR; *mismatch repair*). Okrem uvedených mutácií však boli opísané mutácie v géne pre adhezívnu molekulu epiteliálnych buniek (*EPCAM*), ktoré spôsobujú epigenetický *silencing* susediaceho MMR génu *MSH2* (**graf 1**)⁽¹⁾. MMR je evolučne konzervovaný proces, ktorý opravuje chyby spôsobené DNA polymerázou počas replikácie genómu⁽²⁾. Mutácie v génoch pre MMR spôsobujú poruchy *mismatch* opravného systému, výsledkom čoho je akumulácia spontánnych mutácií v DNA⁽³⁾. Genetické analýzy ukázali, že u pacientov s LS je vysoká frekvencia inzerčno/delečných mutácií, ktoré vznikajú v jednoduchých sekvenčných opakovaníach (mikrosatelitoch). Obvykle sa tieto mutácie prejavujú ako zmeny v dĺžke krátkych sekvenčných opakovaní DNA, čo je fenomén známy tiež ako mikrosatelitová instabilita (MSI)⁽⁴⁾.

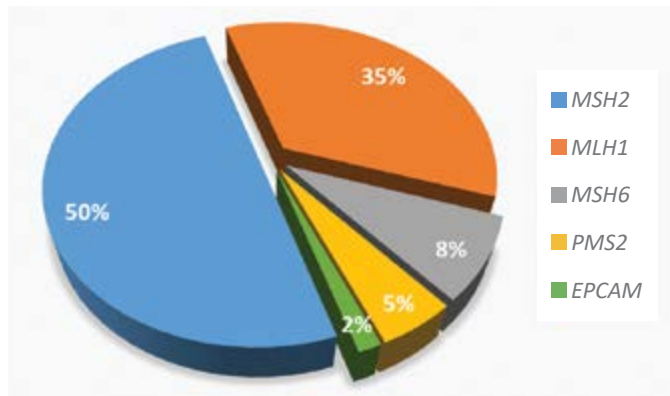
LS sa prejavuje ako predispozícia na rôzne typy rakoviny. Pacienti s týmto syndrómom majú výrazne zvýšené riziko rozvoja kolorektálneho karcinómu, rakoviny endometria, ale aj iných nádorových ochorení vrátane rakoviny žalúdka, vaječníkov, tenkého čreva, močových ciest a iných (**graf 2**)^(5,6). Na označenie tohto syndrómu sa od roku 1984 začal používať názov hereditárny nepolypózny kolorektálny karcinóm, tento termín sa však považuje za nesprávny, keďže súčasťou

LS môžu byť nádory z mimočrevných oblastí⁽³⁾. LS je hlavnou príčinou dedičnej formy kolorektálneho karcinómu, ktorý patrí medzi najčastejšie príčiny úmrtia. Populačné údaje z roku 2012 ukázali, že tento typ karcinómu je tretím najčastejším rakovinovým ochorením a práve slovenská populácia mužov má najväčšiu incidenciu tohto ochorenia na svete⁽⁷⁾.

Diagnostické postupy

Na identifikáciu rodín s rizikom LS sa využívajú amsterdamské kritériá a revidované bethesdské smernice, ktoré sú založené na poznatkoch o rodinnej anamnéze a veku v čase stanovenia diagnózy⁽⁸⁾. Pacienti, ktorí spĺňajú tieto kritériá, sú odporúčaní na analýzu MSI v nádorovom tkanive prostredníctvom molekulárnych metód ako PCR a imunohistochemia (IHC)⁽⁹⁾. Princíp IHC spočíva v značení MMR proteínov pomocou protilátok. Ak je nádorové tkanivo málo zafarbené, znamená to, že vo vzorke je nedostatok MMR proteínov a poukazuje to na prítomnosť mutácie v prislúchajúcom MMR géne. Limitáciou IHC metódy sú patologické mutácie, ktoré dokážu znefunkčniť kódovaný proteín bez toho, aby ovplyvnili jeho antigenicitu. V takomto prípade vznikne falošne pozitívny výsledok a pre správnu interpretáciu je potrebná analýza pomocou PCR⁽¹⁰⁾. Na stanovenie stupňa MSI pomocou PCR sa využíva analýza dvoch mononukleotidových (BAT25, BAT26) a troch dinukleotidových (D2S123, D5S346, D17S250) sekvenčných opakovaní. Ak vykazujú instabilitu dva alebo viac z týchto markerov, nádor sa klasifikuje ako MSI-H (*High-frequency MSI*). Ak iba jeden z markerov vykazuje instabilitu,

Graf 1. Frekvencia mutácií, ktoré spôsobujú deficienciu mismatch opravného systému u pacientov s Lynchovým syndrómom⁽¹⁾

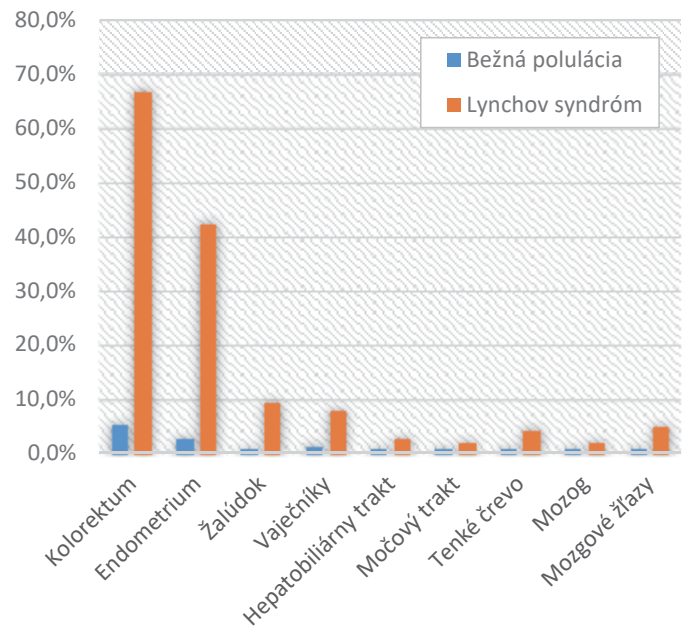


nádor sa radí do skupiny MSI-L (*Low-frequency MSI*) a ak žiadny z markerov nepreukáže instabilitu, tumor sa považuje za stabilný (MSS; *microsatellite stable*)⁽¹¹⁾. Limitáciou tejto metódy sú nádory, v ktorých sa nenahromadil dostatok replikačných porúch na to, aby boli spoľahlivo detegovateľné prostredníctvom PCR. V takých prípadoch je potrebná analýza pomocou IHC. Približne 10-15 % sporadických CRC vykazuje MSI, avšak príčinou tejto instability sú väčšinou metylácie v promótoroch génu *MLH1*. Preto je potrebná analýza metylácií v promótorovej oblasti génu *MLH1*. Ďalším testom je analýza mutácie p. V600E v *BRAF* géne, pretože 50 – 68 % sporadických tumorov, ktoré vykazujú MSI, obsahuje práve túto mutáciu⁽⁹⁾. Viaceré štúdie ukázali, že metódy IHC a PCR je vhodné používať súčasne, napriek tomu však existujú podmienky, pri ktorých obidve metódy poskytujú falošne pozitívne výsledky, ktoré treba overiť ďalšími testami^(12,13,14).

Sekvenovanie novej generácie

S rozvojom sekvenáčnych technológií sa čoraz častejšie objavujú štúdie, ktoré naznačujú, že práve sekvenovanie novej generácie (NGS; *next-generation sequencing*) má veľký potenciál pre skrining LS. Vhodným príkladom je klinický diagnostický test ColoSeq. Je to test pre dedičnú formu kolorektálneho karcinómu, ktorý deteguje jednonukleotidové zámery, inzerčné, delečné a duplikačné mutácie v génoch *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *EPCAM*, *APC*, *MUTYH*. Pri testovaní vzoriek DNA z periférnej krvi onkologických pacientov a z bunkových línií rakoviny čreva táto metóda preukázala 100 % senzitivitu a podarilo sa detegovať všetky typy mutácií vrátane *missense*, *frameshift*, *splicing* mutácií, *in-frame* delécií, veľkých delécií a duplikácií⁽¹⁵⁾. Niektorí pacienti vykazujú symptómy nerozoznateľné od LS, a pritom sú nositeľmi patogénnych mutácií v génoch, ktoré nie sú špecifické pre toto ochorenie. Prostredníctvom štandardných testov, ktoré sa v súčasnosti využívajú, by tieto varianty neboli identifikované, avšak NGS panely dokážu detegovať patogénne varianty aj v génoch, ktoré nie sú špecifické len pre LS⁽¹⁶⁾.

Graf 2. Porovnanie rizika vybraných typov rakoviny v bežnej populácii s rizikom u pacientov, ktorým bol diagnostikovaný Lynchov syndróm⁽⁶⁾



Štúdia Gallego et al. sa pokúsila ohodnotiť efektívnosť NGS panelov a porovnať ich so štandardnými postupmi, ktoré sa využívajú pri diagnóze dedičných foriem kolorektálneho karcinómu a polypózných syndrémov. Ukázalo sa, že testovanie pomocou NGS panelov, ktoré obsahujú gény asociované s kolorektálnym karcinómom a LS, je cenovo efektívne a odporúča sa ich používanie ako prvý krok na diagnostiku týchto ochorení⁽¹⁶⁾. Predpokladá sa, že v blízkej budúcnosti génové panely založené na NGS technológii zmenia prístup skriningu LS⁽¹⁷⁾. Aj táto metóda má však svoje limitácie. Ako sa ukázalo v niektorých štúdiách, s častejším používaním panelového testovania bude vzrastať množstvo identifikovaných variantov neurčitého významu^(18,19). Je dôležité, aby boli tieto varianty správne anotované, preto je veľkou výzvou vývoj spoľahlivých nástrojov na ich klasifikáciu⁽²⁾.

Záver

Štatistické údaje o incidencii kolorektálneho karcinómu poukazujú na potrebu výskumu LS na Slovensku. Doposiaľ na Slovensku nebola urobená žiadna populačná štúdia, ktorá by identifikovala podiel kolorektálnych karcinómov vznikajúcich následkom LS a neboli ani objasnené príčiny vysokej incidencie tohto ochorenia v slovenskej populácii. V tejto štúdii sme poukázali na potenciál NGS technológie, ktorá by mohla byť efektívnou metódou na skrining LS pacientov, pričom údaje získané týmto prístupom by bolo možné využiť na vytvorenie populačných štúdií a následné zodpovedanie uvedených otázok.

LITERATÚRA

1. Tuttlewska K, Lubinski J, Kurzawski G. Germline deletions in the EP-CAM gene as a cause of Lynch syndrome - literature review. *Hered Cancer Clin Pract* 2013; 11(1): 9.
2. Rasmussen LJ, Heinen CD, Royer-Pokora B, et al. Pathological assessment of mismatch repair gene variants in Lynch syndrome: past, present, and future. *Hum Mutat* 2012; 33(12): 1617-1625.
3. Lynch HT, Snyder CL, Shaw TG, et al. Milestones of Lynch syndrome: 1895-2015. *Nat Rev Cancer* 2015; 15(3): 181-194.
4. Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993; 260(5109): 812-816.
5. Leenen CH, van Lier MG, van Doorn HC, et al. Prospective evaluation of molecular screening for Lynch syndrome in patients with endometrial cancer \leq 70 years. *Gynecol Oncol*. 2012; 125(2): 414-420.
6. Wolf AI, Buchanan AH, Farkas LM. Historical review of Lynch syndrome. *J Coloproctol* 2013; 33(2): 95-110.
7. <https://www.wcrf.org>
8. Lopez NE, Peterson CY. Advances in Biomarkers: Going Beyond the Carcinoembryonic Antigen. *Clin Colon Rectal Surg* 2016; 29(3): 196-204.
9. Hegde M, Ferber M, Mao R, et al; Working Group of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) Laboratory Quality Assurance Committee. ACMG technical standards and guidelines for genetic testing for inherited colorectal cancer (Lynch syndrome, familial adenomatous polyposis, and MYH-associated polyposis). *Genet Med* 2014; 16(1): 101-116.
10. Zhang L. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part II. The utility of microsatellite instability testing. *J Mol Diagn* 2008; 10(4): 301-307.
11. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58(22): 5248-5257.
12. Overbeek LI, Ligtenberg MJ, Willems RW, et al. Interpretation of immunohistochemistry for mismatch repair proteins is only reliable in a specialized setting. *Am J Surg Pathol* 2008; 32(8): 1246-1251.
13. Ward RL, Hicks S, Hawkins NJ. Population-based molecular screening for Lynch syndrome: implications for personalized medicine. *J Clin Oncol* 2013; 31(20): 2554-2562.
14. Cragun D, DeBate RD, Pal T. Applying public health screening criteria: how does universal newborn screening compare to universal tumor screening for Lynch syndrome in adults with colorectal cancer? *J Genet Couns* 2015; 24(3): 409-420.
15. Pritchard CC, Smith C, Salipante SJ, et al. ColoSeq provides comprehensive lynch and polyposis syndrome mutational analysis using massively parallel sequencing. *J Mol Diagn* 2012; 14(4): 357-366.
16. Gallego CJ, Shirts BH, Bennette CS, et al. Next-Generation Sequencing Panels for the Diagnosis of Colorectal Cancer and Polyposis Syndromes: A Cost-Effectiveness Analysis. *J Clin Oncol* 2015; 33(18): 2084-2091.
17. Peltomäki P. Update on Lynch syndrome genomics. *Fam Cancer* 2016; 15(3): 385-393.
18. Yurgelun MB, Allen B, Kaldate RR, et al. Identification of a Variety of Mutations in Cancer Predisposition Genes in Patients With Suspected Lynch Syndrome. *Gastroenterology* 2015; 149(3): 604-13.e20.
19. Hall MJ, Forman AD, Pilarski R, et al. Gene panel testing for inherited cancer risk. *J Natl Compr Canc Netw* 2014; 12(9): 1339-1346.



Mgr. Ondrej Pös

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



ALL YOU NEED FOR GENOMICS

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



Request your copy from your local VWR sales office or sk.vwr.com

Multiomická triangulácia alebo potenciálne využitie omických analýz v diagnostickej praxi

Ján Radvánszky

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

NewsLab, 2018; roč. 9 (2): 128 – 129

Pod pojmom „genetizácia“ medicíny vo všeobecnosti sa dá predstaviť, aspoň ja si predstavujem, využívanie rôznych genetických analýz zameraných na jeden gén s cieľom stanovenia klinickej diagnózy, prípadne následne aj na výber vhodnej liečby pre individuálnych pacientov. Uznávam, že by sme mohli polemizovať o tom, či proces postupnej genetizácie medicíny za posledné desaťročia naozaj úspešne prebehol aj u nás na Slovensku, z hľadiska dnešného príspevku mi však dovoľte predpokladať, že áno. Naproti tomu „genomizácia“ medicíny, t. j. využívanie komplexných genomických analýz a hodnotenie celkových genomických informácií na stanovenie klinickej diagnózy a na výber vhodnej liečby a terapie, je zatiaľ v začiatkoch svojho rozmachu, a to nielen u nás, ale dá sa povedať aj na celom svete, pričom jeho prísluby sú celkom zaujímavé⁽⁴⁾. Základným princípom personalizovanej (individualizovanej) medicíny je pritom nielen filozofické, ale aj biologické poznanie, že každý jedinec/pacient je individuálnym fenotypom. Hlavným cieľom „genomickej medicíny“ (personalizovanej medicíny vychádzajúcej z genomických informácií) budúcnosti by pritom mala byť transformácia celkovej genomickej informácie na komplexnú fenotypovú informáciu s cieľom revolucionalizácie nielen diagnostiky, predikcie a prevencie, ale aj terapeutických postupov zdravotnej starostlivosti.

Je viac-menej jednoznačné, že pri súčasných technológiách generovanie samotných genomických dát vo forme čistých sekvencií DNA nepredstavuje praktický problém, a to už ani pre celogenómové rozmery⁽⁶⁾. Priradenie určitej informačnej hodnoty a ich transformácia do priamej klinickej starostlivosti založenej na individuálnych predpokladoch/potrebách pacientov však stále predstavuje nemalú výzvu. Pri použití DNA sekvenovania, či už pomocou prvej generácie, alebo niektorej masívne paralelnej verzie, je výstupom analýzy zoznam nukleotidov tvoriacich genóm analyzovaného jedinca, a to ako čistá sekvencia alebo ako zoznam pozícií, ktoré sa líšia od použitej referenčnej sekvencie. Anotácia týchto variantov je pritom závislá od dostupnosti špecifických informácií, obsiahnutých v rôznych databázach, napr. v databáze ochorení, databáze všeobecnej variability genetického materiálu alebo aj databáze patogénnych variácií, prípadne priamo vo vedeckých publikáciách.

V kontexte variantov s veľkým klinickým efektom, čiže napr. v kontexte ochorení klasicky považovaných za monogénové, sa čoraz častejšie stane, že takáto analýza odhalí sekvenčné varianty so známym klinickým efektom. Dá sa teda povedať, že momentálne sa nachádzame vo fáze, v ktorej

existuje teoretická a technická možnosť využiť „genomické analýzy“ na efektívnejšie dosiahnutie „genetických diagnóz“, čiže diagnóz, ktoré sa stanovujú na základe identifikácie genetického variantu s veľkým efektom v jedinom géne. Výhoda genomického prístupu v tomto kontexte pritom spočíva v tom, že pri geneticky heterogénnych alebo pri extrémne zriedkavých ochoreniach by bola identifikácia a charakterizácia správneho génu „klasickými“ postupmi zdĺhavá, prácna a finančne pomerne náročná. Pri takomto prístupe sa varianty s menším efektom, ktoré však prispievajú k výslednému fenotypu, zatiaľ najčastejšie strácajú v informačnom šume. Ak aj upustíme od futuristickej predstavy naozaj komplexnej povahy možných budúcich genomických prístupov, v súčasnosti predstavuje mnohokrát problém aj základná interpretácia dát, keďže nielen pri celogenómovom, ale aj pri panelovom sekvenovaní na úrovni celých exónov alebo menších súborov génov sa stretávame s každodenným problémom identifikácie variantov, z ktorých sa vzhľadom na chýbajúce informácie významná časť klasifikuje ako varianty s neznámou klinickou signifikanciou.

Implementácia personalizovanej medicíny vychádzajúcej z genomických informácií má teda svoje úskalia, ani nie tak technického, ale skôr interpretačného a translačného charakteru. Nemôžeme však zabudnúť na to, že gény poskytujú „len“ inštrukcie pre biologické procesy alebo štruktúry, ktoré sú však zabezpečené proteínmi. Tie umožňujú realizovať dané inštrukcie, pričom ako medzikrok medzi inštrukciami a realizátormi sa vyskytujú molekuly RNA. A práve pre veľký význam molekúl RNA a proteínov, extrémny rozvoj moderných technológií umožnil pokroky analýzy aj týchto biomakromolekúl, a to tiež na omických úrovniach. Masívne paralelné sekvenovanie okrem priameho DNA sekvenovania umožňuje napr. analýzy kompletných transkriptómov. Na druhej strane, kompletne iná, avšak nemenej významná technológia založená na hmotnostnej spektrometrii zabezpečila bezprecedentný rozvoj technológií umožňujúcich štúdium štruktúry a funkcie komplexných proteómov, tak na úrovni ich primárnej štruktúry, ako napr. aj ich posttranslačných modifikácií zahrňujúcich fosforyláciu, ubikvitináciu, glykozyláciu atď.⁽¹⁾ Identifikácia peptidov z generovaných profilov je však pomerne náročná úloha, vyžadujúca veľmi dobre definovanú databázu proteínových sekvencií, pričom kombinácia tejto analýzy s transkriptómovou predstavuje prístup s veľkým potenciálom nielen z dôvodu ľahšej identifikácie peptidov, ale napr. aj pre extrémne dynamickú povahu transkriptómu a proteómu.

Výsledkom úzkeho biologického prepojenia a technologických vymožeností, jedným z možných riešení rozšírenia informácií týkajúcich sa efektu neznámych DNA variantov je tzv. hĺbková alebo molekulárna fenotypizácia, sledujúca napr. expresiu génov, ideálne na úrovni RNA aj na úrovni proteínov⁽⁵⁾. Ako sme už spomenuli, moderné metodiky masívne paralelného sekvenovania a hmotnostnej spektrometrie umožňujú v súčasnosti študovať expresiu na omických úrovniach, čiže vo forme celogenómových, celotranskriptómových a celoproteómových analýz. To poskytuje nemalú výhodu v prípadoch, keď vopred nepoznáme cieľ nášho záujmu. Následné kombinatorické hodnotenie dát generovaných omickými analýzami uvedených úrovní sa dá nazvať „multiomickou trianguláciou“, ktorá umožňuje dáta navzájom komplementovať a následne lepšie a presnejšie interpretovať. Prírodzene ani takýto multiomický triangulačný prístup nezaručí definitívne odpovede vo všetkých možných hypotetických a praktických prípadoch a stále budú identifikované aj ťažko interpretovateľné nálezy. Je však určitá pravdepodobnosť, že tieto prípady sa stanú čoraz minoritnejšími, najmä v porovnaní s prístupom čisto genomických analýz. Vysokokapacitné omické analýzy sa prírodzene dajú rozširovať aj mimo úroveň opísaných troch systémov, napr. vo forme analýz epigenómu, epitranskriptómu, mikrobiómu (metagenómu), metabolómu, interaktómu, expozómu a mnohých iných „ómov“, z ktorých všetky majú potenciál pridať molekulárne informácie týkajúce sa konkrétneho objektu záujmu⁽²⁾.

Okrem dočasného problému spracovania a ukladania extrémneho množstva generovaných dát⁽³⁾ načrtnutý postup má prirodzene určité limitácie. Jednou z nich je extrémne dynamická povaha expresných profilov. Na rozdiel od pomerne statického genómu, ktorý nemá veľkú tendenciu meniť sa počas života jedinca (s výnimkou roztrúsených somatických variantov a určitých špecifických ochorení, ako je napr. rakovina alebo ochorenia spojené s nestabilitou a expanziou repetitívnych elementov), expresné profily majú výraznú tendenciu meniť sa napr. fyzickou aktivitou, chorobou alebo aj rôznymi biologickými cyklami⁽⁵⁾. Hlavnou a zatiaľ pretrvávajúcou limitáciou načrtnutého postupu však stále zostáva dostupnosť biologického materiálu na vykonanie potrebných analýz. Genomické dáta, najmä týkajúce sa zdedenej variability, sú totiž obsiahnuté v každej našej bunke (s výnimkou červených krviniek), a tak sú pomerne ľahko dostupné pre sekvenčné analýzy. Transkriptómové aj proteómové analýzy však na rozdiel od základných genomických vyžadujú dostupnosť postihnutého tkaniva, kde sa má exprimovať daný postihnutý gén, v ktorom chceme zmenu identifikovať, limitujúc tak do určitej miery, aplikovateľnosť uvedeného postupu. Či sa tento problém bude dať preklenúť v budúcnosti analýzou cirkulujúcich biomarkerov, prípadne v ktorých konkrétnych ochoreniach, je zatiaľ otvorená otázka.

REFERENCIE

1. Aebersold R, Mann M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature* 2016; 537(7620): 347-355.
2. Butte AJ. Big data opens a window onto wellness. *Nat Biotechnol* 2017; 35(8): 720-721.
3. Eisenstein M. The power of petabytes. *Nature* 2015; 527(7576): Suppl. S12-S13.
4. Green ED, Rubin EM, Olson MV. The future of DNA sequencing. *Nature* 2017; 550(7675): 179-181.
5. Savage N. Proteomics: High-protein research. *Nature* 2015; 527(7576): Suppl. S6-S7.
6. Scott AR. Read the instructions. *Nature* 2016; 537(7619): Suppl. S54-S56.



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

Parazitológom z Medirexu, a. s. uverejnili odborný dokument v uznávanom medzinárodnom časopise

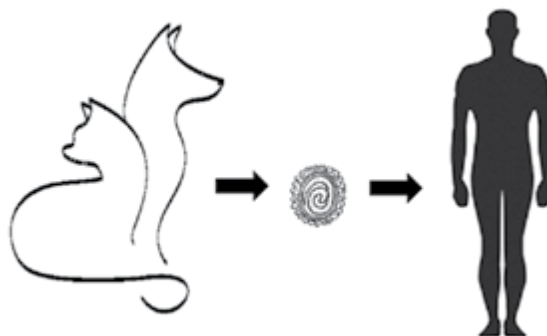
Vojtech Boldiš

Klinická mikrobiológia, Medirex, a. s., Bratislava

Laboratóriá **MEDIREX GROUP** poskytujú nielen rutinnú laboratórnu diagnostiku, ale naši odborníci sa venujú aj zlepšovaniu laboratórnej diagnostiky na základe aktuálnych vedeckých poznatkov. Z tohto dôvodu vám dávame do pozornosti publikáciu „Význam detekcie špecifických IgA anti-toxokarových protilátok pre determináciu humánnej toxokarózy“, ktorú vydalo vydavateľstvo Springer v odbornom karentovom časopise *Folia Microbiologica* koncom roka 2017. RNDr. Vojtech Boldiš, PhD., prof. RNDr. František Ondriska, PhD. a Mgr. Simona Lipková predstavujú kolektív autorov, ktorí spracovali odborný spis.

Humánna toxokaróza je parazitárne ochorenie ľudí, ktoré zapríčiňujú larvy škrkavky psej/mačacej. V rámci patogenézy po určitej dobe migrácii lariev dochádza k tvorbe mnohopočetných granulómov o veľkosti 1 – 2 mm, ktoré sa tvoria najčastejšie v pečeni, pľúcach, ale tiež v srdcovom svale, obličkách, črevnej stene, mezenterých uzlinách, pankrease, CNS a oku človeka.

Inšpiráciou autorov venovaniu sa problematike toxokarózy bolo, že táto tkanivová helmintozoonóza patrí k najrozšírenejším infekciám v mnohých krajinách vrátane Slovenska a že presné určenie aktuálneho statusu nákazy u pacientov je stále problematické. Výskyt larválnej toxokarózy na Slovensku narastá v súvislosti so zvyšujúcim počtom psov a mačiek (najmä túlavých). Rutinná diagnostika humánnej toxokarózy je založená na detekcii špecifických protilátok triedy IgG ako pri väčšine tkanivových helmintóz. Pre rozlíšenie akútnej a chronickej infekcie však detekcia IgG špecifických protilátok nie je postačujúca. Z tohto dôvodu autori sérologickú diagnostiku humánnej toxokarózy rozšírili o dôkaz IgA anti-toxokarových protilátok. Výsledky štúdie potvrdili užitočnosť stanovenia IgA protilátok pre determináciu akútnej toxokarózy najmä u pacientov s vyššími hladinami celkových IgE protilátok čo bolo aj štatisticky potvrdené. Pre určenie akútnej infekcie parazitológovia potvrdili významné súvislosti medzi prítomnosťou anti-toxokarových IgA protilátok a zvýšeným počtom eozinofilov ako i prítomnosť IgG protilátok s nízkou aviditou u pacientov. Celý článok nájdete na webovej stránke <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12223-017-0572-1>.



RNDr. Vojtech Boldiš, PhD.
 Klinická mikrobiológia, Medirex, a. s.
 Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava
 e-mail: vojtech.boldis@medirex.sk

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.

Liquid **B**ased **C**ytology

www.zenskeveci.com/cytologia

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
www.medirexgroupacademy.sk

