

2/2016

newslab

časopis laboratórnej medicíny

ISSN 1338-9661
Ročník VII.

- Plúcna aspergilóza
Pulmonary aspergillosis
- Infekcie vyvolané cytomegalovírusom – diagnostika a terapia
Cytomegalovirus infection – diagnosis and therapy
- Dlhodobá molekulová remisia ako predpoklad úspešného tehotenstva u pacientok s chronickou myelocytovou leukémiou
Long-lasting molecular remission as a precondition for successful pregnancy in female patients with chronic myeloid leukemia
- Aberácie chromozómu 11 u pacientky s akútnou myeloidnou leukémiou – kazuistika
Aberrations of chromosome 11 in patient with acute myeloid leukemia – case report
- Nové biomarkery v diagnostike IgA nefropatie
New diagnostic biomarkers in IgA nephropathy



gyncare

www.gyncare.sk

0800 300 000

GYNCARE prináša do liečby neplodnosti komplexný prístup

Centrum pre asistovanú reprodukciu Gyncare prechádza veľkými zmenami – rozširuje kolektív odborníkov na liečbu neplodnosti, sťahuje sa do nových moderných priestorov a pripravuje novú webovú stránku. Cieľ je jednoznačný – **vyššia úroveň profesionality a odbornosti.**

„Máme najmodernejšie vybavenie a dlhoročné skúsenosti, čo tvorí polovicu úspechu pri všetkých procesoch umelého oplodnenia. Druhú polovicu tvorí náš prístup,“

hovorí Doc. MUDr. Silvia Toporciová.

Keď treba prírode pomôcť, vieme, ako na to.

Naším klientom prinášame:

- odbornosť a skúsenosť
- vynikajúce výsledky a pozitívne recenzie
- komplexný a individuálny prístup
- pocit bezpečia a intimity

Neplodnosť má mnoho príčin a jej liečba je mimoriadne **komplexným procesom**. Gyncare svojim klientom prináša nadštandardnú starostlivosť, ktorá sa nekončí len pri vyšetrení vajčiek, spermií a IVF. **Sústredíme sa aj na imunológiu, genetiku, sexuológiu, psychológiu a andrológiu.**

Vďaka nadštandardnej diagnostike v týchto oblastiach sme schopní lepšie stanoviť diagnózu a rýchlejšie naordinovať správnu liečbu. Naším klientom tak šetríme čas a energiu, ktorej už často pri dlhoročnej neúspešnej snahe o bábätko nemajú nazvyš.

Vďaka našej celkovej starostlivosti sú naši klienti spokojní a naša liečba úspešná.



Vážené kolegyně, vážení kolegovia, milí čitatelia,

keď sme v roku 2010 pripravovali prvé vydanie odborného časopisu **MEDIREX** GROUP NewsLab, bolo našou snahou hlavne informovať vás, našich klientov a spolupracovníkov, o novinkách v našich laboratóriách. O nových testoch, ktoré sme zaviedli (metodické listy), prednáškach, ktoré odznali na našich odborných podujatiach, jeho súčasťou však boli aj pôvodné práce našich kolegov z laboratórií **MEDIREX** GROUP.

Vývoj v oblasti laboratórnej medicíny, ako aj rozvoj našej spoločnosti je však veľmi dynamický, preto sa ukázalo, že vydávanie metodických listov jedenkrát ročne je pre naše aj vaše potreby nepružné, preto boli presunuté do nášho druhého časopisu a NewsLab sa stal výsostne odborným časopisom laboratórnej medicíny.

Rozvojom spolupráce s vysokými školami a vedeckými inštitúciami u nás, ale aj v zahraničí sa nám podarilo v našom časopise uverejňovať aj práce externých spolupracovníkov a kolegov z vedy a výskumu. Aj vďaka tejto spolupráci sme NewsLab rozšírili o nové témy z viacerých odborov laboratórnej medicíny.

Ďalšia veľká zmena prišla so spoluprácou s vydavateľstvom SOLEN, s. r. o., ktoré je vydavateľom viacerých odborných lekárskeho časopisov. Spolupráca so skúsenými redaktormi priniesla obsahové, ale aj grafické zmeny nášho časopisu. NewsLab sa stal plne recenzovaným časopisom s ambíciou prinášať pravidelné rubriky, ako sú prehľadové články, pôvodné práce, krátke novinky z oblasti laboratórnej medicíny. Dovolili sme si priniesť aj novú rubriku, ktorú sme ambiciózne nazvali „Uspeli sme v zahraničí“, v ktorej by sme vás radi informovali nielen o úspechoch našich kolegov z Medirexu, ale aj iných kolegov z oblasti laboratórnej diagnostiky, ktorým sa podarilo úspešne prezentovať ich prácu na medzinárodnom poli. Prvou takouto prezentáciou je správa z Európskeho kongresu klinických mikrobiológov a infektológov v Amsterdame.

Našou ambíciou je vybudovať z NewsLab-u „značku“ pre vyhľadávaný a uznávaný časopis všetkých a pre všetkých, ktorí sa zaoberajú laboratórnou medicínou, už toto číslo je preto obohatené o príspevky z oblasti mikrobiológie, vďaka čomu NewsLab zastrešuje naozaj všetky odbory laboratórnej medicíny. Postupne v ňom chceme uverejňovať články nielen takpovediac „z bežnej laboratórnej medicíny“, ale aj články z oblasti vedy a výskumu, ktoré sú neoddeliteľnou súčasťou prudko sa rozvíjajúcej laboratórnej medicíny. Možno budú občas pre nás praktikov trochu náročnejšie, verím však, že rozšíria náš aj váš obzor a aj vďaka nim sa dozvieme o novinkách, ktoré sa v našom odbore „dejú“.

NewsLab sa teda mení z časopisu firemného na časopis plne nezávislý a otvorený odbornej verejnosti, ktorý dáva priestor všetkým autorom, ktorí majú chuť podeliť sa o svoje vedomosti a výsledky svojej práce s ostatnými kolegami. Naše ciele sú možno trochu odvážne, ale dúfame, že aj vďaka vašim názorom a pripomienkam sa nám ich podarí dosiahnuť a že nás na tejto neľahkej ceste budete sprevádzať.

Do rúk sa vám teda dostáva vydanie „vynoveného“ časopisu NewsLab, ja mu prajem veľa spokojných čitateľov a vám obohacujúce čítanie, aby ste si po jeho prečítaní mohli povedať, že stál za to. Takže „NewsLab, šťastnú cestu!“

RNDr. Elena Tibenská, PhD.
šéfredaktorka časopisu NewsLab

EDITORIÁL

Úvodné slovo

71

PREHĽADOVÉ ČLÁNKY/REVIEW ARTICLES

MUDr. Miroslav Gašpar

Plúcna aspergilóza*Pulmonary aspergillosis*

74

RNDr. Daniela Hučková, RNDr. Katarína Kollárová

Infekcie vyvolané cytomegalovírusom – diagnostika a terapia*Cytomegalovirus infection – diagnosis and therapy*

78

RNDr. Daniela Hučková, RNDr. Katarína Kollárová

Klinický význam vírusu Epsteina-Barrovej*The clinical relevance of Epstein-Barr virus*

84

Ing. Zuzana Pakanová, PhD., RNDr. Jana Ziburová, PhD., RNDr. Anna Šalingová,
MUDr. Darina Behúlová, PhD., MUDr. Anna Hlavatá, PhD., MPH, RNDr. Ján Mucha, CSc.**Kongenitálne poruchy glykozylácie a ich diagnostika na Slovensku***Congenital disorders of glycosylation and their diagnostics in Slovakia*

89

RNDr. Martina Sládekóvá, MHA

Mykotické ochorenia a stavy podmienené hubami – charakteristika a rozdelenie*Mycotic diseases and morbid conditions caused by fungi – characteristic and classification*

93

MUDr. Tomáš Šimurda, MUDr. Miroslava Dobrotová, PhD., Ing. Ingrid Škorňová, PhD.,
RNDr. Jela Ivanková, MUDr. Pavol Hollý, PhD., prof. MUDr. Ján Staško, PhD., prof. MUDr. Peter Kubisz, DrSc.**Diagnostika vrodených krvácajúcich porúch sekundárnej hemostázy:
jednoduchý sprievodca pre bežné klinické laboratóriá***Diagnostics of inherited bleeding disorders of secondary hemostasis:
an easy guide for routine clinical laboratories*

98

RNDr. Miroslav Tomka, PhD.

Genetic landscape of breast cancer*Genetické pozadie nádorov prsníka*

102

Ročník 7, 2016, číslo 2,
vychádza dvakrát ročne
Dátum vydania: september 2016**Redakčná rada:****Predseda:**

RNDr. Elena Tibenská, PhD.

Členovia:MUDr. Katarína Schenková
MUDr. Eva Ďurovcová, PhD.
MUDr. Ján Lazúr
RNDr. Ján Radvánszky, PhD.
RNDr. Renata Lukačková
MUDr. Pavol Janega, PhD.
MUDr. Peter BohušMgr. Peter Baráth, PhD.
RNDr. Daniela Hučková
MUDr. Adriana Krajčíková
MUDr. Monika Czifuszová, PhD.**Editorky:**PhDr. Mária Žeglenová
Mgr. Slavomíra Šindelárová**Vydavateľ:**SOLEN, s. r. o., Ambrova 5,
IČO 35865211**Sídlo vydavateľa a adresa redakcie:**SOLEN, s. r. o., Ambrova 5,
831 01 Bratislavatel.: 02/5465 1386, fax.: 02/5465 1384,
redakcia@solen.sk**Redakcia:**

Michaela Malová

Grafická úprava:

Ján Kopčok

Všetky články sú plne recenzované.**Registrácia MK SR
pod číslom EV 5164/15
ISSN 1338-9661****Časopis je indexovaný
v Bibliographia Medica Slovaca (BMS).****Citácie sú spracované v CIBaMed.****Citačná skratka: Newslab**Na informačné a nekomerčné účely
články v publikácii Newslab je do-
volené voľne a bezplatne sťahovať,
kopírovať, distribuovať, tlačiť, pre-
hľadávať a odkazovať na ne, pričom
je 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 jednot-
livých článkov či inzerátov.**

PREHĽADOVÉ ČLÁNKY/REVIEW ARTICLES

Mgr. Katarína Uhlárová, RNDr. Iveta Gáboríková

An image-based automated analysis of urine sediment*Automatizovaná analýza močového sedimentu*

106

PÔVODNÉ PRÁCE/ORIGINAL ARTICLES

RNDr. Miroslava Eckertová, PhD., MUDr. Lucia Setteyová, MUDr. Katarína Slezáková, PhD.

Dlhodobá molekulová remisia ako predpoklad úspešného tehotenstva u pacientok s chronickou myelocytovou leukémiou*Long-lasting molecular remission as a precondition for successful pregnancy in female patients with chronic myeloid leukemia*

109

Mgr. Jakub Petřík, Mgr. Alena Žákovičová, Mgr. Kristína Juríková, RNDr. Renata Lukačková

Cytogenetic and molecular changes in myelodysplastic syndromes*Cytogenetické a molekulárne zmeny pri myelodysplastickom syndróme*

113

KAZUISTIKY/CASE REPORTS

RNDr. Andrea Blahová

Aberácie chromozómu 11 u pacientky s akútnou myeloidnou leukémiou – kazuistika*Aberrations of chromosome 11 in patient with acute myeloid leukemia – case report*

117

MUDr. Kristína Giertlová, MUDr. Hedviga Mrázová, MUDr. Daša Mesárošová, PhD.,
MUDr. Štefan Laššán, PhD., MUDr. Marta Hájková, CSc., MPH, MUDr. Pavol Janega, PhD.**Invazívna aspergilóza u pacientov s pokročilou cirhózou pečene***Invasive aspergillosis in patients with advanced cirrhosis of the liver*

121

MUDr. Michal Zámečník

Malobunkový hyperkalcemický karcinóm/malígny rhabdoidný tumor ovária – kazuistika*Hypercalcemic-type small cell carcinoma of the ovary – case report*

126

NOVINKY/NEWS

MUDr. Eva Ďurovcová, PhD.

Nové biomarkery v diagnostike IgA nefropatie*New diagnostic biomarkers in IgA nephropathy*

129

USPELI SME V ZAHRANIČÍ/WE SUCCEEDED ABROAD

MUDr. Monika Czirfuszová, PhD.

Európsky kongres klinických mikrobiológov a infektológov v Amsterdame**– prezentácia našich výsledkov**

131

Redakcia časopisu Newslab ďakuje všetkým recenzentom, ktorí sa podieľali na recenzovaní príspevkov publikovaných v druhom tohtoročnom vydaní časopisu.

Pľúcna aspergilóza

MUDr. Miroslav Gašpar

Oddelenie mykológie, HPL, spol. s r. o., Bratislava

Pľúcna aspergilóza predstavuje široké spektrum rôznych klinických foriem postihnutia dolných dýchacích ciest – od alergických prejavov až po život ohrozujúce infekcie u vysoko rizikových pacientov. Existujú rôzne klasifikácie pľúcnej aspergilózy, ale najčastejšie sa rozlišujú štyri základné formy: invazívna pľúcna aspergilóza, chronická nekrotizujúca pľúcna aspergilóza, pľúcny aspergilóm a alergická bronchopulmonálna aspergilóza. Vyvolávateľom ochorenia sú ubikvitárne vlákňité huby rodu *Aspergillus*. Autor uvádza prehľad klinických foriem pľúcnej aspergilózy a možnosti ich laboratórnej diagnostiky.

Kľúčové slová: pľúcna aspergilóza, *Aspergillus fumigatus*, invazívna pľúcna aspergilóza, chronická nekrotizujúca pľúcna aspergilóza, aspergilóm, alergická bronchopulmonálna aspergilóza, galaktomanán, bronchoalveolárna laváž

Pulmonary aspergillosis

Pulmonary aspergillosis represents a wide range of different clinical forms of affection of the lower respiratory tract – from allergic symptoms to life-threatening infections in high-risk patients. There are several classifications of pulmonary aspergillosis, but most often, four main forms are being distinguished: invasive pulmonary aspergillosis, chronic necrotizing pulmonary aspergillosis, pulmonary aspergilloma and allergic bronchopulmonary aspergillosis. Causative agents of disease are ubiquitous filamentous fungi of the genus *Aspergillus*. The author presents an overview of clinical forms of pulmonary aspergillosis and possibilities of their laboratory diagnostics.

Key words: pulmonary aspergillosis, *Aspergillus fumigatus*, invasive pulmonary aspergillosis, chronic necrotizing pulmonary aspergillosis, aspergilloma, allergic bronchopulmonary aspergillosis, galactomannan, bronchoalveolar lavage

NewsLab, 2016; roč. 7(2): 74–77

Úvod

V posledných rokoch sa rozširuje spektrum etiologických agensov infekcií z dôvodu narastajúceho počtu **imunokompromitovaných jedincov** liečených agresívnymi chemoterapeutikami, a tiež vďaka zlepšujúcim sa možnostiam diagnostiky. Do popredia sa dostávajú tiež **mikroskopické huby** – kvasinky a vlákňité huby (1, 2). Zástupcovia rodu *Aspergillus* sa bežne vyskytujú v prostredí. Vstupnou bránou infekcie sú dýchacie cesty, pacient sa nakazí inhaláciou spór (konídií) (3). Konídie sa vďaka svojej malej veľkosti môžu dostať až do pľúcnych alveol, v ktorých za vhodných podmienok kľúčia a prerastajú vo forme mycélia (spleť hýf – hubových vláken) cez okolité štruktúry, prípadne až do krvného obehu, a tak do ďalších orgánov. Predilekčnou lokalizáciou aspergilózy sú **pľúca** (4). Mimopľúcna lokalizácia je vzácnejšia (paranazálne dutiny, obličky, mozog, pečeň, koža). Najčastejším pôvodcom humánnych aspergilóz je *Aspergillus fumigatus* (5), nasledovaný druhmi *A. flavus*, *A. niger* a *A. terreus* (6, 7).

Formy pľúcnej aspergilózy

Invazívna pľúcna aspergilóza (IPA)

Táto najzávažnejšia forma pľúcnej aspergilózy (PA) sa vyskytuje predovšetkým u **výrazne imunitne oslabených jedincov**. Letalita IPA sa pohybuje od 50 % až do 90 % (5). Najviac ohrození sú pacienti s dlhodobou neutropéniou, akútnou leukémiou, po transplantácii krvotvorných buniek a orgánov (srdce, pľúca, pečeň, obličky), dlhodobo liečení kortikosteroidmi alebo imunosupresívami (7, 8). V klinickom obraze dominuje horúčka, neproduktívny dráždivý kašeľ, dyspnoe,

pleurálna bolesť, pleurálny trecí šelest (8, 9). Následkom angioinvazivity je hemoptýza, pri masívnejšom postihnutí vznikajú kavitácie. Môže dôjsť k diseminácii – najmä do CNS (centrálny nervový systém), čo sa spája s veľmi nepriaznivou prognózou (3). V závažných prípadoch pribúdajú známky konsolidácie pľúc, tachypnoe, progresívne sa zhoršujúca hypoxémia až respiračné zlyhanie. Na úspešné zvládnutie IPA je nevyhnutné včasné stanovenie diagnózy a najmä podávanie účinnej antimykotickej (ATM) liečby (7, 9). V súčasnosti je liekom voľby vorikonazol, v druhej línii lipidový komplex amfotericínu B, posakonazol alebo kaspofungín (8). Niekedy je potrebná aj chirurgická intervencia (6).

Chronická nekrotizujúca pľúcna aspergilóza (CNPA)

Táto vzácna chronická infekcia je takmer vždy spôsobená druhom *A. fumigatus* (5). Ide o lokálnu inváziu hýf do pľúcneho parenchýmu, bez angioinvazivity a diseminácie do iných orgánov, pri ktorej dochádza k nekrózám a zápalu. CNPA sa vyskytuje najmä u starších pacientov s **chronickými pľúcnymi ochoreniami** (chronická obštrukčná pľúcna choroba, pľúcna tuberkulóza, pneumokonióza, cystická fibróza, sarkoidóza, pľúcny infarkt) a nezriedka aj s miernym imunodeficitom či chronickým alkoholizmom (3).

Pľúcny aspergilóm

Aspergilóm (mycetóm) je guľovitý útvar tvorený masou hýf, hlienu, fibrínu a leukocytov. Vytvára sa v preexistujúcej dutine pľúcneho parenchýmu. Najčastejšou príčinou vzniku týchto dutín je **tuberkulóza, sarkoidóza**, iný **nekrotizujúci** pľúcny proces (absces, iné pľúcne in-

fekcie), **cystická fibróza** alebo **nádor** (3, 5). Aspergilóm len zriedkavo mení svoju veľkosť a pri poškodení ciev v bezprostrednej blízkosti môže spôsobiť krvácanie. Definitívnou liečbou je chirurgické riešenie – resekcia aspergilómu alebo cieleňá embolizácia vyživovacej bronchiálnej artérie.

Alergická bronchopulmonálna aspergilóza (ABPA)

Táto forma aspergilózy sa vyskytuje predovšetkým u pacientov s **prieduškovou astmou** alebo **cystickou fibrózou** a výrazne zhoršuje priebeh týchto ochorení (3). ABPA predstavuje hypersenzitívnu reakciu na kolonizáciu dýchacích ciest *Aspergillus* spp. Dochádza k upchatiu dýchacích ciest zhlukom hlienu, hýf, zápalových buniek, bez poškodzovania pľúcneho tkaniva (5). Priebeh ochorenia je možné liečebne ovplyvniť celkovými kortikoidmi a v niektorých prípadoch pridaním ATM (3).

Diagnostika pľúcnej aspergilózy

Diagnostika pľúcnej aspergilózy je interdisciplinárny proces. Opiera sa o klinický obraz, zobrazovacie metódy a laboratórne vyšetrenia. **HRCT** (*high-resolution computed tomography* – počítačová tomografia s vysokým rozlíšením) má v porovnaní s klasickým RTG vyšetrením oveľa väčší prínos v diagnostike. Pri IPA sa stretávame s rôznorodými nálezmi – mnohopočetné ložiská, kavitácie, pleurálny výpotok, „*ground glass opacity*“ (obraz mliečneho skla), „*halo sign*“ (prekrvácenie na periférii centrálnych kondenzácií) alebo „*air crescent sign*“ (rozpadová dutina).

Ďalším krokom by mali byť **mikrobiologické analýzy**: stanovenie galaktomanánu (GM) v BAL (bronchoalveolárna laváž) a krvnom sére, mikroskopická a kultivačná analýza BAL (9, 10, 11, 12, 13).

Mozaiku vyšetrení môže doplniť **dôkaz DNA** (*deoxyribonucleic acid* – deoxyribonukleová kyselina) *Aspergillus* spp. metódou PCR (*polymerase chain reaction* – polymerázová reťazová reakcia) vo vzorkách BAL, krvi a iných primárne sterilných biologických materiáloch (8, 9, 10). Nápomocnou metódou je tiež detekcia 1,3- β -D-glukánu (BDG), najmä vo vzorkách krvného séra (výnimočne aj v BAL). Jednou z možností je histologické vyšetrenie vzoriek získaných biopsiou pľúcnych infiltrátov, avšak pre vysoké riziko komplikácií a častú kontraindikáciu výkonu sa táto možnosť širšie nevyužíva.

Mikrobiologická diagnostika PA

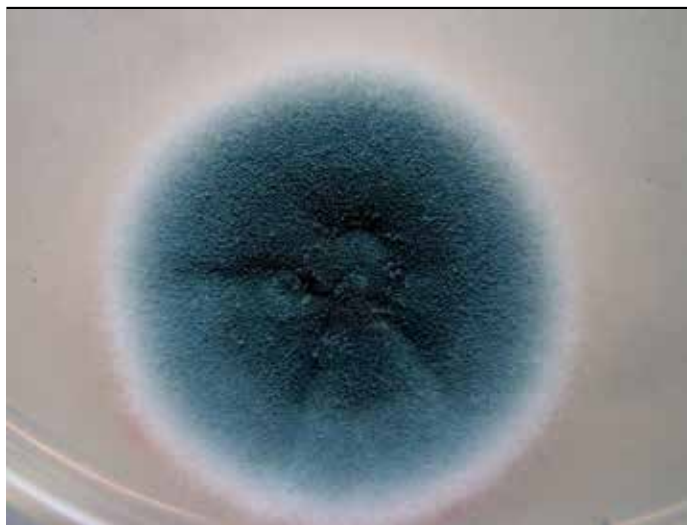
Pri podozrení na pľúcnu aspergilózu sa odporúča zaslať biologický materiál cielene do mykologického laboratória. Medzi diagnosticky najprínosnejšie vzorky patrí BAL, bioptická vzorka pľúc, krvné sérum, punktáty z primárne sterilných lokalít a pri podozrení na disemináciu do CNS aj likvor. Menej vhodným materiálom je odsatý sekrét (OS) z dolných dýchacích ciest (DDC) alebo sputum. Pozitívny nález v týchto biologických materiáloch môže byť spôsobený kolonizáciou dýchacích ciest.

Mikroskopia je časovo nenáročná, ale vyžaduje si skúsenosť mykológa (1, 9). Prítomnosť hýf v biologickom materiáli z DDC zvyšuje pravdepodobnosť možnej pľúcnej aspergilózy. Senzitivita mikroskopie síce výrazne kolíše (0 % až 90 %) (10), ale prítomnosť elementov mikroskopických húb vo vzorke môže klinikov nasmerovať k mykotickej etiológii infekcie. Nevýhodou tejto analýzy okrem nízkej senzitivity je, že neumožňuje identifikovať pôvodcu do rodu a druhu. Hýfy *Aspergillus* spp. sa nedajú spoľahlivo odlíšiť od hýf niektorých ďalších rodov mikromycét (9, 10, 13).

Kultivácia vlákňitých húb je časovo náročná (2 až 14 dní), avšak pozitívny nález umožňuje určiť možného pôvodcu infekcie (1, 2). Nevýhodou kultivácie je okrem dĺžky jej trvania tiež nízka senzitivita – okolo 50 % (9), čo môže súvisieť s predošlou ATM liečbou pacienta a faktom, že elementy mikroskopických húb nemusia byť vo vzorke rovnomerne rozptýlené. Pokiaľ sa *Aspergillus* sp. vykultivuje z biptickej vzorky tkaniva, diagnóza aspergilózy je potvrdená (10). Základným kultivačným médiom je Sabouraudov glukózový agar. Z narastenej kultúry (obrázok 1) sa zhotoví preparát, napríklad v laktofenole s bavlníkovou modrou (obrázok 2). Na základe makro- a mikromorfológie sa izolát identifikuje na úroveň druhu (respektíve sekcie alebo len rodu). Kvantitatívna citlivosť kmeňa na ATM sa stanovuje formou E-testu. Výsledkom je číselný údaj v jednotke mg/l, ktorý predstavuje hodnotu MIC (*minimum inhibitory concentration* – minimálna inhibičná koncentrácia) daného ATM pre konkrétny izolát *Aspergillus* sp. (obrázok 3). Štandardnou pôdou na stanovenie citlivosti vlákňitých húb na ATM je RPMI médium (*Roswell Park Memorial Institute medium*). Podľa Vestníka Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky z roku 2010 sa odporúča stanovovať citlivosť na vorikonazol, amfotericín B, posakonazol, kaspofungín a itraconazol (14).

Stanovenie GM v BAL a krvnom sére metódou **ELISA** (*enzyme-linked immunosorbent assay* – imuno-enzymatická analýza na dôkaz antigénov alebo protilátok) sa stalo **jedným z kľúčových laboratórnych vyšetrení pri podozrení na IPA** (7, 15). Tento antigén sa uvoľňuje z bunkovej steny niektorých mikroskopických húb (vrátane druhov rodu *Aspergillus*) počas ich rastu. Množstvo GM vo vzorke sa vyjadruje pomocou indexu pozitivity (IP), ktorý má rôzne hraničné hodnoty (*cut-off*) v biologických materiáloch BAL a sérum. Vo vzorkách BAL je *cut-off* IP = 1,0 (11, 15). V krvnom sére je GM negatívny pri IP < 0,5; slabopozitívny od IP $\geq$ 0,5 až do < 0,7 a pozitívny pri IP $\geq$ 0,7. Nález IP GM $\geq$ 0,5 v dvoch za sebou nasledujúcich vzorkách je mikrobiologickým kritériom pre pravdepodobnú aspergilózu (9). Pri detekcii GM je často pozorovaná skrížená (falošná) pozitivita. Je opisovaná pri systémových infekciách vyvolaných inými rodmi mikroskopických húb (*Penicillium* spp., *Paecilomyces* spp., *Alternaria* spp., *Rhodotorula* spp., *Histoplasma capsulatum*), liečbe pacientov niektorými beta-laktámovými antibiotikami (ampicilín, ampicilín/sulbaktám, piperacilín/tazobaktám, amoxicilín/klavulanát), kolonizácii črevnej sliznice *Bifidobacterium* spp. u novorodencov (najmä nedonosených), prieniku GM z niektorých mliečnych výrobkov cez poškodenú stenu gastrointestinálneho traktu (mukozitída pri črevnej GvHD, *graft-versus-host disease* – reakcia štetu voči hostiteľovi po transplantácii), aplikácii roztoku *Plasmalyte*®, kontaminácii vzorky počas odberu alebo pri spracovaní materiálu (vata, vzdušné konidie *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp.) (9, 10, 16). Pozitivita GM v BAL pri pľúcnej aspergilóze môže časovo predchádzať jeho pozitivitu v krvnom sére (9), preto sa pri podozrení na IPA odporúča včas odobrať BAL na stanovenie GM. Výhodou vyšetrenia hladiny GM (predovšetkým v BAL) je jeho vysoká senzitivita a špecifickosť (61 % až 94 % a 71 % až 92 %) (10), ako aj negatívna prediktívna hodnota (92 % až 98 %) (5), pričom vyššie hodnoty sa zaznamenali pri vyšetrení BAL (10). Monitorovanie hodnôt IP GM je jedným z ukazovateľov úspešnosti ATM liečby pacienta s IPA.

Obrázok 1. *A. fumigatus*, Sabouraudov agar, 7-dňová kultúra (fotografia: autor)



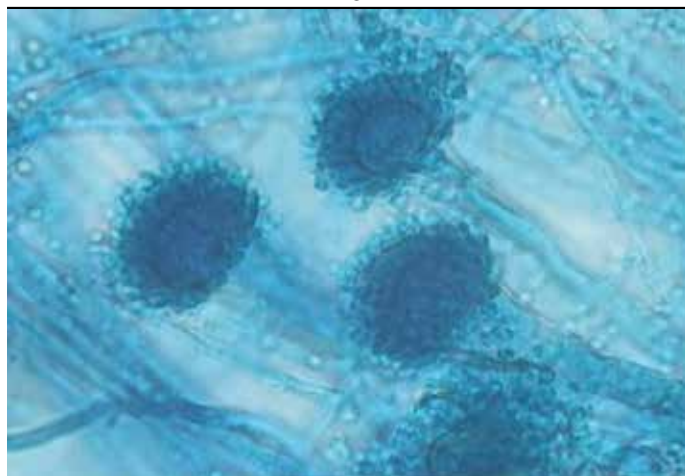
Protilátky voči *A. fumigatus* sa stanovujú z krvného séra, napríklad nepriamou hemaglutináciou (celkové protilátky) alebo metódou ELISA – špecifické protilátky tried IgA, IgM a IgG, respektíve IgE. Pri **nepriamej hemaglutinačnej metóde** sa ako hraničný titer protilátok udáva hodnota 1 : 320. V takom prípade sa odporúča opakovať vyšetrenie s odstupom 2 až 3 týždňov. Signifikantnú reakciu v zmysle aspergilózy predstavuje titer $\geq 1 : 640$. Výhodou týchto sérologických analýz je využitie ich stanovenia pri diagnostike ABPA, CNPA alebo pľúcneho aspergilómu.

Pri diagnostike IPA je možné využiť aj stanovenie **BDG** (9, 10, 17). Tento antigén sa uvoľňuje do krvného obehu pri aktívne prebiehajúcej systémovej mykóze, a to nielen pri aspergilóze, ale aj pri infekcii vyvolanej inými mikroskopickými hubami – s výnimkou mukormycét a druhov rodu *Cryptococcus* (9). Nižšia špecifickosť (76 %) je jednou z nevýhod tohto laboratórneho testu (15). Falošne pozitívny nález bol pozorovaný u pacientov liečených niektorými antibiotikami (amoxicilín/klavulanát, imipeném, gentamicín), pri dialýze s použitím celulózovej membrány, kontaminácii gázou, bakteriálnej sepe alebo laboratórnej kontaminácii (9). Silnou stránkou tejto metódy je vysoká negatívna prediktívna hodnota (94 %) (15).

Metódy **molekulárnej biológie** sa využívajú čoraz častejšie. Pri podozrení na IPA sa stanovuje prítomnosť DNA *Aspergillus* spp. v biologických vzorkách PCR analýzami. K dispozícii je niekoľko komerčných súprav na rôzne typy PCR reakcií a podľa viacerých štúdií sa dosahujú dobré výsledky z hľadiska senzitivity (70 % až 91 %), špecifickosti (97 % až 100 %), pozitívnej (100 %) a negatívnej prediktívnej hodnoty (93 %) (10, 15). Stále však chýba štandardizácia týchto analýz pre rutinné laboratórne vyšetrenie. Pozitívny PCR nález u imunokompromitovaného symptomatického pacienta má vysokú diagnostickú hodnotu. Molekulárno-biologické stanovenia sú však vysoko senzitívne, preto môže ľahko dôjsť k falošne pozitívnym výsledkom, napríklad pri kontaminácii vzorky konídiami *Aspergillus* spp. z prostredia alebo pri kolonizácii DDC.

Interpretácia výsledkov mykologických vyšetrení je náročná a odporúča sa podľa možnosti potvrdiť nález opakovaným vyšetrením.

Obrázok 2. *A. fumigatus*, mikroskopický preparát v laktofenole s bavlníkovou modrou, zväčšenie 500-krát (fotografia: autor)



Obrázok 3. *A. fumigatus*, E-test vorikonazolu (Liofilchem® s. r. l., Taliansko), RPMI médium – 24-hodinový nález, MIC = 0,094 mg/l (fotografia: autor)



Odber a transport biologického materiálu

Biologický materiál je potrebné **odoberať asepticky** do sterilných uzatvárateľných odberových nádob a po odbere ich už neotvárať. Všeobecne platí, že materiál by mal byť **doručený do laboratória čo najskôr po odbere** – pri diagnostike PA cielene na oddelenie mykológie. Rovnako dôležité je správne a čitateľne vyplniť mikrobio-

logickú (mykologickú) žiadanku vrátane uvedenia adekvátnej diagnózy. Identifikačné údaje pacienta (meno, rodné číslo), typ materiálu a požadovaných analýz je potrebné zaznačiť aj na odberovej nádobe (skúmavke, tampóne).

Materiál získaný pri bronchoskopii (BAL) a bioptické vzorky sa uschová v sterilnom fyziologickom roztoku. Spútum sa odoberá ráno pri prvej expektorácii po vypláchnutí ústnej dutiny čistou pitnou vodou.

Na stanovenie sérového GM a protilátok voči *A. fumigatus* sa odoberá krv do skúmavky s gélom (respektíve do skúmavky bez protizrážavého činidla) s objemom minimálne 2 až 3 ml. Pri možnosti transportu materiálu do 2 hodín od odberu sa môže skladovať pri izbovej teplote (+18 °C až +25 °C). Ak je predpokladaná lehota doručenia vzorky 2 až 24 hodín, je potrebné uschovať ju pri teplote +2 °C až +8 °C. **Pri dlhšom skladovaní je potrebné oddeliť krvné sérum** (v laminárnom boxe, aby sa minimalizovalo riziko kontaminácie vzorky) a zamraziť ho na -18 °C až -24 °C.

Kultivácia spolu s mikroskopiou (pri požiadavke na kultivačné vyšetrenie sa vykonáva automaticky) biologického materiálu sa realizuje denne. GM a celkové protilátky voči *A. fumigatus* sa vyšetrujú t. č. 2-krát týždenne (utorky a piatky), pričom materiál musí byť doručený do laboratória najneskôr deň vopred.

Stanovenie sérového galaktomananu a protilátok voči *A. fumigatus* je určené hospitalizovaným pacientom, rovnako aj pacientom z hematologických, imunoalergologických a pneumologických ambulancií pri podozrení na niektorú z foriem pľúcnej aspergilózy. U ostatných ambulantných pacientov sa tieto analýzy poskytujú na priamu platbu (cenník dostupný na webovom rozhraní laboratórií).

Záver

Pľúcna aspergilóza si vyžaduje náležitú pozornosť pre svoj rôznorodý klinický obraz, problematickú diagnostiku a v mnohých prípadoch aj nepriaznivú prognózu. Základom úspešnej laboratórnej diagnostiky IPA je včasné rozpoznanie jej hrozby na základe rizikových faktorov pacienta, nešpecifických klinických príznakov a s pomocou ďalších vyšetrovacích metód (9, 15). Výsledky jednotlivých laboratórnych vyšetrení je potrebné interpretovať v súlade s klinickým stavom pacienta, ako aj výsledkami zobrazovacích metód, čo predpokladá úzku spoluprácu ošetrovúcich lekárov a mikrobiológov pri manažmente pacienta s pľúcnou aspergilózou.

Literatúra

1. Buchta V, Hamal P, Mallátová N, et al. Nepodkročiteľné minimum laboratorní diagnostiky invazívnych mykotických infekcií – doporučení odborníků s podporou CELL a SLM JEP. *Postgraduální medicína*. 2010;12(příloha 5):76–81.
2. Tošková M, Winterová J, Kocmanová I, et al. Invazívne mykotické infekcie u hematologických pacientov – epidemiológia, rizikové faktory, klinické príznaky a diagnostika. *Onkologické*. 2012;6(6):298–303.
3. Harman EM. *Aspergillosis* [online]. Updated 2015. Available from: <<http://emedicine.medscape.com/article/296052-overview>>. Accessed December 28, 2015.
4. De Hoog GS, Guarro J, Gené J, et al. *Atlas of Clinical Fungi*. 2nd ed. Utrecht, The Netherlands/Reus, Spain: Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili; 2000: 1126.
5. Kousha M, Tadi R, Soubani AO. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. *Eur Respir Rev*. 2011;20(121):156–174.
6. Drgoňa L. Invazívne mykotické infekcie. In: Drgoňa L. *Infekčné komplikácie onkologických pacientov*. Bratislava, Slovenská republika: Univerzita Komenského; 2013: 24–42.
7. Gašpar M, Drgoňa L, Póczová M, et al. Včasná invazívna pľúcna aspergilóza s fatálnym koncom u pacientky s akútnou lymfoblastovou leukémiou. *Onkológia (Bratisl.)*. 2015;10(2):116–120.
8. Sherif R, Segal BH. Pulmonary Aspergillosis: clinical presentation, diagnostic tests, management and complications. *Curr Opin Pulm Med*. 2010 May;16(3):242–250.
9. The Czech Leukemia Study Group for Life (Česká leukemická skupina – pro život) – Ráčil Z, Mayer J, eds. Invazívna aspergilóza: súčasné možnosti diagnostiky. *Vnitř. Lék*. 2007;53(Suppl):S1–S34.
10. Barton RC. Laboratory Diagnosis of Invasive Aspergillosis: From Diagnosis to Prediction of Outcome. *Scientifica*. 2013;Article ID 459405:29.
11. Haber J. Hodnocení galaktomananu v séru a bronchoalveolární laváži u neutropenických a non-neutropenických pacientů. *Kazuistiky v alergologii, pneumologii a ORL*. 2011;8(2):10–13.
12. Sharma SK, Kumar S, Singh AK, et al. Feasibility and outcome of CT-guided lung biopsy in patients with hematological diseases and suspected fungal pneumonia. *J Infect Dev Ctries*. 2013;7(10):748–752.
13. Crumley S, Hull A, Cernoch P, et al. Comparison between cytologic examination of fungi in bronchial washings and bronchoalveolar lavage specimens and culture: a review of 100 cases with emphasis on diagnostic pitfalls. *Journal of the American Society of Cytopathology*. 2014;3(4):211–217.
14. Odborné usmernenie Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky k diagnostike a liečbe invazívnych mykóz. In: *Vestník Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky*. Bratislava, Slovenská republika: V OBZOR, s. r. o.; 2010: 146–159.
15. Hoenigl M, Prattes J, Spiess B, et al. Performance of Galactomannan, Beta-D-Glucan, Aspergillus Lateral-Flow Device, Conventional Culture, and PCR Tests with Bronchoalveolar Lavage Fluid for Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2014;52(6):2039–2045.
16. Wheat LJ, Walsh TJ. Diagnosis of invasive aspergillosis by galactomannan antigenemia detection using an enzyme immunoassay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008;27(4):245–251.
17. Racil Z, Kocmanová I, Lengerová M, et al. Difficulties in using 1,3-β-D-glucan as the screening test for the early diagnosis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies – high frequency of false-positive results and their analysis. *J Med Microbiol*. 2010;59(9):1016–1022.



MUDr. Miroslav Gašpar
HPL, spol. s r. o.
Oddelenie mykológie
Istrijská 20, 841 07 Bratislava
gaspar@hpl.sk

Infekcie vyvolané cytomegalovírusom – diagnostika a terapia

RNDr. Daniela Hučková, RNDr. Katarína Kollárová

Medirex, a. s., Bratislava

Ako pri ostatných herpesvíruchoch ľudí, aj pri cytomegalovíruse (CMV) po prekonaní primárnej infekcie nasleduje celoživotná infekcia, sprevádzaná obdobím latencie a reaktívácie, ktorá býva spojená s asymptomatickým vylučovaním vírusu do telesných sekrétov. U imunokompetentných jedincov prebieha CMV infekcia/reaktívacia obyčajne bezpríznakovito. Ak sú prítomné klinické príznaky, väčšinou odznejú samé, bez potreby terapie. Infekcia je kontrolovaná imunitným systémom hostiteľa, najmä bunkovou imunitou.

Vážny klinický problém predstavujú primárne a sekundárne CMV infekcie u gravidných žien (riziko kongenitálnej infekcie), novorodencov a u ťažko imunodeficitných jedincov (pacienti po transplantácii, pacienti s AIDS, onkologickí pacienti).

Laboratórna diagnostika nekomplikovaných ochorení využíva stanovenie špecifických protilátok. Pri závažných neurologických/očných komplikáciách býva doplnená o dôkaz autochtónnej produkcie protilátok a o detekciu CMV DNA vo vhodnom biologickom materiáli (cerebrospinálny mok, očná tekutina, nezrazená krv). U gravidných žien sa v diferenciálnej diagnostike kongenitálnych infekcií obyčajne stanovujú anti-CMV IgM/G a test avidity anti-CMV IgG. Pri zistení akýchkoľvek abnormalít, či už v sére matky, alebo plodu pomocou ultrasonografie/MRI sa odporúča kvantitatívne stanovenie CMV DNA (PCR) v plodovej vode. Manažment imunodeficitných pacientov sa opiera o monitoring nálože CMV DNA z vhodného biologického materiálu pomocou kvantitatívnych molekulárno-biologických metód.

Kľúčové slová: cytomegalovírus, laboratórna diagnostika, primárna infekcia, sekundárna infekcia, terapia

Cytomegalovirus infection – diagnosis and therapy

As with other human herpesviruses, overcoming cytomegalovirus (CMV) primary infection is followed by persistent lifelong infection, accompanied by a period of latency and reactivation, which is usually associated with asymptomatic viral shedding in bodily secretions. In immunocompetent individuals, CMV infection and/or reactivation are usually asymptomatic. In case some clinical symptoms are present, they are usually self-limiting without the need for any specific therapy. The infection is controlled by the host immune system, especially by the cellular immunity.

Primary and secondary CMV infections represent a serious clinical problem in pregnant women (the risk of congenital infections), newborns and severely immunocompromised individuals (transplant recipients, patients with AIDS, cancer patients).

Laboratory diagnosis of uncomplicated CMV manifestations is based on the determination of specific antibodies. Severe neurological/ocular CMV complications are complemented by autochthonous antibody production testing and CMV DNA detection in appropriate biological material (cerebrospinal fluid, aqueous/vitreous humour, whole blood). In pregnant women, the differential diagnosis of CMV congenital infection is usually based on serological testing of anti-CMV IgM/IgG and avidity of anti-CMV IgG in serum; but in case that any abnormalities in serologic profile of the mother or ultrasound/MRI testing of the fetus are found out, CMV DNA quantitative real-time PCR of amniotic fluid is recommended. In immunocompromised patients, the monitoring of CMV DNA load from a suitable biological material by quantitative molecular-biological method plays a key role in patient's management.

Key words: cytomegalovirus, laboratory diagnosis, primary infection, secondary infection, therapy

NewsLab, 2016; roč. 7(2): 78–83

Cytomegalovírus

Cytomegalovírus ľudí (CMV, HCMV, ľudský herpesvírus 5, HHV-5) patrí medzi ľudské herpetické vírusy; konkrétne do podčelade *Betaherpesvirinae*, do ktorej sa zaraďuje spolu s ostatnými cytomegalovírusmi iných cicavcov a herpesvírusmi ľudí 6 a 7 (1).

Genóm CMV ľudí je najväčší zo skupiny humánnych vírusov (~ 230 kbp). Tvorí ho lineárna dvojvláknová DNA, ktorá kóduje približne 180 proteínov, z toho asi 60 glykoproteínov, takže antigénová komplexnosť obalu je veľká. Niektoré štruktúrne a neštruktúrne proteíny (napríklad pp150, pp65, gB, gH, UL97, UL54, IE) sa využívajú

v diagnostike CMV infekcií, respektíve pri štúdiu niektorých typov vakcín (1).

Ľudský CMV sa vyskytuje v populácii ubikvitárne ako heterogénna zmes kmeňov. Taxonomicky ide o jediný druh bez rozlišovania sérotypov, avšak pri porovnaní sekvencií genómov jednotlivých izolátov a laboratórne pasážovaných kmeňov bola zistená značná variabilita (1). Pôvodne sa predpokladalo, že variabilita kmeňov CMV má len malý vplyv na hostiteľa, avšak v posledných rokoch viaceré štúdie naznačujú, že rozdiely v kmeňoch môžu výrazne ovplyvňovať klinický priebeh infekcie u pacientov s ťažkým imunodeficitom a pri kongenitálnych

infekciách (2). Navyše, kmeňovo-špecifické imunitné odpovede môžu brániť vývoju efektívnej vakcíny.

Epidemiológia

Infekcie CMV sú bežné, prevalencia špecifických protilátok svedčiacich o prekonaní infekcie postupne stúpa s vekom a u dospelaj populácie dosahuje v rôznych geografických oblastiach v závislosti od spôsobu života od cca 40 – 60 % v rozvinutých krajinách až po skoro 100 % v krajinách s nízkym hygienickým štandardom (3).

Cytomegalovírus sa šíri podobne ako ostatné herpetické vírusy, najmä blízkym kontaktom (horizontálne), významný je však i vertikálny prenos. Zdrojom nákazy sú chorí, častejšie však nosiči (vírus sa aktivuje hlavne pri oslabení imunitného systému, hoci klinické prejavy nemusia byť zjavné). Inkubačná lehota obvyčajne trvá v rozmedzí 9 – 60 dní (4).

Ako pri primárnej, tak i pri každej reaktivácii sa viriónové častice vylučujú z tela rôznymi telesnými sekrétmi, hlavne močom a slinami, ale aj materským mliekom, cervikálnym sekrétom, ejakulátom alebo slzami. K prenosu infekcie môže dôjsť i iatrogénne (krvou či transplantovaným orgánom) (1, 5). Vylučovanie vírusu môže byť intermitentné alebo kontinuálne a bežne trvá u dospelých niekoľko dní až týždňov, u malých detí skôr niekoľko mesiacov až rokov (6, 7, 8, 9). Pre tehotné ženy je obvyčajne príčinou infekcie práve kontakt s deťmi, často vlastnými (5, 10).

Vylučovanie CMV materským mliekom je jeden z najvýznamnejších rizikových faktorov postnatálnej infekcie (60 – 80 % pravdepodobnosť transmisie) (11). Najčastejšie sa vírus vylučuje 2. až 3. týždeň po pôrode (12). Obdobie vylučovania i množstvo vylučovaného vírusu sú rôzne.

Klinický obraz

Primárna infekcia prebieha väčšinou v detstve a spravidla inaparentne. Niekedy sa môže vyskytnúť ochorenie bez špecifických príznakov (horúčka, zdurené uzliny, únava, slabosť, bolesť svalov/kĺbov, nechutenstvo), respektíve syndróm infekčnej mononukleózy (IM), ktorý je klinicky neodlíšiteľný od IM spôsobenej vírusom Epsteina-Barrovej (EBV) (4).

Vzácnnejšie môže CMV infekcia vyvolať napríklad kolitídu, Guillain-Barrého syndróm, meningoencefalitídu, trombocytopéniu, hemolytickú anémiu, anikterickú či mierne ikterickú hepatopatiu (hepatosplenomegália a lymfocytóza), pneumóniu, perikarditídu, myokarditídu, vaskulárnu trombózu, uveitídu (4). Viaceré hlásené prípady CMV ochorení u imunkompetentných pacientov boli asociované s komorbiditami, ako napríklad diabetes mellitus a renálne zlyhanie. Predpokladá sa, že mierna dysfunkcia imunitného systému môže predstavovať v súčasnosti zatiaľ prehliadané riziko rozvoja CMV ochorenia (13, 14, 15, 16).

Kongenitálne CMV infekcie sú relatívne časté (0,6 – 0,7 % živonarodených detí), pričom stupeň klinického prejavu je závislý od infekčnej dávky. Infekcia tehotných žien môže viesť k transplacentárnemu prenosu vírusu na plod alebo k perinatálnej nákaze novorodenca. Kongenitálna infekcia nasleduje hlavne po primárnej infekcii gravidnej matky (20 – 40 % prípadov), avšak aj reinfekcia iným kmeňom CMV alebo reaktivácia latentného vírusu (latentne perzistujúceho kmeňa v hostiteľovi po prekonanej primárnej CMV infekcii v minulosti) môže spôsobiť infekciu plodu, hoci v podstatne menšej miere (0,2 – 2 % incidencie) (5, 7, 10, 17,

18). Asi 10 % kongenitálne infikovaných detí je pri pôrode symptomatických. Symptomatická kongenitálna infekcia sa môže manifestovať ako perinatálna sepsa, hepatitída, hepatosplenomegália, lymfocytóza, trombocytopénia, petechie, pneumónia alebo chorioretinitída (18). Úmrtnosť býva v rozmedzí 2 – 30 %. Dôsledkom teratogénneho účinku CMV môžu mať novorodenci rôzne vrodené chyby, často so závažnými trvalými následkami. Približne u 5 – 15 % kongenitálne infikovaných detí, ktoré sú pri pôrode asymptomatické, sa rozvinú symptómy v priebehu niekoľkých mesiacov až rokov. Najčastejšie ide o poškodenie sluchového nervu (10, 18).

Perinatálne infekcie a skoré infekcie po narodení u nedonosených detí môžu mať podobné klinické prejavy ako infekcie *in utero*, avšak ešte donedávna sa predpokladalo, že nebývajú spojené s trvalými následkami (19). Niektoré novšie štúdie však pri dlhodobom sledovaní predčasne narodených detí s postnatálnou CMV infekciou zistili určité mierne kognitívne rozdiely u tejto skupiny detí v porovnaní s kontrolnou skupinou jedincov bez včasnej postnatálnej CMV infekcie (20).

Infekcie u imunodeficitných pacientov. Rizikovou skupinu tvoria najmä pacienti po transplantácii kostnej drene, solídnych orgánov a pacienti s AIDS, u ktorých môže CMV infekcia vyvolať závažné systémové ochorenie (21, 22, 23, 24).

U imunosuprimovaných séronegatívnych pacientov dochádza k infekcii prostredníctvom transplantovaných orgánov/štepov od séropozitívnych darcov; u séropozitívnych príjemcov môže ísť o reaktiváciu endogénnej latentnej infekcie alebo reinfekciu iným kmeňom CMV pochádzajúcim od darcu (25). CMV infekcia môže mať potom priame a nepriame dôsledky. Medzi priame dôsledky patrí napríklad supresia kostnej drene, pneumónia, myokarditída, ochorenie gastrointestinálneho traktu, hepatitída, pankreatitída, nefritída, retinitída, encefalitída; medzi nepriame dôsledky akútna alebo chronická rejekcia štepov, akcelerovaná ateroskleróza (transplantácia srdca), sekundárne vírusové infekcie (napríklad EBV-asociované posttransplantačné lymfoproliferatívne ochorenie, infekcie herpesvírusmi ľudí 6, 7, adenovírusmi), bakteriálne (napríklad enterokoky, *Staphylococcus aureus*, aeróbne a fakultatívne anaeróbne gramnegatívne paličky) a mykotické infekcie (*Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Pneumocystis jirovecii*), znížená odolnosť štepov a celkové prežívanie pacienta (24, 26, 27, 28).

Laboratórna diagnostika

Na diagnostiku CMV infekcií u imunkompetentných jedincov je vo väčšine prípadov postačujúca sérologická diagnostika – stanovenie špecifických IgM (prípadne i IgA) a IgG (u séropozitívnych gravidných žien doplnená i o stanovenie avidity anti-CMV IgG). Molekulárno-biologické metódy (najmä PCR) sú vhodné predovšetkým pre ťažko imunodeficitných pacientov, novorodencov, pri diferenciálnej diagnostike kongenitálnych infekcií, neurologických/očných infekcií a iných závažných stavov.

Stanovenie špecifických protilátok proti CMV

Z nepriamych metód sa v súčasnosti využívajú najmä metódy enzýmovej alebo chemiluminiscenčnej imunoanalýzy (ELISA, CLIA). Stanovujú sa protilátky triedy IgG (kvantitatívne) a IgM (semikvantitatívne), v ojedinelých prípadoch i IgA (semikvantitatívne). Algoritmus sérologických testov v súčasnosti v mnohých prípadoch umožňuje interpretáciu výsledku

a určenie štádia infekcie z vyšetrenia jednej vzorky. Ak je potrebné posúdiť významné zmeny v protilátkovej aktivite, vyšetrenie druhej vzorky je vhodné cca o 7 – 14 dní.

Anti-CMV IgM a IgA protilátky sa tvoria len prechodne v súvislosti s aktívnou CMV infekciou (hlavne primárnou, ale i rekurentnou). V priebehu primárnej infekcie obvyčajne po 2 – 3 mesiacoch rýchlo klesajú, možná je však aj dlhodobá perzistencia IgM (29). Stanovenie samotných anti-CMV IgM nestačí na dôkaz aktívnej infekcie, možná je aj heterotypická imunitná odpoveď vplyvom inej prebiehajúcej infekcie (napríklad *Toxoplasma gondii*, *Legionella pneumophila*, chlamýdie, vírus parotitídy, EBV) (5, 30).

Nakoľko anti-CMV IgG sú prítomné už v akútnej fáze infekcie a po jej odznení pretrvávajú celý život, diagnostický význam má dôkaz sérokonverzie alebo významného vzostupu týchto protilátok v párových vzorkách séra. Vzostup protilátkovej aktivity môže byť spôsobený aj heterológom imunitnou odpoveďou v dôsledku inej infekcie (napríklad HSV). Dôkaz vírusovo špecifických protilátok má dobrú výpovednú hodnotu, hlavne pri diagnostike primárnych infekcií. Vzhľadom na nasledujúce celoživotné nosičstvo vírusu je hosťateľský organizmus opakovane stimulovaný vírusovými antigénmi. Dôsledkom toho má dlhodobo vysokú hladinu protilátok, ktorá pri reaktiváciách nemusí vykazovať významné zmeny. Preto je diagnostický význam sérologických metód pri reaktiváciách a reinfekciách nízky. U dospelých pacientov je interpretácia sérologického nálezu často komplikovaná a nejednoznačná: dospelý organizmus je už infikovaný viacerými druhmi herpetických vírusov, ktoré sa môžu v rôznych klinických situáciách sekundárne reaktivovať a vyvolať tvorbu druhovo špecifických i skřížene reagujúcich protilátok. Typickým príkladom je sekundárna reaktivácia CMV a HHV-6 pri infekčnej mononukleóze vyvolanej EBV (6, 30).

Výsledok sérologického vyšetrenia musí byť hodnotený v súvislosti s klinickým stavom pacienta a s výsledkami iných laboratórnych vyšetrení. Plošný sérologický skrining žien pred graviditou (na selekciu a ďalšie sledovanie séronegatívnych osôb) sa vzhľadom na vysokú prevalenciu CMV v populácii a relatívne nízke percenta symptomatických kongenitálnych infekcií paušálne nerobí (29).

U imunodeficitných pacientov i novorodencov je sérologická diagnostika nedostatočná a je potrebné ju doplniť metódami priameho dôkazu CMV (21).

Stanovenie avidity (väzobnej schopnosti) IgG protilátok

Stanovenie avidity IgG protilátok je veľmi dôležité na diagnostiku CMV infekcie u gravidných žien. Využíva sa na odlíšenie primárnej infekcie, keď je riziko transplacentárneho prenosu vírusu najvyššie, od reinfekcie/reaktivácie vírusu (31). Pri primárnej infekcii sa tvoria nízkoavidné protilátky, ktoré sú počas 2 – 4 mesiacov rekonvalescencie postupne nahrádzané protilátkami s vysokou aviditou (*cut-off* pre nízku aviditu sa v závislosti od použitej diagnostickej súpravy obvyčajne udáva od 35 % do 50 %; pre vysokú aviditu v rozmedzí od 50 % do 65 %). Vysoká avidita anti-CMV IgG v 1. trimestri vylučuje primárnu infekciu počas gravidity a indikuje nízke riziko intrauterinnej transmisie vírusu. Naproti tomu, interpretácia sérologického výsledku so stredne vysokou, respektíve vysokou aviditou stanovenou v 2. alebo 3. trimestri je obťažná, nakoľko nie je možné jednoznačne vylúčiť primárnu infekciu počas tehotenstva (18, 30, 32).

Diagnostika primárnych infekcií sa môže v niektorých prípadoch doplniť o ďalšie testy, ako napríklad dôkaz anti-CMV glykoproteínu B (syntéza 50 až 100 dní po infekcii) (33).

Stanovenie špecifickej bunkovej imunitnej odpovede

U imunosuprimovaných pacientov po transplantácii je reaktivácia/reinfekcia, respektíve primárna infekcia CMV relatívne častým rizikovým faktorom rozvoja ochorenia. Profylaktická/včasná preemptívna terapia špecifickými antivírusovými látkami je ťažisková na zníženie morbidít a mortality u tejto skupiny pacientov (21, 22, 24). Vzhľadom na vysokú toxicitu preparátov a ďalšie nevýhody (napríklad neskorý nástup CMV ochorenia pri profylaktickej terapii a ťažkosti s určením *cut-off* hraníc vírusovej nálože na začatie preemptívnej terapie) sa už niekoľko rokov hľadá nástroj na odlíšenie asymptomatickej aktivácie CMV od aktivácie s rizikom rozvoja CMV ochorenia. V rutinej praxi sa zvykne sledovať dynamika nálože CMV DNA pomocou kvantitatívnej PCR, avšak v posledných rokoch sa čoraz častejšie zdôrazňuje potreba sledovania rekonštitúcie bunkovej zložky adaptívnej imunity (napríklad pomocou ELISPOT alebo cytokinovej prietokovej cytometrie), konkrétne anti-CMV špecifických CD4+ a CD8+ T-lymfocytov a ich produktov, ktoré sú kľúčové na dosiahnutie dlhodobej protektivity proti reaktivácii vírusu a rozvoju ochorenia (25, 34, 35, 36, 37).

Priame metódy

V minulosti bola na dôkaz CMV infekcie štandardným postupom kultivácia vírusu *in vitro* na bunkových kultúrach (napríklad ľudské fibroblastové bunky). Vznik typického cytopatického efektu bolo možné pozorovať po 2 – 21 dňoch, t. j. že na vydanie negatívneho výsledku bolo nutné vzorku kultivovať minimálne 3 – 4 týždne. Zrýchlený variant kultivácie (tzv. shell vial assay) pomocou centrifugácie vzorky na monovrstvu fibroblastových buniek pomohol výrazne zrýchliť detekciu vírusu (38).

Vírusové antigény (najmä IE = immediate-early; t. j. veľmi skoré antigény, produkované na začiatku replikácie vírusu) môžu byť tiež detegované pomocou fluorescenčne značených monoklonových protilátok, a to už po 16 hodinách inkubácie vzorky (mikroskopicky alebo v mikrotitračných platničkách) (38).

Na diagnostiku CMV infekcie je použiteľná i metóda antigenémie pp65 (imunofluorescenčné mikroskopické stanovenie antigénu pp65, tegumentového fosfoproteínu CMV, v periférnych polymorfonukleároch a mononukleároch), hybridizácia *in situ*, imunohistochemické vyšetrenie vzoriek tkanív alebo tekutého biologického materiálu (pomocou fluorescenčných alebo enzýmovo značených monoklonových/polyklonových protilátok proti skorým CMV antigénom), metóda „hybrid capture“ (detekcia CMV DNA pomocou RNA značených sond) alebo dôkaz IE mRNA (veľmi skorý transkript CMV proteosyntézy) metódou NASBA (nucleic acid sequence-based amplification) (21, 22, 30, 38, 39, 40).

Je potrebné zdôrazniť, že hoci vyššie spomenuté metódy sa v priebehu niekoľkých posledných desiatok rokov postupne vyvíjali a používali či už diagnosticky, alebo na získanie nových poznatkov o CMV a jeho interakcii s hosťateľom, vzhľadom na časovú náročnosť, prácnosť, požiadavky na erudovanú spôsobilosť pri hodnotení niektorých testov a v neposlednom rade i nižšiu citlivosť (okrem NASBA) sa v súčasnosti v rutinných laboratóriách už skoro vôbec nepoužívajú.

Amplifikačné metódy (najmä PCR na kvantitatívne stanovenie vírusovej nukleovej kyseliny) vďaka rýchlosti, vysokej citlivosti, špecifickosti a relatívne dobrej aplikovateľnosti stále viac nahrádzajú ostatné metódy priameho dôkazu vírusov (21, 22).

Pri vyšetrení vzoriek pomocou PCR, ktoré je realizované na účely diferenciálnej diagnostiky, je vhodné odberať materiál zodpovedajúci postihnutým orgánom: napríklad cerebrospinálny mok pri ochorení nervového systému, bronchoalveolárnu laváž (BAL) alebo spútum pri postihnutí dolných dýchacích ciest, výter zo spojkového vaku pri keratokonjunktivitídach, očné tekutiny pri retinitíde, biopsiu pri gastroenteritíde, periférnu nezrazenú krv pri akútnych horúčkových ochoreniach či uzlinových syndrónoch (30), plodovú vodu pri perinatálnej diagnostike a moč, sliny, krv, prípadne i iný materiál pri postnatálnej diagnostike kongenitálnych CMV infekcií (29, 38, 40).

Na základe dôkazu vírusovej DNA nie je možné odlíšiť latentný vírus od replikujúceho. Výsledky kvalitatívneho vyšetrenia PCR môžu byť pozitívne ako v akútnej fáze infekcie, tak i v prodromálnom asymptomatickom štádiu, či vočasnej fáze rekonvalescencie (30). Sú to veľmi citlivé metódy, schopné zachytiť i malé množstvo vírusu (napríklad 100 – 1 000 kópií vírusového genómu/1 ml). Tieto metódy môžu detegovať i bezpríznakovú alebo lokálnu aktiváciu CMV. Rozlíšiť tieto štádiá je často možné len pomocou kvantitatívnej PCR (real time PCR).

Pri interpretácii nálezu je potrebné zohľadniť, z akého materiálu bolo vyšetrenie realizované. Najlepšie na posúdenie aktívnej CMV infekcie je vyšetrenie periférnej krvi s kvantitatívnym vyjadrením vírusovej nálože. Dôkaz DNA v slinách, moči alebo vaginálnom sekréte môže znamenať ako primárnu infekciu, tak i reinfekciu, či reaktiváciu. Pri náleze CMV DNA v BAL je potrebné zohľadniť možnú kontamináciu vplyvom asymptomatického vylučovania vírusu do nazofaryngeálneho sekréту. Na vylúčenie možnej „mylnnej“ positivity BAL je vhodné opakované alebo paralelné vyšetrenie BAL a periférnej krvi (30).

V diagnostike kongenitálnych infekcií je základom dôkaz primárnej infekcie, respektíve reinfekcie/reaktivácie CMV u matky v gravidite. Ak sa aktívna infekcia u matky potvrdí, respektíve je veľmi suspektná (sérokonverzia v triede IgG, výrazne vysoké hladiny anti-CMV IgM/IgG alebo signifikantný vzostup hladiny špecifických protilátok, nízka avidita špecifických IgG, detekcia CMV DNA v krvi, moči alebo slinách matky, abnormálny ultrasonografický obraz plodu), je možné urobiť laboratórne vyšetrenia amniotickej tekutiny (metódou PCR). V tomto prípade má PCR metóda vysokú negatívnu aj pozitívnu prediktívnu hodnotu, výsledok je však nutné interpretovať v závislosti od gestačného týždňa (testovanie amniotickej tekutiny pred 21. týždňom gestácie má len asi 30 – 45 % senzitivitu) (41). Pozitívny výsledok testu indikuje, že došlo k prenosu infekčného agensa na plod.

Na diferenciálnu diagnostiku kongenitálnych CMV infekcií u novorodencov a najmä na odlíšenie od peri-/postnatálnych infekcií je najvhodnejším materiálom moč, respektíve sliny odobraté do cca 2 týždňov po narodení dieťaťa (38). Pozitívna potvrdí infekciu, ktorá môže byť symptomatická alebo asymptomatická. Pri liečbe symptomatických infekcií sa zvykne monitorovať množstvo DNA vírusu v periférnej krvi, prípadne paralelne i v inom biologickom materiáli (napríklad moč, BAL, ascites) kvantitatívnou PCR metódou (30, 38).

Problémom je retrospektívny dôkaz kongenitálnej infekcie u detí, u ktorých sa klinické príznaky prejavujú oneskorene a prítomnosť aktívnej CMV infekcie sa už nedá dokázať. Na retrospektívne stanovenie infekcie CMV sa môže použiť detekcia CMV DNA z vysušených vzoriek krvi aplikovaných hneď po pôrode na tzv. perinatálne karty (Guthrie cards) (42, 43, 44). Periférna nezrazená krv je vhodným materiálom pri monitorovaní infekcie na účely včasného záchytu aktivácie vírusu u vysoko rizikových pacientov (napríklad pacienti po transplantácii, pacienti s AIDS, nedonosení novorodenci v riziku perinatálnej infekcie) pomocou kvalitatívnej PCR a pri monitorovaní úspešnosti terapie sledovaním vírusovej nálože pomocou kvantitatívnej molekulárno-biologickej metódy (21, 22, 23, 24, 45, 46).

Rezistencia CMV voči antivírusovým látkam sa stáva stále väčším klinickým problémom, najmä pri liečbe pacientov po transplantácii a HIV pozitívnych pacientov. Na diagnostiku rezistencií je najviac využívaná sekvenácia genómu CMV a sledovanie mutácií v úsekoch kódujúcich *UL97* (gén pre fosfotransferázu) alebo *UL54* (gén pre vírusovú DNA polymerázu). Diagnostika je však veľmi nákladná, nedáva kvantitatívny výsledok (t. j. nevieme koľko % vírusovej populácie danú mutáciu obsahuje), a tiež je náročná na interpretáciu (môžu byť detegované i náhodné, irelevantné mutácie), preto nebýva dostupná v rutinných laboratóriách (47).

Terapia a profylaxia

Liečba primárnej, nekomplikovanej CMV infekcie u imunokompetentných osôb je obvyčajne symptomatická (podporná terapia, pečeňová diéta, obmedzenie fyzicky náročných aktivít). Špecifická antivírusová terapia sa podáva len vo výnimočných prípadoch, napríklad pri meningoencefalitíde, očných komplikáciách alebo ťažkej pneumónii vyvolanej CMV infekciou/aktiváciou (16).

Na liečbu pacientov so závažným priebehom CMV infekcie sa obvyčajne používa gancyklovir, foscarnet alebo cidofovir. Tieto lieky však majú veľa nežiaducich vedľajších účinkov, pri ktorých medzi najzávažnejšie patrí myelotoxicita a nefrotoxicita (48, 49). Novšie preparáty, ako napríklad brincidofovir, maribavir, leflunomid, majú viaceré výhody (menšia toxicita, lepšia biologická dostupnosť, vyššia účinnosť lieku), no sú ekonomicky nákladnejšie (50, 52, 53). Každé transplantáčne centrum má svoje algoritmy na manažment pacienta v závislosti od typu transplantácie, biologických parametrov donora a recipienta a iných rizikových faktorov. Profylaktická terapia sa volí najmä u séroneгатívnych príjemcov, ktorým sa transplantuje štep/orgán od séropozitívneho darcu. Preemptívna terapia sa zvykne voliť u menej rizikových pacientov (21, 22, 24). Podľa typu transplantácie a ďalších rizikových faktorov sa nastavia tzv. *cut-off* hladina vírusovej nálože, po prekročení ktorej sa podáva špecifická antivírusová látka. Ďalšou možnosťou pri aktivácii CMV je redukcia imunosupresie, podávanie intravenózneho imunoglobulínu alebo transfer *ex vivo* upravených klonov cytotoxických T-lymfocytov špecifických proti CMV, izolovaných od darcu transplantátu (25, 36, 54).

Špecifická antivírusová terapia nie je vhodná na aplikáciu v gravidite. Kladný efekt zabránenia ťažkého poškodenia plodu sa pozoroval napríklad podaním hyperimúnného imunoglobulínu matke intravenózne (raz mesačne až do pôrodu), respektíve intraamniotickou infúziou alebo infúziou do pupočnej žily (55, 56).

Pri laboratórne potvrdennej kongenitálnej CMV infekcii sú symptomatickí novorodenci obvyčajne liečení gancyklovirom/valgancyklovirom (57, 58). Na profylaktickú terapiu asymptomatických novorodencov nie je jednotný názor. Zatiaľ nie je možné definovať, u ktorých z nich sa v priebehu rokov prejavia neskoré následky kongenitálnej infekcie, ako napríklad strata sluchu, aby boli cielene liečení len títo pacienti. Vzhľadom na toxicitu preparátu a možné riziko vzniku anémie v dôsledku podávania antivírusovej látky sa v súčasnosti skôr odporúča pravidelné monitorovanie dieťaťa v špecializovaných ambulanciách (napríklad ORL, očné oddelenie) počas niekoľkých rokov po narodení pre včasnú intervenciu v prípade rozvoja senzorineurálnej poruchy (podanie gancykloviru, logopedické cvičenia, kochleárny implantát) (59, 60). Ďalším problémom z hľadiska ekonomických nákladov sa javí otázka zavedenia plošného skríningu novorodencov na selekciu detí s asymptomatickou kongenitálnou CMV infekciou, ktoré by danému monitoringu malo predchádzať.

Pri postnatálnych infekciách býva liečba antivirotikami indikovaná v závislosti od klinického stavu dieťaťa. V rámci prevencie proti postnatálnej CMV infekcii u nedonosencov sa odporúča podávať materské mlieko po šetrnej tepelnej inaktivácii (údajne je optimálne zahriatie 5 minút na 72 °C) (61).

Možnosti prevencie kongenitálnej CMV infekcie a prevencie alebo aspoň zmiernenia CMV ochorení u imunosuprimovaných pacientov pomocou vakcinácie sú zatiaľ v štádiu výskumu. Viaceré vakcíny už boli testované na vybraných skupinách pacientov: živá atenuovaná vakcína, rekombinantné vakcíny, DNA vakcína alebo subjednotková vakcína (obsahujúca glykoproteín B) (25, 29, 62).

Literatúra

- Rajčáni J, Čiampor F. *Lekárska virológia*. Bratislava: Veda; 2006: 574.
- Klein M, Schoppel K, Amvrossiadis N, et al. Strain-Specific Neutralization of Human Cytomegalovirus Isolates by Human Sera. *J Virol*. 1999;73(2):878–886.
- Boeckh M, Leisenring W, Riddell SR, et al. Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: importance of viral load and T-cell immunity. *Blood*. 2003;101(2):407–414.
- Akhter K. *Cytomegalovirus Clinical Presentation* [online]. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/215702-clinical>. Updated August 12, 2015.
- Stagno S. Cytomegalovirus. In: Remington JS, Klein JO, eds. *Infectious diseases of the fetus and new born infant*. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 2001: 389–424.
- Arora N, Novak Z, Fowler KB, et al. Cytomegalovirus Viruria and DNAemia in Healthy Seropositive Women. *J Infect Dis*. 2010;202:1800–1803.
- Cannon MJ, Hyde TB, Schmid DS. Review of cytomegalovirus shedding in bodily fluids and relevance to congenital cytomegalovirus infection. *Rev Med Virol*. 2011;21(4):240–255.
- Noyola DE, Demmler GJ, Williamson WD, et al. Cytomegalovirus urinary excretion and long term outcome in children with congenital cytomegalovirus infection. Congenital CMV Longitudinal Study Group. *Pediatr Infect Dis J*. 2000;19:505–510.
- Zanghellini F, Boppana SB, Emery VC, et al. Asymptomatic primary cytomegalovirus infection: virologic and immunologic features. *J Infect Dis*. 1999;180:702–707.
- Swanson EC, Schleiss MR. Congenital Cytomegalovirus Infection: New Prospects for Prevention and Therapy. *Pediatr Clin North Am*. 2013;60(2):10.1016/j.pcl.2012.12.008.
- Vochem M, Hamprecht K, Jahn G, et al. Transmission of cytomegalovirus to preterm infants through breast milk. *Pediatr Infect Dis J*. 1998;17:53–58.
- Hamprecht K, Maschmann J, Vochem M, et al. Epidemiology of transmission of cytomegalovirus from mother to preterm infant by breastfeeding. *Lancet*. 2001;357:513–518.
- Cook CH, Trgovcich J. Cytomegalovirus reactivation in critically ill immunocompetent hosts: A decade of progress and remaining challenges. *Antiviral Res*. 2011;90(3):151–159.
- Lancini D, Faddy HM, Flower R, et al. Cytomegalovirus disease in immunocompetent adults. *Med J*. 2014;201(10):578–580.
- Osawa R, Singh N. Cytomegalovirus infection in critically ill patients: a systematic review. *Critical Care*. 2009;13:R68.
- Rafailidis PI, Mourtoukous EG, Varbobitis IC, et al. Severe cytomegalovirus infection in apparently immunocompetent patients: a systematic review. *Virol J*. 2008;5:47.
- Boppana SB, Rivera LB, Fowler KB, et al. Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *N Engl J Med*. 2001;344:1366–1371.
- Centers for Disease Control and Prevention: Cytomegalovirus (CMV) and Congenital CMV Infection [online]. Available from: <http://www.cdc.gov/cmv/clinical/features.html>.
- Vollmer B, Seibold-Weiger K, Schmitz-Salue C, et al. Postnatally acquired cytomegalovirus infection via breast milk: effects on hearing and development in preterm infants. *Pediatr Infect Dis J*. 2004;23(4):322–7.
- Brecht KF, Goelz R, Bevo A, et al. Postnatal human cytomegalovirus infection in preterm infants has long-term neuropsychological sequelae. *J Pediatr*. 2015;166(4):834–9.e1. doi: 10.1016/j.jpeds.2014.11.002.
- Azevedon LS, Pierrotti LC, Abdala E, et al. Cytomegalovirus infection in transplant recipients. *CLINICS*. 2015;70(7):515–523.
- Bhat V, Joshi A, Sarode R, et al. Cytomegalovirus infection in the bone marrow transplant Patient. *World J Transplant*. 2015;5(4):287–291.
- Brantsaeter AB, Holberg-Petersen M, Jeansson S, et al. CMV quantitative PCR in the diagnosis of CMV disease in patients with HIV-infection – a retrospective autopsy based study. *BMC Infectious Diseases*. 2007;7:127.
- Bruminhent J, Razonable RR. Management of cytomegalovirus infection and disease in liver transplant recipients. *World J Hepatol*. 2014;6(6):370–383.
- Einsele H. Immunotherapy for CMV infection. *Cytotherapy*. 2002;4(5):435–436.
- Roman A, Manito N, Campistol JM, et al.; ATOS working group. The impact of the prevention strategies on the indirect effects of CMV infection in solid organ transplant recipients. *Transplant Rev*. 2014;28(2):84–91.
- Rubin RH. The indirect effects of cytomegalovirus infection on the outcome of organ transplantation. *JAMA*. 1989;261(24):3607–3609.
- Couzi L, Pitard V, Moreau J-F, et al. Direct and Indirect Effects of Cytomegalovirus-Induced $\gamma\delta$ T Cells after Kidney Transplantation. *Frontiers in Immunology*. 2015;6:3. doi:10.3389/fimmu.2015.00003.
- Revello MG, Gerna G. Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus and newborn infant. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(4):680–715.
- Roubalová K. Laboratorní diagnostika herpetických virů. *Med. Pro Praxi*. 2010;7(5):241–244.
- Kanengisser-Pines B, Hazan Y, Pines G, et al. High cytomegalovirus IgG avidity is a reliable indicator of past infection in patients with positive IgM detected during the first trimester of pregnancy. *J Perinat Med*. 2009;37(1):15–18.
- Prince HE, Lapé-Nixon M. Role of Cytomegalovirus (CMV) IgG Avidity Testing in Diagnosing Primary CMV Infection during Pregnancy. *Clin Vaccine Immunol*. 2014;21(10):1377–1384.
- Sipewa MJ, Goubau P, Bodeus M. Evaluation of a cytomegalovirus glycoprotein B recombinant enzyme immunoassay to discriminate between a recent and a past infection. *J Clin Microbiol*. 2002;40(10):3689–3693.
- Egli A, Binet I, Binggeli S, et al. Cytomegalovirus-specific T-cell responses and viral replication in kidney transplant recipients. *Journal of Translational Medicine*. 2008;6:29.
- Gabanti E, Bruno F, Lillieri D, et al. Human Cytomegalovirus (HCMV) – Specific CD4+ and CD8+ T Cells Are Both Required for Prevention of HCMV Disease in Seropositive Solid-Organ Transplant Recipients. *PLoS ONE*. 2014;9(8):e106044.
- Hanley PJ, Bollard CM. Controlling Cytomegalovirus: Helping the Immune System Take the Lead. *Viruses*. 2014;6:2242–2258.
- Lillieri D, Gerna G, Fornara C, et al. Prospective simultaneous quantification of human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T-cell reconstitution in young recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants. *Blood*. 2006;108(4):1406–1412.
- Ross SA, Novak Z, Pati S, et al. Diagnosis of Cytomegalovirus Infections. *Infect Disord Drug Targets*. 2011;11(5):466–474.
- Gerna G, Baldanti F, Lillieri D, et al. Human Cytomegalovirus Immediate-Early mRNA Detection by Nucleic Acid Sequence-Based Amplification as a New Parameter for Preemptive Therapy in Bone Marrow Transplant Recipients. *J Clin Microbiol*. 2000;38(5):1845–1853.
- Revello MG, Lillieri D, Zavattoni M, et al. Prenatal diagnosis of congenital human cytomegalovirus infection in amniotic fluid by nucleic acid sequence-based amplification assay. *J Clin Microbiol*. 2003;41(4):1772–1774.
- Liesnard C, Donner C, Brancart F, et al. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection: prospective study of 237 pregnancies at risk. *Obstet. Gynecol*. 2000;95:881–888.
- Boppana SB, Ross SA, Novak Z, et al. for the National Institute on Deafness and Other Communication Disorders CMV and Hearing Multicenter Screening (CHIMES) Study: Dried blood spot real-time polymerase chain reaction assays to screen newborns for congenital cytomegalovirus infection. *JAMA*. 2010;303(14):1375–1382.

43. Misono S, Sie KCY, Weiss NS, et al. Congenital Cytomegalovirus Infection in Pediatric Hearing Loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2011;137(1):47–53.
44. Scanga L, Chaing S, Powell C, et al. Diagnosis of human congenital cytomegalovirus infection by amplification of viral DNA from dried blood spots on perinatal cards. *J Mol Diagn.* 2006;8(2):240–245.
45. Hučková D, Kollárová K, Jančovičová K, et al. Monitoring CMV ochorenia u pacienta po transplantácii obličky a u pacienta po TKB pomocou real-time PCR. *KMIL.* 2005;11(5):176–181.
46. Razonable RR, Hayden RT. Clinical Utility of Viral Load in Management of Cytomegalovirus Infection after Solid Organ Transplantation. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(4):703–727.
47. Drew WL. Cytomegalovirus Resistance Testing: Pitfalls and Problems for the Clinician. *Clin Infect Dis.* 2010;50(5):733–736.
48. Deray G, Martinez F, Katlama C, et al. Foscarnet nephrotoxicity: mechanism, incidence and prevention. *Am J Nephrol.* 1989;9:316–321.
49. Sommadossi JP, Carlisle R. Toxicity of 3'-azido-3'-deoxythymidine and 9-(1,3-dihydroxy-methyl) guanine for normal human hematopoietic progenitor cells in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987;31:452–454.
50. Alain S, Revest M, Veyer D, et al. Maribavir use in practice for cytomegalovirus infection in French transplantation centers. *Transplant Proc.* 2013;45(4):1603–1607.
51. Chong AS, Zeng H, Knight DA, et al. Concurrent antiviral and immunosuppressive activities of leflunomide in vivo. *Am J Transplant.* 2006;6:69–75.
52. McGregor A, Yeon Choi K. Cytomegalovirus Antivirals and Development of Improved Animal Models. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2011;7(10):1245–1265.
53. Marcelin JR, Beam E, Razonable RR. Cytomegalovirus infection in liver transplant recipients: Updates on clinical management. *World Journal of Gastroenterology.* 2014;20(31):10658–10667.
54. Sokos DR, Berger M, Lazarus HM. Intravenous immunoglobulin: appropriate indications and uses in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2002;8(3):117–130.
55. Nigro G, Adler SP, Parruti G, et al. Immunoglobulin Therapy of Fetal Cytomegalovirus Infection Occurring in the First Half of Pregnancy – A Case-Control Study of the Outcome in Children. *J Infect Dis.* 2012;205(2):215–227.
56. Nigro G, Adler SP, La Torre R, et al. for the Congenital Cytomegalovirus Collaborating Group: Passive Immunization during Pregnancy for Congenital Cytomegalovirus Infection. *N Engl J Med.* 2005;353:1350–1362.
57. Nassetta L, Kimberlin D, Whitley R. Treatment of congenital cytomegalovirus infection: implications for future therapeutic strategies. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63(5):862–867.
58. Amir J, Wolf DG, Levy I. Treatment of symptomatic congenital cytomegalovirus infection with intravenous ganciclovir followed by long-term oral valganciclovir. *Eur J Pediatr.* 2010;169(9):1061–7.
59. Lackner A, Acham A, Alborno T, et al. Effect on hearing of ganciclovir therapy for asymptomatic congenital cytomegalovirus infection: four to 10 year follow up. *J Laryngol Otol.* 2009;123(4):391–396.
60. Morton CC, Nance WE. Newborn hearing screening – a silent revolution. *N Engl J Med.* 2006;354(20):2151–2164.
61. Hamprecht K, Maschmann J, Müller D, et al. Cytomegalovirus (CMV) inactivation in breast milk: reassessment of pasteurization and freeze-thawing. *Pediatr Res.* 2004;56(4):529–35.
62. Sung H, Schleiss MR. Update on the current status of cytomegalovirus vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2010;9(11):1303–1314.



RNDr. Daniela Hučková
Medirex, a. s.
Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava
daniela.huckova@medirex.sk

Taký malý, že sa zmestí do vášho vrecka Taký presný, že ho možno používať v laboratóriu

S novým koagulačným analyzátorom Xprecia Stride spoločnosť Siemens Healthcare reaguje na požiadavky, akými sú správnosť a presnosť výsledkov v oblasti point of care.

V dnešnom prostredí point of care (POC) musíte byť schopní rýchlo prijať rozhodnutia na základe výsledkov, ktorým dôverujete. Preto spoločnosť Siemens Healthcare vyvinula nový analyzátor Xprecia Stride™. Teraz v priebehu niekoľkých minút získate výsledky v laboratórnej kvalite, na ktoré sa pri vašom rozhodovaní o diagnóze pacienta spoliehate.

Xprecia Stride je inovátorom na poli malých kompaktných PT/INR analyzátorov, ktorých dizajn je navrhnutý tak, aby spĺňal požiadavky na súčasné trendy v point of care.

Tento koagulačný analyzátor, charakteristický ergonomickým dizajnom s veľkou intuitívnou dotykovou obrazovkou, zvyšuje pohodlie používateľa, zjednodušuje pracovné postupy a zlepšuje celkovú presnosť testovania.

Už viac ako 30 rokov je spoločnosť Siemens Healthcare celosvetovým lídrom v oblasti laboratórneho testovania hemostázy. Analyzátor Xprecia Stride v súčasnosti reprezentuje najlepšiu voľbu v rámci merania PT/INR pre potreby POC.

Testujte s presnosťou a dôverujte výsledku. Spoločnosť Siemens Healthcare poskytuje kvalitné testovanie v oblasti hemostázy od laboratória až po lôžko pacienta.

Pre viac informácií kontaktujte: jana.stefanovicova@siemens.com
Tel.: +421 2 5968 2521, Adresa: Siemens Healthcare s.r.o.
Lamačská cesta 3/A, 841 04 Bratislava.

Klinický význam vírusu Epsteina-Barrovej

RNDr. Daniela Hučková, RNDr. Katarína Kollárová

Medirex, a. s., Bratislava

Typickým prejavom infekcie vírusom Epsteina-Barrovej (EBV) je infekčná mononukleóza. Ochorenie je spojené s výrazným oslabením obranyschopnosti organizmu, najmä v oblasti bunkovej imunity. U osôb s funkčnou poruchou bunkovej imunity sa môže chronická aktívna infekcia EBV spolupodieľať na vzniku rôznych autoimunitných procesov (reumatoidná artritída, proliferatívna lymfohistiocytóza, hemofagocytárny syndróm). U týchto pacientov je vhodné v rámci diferenciálnej diagnostiky doplniť i sérologické vyšetrenie na EBV. Vírus sa u pacientov s ťažkým imunodeficitom/immunosupresiou dáva do súvislosti s rizikom rozvoja lymfoproliferatívnych ochorení až malígnych lymfómov (Hodgkinova choroba, lymfómy B-, T- a NK-bunkového pôvodu). U imunokompetentných osôb je toto riziko minimálne, avšak výnimočne môže ochorenie vzniknúť pri súčasnom pôsobení viacerých nepriaznivých faktorov (vplyv vonkajšieho prostredia, respektíve genetická predispozícia).

Kľúčové slová: vírus Epsteina-Barrovej, laboratórna diagnostika, primárna infekcia, sekundárna infekcia, terapia

The clinical relevance of Epstein-Barr virus

Epstein-Barr virus (EBV) infection is typically manifested as an infectious mononucleosis. The disease is associated with significant impairment of the host immunity, the cellular immunity in particular. The chronic active EBV infection may participate in the formation of a variety of autoimmune processes in individuals with malfunction of cellular immunity (rheumatoid arthritis, proliferative lymphohistiocytosis, hemophagocytic syndrome). Therefore, the differential diagnosis of these clinical problems should include EBV serological tests. The risk of developing lymphoproliferative disorders and malignant lymphomas has been associated with EBV infection in patients with severe immunodeficiency/immunosuppression (Hodgkin's disease, lymphomas of B-, T- and NK-cell origin). The risk of initializing these processes in immunocompetent individuals is minimal, but exceptionally, the disease may arise in the superposition of several unfavourable factors (environmental influences, a genetic predisposition).

Key words: Epstein-Barr virus, laboratory diagnosis, primary infection, secondary infection, therapy

NewsLab, 2016; roč. 7(2): 84–88

Vírus Epsteina-Barrovej

Vírus Epsteina-Barrovej (EBV) patrí medzi ľudské herpetické vírusy (niekedy označovaný ako ľudský herpesvírus 4, HHV-4). Ľudský jedinec je jediným prirodzeným hostiteľom. EBV sa vyskytuje sporadicky alebo v malých epidémiách v detských kolektívoch a má relatívne nízku kontagiozitu. Napriek tomu je zamorenosť populácie extrémne vysoká. Ide o ubikvitárne rozšírený vírus s výskytom viac ako 90 % v dospeljej populácii. Zvýšená transmisia vírusu je v dôsledku inaparentnej formy primárnej EBV infekcie, respektíve viacerých reaktivácií počas života hostiteľa (1, 2).

EBV je už niekoľko desaťročí predmetom intenzívneho záujmu odbornej verejnosti na celom svete. Ide o komplexný vírus s onkogénnym potenciálom, ktorý sa spája so širokým spektrom klinických prejavov. V snahe nájsť nové spôsoby liečby ochorení asociovaných s EBV infekciou sa v laboratóriách detailne študujú biologické a patogenetické vlastnosti tohto a iných gamaherpesvírusov (herpesvírus Kaposiho sarkómu, myšací gamaherpesvírus 68) (1, 2, 3).

Epidemiológia

Prameňom nákazy je chorý jedinec alebo bezpríznakový nosič vírusu. EBV sa prenáša intímny kontaktom, najmä slinami a krvou, ale je možné infikovať sa aj krvnou transfúziou, pri transplantácii kmeňových krvotvorných buniek, orgánov, prípadne intrauterinne alebo pohlavným stykom (4, 5).

Ochorenie vyvolané infekciou EBV nie je preventabilné očkovaním a nie sú k dispozícii ani iné hromadné preventívne opatrenia na zabránenie prenosu EBV (4).

Primárna infekcia

Vírusom Epsteina-Barrovej sa väčšina populácie nakazí už v rannom detstve, respektíve v adolescentnom veku. Inkubačná lehota obvyčajne trvá 4 až 6 týždňov. Po infekcii vnímavého jedinca EB vírusom cez orofaryngeálny kompartment dochádza v bunkách nosohltana, slinných žliaz a lymfatického tkaniva mandlí k prvotnému pomnoženiu EBV. Vírus je potom krvnou cestou diseminovaný do celého tela, v ktorom v rámci lymfatického tkaniva vstupuje a následne transformuje najmä B-lymfocyty. EBV aktivuje indukciu ich rastového programu a diferenciácie na pamäťové B-bunky. Infikované pamäťové B-bunky sú uvoľnené do periférnej krvi, v ktorej sú rozoznávané a likvidované najmä špecifickými cytotoxickými T-lymfocytmi. Počet infikovaných B-buniek postupne klesá, avšak nikdy nie sú eliminované úplne všetky. Lytická fáza EBV infekcie postupne prechádza do latentnej. Počet produkovaných antigénov EBV je výrazne redukovaný, čo uľahčuje únik pred účinkami imunitného systému. EBV dlhodobo prežíva v pamäťových B-bunkách (možno i v epiteliálnych bunkách) vo forme epizomálnej DNA, no predpokladá sa aj možnosť integrácie vírusového genómu do DNA hostiteľskej bunky (4, 6).

Latentná infekcia a reaktivácia

Prvotná akútna infekcia prechádza do štádia latencie. Ide o štádium perzistentnej vírusovej infekcie bez aktívnej produkcie vírusu. V prípade, že sa infikovaný leukocyt dostane do prostredia, v ktorom má dostatok signálov na aktiváciu a diferenciáciu, latentná infekcia je v ňom prerušená. Vírus sa začne množiť a infikovať ďalšie leukocyty. Tento proces nastáva napríklad v prostredí zápalu v dôsledku iného akútneho ochorenia (napríklad chrípky), iných chronických ochorení (autoimunitné poruchy, nádorové ochorenia, diabetes), u starších jedincov alebo pri podávaní určitých druhov liekov, keď je činnosť imunitného systému oslabená. Najčastejšie k reaktivácii vírusu dochádza v lymfatických uzlinách horných dýchacích ciest, odkiaľ býva spravidla vylučovaný do slín a slizničných sekrétov, prostredníctvom ktorých sa vírus šíri v populácii. K reaktivácii dochádza i u zdravých ľudí bez sprievodných príznakov ochorenia. Reaktivácia vírusu je neustále potláčaná činnosťou imunitného systému cieľným rozpoznávaním a rýchlou likvidáciou buniek, v ktorých sa EBV začal množiť. Produktívna fáza infekcie sa následne zastaví a nastolí sa rovnováha medzi vírusom a hostiteľom formou latencie. EBV takto perzistuje v svojom hostiteľovi do konca života (6).

Klinická manifestácia EBV infekcie

Primárne EBV infekcie najčastejšie prebiehajú u detí a mladých dospelých. U detí býva priebeh infekcie zväčša inaparentný, u adolescentov a mladých dospelých môže infekcia prebiehať bezpríznakovo, s miernymi nešpecifickými príznakmi alebo najčastejšie formou infekčnej mononukleózy.

Ťažkosti spojené s reaktiváciou EBV alebo chronickou perzistentnou infekciou sú častejšie prítomné u pacientov s oslabenou imunitnou odpoveďou (primárne, sekundárne).

Infekčná mononukleóza (IM)

U mladých dospelých je typickým prejavom infekcie – infekčná mononukleóza, pseudomembranózna angína s krčnou lymfadenitídou. V akútnom štádiu má pacient zväčšené lymfatické uzliny, býva pozorovaná malátnosť, únava, nevoľnosť, horúčka, zväčšená slezina a pečeň, prípadne opuch očných viečok, respektíve celej tváre. V krvnom obraze je zvýšené množstvo leukocytov (50 %), pričom minimálne 10 % z nich má atypický tvar (veľké CD8+ cytotoxické T-lymfocyty s bazofilnou cytoplazmou a excentricky uloženým jadrom) (1). Zároveň bývajú zvýšené pečeneové testy (obyčajne nie viac ako desaťnásobok referenčných hodnôt).

Pri liečbe antibiotikami príznaky neustupujú a môžu sa objaviť alergické reakcie (prechodná hypersenzitivita na penicilínové deriváty). Ochorenie môže prebiehať i bez angíny, len so zdurením uzlín alebo ako horúčkové ochorenie s nápadnou splenomegáliou. Akútna fáza ochorenia trvá v priemere asi 16 dní a potom postupne odznieva. V diferenciálnej diagnostike je vhodné vyšetrenia doplniť o kultiváciu z výteru tonzíl, ASLO a anti-DN-ázu B, vzhľadom na to, že na tonzilitide pri IM sa často etiologicky podieľa *Streptococcus pyogenes* (6, 7).

IM býva spojená s výrazným oslabením obranyschopnosti organizmu, najmä v oblasti bunkovej imunity. U normálne reagujúcich jedincov je imunosupresívny vplyv EBV infekcie dočasný. Pri klinicky zjavných prejavoch ochorenia býva IM sprevádzaná dlhým obdobím rekonvalescencie (obyčajne

niekoľko mesiacov), pre ktoré je charakteristické nižšia výkonnosť organizmu, zvýšená únava, zvýšená náchylnosť na iné infekcie alebo alergické reakcie (7, 8).

Z komplikácií sa ako najzávažnejšou javí dychová nedostatočnosť spôsobená zúžením dýchacích ciest zdureným lymfatickým tkanivom. Veľmi časté je poškodenie pečene a asi u 5 % chorých sa vyskytuje zvýšená bilirubinémia (častejšie u dospelých jedincov). Vzácnjšími komplikáciami sú: myokarditída, prechodný útlm krvotvorby, hemolytická anémia, ruptúra sleziny, neurologické komplikácie (encefalitída, polyradikuloneuritída), očné komplikácie, a to i bez klinického obrazu IM (7).

Významnou skutočnosťou pre prax je, že pacienti po prekonaní akútnej EBV infekcie sú dočasne imunokompromitovaní, hlavne v oblasti bunkovej imunity, v dôsledku čoho:

- sú náchylnejší hlavne na vírusové a mykotické infekcie,
- u pacientov s precitlivosťou včasného typu môže byť mylná negativita kožných testov.

Boli opísané sporadické prípady pacientov, u ktorých sa príznaky IM vrátili pred koncom akútneho ochorenia. Takéto rekurentné alebo „sekundárne“ prípady IM po odznení akútneho štádia sa však len veľmi zriedka podarí dokumentovať laboratórnymi testami svedčiacimi o aktívnej EBV infekcii.

Chronická aktívna infekcia

U niektorých jedincov sa po odznení akútneho štádia EBV infekcie postupne rozvíja chronická aktívna EBV infekcia (4, 6, 9, 10, 11). Ide o vzácnu poruchu, ktorá je definovaná tromi charakteristikami:

- klinické príznaky IM (subfebrilita, únava, faryngitída, lymfadenopatia, bolesti kĺbov) prítomné viac ako 6 mesiacov, spojené s pozitívou protilátok proti antigénom lytickej fázy,
- histologický dôkaz orgánového postihnutia (intersticiálna pneumónia, hepatitída, hypoplázia kostnej drene),
- histologický nález EBV DNA v tkanivách.

Chronický únavový syndróm (CFS – chronic fatigue syndrome)

V minulosti sa chronická EBV infekcia zvažovala ako jedna z možných príčin CFS. V súčasnosti sa odborníci prikláňajú k názoru, že ide o komplexnú poruchu organizmu vyvolanú pravdepodobne viacerými spúšťačmi (infekcie, porucha imunitného systému, nutričné deficiencie, stres, nízky krvný tlak). Diagnostika CFS je náročná. Únava býva častým príznakom viacerých ochorení, preto je potrebné v rámci diferenciálnej diagnostiky vykonať širokú škálu testov, aby sa zistila pravá príčina zdravotných ťažkostí. Problémom môže byť interpretácia vysokých hladín protilátok proti EBV a iným ubikvitárnym infekčným patogénnym mikroorganizmom, ktoré súvisia s celkovou aktiváciou imunitného systému charakteristickou pre CFS. Častá reaktivácia EBV a ďalších latentných vírusov je pravdepodobne nežiaducou záťažou, ktorá môže základné ochorenie zhoršovať. Jediná možnosť, ako tomu zabrániť, je snaha o obnovenie rovnováhy imunitného systému, ku ktorej pri CFS samovoľne nedochádza (6, 9, 12).

EBV a autoimunitné choroby

Autoimunitné ochorenia tvoria veľkú skupinu chorôb, pri ktorých je príčinou patologického procesu autoreaktivita imunitného systému proti

vlastným tkanivám organizmu. Príčina vzniku týchto chorôb je doteraz neobjasnená, avšak predpokladá sa, že genetické predispozície a vplyvy vonkajšieho prostredia sa môžu spolupodieľať na incidencii a rozvoji týchto ochorení. EBV infekcia sa považuje za jeden z mnohých možných spúšťačov autoimunitného procesu. EBV vyvoláva perzistentnú infekciu s úsporným programom latencie v pamäťových B-bunkách, čo umožňuje vyhnúť sa účinkom imunitného dohľadu. Vírus produkuje viaceré imunomodulačné proteíny a má k dispozícii aj iné mechanizmy, ktoré môžu za určitých podmienok viesť k chronickej aktivácii imunitného systému, častým reaktiváciám EBV a tvorbe polyreaktívnych protilátok. Tieto procesy sa javia ako kritické pre navodenie rôznych imunopatologických stavov (reumatoidná artritída, lupus erythematosus, Crohnova choroba, roztrúsená skleróza, proliferatívna lymfohistiocytóza, hemofagocytárny syndróm), najmä u osôb s funkčnou poruchou bunkovej zložky imunity. Navyše, pri liečbe týchto ochorení môžu podávané imunosupresívne látky ovplyvniť účinnosť imunitného dozoru nad latentnou infekciou, v tom prípade môže byť i reaktivácia vírusu spojená s príznakmi ochorenia. U pacientov bývajú pozorované zvýšené hladiny protilátok proti niektorým EB-vírusovým antigénom, znížená T-bunková odpoveď proti EBV a zvýšená nálož EBV DNA. Pre diagnostiku je prínosný najmä priamy dôkaz vírusu (6, 13).

Ochorenia súvisiace s onkogénnym potenciálom EBV

EBV proteíny latencie sú už dlhšie známe pre svoj onkogénny potenciál. Vírus sa dáva do súvislosti s viacerými lymfoproliferatívnymi poruchami, ktoré varujú od benígnych ochorení až po agresívne malígne neoplázie. V súčasnosti sú opísané tri hlavné (pre hostiteľa nepriaznivé) typy latencie EBV, ktoré sa líšia v spektre exprimovaných antigénov a type vyvolaného ochorenia (štvrtý typ latencie je u zdravých osôb).

Infekcia EB vírusom sama o sebe nestačí, aby vyvolala zhubné ochorenie, často sa však dáva do súvislosti s niektorými druhmi lymfómov a neoplázií (Burkittov lymfóm endemický, Hodgkinov lymfóm asociovaný s AIDS, non-Hodgkinov lymfóm mozgu asociovaný s AIDS, periférny T-bunkový lymfóm, extranodálny NK-/T-lymfóm, PTLT, niektoré typy karcinómu nosohltana, zažívacieho traktu a zriedka i karcinómu prsníka). Diagnostika EBV v súvislosti s nádorovými ochoreniami je vo všeobecnosti málo prínosná. Prítomnosť EBV v nádorových bunkách nemá väčšinou žiadny vplyv na diagnózu alebo prognózu choroby. Výnimkou je karcinóm nosohltana, pri ktorom môže vzostup hladiny IgA proti EA (early antigen) signalizovať relaps ochorenia (1, 2, 4, 6, 14, 15).

Posttransplantačná lymfoproliferatívna choroba (PTLD)

Ide o polyklonálnu alebo monoklonálnu proliferáciu lymfoidného tkaniva, ktorá sa vyskytuje po transplantáciách solídnych orgánov alebo hematopoetických kmeňových buniek. Incidencia PTLT závisí od viacerých faktorov, ako sú napríklad vek pacienta, anti-EBV sérostatus donora a recipienta pred transplantáciou, typ transplantovaného orgánu, miera zhody darcu a príjemcu v HLA systéme, typ a intenzita imunosupresie. Frekvencia PTLT variuje v rozmedzí cca 1 – 30 %, hoci pri výraznej T-bunkovej deplícii môže byť incidencia PTLT ešte vyššia. Ochorenie môže byť spojené s príznakmi ako pri IM až po rozvoj monoklonálnych a monomorfných lymfómov (4, 14).

Lymfoproliferatívny syndróm viazaný na chromozóm X

Mutácia v géne kódujúcom molekulu SAP (SLAM-associated protein; SLAM – signaling lymphocyte activation molecule) (1, 4). Ide o vrodené ochorenie viazané na X-chromozóm, postihujúce chlapcov, ktorí sú až do prvého kontaktu s vírusom EBV zdraví. Infekcia EBV môže u nich vyústiť do troch stavov:

- ťažká až fatálna IM (58 %),
- lymfoproliferatívny syndróm (30 %),
- dysimunoglobulinémia až hypogamaglobulinémia (30 %).

Laboratórna diagnostika

Laboratórny dôkaz u imunokompetentných osôb sa opiera hlavne o stanovenie špecifických protilátok proti EBV imunoserologickými metódami. Molekulárno-biologické metódy sú vhodné predovšetkým pre imunosuprimovaných pacientov a pri vyššie uvedených komplikáciách spojených s aktívnou EBV infekciou.

V diagnostike infekčnej mononukleózy sa v menšej miere využíva kvantitatívne stanovenie heterofilných protilátok. Ich vznik indukujú neoantigény v bunkovej membráne transformovaných B-lymfocytov s EBV. Z metodického hľadiska ide o Paul-Bunnelovu reakciu (aglutinácia s baraním erytrocytmi), IM test (aglutinácia s konskými erytrocytmi) a Ericsonov test (OCH test, hemolýza hovädzích erytrocytov v nadbytku komplementu). Testy sú ekonomicky nenáročné a pri jednoznačnej pozitívite sú prínosom pri stanovení diagnózy. V tomto prípade nie je potrebný dôkaz špecifických protilátok. Limitáciou stanovenia heterofilných protilátok je fakt, že nemusia byť prítomné v dostatočnej hladine pri prebiehajúcej EBV infekcii, a to nielen u malých detí, ale i adolescentov. Pri diagnostike EBV u dospelých nebývajú metódou voľby (7, 8). Pri jednoznačnom klinickom obraze infekčnej mononukleózy (výnimka deti do 4 rokov) sa volí vyšetrovanie heterofilných protilátok. Pri nejednoznačnom klinickom obraze je potrebná kombinácia heterofilných protilátok so špecifickými testami. U pacientov so sekundárnou imunodeficienciou sa sérologicky obraz vymyká typickým nálezom.

Stanovenie špecifických protilátok proti EBV (metódami EIA, CLIA) umožňuje:

1. zistiť, či sa vyšetrovaný pacient už s infekciou stretol, alebo či je séro-negatívny (t. j. vnímavý k primárnej infekcii),
2. ak je séropozitívny, či ide o aktívnu infekciu, alebo latentnú,
3. v prípade aktívnej infekcie rozlíšiť primárnu infekciu od reaktivácie.

V rámci sérologického vyšetrovania je nutné vykonať súbor niekoľkých testov, v ktorých sa stanovujú rôzne druhy protilátok proti niekoľkým diagnosticky dôležitým vírusovým antigénom. Niektoré protilátky sa tvoria pri prvom kontakte s vírusom a následne pretrvávajú celý život (tzv. anamnestické protilátky, napríklad IgG proti vírusovému kapsidovému antigénu – VCA). Iné protilátky sa tvoria prechodne ako odozva na aktívnu infekciu (primárna infekcia alebo reaktivácia vírusu), napríklad protilátky v triede IgM alebo IgA proti VCA, alebo IgG proti včasnému antigénu (EA). IgG proti nukleárnemu antigénu EBV (EBNA 1) sa tvorí po primárnej infekcii oneskorene (obyčajne v 2. až 5. mesiaci po infekcii, výnimočne až v 6. až 12. mesiaci) a používa sa na rozlíšenie primárnej infekcie od reaktivácie. Pri primárnej infekcii sa spravidla tvoria špecifické IgM a IgA vo vysokej

hladine a často pretrvávajú ešte niekoľko týždňov, respektíve mesiacov po odznení ochorenia. Pri reaktivácii EBV dosahujú tieto protilátky len nízke hladiny, alebo sa vôbec netvoria. Naopak, nakoľko je reaktivácia vírusu najčastejšie bezpríznaková, môžeme tieto protilátky (najmä IgG proti EA alebo IgA proti VCA) náhodne zachytiť u zdravých jedincov (1, 4, 6, 16).

Reaktivácia mnohých herpetických vírusov vrátane EBV je bežným javom v gravidite, v súvislosti s prirodzeným oslabením bunkovej imunity. Riziko prenosu infekcie na plod je však vo väčšine prípadov zanedbateľné (5).

Laboratória majú možnosť použiť rôzne algoritmy dôkazu protilátok proti EBV. Naše pracovisko stanovuje protilátky v dvoch modeloch:

1. protilátky proti celovirionovému antigénovému komplexu metódou ELISA (VCA, EA a EBNA-1 súčasne) v triede IgM, IgG, IgA, doplnené o anti-EBNA1 IgG (metóda CLIA),
2. protilátky proti VCA metódou CLIA v triede IgM, IgG a anti-EBNA 1 IgG, vo vybraných prípadoch doplnené o stanovenie protilátok triedy IgA proti celovirionovému antigénovému komplexu (metóda ELISA).

Algoritmus sérologických testov v súčasnosti v mnohých prípadoch umožňuje laboratórnemu pracovníkovi interpretáciu výsledku a určenie štádia infekcie z vyšetrenia jednej vzorky (tabuľka 1).

Ak je potrebné posúdiť signifikantné zmeny v protilátkovej aktivite, vyšetrenie druhej vzorky pri sledovaní IgM je vhodné minimálne o 5 – 10 dní, pri sledovaní IgG o 2 – 3 týždne, respektíve podľa odporúčania laboratória.

Výsledok sérologického vyšetrenia musí byť hodnotený v súvislosti s klinickým stavom pacienta a s výsledkami iných laboratórnych vyšetrení. Stanovenie samotných anti-EBV IgM nestačí na dôkaz primárnej či rekurentnej infekcie, možná je aj heterotypická imunitná odpoveď vplyvom inej prebiehajúcej infekcie (napríklad CMV, iné herpetické vírusy, borélie, vírus parotitídy, vírus rubeoly, vírus hepatitídy A) (1, 4, 6, 16).

Dôkaz EBV DNA (metóda PCR). Význam priamej DNA diagnostiky spočíva predovšetkým pri diagnostike lymfoproliferatívnych ochorení u imunodeficientných pacientov, chronických aktívnych EBV infekciách, neurologických komplikáciách spojených s EB vírusovou infekciou, monitorovaní reakcie na liečbu.

Kvalitatívne metódy detekcie EBV DNA majú nízku prediktívnu hodnotu, preto sa v súčasnosti odporúčajú metódy kvantitatívnej PCR, ktorej výsledky sú prínosné v prípade, že sú interpretované v súvislosti s výsledkami sérologických vyšetrení (s výnimkou ťažko imunosuprimovaných pacientov) a s ohľadom na klinický stav pacienta.

Pri interpretácii výsledku vyšetrenia je potrebné mať na zreteli prirodzenú prítomnosť latentného alebo asymptomaticky vylučovaného vírusu v určitých kompartmentoch. EBV a prechodne i CMV, HHV6 alebo HHV7 možno citlivou metódou dokázať i u zdravých asymptomatických jedincov. Na účely diagnostiky či monitorovania infekcie je preto nevyhnutné kvantitatívne stanovenie hladín týchto vírusov v krvi, prípadne sledovanie ich dynamiky.

Špecifické miesto v priamej diagnostike má dôkaz EBV v lymfoproliferatívnych ložiskách, optimálnym vyšetrením je metóda založená na imunohistochemickom dôkaze vírusovej latentnej RNA v biopsii pomocou hybridizácie *in situ* so značenými fluorescenčnými sondami. Toto vyšetrenie je dostupné len na špecializovaných patologicko-anatomických pracoviskách (4, 6, 16, 17, 18, 19).

Tabuľka 1. Interpretácia výsledkov sérologického vyšetrenia proti EBV

IgG	IgM	anti-EBNA 1 IgG	Interpretácia výsledkov
negatívne	negatívne	–	EBV senzitivný pacient
hraničné alebo pozitívne	negatívne	pozitívne	EBV infekcia prekonaná v minulosti
hraničné alebo pozitívne	hraničné alebo pozitívne	negatívne	prebiehajúca EBV infekcia
hraničné alebo pozitívne	hraničné alebo pozitívne	pozitívne	polyklonálna IgM odpoveď alebo v minulosti prekonaná EBV infekcia s pretrvávajúcimi IgM
negatívne	hraničné	–	vhodné je vyžiadať si ďalšiu vzorku na vyšetrenie
vysoko pozitívne	pozitívne IgA	pozitívne	chronická perzistujúca EBV infekcia alebo reaktivácia vírusu

Terapia a profylaxia

Liečba infekčnej mononukleózy je symptomatická a obvyčajne zahŕňa podávanie antipyretík, analgetík, dodržiavanie pečeňovej diéty, avšak s dostatočným prísunom tekutín a živín a obmedzenie fyzicky náročných aktivít. Antivirotiká, ktoré sa používajú pri liečbe iných herpetických vírusov (napríklad acyklovir), pôsobia na EBV iba v určitej fáze životného cyklu, keď prebieha replikácia vírusovej DNA v infikovanej bunke. Ochorenie spôsobené EBV však nesúvisí len s množením vírusu, ale aj s množením latentne infikovaných buniek, na ktoré antivirotiká nepôsobia. Preto nemá aplikácia antivirotik pre liečbu zásadný význam. V prípade potreby sa aplikuje symptomatická liečba a pri bakteriálnej superinfekcii antibiotiká s výnimkou aminopenicilínov a kotrimoxazolu. Na potlačenie anaeróbnej flóry sa osvedčil metronidazol. Pri obštrukcii horných dýchacích ciest je nevyhnutná intervencia kortikosteroidmi (4, 6).

Z novších terapeutických postupov sa najmä v súvislosti s PTLD skúša podávanie monoklonálnych protilátok (anti-CD19, anti-CD20, anti-CD21 a anti-CD24), intravenózneho imunoglobulínu, EBV-špecifických cytotoxických T-lymfocytov a multimodálne prístupy.

Ďalšie štúdie sa zameriavajú na výskum nových látok vrátane liečiv ovplyvňujúcich miRNA, EBV vakcín, špecifických inhibítorov pre EBV signálne molekuly a kombinácie indukcie lytickej fázy EBV infekcie a anti-EBV chemoterapeutík (20, 21, 22, 23).

Literatúra

1. Rajčáni J, Čiampor F. *Lekárska virológia*. Bratislava: Veda; 2006: 574.
2. Čipková-Jarčuškova J, Mistríkova J. Vírus Epstein a Barrovej: jeden z najrozšírenejších vírusov v dospeljej ľudskej populácii. *Slovenský lekár*. 2013;23(3):55–65.
3. Čipková-Jarčuškova J, Chalupková A, Hrabovská Z, et al. Biological and pathogenetic characterization of different isolates of murine gammaherpesvirus 68 (MHV-68) in the context of study of human oncogenic gammaherpesviruses. *Acta Virol*. 2013;57(2):105–12.
4. Odumade OA, Hogquist KA, Balfour HH Jr. Progress and Problems in Understanding and Managing Primary Epstein-Barr Virus Infections. *Clin Microbiol Rev*. 2011;24(1):193–209.
5. Eskild A, Bruu AL, Stray-Pedersen B, et al. Epstein-Barr virus infection during pregnancy and the risk of adverse pregnancy outcome. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 2005;112:1620–1624.
6. Roubalová K. *Co je EB-vírus a jaký má vztah k lidským nemocem* [online]. Available from: <<http://www.alergieimunita.cz/2012/05/08/co-je-eb-virus-a-jaky-ma-vztah-k-lidskym-nemocem/>>. Updated April 2, 2014.

7. Hučková D. Laboratórna diagnostika vírusových ochorení, B6/1-52. In: Gajdošík J, Moro M, eds. *Diagnostika a liečba infekčných ochorení v ambulantnej praxi*. Raabe; 2009: 1342.
8. Roubalová K. Laboratórná diagnostika herpetických virů. *Med. Pro Praxi*. 2010;7(5):241–244.
9. Pizzigallo E, Racciatti D, Gorgoretti V. EBV Chronic Infections. *Medit J Hemat Infect Dis*. 2010;2(1):e2010022.
10. Petrova M, Kamburov V. Epstein-Barr virus: Silent companion or causative agent of chronic liver disease? *World J Gastroenterol*. 2010;16(33):4130–4134.
11. Okano M, Gross TG. Acute or chronic life-threatening diseases associated with Epstein-Barr virus infection. *Am J Med Sci*. 2012;343(6):483–9.
12. Centers for Disease Control and Prevention: Chronic Fatigue Syndrome (CFS) [online]. Available from: <<http://www.cdc.gov/cfs/general/index.html>>.
13. Holck Draborg A, Duus K, Houen G. Epstein-Barr Virus in Systemic Autoimmune Diseases. *Clin Dev Immunol*. 2013;535738.
14. Ok CY, Li L, Young KH. EBV-driven B-cell lymphoproliferative disorders: from biology, classification and differential diagnosis to clinical management. *Experimental & Molecular Medicine*. 2015;47:e132. doi:10.1038.
15. Čižmár A, Predný J, Hučková D, et al. Infekcia vírusom Epsteina-Barrovej asociovaná s hemofagocytujúcou lymfohistocytózou. *Klinická mikrobiológia a infekčná liečba*. 2002;8(4):177–181.
16. Gulley ML, Tang W. Laboratory Assays for Epstein-Barr Virus-Related Disease. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2008;10(4):279–292.
17. Stuhlmann-Laeisz C, Oschlies I, Klapper W. Detection of EBV in reactive and neoplastic lymphoproliferations in adults – when and how? *J Hematopathol*. 2014;7:165–170.
18. Visco C, Falisi E, Young KH, et al. Epstein-Barr virus DNA load in chronic lymphocytic leukemia is an independent predictor of clinical course and survival. *Oncotarget*. 2015;6(21):18653–18663.
19. Gulley ML, Tang W. Using Epstein-Barr Viral Load Assays to Diagnose, Monitor, and Prevent Posttransplant Lymphoproliferative Disorder. *Clin. Microbiol*. 2010;23(2):350–366.
20. Breton CS, Nahimana A, Aubry D, et al. A novel anti-CD19 monoclonal antibody (GBR 401) with high killing activity against B cell malignancies. *Journal of Hematology & Oncology* 2014;7:33. Breton CS, Nahimana A, Aubry D, et al. A novel anti-CD19 monoclonal antibody (GBR 401) with high killing activity against B cell malignancies. *Journal of Hematology & Oncology*. 2014;7:33. doi:10.1186/1756-8722-7-33.
21. Kuehnle I, Huls MH, Liu Z, et al. CD20 monoclonal antibody (rituximab) for therapy of Epstein-Barr virus lymphoma after hemopoietic stem-cell transplantation. *Blood*. 2000;95(4): 1502–5.
22. Benkerrou M, Jais JP, Leblond V, et al. Anti-B-Cell Monoclonal Antibody Treatment of Severe Posttransplant B-Lymphoproliferative Disorder: Prognostic Factors and Long-Term Outcome. *Blood*. 1998;92(9):3137–47.
23. Khanna R, Smith C. Cellular immune therapy for viral infections in transplant patients. *Indian J Med Res*. 2013;138(5):796–807.



RNDr. Daniela Hučková

Medirex, a. s.

Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava

daniela.huckova@medirex.sk



Spoločnosť Bio G, spol. s r.o., poskytuje od roku 1995 vysokokvalifikované obchodné a servisné služby najmä v oblasti laboratórnej medicíny, podporené kompletným odborným poradenstvom. Svoje obchodné aktivity spoločnosť Bio G, spol. s r.o., doplnila o ponuku diagnostických testov a prístrojov pre ambulantných detských lekárov rôznych špecializácií, všeobecných a odborných lekárov. Z našej ponuky Vám radi dodáme:

- Glukomer
testovanie kapilárnej glykémie (odber z prsta)



- Močové prúžky a prístroj na ich vyhodnotenie.
Chemické stanovenie glukózy, bilirubínu, urobilinogénu, ketónov, proteínov, erytrocytov, leukocyto, pH, dusitanov, špecifickej hmotnosti a kyseliny askorbovej v moči.



- Multifunkčný prístroj na vyšetrenie CRP a INR z kapilárnej krvi a na kvantitatívne stanovenie hemoglobínu v stolici



- Prístroj na vyšetrenie hemoglobínu a hematokritu z kapilárnej krvi



Kongenitálne poruchy glykozylácie a ich diagnostika na Slovensku

Ing. Zuzana Pakanová, PhD.¹, RNDr. Jana Ziburová, PhD.¹, RNDr. Anna Šalingová², MUDr. Darina Behúlová, PhD.², MUDr. Anna Hlavatá, PhD., MPH³, RNDr. Ján Mucha, CSc.¹

¹Centrum excelentnosti pre glykomiku, Chemický ústav SAV, Bratislava

²Oddelenie laboratórnej medicíny DFNSP, Centrum dedičných metabolických porúch, Bratislava

³2. detská klinika LF UK a DFNSP, Centrum dedičných metabolických porúch, Bratislava

Kongenitálne poruchy glykozylácie (CDG) sú rýchlo rastúcou skupinou dedičných metabolických ochorení s rôznorodými klinickými príznakmi. Rozsiahla škála symptomatiky ich tak zaraďuje medzi obťažne diagnostikovateľné ochorenia. Na Oddelení laboratórnej medicíny DFNSP Bratislava, v Centre dedičných metabolických porúch je od roku 2012 v rámci selektívneho skríningu na vrodené metabolické ochorenia vyšetřovaný aj skríninový parameter pre CDG, a to na báze izoelektrickej fokusácie sérového transferínu. Pri záchyť pozitívneho výsledku skríninového vyšetřenia pre poruchy glykozylácie v rámci ďalšej diagnostiky špecifického CDG-subtypu vznikla spolupráca medzi klinikami a vedeckými pracovníkmi z Centra excelentnosti pre glykomiku, Chemický ústav SAV, ktorá otvára nové možnosti v personalizovanej medicíne. Štruktúrna analýza N-viazaných glykánov uvoľnených zo sérového proteómu, respektíve uvoľnených špecificky zo zvolených N- a O-glykobiomarkerov pomocou hmotnostnej spektrometrie a celoexómové sekvenovanie vybraných panelov génov metódami sekvenovania novej generácie sa tak stávajú dostupnými diagnostickými technikami, ktoré medziodborovo spájajú lekárov a vedcov. Včasná a presná diagnostika tak môže napomôcť záchyť tejto skupiny dedičných metabolických porúch a pochopeniu molekulárnej podstaty tejto stále sa rozširujúcej skupiny metabolických ochorení.

Kľúčové slová: kongenitálne poruchy glykozylácie, CDG, glykokonjugáty

Congenital disorders of glycosylation and their diagnostics in Slovakia

Congenital disorders of glycosylation (CDG) is rapidly expanding group of inherited metabolic disorders with various clinical symptoms. A wide range of symptomatology classifies these diseases as difficult to diagnose. Since 2012, a selective screening for CDG, based on isoelectric focusing of serum transferrin, is performed at Department of laboratory medicine DFNSP Bratislava, in the Center of Inherited Metabolic Disorders. After a positive result of CDG-screening, for further diagnosis of the specific CDG-subtype the close collaboration between clinicians and research scientists from the Center of Excellence for Glycomics (Institute of Chemistry, SAV) was initiated, which opens new possibilities for personalized medicine. Structural analysis of N-linked glycans released from serum proteome or released specifically from isolated N- and O-glycobiomarkers by mass spectrometry and whole-exome sequencing of the gene panels by the next generation sequencing thus became available diagnostic techniques that connect clinicians and scientists into intradisciplinary collaboration. Early and accurate diagnosis may help to detect the affected individuals of this group of extremely expanding inherited metabolic disorders and to understand its molecular bases.

Key words: congenital disorders of glycosylation, CDG, glycoconjugates

NewsLab, 2016; roč. 7(2): 89–92

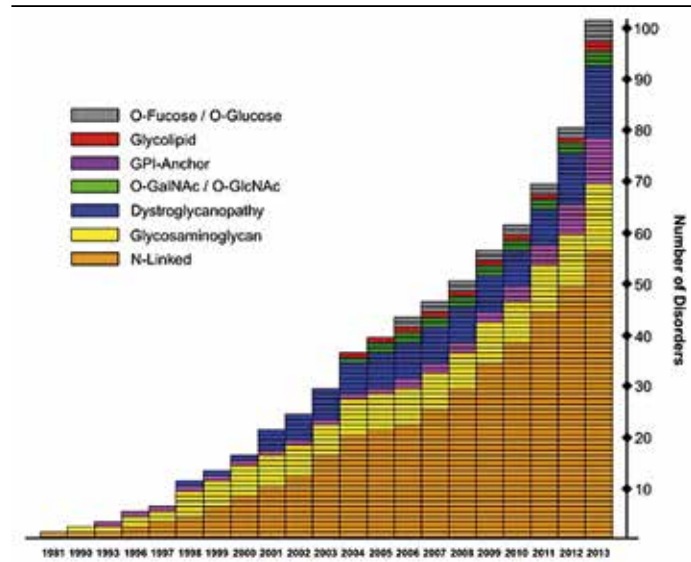
Úvod

Kongenitálne poruchy glykozylácie (CDG) sú rýchlo rozširujúcou sa skupinou zriedkavých dedičných metabolických ochorení, zapríčinených poruchou v jednej z najdôležitejších posttranslačných modifikácií proteínov – glykozylácií. V ľudskom tele sa viac než polovica všetkých proteínov a väčšina membránových a sekrečných proteínov (1) nachádza v glykozylovanej forme. Glykány sa kovalentne viažu na proteíny: cez atóm kyslíka na serínové alebo threonínové zvyšky (O-viazané oligosacharidy) alebo cez atóm dusíka na asparagínové zvyšky proteínov (N-viazané oligosacharidy) (2).

V posledných rokoch sa postupne začal zisťovať vzťah medzi abnormálnou glykozyláciou a mnohými ochoreniami. Zmeny v glykozylačnom profile boli zistené u pacientov trpiacich Alzheimerovou chorobou (3)

a vo viacerých biomarkeroch u pacientov trpiacich rôznymi typmi nádorových ochorení bolo potvrdené, že onkogenéza je často v korelačnom vzťahu so zmenami v oligosacharidovej štruktúre (4). Glykozylačný proces je komplexný a zahŕňa stovky špecifických enzýmov, transportérov. Zúčastňuje sa ho 250 – 500 génov, čo reprezentuje 1 % z celého ľudského genómu (5). V roku 1997 boli známe tri defekty génov zúčastňujúcich sa N-glykozylačného procesu, v roku 2011 bolo vďaka neustálemu rozvoju moderných analytických metód známych približne 50 subtypov týchto ochorení (6). Počet známych subtypov neustále narastá (7) a predpokladá sa, že mnoho pacientov stále zostáva nediagnostikovaných (obrázok 1). U približne 40 % CDG pacientov konkrétny enzymatický defekt, a teda aj molekulárna podstata týchto ochorení zostáva stále neobjasnená.

Obrázok 1. Kumulatívny počet známych porúch v glykozylácií v závislosti od roku (7) (V priebehu roku 2013 bola nová, geneticky potvrdená porucha v glykozylácií v priemere reportovaná každých 17 dní. V súčasnosti je známych viac ako 100 rôznych porúch glykozylácie.)



Klinické príznaky

Porucha v jedinom géne zúčastňujúcom sa glykozylačného procesu vedie k širokej škále symptómov, ktoré potenciálne zasiahnu viaceré orgány a klinické príznaky sú veľmi nešpecifické. CDG môže postihnúť akýkoľvek orgán ľudského tela, avšak väčšinou tieto ochorenia bývajú multisystémové a postihujú jeden alebo viaceré orgány. Môžu byť život ohrozujúce, ale aj s miernym priebehom. CDG patria do skupiny ťažko diagnostikovateľných ochorení pre ich častokrát nešpecifickú klinickú manifestáciu ochorenia. Mnohé CDG sú charakteristické poruchami v centrálnom nervovom systéme (hypotónia, záchvaty, oneskorený vývoj, kognitívne poruchy a cerebelárna hypoplázia vedúca k problémom s rovnováhou a koordináciou). Ďalšími symptómami sú hepatopatia, kardiomyopatia, abnormálna distribúcia tuku, koagulačné poruchy, gastrointestinálne ťažkosti, strabizmus, tvárový dysmorfizmus, poruchy prehĺtania a poruchy rastu.

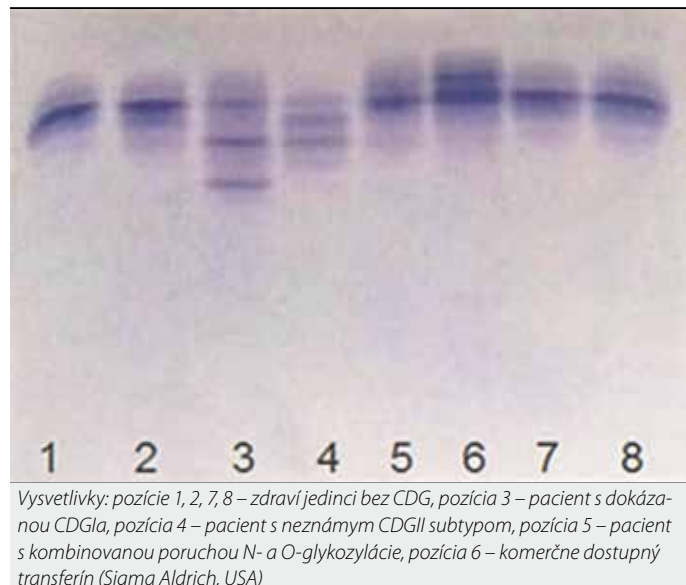
Možnosti diagnostiky

V súčasnosti je alarmujúci neustále rastúci tlak na skrining a diagnostiku tejto skupiny dedičných metabolických porúch v našej krajine. Napriek tomu, že CDG sú vrodenými metabolickými poruchami, nie sú súčasťou novorodeneckého skriningového programu. Pacienti s kongenitálnymi poruchami N- a O-glykozylácie sú zachytávaní cestou selektívneho skriningu na základe špecifických klinických symptómov a laboratórnych nálezov. S neustálym rozvojom robustných analytických metód vo svete stúpa aj známa prevalencia, zatiaľ čo molekulárna podstata ostáva v mnohých prípadoch stále neobjasnená.

Izoelektrická fokusácia

V roku 2012 bola v Centre dedičných metabolických porúch (CDMP) DFNSP Bratislava zavedená metóda selektívneho skriningu CDG založená na izoelektrickej fokusácii (IEF) sérového transferínu. Táto metóda v súčas-

Obrázok 2. Izoelektrická fokusácia sérového transferínu

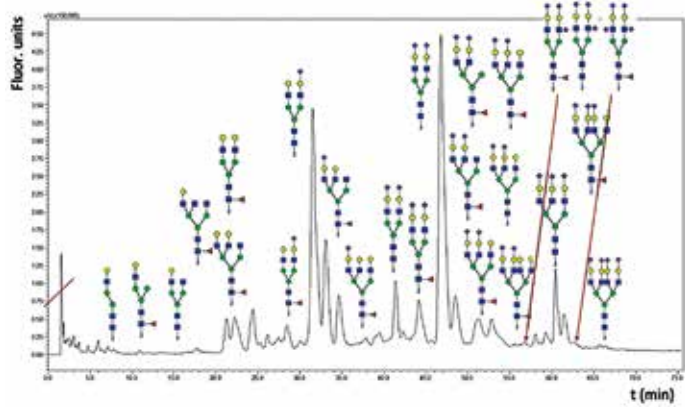


nosti predstavuje zlatý štandard uplatňujúci sa všade vo svete na záchyt pacientov s poruchami glykozylácie. CDMP je v súčasnosti jediné pracoviisko na Slovensku, ktoré sa zaoberá skriningom CDG. Tento test rozdeľuje glykoizoformy na základe náboja, čím umožňuje odlíšiť zdravých jednotlivcov od suspektných pacientov s poruchou N-glykozylácie podtypu I alebo II. U CDG I pacienta je v IEF profile prítomný asialo- a vo veľkom množstve disialotransferín, kým tetrasialotransferín sa v sére nachádza v nižšej koncentrácii v porovnaní s kontrolnou vzorkou séra od zdravého jedinca (pozri obrázok 2) (8). Získaný patologický profil glykoizoforiem však nevypovedá o konkrétnom enzymatickom deficite. Okrem primárnych porúch N-glykozylácie I. a II. podtypu zachytáva CDMP aj sekundárne patologický profil v obraze IEF transferínu u pacientov s hereditárnou intoleranciou fruktózy, galaktozémiou, závislosťou od alkoholu, ale aj pri polymorfizme transferínu, ťažkých ochoreniach pečene a u pacientov s hemolyticko-uremickým syndrómom. IEF sérového transferínu teda umožňuje detegovať glykozylačné defekty vedúce k zníženej sialyzácii, avšak neposkytuje dostatočné rozlíšenie potrebné na objasnenie špecifických enzymatických defektov, a teda neumožňuje diagnostiku konkrétného subtypu.

Štruktúrna analýza N-viazaných glykánov

Na ďalšiu diagnostiku špecifického subtypu a konkrétného enzymatického deficitu vznikla spolupráca medzi klinikmi a vedcami z Centra excelentnosti pre glykomiku (CEG), Chemický ústav SAV, ktorá otvára nové možnosti v personalizovanej medicíne. Vzorky od pacientov s pozitívnym výsledkom skriningu sa spracujú prístupom analýzy N-glykoproteínu celkového séra alebo analýzy N-glykoproteínu zvoleného biomarkera (napríklad sérového transferínu) izolovaného imunoafinitnou preparatívnou chromatografiou. N-glykány sú uvoľnené prostredníctvom enzymatickej deglykozylácie, frakcionované a fluorescenčne značené za účelom stanovenia ich štruktúr pomocou LC-MS (tzv. „offline“ prepojenie HPLC chromatografie a MALDI TOF/TOF hmotnostnej spektrometrie).

Obrázok 3. Reprezentatívna LC-MS analýza uvoľnených N-glykánov z referenčného séra (Jednotlivé N-glykánové štruktúry je možné kvantifikovať na základe nameraných intenzít fluorescenčného signálu. Kvalitatívnu zložku analýzy predstavuje hmotnostná spektrometria, ktorá priradí jednotlivým chromatografickým signálom príslušnú N-glykánovú štruktúru.)



Reprezentatívna analýza sialylovanej frakcie celkového N-glykoproteínu ľudského séra je zobrazená na obrázku 3. Prípadné zmeny v špecifickom kroku syntézy N-glykánových štruktúr sú tak detegovateľné na kvantitatívnej i kvalitatívnej úrovni, vďaka čomu môžu byť predpokladom pre vybraný konkrétny enzymatický defekt. Tým sa mnohonásobne zužuje okruh potenciálnych kandidátnych glykogénov zúčastňujúcich sa glykozylačného procesu.

Štruktúrna analýza O-viazaných glykánov apolipoproteínu CIII

V CEG Chemického ústavu SAV bola na sledovanie prípadných porúch v O-glykozylnácii v roku 2015 zavedená metóda stanovenia O-glykoproteínu apolipoproteínu CIII (9). Sérové lipoproteínové komplexy sú mechanicky rozbité a následne je vzorka odsolená pomocou chromatografie na reverznej fáze. V MALDI TOF hmotnostnom spektre takto pripravenej vzorky je možné pozorovať jednotlivé signály príslušajúce asialo-, monosialo- a disialo-O-glykoizofórmam, ktorých relatívny pomer a jeho zmeny môžu vypovedať o poruchách v procesoch O-glykozylnácie.

Sekvenovanie novej generácie

Ďalšie možnosti otvára analýza na úrovni DNA, pri ktorej sa na základe štruktúrneho profilu glykánov vymedzí súbor potenciálne postihnutých glykogénov. Takto vytipované gény sú ďalej podrobené genomickej analýze na zistenie mutácií potenciálne zodpovedných za vznik tohto typu ochorenia. Testovanie na úrovni jedného génu nemá význam, pretože presná príčina vzniku ochorenia nie je známa. V prípade symptomatiky CDG ochorenia ide o multisystémové zlyhanie, a to utvára predpoklad, že sa sledovaná mutácia môže vyskytovať v ktoromkoľvek z génov (jednom či viacerých) zúčastňujúcich sa biosyntetickej dráhy glykánov. Na analýzu glykogénov bude preto použité sekvenovanie novej generácie ako veľmi robustná metóda, pri ktorej je možné súčasne analyzovať viacerých pacientov a veľké množstvo génov v jednom sekvenačnom behu. Neustále znižovanie ceny, zjednodušovanie prípravy vzoriek a čoraz väčšie množstvo dát získaných z jediného sekvenačného behu radí túto metódu medzi progresívne sa rozvíjajúce metódy v diagnostike aj v základnom

Tabuľka 1. Analýzy realizovateľné v Centre excelentnosti pre glykomiku, Chemický ústav SAV

štruktúrna analýza N-glykánov v sére	celkový N-glykoproteín	potrebných 1,5 ml séra
štruktúrna analýza N-glykánov viazaných na sérovom transferíne	N-glykoproteín vybraného glykobiomarkera	potrebných 1 ml séra
štruktúrna analýza O-glykánov viazaných na apolipoproteínu CIII	O-glykoproteín vybraného glykobiomarkera	potrebných 5 µl séra
sekvenovanie novej generácie	panel vybraných génov zúčastňujúcich sa na syntéze N- a O-glykánov	potrebných 200 µl celej krvi s prídavkom EDTA

výskume. Na analýzu vytipovaných génov sa používajú prednastavené panely génov dodávané výrobcom. Analyzujú sa celé exóny vopred vytipovaných génov postihnutých jedincov, ako aj parentálnej generácie na zistenie genetického pozadia CDG ochorenia (10).

Sekvenovaním exónových častí kandidátnych génov sa nemusia zachytiť všetky mutácie spôsobujúce ochorenie. Existuje totiž predpoklad, že približne 15 % pacientov má mutáciu v nekódujúcich oblastiach sledovaných génov. Z tohto dôvodu je nevyhnutné podrobiť sekvenčnej analýze nielen oblasti, v ktorých dochádza k zotrhu, ale aj hlboké intrónové oblasti sledovaných génov (11).

Perspektíva CDG

Objav vhodných terapeutických prístupov v liečbe CDG stále ostáva významnou výzvou, nakoľko sa celková prevalencia týchto ochorení v USA odhaduje až na 1 : 10 000 (7). V priebehu roku 2013 bol vo svete nový známy CDG subtyp reportovaný každých 17 dní, a to práve vďaka vývoju stále citlivejších analytických metód, ktoré sú dnes dostupné aj na pôde Slovenskej republiky. Napriek obrovskému rozvoju diagnostických možností sa však stále predpokladá, že väčšina CDG pacientov ostáva poddiagnostikovaných. Od roku 2012 je v našej krajine dostupná efektívna skriningová metóda, ktorá umožňuje záchyt pacientov s CDG. Na lepšie poznanie CDG a príčin ich vzniku bude preto v budúcnosti nevyhnutná úľahla spolupráca medzi výskumnými pracoviskami a diagnostickými laboratóriami. Len aplikáciou molekulárno-biologických dát v spolupráci s poznatkami o glykozylnácii proteínov sa umožní rozširovanie panelu kandidátnych génov potenciálne zodpovedných za tento typ ochorenia (5). Na diagnostiku porúch súvisiacich s metabolizmom glykokonjugátov je preto limitujúce zavedenie rýchlych, presných a spoľahlivých metód.

Záver

Poruchy glykozylnácie sú v našej krajine poddiagnostikované z rôznych dôvodov: neuspokojivé lekárske povedomie, vysoká mortalita v prvom roku života, ako aj nedostupnosť v minulosti štandardného skriningového laboratórneho testu. Keďže ide o zriedkavé ochorenia, úspešnosť záchytu i dôkladná diagnostika, až na úrovni štruktúrnej analýzy glykánov či mutačnej analýzy celých panelov glykogénov, závisí aj od dobrej spolupráce klinických pracovísk s pracoviskami výskumného, respektíve akademického charakteru. Iba včasná a presná diagnostika dokáže na-

pomôcť stanoveniu správnej diagnózy u pacienta, prípadne prenatálnej diagnostiky pri ďalšej gravidite matky, pochopeniu molekulárnej podstaty týchto ochorení, ako aj zabráneniu prípadného ireverzibilného poškodenia organizmu.

Podakovanie: Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja. Osobitné podakovanie patrí aj celému Centru dedičných metabolických porúch v Bratislave za vysoko odbornú spoluprácu tohto klinického pracoviska s Chemickým ústavom SAV.

Literatúra

1. Durand G, Seta N. Protein Glycosylation and diseases: Blood and urinary oligosaccharides as markers for diagnosis and therapeutic monitoring. *Clin Chem*. 2000;46(6):795–805.
2. Solá RJ, Griebenov K. Glycosylation of Therapeutic Proteins: An Effective Strategy to Optimize Efficacy. *BioDrugs*. 2010;24(1):9–21.
3. Abou-Abbass H, Abou-El-Hassan H, Bahmad H, et al. Glycosylation and other PTMs alterations in neurodegenerative diseases: Current status and future role in neurotrauma. *Electroph*. 2016; published online.
4. Ferreira JA, Magalhães A, Gomes J, et al. Protein glycosylation in gastric and colorectal cancers: Toward cancer detection and targeted therapeutics. *Canc Letters*. 2016; in press.

5. Jones MA, Hegde MR. *Congenital Disorders of Glycosylation. Molecular Pathology in Clinical Practice*. New York: Springer International Publishing; 2016: 121–125.
6. Morava E, Lefeber D. CDG – an update. *J Inher Metab Dis*. 2011;34(4):847–48.
7. Freeze HH. Understanding human glycosylation disorders: Biochemistry leads the charge. *J Biol Chem*. 2013;288:6936–45.
8. Dörre K, Olczak M, Wada Y, et al. A new case of UDP-galactose transporter deficiency (SLC35A2-CDG): molecular basis, clinical phenotype, and therapeutic approach. *J Inher Metab Dis*. 2015;38(5):931–940.
9. Wada Y, et al. Mass spectrometry of apolipoprotein C-III, a simple analytical method for mucin-type O-glycosylation and its application to an autosomal recessive cutis laxa type-2 (ARCL2) patient. *Glycobiol*. 2012;22(8):1140–1144.
10. Jones MA, Rhodenizer D, da Silva C, et al. Molecular diagnostic testing for congenital disorders of glycosylation (CDG): detection rate for single gene testing and next generation sequencing panel testing. *Mol gen metab*. 2013;110(1):78–85.
11. Raffan E, Semple RK. Next generation sequencing-implications for clinical practise. *Brit Med Bull*. 2011;99:53–71.



Ing. Zuzana Pakanová, PhD.
Centrum excelentnosti pre glykomiku
Chemický ústav SAV
Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava
zuzana.pakanova@savba.sk

MEDICAL DEVICES

LIFE SCIENCES

IN VITRO DIAGNOSTICS

VETERINARY AND FOOD DIAGNOSTICS

CLINICAL IT

IN VITRO DIAGNOSTICS

MEDICAL DEVICES

VETERINARY AND FOOD DIAGNOSTICS

CLINICAL IT

IN VITRO DIAGNOSTICS

LIFE SCIENCES

IMMUNOASSAYS

BIOMEDICA



www.biomedica.sk

**Váš spoľahlivý
partner
v zdravotníctve**

Mykotické ochorenia a stavy podmienené hubami – charakteristika a rozdelenie

RNDr. Martina Sládeková, MHA

Oddelenie mykológie, HPL, spol. s r. o., Bratislava

Mikroskopické huby sú eukaryotické, heterotrofné mikroorganizmy vyskytujúce sa celosvetovo. Podľa zdroja organických látok ich delíme na saprofyty, symbionty a parazity. K mykotickým ochoreniam a stavom podmienenými hubami patria: mykózy, mykotoxikózy, mykoalergie a mycetizmus. Mycetizmus – alimentárna otrava po konzumácii určitých húb, napríklad muchotrávky zelenej, prejavujúca sa najčastejšie dyspeptickými problémami. Mykoalergia – hypersenzitívna reakcia imunitného systému na určité fungálne antigény, tzv. alergény. Alergickú reakciu u predisponovaných osôb môže vyvolať celý rad mikromycét, hlavne druhy rodu *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*. Mykotoxikóza – stav vyvolaný toxickými produktmi metabolizmu mikroskopických húb uvoľňovanými do prostredia. Väčšinou sú to chronické, opakujúce sa otravy nižšími dávkami, možné sú ale aj akútne až smrteľné otravy alebo stavy s chronickými následkami. Mykóza – ochorenie človeka alebo zvierat spôsobené mikroskopickými hubami. Podľa „hĺbky“, do ktorej zasahuje chorobný proces, sa mykózy delia na povrchové (superficiálne), subkutánne a orgánové/systémové.

Kľúčové slová: mikroskopické huby, mycetizmus, mykoalergia, mykotoxikóza, mykóza

Mycotic diseases and morbid conditions caused by fungi – characteristic and classification

Microscopic fungi are eukaryotic, heterotrophic microorganisms occurring worldwide. Depending on the source of organic matter they can be divided into the saprophytes, symbionts and parasites. The mycotic diseases and morbid conditions caused by fungi include mycoses, mycotoxicoses, fungal allergies and mycetism. Mycetism (fungal poisoning) caused by ingestion of certain mushrooms (fungal organisms, e.g. *Amanita phalloides* and related species). Symptoms caused by toxic peptides may include severe abdominal pain, vomiting, cold sweat, diarrhea, etc. Fungal allergies mostly affect the respiratory tract. Human exposure to bioaerosols (presence of fungi and bacteria) has been documented to give rise to a variety of adverse health effects, e.g. irritation of the eyes, nose, throat; neurotoxic or general health problems; skin irritation; nonspecific hypersensitivity reactions. Mycotoxicosis refers to all of those diseases caused by the effects of toxins produced by moulds. Exposure to mycotoxins is mostly by ingestion, but also occurs by dermal and inhalation routes. Mycosis – infection or disease of human and animal caused by fungus. Mycoses are classified according to the tissue levels initially affected: superficial and cutaneous, subcutaneous and systemic mycoses.

Key words: microscopic fungi, mycetism, fungal allergies, mycotoxicosis, mycosis

NewsLab, 2016; roč. 7(2): 93–97

Úvod

Huby ako jednobunkové až viacbunkové organizmy sú stabilnou zložkou každej biocenózy. Sú heterotrofné, na svoju výživu potrebujú organické látky rastlinného alebo živočíšneho pôvodu. Podľa spôsobu získavania živín je možné huby deliť na: *saprofytické*, *symbiotické* a *parazitické* (fakultatívne a striktné parazity). Z viac ako stotisíc opísaných druhov je približne 80 % mikroskopických húb. Z tohto počtu je viac ako sto druhov známych ako agensy vyvolávajúce ľudské a zvieracie mykózy a niekoľko sto ďalších predstavuje podmienené patogény. Mnohé mikromycéty, donedávna považované za komenzálne či saprofytické, sú schopné za určitých podmienok (napríklad na alterovanom teréne, v imunosupresii) vyvolávať často závažné ochorenia človeka a zvierat.

Myctizmy

Mycetizmy sú alimentárne otravy následkom požitia plodníc vyšších húb (napríklad muchotrávka zelená, muchotrávka tigrovaná, kapučňovka okrovohnedastá, závojenka olovová). Otravy hubami sa vyskytujú predovšetkým v čase od augusta do októbra. Klinicky sa konzumácia jedovatých

húb môže prejavovať rôznymi symptómami: nevoľnosťou, vracaním, kŕčovitou bolesťou brucha, hnačkou. V ojedinelých prípadoch môže dôjsť až k zlyhaniu pečene vyžadujúcemu transplantáciu (1, 2). **Pri podozrení na otravu hubami je potrebné okamžite vyhľadať alebo privolať lekársku pomoc.** Terapeuticky cenné je presné zistenie času, ktorý uplynul od požitia huby. Prvé dyspeptické príznaky sa objavujú zvyčajne po 4 až 24 hodinách od požitia, napríklad muchotrávky zelenej (obrázok 1), ktorá je najčastejšou príčinou mycetizmu (1).

Celá plodnica obsahuje zmes peptidických jedov, ktoré sa delia na dve skupiny: falotoxíny a amatoxíny. Z toxikologického hľadiska sú významnejšie amatoxíny. Falotoxíny sa buď odbúrajú v tráviacom trakte pôsobením žalúdočnej kyseliny, alebo sa vôbec nevstrebávajú do krvi. Amatoxíny sú termostabilné a neodbúrajú sa ani varom. Letálna dávka je veľmi nízka – 0,1 mg/kg hmotnosti dospelého človeka. Tieto toxíny sa rýchlo absorbujú z tráviaceho traktu, takmer 60 % absorbovaného toxínu sa vylučuje do žlče a prechádza cez enterohepatálny obeh. Toxin sa absorbuje hepatocyty, inhibuje RNA polymerázu II a prerušuje syntézu mRNA štruktúrnych proteínov, čo vedie k celulárnej nekróze (1, 3). K počiatočným príznakom patrí únava, žalúdočná

Obrázok 1. Muchotrávka zelená – *Amanita phalloides* (www.naturephoto-cz.com)



nevoľnosť, závraty, bolesti hlavy, pocity chladu až mrazenia. Nevoľnosť sa stupňuje, nastupujú bolesti žalúdka sprevádzané silným vracaním a hnačkami. To vedie k dehydratácii organizmu až obehovému zlyhaniu, čo hlavne u detí môže byť bezprostrednou príčinou smrti. Po tejto fáze zvyčajne môže dôjsť ku zdanlivému zlepšeniu. V ďalšej fáze dochádza k zlyhaniu pečene, obličiek, multiorgánovému zlyhaniu až smrti. Toxíny muchotrávky zelenej môžu poškodiť až usmrtiť plod tehotnej ženy, pretože prestupujú placentárnou bariérou a vylučujú sa aj do materského mlieka (4). Základom terapeutického úspechu je dôkladné a čo najrýchlejšie odstránenie jedovatých húb z tráviaceho traktu – opakované výplachy žalúdka, podanie aktívneho uhlia, preháňadiel, primeraná hydratácia, forsírovaná diuréza, podávanie penicilínu G (prípadne ceftazidimu) a antidot (napríklad N-acetylcysteín a Silybum). Pestrec mariánsky – *Silybum marianum*, je rastlina pripomínajúca bodliak, schopná regenerovať tkanivo pečene a obnovovať jej správnu funkciu. Za liečivé účinky sú zodpovedné flavolignany, ktoré sa súhrnne nazývajú silymarín. Flavolignany sú schopné inhibovať väzbu alfa-amanitínu na hepatocyty. Okrem toho podporujú regeneráciu poškodených pečenej buniek a pôsobia ako silné antioxidanty. Ďalšou látkou používanou pri liečbe otravy amatoxínom je antioxidant cimetidín – inhibítor cytochrómu P450. Zvyčajne sa podáva spolu s penicilínom G. V liečbe sa tiež používa vitamín C, ktorý inhibuje peroxidáciu lipidov a slúži ako protektor hepatocytov (1, 2, 3). Mimotelovú eliminačnú liečbu pri neskorom príchode chorého do zdravotníckeho zariadenia treba začať do 24 – 48 hodín po akútnej otrave. Pri začínajúcej hepatálnej kóme sa odporúča použiť aj plazmaferézu (5). Otravy nejedovatými hubami (rozkladajúcimi sa napríklad pri zlom skladovaní) sa prejavujú dyspeptickými ťažkosťami, ktoré obyčajne vznikajú do 4 hodín od požitia. V štádiu dyspeptických príznakov hrozí najväčšie nebezpečenstvo z dehydratácie organizmu. Tá môže zapríčiniť hypotenziu, cyanózu až anúriu. Podľa Národného toxikologického informačného centra SR tvoria otravy hubami približne 4,5 % zo všetkých hlásených intoxikácií. Vďaka laboratórnym diagnostickým metódam (mikroskopické mykologické vyšetrenie obsahu gastrointestinálneho traktu – zvratky, stolica alebo zbytky húb, vyšetrenie RIA – rádioimunoanalýza zo séra alebo moču na dôkaz prítomnosti toxínu, chemicko-toxikologické, hematologicko-hemokoagulačné, prípadne biochemické vyšetrenie, napríklad koagulačné faktory, fibrinogén, bilirubín, elektrolytová analýza), novým možnostiam liečby, ako aj lepšiemu poznaniu zloženia toxínov a mechanizmu ich účinku na ľudský organizmus podstatne klesla úmrtnosť pri intoxikáciách hubami (5). Prognóza otravy závisí od množstva požitých jedovatých húb a včasnosti začatia účinnej terapie. Na otravy hubami sú vo všeobecnosti citlivejšie deti než dospelí.

Mykotoxikózy

Niektoré mikroskopické huby sú schopné produkovať látky – sekundárne metabolity, označované ako mykotoxíny. Prostredníctvom rastlinných produktov sa dostávajú do potravinového reťazca. V súčasnosti je

známych niekoľko sto mykotoxínov. Produkujú ich najmä zástupcovia rodov *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Phoma*, *Stachybotrys* (6). Príznaky mykotoxikózy závisia od druhu mykotoxínu, jeho množstva, dĺžky expozície, veku, zdravotného stavu, ako aj pohlavia exponovaného jedinca. Závažnosť ochorenia môžu umocniť aj ďalšie faktory, ako je dietetický status, nedostatok vitamínov, kalorická deprivácia, alkohol a iné prebiehajúce infekčné ochorenia. Väčšina mykotoxikóz je výsledkom konzumácie kontaminovaných potravín. Menej často k expozícii človeka mykotoxínmi dochádza inhalačne alebo cez kožu (kontaktným s kontaminovanými povrchmi) (7). Častejšie sa s nimi stretávame v teplých vlhkých oblastiach, ale vyskytujú sa aj v miernom pásme. Mykotoxíny môžu rôznymi mechanizmami poškodzovať orgány a tkanivá teplokrvných živočíchov aj človeka. Takmer všetky sú cytotoxické. Poškodzujú bunkové štruktúry a ovplyvňujú životné bunkové procesy (proteosyntézu, syntézu nukleových kyselín). Účinok mykotoxínov sa líši podľa ich chemickej štruktúry, ako aj podľa špecifického pôsobenia na cieľové miesta – bunky, bunkové štruktúry alebo procesy (8). Jeden druh húb môže produkovať rôzne mykotoxíny. Z hľadiska patologického účinku ich môžeme deliť na nefrotoxické, hepatotoxické, neurotoxické, dermatotoxické, genitotoxické a toxíny respiračného traktu. Ochorenia sa môžu manifestovať ako akútne alebo chronické. Akútne mykotoxikózy sú vyvolané príjmom vysokých dávok toxínu/toxínov. Môžu spôsobiť poškodenie až deštrukciu pečene, obličiek, obehového, ako aj centrálného nervového systému. V humánnej medicíne sú zriedkavosťou. Pri chronických ochoreniach ide o dlhodobý príjem nízkych dávok toxínu/toxínov, ktoré môžu mať teratogénny, mutagénny, karcinogénny účinok, prípadne toxicky ovplyvňujú krvotvorbu. Medzi najčastejšie toxíny patria: aflatoxíny, ochratoxíny, patulín, fuzáriové toxíny, citrinín a námellové alkaloidy. Najviac toxický je karcinogénny aflatoxín B₁, ktorý produkujú huby *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*. Z ďalších aflatoxínov sú to B₂, G₁ a G₂, pričom ich toxicita aj mutagenita klesá v uvedenom poradí. K akútnym prejavom aflatoxikózy patria: nekróza hepatocytov, poruchy zrážanlivosti krvi, bolesti brucha, vracanie, kŕče, pľúcny edém, letargia, kóma až smrť. Chronické subletálne dávky majú nutričné a imunologické dôsledky, pričom všetky dávky majú kumulatívny účinok na riziko vzniku rakoviny (6, 9). Medzi producentov sekundárnych metabolitov patria aj mnohé fuzárie (napríklad *F. sporotrichoides*, *F. verticillioideus*, *F. poae*), ktorých toxické izoláty produkujú napríklad trichotecény, zearalenón, fumonizíny. Tieto toxíny je možné nájsť aj v produktoch z cereálnych výrobkov, v krmovinách, pričom niektoré z nich spôsobujú ochorenie známe ako toxická alimentárna aleukia (T2 toxín) (10). Ochratoxíny produkujú niektoré kmene *A. ochraceus* (obrázok 2) a *Penicillium* spp., produkujú ich aj čierne aspergily, patulín druhu *P. patulum*, *Aspergillus* spp., *Byssosclamy* spp.

Nebezpečným cudzopasníkom na raži, žite a trávach je huba kyjanička (napríklad *Claviceps purpurea*). Kyjaničky spôsobujú tzv. námelf obsahujúci ergotové alkaloidy, najmä ergotamíny (štruktúrne podobné LSD), ktoré sú vo väčších dávkach nebezpečné a spôsobujú symptómy nazývané **ergotizmus** (hlavne u hovädzieho dobytku). Ergotizmus je jednou z najstarších známych ľudských mykotoxikóz. Pri vaskulárnej forme, označovanej aj ako suchá gangréna, dominujú spazmy drobných ciev indukované ergotamín-ergokristín alkaloidmi. Medzi príznaky

Obrázok 2. *Aspergillus ochraceus*, Sabouraudov agar (25 °C/5 dní) (Sládeková, 2016)



patrí olupovanie kože, strata periférnej citlivosti, opuchy. Opakované pôsobenie toxínu a väčšie dávky môžu viesť až k odumretiu akrálnych tkanív (ušný boltec, nos, brada, prsty). K príznakom konvulzívneho ergotizmu patria svalové záškľby a kŕče, hnačka, parestézia, svrbenie, bolesti hlavy, nevoľnosť, vracanie, halucinácie, potenie a horúčka, trvajúce po obdobie niekoľkých týždňov, až duševné poruchy vrátane psychózy spôsobenej nadmernou stimuláciou

centrálneho nervového systému. Alkaloidy môžu počas laktácie prechádzať z matky na dieťa, čo spôsobuje ergotizmus aj u dojčiat. V stredoveku sa ochorenie nazývalo oheň svätého Antonína (11, 12).

Mykoalergie

Mykoalergie sú hypersenzitívne reakcie imunitného systému na antigénnu stimuláciu mykotickým alergénom, respektíve sú to stavy z precitlivenosti pri dlhodobej a opakovanej expozícii mikroskopickým hubám v domácom alebo pracovnom prostredí. Fungálne alergie môžu byť spôsobené časticami húb alebo ich metabolitmi (mykotoxíny, prchavé organické zlúčeniny – alkoholy, aldehydy, ketóny, aromatické, sírne zlúčeniny) (6, 13). Účinok mikromycét ako alergénov závisí od množstva ich častíc vo vzduchu, koncentrácie prchavých látok, ktoré vylučujú, dĺžky pobytu človeka v takomto prostredí a tiež od jeho predispozícií a imunity. Mikromycéty sú prítomné takmer všade, pričom väčšina z nich sa ľahko šíri vzduchom. Častice húb väčšie ako 10 µm sa ľahko zachytia v horných dýchacích cestách a samočistiacim mechanizmom sa odstránia z makroorganizmu. Čiastočky menšie ako 3 µm sa zachytávajú v alveolách, kde sa fagocytujú, potenciálne však môžu byť z alveol absorbované do krvného riečiska. Mykoalergie je možné rozdeliť z hľadiska vstupu alergénu do organizmu na: inhalačné (dýchacie cesty), kontaktné (pri styku s kožou) a potravinové (vstupom cez gastrointestinálny trakt). Samotné prejavy sú rôzne, hlavne v oblasti dýchacích ciest (upchatý nos, dráždenie nosnej sliznice, nádchy, dráždenie na kašeľ, sucho, bolesť v hrdle), na koži (vyrážka, podráždená koža, pálenie, svrbenie), slzenie očí, únava, nevoľnosť, bolesť hlavy, závraty. Mnohokrát tieto prejavy súvisia aj s problematikou kvality vnútorného prostredia obytných, administratívnych a iných budov (vlhko, prašnosť, zlá ventilácia). Súhrn zdravotných ťažkostí, nepríjemného pocitu až diskomfortu v súvislosti s pobytom v určitých budovách sa označuje ako tzv. syndróm chorých budov – sick building syndrome (SBS) (6). Vlákňité huby v uzavretých priestoroch sú zvlášť nebezpečné pre ľudí s narušenou imunitou, chronickými ochoreniami, pre alergikov, dojčatá a deti. Alergický potenciál majú napríklad hýfomycéty rodu *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Fusarium*, niektoré bazídiomycéty, kvasinky, zygomycéty rodu *Mucor* a *Rhizopus* (14). Mykotické (fungálne, hubové) antigény môžu stimulovať produkciu špecifických protilátok IgE (tzv. I. typ alergickej reakcie) u atopických jedincov, čo spravidla zhoršuje klinický priebeh atopických ochorení: alergická sinusitída, bronchiálna astma alebo atopická

dermatitída. Mikromycéty môžu tiež vyvolávať IgE nezávislé alergické reakcie: tvorbu imunokomplexov (III. typ), ako aj reakciu sprostredkovanú bunkami (IV. typ). Či sa reakcia ľudského organizmu prejaví ako alergická bronchopulmonálna aspergilóza (ABPA), alergická fungálna sinusitída (AFS – zápal prínosových dutín), alebo alergická dermatitída, závisí od jeho imunologického stavu, ako aj od expozície mykotickým antigénom. Diagnóza alergických ochorení vrátane mykoalergií je založená na klinických symptómoch pacienta, na stanovení reakcie pacienta po jeho expozícii konkrétnemu antigénu (alergénu), na výsledkoch kožných testov a *in vitro* testov (napríklad RAST – rádioalergosorbent test, využívajúci rádioimunoanalýzu na detekciu špecifických IgE protilátok v krvi) (15).

Mykózy

Mykózy sú choroby človeka alebo zvierat spôsobené najmä mikroskopickými hubami. Predstavujú široké spektrum ochorení od superficiálnych infekcií postihujúcich vrchnú vrstvu kože *stratum corneum* až po diseminované infekcie postihujúce mozog, srdce, pľúca, pečeň. Niektoré mykózy môžu byť signálom zníženia obranyschopnosti organizmu, rozvíjajúceho sa závažného zdravotného stavu pacienta alebo môžu komplikovať iné choroby (16). K predisponujúcim faktorom vzniku závažných fungálnych infekcií patrí neutropénia, chemoterapia, imunosupresívna terapia, liečba širokospektrálnymi antibiotikami, invazívne zákroky, polytrauma. Jedným z rizikových faktorov môžu byť aj kontaminované ruky ošetrojúceho personálu. Mykotické infekcie sa vyskytujú vo všetkých svetových pásmach, postihujú všetky rasy, ľudí každého veku a pohlavia. Mykózy klasifikujeme podľa virulencie vyvolávateľa infekcie, cesty získania a lokalizácie infekcie. Podľa virulencie vyvolávateľa mykotickej infekcie môžeme hovoriť o primárne patogénnych a oportúnnych hubách. Primárne patogény sú schopné vyvolať infekciu aj u zdravého jedinca. Oportúnne patogény spôsobujú infekcie hlavne u imunitne oslabených jedincov. Primárne patogénne huby sa vyskytujú často v presne definovaných geografických oblastiach (endemický výskyt), zatiaľ čo oportúnne patogény sa vyskytujú ubikvitárne. Podľa cesty získania infekcie môže ísť o exogénnu alebo endogénnu infekciu. Cesta vstupu exogénnych húb zahŕňa vdychnutie spór, inokuláciu kutánne alebo perkutánne (pri úraze, chirurgickom, inštrumentálnom alebo inom invazívnom zákroku). Endogénna infekcia vzniká predovšetkým z kolonizácie normálnou flórou alebo reaktiváciou predošlej infekcie. Podľa „hlĺby“, do ktorej zasahuje chorobný proces, ako aj podľa stupňa poškodenia tkaniva a odpovede hostiteľského organizmu sa mykózy delia na: povrchové a kožné (kutánne), subkutánne a orgánové (systémové). K povrchovým mykózam patria superficiálne kolonizácie (bez tkanivovej odpovede) a superficiálne mykózy (napríklad *piedra* – mikromycéty kolonizujú vlasy v podobe uzlíkov, *pityriasis versicolor* – infekcia horných vrstiev epidermy *stratum corneum*, spolupôvodcom sú lipofilné kvasinky rodu *Malassezia*). Kutánne a mukokutánne infekcie sú charakteristické poškodením, ktoré je spôsobené proliferáciou húb v keratínových tkanivách – koža, nechty, vlasy, ochlpenie (dermatomykózy, onychomykózy, dermatofytózy). Patria sem aj infekcie očí, sínusov, orofaryngu, vagíny a vonkajšieho ušného kanála. Pri týchto infekciách je možné sledovať imunitnú odpoveď (11). Subkutánne infekcie predstavujú heterogénnu

skupinu ochorení, ktoré sú spôsobené širokým spektrom taxonomicky rozdielnych húb. Intenzita tkanivového poškodenia je rôzna a často závisí od imunitného stavu postihnutého organizmu. Spektrum infekcií zahŕňa: chromoblastomycózy, feohýfomycózy, hyalohýfomycózy, sporotrichózy a mycetómy (11, 17). Pôvodcom sú najmä saprofytické vlákňité huby, vyskytujúce sa bežne v pôde, prachu, na rozkladajúcich sa rastlinných zvyškoch, dreve. Ochorenie vzniká najčastejšie po traumatickej inokulácii. Infekčný proces postihuje predovšetkým podkožie a šíri sa len pomaly, často ide o chronické infekcie. Orgánové (systémové) mykotické infekcie sú život ohrozujúce infekčné komplikácie, ktoré sa stali v posledných desaťročiach významnou príčinou morbiditu a mortality. Pri týchto infekciách môže patogén diseminovať z jedného orgánu do druhého. Najohrozenejšou skupinou pacientov sú imunosuprimované osoby, u ktorých riziko vzniku, vážneho priebehu a prípadnej letality stúpa s prehĺbením deficitu ich imunitných funkcií. V minulosti sa spájali takmer výlučne s populáciou hematologických pacientov (18). V súčasnosti je táto problematika aktuálna aj v iných rizikových skupinách, v ktorých sa práve podmienene patogénne huby stali vážnou hrozbou. Sú to najmä pacienti na jednotkách intenzívnej starostlivosti, anestéziologických, chirurgických, interných, ale aj ďalších oddeleniach. Podľa Metodického listu MZ SR 2005 (19) sa k systémovým mykózam zaraďujú: fungémie (mykotické infekcie krvného prúdu), fungiúrie (mykotické infekcie uropoetického systému), orgánové infekcie (hepatosplenická forma), pulmonálne infekcie (lokálna invazívna forma, mycetóm pľúc), infekcie centrálného nervového systému, invazívna sinusitída (rinocerebrálna forma) alebo chronická diseminovaná forma. Poznanie rizikových, predisponujúcich faktorov umožňuje predpokladať etiológiu, a tým lepšie cieľiť diagnostické a terapeutické úsilie (18). Diagnostika mykóz a najmä invazívnych mykóz je interdisciplinárny proces, ktorý vyžaduje spoluprácu viacerých odborností. Opiera sa o dostupné mikrobiologické, sérologické, histologické, rádiologické a biochemické metódy. Stručný prehľad diagnostických metód je uvedený v tabuľke 1.

Tabuľka 1. Laboratórne metódy využívané v diagnostike mykotických infekcií (20)

Konvenčné mikrobiologické metódy	priama mikroskopia (Gram, Giemsa, KOH, karkofluór)
	kultivácia
	identifikácia
	stanovenie citlivosti na ATM
Histopatologické metódy	konvenčná mikroskopia (PAS, Gomori)
	priama imunofluorescencia
	in situ hybridizácia
Imunologické a biochemické metódy	dôkaz histoplazmového Ag
	dôkaz kryptokokového Ag
	dôkaz aspergilového Ag – galaktomananu
	dôkaz kandidového Ag – mananu
	dôkaz 1-3-β-D-glukánu
Molekulárne metódy	priama detekcia (DNA špecifické sondy)
	identifikácia

Záver

Mikroskopické huby sa vyskytujú vo všetkých biotopoch (pôda, voda, vzduch). Pôda, ktorá vytvára mikromycetám veľmi dobré existenčné podmienky (dostatok tepla, vlhkosti, organických látok a chráni ich pred slnečným žiarením), je považovaná za ich prirodzený biotop. V porovnaní s pôdou sa v oveľa menšom množstve nachádzajú aj vo vode. Vo vzduchu sú prítomné najmä vo forme spór. Huby vďaka svojej metabolickej aktivite našli uplatnenie aj v mnohých výrobných postupoch a odvetviach:

- potravinársky priemysel – výroba syra, mliečnych produktov, chleba, alkoholických nápojov,
- chemický priemysel, biotechnológie – pri výrobe organických kyselín, enzýmov, vitamínov, hormónov, rastových látok,
- farmaceutický priemysel – výroba antibiotík, najmä penicilínu (*P. chrysogenum*),
- poľnohospodárstvo – v boji proti škodlivému hmyzu a parazitom kultúrnych rastlín,
- v environmentálnych biotechnológiách – v biologickej degradácii odpadov (21).

Okrem spomínaného využitia sú mnohé pôvodcom často závažných ochorení človeka, ale aj zvierat.

Centers for Disease Control and Prevention – CDC's vedie skupinu, tzv. *Mycotic Disease Branch (MDB)*, zameranú na prevenciu a kontrolu fungálnych infekcií nielen v USA, ale aj na medzinárodnej úrovni prostredníctvom epidemiologických a mikrobiologických štúdií umožňujúcich zlepšenie diagnostiky, liečby, prevencie a kontroly mykotických ochorení.

Hlavnými cieľmi sú:

- rozvíjanie metód umožňujúcich včasnú diagnostiku,
- sledovanie geografickej distribúcie environmentálnych mykotických ochorení,
- určenie vplyvu klimatických podmienok a klimatických zmien na tieto ochorenia,
- identifikovanie osôb s vysokým rizikom infekcie so zameraním sa na preventívne stratégie,
- zabezpečovanie vzdelávania poskytovateľov zdravotníckej starostlivosti, ako aj zvyšovanie povedomia verejnosti o možnostiach prevencie a liečby týchto ochorení (22).

Literatúra

1. Chen WCh, Kassi M, Saeed U, et al. A Rare Case of Amatoxin Poisoning in the State of Texas. *Case Rep Gastroenterol.* 2012;6(2):350–357.
2. Gok F, Topal A, Hacıbeyoglu G, et al. Fulminant Liver Failure Due to Amanita Phalloides Toxicity Treated with Emergent Liver Transplantation. *Eur J Gen Med.* 2015. 12(3):244–248.
3. Roberts DM, Hall MJ, Falkland MM, et al. Amanita phalloides poisoning and treatment with silibinin in the Australian Capital Territory and New South Wales. *Med J Aust.* 2013;198(1):43–47.
4. Santi L, Maggiori C, Mastroroberto M, et al. Acute Liver Failure Caused by Amanita phalloides Poisoning. *Int. J. of Hepatology.* 2012;2012:1–6.
5. Plačková S, Čagaňová B, Kresánek J. *Diferenciálna diagnostika otráv hubami na základe mykologickej analýzy* [online]. Bratislava: Národné toxikologické informačné centrum, KPLaT, FNŠP Bratislava; 2009: 1. Available from: <http://www.vzbb.sk/sk/aktuality/spravy/dokumenty/32_plackova.pdf>.
6. Mihinová D, Piecková E. Sekundárne metabolity mikromycet mykotoxíny a ich biologické účinky. *Lek Obz.* 2011;60(1):40–45.
7. Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(3):497–516.
8. *Mykotoxíny a mykoalergie* [online]. Available from: <http://uniba.sk/fileadmin/prif/envi/kpe/envirom_mikrobiologia/04.pdf>

9. Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, et al. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am J Clin Nutr*. 2004;80(5):1106–1122.
10. Remža J, Bíreš J, Matúšová M, et al. Official controls of foodstuffs – contamination of cereals by mycotoxins of the genus *Fusarium* and ochratoxin A. *Potravinárstvo*. 2011;5(2):63–66.
11. Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. *Clinical Mycology*. USA: Elsevier Science; 2003: 67–77.
12. Eadie MJ. Convulsive ergotism: epidemics of the serotonin syndrome? *Lancet Neurol*. 2003;2(7):429–34.
13. Lisalová M. *Lexikón lekárskej mykológie*. Bratislava: HPL SERVIS; 2014: 11.
14. Pospíšilová S. *Toxiny a sekundárni metabolity hub v potravinách*. Kroměříž: Bakalářská práce, Univerzita T. Bati ve Zlíne, Fakulta technologická; 2011.
15. Bogacka E, Jahnz-Rózyk K. Allergy to fungal antigens. *Pol Merkur Lekarski*. 2003;14(83):381–4.
16. Volleková A, Baroňáková A. Superficiálne mykózy. *Via pract*. 2005;2(3):129–133.
17. Hoog de GS, Guarro J, Gene J, et al. *Atlas of Clinical Fungi*. 2nd ed. Spain, The Netherlands: 2000: 1126.
18. Drgoňa L. *Infekčné komplikácie onkologických pacientov – vybrané kapitoly*. Bratislava: Univerzita Komenského; 2013: 24–34.

19. Diagnostika a liečba systémových mykóz. *Metodický list Ústrednej komisie racionálnej farmakoterapie a liekovej politiky MZ SR 2005*. 2005;9(3–4):1–8.

20. Alexander BD, Pfaller A. Contemporary Tools for the Diagnosis and Management of Invasive Mycoses. *Clin Infect Dis*. 2006;Suppl.1(43):15–27.

21. Gáper J. Funkcie húb v ekosystémoch a ich význam pre človeka [online]. *Huby – Enviromagazín*. Available from: <http://www.enviromagazin.sk/enviro6_2/funkcie22.html>.

22. Centers for Disease Control and Prevention – CDC 24/7 [online]. *Fungal Diseases*. 2016. Available from: <<http://www.cdc.gov/nceid/dfwed/mycotics/>>.



RNDr. Martina Sládeková, MHA

Oddelenie mykológie

HPL, spol. s r. o.

Istrijská 20, 841 07 Bratislava

sladekova@hpl.sk

**Komplexný sortiment prístrojov, diagnostických súprav
a spotrebného materiálu pre Vaše laboratórium**

Gaštanová 10, 974 09 Banská Bystrica
tel.: 048 41 550 45, fax: 048 41 550 56

DYNEX www.dynex.cz
e-mail: dynex@isternet.sk

Diagnostika vrodených krvácavých porúch sekundárnej hemostázy: jednoduchý sprievodca pre bežné klinické laboratóriá

MUDr. Tomáš Šimurda, MUDr. Miroslava Dobrotová, PhD., Ing. Ingrid Škorňová, PhD., RNDr. Jela Ivanková, MUDr. Pavol Hollý, PhD., prof. MUDr. Ján Staško, PhD., prof. MUDr. Peter Kubisz, DrSc.

Národné centrum hemostázy a trombózy, Klinika hematológie a transfúziológie, JLF UK a UNM, Martin

Diagnostika vrodených krvácavých porúch sekundárnej hemostázy zostáva vždy veľkou výzvou pre väčšinu klinických laboratórií. Krvácanie môže byť spôsobené buď získanými, alebo vrodenými príčinami, ktoré vedú k poruche primárnej alebo sekundárnej hemostázy. V praxi neexistujú všeobecne platné laboratórne postupy pre diagnostiku krvácavých porúch, preto sme vytvorili jednoduchý návod pre rutinné klinické laboratóriá. Tento pragmatický prístup k identifikácii a diagnostike vrodených krvácavých porúch sekundárnej hemostázy so sebou nesie určitú stratégiu založenú na zhromažďovaní údajov osobnej a rodinnej anamnézy a výsledkoch prvej línie testov, na ktorú následne nadväzujú analýzy druhej, ale aj tretej línie, ktoré rozhodnú o závažnosti krvácania konkrétneho fenotypu. Častá prítomnosť krvácaní do hlbokých štruktúr, skôr než mukokutánnych krvácaní, poukazuje na poruchu sekundárnej hemostázy. Aj keď pozitívna rodinná anamnéza je častá u pacientov s vrodenými poruchami, nedostatok klinicky významných symptómov u príbuzných pacientov môže svedčiť o získanej poruche hemostázy. Ďalší krok v diagnostike zahŕňa vyhodnotenie koagulačných testov prvej línie (protrombínový čas, aktivovaný parciálny tromboplastínový čas a vyšetrenie fibrinogénu), čo má význam najmä v prípade negatívnej rodinnej anamnézy, pri ktorej nie je podozrenie na konkrétny nedostatok faktora. Prítomnosť abnormálnych údajov z týchto testov a variabilná kombinácia ich výsledkov je potom užitočná pre vyšetrenie druhou líniou testov, najmä vyšetrenia jednotlivých koagulačných faktorov, ktoré potom poskytujú základ pre predbežnú diagnózu. Na definitívne potvrdenie diagnózy je potrebná tretia línia testov (imunologické testy koagulačných faktorov a geneticko-molekulová analýza), ktorá je sústredená do špecializovaných centier.

Kľúčové slová: deficit faktora, diagnostika, koagulácia, krvácavé poruchy, laboratórne testy, sekundárna hemostáza

Diagnostics of inherited bleeding disorders of secondary hemostasis: an easy guide for routine clinical laboratories

The investigation of inherited bleeding disorders of secondary hemostasis remains a great challenge for most clinical laboratories. Bleeding can be essentially caused by a variety of acquired or congenital conditions which impair either primary or secondary hemostasis. Since a universally agreed approach for the diagnostics of hemorrhagic disorders is still unavailable, this article aims to provide an easy guidance for routine clinical laboratories. This pragmatic approach to identifying and diagnosing inherited bleeding disorders of secondary hemostasis entails a multifaceted strategy based on a collection of personal and family history, the results of first-line tests which can then be followed by second- or third-line analyses to definitely establish the specific nature and the severity of the bleeding phenotype. Briefly, the presence of profound hemorrhages rather than mucocutaneous bleeding is suggestive of a disorder of secondary hemostasis. Although a positive family history is frequently reported in patients with congenital conditions, the lack of clinically meaningful symptoms in patient's relatives is not absolutely indicative of an acquired disorder. The next step encompasses the assessment of first-line coagulation tests (i.e., prothrombin time, activated partial thromboplastin time, and fibrinogen), if family history is not suggestive of a specific factor deficiency. The emergence of abnormal data of these assays and the variable combination of their results is then helpful to guide the performance of second-line tests, in particular specific factor assays which will then provide a reasonable basis for a preliminary diagnosis. Third-line tests (immunoassays coagulation factors and genetic and molecular analysis) which is concentrated in the specialized centers is necessary for the final confirmation of the diagnosis.

Key words: bleeding disorders, coagulation, diagnosis, factor deficiencies, laboratory testing, secondary hemostasis

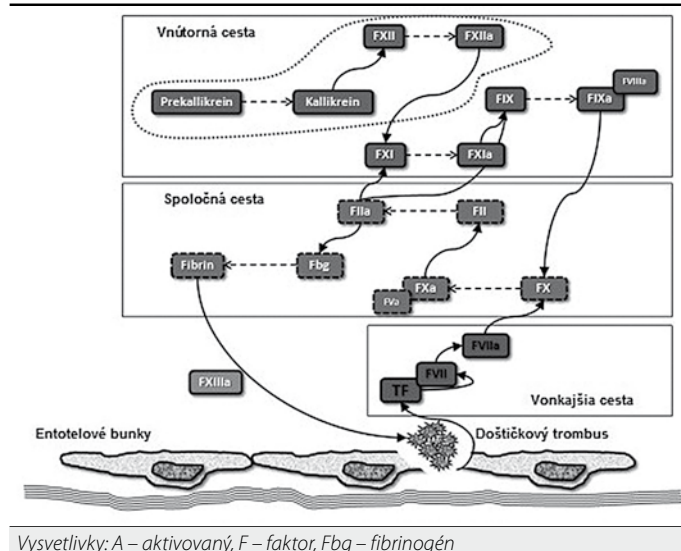
NewsLab, 2016; roč. 7(2): 98–101

Klinická anamnéza

Hemostáza je považovaná za komplikovaný mechanizmus v organizme, ktorého cieľom je zabrániť nadmernému krvácaniu v mieste poranenia cievy (1). Proces zastavovania krvácania začína v mieste poškodenia endotelu, čo má za následok spustenie procesu primárnej hemostázy, ktorý v nasledujúcom kroku vedie k spusteniu aktivácie sekundárnej hemostázy (obrázok 1).

Aj keď všetky vrodené poruchy zrážania krvi sa vyznačujú spoločným klinickým symptómom – krvácaním, charakter, lokalizácia a intenzita krvácania sa zvyčajne pri jednotlivých poruchách hemostázy značne líši. V tabuľke 1 sú uvedené charakteristické klinické prejavy pri jednotlivých vrodených poruchách sekundárnej hemostázy. Deficity FVIII a FIX (hemofília A a B) majú tendenciu vykazovať rôzne klinické prejavy

Obrázok 1. Model hemostázy *in vivo* (Prerušovaná čiara zahŕňa prekalikreín, kalikreín a FXII vo „vnútornej ceste“, poukazuje, ako je táto časť hemostatickej dráhy *in vivo* významná.)



iných deficitov faktorov, avšak keďže sú X-viazané recesívne ochorenia, majú väčšinový podiel v mužskej populácii. Zriedka u symptomatických žien môže byť diagnostikovaný deficit FVIII alebo FIX, ak však sa tieto deficity diagnostikujú, zvyčajne tieto pacientky definujeme ako „symptomatické nosičky“ (2). Ďalšie vzácne krvácavé ochorenia sekundárnej hemostázy sú väčšinou dedené autozomálne recesívne, a preto sú ženy a muži postihnutí s rovnakou frekvenciou (3). Najtypickejším klinickým príznakom deficitu faktora býva prítomnosť podkožných krvácaní, krvácaní z nosa, úst a u žien menorágie. Najzávažnejšie deficity FVIII a FIX môžu mať prítomné život ohrozujúce krvácanie po poranení, traume, menorágie, krvácania po rozsiahlych chirurgických zákrokoch alebo aj po menších invazívnych zákrokoch, ako je extrakcia zuba. Okrem týchto klinických prejavov sa u pacientov s ťažkou formou hemofilie často objavujú opakované spontánne krvácania do kĺbov, ktoré môžu viesť až k rozvoju hemofilickej artropatie. Zníženie týchto spontánnych krvácaní a rozvoja artropatie môžeme docieľiť adekvátnou profylaktickou liečbou (1). Charakteristickými klinickým prejavmi porúch trombocytov a niektorých foriem vWCH sú mukokutánne krvácania. Avšak, tieto prejavy sú zriedkavé u pacientov s vrodenou poruchou sekundárnej hemostázy. Dôležitá je podrobná rodinná anamnéza krvácania, v tomto prípade sú u príbuzných prítomné časté krvácavé prejavy, avšak treba myslieť aj nato, že neprítomnosťou krvácajúcich prejavov v rodinnej anamnéze nemôžeme jednoznačne vylúčiť vrodenú poruchu hemostázy, pretože *de novo* mutácie sú zodpovedné až za jednu tretinu všetkých prípadov (4). Okrem toho v diferenciálnej diagnostike by sme mali myslieť aj na poruchy, ktoré sú charakterizované prítomnosťou protilátok proti koagulačným faktorom (napríklad získaná hemofília) (5). Dôležitý je aj vek nástupu klinických príznakov, pretože vrodené poruchy, najmä tie najzávažnejšie (hemofília A a B, ktorá sa vyznačuje aktivitou koagulačného faktora < 5 %) sa zvyčajne objavujú už pri narodení alebo počas raného detstva.

Tabuľka 1. Najčastejšie klinické príznaky vrodených krvácajúcich porúch sekundárnej hemostázy

Vrodený deficit	Najčastejšie klinické príznaky
Deficit fibrinogénu	hematómy, krvácanie z nosa a dutiny ústnej, menorágie
Deficit faktorov II a V	hematómy, krvácanie z nosa alebo po chirurgickom zákroku, menorágie
Deficit faktora VII	hematómy, krvácanie do podkožia, z nosa, dutiny ústnej, urogenitálneho traktu alebo po chirurgickom zákroku, menorágie
Deficit faktorov VIII a FIX	krvácanie do kĺbov a svalov, krvácanie po poranení, chirurgickom zákroku alebo po extrakcii zubov
Deficit faktora X	hematómy, krvácanie z nosa a dutiny ústnej, po poranení alebo chirurgických zákrokoch, menorágie
Deficit faktora XI	krvácanie z nosa, po extrakcii zubov (oneskorené), po poranení, chirurgickom zákroku, menorágie
Deficit faktora XII	asymptomatické
Kombinovaný deficit FV + FVIII	krvácanie z nosa, z ďasien, po poranení, chirurgickom zákroku, drobné hematómy, menorágie
Deficit faktora XIII	hematómy, krvácanie z nosa a dutiny ústnej, po chirurgických zákrokoch, menorágie

Prvá línia hemokoagulačných testov

Pôvodný model koagulácie, ktorý pozostáva z vonkajšej, vnútornej a spoločnej cesty, už dlho reprezentuje spoločný základ prvej línie testov a bol vyvinutý na skríning pacientov s podozrením na krvácavé ochorenia. Tieto testy zahŕňajú protrombínový čas (PT), aktivovaný parciálny tromboplastínový čas (aPTT), trombínový čas (TT) a vyšetrenie fibrinogénu (FBG) (1) PT, pôvodne vyvinutý Quickom v roku 1935, ktoré je základným koagulačným testom, založeným na citrátovej plazme a aktivácii vonkajšej dráhy zrážania krvi (F VII) pomocou kalciového tromboplastínu (6). Tento test je preto väčšinou citlivý na poruchu FVII a ďalších faktorov spoločnej cesty koagulácie (FX, protrombín a FBG) (obrázok 1). PT môže byť vyjadrený v sekundách alebo ako pomer medzi pacientovou a referenčnou plazmou v medzinárodnom normalizovanom pomere (INR), v ktorom je pomer upravený indexom porovnania aktivačných vlastností tromboplastínu s medzinárodným referenčným tromboplastínom (7). Hoci hodnoty vyjadrenia v INR sa bežne používajú na monitorovanie perorálnej antikoagulačnej terapie antagonistom vitamínu K, výsledky INR môžu byť spoľahlivo použité u vyšetovaných pacientov s vrodenými alebo získanými (ochorenia pečene) poruchami koagulačných faktorov (8). Príčinami predĺženého PT môže byť nesprávny odber a preprava vzorky, malabsorpcia (čo vedie k nedostatku vitamínu K), ochorenia pečene, afibrinogénia, diseminovaná intravaskulárna koagulácia (DIC), inhibícia koagulačných faktorov pri užívaní priamych antikoagulantov, najmä liekov inhibujúcich FXa (apixaban a rivaroxaban) (9, 10). aPTT bol pôvodne vyvinutý Langdellom et al. v roku 1953. Test je založený na rekalcifikovanej citrátovej plazme, do ktorej je pridaný parciálny tromboplastín spoločne s jedným z aktivátorov vnútornej cesty koagulácie (kaolín, oxid kremičitý, kyselina elágová) (1). Tento test je citlivý na poruchy faktorov vnútornej cesty koagulácie (FVIII, FIX, FXI, FXII, prekalikreín) a taktiež aj FX, protrombín a FBG (obrázok 1). Podobne ako PT, môže byť vyjadrený v sekundách alebo ako pomer (7). Je zaujímavé, že deficit FXII je najčastejšou príčinou

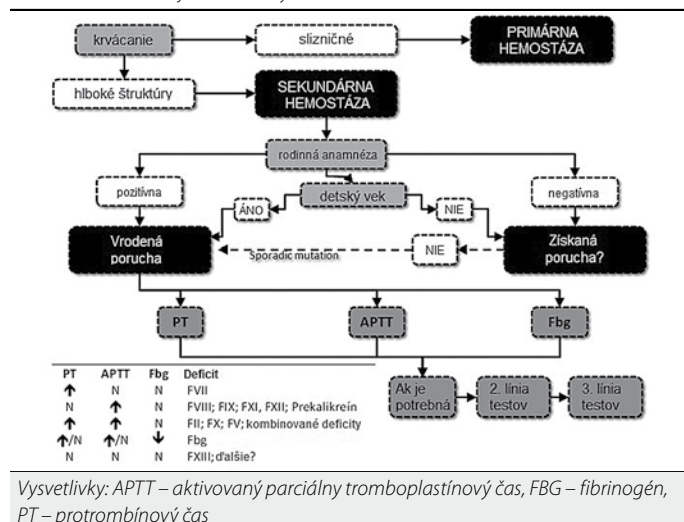
abnormálne predĺženého aPTT (30 až 50 % všetkých prípadov), čo je považované za benígny stav. Predĺžené aPTT býva pri deficitoch faktorov FVIII, FIX, FXI, FXII, ale aj pri nesprávnom odbere a preprave, pri ťažkej vWCH, inhibítoroch koagulačných faktorov, DIC, lupus antikoagulans, pri liečbe heparínom (najmä s nefrakcionovaným heparínom), kumarínom, alebo aj pri užívaní priamych perorálnych antikoagulancií (9, 10). Vyšetrenie FBG prebieha pomocou dvoch základných metód – funkčná a imunologická (3). Funkčná metóda podľa Claussa bola pôvodne opísaná v roku 1957, je založená na zriedenej citrátovej plazme (1 : 10) a premene FBG na fibrín pridaním vysokej koncentrácie (100 U/ml) trombínu. Riedenie plazmy má za cieľ obmedziť potenciálny inhibičný vplyv heparínu alebo fibrín/FBG degradačných produktov vrátane D-dimérov. Čas potrebný na vytvorenie zrazeniny sa potom preniesie na kalibračnú krivku, z ktorej sa vypočíta konečná koncentrácia FBG (11). Metóda podľa Claussa je najviac používanou metódou v klinických laboratóriách, pričom imunologické testy FBG (elektroimunodifúzia alebo metóda LIA – liquid immuno assay) sa používajú ako sekundárne testy pri diagnostike dysfibrinogenémie, pri ktorej je diskrepancia výsledkov medzi koncentráciou antigénu a funkčnou aktivitou FBG (3, 4).

Druhá a tretia línia hemokoagulačných testov

Abnormalita testov prvej línie môže byť príčinou jednej alebo viacerých vrodených porúch sekundárnej hemostázy, avšak neumožňuje presne charakterizovať poruchu, preto ani jednoznačne určiť spôsob liečby. Všetky rutinné klinické laboratória môžu ľahko vykonávať testy PT, aPTT a testy FBG (12, 13). Avšak významné technologické pokroky, ku ktorým došlo v priebehu posledných desaťročí, umožnili okrem rutinných testov hemostázy vykonávanie ďalších špecifických testov, ktoré umožňujú zlepšiť a identifikovať danú poruchu, a tým klasifikovať závažnosť ochorenia. Tieto testy sú väčšinou založené na vyšetrení jednotlivých koagulačných faktorov. Medzinárodná spoločnosť pre trombózu a hemostázu (ISTH) uvádza klasifikáciu vrodených porúch sekundárnej hemostázy podľa funkčnej aktivity koagulačného faktora na ťažkú, stredne ťažkú a ľahkú formu. Z tohto dôvodu sú závažné deficity charakterizované zvyškovou aktivitou FII, FV, FVIII, FIX < 1 %; FVII, FX, FXI a FXII 5 – 10 %, a FBG < 0,1 g.l⁻¹ (14, 15, 16). Hoci táto klasifikácia môže byť užitočná pre manažment liečby, je pozoruhodné, že klinický fenotyp je tiež závislý od ďalších faktorov, ako je vek, príčina krvácania (diéta, trauma, pečenej a obličkovej funkcie), funkcia primárnej hemostázy (funkcia a počet krvných doštičiek, úroveň aktivity a vWF), aktivita iných koagulačných faktorov a fibrinolytického potenciálu (15).

Medzi ďalšie testy druhej línie, ktoré sa môžu realizovať v rutinných klinických laboratóriách, patria test na diferenciálnu diagnostiku medzi vrodeným deficitom koagulačného faktora, prítomnosťou inhibítorov alebo antikoagulancií (17), testy na diagnostiku vWCH (vWF antigén a aktivita, napríklad ristocetínový kofaktor, test väzby kolagénu – collagen binding assay – CBA (1) a trombínový čas (TT). TT je založený na rekalcifikovanej citrátovej plazme a aktivácii tvorby fibrínu pridaním trombínu do testovanej vzorky. Tento test sa používa hlavne na detekciu porúch FBG a na identifikáciu kontaminovanej vzorky s inhibítorom trombínu, najmä liekmi inhibujúcimi FIIa, ako je napríklad dabigatran. Aj keď tento test bol pou-

Obrázok 2. Základný algoritmus skríningu pacientov s vrodenými poruchami sekundárnej hemostázy



žívaný v minulosti ako test prvej línie, jeho využitie na skríning pacientov s podozrením na vrodené poruchy sekundárnej hemostázy je do značnej miery irelevantné, vzhľadom na to, že kombinácia testov PT, aPTT a FBG, ktorú väčšina laboratórií vykonáva, je dostatočná (18). Samozrejmosťou je, že TT môže byť užitočný ako súčasť rutínnej diagnostiky na odlíšenie liečby heparínom a priamymi inhibítormi anti-Xa (10).

Testy tretej línie zahŕňajú imunologické metódy na odlíšenie kvantitatívnych porúch od kvalitatívnych porúch koagulačných faktorov a taktiež k nim zaraďujeme aj genetické analýzy, ktorých cieľom je identifikácia špecifických mutácií v gène kódujúcom príslušný koagulačný faktor. Týmto testami dodávame jasný obraz o tejto skupine ochorení (1). Za zmienku stojí, že testy tretej línie nie sú bežne dostupné a často sú finančne náročnejšie a zároveň vyžadujú špecializované technické vybavenie a správnu interpretáciu výsledkov. Táto diagnostika je sústredená do špecializovaných centier (3).

Pragmatický diagnostický prístup u pacienta s neobjasneným krvácaním

Vzhľadom na zložitosť primárnej a sekundárnej hemostázy by mala presná diagnostika vrodených krvávacích porúch sekundárnej hemostázy zahŕňať zhromažďovanie údajov osobnej a rodinnej anamnézy, výsledky prvej línie testov (skrínigových testov), ktoré sú doplnené vyšetreniami druhej alebo aj tretej línie testov. Tieto vyšetrenia definitívne stanovia klinický fenotyp pacienta (4). Prístup k diagnostike pacienta s vrodenou krvávacou poruchou sekundárnej hemostázy možno navrhnúť niekoľkými praktickými odporúčaniami, ktoré sú uvedené na obrázku 2. Pri poruchách sekundárnej hemostázy je prítomný častejší výskyt hematómov do hlbokých štruktúr (tabuľka 1) ako mukokutánnych krvácaní, aj keď vytvorenie hranice medzi poruchami primárnej a sekundárnej hemostázy býva často ťažko stanoviteľné (12). Pri podozrení na poruchu primárnej hemostázy (porucha funkcie alebo počtu trombocytov) je dôležité doplniť špecifické testy na vWCH (antigén a aktivita vWF), aby sa vylúčila alebo potvrdila buď prítomnosť vWCH, alebo iných porúch trombocytov (19, 20). Ako už bolo

spomenuté, pozitívna rodinná anamnéza krvácavého ochorenia je dôležitá pre prítomnosť vrodeného stavu. Avšak, nedostatok klinicky významných symptómov u príbuzných pacienta nie vždy svedčí o získanej poruche (až 30 % deficitov koagulačných faktorov sa javí ako *de novo*). Ak bol nástup prvých klinických prejavov pri narodení alebo v ranom detstve, zväčša ide o vrodené poruchy oproti získaným poruchám, ktoré môžu vzniknúť počas celého života (DIC, získaná hemofília, inhibitory na iné koagulačné faktory, ochorenia pečene, antikoagulačná terapia) (1).

Záver

Prítomnosť krvácaní do hlbokých štruktúr poukazuje na poruchu sekundárnej hemostázy. U pacientov s vrodenými poruchami je častá pozitívna rodinná anamnéza, nedostatok klinicky významných symptómov u príbuzných pacientov môže svedčiť o získanej poruche hemostázy. Dôležité v rámci diagnostiky krvácajúcich porúch sekundárnej hemostázy je okrem vyhodnotenia koagulačných testov prvej línie aj vyšetrenie testov druhej línie, najmä vyšetrení jednotlivých koagulačných faktorov, ktoré nám poskytujú základ pre predbežnú diagnózu. Na definitívne stanovenie diagnózy je nutné doplniť aj testy tretej línie (imunologické testy koagulačných faktorov a geneticko-molekulová analýza), ktoré nám potvrdzujú konečnú diagnózu, prípadne konkrétny deficit faktora (kvantitatívne alebo funkčné).

Podakovanie: Práca bola podporená projektmi: APVV 0222-11, Vega 1/0168/16, Grant Univerzity Komenského (UK/334/2015) a Martinské centrum pre biomedicínu (BioMed Martin, ITMS 26220220187), ktoré sú spolufinancované zo zdrojov EÚ.

Literatúra

1. Lippi G, Franchini M, Montagnana M, et al. Inherited disorders of blood coagulation. *Ann Med*. 2012;44:405–18.
2. Franchini M, Mannucci PM. The history of hemophilia. *Semin Thromb Hemost*. 2014;40:571–576.
3. Šimurda T, Dobrotová M, Staško J, et al. Vrodené poruchy fibrinogénu. *Interná med*. 2016;16:95–98.
4. de Moerloose P, Casini A, Neerman-Arbez M. Congenital fibrinogen disorders: an update. *SeminThromb Hemost*. 2013;39:585–595.
5. Coppola A, Favaloro EJ, Tufano A, et al. Acquired inhibitors of coagulation factors: part I. Acquired hemophilia A. *Semin Thromb Hemost*. 2012;38:433–446.
6. Tripodi A, Lippi G, Plebani M. How to report results of prothrombin and activated partial thromboplastin times. *Clin Chem Lab Med*. 2016;54:215–222.
7. Lippi G, Favaloro EJ, Franchini M. Dangers in the practice of defensive medicine in hemostasis testing for investigation of bleeding or thrombosis: part I – routine coagulation testing. *Semin Thromb Hemost*. 2014;40:812–824.
8. Tripodi A. Liver Disease and Hemostatic (Dys)function. *Semin Thromb Hemost*. 2015;41:462–467.
9. Lippi G, Favaloro EJ. Recent guidelines and recommendations for laboratory assessment of the direct oral anticoagulants (DOACs): is there consensus? *Clin Chem Lab Med*. 2015;53:185–197.
10. Favaloro EJ, Lippi G. Laboratory testing in the era of direct or non-vitamin K antagonist oral anticoagulants: a practical guide to measuring their activity and avoiding diagnostic errors. *Semin Thromb Hemost*. 2015;41:208–227.
11. Lowe GD, Rumley A, Mackie IJ. Plasma fibrinogen. *Ann Clin Biochem*. 2004;41:430–440.
12. Kitchen DP, Jennings I, Kitchen S, et al. Bridging the gap between point-of-care testing and laboratory testing in hemostasis. *Semin Thromb Hemost*. 2015;41:272–278.
13. Bonar R, Mohammed S, Favaloro EJ. International normalized ratio monitoring of vitamin K antagonist therapy: comparative performance of point-of-care and laboratory-derived testing. *Semin Thromb Hemost*. 2015;41:279–286.
14. White GC II, Rosendaal F, Aledort LM, et al.; Factor VIII and Factor IX Subcommittee. Definitions in hemophilia. Recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost*. 2001;85:560.
15. Peyvandi F, Di Michele D, Bolton-Maggs PH, et al.; Project on Consensus Definitions in Rare Bleeding Disorders of the Factor VIII/Factor IX Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Classification of rare bleeding disorders (RBDs) based on the association between coagulant factor activity and clinical bleeding severity. *J Thromb Haemost*. 2012;10:1938–1943.
16. Šimurda T, Dobrotová M, Staško J, et al. Afibrinogénémia a dysfibrinogénémie. *Vask med*. 2015;7:78–80.
17. Kershaw G, Orellana D. Mixing tests: diagnostic aides in the investigation of prolonged prothrombin times and activated partial thromboplastin times. *Semin Thromb Hemost*. 2013;39:283–290.
18. De Simone N, Sarode R. Diagnosis and management of common acquired bleeding disorders. *Semin Thromb Hemost*. 2013;39:172–181.
19. Škorňová I, Staško J, Hollý P, et al. Analýza multimérov von Willebrandovho faktora pri von Willebrandovej chorobe. *Vask med*. 2014;6:32–34.
20. Staško J, Stančíková L, Sokol J, et al. Krvácavé trombocytopatie. *Vask med*. 2013;5:74–80.



MUDr. Tomáš Šimurda

Národné centrum hemostázy a trombózy
Klinika hematológie a transfúziológie, JLF UK a UNM
Kollárova 3, 036 01 Martin
tsimurda@orava.sk

Genetic landscape of breast cancer

RNDr. Miroslav Tomka, PhD.

MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o., Bratislava

Breast cancer encompasses heterogeneous group of tumors with different histological, biological and clinical behavior. Intra- and inter-tumor heterogeneity as a result of genetic and non-genetic factors has considerable impact on different responses to anticancer therapy and prognosis. Introduction of new methods such as next-generation sequencing or comparative genome hybridization uncovered complexity of genetic nature of breast cancer. This article summarizes some of the new findings on this field.

Key words: breast cancer, comparative genome hybridization, next-generation sequencing, copy number variations

Genetické pozadie nádorov prsníka

Nádory prsníka tvoria heterogénnu skupinu nádorov s rozdielnymi histologickými, biologickými a klinickými prejavmi. Vplyvom genetických a negenetických faktorov vzniká rozdielnosť nielen medzi nádormi pacientov, ale aj v rámci jedného nádoru, čo má značný vplyv na liečbu a prognózu. Zavedenie nových metodík, ako sú sekvenovanie novej generácie a komparatívna genómová hybridizácia, odhalilo zložitosť genetického pozadia nádorov prsníka. Predkladaný článok sumarizuje niektoré z nových zistení na tomto poli.

Kľúčové slová: nádory prsníka, komparatívna genómová hybridizácia, sekvenovanie novej generácie, zmeny počtu kópií

NewsLab, 2016; roč. 7(2): 102–105

Introduction

Mammary gland is a unique organ that undergoes remarkable changes during the different stages of lifetime. During each menstrual cycle, the mammary gland passes through the waves of proliferation and apoptosis. Proliferation of the mammary epithelial cells is mainly driven by cyclic fluctuations of the hormonal factors such as estrogen and progesterone. Apoptosis controlled form of cell suicide is regulated by both hormonal and non-hormonal factors, but this process is still not well elucidated. Pregnancy also has great impact on breast morphology and function since it leads to extensive ductal branching and alveogenesis (1).

Breast tissue gladly responds to any hormonal or structural changes which makes it favorable target for tumorigenesis. Cancer can originate from any cell in the breast that has undergone tumorigenic transformation, mainly from epithelial tissue. This process can be partly explained as a progression from premalignant disease (e.g., hyperplasia, ductal carcinoma in situ) through invasive carcinoma to metastases. The whole process is accompanied and managed by accumulation of distinct genetic abnormalities. The common targets for breast cancer metastases are bone, lung, liver and brain. The prominent target organ is bone (2). The reason for this might lie in the fact that this tissue expresses higher level of hyaluronan and osteopontin. Hyaluronan interacts with osteopontin and serves as a specific ligand for CD44. This attachment complex is involved in breast cancer adhesion, migration and invasion (3). In addition, bone is an estrogen rich organ which might create generous environment for breast cancer cells (4).

Nowadays, two models are trying to explain the origin of cancer in general. First is based on the initial transformed cell that represents the cell-of-origin for the tumor. Accumulation of mutations in the regulatory genes, tumor suppressors or/and oncogenes gives such a cell growth advantage over the others what results to growth acceleration of some cell population and tumor formation. Probably, the best example illustrating

the multistage neoplastic process „from one cell to tumor“ is the well-known model of colorectal tumorigenesis (5).

The second theory considers the possibility of existence of self-renewing cancer cells called cancer stem cells (CSC). CSCs are subpopulation of cancer cells with high proliferative and metastatic potential. Breast cancer CSCs were isolated and identified as a CD44+/CD24- phenotype cells (6). Some introduced other markers of CSCs including ALDH1, CD49f and CD61 (7, 8, 9). This theory is trying to explain resistance to conventional therapies by the CSCs' ability of enhanced transmembrane transport outward by ABC transporters, specific mechanisms of DNA repair, ability to maintain specific signaling pathways involving key transcription factors, level of tumor suppressors and collaborative interactions among cancer stem cells to maintain specific microenvironment (10). Of course, each mentioned model has its strengths and weaknesses which are discussed elsewhere (11).

Classification of breast cancer

Breast cancer is classified into different subtypes that are associated with different patient survival outcomes. For many years, breast cancer has been classified based on clinicopathological features such as tumor type, tumor size, lymph node status and histological grade. One of the classification system is the Nottingham histologic score system. It is a grading system which utilizes features including tubule formation (similarity with normal breast duct structures), nuclear features (size and shape) and mitotic activity. According to this classification, low grade tumors (grade 1) tend to be less aggressive than the high grade tumors (grade 3). Despite not optimal reproducibility, grading system is the key point in the diagnosis and management of the disease (12).

Another classification of breast cancer is based on the expression of Estrogen Receptor (ER), Progesterone Receptor (PR), and Human Epidermal growth factor Receptor (HER2). Best survival rate was observed in the

case of ER+/PR+/HER2- subtype, the difference in survival was less than 1 % between ER+/PR+/HER- and ER+/PR+/HER2+ subtypes. All of the ER+ subtypes have better survival and adjusted mortality than all of the ER- subtypes. This suggests that ER may be a more important factor in survival than HER2 (13). ER, PR and HER2 status are predictive factors of tumor response to ER, PR, and HER2 targeted drugs.

In 2000, a classification system for the breast tumors based on variations in gene expression patterns was described. It was later revised and redivided into four subtypes: luminal A, luminal B, HER2-enriched, and basal-like (14).

Luminal A type of cancers have a low histological grade and are predominantly ER-positive. Luminal B group cancers are predominantly ER-positive with intermediate to high histological grade. Prognosis is good in the case of luminal A tumors, whereas luminal B type has intermediate prognosis with high risk of relapse. Both types of cancer are suitable for hormonal therapy.

Third type – HER2-enriched – is characteristic by high histological grade, ER- and PR-negative, HER2-positive with poor prognosis. Therapy uses drugs aimed against HER2 (e.g. trastuzumab).

Tumors that belong to the basal type or triple negative for ER, PR and HER2 group are of high histological grade with poor prognosis. Treatment of these cancer types is difficult (12).

Mutations in familial breast cancer

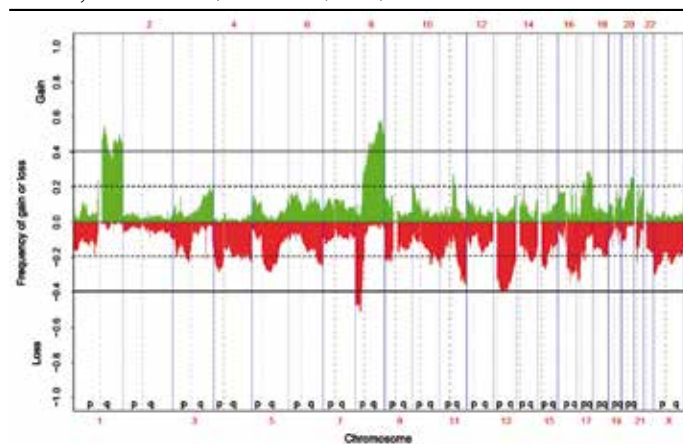
Genome-wide scanning revealed genetic variation in over 75 loci significantly associated with familial breast cancer. Despite progress on this field, currently known risk alleles explain only about 40 % of familial bound breast cancer (15). Up to date, *BRCA1* and *BRCA2* remain the two most significant genes linked to familial breast and ovarian cancer and account for about 20 % of familial breast cancer (16).

Traditional view on the subject suggests the key role of *BRCA1/2* in familial breast and ovarian cancer onset. Accordingly, mutation in one of these genes significantly increases cancer risk. However, things are not so easy. There are some reports out there claiming that some *BRCA1/2* mutations increase breast cancer risk only moderately (e.g. *BRCA1* c.1966Gln) (17), or even mean low risk for the affected person (e.g. *BRCA2* p.Lys3326*) (18). Spectrum of mutations found in *BRCA1* and *BRCA2* is extremely wide. Some of the mutations have been found one time only, whereas some have been found recurrently, often in enclosed ethnic groups, for example Ashkenazi Jews (e.g. *BRCA1* c.66_67delAG; *BRCA2* c.5946delT) (19).

Both *BRCA1* and *BRCA2* play critical roles in DNA repair, cell cycle checkpoint control and maintenance of genomic stability. Thus, searching for other genes involved in corresponding networks led to discovery of genes related to breast cancer, including *ATM*, *CHEK2*, *BRIPI*, *PALB2* and *NBS1*. Mutations in these genes increase breast cancer risk approximately twice. Another group of genes with influence on familial breast cancer is composed of genes such as *FAM175A*, *BARD1*, *RAD51C*, *MRE11*, *RAD50* (16).

Familial syndromes, such as Li-Fraumeni syndrome (*TP53*), Cowden syndrome (PTEN Hamartoma Tumour Syndrome) (*PTEN*), Peutz-Jeghers syndrome (*STK11*), and hereditary diffuse gastric cancer syndrome (*CHD1*) are known to be one of the prominent diagnostic marks of breast cancer.

Figure 1. Frequency of copy number anomalies in the overall population. Courtesy of Dr. Andre (Andre et al., 2009)



Gained regions are green, lost are red. Two regions, 1q and 8q are the most frequent gained regions in the population. Lost regions are spread all over the genome more equally.

Families affected by breast cancer seldom carry mutations in these genes but person with mutation in one of these genes has 2- to 10-fold increased risk of getting breast cancer early during the lifetime (16).

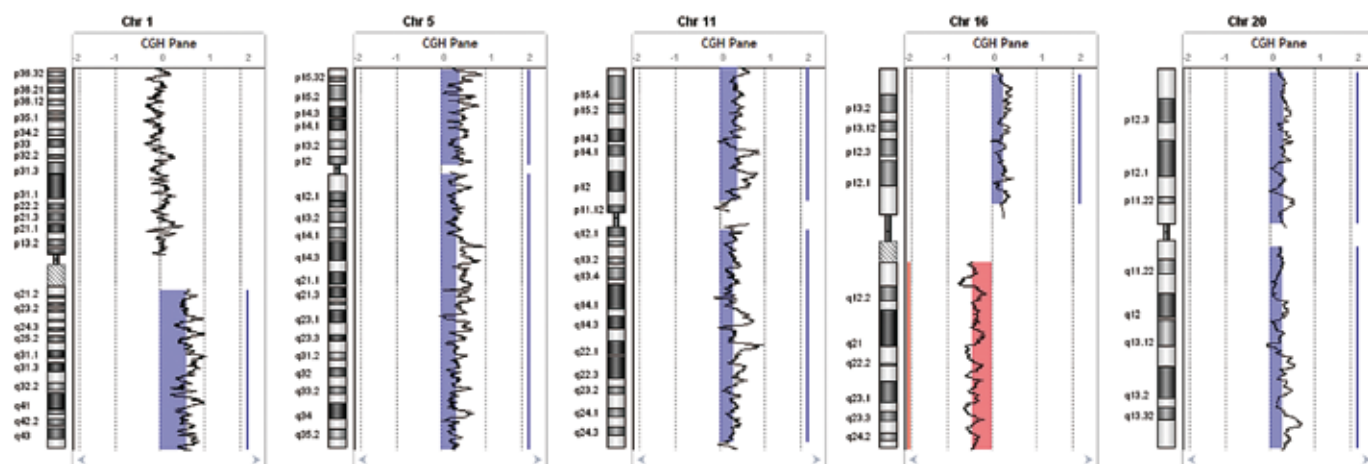
Modern screening methods such as next generation sequencing (NGS) revealed rare alleles associated with breast cancer risk, including *FANCM*, *BLM*, *FANCC*, *XRCC2* and *MCPH1/BRIT1* (20). The *MCPH1* c.904_916del mutation was genotyped in 1 370 breast cancer cases (145 familial cases, 75 young cases diagnosed below the age of 40 years, and 1 150 cases unselected for a family history of cancer or age at disease onset) and 1 160 healthy geographically matched controls. The highest prevalence for *MCPH1* c.904_916del was observed among the familial cases (5/145, 3.4 %), whereas only 5 of the 1 160 healthy controls (0.4 %) carried the mutation (20).

Castéra et al. used NGS 69 to detect germline deleterious alterations within *BRCA1* and *BRCA2* in 708 patients, 4 *TP53* mutations in 468 patients and also 36 variations inducing either a premature stop codon or a splicing defect among other genes: 5/708 in *CHEK2*, 3/708 in *RAD51C*, 1/708 in *RAD50*, 7/708 in *PALB2*, 3/708 in *MRE11A*, 5/708 in *ATM*, 3/708 in *NBS1*, 1/708 in *CDH1*, 3/468 in *MSH2*, 2/468 in *PMS2*, 1/708 in *BARD1*, 1/468 in *PMS1* and 1/468 in *MLH3* (21).

Aloraifi et al. screened *BRCA1/2* negative families with breast cancer. As expected, they identified mutations in several well-known high-susceptibility and moderate-susceptibility genes, including *ATM* (~ 5 %), *RAD50* (~ 3 %), *CHEK2* (~ 2 %), *TP53* (~ 1 %), *PALB2* (~ 1 %), and *MRE11A* (~ 1 %). They also identified novel pathogenic variants in 30 other genes: *MAP3K1*, *CASP8*, *RAD51B*, *ZNF217*, *CDKN2B-AS1* and *ERBB2* including a splice site mutation which, as they predict, would generate a constitutively active HER2 protein (22).

Chrupek et al. screened 289 African American women for inherited mutations. African Americans have a disproportionate burden of aggressive young-onset breast cancer. Of patients with mutations, 80 % (52/65) carried mutations in *BRCA1* and *BRCA2* genes and 20 % (13/65) carried mutations in *PALB2*, *CHEK2*, *BARD1*, *ATM*, *PTEN*, or *TP53*. The mutational allelic spectrum was highly heterogeneous with 57 different mutations in 65 patients (23).

Figure 2. Example of the comparative genome hybridization (aCGH)



Result of the aCGH in our laboratory. DNA was isolated from the tumor of patient with breast cancer. Gain regions are blue (1q, 16p, and 5, 11 and 20 both arms), lost region (16q) is red.

A total of 133 patients were enrolled in Li's study. Total 30 patients (22.6 %) were found to carry germline deleterious mutations: 9 in *BRCA1*, 11 in *BRCA2*, 2 in *RAD50*, 2 in *TP53* and one each in *ATM*, *BRIP1*, *FANCI*, *MSH2*, *MUTYH*, and *RAD51C* (24).

These data clearly support the idea to implement NGS into clinical management of familial breast cancer. It is highly probable that near future will bring routine usage of panels containing all known breast cancer associated loci for mutation screening in affected families.

Copy number variations in breast cancer

During last two decades, our understanding of cancer related loci has increased. The comparative genome hybridization (CGH) is tightly connected with this progress, despite its limitations. CGH is used for mapping losses and gains of DNA in the cancer genomes. These experiments revealed some loci that are commonly affected in breast cancer. Most frequently gained regions are localized on the chromosomal arms 1q, 8q, 17q, as well as 11q and 20q. On the contrary, most frequently lost regions were observed on 8p, 11q and 16q (25,26,27).

Closer view on the frequency plots shows two most prevalent regions with high gain alterations: 1q and 8q (figure 1). Andre et al. observed the gain of the 153 Mb region at 1q in 55 % cases out of 106 breast cancer patients. The second most frequently observed region of gain was spanning throughout the 116.7 and 127.5 Mb of the 8q. These gains were shown in 58 % of all cases (27). Interestingly, long arm of chromosome 1 is almost exclusively affected by gain of genetic material in breast tumors. On the other hand, its short arm is mainly involved in loss (28).

On the contrary, loss of genetic material is more or less equally distributed throughout the genome. However, at least a 24.2 Mb region at 8p is more frequently lost in 51 % cases, followed by a 47.8 Mb region at 13q seen in 41 % cases (27). Similar findings were spotted by others as well (25). Some patients show more complex anomalies in their tumor genome (figure 2).

Several studies have shown positive correlation between copy number alteration and gene expression level. For example, Andre et al. identi-

fied 3 007 such genes by Affimetrix U133A probes, including *MYC*, *FOXA1*, *FGF3*, *FGF4*, *CCND1*, *PAK1*. In addition, amplification with positive gain/loss and gene expression were observed in two amplicons (8p11-12 and 17q11-21) where genes *PROSC*, *GPR124*, *ADRB3*, as well as genes for trans-membrane tyrosine kinases -*ERBB2*, *FGFR1* are localized (27).

On the other hand, regions that were shown to be lost and highly correlated with changes in gene expression contain genes such as *BRCA1*, *STAT3*, *STAT5A*, *STAT5B*, and *MAPT* genes, as well as genes encoding chemokines (*CCL3*, *CCL4*, *CCL5*, *CCL14*, *CCL15*, *CCL16*, *CCL18*, *CCL23*) (27).

According to the accepted theory, cancerogenesis is a multistep process leading from primary cancer cells through tumor formation to metastasis. According to this theory, one can expect differences in genetic variations within different stages of tumor. Navin et al. dissected primary breast cancer tumors into sections and analyzed them by flow cytometry and CGH. Based on their observations, breast carcinomas divided into two groups: (1) monogenomic and (2) polygenomic. Monogenomic tumors contained a single major clonal subpopulation with a highly stable chromosome structure. Polygenic tumors contained only a few, no more than three major tumor subpopulations. They do not found any series of gradual intermediates which can confirm the multistage carcinogenesis (29).

In this context, it is not surprising that differences between primary tumors and metastasis are not so significant. Comparison of known driver oncogenes located within regions frequently amplified in breast cancer showed 100 % concordance for *ERBB2* (17q12) and *FGFR1* (8p11.23), 96 % for *CCND1* (11q13.3) and *PAK1* (11q14.1), and 88 % for *MYC* (8q24) (25). Mutational status of primary tumors and metastases by NGS showed tumor-metastases concordance of variants 92 % for recurrent mutations (*AKT1*, *ERBB2*, *PIK3CA*, *TP53*) and 73 % for non-recurrent variants (25). High level of similarity was found by others as well, for instance Vollebergh (30).

However, genetic footprint of the primary tumors and metastases is not always in perfect concordance. For example, an *ATM*-containing region was found to be deleted in metastases, but in primary tumors it was usually amplified (25).

Thus, it is evident that primary tumors and metastases share higher level of copy number variation, but a little less concordance is found in mutational status. This suggests that metastasis formation does not require much more genetic events as was thought. To elucidate the carcinogenesis in general, further investigation will need information from the other fields, for example proteomics (25).

Conclusion

Breast cancer is the most common cancer in women worldwide. Despite improvements in the diagnostics and treatment in the past decade, our knowledge of this disease is still limited. Differences on the gene level observed not only between two different patients, but even among the cells of the same tumor cause problems which makes treatment and prognosis more challenging. Treatment regime which is successful in one patients might not be of any value for another. Therefore, involvement of new techniques such as CGH might be a good way towards personalized medicine from which each patient can benefit the most.

Acknowledgments: *The author acknowledges the funding provided by Research and Development Operational Programme ITMS 26210120026, 2013/1.1/02-SORO. Additionally, I would like to thank Andrej Gnip, BSc. for proofreading of the manuscript.*

References

1. Navarrete MA, Maier CM, Falzoni R, et al. Assessment of the proliferative, apoptotic and cellular renovation indices of the human mammary epithelium during the follicular and luteal phases of the menstrual cycle. *Breast Cancer Res.* 2005;7(3):306–313.
2. Jin X, Mu P. Targeting breast cancer metastases. *Breast Cancer (Auckl.)*. 2015;9(Suppl 1):23–24.
3. Cook AC, Chambers AF, Turley EA, et al. Osteopontin induction of hyaluronan synthase 2 expression promotes breast cancer malignancy. *J Biol Chem.* 2006;281(34):24381–24389.
4. Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, et al. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell.* 2007;130(5):811–823.
5. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990;61(5):759–767.
6. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(7):3983–3988.
7. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell.* 2007;1(5):555–567.
8. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Bertucci F, et al. ALDH1-positive cancer stem cells predict engraftment of primary breast tumors and are governed by a common stem cell program. *Cancer Res.* 2013;73(24):7290–300.
9. Vaillant F, Asselin-Labat ML, Shackleton M, et al. The mammary progenitor marker CD61/beta3 integrin identifies cancer stem cells in mouse models of mammary tumorigenesis. *Cancer Res.* 2008;68(19):7711–7717.
10. Bozorgi A, Khazaei M, Khazaei MR. New findings on breast cancer stem cells: A review. *J Breast Cancer.* 2015;18(4):303–312.
11. Rycaj K, Tang DG. Cell-of-Origin of Cancer versus Cancer Stem Cells: Assays and Interpretations. *Cancer Res.* 2015;75(19):4003–4011.
12. Rosa M. Advances in the molecular analysis of breast cancer: Pathway toward personalized medicine. *Cancer Control.* 2015;22(2):211–219.
13. Parise CA, Caggiano V. Breast Cancer Survival Defined by the ER/PR/HER2 Subtypes and a Surrogate Classification according to Tumor Grade and Immunohistochemical Biomarkers. *J Cancer Epidemiol.* 2014;2014. Article ID 469251, doi:10.1155/2014/469251.
14. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(19):10869–10874.
15. Lalloo F, Evans DG. Familial breast cancer. *Clin Genet.* 2012;82(2):105–114.
16. Hilbers FS, Vreeswijk MP, van Asperen CJ, et al. The impact of next generation sequencing on the analysis of breast cancer susceptibility: a role for extremely rare genetic variation? *Clin Genet.* 2013;84(5):407–414.
17. Spurdle AB, Whitley PJ, Thompson B, et al. BRCA1 R1699Q variant displaying ambiguous functional abrogation confers intermediate breast and ovarian cancer risk. *J Med Genet.* 2012;49(8):525–532.
18. Michailidou K, Hall P, Gonzalez-Neira A, et al. Large-scale genotyping identifies 41 new loci associated with breast cancer risk. *Nat Genet.* 2013;45(4):353–361.
19. Cierniková S, Tomka M, Kováč M, et al. Ashkenazi founder BRCA1/BRCA2 mutations in Slovak hereditary breast and/or ovarian cancer families. *Neoplasma.* 2006;53(2):97–102.
20. Mantere T, Winqvist R, Kauppila S, et al. Targeted Next-Generation Sequencing Identifies a Recurrent Mutation in MCPH1 Associating with Hereditary Breast Cancer Susceptibility. *PLoS Genet.* 2016;12(1):e1005816.
21. Castéra L, Krieger S, Rousselin A, et al. Next-generation sequencing for the diagnosis of hereditary breast and ovarian cancer using genomic capture targeting multiple candidate genes. *Eur J Hum Genet.* 2014;22(11):1305–1313.
22. Aloraifi F, McDevitt T, Martiniano R, et al. Detection of novel germline mutations for breast cancer in non-BRCA1/2 families. *FEBS J.* 2015;282(17):3424–3437.
23. Churpek JE, Walsh T, Zheng Y, et al. Inherited predisposition to breast cancer among African American women. *Breast Cancer Res Treat.* 2015;149(1):31–39.
24. Lin PH, Kuo WH, Huang AC, et al. Multiple gene sequencing for risk assessment in patients with early-onset or familial breast cancer. *Oncotarget.* 2016;7(7):8310–8320.
25. Bertucci F, Finetti P, Guille A, et al. Comparative genomic analysis of primary tumors and metastases in breast cancer. *Oncotarget.* 2016; doi: 10.18632/oncotarget.8349. [Epub ahead of print].
26. Bekhouche I, Finetti P, Adelaide J, et al. High-resolution comparative genomic hybridization of inflammatory breast cancer and identification of candidate genes. *PLoS One.* 2011;6(2):e16950.
27. Andre F, Job B, Dessen P, et al. Molecular characterization of breast cancer with high-resolution oligonucleotide comparative genomic hybridization array. *Clin Cancer Res.* 2009;15(2):441–451.
28. Orsetti B, Nugoli M, Cervera N, et al. Genetic profiling of chromosome 1 in breast cancer: mapping of regions of gains and losses and identification of candidate genes on 1q. *Br J Cancer.* 2006;95(10):1439–1447.
29. Navin N, Krasnitz A, Rodgers L, et al. Inferring tumor progression from genomic heterogeneity. *Genome Res.* 2010;20(1):68–80.
30. Vollebergh MA, Klijn C, Schouten PC, et al. Lack of Genomic Heterogeneity at High-Resolution aCGH between Primary Breast Cancers and Their Paired Lymph Node Metastases. *PLoS One.* 2014; 9(8):e103177.



RNDr. Miroslav Tomka, PhD.
MEDIREX GROUP ACADEMY, n.o.
 Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava
 miroslav.tomka@medirex.sk

An image-based automated analysis of urine sediment

Mgr. Katarína Uhlárová, RNDr. Iveta Gáboríková

Medirex, a. s., Bratislava

Laboratories of Medirex Company employ automated analysers for urine determination realized via on-line combination of image-based automated urine sediment analyser (Iris iQ200) and dip-stick chemistry analyser (Aution Max AX-4030). This article discusses sample assessment with respect to everyday routine, maintenance of the analyser, precision study of Iris iQ200, and interpretation of possible interferences. Sample assessment includes general sediment assessment, reviewing of flagged samples with respect to results from chemical analysis. Due to the use of Auto-Particle Recognition software, several discrepancies or misclassifications can occur as a consequence of disintegration, morphological changes of cells, etc. However, work station enables the manual reviewing of the images before the results are sent to a laboratory information system. Not only to prevent discrepancies, but also to provide accurate and precise results, manual reviewing by trained laboratory technicians is performed considering urine sediment and chemical properties when available.

Key words: urine sediment, automated urinalysis, manual microscopy, Iris iQ200 interference

Automatizovaná analýza močového sedimentu

Vyšetrenie močového sedimentu patrí medzi základné laboratórne vyšetrenia. Spracovanie veľkého množstva prijatých vzoriek moču v priebehu jedného dňa si preto vyžaduje automatizovanú analýzu. Z toho dôvodu sú v laboratóriách spoločnosti Medirex, a. s. používané automatizované analyzátory močového sedimentu, pracujúce na princípe digitalizácie obrazu (snímaného mikroskopom a digitalizovaného kamerou s vysokým rozlíšením). Vyhodnotenie snímok získaných analýzou 3 mL vzorky je riadené softvérom, ktorý objekty na snímkach zatriedí na základe veľkosti, tvaru, kontrastu a štruktúry do príslušných kategórií, ako sú červené a biele krvinky, epitelové bunky, baktérie a podobne. Vzhľadom na autonómny vyhodnocovací softvér môže pri identifikácii a zatriedení dôjsť k nezhode. Riešením je ďalšie posúdenie výsledkov školeným pracovníkom, špeciálne pri pozitívnych močových sedimentoch, ako aj pri chýbajúcej chemickej analýze močov. Výsledky chemickej analýzy moču diagnostickými prúžkami sú hodnotnou komplementárnou informáciou v záujme objektívneho posúdenia močového sedimentu, najmä pri revízii nejednoznačných nálezov. Avšak chemická analýza diagnostickými prúžkami v dôsledku obmedzenej špecificity testov môže poskytovať výsledky ovplyvnené interferenciami, ako napríklad kyseliny askorbovej s dôkazom na prítomnosť hemoglobínu z červených krviniek. Z vyššie uvedených dôvodov automatizovaná analýza umožňuje dosahovať presné a správne výsledky potrebné na diagnostikovanie stavu pacienta aj v prípade základného vyšetrenia moču.

Kľúčové slová: močový sediment, automatizovaná analýza moču, manuálna mikroskopia, interferencie Iris iQ200

NewsLab, 2016; roč. 7(2): 106–108

Introduction

Chemical testing of urine samples (reagent strip method), identification and counting of particles is performed routinely to identify and monitor diseases of the kidney and urinary tract (1). Manual microscopy is extremely time consuming and has poor precision owing to variations in sediment preparation and counting technique (2, 3, 4, 5). Furthermore, visual urine microscopy is notoriously subjective (6). Improvements in automated systems are needed to eliminate labor intensive manual microscopy (7) given the large number of samples in clinical laboratories. Systems currently available to automate manual microscopy are based either on flow cytometry (8) or image-based microscopy analysis (9). Laboratories of Medirex company use automated urine microscopy analyzers iQ200 (Iris Diagnostics, Chastworth, CA) (9).

iQ200 analyzer

The iQ200 analyzer uses flow-imaging microscopy provided by high-definition camera and strobe lamp that stops the fluid motion in order to

capture the images and detect particles. An Auto-Particle Recognition (APR) software works as trained neural network system for processing of images. APR software enables to sort particles according to size, shape, contrast and texture and thus to classify and quantify cells and formed particles in native uncentrifuged urine. Cells and particles can be sorted into categories and quantified as in table 1. Work station provides the viewing of the images when needed even though the sample has been already discarded.

Precision control is performed daily in the morning and calibration every 28 days. Before the testing of patients, iQ Focus, iQ Negative and iQ Positive (glutaraldehyde-preserved human red blood cells) control samples (Iris diagnostics) are run according to manufacturer's instructions. The iQ200 requires a minimum of 3 mL of urine for testing and quantifies particles per 2 μ L of sample.

Precision study

Wah et al. (10) have published the evaluation of the analytic performance of the iQ200 based on a comparison with results from manual microscopy.

For the study of iQ200 within-run imprecision, 166 urine samples were analyzed a total of 20 times during the same day for red blood cells (RBCs), white blood cells (WBCs) and squamous epithelial cells (ECs). Under such conditions, 10 % of the samples tested had cell counts outside the 95 % confidence interval of the regression lines. The correlation study revealed discrepancies due to misclassification, disintegration of cells, abnormal morphological features (ghost and dysmorphic RBCs) or trapping of cells in mucus strands.

Sample assessment

It is necessary to emphasize that the precision study by Wah et al. (10) was performed via analyzer set-up as a walk-away system. In order to achieve the highest diagnostic accuracy and to prevent incorrect automatic classification of cells and particles at the laboratories of the Medirex company, the walk-away capability of the iQ200 is implemented only for samples possessing negative sediment and chemical analysis. After each assessment, analyzer flags samples that need to be reviewed by trained laboratory technician in case of absent chemical analysis or positive results of selected specimen. Review flags are assigned according to cut off values that convert quantitative data provided by the iQ200 analyzer into semiquantitative ranges correlating the image-based microscopy with qualitative chemical analysis (table 1). Setting the accurate cut off values for a lab's specific population is essential so there wouldn't be marked way too many flags or missed clinically important findings.

General approach for image reviewing and cell counts editing often includes comparison of urine sediment and chemical analysis. Chemical analysis based on dry-reagent strip is performed via on-line connection of analyzer Aution Max AX-4030 (Arkray, Japan) to the iQ200. Chemical analysis provides relevant supplementary information for assessment of cells and particles especially when misclassification or disintegration of cells occurs.

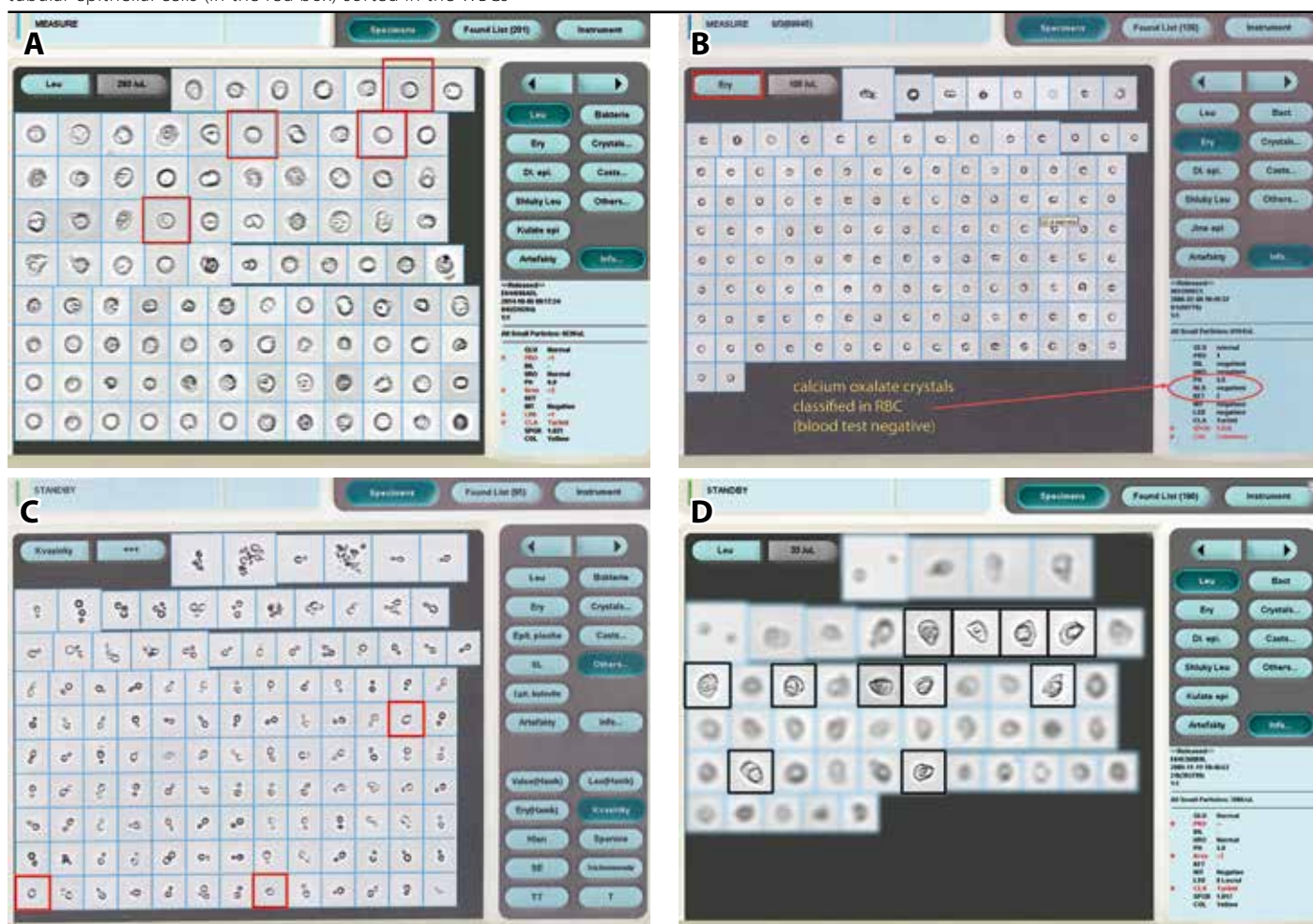
The most often misclassification of specimens occurs due to size and shape similarity as a consequence of morphological changes or high counts of particles. RBCs or/and WBCs are each other often misclassified when macroscopic hematuria or a pus is present (figure 1 A). Furthermore, oval calcium oxalate crystals (figure 1 B) or single-cell yeast (figure 1 C) can be added to RBCs. On the other hand, class of dysmorphic RBCs (especially acantocytes) can resemble to budding yeast, what subsequently requires the verification with manual microscopy. Renal tubular epithelial cells (figure 1 D) are rare findings that can be incorrectly sorted into WBCs clump. Often present mucus strands are prone to be classified as hyaline casts. On the contrary, APR software provides better identification of pathologic casts than manual counting. Translucent hyaline casts can be often missed by manual counting due to the use of bright-field microscopy. In order to prevent an overestimation of hyaline casts, manufacturer recommends verification of all casts by manual review of stored images. In general, the quality of stored images is sufficient for subclassification of casts with exception of cellular casts, in which the cellular detail is not always adequate for differentiation into cell specific subcategories. Small numbers of pathologic casts are often accompanied with higher protein excretion (more than 1+) what can refer to renal failure before it is manifested with increased serum creatinine level.

Table 1. Correlation of quantitative values obtained by iQ200 with qualitative values from chemistry analyzer. In case of absencing chemical test for particular category (marked as „none“) an indirect reference is listed in corresponding row (marked as „ref.“)

Category	Scale	
	Sediment analysis (particle count/ μ L)	Chemical analysis
RBCs	0 – 10	Negative
	11 – 25	Traces
	26 – 80	1+
	81 – 200	2+
	> 200	3+
WBCs	0 – 15	Negative
	16 – 70	Traces
	71 – 125	1+
	126 – 500	2+
	> 500	3+
WBCs clumps	Negative	None Ref. – positive WBCs
	Rare	
	Many	
Bacteria	Negative	Negative
	Rare	Positive
	Many	Strongly positive
Yeast	Negative	None
	Rare	
	Many	
Fungi	Negative	None
	Rare	
	Many	
Mucus	Negative	None
	Rare	
	Many	
Squamous epithelial cells	Negative	None
	Positive	
Transitional/Renal tubular epithelial cells	Negative	None
	Positive	Ref. – positive proteins
Hyaline casts	Negative	None
	Positive	
Cellular/Waxy casts	Negative	None
	Positive	Ref. – positive proteins
Crystals	None	None
	Present	Ref. – pH
Amorphous	Negative	None Ref. – pH
	Rare	
	Many	

Information about urine chemical properties such as pH, specific gravity, nitrites or ascorbic acid concentration can help in classification of the specimen when morphological features had changed. High count of bacteria (gram-negative bacteria are manifested as positive nitrites) often leads to increased pH of urine and thus to disintegration and abnormally shaped cells. Besides, low osmolality (low specific gravity) of urine can change morphology of RBCs subsequently sorted among WBCs. At the same time, chemical dry reagent strip is very prone to interference. Among all, ascorbic acid is the cause of the most important interferences in urine. It is able induce false negative result predominantly for RBCs (hemoglobin) and at higher concentrations for bilirubine, urobilinogen, bacteria (nitrites),

Figure 1. Morphological similarities of particles characterized in urine sediment: (A) misclassified RBCs (in a red box) among WBCs due to high counts of cells, (B) calcium oxalate crystals misclassified among RBC, (C) single cell yeast (in the red box) among budding yeast resembling to RBCs, (D) renal tubular epithelial cells (in the red box) sorted in the WBCs



WBCs (leukocyte esterase), etc. Furthermore, the very low specificity and sensitivity of dry-reagent strip for G-positive bacteria or lymphocytes connected to absent analysis of urine sediment can also provide false negative results. False positive sediment is another issue resulting from high counts of bacteria or squamous epithelial cells in improperly collected samples.

Conclusion

The number of urine samples received every day requires the use of automated analysis of urine sediment and chemistry. Such approach enables to achieve as objective, precise and accurate results as possible. Furthermore, trained technician can edit and review questionable findings when misclassification occurs. Taking into account such procedure, even fundamental laboratory examination of urine can help to diagnose the patient's condition fast and accurately.

References

- Cheung KA, Falk RJ, Coffman TM, et al. *Primer on Kidney Diseases*. 4th ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2005.
- Winkel P, Statland BE, Jorgensen K. Urine microscopy, an ill-defined method, examined by multifactorial technique. *Clin Chem*. 1974;20:436–439.
- Elin RJ, Hosseini JM, Kestner J, et al. Comparison of automated and manual methods for urinalysis. *Am J Clin Pathol*. 1986;86:731–737.
- Gadeholt H. Quantitative estimation of urinary sediment, with special regard to sources of error. *Br Med J*. 1964;1:1547–1549.
- Ferris JA. Comparison and standardization of the urine microscopic examination. *Lab Med*. 1983;14:659–662.
- Lusky K, Cap Today. *Paths to validating, using urine sediment analyzers* [online]. 2015. Available from: <<http://www.captodayonline.com/paths-validating-using-urine-sediment-analyzers/>>. Accessed May 25, 2016.
- European Confederation of Laboratory Medicine. European urinalysis guidelines: summary. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 2000;60:1–96.
- Manoni F, et al. Measurement of urine leukocytes by a second generation flow cytometer; application in the diagnosis of acute urinary tract infections in adult patients. *Riv Med Lab-JLM*. 2001;2:19–27.
- Deindorfer FH, Gangwer JR, Laird CW, et al. „The Yellow IRIS“ urinalysis workstation: the first commercial application of „automated intelligent microscopy.“ *Clin Chem*. 1985;31:1491–1499.
- Wah DT, Wises PK, Butch AW. Analytic performance of the iQ200 automated urine microscopy analyzer and comparison with manual counts using Fuchs-Rosenthal cell chambers. *Am J Clin Pathol*. 2005;123:290–296.



Mgr. Katarína Uhlárová

Medirex, a. s.

Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava

katarina.uhlarova@medirex.sk

Dlhodobá molekulová remisia ako predpoklad úspešného tehotenstva u pacientok s chronickou myelocytovou leukémiou

RNDr. Miroslava Eckertová, PhD.¹, MUDr. Lucia Setteyová^{2,3}, MUDr. Katarína Slezáková, PhD.²

¹Medirex, a. s., Bratislava

²Klinika hematológie a transfúziológie LF UK, SZU a UNB, Bratislava

³Oddelenie klinickej patofyziológie, Ústav patologickej fyziológie LF UK, Bratislava

Úvod: Liečba pacientok s chronickou myelocytovou leukémiou (CML) počas tehotenstva predstavuje aj v ére inhibítorov tyrozínkináz (TKI) dôležitú výzvu nielen z pohľadu klinického lekára hematológa, ale aj genetika, ktorý zabezpečuje laboratórne vyšetovanie týchto pacientok. Zavedenie TKI do klinickej praxe zlepšilo prognózu pacientov s CML natoľko, že sú schopní viesť plnohodnotný život a u pacientok s CML nie je zriedkavé ani plánovanie gravidity. Podľa aktuálnych klinických odporúčaní sa vzhľadom na ich možné teratogénne účinky odporúča plánované tehotenstvo, tzn. prerušenie liečby TKI ešte pred tehotenstvom.

Kazuistiky: Prinášame kazuistiky 2 pacientok s CML s rôznym intervalom trvania veľkej molekulovej odpovede (MMR) pred graviditou, u ktorých bola prerušená liečba s TKI.

Výsledky: Výsledky nami prezentovaných kazuistík poukazujú na významnosť stabilnej MMR pred pozastavením liečby s TKI pred plánovaným tehotenstvom.

Záver: Plánovanie tehotenstva u pacientok s CML je vhodné až po dosiahnutí veľkej molekulovej remisie a jej pretrvávania minimálne 2 roky. Počas tehotenstva sa odporúčajú pravidelné kontroly krvného obrazu s diferenciálnym rozpočtom leukocytov a nevyhnutné sú aj molekulárne vyšetrenia *BCR-ABL* génu.

Kľúčové slová: chronická myelocytová leukémia, inhibítory tyrozínkináz, molekulová odpoveď, tehotenstvo

Long-lasting molecular remission as a precondition for successful pregnancy in female patients with chronic myeloid leukemia

Introduction: In the era of tyrosine kinase inhibitors (TKI), treatment of patients with chronic myeloid leukemia (CML) during pregnancy represents an important clinical challenge not only from the perspective of a hematologist, but also from the perspective of a clinical geneticist who performs a laboratory analysis. The introduction of TKI into clinical practice ameliorated the prognosis of patients with CML to such an extent that they are able to conduct full-valued life, not excluding pregnancy in female patients with CML. According to current clinical recommendations, in view of potential teratogenic effects of TKI, planned pregnancy with discontinuation of treatment before pregnancy is recommended.

Cases: The following are examples of 2 female CML patients with a different duration of stable MMR before pregnancy, in which was TKI treatment interrupted.

Results: Reported cases point to importance of stable MMR before planned pregnancy with discontinuation of TKI treatment.

Conclusion: Pregnancy planning in female patients with CML is possible after the achievement of major molecular response and its persistence for at least 2 years. During pregnancy, regular measurement of the complete blood count with the leukocyte differential count is recommended, essential is periodic molecular detection of *BCR-ABL* gene.

Key words: chronic myeloid leukemia, tyrosine kinase inhibitors, molecular response, pregnancy

NewsLab, 2016; roč. 7(2): 109–112

Úvod

Chronická myelocytová leukémia (CML) je klonálne myeloproliferatívne ochorenie vychádzajúce z transformovanej kmeňovej pluripotentnej hematopoetickej bunky, pri ktorom dominuje proliferácia granulopoézy. Typickou pre túto diagnózu je recipročná translokácia dlhých ramien chromozómov 9 a 22, t(9;22)(q34;q11), pričom s danou cytogenetickou odchýlkou, tzv. chromozómom Philadelphia (Ph), je spojená prítomnosť

fúzneho génu *BCR-ABL* (1). Tento abnormálny fúzny gén produkuje onkoproteín BCR-ABL, ktorý predstavuje konštitutívne aktívnu tyrozínkinázu. Hlavnú skupinu liekov predstavujú inhibítory tyrozínovej kinázy (TKI), ktorých zavedenie do praxe znamenalo revolúciu v liečbe CML.

Imatinib bol prvým z inhibítorov tyrozínkináz, ktorý bol použitý na liečbu pacientov s CML už v roku 1998. Je považovaný za liek prvej línie u chorých s novodiagnostikovanou CML v chronickej fáze ochorenia (2, 3), predovšet-

kým u pacientov s nízkym rizikom podľa Sokala. Pre pacientov s rezistenciou alebo intoleranciou na imatinib boli vyvinuté tzv. inhibítory tyrozínkináz (dasatinib a nilotinib) druhej generácie. Keďže boli schopné navodiť rýchlejšie a dlhodobejšie liečebné odpovede v porovnaní s imatinibom, v súčasnosti sú dostupné aj ako lieky 1. línie pre pacientov s CML. Dasatinib je dostupný ako liečba 1. línie vo svete, na Slovensku len ako liečba 2. línie. Nilotinib je možné použiť ako liečbu 1. línie aj na Slovensku u pacientov so stredným a vysokým rizikom podľa Sokala a u pacientov v akcelerovanej fáze (4, 5). Podľa ELN odporúčaní je možné u novodiagnostikovaných pacientov v chronickej fáze začať liečbu imatinibom 400 mg alebo nilotinibom 600 mg, alebo dasatinibom 100 mg, bez ohľadu na rizikové skóre podľa Sokala.

V manažmente pacientov s CML sa použitím TKI dosahuje optimálna liečebná odpoveď (6). Väčšina pacientov je schopná pod ich vplyvom udržať ochorenie CML pod kontrolou, a tým zlepšiť kvalitu života. Najnovšie klinické štúdie založené na dlhodobých skúšaníach zameriavajú svoje ciele na možnosť ukončenia liečby s TKI u tých pacientov s CML, u ktorých sa dosahuje dlhodobá a zároveň hlboká molekulová odpoveď. Tento zámer je nesporne veľmi dôležitý v prípade CML pacientok, ktoré plánujú tehotenstvo. Napriek tomu, že CML je diagnostikovaná u pacientov vo vyššom veku (55 – 60 rokov), podľa registra GIMEMA je až 50 % pacientov s touto diagnózou v reprodukčnom veku. Hoci v súčasnosti používaná cielená terapia umožňuje pacientom viesť plnohodnotný život, podľa dostupných informácií sa odporúča počas užívania TKI vhodná metóda antikoncepcie. Teratogénne účinky TKI v skorom štádiu tehotenstva sa podpisujú na množstve fetálnych abnormalít. Bol opísaný ich vplyv na spontánne potraty a na skeletálne malformácie (predčasné uzavretie lebečných štrbín, kraniosynostóza, anomálie ramien, skolióza), renálne (zdvojená oblička, agenéza obličky), respiračné (hypoplázia pľúc) a gastrointestinálne (omfalokéla) abnormality (6, 7).

Zastavenie liečby s TKI u pacientov v chronickej fáze CML

Predpokladom zastavenia liečby s TKI je dosiahnutie optimálnej liečebnej odpovede u pacientov v chronickej fáze CML, ktorá je definovaná podľa odporúčaní European LeukemiaNet (3, 8). Hodnotenie odpovede na liečbu u pacientov s CML liečených TKI je monitorované v presne stanovených časových intervaloch (3, 6 a 12 mesiacov), pričom sa posudzuje odpoveď na úrovni cytogenetiky, fluorescenčnej *in situ* hybridizácie (FISH) a kvantitatívnej polymerázovej reťazovej reakcie v reálnom čase (qRT-PCR). Molekulová remisia sa vyšetruje v 3 – 6-mesačných intervaloch pri optimálnej odpovedi. Za optimálnu odpoveď sa posudzuje hladina transkriptov *BCR-ABL* $\leq 10\%$ a/alebo prítomnosť Ph+ $\leq 35\%$ po 3 mesiacoch od začatia liečby; $\leq 1\%$ a/alebo Ph+ = 0 po 6 mesiacoch; a $\leq 0,1\%$ po 12 mesiacoch liečby. Väčšina pacientov v chronickej fáze CML je schopná dosiahnuť dlhodobú cytogenetickú a molekulovú odpoveď, pričom hlavným cieľom liečby je dospieť k veľkej molekulovej odpovedi (MMR), ktorej dosiahnutie do 1 roka od začatia liečby sa považuje za významný prediktor hlbokaj molekulovej odpovede.

Stabilná MMR sa spája s dlhodobou absenciou progresie ochorenia do akcelerovanej a blastovej fázy (9, 10) a vedie k možnosti zastavenia liečby s TKI u časti pacientov. Francúzska klinická štúdia STIM (Stop Imatinib) ukázala, že imatinib môže byť vyradený z liečebného procesu u tých pacientov, ktorí dosahujú stabilnú kompletnú molekulovú remisiu (CMR)

(nedetekovanie transkriptu *BCR-ABL* metódou qRT-PCR) po období minimálne dvoch rokov. Vo vzorke 100 pacientov 61 % z nich zrelabovalo na molekulovej úrovni v priebehu 6 – 7 mesiacov. Hoci u väčšiny pacientov v relapse bola pozorovaná odpoveď na opakovanú liečbu, nie všetci z nich boli schopní spätne dosiahnuť CMR. Naďalej ostáva nejasný dopad prechodnej straty optimálnej odpovede, a preto sa v súčasnosti, s výnimkou klinických štúdií, neodporúča prerušenie liečby TKI (11).

Manažment tehotenstva u pacientok s CML

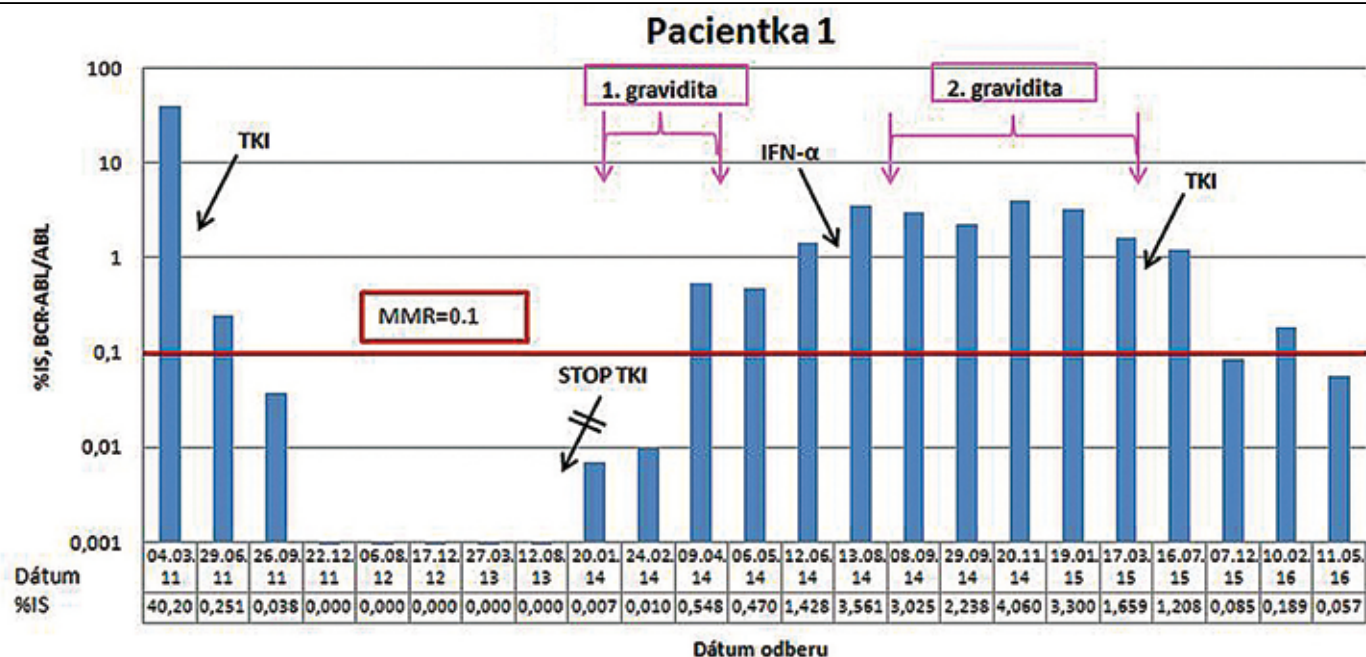
Odporúčania na liečbu pacientok s CML počas tehotenstva sú výzvou pre hematológov a gynekológov, keďže vzhľadom na vzácnosť tohto ochorenia v gravidite nie je dostatok informácií ani klinických štúdií. Doposiaľ sa preukázalo, že medián prežívania pacientov s neliečenou CML je približne 30 mesiacov, t. j. nástup progresie ochorenia nie je príliš rýchly (12). Na základe tejto skutočnosti je málo pravdepodobné, že sa rezistencia alebo progresia CML objaví v relatívne krátkom čase počas tehotenstva. Napriek tomu reziduálne CML bunky môžu spôsobiť progresiu ochorenia, a vtedy musia byť pacientky liečené aj v gravidite. Dostupnou liečebnou alternatívou v gravidite je interferón- α , ktorý síce prechádza placentárnou bariérou a môže zvýšiť riziko reprodukčných strát, no napriek tomu má len mierne nepriaznivé účinky na vývoj plodu (13).

Súbor pacientov a metódy

Keďže našim cieľom bolo poukázať na nutnosť dosiahnutia dlhotrvajúcej veľkej molekulovej remisie u pacientok s CML pri plánovaní gravidity ako predpokladu úspešného zvládnutia tehotenstva, prinášame 2 kazuistiky pacientok v reprodukčnom veku. MMR po období minimálne dvoch rokov sa považuje za indikátor úspešnej obnovy liečby TKI po pôrode, ktorý sa odzrkadľuje v opätovnom dosiahnutí MMR v krátkom časovom horizonte.

Vzorky periférnej krvi (PK) a kostnej drene (KD) na molekulové vyšetrenie boli odoberané do skúmaviek s EDTA a zároveň do TEMPUS skúmaviek, ktoré obsahujú stabilizačný roztok zamedzujúci degradáciu RNA. Do transportu a počas neho boli uchovávané pri teplote 4 – 10 °C.

Na stanovenie transkriptov fúzných génov *BCR-ABL* sa využíva metóda molekulovej analýzy, kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia v reálnom čase (qRT-PCR). DNA (cDNA) fúzných génov je použitím hydrolyzačných TaqMan sond špecificky amplifikovaná po predchádzajúcej reverznej transkripcii z izolovanej RNA. qRT-PCR umožňuje presnú kvantifikáciu PCR produktu v exponenciálnej fáze amplifikačného procesu detekciou vzrastu fluorescenčného signálu hydrolyzačnej sondy. Intenzita fluorescencie je priamo úmerná množstvu vznikajúceho produktu. Na presné určenie množstva produktu slúžia štandardy so známym počtom kópií cDNA. Pomocou nich je možné zostrojiť kalibračnú krivku a presne určiť množstvo sledovaných transkriptov v testovanej vzorke. Počet kópií cDNA sledovaného génu je normalizovaný k počtu kópií kontrolného génu (housekeeping gén), v našom prípade gén *ABL* (Abelson). Pomer počtu kópií fúzneho génu *BCR-ABL* k počtu kópií kontrolného génu *ABL* nám poskytne hodnotu NCN (normalizovaný počet kópií fúzneho génu). Molekulovú odpoveď stanovujeme v % podľa medzinárodnej stupnice IS (International Scale) vynásobením hodnoty NCN konverzným faktorom špecifickým pre každé laboratórium.

Graf 1. Molekulová odpoveď pod vplyvom liečby TKI – pacientka 1

Výsledky

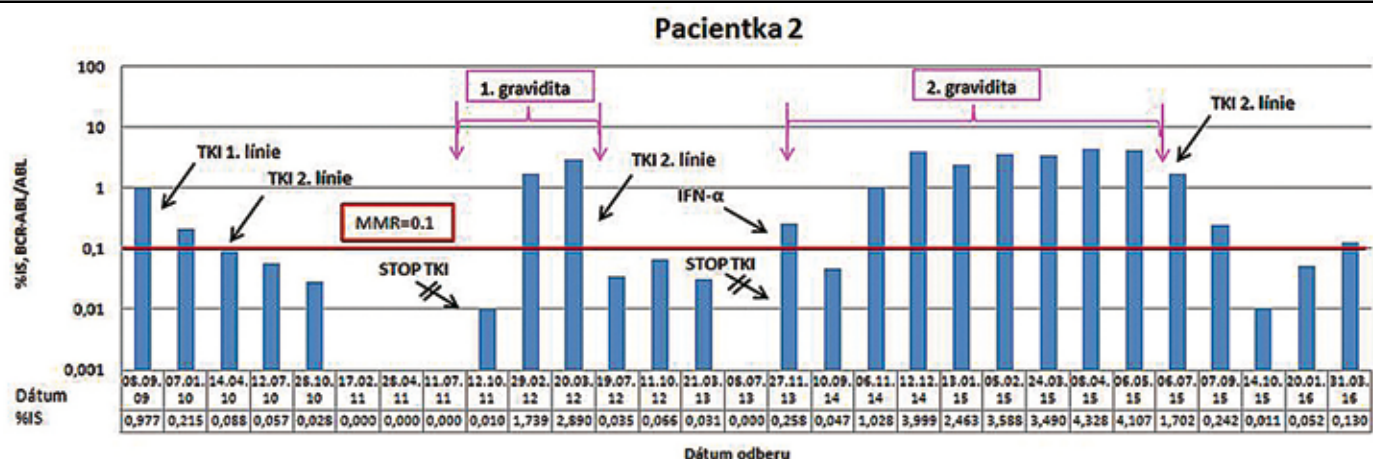
Kazuistika – pacientka 1

Pacientke narodennej v roku 1984 bola diagnostikovaná CML v chronickej fáze v roku 2011. Po stanovení diagnózy CML bola začatá liečba inhibitorom tyrozínkinázy 1. línie – imatinibom (Glivec®). Pacientka bola monitorovaná v trojmesačných intervaloch podľa odporúčaní ELN, pričom po 6 mesiacoch od začatia liečby dosiahla MMR ($BCR-ABL \leq 0,1\%$) a pri následnej kontrole sme už fúzny transkript $BCR-ABL$ na molekulovej úrovni nedetegovali. Po 32 mesiacoch liečby bolo prerušené užívanie TKI pre plánovanú graviditu. Pri ďalšej kontrole v 8. gestačnom týždni gravidity sme zaznamenali zvýšenú hladinu $BCR-ABL$ ako následok prerušenia liečby imatinibom. Gravidita sa vyvíjala bez problémov, až kým v 18. gestačnom týždni nedošlo k zmlknutému potratu. Keďže u pacientky došlo počas obdobia vysadenia liečby k strate molekulovej remisie ($BCR-ABL \geq 0,1\%$), bola u nej začatá liečba s inter-

ferónom- α . Pacientke sa podarilo v priebehu pár mesiacov znovu otehotnieť, priebeh gravidity bol bez komplikácií a aj napriek liečbe interferónom- α došlo k strate cytogenetickej aj hematologickej remisie. V 39. gestačnom týždni sa pacientke narodilo zdravé dieťa a ihneď po pôrode bola znovu začatá liečba imatinibom, čo viedlo opäť k dosiahnutiu MMR (graf 1).

Kazuistika – pacientka 2

Pacientka narodená v roku 1982 mala v roku 2008 diagnostikovanú chronickú fázu CML a následne sa u nej začala liečba imatinibom. Po krátkom čase sa u nej prejavila rezistencia na liečbu prvej línie, čo viedlo k prechodu na TKI 2. generácie – dasatinib (Sprycel®). Liečba viedla najskôr k MMR a neskôr aj k nedetekovateľnosti $BCR-ABL$ na molekulovej úrovni. Po roku pacientka otehotnela a bola jej pozastavená liečba s TKI. Keďže tehotenstvo prebiehalo bez komplikácií, neužívala žiadnu liečbu. Po pôrode jej bol opäť nasadený dasatinib, na ktorý reagovala rýchlou

Graf 2. Molekulová odpoveď pod vplyvom liečby TKI – pacientka 2

obnovou MMR. O rok pacientka znovu otehotnela, dasatinib bol vysadený, začala sa liečba s interferónom- α . Po úspešnom priebehu gravidity, avšak so stratou molekulovej, cytogenetickej aj hematologickej remisie sa pacientke narodilo druhé zdravé dieťa. Po pôrode bol nasadený dasatinib, a hoci došlo v krátkom čase k obnove MMR, u pacientky nastúpil po 3 mesiacoch molekulový relaps ochorenia (graf 2).

Diskusia

Aktívnou oblasťou súčasných výskumov ostáva zodpovedať otázku možnosti pozastavenia liečby TKI pacientov s CML, u ktorých pretrvávajú veľká, prípadne až kompletná molekulová remisia (MR4,5 a MR5, t. j. pri MR4,5 hladina transkriptov *BCR-ABL* $\leq 0,0032\%$ a pri MR5 hladina transkriptov *BCR-ABL* $\leq 0,001\%$) aspoň 2 roky. Riešenie tohto problému je zvlášť dôležité u pacientok s CML, ktorých túžbou je mať zdravé dieťa.

Z našich doterajších pozorovaní je zrejmé, že stabilná MMR (> 2 roky) nie je vždy zárukou bezpečného zastavenia liečby s TKI. U oboch pacientok došlo v pomerne krátkom čase k strate molekulovej a následne i cytogenetickej a hematologickej odpovede, ktorú sa nepodarilo obnoviť ani užívaním interferónu- α . Po opätovnom nasadení TKI u pacientky 1 a 2 došlo v krátkom čase k obnove MMR, avšak u pacientky 2 nastala jej strata. Tento výsledok môže súvisieť s tým, že interval trvania MMR pred graviditou bol menej ako 2 roky, ale aj s tým, že pozastavenie liečby s TKI bolo príliš dlhé. Podľa dostupných klinických pozorovaní totiž nie je v súčasnosti možné jednoznačne povedať, aká je únosná dĺžka prerušenia liečby s TKI bez toho, aby u pacientov došlo k progresii ochorenia.

Záver

Manažment liečby CML počas tehotenstva je stredobodom záujmu viacerých pracovných vedeckých skupín a je veľkou výzvou nielen pre hematológov a gynekológov, ale aj pre samotnú pacientku, keďže v súčasnosti nie je dostatok informácií o vplyve pozastavenia liečby s TKI počas gravidity na udržanie dostatočne hlbkej molekulovej remisie. Molekulové sledovanie tehotných pacientok s CML, poskytujúce údaje o hladine transkriptov fúzných génov *BCR-ABL* by malo byť samozrejmosťou v častejších intervaloch než 3 mesiace (napríklad 1-krát/mesiac).

Literatúra

1. Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973;243:290–293.
2. Druker BJ, Sawyers CL, Capdeville R, et al. Chronic myelogenous leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2001;87–112.
3. Baccarani M, Cortes J, Pane F, et al. European LeukemiaNet. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendation of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol*. 2009;27(35):6041–6051.
4. Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, et al. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2010;362:2260–2270.
5. Saglio G, Kim DW, Issaragrisil S, et al. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2010;362:2251–2259.
6. Pye SM, Cortes J, Ault P, et al. The effects of imatinib on pregnancy outcome. *Blood*. 2008;111:5505–5508.
7. Apperley J. CML in pregnancy and childhood. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2009;22:455–474.
8. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2013;122:872–884.
9. Cortes J, Talpaz M, O'Brien S, et al. Molecular responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase treated with imatinib mesylate. *Clin Cancer Res*. 2005;11:3425–3432.
10. Palandri F, Lacobucci I, Soverini S, et al. Treatment of Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia with imatinib: importance of a stable molecular response. *Clin Cancer Res*. 2009;15:1059–1063.
11. Mahon FX, Rea D, Guilhot J, et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol*. 2010;11:1029–1035.
12. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, et al. The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1999;341(3):164–172.
13. Koh LP, Kanagalingam D. Pregnancies in patient with chronic myeloid leukemia in the era of imatinib. *Int J Hematol*. 2006;84:459–462.



RNDr. Miroslava Eckertová, PhD.

Medirex, a. s.
Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava
miroslava.eckertova@medirex.sk

Cytogenetic and molecular changes in myelodysplastic syndromes

Mgr. Jakub Petřík, Mgr. Alena Žákovičová, Mgr. Kristína Juríková, RNDr. Renata Lukačková

Medirex, a. s., Bratislava

Myelodysplastic syndromes (MDS) consist of hematologic diseases which differ in clinical features and also in cytogenetic presentation. They are characterized with abnormal development of at least one bone marrow cell line. Around 50 % patients display chromosome aberrations which have diagnostic and prognostic value. Chromosome abnormalities can be detected with different methods. We compared two of them, fluorescent in situ hybridization (FISH) and multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). Despite the detection limit of MLPA, we found out that these methods can be used in routine diagnostics of MDS and the best way is their combination.

Key words: MDS, FISH, MLPA, chromosome aberrations

Cytogenetické a molekulárne zmeny pri myelodysplastickom syndróme

Myelodysplastický syndróm (MDS) je heterogénna skupina chorôb, ktorá sa líši v klinických prejavoch, ako aj v prítomnosti cytogenetických abnormalít. Pre MDS je typický abnormálny vývoj jednej alebo viacerých bunkových línii kostnej drene. Približne 50 % pacientov má prítomné chromozómové aberácie, ktoré majú prognostický a diagnostický význam. Tieto aberácie je možné vyšetriť rôznymi metódami, my sme porovnali 2 z nich, a to interfáznu fluorescenčnú *in situ* hybridizáciu (FISH) a multiplexnú od ligácie závislú amplifikáciu prôb (MLPA). Aj napriek určitým limitáciám MLPA analýzy môžeme povedať, že obe tieto metódy sú vhodné na rutinnú diagnostiku a pri ich vhodnej kombinácii vieme získať najlepšie výsledky.

Kľúčové slová: MDS, FISH, MLPA, chromozómové aberácie

NewsLab, 2016; roč. 7(2): 113–116

Introduction

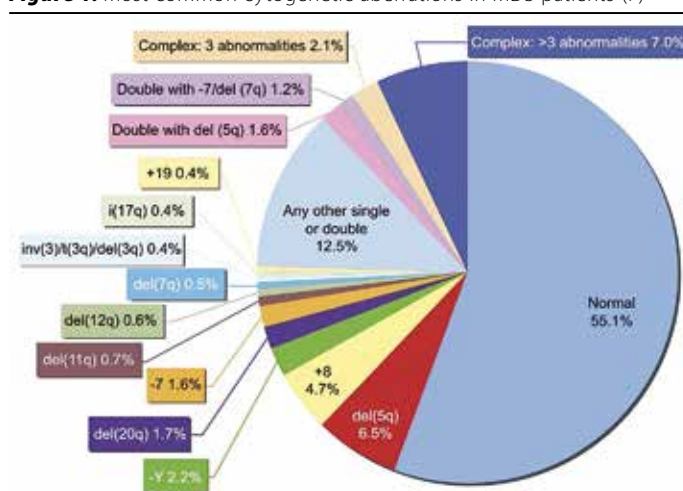
Myelodysplastic syndromes (MDS) are hematologic diseases with heterogeneous clinical manifestation. MDS is characterized by abnormal development of one or more bone marrow cell lines, resulting in one or more peripheral blood cytopenias. Patients with MDS have risk of progression to acute myeloid leukemia (AML) (1). The clinical outcome is diverse due to the complexity of genetic changes which include copy number changes (deletions, amplifications), mutations of individual genes, as well as epigenetic mutations which alter gene expression levels (2). Chromosome changes include numerical and structural aberrations, such as monosomies, trisomies, inversions or translocations, while unbalanced aberrations are more prevalent.

About 50 % of patients carry clonal chromosome abnormalities. The most common are del(5q), del(7q)/-7, +8, del(11q), del(12p), del(17p), del(20q), and loss of Y chromosome (3). Some copy number changes (CNVs) have prognostic and diagnostic value (table 1). Therefore, the karyotype analysis plays crucial role in diagnostics and represents a powerful tool for establishing independent prognostic factors. Findings of cytogenetic aberrations are important part of prognostic scoring systems, e.g. International Prognostic Scoring System (4) and its revised form (5), introduced in 2012. These scoring

Table 1. MDS cytogenetic scoring system (5)

Cytogenetic prognostic subgroup	Cytogenetic abnormalities
Very good	-Y, del(11q)
Good	normal; del(5q); del(12p); del(20q); double including del(5q)
Intermediate	del(7q); +8; +19; i(17q); any other single or double abnormalities
Poor	-7; inv(3)/t(3q)/del(3q); double including -7/del(7q); complex: 3 abnormalities
Very poor	complex karyotype: > 3 abnormalities

Figure 1. Most common cytogenetic aberrations in MDS patients (7)



systems identify abnormalities in karyotype and some clinical features which differentiate patients with MDS into prognostic subgroups.

Chromosome abnormalities can be detected by various methods, e.g. metaphase karyotyping, fluorescent *in situ* hybridization (FISH) in interphase cells or molecular analyses, such as multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), array-based comparative genomic hybridization (aCGH) or whole genome sequencing (WGS). Conventional karyotyping is limited and many chromosomal aberrations cannot be detected as it is dependent on dividing cells, and it has low resolution and sensitivity. The disadvantages of FISH probes are their price and their resolution which is relatively low (in kilobases) but better than karyotyping. On the other hand, MLPA is simple, multiplex, cost-effective, PCR based, and relatively easy method and it can detect up to 50 different genomic DNA sequences (6). As the sequences detected by MLPA are only 50 – 70 nucleotides long, this method is powerful in detection of deletions or amplifications of single exons (8). In comparison to FISH, MLPA is multiplex and can detect single gene aberrations which are too small to be discovered by FISH or karyotyping. When comparing MLPA to whole genome methods, such as aCGH or WGS, MLPA is a low cost and technically simple method. Although, it cannot be used for genome-wide screening, it is a good alternative to such techniques.

Nowadays, molecular pathogenesis and the development of MDS, as well as progression to AML is still unclear (9). Many chromosomal aberrations are known, but about 50 % patients have normal karyotype. Most of the genes involved in MDS remain undiscovered. Therefore, single-gene aberration studies are currently under investigation. Research shows that around 70 % of MDS patients carry mutations, but most of them are rare (10, 11). Approximately 40 genes seem to be mutated in most patients, e.g. *ABCA12*, *ASXL1*, *BCOR*, *CBL*, *CEBPA*, *CUX1*, *DNMT3A*, *EP300*, *ETV6*, *EZH2*, *FAM5C*, *FLT3*, *GNAS*, *HNRNP*, *IDH1*, *IDH2*, *JAK2*, *KIT*, *KRAS*, *MLL*, *MLL2*, *MLL3*, *MLL5*, *NF1*, *NPM1*, *NRAS*, *NSD1*, *PHF6*, *PTPN11*, *RAD21*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SMC1A1*, *SMC3*, *SRSF2*, *STAG2*, *TET1*, *TET2*, *TP53*, *U2AF1*, *WT1*, *ZRSR2*. They include epigenetic modifiers, transcription factors, spliceosome proteins, cohesins or signaling molecules. Most of them are of ambivalent significance, but some are associated with more advanced disease or progression to AML (e.g. *FLT3*, *IDH1*, *IDH2*, *KIT*), others with reduced overall survival (e.g. *ASXL1*, *ETV6*, *EZH2*, *RUNX1*, *TP53*) (12). Other studies (13, 14) revealed mutations in genes involved in DNA methylation or histone modifications – *TET2*, *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2*, *EZH2*, *DNMT3A*. Specific effects of these mutations are unclear, but it is very likely that they are linked with epigenetic deregulation, as this kind of dysregulation is common in MDS (15).

Aim of the study

The aim of this study was to evaluate patients with suspected MDS and compare two different methods (FISH, MLPA) and their ability to detect positive samples.

Materials and methods

Samples

Samples were processed at the Department of Clinical Genetics, Medirex, a. s., Bratislava. They were collected between April 2015 and May 2016. DNA for MLPA reaction was extracted from peripheral blood or bone

marrow samples collected in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) by Magnesia Genomic DNA Whole Blood Kit (Anatolia Geneworks, Istanbul, Turkey) according to the manufacturer's instructions and quantified with an Implen Nanophotometer (Implen GmbH, Munchen, Germany). Totally 241 DNA samples were collected from patients suspected with *de novo* MDS. Blood samples from healthy persons were used as a reference samples. The interphase FISH analysis was performed on the same group of patients, samples collected into lithium heparin tubes. There were totally 173 samples which were suitable for FISH analysis.

MLPA

The P414_MDS probemix and SALSA reagents (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) were used for MLPA reaction according to the manufacturer's instructions. The probemix contains 45 probes targeted to the specific chromosomal regions related to MDS and 1 probe designed for specific point mutation V617F of the *JAK2* gene and 12 internal reference probes that are intact in MDS. Amplified probes were separated by ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA).

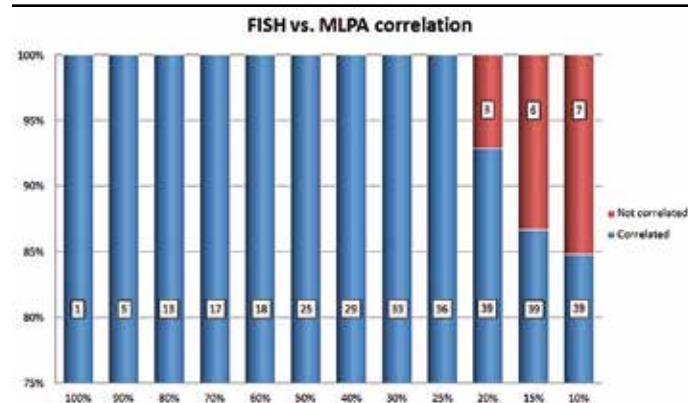
FISH

Samples collected in lithium heparin were analyzed with Metasystems probes (MetaSystems GmbH, Altlußheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. Our MDS FISH panel included probes XL del(5q) 5p15 sg/5q31 so, XL 7q22 so/7q36 sg, XL P53, XCE Chr. 8 Blue and XL 20q12/20qter. Fluorescent signals were visualized under fluorescent microscope Olympus BX51 (Olympus, Tokyo, Japan), while at least 200 interphase nuclei were analyzed. The cut-off values were set at 5 %.

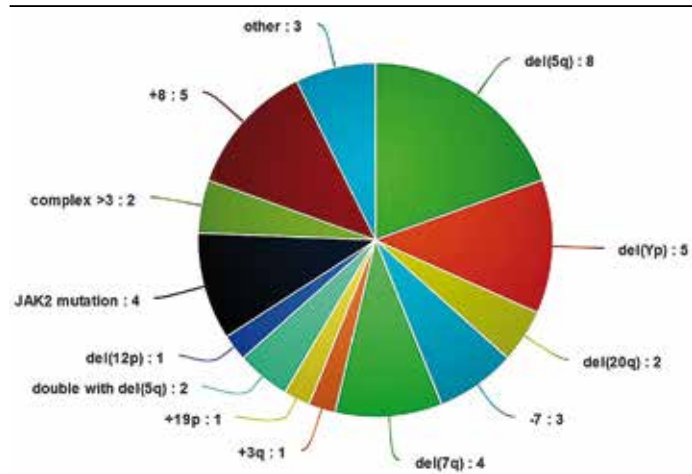
Results

Data from ABI 3500 Genetic Analyzer were analyzed with specialized software Coffalyser.net (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands). Then the results obtained from MLPA analysis were compared to the results from FISH analysis. Results from MLPA analysis showed 34 (14.11 %) positive patients, 206 negative patients (85.48 %) and only 1 uninformative

Figure 2. Correlation between FISH and MLPA results



Notes: On Y axis, there is a percentage of the correlation. There is the cut-off for FISH positivity on X axis. The numbers in columns represent the number of correlated positive aberrations (in blue columns) and non-correlated (in red columns), respectively. The number of aberrations does not correspond with the number of patients as some patients had more than 1 aberration.

Figure 3. The distribution of aberrations in our set of patients

sample (0.41 %). On the other hand, with FISH analysis 32 patients were evaluated as positive (13.28 %), 141 patients were negative (58.51 %) and 68 patients (28.22 %) were not evaluated with FISH as 4 patients (1.66 %) were uninformative, 6 failed the cultivation process and there was no suitable material available for 58 patients. The only sample uninformative in MLPA was also uninformative in FISH.

When compared, every sample negative in FISH was also negative in MLPA reaction (141/141). But there were 6 samples positive in FISH, but not in MLPA. Our observations suggest that the detection limit of MLPA reaction was around 20 – 25 % of positive cells (figure 2).

On the other hand, there were 8 patients found to be positive in MLPA, but they were not able to be evaluated by FISH due to the unavailable samples or uninformative results. In addition, there were aberrations found in MLPA which were not covered by our MDS FISH panel (+19p, del(Yp) and +3q), but they were confirmed by FISH lately. Amongst the positive samples which were not analyzed by FISH there were 4 samples positive for JAK2 V617F mutation, 1 sample with del(5q), 1 sample with del(Yp) and two samples with complex karyotype. Overall, we were able to detect several chromosome aberrations, e.g. del(5q), del(Yp), del(20q), -7, del(7q), +8, +3q, +19p, del(12p), JAK2 V617F point mutation or double aberrations with del(5q) and also 2 complex karyotypes with more than 3 chromosome aberrations (figure 3). After the exclusion of samples where FISH analysis was not performed the overall correlation between FISH and MLPA was 96.53 % (167/173).

Discussion

We compared 2 different methods which are routinely used in the diagnostics of MDS nowadays. The FISH analysis which was done on interphase nuclei and MLPA analysis which is a method based on the extracted DNA. When we compared the results, the correlation of these two methods was 96.53 %. But there were samples, which were not evaluated by FISH, because of the quality of the sample or the sample was not delivered to the laboratory in the correct medium. Amongst such samples, we were able to find 8 positive patients with MLPA analysis. In addition, MLPA was also able to find chromosome aberrations which

were not covered by our MDS FISH panel of probes. On the other hand, there were also samples positive on FISH but negative in MLPA. Such findings of false negativity are in concordance with other studies (16, 17), and the reason is that MLPA analysis is not able to detect low proportion of aberrant cells. We found out that our detection limit in MLPA is about 25 % aberrant cells in the sample.

Mutation analysis of specific genes except JAK2 V617F in P414_MDS MLPA in MDS patients is not routinely diagnosed nowadays. However, by using sensitive genotyping methods in the future, such as NGS, it will soon be possible to detect many single-gene mutations simultaneously. It will help clinicians with the diagnosis, prognosis, and monitoring of MDS patients. Lately, Bejar et al. (12) proposed a molecular testing for mutations in genes *ASXL1*, *ETV6*, *EZH2*, *RUNX1* and *TP53*, based on their study where they demonstrated their independent prognostic value. Recent studies show the growing number of single-gene mutations involved in MDS and their prognostic significance. For example, Bejar et al. (18) showed an association between mutations in some genes and specific clinical parameters and used them to calculate the risk score for the lower-risk MDS patients.

With the continuously decreasing prices of next generation sequencing, there is no doubt that NGS testing will be used in the near future together with current methods, such as morphology, flow cytometry and metaphase cytogenetics. The advantage of NGS is that it can detect many mutations at the same time. It is not limited only to point mutations, but can also discover insertions, deletions, balanced translocations and CNVs. In addition, NGS assays can be designed only for selected panel of genes, and by multiplexing many patients can be analyzed in one reaction, which also decreases the price of diagnostics.

Conclusion

We found out that our result from FISH and MLPA correlated in 96.53 %. Both methods have their advantages and limitations, but by combining them we were able to detect more aberrations and at the same time we were able to decrease the number of false negative results. MLPA offers time-effective analytical method with relatively easy data interpretation. The powerful combination of MLPA and FISH makes a useful tool for screening for multiple aberrations in MDS patients.

References

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, France: IARC Press; 2008.
2. Bejar R, Levine R, Ebert B. Unraveling the molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2011;29(5):504–515.
3. Haase D. Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol*. 2008;87(7):515–526.
4. Greenberg PL, Cox C, LeBeau MM, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997;89(6):2079–2088.
5. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *Blood*. 2012;120(12):2454–2465.
6. 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.
7. Nybakken GE, Bagg A. The genetic basis and expanding role of molecular analysis in the diagnosis, prognosis, and therapeutic design for myelodysplastic syndromes. *J Mol Diagn*. 2014;16:145–158.

8. Lukackova R, Bujalkova MG, Majerova L, et al. Molecular genetic methods in the diagnosis of myelodysplastic syndromes. *Biomed Pap Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2014;158(3):339–345.
9. Tormo M, Marugán I, Calabuig M. Myelodysplastic syndromes: an update on molecular pathology. *Clin Transl Oncol.* 2010;12:652–661.
10. Walter MJ, Shen D, Shao J, et al. Clonal diversity of recurrently mutated genes in myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* 2013;27(6):1275–1282.
11. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, et al. Chronic myeloid disorders working group of the international cancer genome consortium: clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2013;122:3616–3627.
12. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med.* 2011;364:2496–2506.
13. Kulasekararaj AG, Mohamedali AM, Mufti GJ. Recent advances in understanding the molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* 2013;162:587–605.
14. Shih AH, Abdel-Wahab O, Patel JP, et al. The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(9):599–612.
15. Issa JP. The myelodysplastic syndrome as a prototypical epigenetic disease. *Blood.* 2013;121(19):3811–3817.

16. Al Zaabi EA, Fernandez LA, Sadek IA, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification versus multiprobe fluorescence in situ hybridization to detect genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia: a tertiary center experience. *J Mol Diagn.* 2010;12(2):197–203.
17. Taylor CF, Charlton RS, Burn J, et al. Genomic deletions in MSH2 or MSH1 are a frequent cause of hereditary non-polyposis colorectal cancer: identification of novel and recurrent deletions by MLPA. *Hum Mutat.* 2003;22(6):428–433.
18. Bejar R, Stevenson KE, Caughey BA, et al. Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol.* 2012;30(27):3376–3382.



Mgr. Jakub Petřík

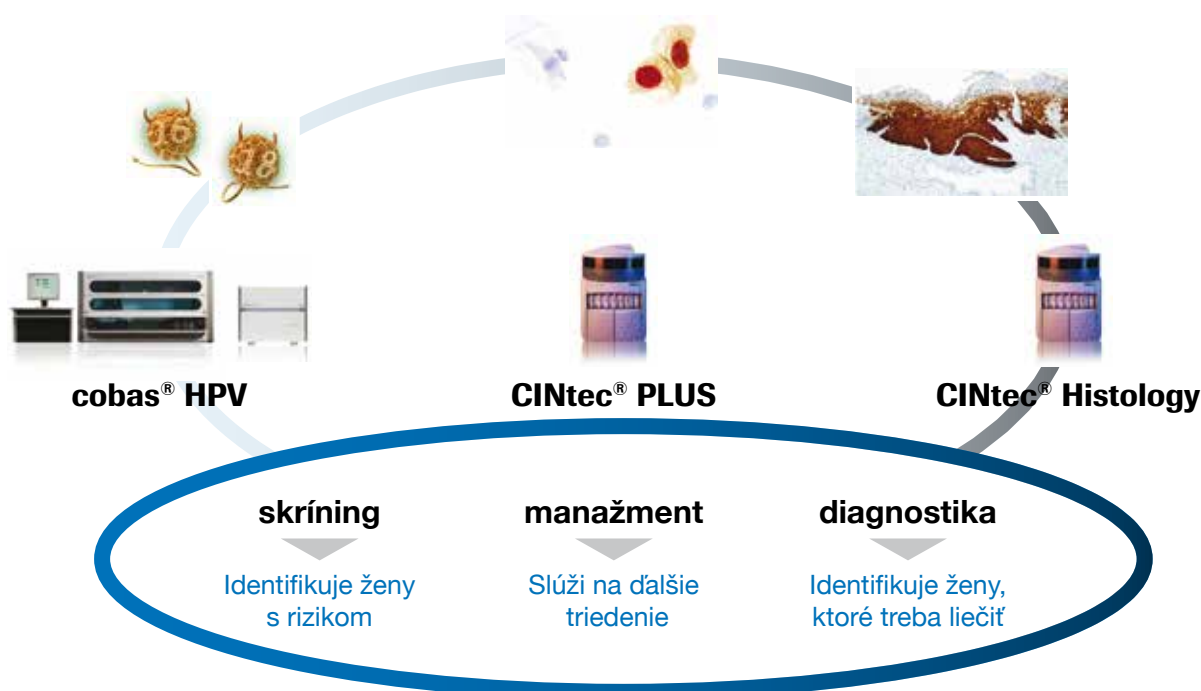
Medirex, a. s.

Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava

jakub.petrik@medirex.sk

Roche portfólio – karcinóm cervixu

Tri produkty, ktoré pomôžu odpovedať na Vaše klinické dotazy



„Roche riešenie na prevenciu karcinómu cervixu prináša bezprecedentné klinické vedomosti týkajúce sa CxCa – podporuje úsilie na ochranu pacientok s rakovinou pred zbytočnou liečbou a psychickým stresom.“

Aberácie chromozómu 11 u pacientky s akútnou myeloidnou leukémiou – kazuistika

RNDr. Andrea Blahová

Medirex, a. s., Bratislava

Úvod: Akútna myeloidná leukémia (AML) je fenotypovo a geneticky heterogénne klonálne ochorenie krvotvorných progenitorových buniek, pri ktorej dochádza k rýchlej a nekontrolovanej proliferácii patologickej bunkovej populácie. Bolo identifikovaných mnoho štruktúrových a numerických aberácií asociovaných s AML a mnohé z nich sú predikciou klinických znakov ochorenia a terapeutického výsledku. K častým nálezom patria prestavby *KMT2A* génu lokalizovaného na chromozóme 11 v oblasti q23.

Kazuistika: V prezentovanom prípade mladej pacientky s AML typu M2 sme v čase diagnózy cytogenetickou analýzou detegovali zriedkavú translokáciu t(11;17)(q23;q25).

Výsledky: Translokácia bola potvrdená aj metódou fluorescenčnej *in situ* hybridizácie (FISH), pomocou celochromozómových sond. Pacientka neskôr podstúpila nepríbuzenskú alogénnu transplantáciu, po dvoch rokoch nastal relaps a k primárnej aberácii pribudla sekundárna – delécia dlhého ramena druhého chromozómu 11.

Diskusia: Prognóza pacientov s prestavbou *KMT2* génu je rôzna, závisí od translokačného partnera. Translokácia t(11;17)(q23;q25) sa spája so zlou prognózou. V literatúre sú opísané rôzne sekundárne aberácie, avšak delécia druhého chromozómu 11, a teda neprítomnosť žiadneho funkčného *KMT2* génu opísaná nebola.

Záver: Cytogenetická analýza zohráva dôležitú úlohu v diagnostike hematologických malignít. V kombinácii s FISH analýzou a molekulovou metódou sa metódy navzájom dopĺňajú, umožňujú detegovať široké spektrum aberácií a majú dôležitú úlohu v stanovení prognózy, klasifikácii a manažmente pacienta.

Kľúčové slová: AML, *KMT2* gén, translokácia, cytogenetika, FISH, molekulová analýza

Aberrations of chromosome 11 in patient with acute myeloid leukemia – case report

Introduction: Acute leukemia is phenotypically and genetically heterogenous clonal disease of hematopoietic stem cells which is characterized by the rapid growth and uncontrolled proliferation of pathological cell population. Many recurrent structural and numerical abnormalities associated with AML have been identified and many of them are predictive of clinical features and therapeutic outcome. Recurrent genetic alterations are rearrangements of *KMT2A* gene that is localised at chromosome 11 band q23.

Case report: We report here a rare case of translocation t(11;17)(q23;q25) on cytogenetic level in young patient with AML type M2.

Results: The translocation was also confirmed by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) using whole chromosome painting probes. Patient underwent allogeneic stem cell transplantation, after two years relapsed and to primary aberration gained secondary one – deletion of long arms of the second chromosome 11.

Discussion: Prognosis for patient with aberration of *KMT2* gene varies and depends on a translocation partner. Translocation t(11;17)(q23;q25) is connected with a poor prognosis. Variety of secondary aberrations are described in literature but none deletion of second chromosome 11 (consequently no functional *KMT2* gene present).

Conclusion: Cytogenetic analysis plays important role in diagnostic of hematological malignancy. In combination with FISH and molecular methods complement each other and thus allow detection of wide spectrum of aberration. Cytogenetic analysis has still an important role in prediction of prognosis, classification and patient management.

Key words: AML, *KMT2A* gene, translocation, cytogenetics, FISH, molecular analyse

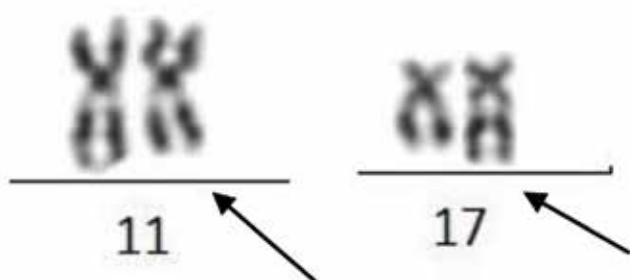
NewsLab, 2016; roč. 7(2): 117–120

Úvod

Akútne myeloidné leukémie (AML) predstavujú heterogénnu skupinu malígnych ochorení charakterizovaných nekontrolovanou proliferáciou a akumuláciou nezrelých hematopoetických buniek v kostnej dreni (KD) a následným vyplávaním do periférnej krvi (PK). Dochádza ku klonálnej expanzii myeloblastov, ktoré tvoria $\geq 20\%$ buniek v kostnej dreni alebo v periférnej krvi. AML predstavuje 2–4 % všetkých malígnych nádorov a incidencia ochorenia je 2–3 prípady na 100 000

obyvateľov/rok. AML sa vyskytuje sa vo všetkých vekových skupinách, avšak s vekom výskyt ochorenia stúpa a incidencia nad 65 rokov je 12–15 prípadov na 100 000 obyvateľov a je mierne vyššia u mužov ako u žien (1).

Dôležitými determinantmi AML sú cytogenetické zmeny. V čase diagnózy sa vyskytujú klonálne chromozómové aberácie približne u 50 až 60 % pacientov. Pacientov môžeme na základe klinických a genetických znakov rozdeliť do troch prognostických skupín (2):

Obrázok 1. Translokácia t(11;17)(q23;q25)

- **s priaznivou prognózou** – t(8;21), t(15;17), inv(16),
- **so strednou prognózou** – normálny karyotyp, t(9;11), del(11q), del(7q), del(9q), del(20q), +8,+11,+13,+21,
- **s nepriaznivou prognózou** – komplexný karyotyp, prestavby 11q23, inv(3)/t(3;3).

Častým cieľom prestavieb v hematologických malignitách je gén *KMT2A* (starší názov *MLL*) lokalizovaný na chromozóme 11 v oblasti 11q23. Je to protoonkogén s dĺžkou 89 kb, pozostávajúci z 36 exónov. Kóduje jadrový proteín s 430 kDa, ktorý má dôležitú úlohu v regulácii transkripcie *HOX* génov, ktoré participujú na kontrole embryonálneho vývoja a na diferenciácii hematopoetických buniek (3, 4).

Reciproké translokácie predstavujú najčastejšiu formu prestavby *KMT2A* génu u pacientov s AML. 11q23 lokus je vysoko promiskuitný a v súčasnosti je identifikovaných viac ako 70 rôznych fúzných partnerov, s ktorými sa vyskytuje v prestavbe. Fúzny gén vzniká fúziou 5'-konca *KMT2A* génu a 3'-konca partnerského génu. Výsledný fúzny proteín spôsobuje zmenu fyziologických vlastností MLL proteínu, čo má za následok leukemickú transformáciu prekursorových hematopoetických buniek (5). Prognóza translokácie závisí od fúzneho partnera, avšak pri väčšine prestavieb je nepriaznivá (4, 6).

Delécie dlhého ramena chromozómu 11 patria k zriedkavejším cytogenetickým zmenám (~ 1 %) a predstavujú intermediárnu prognózu. Dochádza k nim v rôznych oblastiach, ale všetkým pacientom chýba *KMT2A* gén.

K ďalším, zriedkavo detegovaným prestavbám *KMT2A* génu, patria nebalansované translokácie, adície, duplikácie, amplifikácie, inverzie a in-zercie (7).

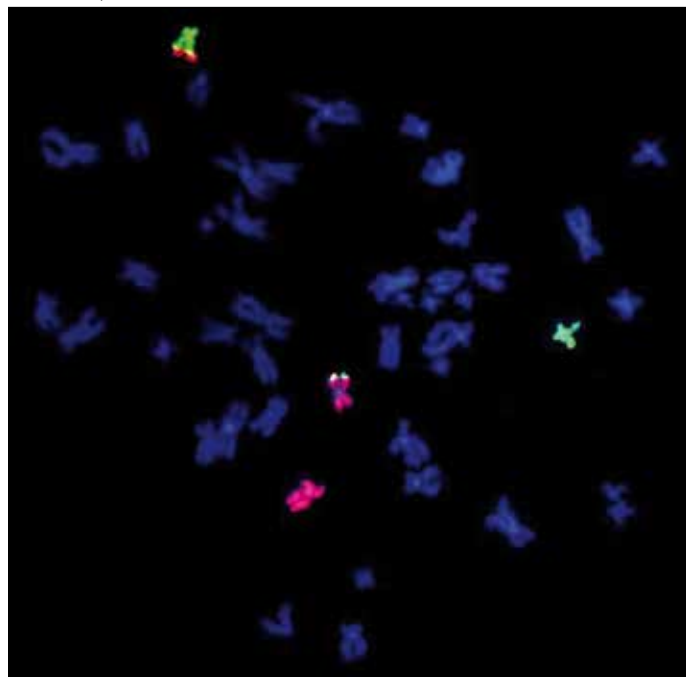
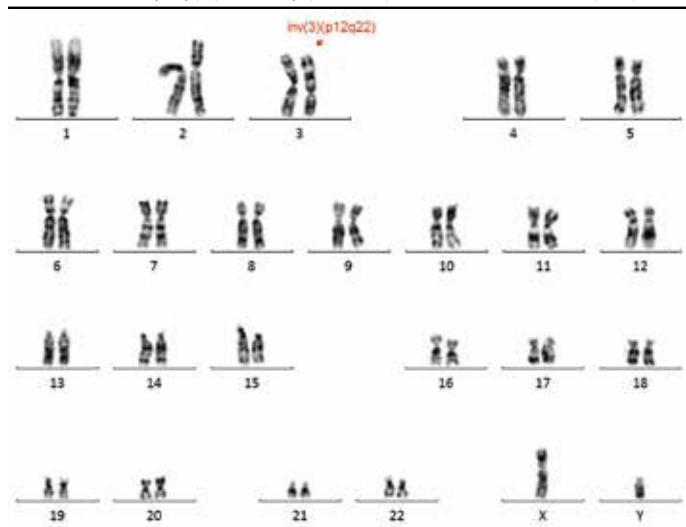
Kazuistika

Predstavujeme zaujímavý prípad mladej 34-ročnej pacientky, ktorej bola v júni 2014 stanovená diagnóza AML-M2 podľa FAB klasifikácie. V čase diagnózy mala pacientka v KD prítomných 85 % blastov a zo vzorky KD sme uskutočnili vstupné genetické vyšetrenie.

Výsledky

Cytogenetické a FISH vyšetrenie

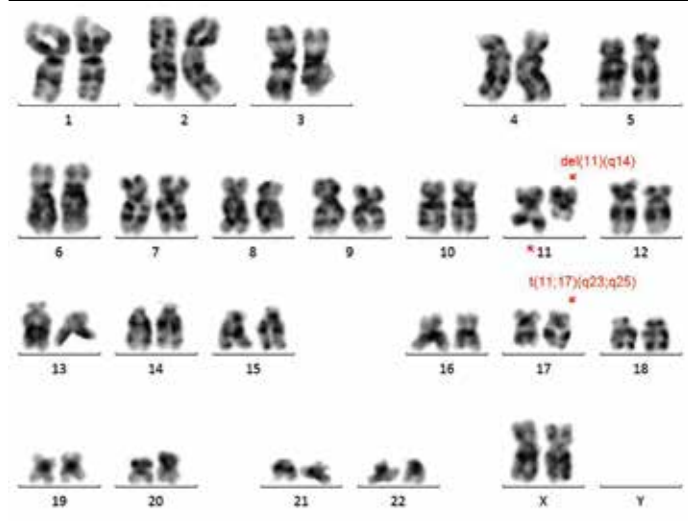
Cytogenetickou analýzou metafáz pripravených 24-hodinovou kultiváciou buniek KD sme odhalili drobnú translokáciu t(11;17)(q23;q25) (obrázok 1) a stanovili karyotyp 46,XX,t(11;17)(q23;q25). Translokáciu sme potvrdili aj

Obrázok 2. Potvrdenie translokácie FISH analýzou za použitia celochromozómových sond – 11 (zelená farba) a 17 (červená farba)**Obrázok 3.** Karyotyp pacientky po transplantácii //46,XY,inv(3)(p12q22)

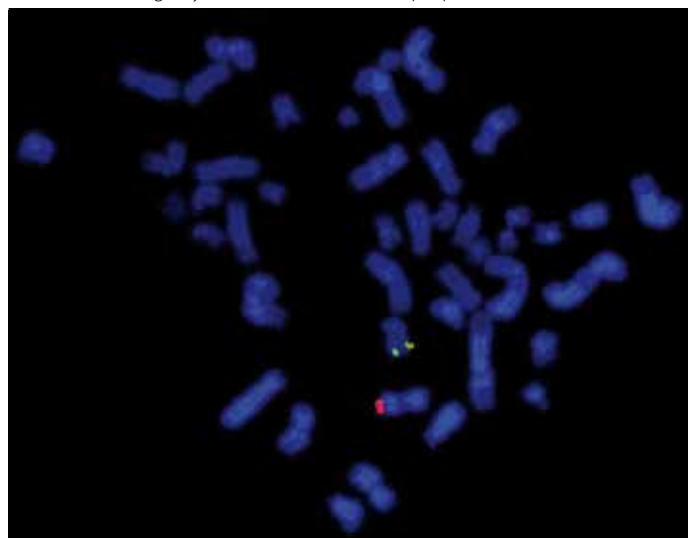
použitím celochromozómových sond 11a 17 (obrázok 2) a zároveň sme pomocou fluorescenčnej *in situ* hybridizácie (FISH) potvrdili aj prestavbu *KMT2A* génu v 88 % vyšetrených interfázových jadrách za použitia sondy XL MLL plus (Metasystems).

Tri mesiace po stanovení diagnózy (9/2014) a dosiahnutí remisie podstúpila pacientka nepríbuzenskú alogénnu transplantáciu krvotvorných buniek (TKB). Darcom bol muž, ktorý bol nositeľom fyziologickej pericentrickej inverzie chromozómu 3 (obrázok 3). Počas nasledujúceho roka chodila pacientka na pravidelné kontrolné vyšetrenia, ktoré boli negatívne. Až vyšetrenie z januára 2016 odhalilo relaps ochorenia a k primárnej cytogenetickej zmene – translokácii t(11;17)(q23;q25), pribudla sekundárna zmena – delécia dlhého ramena druhého chromozómu 11-del(11)(q14)

Obrázok 4. Karyotyp pacientky v čase relapsu ochorenia 46,XX,del(11)(q14),t(11;17)(q23;q25). (Okrem translokácie je prítomná aj delícia dlhého ramena druhého chromozómu 11.)



Obrázok 5. FISH analýza použitím dual color sondy XL MLL plus (Metasystems). (Je prítomný len jeden červený a jeden zelený signál v prestavbe. Ďalšie signály nie sú kvôli delícii 11q14 prítomné.)



Tabuľka 1. Zhrnutie výsledkov genetických vyšetrení

Dátum	Cytogenetické vyšetrenie	FISH vyšetrenie	Molekulová analýza
Jún 2014 Čas diagnózy	46,XX,t(11;17)(q23;q25)	88 % prestavba <i>MLL</i> génu	<i>WT1</i> pozitívny (NCN = 0,965) AML plex negatívny
Júl 2014	46,XX	2 % prestavba <i>MLL</i> génu	<i>WT1</i> negatívny
Október 2014 Po nepríbuzenskej TKB	//46,XY,inv(3)(p12q22)	<i>MLL</i> gén negatívny XY 100 %	<i>WT1</i> negatívny
September 2015	//46,XY,inv(3)(p12q22)	<i>MLL</i> gén negatívny XY 100 %	–
Január 2016 Relaps ochorenia	46,XX,del(11)(q14),t(11;17)(q23;q25) [7]//46,XY,inv(3)(p12q22)[13]	43 % prestavba <i>MLL</i> génu XX 33 % // 67 % XY	–
Marec 2016	//46,XY,inv(3)(p12q22)	23 % prestavba <i>MLL</i> génu	<i>WT1</i> pozitívny (NCN = 0,29)

(obrázok 4). Sondou XL MLL plus (Metasystems) sme potvrdili prítomnosť len jedného *KMT2A* génu v prestavbe, druhý signál v dôsledku delécie chýbal (obrázok 5). Posledné vyšetrenia sme uskutočnili v marci 2016, keď sme na cytogenetickej úrovni detegovali len metafázy donora, avšak na FISH úrovni bola ešte v 23 % prítomná prestavba *KMT2A* génu.

Molekulová analýza

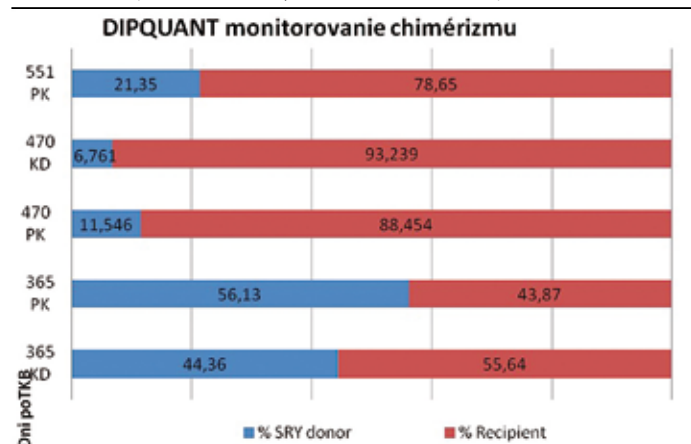
Na molekulovej úrovni sme v čase diagnózy uskutočnili multiplexovú analýzu PCR AMLplex (Mentype), ktorá umožňuje analýzu 11 základných fúzných transkriptov pri AML (*AML1-ETO*, *BCR-ABL*, *CALM-AF10*, *CBFB-MYH11*, *DEK-CAN*, *MLL-AF6*, *MLL-AF9*, *MLL-PTD*, *NPM1-MLF1*, *PML-RARA*) s 31 transkripčnými variantmi. Výsledok bol negatívny, nebola dokázaná žiadna zo spomenutých translokácií. V čase diagnózy a počas kontrol sa analyzoval aj *WT1* gén, ktorého nadexpresia bola pozorovaná u 90 % pacientov s AML. V leukocytoch kostnej drene zdravých jedincov sa hladina expresie *WT1* génu pohybuje rádovo 10^{-2} NCN (normalizovaný počet kópií). V čase diagnózy a počas relapsu sme vo vzorkách KD pacientky zaznamenali zvýšenú hladinu expresie *WT1* génu, ktorá koreluje s klinickým priebehom ochorenia (8). Výsledky všetkých vyšetrení sú zhrnuté v tabuľke 1.

Chimérizmus – monitorovanie stavu krvotvorby po transplantácii krvotvorných buniek

Pacientka podstúpila v septembri 2014 alogénnu nepríbuzenskú transplantáciu krvotvorných buniek a v súčasnosti je 611 dní po transplantácii. Chimérizmus bol na molekulovej úrovni v pravidelných intervaloch monitorovaný (Mentype). V 12/2014 bola potvrdená 100 % krvotvorba darcu (kompletný chimérizmus). Tá však bola postupne, ako je uvedené v grafe 1, vytlačaná hematopoézou pacientky (zmiešaný chimérizmus). Percentuálne zastúpenia krvotvorby darcu a recipienta – pacientky, v kostnej dreni (KD) a periférnej krvi (PK) sú z druhého roku po transplantácii.

Diskusia

Približne 10 % všetkých leukémií a 3 – 4 % všetkých AML prípadov má prestavbu *KMT2A* génu, ktorá sa častejšie vyskytuje u mladších pacientov s AML *de novo* ako u starších pacientov, čo sa potvrdilo aj u našej pacientky (3). Prognóza pacientov s translokáciou je rôzna, závisí od translokačného partnera. Dodnes bolo klonovaných a charakterizova-

Graf 1. Zastúpenie krvotvorby v KD a PK uvedené v percentách

ných na molekulovej úrovni viac ako 70 rôznych partnerských génov a nové sú stále objavované a opisované (9). K najčastejšie vyskytujúcim sa translokáciám patria t(11;19)(q23;p13), t(9;11)(22;q23) a t(10;11)(p12;q23). Translokácie s lokusom 11q23 patria do nepriaznivej prognostickej skupiny okrem t(9;11)(p22;q23), ktorá má signifikantne dlhšie prežívanie a spája sa so strednou prognózou. V našej práci opisujeme zriedkavú translokáciu t(11;17)(q23;q25) detegovanú na cytogenetickej úrovni v čase diagnózy. Translokácie sa zúčastňuje z chromozómu 11 gén *KMT2A* a z chromozómu 17 pravdepodobne gén *SEPT9*. Gén *SEPT9* je členom septínovej rodiny, ktorú tvorí 5 génov. Septíny sú GTP-viažuce proteíny a majú dôležitú úlohu v procesoch bunkového delenia a zachovania bunkovej integrity. Translokácia t(11;17)(q23;q25) bola okrem pacientov s AML opísaná aj u pacientov so sekundárnou AML, akútnou lymfoblastovou leukémiou (ALL) a veľmi zriedkavo u pacientov s myelodysplastickým syndrómom (MDS) a ako väčšina prestavieb s *KMT2A* je spojená so zlou prognózou (10). Chen et al. (11) vo svojej práci uvádzajú ako najčastejšie sa vyskytujúce sekundárne aberácie k prestavbe *KMT2A* génu deléciu chromozómov 5, 7, komplexný karyotyp a trizómiu chromozómu 8. Deléciu chromozómu 11, akú sme detegovali u našej pacientky, nezaznamenali. Strata funkcie oboch génov *KMT2A* súčasne je veľmi ojedinelý jav a zatiaľ nie sú žiadne literárne údaje o výskyte a prognóze.

Záver

Cytogenetická analýza je nenahraditeľnou súčasťou vyšetrovacích metód v diagnostike hematologických malignít. Umožňuje získať celkový karyotypový obraz pacienta a odhaliť aj rôzne štruktúrové a numerické

aberácie, ktoré sú inými metódami nedetegovateľné. Umožňuje ich sledovať v čase diagnózy, počas liečby alebo relapsu. S FISH analýzou a molekulovou metódou sa navzájom dopĺňajú, spolu umožňujú detegovať široké spektrum aberácií a majú dôležitú úlohu v stanovení prognózy, klasifikácii a manažmente pacienta. Prognóza našej pacientky je vzhľadom na danú translokáciu a neprítomnosť ani jedného „zdravého“ a neporušeného *KMT2A* génu veľmi nepriaznivá. Pacientka je v súčasnosti v zlom stave, rezistentná na chemoterapiu, vo floridnej fáze ochorenia.

Podakovanie: Ďakujem všetkým kolegom, ktorí sa podieľali na príprave a vyšetrovaní vzoriek pacientky na cytogenetickej, FISH a molekulovej úrovni počas uplynulých dvoch rokov.

Literatúra

1. Doubek M, Mayer J. Akútní myeloidní leukémie. In: Pospíšilová Š, Dvořáková D, Mayer J, et al. *Molekulární hematologie*. Praha, Czech Republic: Galén; 2013: 209–224.
2. Yohe S. Molecular Genetic Markers in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Med*. 2015;460–478.
3. Ilencikova D, Kolenova A. MLL Gene Alterations in Acute Myeloid Leukaemia (11q23/MLL+AML), *Oncogene and Cancer – From Bench to Clinic* [online]. Dr. Yahwardiah Siregar, ed. *InTech*. 2013. DOI: 10.5772/55141. Available from: <<http://www.intechopen.com/books/oncogene-and-cancer-from-bench-to-clinic/ml-l-gene-alterations-in-acute-myeloid-leukemia-11q23-ml-l-aml>>.
4. Launay E, Henry C, Meyer C, et al. MLL-SEPT5 fusion transcript in infant acute myeloid leukemia with t(11;22)(q23;q11). *Leukemia & Lymphoma*. 2014;55(3):662–667.
5. Mejstříková S, Dvořáková D. Akútní myeloidní leukémie s abnormalitami genu MLL. In: Pospíšilová Š, Dvořáková D, Mayer J, et al. *Molekulární hematologie*. Praha, Czech Republic: Galén; 2013: 220.
6. Saito H, Otsubo K, Kakimoto A, et al. Emergence of two unrelated clones in acute myeloid leukemia with MLL-SEPT9 fusion transcript. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010;201:111–115.
7. Zhao X, Li S, Li N, et al. 11q23 abnormalities in adult Chinese patients with hematological malignancies. *Med Oncol*. 2014;31:115.
8. Ilenciková D, Sýkora J, Mikulášková Z, et al. Identifikácia molekulárných markerov u detí s akútnou myeloblastovou leukémiou (AML). *Klin Onkol*. 2015;25(1):26–35.
9. Zhang Y, Chen A, Yan X-M, et al. Disordered epigenetic regulation in MLL-related leukemia. *Int J Hematol*. 2012;96(4):428–37.
10. Lee SG, Park TS, Seung HO, et al. De novo Acute Myeloid Leukemia Associated with t(11;17)(q23;q25) and MLL-SEPT9 Rearrangement in an Elderly Patient: A Case Study and Review of the Literature. *Acta Haematol*. 2011;126:195–198.
11. Chen Y, Kantarjian H, Pierce S, et al. Prognostic significance of 11q23 aberrations in adult acute myeloid leukemia and the role of allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2013;27:836–842.

**RNDr. Andrea Blahová**

Medirex, a. s.

Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava
andrea.blahova@medirex.sk

Invazívna aspergilóza u pacientov s pokročilou cirhózou pečene

MUDr. Kristína Giertlová¹, MUDr. Hedviga Mrázová¹, MUDr. Daša Mesárošová, PhD.²,
MUDr. Štefan Laššán, PhD.³, MUDr. Marta Hájková, CSc., MPH³, MUDr. Pavol Janega, PhD.¹

¹Ústav patologickej anatómie LF UK a UNB, Úrad pre dohľad nad zdravotnou starostlivosťou, Bratislava

²II. interná klinika LF UK a UNB, Bratislava

³Klinika pneumológie, ftizeológie a funkčnej diagnostiky SZU a UNB, Bratislava

Úvod: Invazívna aspergilóza (IA) patrí medzi najčastejšie invazívne mykotické infekcie a predstavuje vážny problém v skupine imuno-kompromitovaných pacientov. V posledných rokoch sa však zvyšuje počet hlásení infekcií aj u neneutropenických pacientov, a to hlavne v súvislosti s pľúcny alebo pečennými ochoreniami.

Metodika: Demonštrujeme dva prípady pacientov s cirhózou pečene v štádiu Child-Pough C, ktorí počas hospitalizácie vykazovali zvyšujúce sa zápalové parametre s neutrofilou. Zobrazovacie techniky odhalili v oblasti pľúc zápalové infiltráty s dutinovými léziami. Napriek široko-spektrálnej antibiotickej terapii došlo u oboch pacientov k postupujúcej kvantitatívnej poruche vedomia a následnému exitu. Vykonaná pitva pri oboch prípadoch odhalila abscedujúcu bronchopneumóniu s disemináciou do centrálnej nervovej sústavy a v jednom prípade rozsiahlu disemináciu aj do iných orgánov. Vzorky z patologicky zmenených tkanív boli vyšetrené mikroskopicky základným histologickým farbením hematoxylín-eozínom, špeciálnym farbením PAS (periodic-acid-Shiff) a impregnačnou striebriacou metodikou (metenaminovým striebrom). **Výsledok:** V histologickom obraze vyšetovaných vzoriek sa v cievnach a okolitom tkanive zobrazili vláknité septované štruktúry s vetvením pod ostrým uhlom. Dané štruktúry vykazovali PAS pozitivitu, farbili sa striebriacimi technikami a pri farbení hematoxylín-eozínom vykazovali výraznú bazofiliu, čím korelovali s morfológiou aspergilózy.

Záver: IA býva u pacientov s chorobami pečene často poddiagnostikovaná s vysokou následnou mortalitou, keďže nejde o typickú rizikóvu skupinu pacientov pre toto ochorenie. Postihnutí sú hlavne pacienti v pokročilom štádiu cirhózy alebo s akútnym pečenným zlyhaním. Klinické príznaky sú často nevýrazné a nešpecifické, kultivačné vyšetrenia poskytnú len limitované informácie. Zaradenie IA do diferenciálnej diagnostiky komplikácií pacientov s chronickými chorobami pečene môže dopomôcť k jej včasnejšej diagnóze a adekvátnej liečbe.

Kľúčové slová: invazívna aspergilóza, diseminovaná aspergilóza, oportúnna infekcia, aspergilóza centrálneho nervového systému, cirhóza pečene

Invasive aspergillosis in patients with advanced cirrhosis of the liver

Introduction: As the most common invasive mycotic infection, invasive aspergillosis (IA) represents a serious problem for immunocompromised patients. However, recently, there has been an increase in number of registered infections also in non-neutropenic patients. Within this group mainly the ones with pulmonary or liver disease are affected.

Methods: We illustrate two cases of patients with liver cirrhosis Child-Pough class C, who showed increase in inflammatory markers and neutrophilia. Imaging examination of lungs displayed inflammatory infiltrates with cavitations. Despite of broad-spectrum antibiotic therapy both patients showed progressing quantitative loss of consciousness resulting in exitus. Autopsy examination uncovered in both cases absceding bronchopneumonia with dissemination to central nervous system and in one case extensive dissemination also to other organs. Tissue samples from dissected organs were examined histologically using principal stain Hematoxylin and Eosin (H&E), special stain Periodic acid-Shiff (PAS) and silver impregnation staining techniques using methenamin silver.

Results: Histologic examination uncovered regularly septate tubular structures with dichotomous branching at acute levels. These structures showed PAS positivity, were visualized by silver impregnation techniques and in H&E staining showed marked basophily, which correlated with the diagnosis of aspergillosis.

Conclusion: Invasive aspergillosis is often underdiagnosed with high consequent mortality in patients with liver diseases, since they do not belong in the typical risk group of this infection. Within this group it mainly affects patients with advanced liver cirrhosis or acute liver failure. Clinical symptoms are often obscure and non-specific and microbial culture provides only limited information. We suggest that invasive aspergillosis should be considered in differential diagnosis of complications in patients with chronic liver diseases.

Key words: invasive aspergillosis, disseminated aspergillosis, opportunistic infection, aspergillosis of central nervous system, cirrhosis of the liver

Úvod

Aspergilóza je jedna z najčastejších invazívnych mykotických infekcií u pacientov a vykazuje celkovo stúpajúcu incidenciu (1, 2). Rizikovou skupinu tvoria hlavne imunokompromitovaní pacienti. Tí predstavujú vzhľadom na vzrastajúci počet transplantácií kostnej drene a iných orgánov, zavádzanie intenzifikovaných chemoterapeutických a imunosupresívnych režimov a HIV pandémie stále významnejšiu skupinu v populácii (3, 4). Invazívna aspergilóza sa vyskytuje hlavne u neutropenických pacientov, zvyšuje sa však aj počet hlásení u neneutropenických pacientov. Patria sem hlavne pacienti s pľúcnyimi chorobami, ale aj pacienti s chorobami pečene (3, 5, 6). Úmrtnosť na invazívnu aspergilózu dosahuje v priemere 46 – 63 % a je najvyššia u pacientov po transplantácii kostnej drene a u HIV pozitívnych pacientov (1, 3, 5).

Aspergilové konídie sa vzhľadom na ich častú prítomnosť v ovzduší dostávajú do tela predovšetkým inhaláciou. Následne dochádza u imunokompromitovaných pacientov pre oslabenú obrannú funkciu ich slizníc ku kolonizácii pľúc a rastu hýf. Rastúce hýfy, ktoré uniknú obranným mechanizmom hostiteľa, dokážu penetrovať cez endoteliálnu výstelku do cievneho riečiska, odkiaľ sa ich fragmenty krvnou cestou dostávajú do vzdialených orgánov. Angioinvázia vedie k trombotizácii a ischemizácii postihnutých orgánov, pričom rozpadajúce sa nekrotické tkanivo je vhodným prostredím na mykotický rast (7, 8).

Diseminovaná aspergilóza vrátane aspergilózy centrálnej nervovej sústavy (CNS) sa vyvinie u menej ako 10 % postihnutých pacientov. Úmrtnosť v tejto skupine je však veľmi vysoká a v prípade postihnutia CNS sa blíži k 100 %. Cerebrálna aspergilóza najčastejšie postihuje frontálny lalok a cerebelopontínny uhol a iba zriedka je jedinou lokalizáciou diseminácie (1, 3, 9, 10).

V tomto článku prezentujeme prípady dvoch pacientov s cirhózou pečene, u ktorých bola pitvou dokázaná invazívna aspergilóza s infiltráciou CNS.

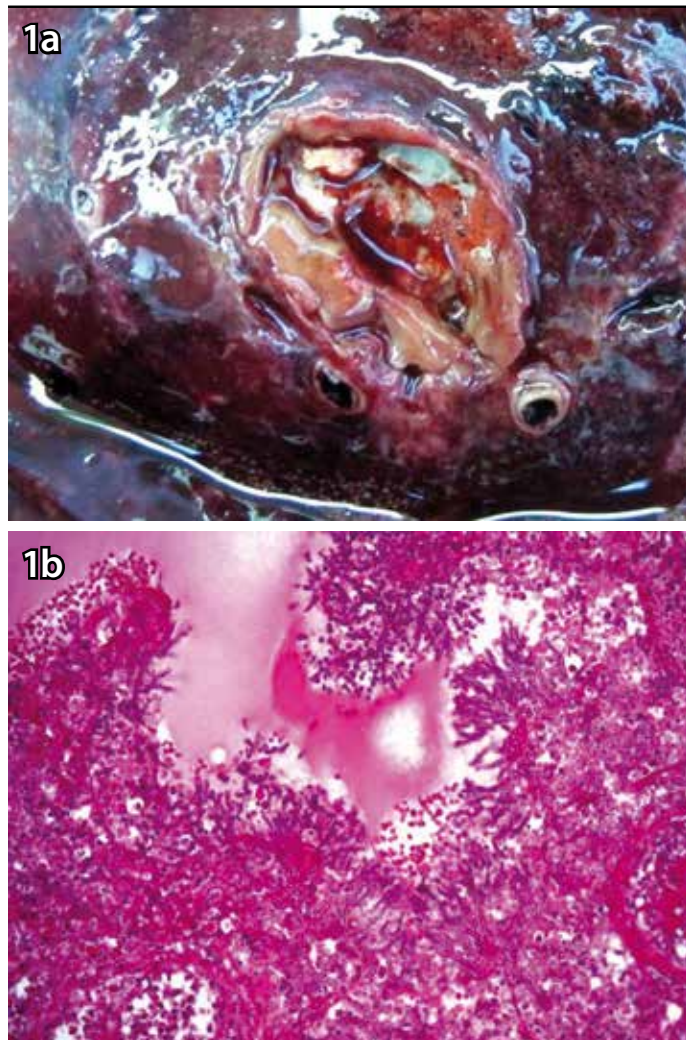
Opis prípadu

Prípad 1

58-ročný pacient s anamnézou cirhózy pečene etyltoxickej genézy Child-Pough C, s ezofageálnymi varixmi, chronickou pankreatitídou a diabetom druhého typu bol prijatý na internú kliniku pre niekoľko dní trvajúce celkové zhoršenie stavu, suchý kašeľ, apatiu, spavosť, dezorientáciu, zmätenosť a odmietanie perorálneho príjmu. Tri týždne pred aktuálnou hospitalizáciou bol prepustený z interného oddelenia inej kliniky, na ktorú bol prijatý pre dekompenzovanú cirhózu pečene s ikterom a na ktorej mu bola pred prepustením začatá perorálna kortikoterapia.

Pri vyšetrení bol pacient ikterický, mal mierne zvýšenú teplotu (37,7 °C), vykazoval spomalené psychomotorické tempo, bol somnolentný, pri postoji a chôdzi boli prítomné titubácie. Fyzikálne vyšetrenie pľúc odhalilo obojstranne inspiračné chrôpky. Akcia srdca bola pravidelná, na EKG bola prítomná ascendentná depresia ST segmentu vo svodoch V4 – V6 a negatívna vlna T vo svodoch III, V1 a V3. V laboratórnom obraze dominovali elevované hepatálne ukazovatele s hyperbilirubinémiou a zvýšenou hodnotou amoniaku na 83 μmol/l, bol prítomný hypokoagulačný stav,

Obrázok 1. Aspergilóza pľúc tvoriaca makroskopicky dutiny obsahujúce malé množstvo žltosivého materiálu (a), s charakteristickým mikroskopickým obrazom septovaných vláknitých štruktúr, infiltrujúcich tkanivo pľúc, HE, 200-krát (b)



trombocytopénia ťažkého stupňa a známky dehydratácie. Taktiež boli elevované zápalové parametre s hodnotou CRP 62 mg/l a neutrofiliiou.

Röntgenologické vyšetrenie pľúc odhalilo obojstranné nehomogénne zatienenie v dolnom pľúcnom poli, na ľavej strane sa dutinovou léziou veľkosti 25 x 20 mm. Tento nález bol klinicky uzavretý ako suspektná zápalová infiltrácia. Pacientovi bola podávaná kombinovaná parenterálna antibiotická terapia a komplexná liečba vaskulárnej a metabolickej dekompenzácie cirhózy pečene. Počas hospitalizácie dochádzalo k postupnej progresii poruchy vedomia, ktorá bola vzhľadom na základné ochorenie pripisovaná hepatálnej encefalopatii, po trojdňovej hospitalizácii pacient exitoval.

Pri pitve boli prítomné viaceré nálezy zhodné s klinickými diagnózami. Makroskopické a histologické vyšetrenie odhalilo aktívnu mikronodulárnu cirhózu pečene s ascitom v objeme 500 ml, ezofageálnymi varixmi a chronickou fibrotizujúcou pankreatitídou a hypertenznú chorobu s hypertenzným srdcom a arteriolosklerotickou nefrosklerózou.

Najvýraznejší nález bol pozorovaný na hrudnom komplexe. Pľúca boli obojstranne výrazne zväčšené, vľavo dosahovali hmotnosť 750 g a vpravo 950 g. Na pleure sa nachádzali tmavočervené petechie. Vo

všetkých lalokoch pľúc boli prítomné splývajúce ložiská konsolidácie sivoružovej farby, ktorých rezná plocha bola suchá a zrnitá. V oblastiach patologicky zmeneného tkaniva sa nachádzali viaceré cystické dutiny priemeru 4 mm – 2 cm, ohraničené bledohnedou membránou hrúbky 1 – 2 mm. Tieto dutiny boli opticky prázdne, prípadne obsahovali malé množstvo žltosivého materiálu. (obrázok 1a). Mikroskopické vyšetrenie patologicky zmenených ložísk odhalilo abscedujúcu bronchopneumóniu s prítomnými početnými vláknitými štruktúrami, ktoré vyplňali alveoly a tapetovali steny makroskopicky prítomných cystických útvarov. Vláknité štruktúry boli septované a vetvili sa pod ostrým uhlom, vykazovali PAS pozitivitu, farbili sa striebriacimi technikami a pri farbení hematoxylínom a eozínom vykazovali výraznú bazofíliu, čím korelovali s morfológiou aspergilózy (obrázok 1b).

Pri disekcii ostatných vnútorných orgánov sme pozorovali viaceré podobné guľovité, pomerne ostro ohraničené ložiská ružovočervenej farby v štítnej žľaze, v kôre obličiek obojstranne a v tele žalúdka s exulceráciou sliznice. Početné ložiská boli prítomné aj v myokarde ľavej komory srdca. Histologicky boli všetky ložiská tvorené nekroticky zmeneným tkanivom prestúpeným leukocytovým infiltrátom s prítomnými vláknitými vetviacimi sa štruktúrami vo vnútri ciev s ich masívnym prestupom do nekrotického tkaniva. Najdôležitejší nález bol prítomný na reze mozgu. Početné, neostro ohraničené guľovité ložiská ružovočervenej farby priemeru 5 mm – 1,5 cm sa nachádzali v bielej hmote frontálneho, parietálneho a okcipitálneho laloka a v oblasti ponsu. Ložiská priemeru 2 cm sa nachádzali v okolí zadného rohu bočnej komory, v prednej časti corpus callosum a v ľavej hemisfére mozočka, zasahujúc do vermis cerebelli. Histologicky bolo tkanivo mozgu v oblasti ložísk edematózne, prestúpené erytrocytmi a granulocytmi a pri farbení striebriacimi technikami sa aj v týchto ložiskách vizualizovali vláknité vetviace sa huby.

Nálezy zistené pri pitve odhalili diseminovanú invazívnu aspergilózu s masívnym postihnutím centrálného nervového systému.

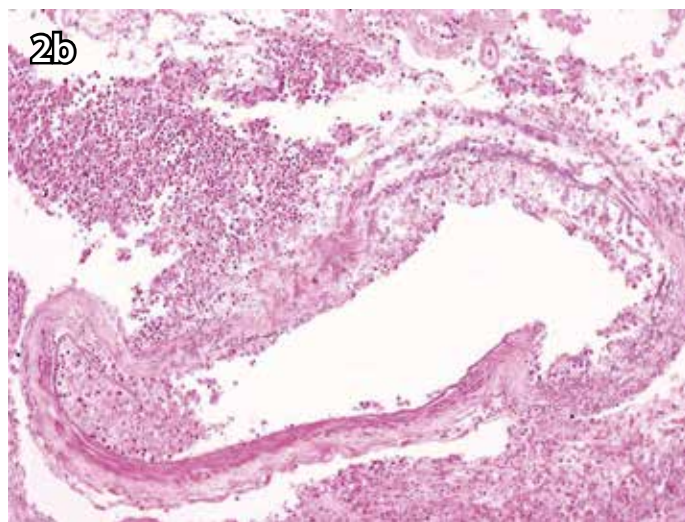
Prípad 2

49-ročná pacientka bola prijatá na špecializované hepatologické pracovisko internej kliniky pre akútnu alkoholovú hepatitídu v teréne cirrózy pečene Child-Pough C. Počas hospitalizácie jej bola nasadená parenterálna kortikoterapia v trvaní troch týždňov.

Pri vyšetrení bola pacientka pri vedomí, ikterická, s prítomným „flapping“ tremorom a ascitom. Dýchanie bolo obojstranne čisté, bazálne oslabené. Pri biochemickom vyšetrení séra dominovali zvýšené hepatálne parametre s hyperbilirubinémiou a hodnotou amoniaku 33,3 $\mu\text{mol/l}$, ktorý počas hospitalizácie stúpil na 80 $\mu\text{mol/l}$. Bol prítomný hypokoagulačný stav, mierna trombocytopenia a stredne ťažká anémia. Počas hospitalizácie sa postupne zvyšovali zápalové markery s hodnotou CRP do 39,34 mg/l a s neutrofiliiou.

Na röntgene pľúc sa zobrazilo splývavé zatienenie v ľavom strednom až dolnom pľúcnom poli. Na CT hrudníka bol opísaný bilaterálny fluidotorax s dystelektázami a nepravidelné mapovité alveolovo-intersticiálne zóny vľavo veľkosti do 35 mm a vpravo do 13 mm. V ľavom hornom pľúcnom poli v teréne dystelektatického parenchýmu v kombinácii so zápalovými zmenami bolo prítomné drobné ložisko plynu. Pri bronchoskopii bol

Obrázok 2. Invazívna aspergilóza s postihnutím mozgu, s ostro ohraničeným prekrvácaným ložiskom kašovitkej konzistencie (a), zápalový infiltrát prestupujúci tkanivo mozgu, v cievach sa zobrazujú vláknité vetviace sa huby, prestupujúce cez stenu ciev do okolitého tkaniva, HE, 200-krát (b)



v hlavných bronchoch pozorovaný žltý hnis. Pacientke bola vysadená kortikoterapia a začatá intenzívna oxygenoterapia, dychová rehabilitácia a kombinovaná antibiotická terapia.

Pre progresiu pľúcneho nálezu bola pacientka po mesačnej hospitalizácii preložená na jednotku intenzívnej starostlivosti kliniky pneumológie a ftizeológie. Pri prijíme bola pacientka objektívne afebrilná, tachypnoická, somnolentná, spavá, odpovedala adekvátne, avšak nie zrozumiteľne. Dýchanie bolo vľavo v celom rozsahu oslabené až vymiznuté, vpravo boli bazálne počuteľné jemné vrzoty. Hospitalizácia pacientky sa komplikovala vznikom ľavostranného tenzného pneumotoraxu, ktorý bol následne drénovaný aj s 1 500 ml sérosangvinolentného výpotku. Napriek komplexnej liečbe sa stav pacientky zhoršoval, prehlbovala sa kvantitatívna porucha vedomia a po troch dňoch hospitalizácie zomrela.

Pitva odhalila aktívnu mikronodulárnu steatocirrózu pečene a ascites v objeme 1 500 ml. V pleurálnej dutine sa obojstranne nachádzalo 500 ml sangvinolentnej tekutiny. Pľúca boli tuhšej konzistencie so zvýšenou hmotnosťou, ktorá vľavo dosahovala 630 gramov a vpravo až 790 gramov.

V hrote ľavého horného laloka pľúc bolo prítomné neostro ohraničené sivožlté tuhšie ložisko priemeru 8 cm, ktoré bolo na reze čiastočne skolkované a vyplnené hustou sivožltou tekutinou. Na reze pravého dolného laloka pľúc, siahajúc až po pleuru sa nachádzalo konsolidované ružovosivé ložisko priemeru 6 cm, miestami sa kašovito rozpadávajúce.

Histologicky boli ložiská tvorené nahromadenými polymorfonukleárnymi granulocytmi s rozpadom alveolárnych sept, lemované granulačným tkanivom. Pleura v okolí ložísk vykazovala známky fibrinózo-hnisavej pleuritídy. V ložiskách sa taktiež nachádzali početné PAS pozitívne septované vetviace sa hýfy, ktoré sa farbili striebriacimi technikami a ich obraz súhlasil s morfológiou aspergilózy.

Nečakaný nález odhalila pitva mozgu, kde sa vo frontálnom laloku pravej hemisféry parasagitálne nachádzalo pomerne ostro ohraničené ložisko priemeru 5 cm, na reze žltosivej farby, kašovitej konzistencie (obrázok 2a). Mäkké pleny nad ložiskom boli zhrubnuté a zakalené. Identické ložisko menších rozmerov sa nachádzalo zrkadlovo parasagitálne na ľavej strane. Bočné komory boli po narezaní vyplnené mierne zakaleným mozgovomiechovým mokom. Mikroskopicky boli ložiská tvorené nekrotickým detritom a výrazne prestúpené polymorfonukleárnymi granulocytmi, na periférii bol zvýraznený edém a malé množstvo zrníčkových buniek. Zápalový infiltrát prestupoval aj do mäkkých plien, ktoré boli väzivo zhrubnuté. Impregnáciou striebrom a farbením PAS sa v cievach zobrazili vláknité vetviace sa huby, ktoré prestupovali do okolitého parenchýmu (obrázok 2b).

Tento nález poukázal na invazívnu aspergilózu s disemináciou do centrálného nervového systému v podobe abscesov a ložiskovej meningitídy.

Diskusia

Invazívna aspergilóza sa zaraďuje medzi oportúnne infekcie, ktoré postihujú predovšetkým neutropenických pacientov. Do skupiny nekonvenčných pacientov, ktorí môžu byť postihnutí generalizovanou infekciou, sa zaraďujú aj pacienti s ochoreniami pečene, a to hlavne pacienti s cirhózou pečene v štádiu Child-Pough C a pacienti s akútnym zlyhaním pečene. Keďže nejde o klasickú rizikovú skupinu, typickú pre danú chorobu, je aspergilóza u týchto pacientov často diagnostikovaná až v pokročilých štádiách, keď už terapia nemá takú úspešnosť (6).

U zdravých jedincov sú konídie, ktoré sa dostanú do dýchacích ciest, odstraňované fagocytárnou činnosťou alveolárnych makrofágov. Makrofágy iniciujú zápalovú odpoveď sprostredkovanú neutrofilnými polymorfonukleárnymi granulocytmi. Konídie, ktoré uniknú makrofágom, sa premenia na hýfy a tie sú primárne odstraňované neutrofilmi (7).

Pacienti s cirhózou pečene vykazujú dysfunkciu retikuloendotelialného systému, zníženú mobilizáciu neutrofilov a ich zníženú fagocytárnu funkciu (11). Taktiež sa predpokladá, že hyperamonémia a hyponatriémia, ktoré sú u cirhotických pacientov pomerne časté, znižujú fagocytárnu schopnosť neutrofilov a zvyšujú ich spontánny rozpad (12). Imunodeficienciu cirhotických pacientov ovplyvňujú aj pridružené faktory, ako je malnutícia, súčasné požívanie alkoholu, častejšie podstupovanie invazívnych procedúr a indikácia kortikosteroidovej terapie.

Pacienti s cirhózou vykazujú všeobecne väčšie riziko bežných, ako aj oportúnnych infekcií. Toto riziko sa ešte zvyšuje u hospitalizovaných pacientov, u ktorých môže dosahovať až 34 % oproti 7 % v bežnej po-

pulácii hospitalizovaných pacientov. Infekcie u cirhotických pacientov zodpovedajú za približne 30 % úmrtí v ich skupine (11).

Príznaky invazívnej aspergilózy sú všeobecne nešpecifické, tak isto ako aj biochemické markery zápalu, ako C-reaktívny proteín a prokalcitonín. Na možnosť tejto infekcie upozorní zväčša až negatívna odpoveď na antibiôtickú terapiu (13). Medzi základné metódy, ktoré sa uplatňujú v diagnostike invazívnej aspergilózy na základe revidovaných odporúčaní IDSA (Infectious Diseases Society of America) z roku 2016, patrí simultánne histopatologické a kultivačné vyšetrenie vhodných vzoriek, ktoré je v určitých prípadoch doplnené molekulárnymi vyšetrovacími metódami. Rutinne sa využíva detekcia dvoch mykotických biomarkerov, a to detekcia antigénu galaktomananu zo séra alebo bronchoalveolárnej laváže, prípadne detekcia antigénu (1-3)-beta-D-glukánu. Monitorovanie sérových hodnôt antigénu galaktomananu sa môže tiež využiť na sledovanie pacientovej odpovede na terapiu (13, 14, 15). Dôležitú skupinu v rámci skorej diagnostiky predstavujú zobrazovacie techniky. Odporúča sa CT vyšetrenie pľúc, vždy keď je prítomné klinické podozrenie na invazívnu aspergilózu, bez ohľadu na výsledky röntgenologického vyšetrenia. Použitie kontrastu v rámci CT sa odporúča, len ak sa podozrivé ložiská nachádzajú v blízkosti väčšej cievy. Invazívna aspergilóza sa v pľúcach najčastejšie prezentuje prítomnosťou viacpočetných makronodulov (zatienenia, ktorých priemer je viac ako 1 cm), častá je tiež prítomnosť tzv. „halo“ znaku, keď sa okolo makronodulu zobrazuje kruhové hmlisté zatienenie. Okrem toho môžu byť prítomné mnohé ďalšie nešpecifické zmeny, ako napríklad lézie charakteru infarktu, kavitárne lézie, tzv. „air-crescent“ znak (prítomnosť vzduchu tvaru polmesiacu vo vnútri nodulu), pleurálny výpotok alebo zhuk malých nodulov (14, 16).

Čo sa týka aspergilózy centrálnej nervovej sústavy, môže sa prezentovať akútnym nástupom ložiskového neurologického deficitu, vznikajúceho v dôsledku cievnej alebo rozvíjajúcej sa lézie. Medzi ďalšie časté symptómy patrí zmena vedomia, bolesť hlavy, vracanie, hemiparéza, dysartria, letargia a záchvatové stavy. Na jej diagnostiku sa odporúča MRI vyšetrenie, pri ktorom sa väčšinou aspergilové abscesy javia ako hypointenzné ložiská pri T1 váženom obraze s neprítomným alebo minimálnym zvýraznením postkontrastne, ktoré sa dáva do súvisu s rozsahom okolitého zápalu. Pri T2 váženom obraze sú lézie väčšinou olemované prstencom nízkej intenzity spôsobeným sčasti krvácaním, sčasti prítomnosťou železa, magnézia a mangánu v mykotických ložiskách a hustým usporiadaním hýf na periférii ložísk. Krvácanie sa v ložiskách zobrazuje v asi 25 % prípadov (17, 18).

Záver

Invazívna aspergilóza býva vzhľadom na skutočnosť, že cirhóza nepatrí medzi klasické rizikové faktory jej vzniku, často poddiagnostikovaná. Najčastejšie bývajú postihnutí pacienti v pokročilom štádiu cirhózy pečene alebo pacienti s akútnym pečenečným zlyhaním. Klinické príznaky sú často nevýrazné, kultivačné vyšetrenia poskytnú len limitované informácie a zobrazovacie diagnostické metodiky sú zväčša nešpecifické. Mortalita neliečených pacientov s invazívnou aspergilózou je vysoká. Príčinou smrti býva najčastejšie generalizovaná aspergilóza a postihnutie CNS. Zaradenie cirhotických pacientov medzi rizikové skupiny tejto infekcie môže dopomôcť k jej včasnejšej diagnóze a adekvátnej liečbe, čo môže viesť k zníženiu mortality v dôsledku aspergilových infekcií u týchto pacientov (19, 20).

Literatúra

1. Graf K, Khani S, Ott E, et al. Five-years surveillance of invasive aspergillosis in a university hospital. *BMC Infect Dis.* 2011;11(1).
2. Groll A, Shah P, Mentzel C, et al. Trends in the post mortem epidemiology of invasive fungal infections at a University Hospital. *Journal of Infection.* 1996;33(1):23–32.
3. Lin S, Schranz J, Teutsch S. Aspergillosis Case-Fatality Rate: Systematic Review of the Literature. *Clinical Infectious Diseases.* 2001;32(3):358–366.
4. Maschmeyer G, Haas A, Cornely O. Invasive Aspergillosis: epidemiology, diagnosis and management of immunocompromised patient. *Drugs.* 2007;67(11):1567–1601.
5. Cornet M, Fleury L, Maslo C, et al. Epidemiology of invasive aspergillosis in France: a six-year multicentric survey in the Greater Paris area. *Journal of Hospital Infection.* 2002;51(4):288–296.
6. Cornillet A, Camus C, Nimubona S, et al. Comparison of Epidemiological, Clinical, and Biological Features of Invasive Aspergillosis in Neutropenic and Nonneutropenic Patients: A 6 Year Survey. *Clinical Infectious Diseases.* 2006;43(5):577–584.
7. Dagenais T, Keller N. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews.* 2009;22(3):447–465.
8. Kamai Y, Lossinsky A, Liu H, et al. Polarized response of endothelial cells to invasion by *Aspergillus fumigatus*. *Cellular Microbiology.* 2009;11(1):170–182.
9. Denning D. Invasive Aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases.* 1998;26(4):781–803.
10. Schwartz S, Ruhnke M, Ribaud P, et al. Improved outcome in central nervous system aspergillosis, using voriconazole treatment. *Blood.* 2005;106(8):2641–2645.
11. Bonnel A, Bunchoontavakul C, Reddy K. Immune Dysfunction and Infections in Patients with Cirrhosis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology.* 2011;9(9):727–738.
12. Shawcross D, Wright G, Stadlbauer V, et al. Ammonia impairs neutrophil phagocytic function in liver disease. *Hepatology.* 2008;48(4):1202–1212.
13. Barton R. Laboratory Diagnosis of Invasive Aspergillosis: From Diagnosis to Prediction of Outcome. *Scientifica.* 2013;2013:1–29.

14. Patterson T, Thompson G, Denning D, et al. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2016;63(4):e1–e60.
15. Ambasta A, Carson J, Church D. The use of biomarkers and molecular methods for the earlier diagnosis of invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Med Myco.* 2015;53(6):531–557.
16. Greene R, Schlamm H, Oestmann J, et al. Imaging Findings in Acute Invasive Pulmonary Aspergillosis: Clinical Significance of the Halo Sign. *Clinical Infectious Diseases.* 2007;44(3):373–379.
17. Almutairi B, Nguyen T, Jansen G, et al. Invasive Aspergillosis of the Brain: Radiologic-Pathologic Correlation. *RadioGraphics.* 2009;29(2):375–379.
18. Marzolf G, Sabou M, Lannes B, et al. Magnetic Resonance Imaging of Cerebral Aspergillosis: Imaging and Pathological Correlations. *PLOS ONE.* 2016;11(4):e0152475.
19. Jeurissen S, Vogelaers D, Sermijn E, et al. Invasive Aspergillosis in Patients with Cirrhosis, a Case Report and Review of the Last 10 Years. *Acta Clinica Belgica.* 2013;68(5):368–375.
20. Falcone M, Massetti A, Russo A, et al. Invasive aspergillosis in patients with liver disease. *Med Mycol.* 2011;49(4):406–413.



MUDr. Kristína Giertlová
Ústav patologickej anatómie LF UK a UNB
Sasinkova 4, 811 08 Bratislava
k_giertlova@yahoo.com

SIEMENS

Jedno riešenie – viac možností

VERSANT® kPCR systém pre molekulárnu diagnostiku poskytuje väčšiu flexibilitu, zvyšuje výkon a umožňuje konsolidáciu vášho PCR laboratória.

- Systém VERSANT® kPCR poskytuje vášmu laboratóriu možnosť automatizovanej extrakcie nukleových kyselín z rozličných typov biologických materiálov a vďaka širokému portfóliu testov detekciu pôvodcov rôznych infekčných ochorení.
- Okrem HBV DNA, HCV RNA, HIV RNA, CT/GC, CMV DNA, EBV DNA, VZV DNA, HSV 1/2 DNA, BKV DNA, JCV DNA, adenovírusu DNA, parvovírusu B19 DNA a HHV-6 DNA možno aplikovať na systém súpravy iných výrobcov alebo in-house metódy.
- Pre viac informácií kontaktujte: jana.stefanovicova@siemens.com, Tel.: +421 2 5968 2521
Adresa: Siemens Healthcare s.r.o., Lamačská cesta 3/A, 841 04 Bratislava.

Malobunkový hyperkalcemický karcinóm/ malígny rhabdoidný tumor ovária – kazuistika

MUDr. Michal Zámečník

MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o., Bratislava

Úvod: Malobunkový karcinóm ovária hyperkalcemického typu je veľmi zriedkavý tumor mladých žien, ktorý bol nedávno zaradený do skupiny malígnych rhabdoidných tumorov.

Opis prípadu a výsledky: Prezentovaný je prípad tohto nádoru u 22-ročnej pacientky. Išlo o tumor pravého ovária priemeru 10 cm. Hyperkalcémia nebola zistená. Terapia spočívala v hysterektómii a bilaterálnej adnexotómii, s následnou chemoterapiou. Histologický obraz zodpovedal malobunkovému karcinómu hyperkalcemického typu, konvenčného histologického obrazu, v ktorom boli len veľmi ojedinelé ložiská sarkomatoidnej vretenobunkovej zmeny. Iné menej obvyklé štruktúry, ako mucinózne žľazky alebo populácia veľkých či rhabdoidných buniek neboli v tumore nájdené. Imunohistochemicky tumor exprimoval cytokeratín AE1/AE3, EMA, WT1, CD99, INI1 a CD10. Negatívne boli estrogénové a progesterónové receptory, inhibín, kalretinín, OCT3/4, c-kit, PLAP, LCA, S100-proteín, HMB45, melan A, chromogranín, CD56, synaptofyzín, alfa-hladkosvalový aktín, desmín, kaldesmon, Fli-1, neurofilament proteín. Priebeh u pacientky bol nepriaznivý, napriek liečbe exitovala 12 mesiacov po operácii.

Diskusia: V práci sa diskutuje histologická a imunohistochemická diagnostika tohto tumoru a jeho najnovšie klasifikačné priradenie k malígnym rhabdoidným tumorom.

Záver: Opísaný prípad demonštruje typický klinický a patologický obraz malobunkového hyperkalcemického karcinómu ovária.

Kľúčové slová: ovárium, malobunkový karcinóm hyperkalcemického typu, imunohistochemia, malígny rhabdoidný tumor

Hypercalcemic-type small cell carcinoma of the ovary – case report

Introduction: Hypercalcemic-type small cell carcinoma of the ovary is a very rare tumor occurring in young women. Recently, many experts consider it as a variant of malignant rhabdoid tumor.

Case report and results: A case of this neoplasm occurring in 22 years old female is presented. It was a 10 cm tumor of the left ovary. The therapy included hysterectomy with bilateral adnexotomy, and subsequent chemotherapy. Hypercalcemia was not found. The tumor histologically showed „classical“ pattern of hypercalcemic-type small cell carcinoma with rare foci of sarcomatoid change. Other variant structures such as mucinous glands and large rhabdoid cells were not found. The tumor immunohistochemically expressed cytokeratin AE1/AE3, EMA, WT1, CD99, INI1 a CD10. It was negative for estrogen and progesterone receptor, alpha-inhibin, calretinin, OCT3/4, c-kit, PLAP, LCA, S100-protein, HMB45, melan A, chromogranin, CD56, synaptophysin, neurofilament protein, desmin, caldesmon, calponin, alpha-smooth muscle actin, and Fli-1. Despite the intensive therapy, the disease progressed and the patient died 12 months after the operation.

Discussion: Diagnosis, therapy and recent classification of this carcinoma as malignant rhabdoid tumor are discussed.

Conclusion: The present case demonstrates typical clinical and pathological features of hypercalcemic-type small cell carcinoma of the ovary.

Key words: ovarium, small cell carcinoma of hypercalcemic type, therapy, immunohistochemistry, malignant rhabdoid tumor

NewsLab, 2016; roč. 7(2): 126–128

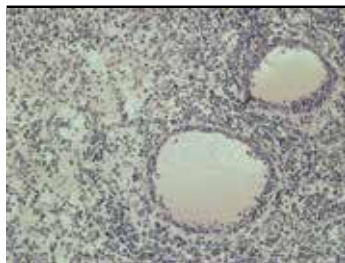
Úvod

Malobunkový karcinóm ovária hyperkalcemického typu (MKOTH) je veľmi zriedkavý tumor vyskytujúci sa zväčša u mladých žien. V typických prípadoch sa u týchto pacientok zisťuje hyperkalcémia. Tumor je vysoko agresívny a má zlú prognózu (1, 2, 3, 4). Celkom nedávno boli v tomto nádore zistené genetické zmeny typické pre malígny rhabdoidný tumor, a preto niektorí autori začali používať pre MKOTH aj označenie malígny rhabdoidný tumor ovária (5, 6). Z našej praxe prezentujeme prípad tohto raritného tumoru.

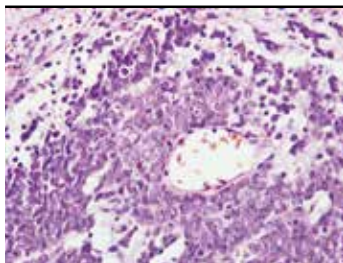
Opis prípadu

22-ročná pacientka v prvom trimestri tehotenstva bola prijatá pre bolesti podbruška. Sonograficky bol zistený tumor pravého ovária a následne bola prevedená hysterektómia s bilaterálnou adnexotómiou. Po stanovení diagnózy nasledovala liečba chemoterapiou. Pacientka exitovala 12 mesiacov po operácii v dôsledku rekurencie tumoru v panve a brušnej dutine. Hyperkalcémia nebola zistená.

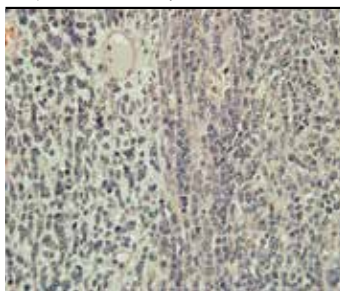
Obrázok 1. Populácia malých buniek s edémom strómy a s priestormi podobnými folikulom. HE, objektív 20



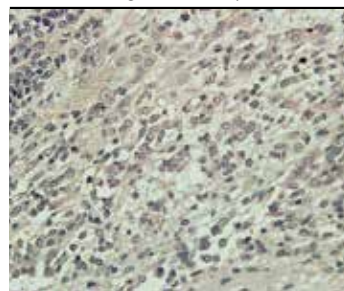
Obrázok 2. Pri veľkom zväčšení je zreteľná high-grade morfológia jadier. HE, objektív 40



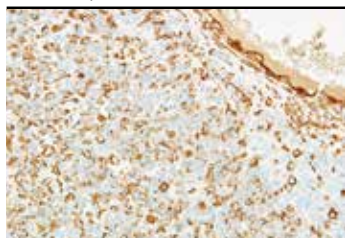
Obrázok 3. Fokálne sa bunky radili do pruhov. HE, objektív 20



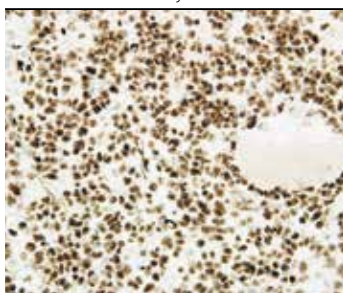
Obrázok 4. Ložisko so sarkomatoidnou morfológiou. HE, objektív 20



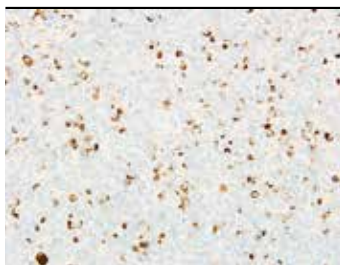
Obrázok 5. Vimentín bol difúzne pozitívny vrátane buniek steny folikulu podobného priestoru (vpravo hore). Objektív 20



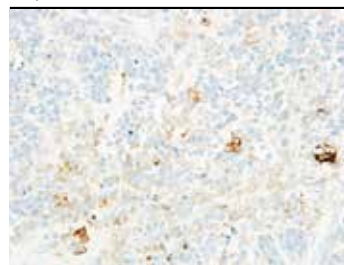
Obrázok 6. Expresia WT1 v jadrách buniek nádoru. Objektív 20



Obrázok 7. Časť buniek bola pozitívna na pancytokeratín. Objektív 20



Obrázok 8. Pozitivita EMA je zreteľná len v malom množstve buniek. Objektív 20



Výsledky

Makroskopicky išlo o ovoidný tumor priemeru do 10 cm, na reze solídny, bledosivý a z časti cystický, s kompletnou tenkou pseudokapsulou. **Histologicky** bol tumor tvorený prevažne solídnu populáciou malých okrúhlych buniek, s nekrózami a folikulom podobnými priestormi (obrázok 1 a 2). Fokálne boli bunky radené do trabekúl a pruhov (obrázok 3). Cytoplazma buniek bola málo objemná, často temer nezreteľná. Jadrá mali monotónny high-grade vzhľad s početnými mitózami a nenápadnými jadierkami. V ojedinelých ložiskách bol tumor sarkomatoidný, s vretenovitými bunkami bohatšími na cytoplazmu (obrázok 4). Časť buniek mala malé množstvo excentricky uloženej cytoplazmy, ale prominentné nukleoly typické pre rhabdoidnú cytomorfológiu sme nenašli. Medzibunková stróma mala vzhľad fibrózy kolagenizovanej alebo myxoidnej. **Imunohistochemicky** bol tumor pozitívny difúzne na vimentín (obrázok 5), WT1 (obrázok 6) a p53. Fokálne boli pozitívne pancytokeratín AE1/AE3 (obrázok 7), epitelový membránový antigén (EMA) (obrázok 8), INI1, CD99 a CD10. Negatívne boli kalretinín, inhibín, estrogénové a progesterónové receptory, LCA, OCT3/4, c-kit, PLAP, S100-proteín, HMB45, melan A, CD56, synaptofyzín, chromogranín, calponín, alfa-hladkosvalový aktín, desmín, kaldesmon, neurofilament proteín a Fli-1.

Diskusia

Klinické aj patologické nálezy v našom prípade svedčia o MKOTH. Tento zriedkavý tumor bol opísaný Scullym et al. a Dickersinom et al. (1, 4). Po týchto prácach nasledovali publikácie ďalších kazuistik a sérií a v súčasnosti je v písomníctve viac ako 300 prípadov (1, 7, 8). Okrem tumorov s „tradičným“ malobunkovým obrazom boli pozorované aj lézie s obsahom väčších buniek, ktoré vykazovali niekedy rhabdoidnú cytomorfológiu, čím sa podobali na tzv. malígnu rhabdoidný tumor (9). Predpokladáme, že práve takéto nálezy viedli Kupryjanczyka et al. k molekulárno-genetickému pátraniu po

mutáciách, ktoré sa typicky vyskytujú v rhabdoidných tumoroch (10). Ide o alterácie génov *SMARCB1* a *SMARCA4* (11, 12, 13). Kupryjanczyk et al. (10) zistili, že aj v MKOTH je charakteristická mutácia *SMARCA4/BRG1* (podobne ako v rhabdoidných tumoroch), čo bolo potvrdené aj ďalšími štúdiami (5, 14). Z tohto dôvodu navrhujú niektorí autori (5, 6) označovať MKOTH ako malígnu rhabdoidný tumor ovária, čím by sa MKOTH vlastne preradil medzi sarkómy. Takáto klasifikácia je podporená ďalšími znakmi, ktoré sú „spoločné“ pre obe spomínané jednotky: častá hyperkalcémia, častá imunohistochemická polyfenotypia, možný familárny výskyt (3, 5, 15). Nevysvetlené ale zostávajú pri MKOTH nálezy netypické pre rhabdoidný tumor, ako sú mucinózne žľazky a častá absencia „klasickej“ rhabdoidnej morfológie. Taktiež molekulárno-genetické nálezy alterácií *SMARCA4* v iných nádoroch (endometrioidný karcinóm, pulmonálne a pankreatické karcinómy) (16, 17) znamenajú ich nižšiu špecifickosť na určovanie histogenézy.

Klinický obraz MKOTH zahŕňa: mladý vek s mediánom 24 – 28 rokov (1, 8), hyperkalcémia v dvoch tretinách prípadov (1), vo väčšine prípadov pri prvej diagnóze štádium vyššie ako štádium I (až 75 % pacientok) (3). Hodnoty bežne používaných sérových markerov bývajú nešpecifické, respektíve neprínosné (AFP, beta-HCG, CA125, LDH). Diagnostickú hodnotu má len nález hyperkalcémie zistenej u mladšej ženy s nádorovou léziou adnex. V našom prípade ale nebola hyperkalcémia zistená, ako tomu býva v tretine prípadov (1).

Histologicky pri MKOTH nachádzame populáciu malých buniek s výraznou atypiou, vysokou mitotickou aktivitou a častou nekrózou. Bunky sú usporiadané zväčša solídne, len fokálne s väčším množstvom intercelulárnej väzivovej strómy. Menej časté sú trabekuly a pruhy buniek. Tvar buniek je okrúhly a ovoidný. V solídnych častiach vznikajú dehiscenciou bunkových spojov charakteristické dutiny rôznej veľkosti, podobné folikulom. Zriedka sa našli v tumore mucinózne žľazky alebo „signet ring“ bunky, vretenobunková sarkomatoidná zmena (ako v našom prípade), populácia

väčších buniek alebo štruktúra neodlišiteľná od rhabdoidného tumoru (3). Imunohistochemicky exprimuje tumor vimentín a (aspoň fokálne) epitelové markery CK a/alebo EMA. Temer konštantná je absencia expresie proteínu BRG1 (ktorý je produktom génu *SMARCA4*) (6). Ďalej boli opísané expresie p53, CD56, WT1, kalretinínu, CD10, „parathyroid-related“ polypeptidu, alfa-hladkosvalového aktínu (3, 15). Negatívne sú estrogénové i progesterónové receptory (argument proti „sex-cord“ pôvodu tumoru, ako aj proti origu z müllerianskeho, respektíve povrchového epitelu ovária) (15).

Histologická diferenciálna diagnóza je široká. Zahŕňa celé spektrum malobunkových lézií ovária, ako sú nádor z buniek granulózy, dysgerminóm, malobunkový karcinóm typu pulmonálneho, endometriálny stromálny sarkóm, tumory skupiny PNET/Ewing, alveolárny rhabdomyosarkóm, desmoplastický „small round cell“ tumor, malígny lymfóm, malígny melanóm. Najčastejším problémom v diferenciálnej diagnóze sú granulózocelulárny nádor a dysgerminóm. Granulózocelulárne tumory nemajú jadrá tak výrazne atypické ako v MKOTH a exprimujú „sex-cord“ markery, „sex-steroid“ receptory a BRG1. Dysgerminóm môže obsahovať folikulom podobné priestory, ale má svetlejšie bunky, strómu s lymfocytmi a odlišný imunofenotyp (pozitívne PLAP, OCT3/4, c-kit, D2-40). Pulmonálny typ karcinómu je negatívny na vimentín a pozitívny na neuroendokrinné markery. Často obsahuje endometrioidnú alebo „urotel-like“ zložku. Endometriálny stromálny sarkóm má charakteristickú bohatú vaskularizáciu. Ďalšie vyššie spomenuté tumory majú imunofenotypy odlišné od MKOTH, čo umožňuje ich odlíšenie. Potrebný je ale vždy pri konkrétnej diferenciálnej diagnóze panel protilátok, pričom treba mať na pamäti polyimunofenotypiu MKOTH.

Terapia MKOTH je v menej pokročilých štádiách v prvom rade chirurgická, zväčša podobného rozsahu ako pri high-grade ovariálnych karcinómoch. Následne sa aplikuje chemoterapia (etopozid + cisplatina), prípadne aj rádioterapia (18). Názory na optimálnu liečbu sa ale pri prvom štádiu značne líšia. Powel et al. odporúčajú dokonca v indikovaných prípadoch fertilitu zachovávať zákrok, s následnou onkologickou terapiou a stagingovou operáciou (19). Naproti tomu Pautier et al. operujú radikálne, s pelvikou a paraaortálnou lymfadenektómiou a následnou chemoterapiou (20). V pokročilých štádiách je odporúčaná neoadjuvantná chemoterapia a následná stagingová operácia (18).

Prognóza tumoru je celkovo veľmi nepriaznivá, diktovaná vysokou agresivitou nádoru (1, 3). Líši sa viac menej podľa štádií. Len u tretiny pacientok so štádiom 1a býva po operácii obdobie bez ochorenia. Ide hlavne o pacientky s vekom nad 30 rokov, normálnou kalcémiou, tumorom priemeru pod 10 cm, absenciou veľkých buniek a po absolvovaní radikálnej chirurgickej liečby (1). Pri vyšších štádiách je prognóza infaustná, s úmrtím do 2 rokov v drvivej väčšine prípadov.

Záver

Prezentovaný prípad zriedkavého MKOTH bol z hľadiska kliniky aj patológie podobný doposiaľ publikovaným prípadom. Histologicky šlo o konvenčný typ tohto tumoru, s prevládajúcou high-grade populáciou malých buniek a typickými folikulom podobnými priestormi. V tumore bola fokálne i menej obvyklá sarkomatoidná štruktúra, bez rhabdoidnej a mucinózne morfológie. Imunohistochemicky vykazoval tumor len fokálnu expresiu epitelových markerov. Hyperkalcémia nebola zistená. Priebeh bol u pacientky infaustný, s úmrtím 12 mesiacov po diagnóze, čo potvrdzuje vysoko malígny charakter tohto nádoru.

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

Literatúra

1. Young RH, Oliva E, Scully RE. Small cell carcinoma of the ovary, hypercalcemic type. A clinicopathological analysis of 150 cases. *Am J Surg Pathol.* 1994;18(11):1102–1116.
2. Dickersin GR, Kline IW, Scully RE. Small cell carcinoma of the ovary with hypercalcemia: a report of 11 cases. *Cancer.* 1982;49(1):188–197.
3. Clement PB. Selected miscellaneous ovarian lesions: small cell carcinomas, mesothelial lesions, mesenchymal and mixed neoplasms, and non-neoplastic lesions. *Mod Pathol.* 2005;18(Suppl. 2):S113–129.
4. Scully RE. *Tumors of the ovary and maldeveloped gonads. Atlas of Tumor Pathology.* 2nd series, Fascicle 16. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology; 1979.
5. Foulkes WD, Clarke BA, Hasselblatt M, et al. No small surprise – small cell carcinoma of the ovary, hypercalcaemic type, is a malignant rhabdoid tumour. *J Pathol.* 2014;233(3):209–214.
6. Karanian-Philippe M, Velasco V, Longy M, et al. *SMARCA4* (BRG1) loss of expression is a useful marker for the diagnosis of ovarian small cell carcinoma of the hypercalcemic type (ovarian rhabdoid tumor): a comprehensive analysis of 116 rare gynecologic tumors, 9 soft tissue tumors, and 9 melanomas. *Am J Surg Pathol.* 2015;39(9):1197–1205.
7. Kapoun M, Bouda J, Presl J, et al. Aggressive small cell carcinoma of the ovary, hypercalcemic type, surgery and oncological treatment: case report. *Ceska Gynekol.* 2015;80(3):218–221.
8. Ulbright TM, Roth M, Stehman FB. Poorly differentiated (small cell) carcinoma of the ovary in young women. Evidence supporting a germ cell origin. *Hum Pathol.* 1987;18(2):175–184.
9. Beckwith JB, Palmer NF. Histopathology and prognosis of Wilms tumors: results from the First National Wilms' Tumor Study. *Cancer* 1978;41(5):1937–1948.
10. Kupryjanczyk J, Dansonka-Mieszkowska A, Moes-Sosnowska J, et al. Ovarian small cell carcinoma of hypercalcemic type – evidence of germline origin and *smarca4* gene inactivation. A pilot study. *Pol J Pathol.* 2013;64(4):238–246.
11. Versteeg I, Sevenet N, Lange J, et al. Truncating mutations of *hSNF5/INI1* in aggressive paediatric cancer. *Nature* 1998;394(6689):203–206.
12. Biegel JA, Zhou JY, Rorke LB, et al. Germ-line and acquired mutations of *INI1* in atypical teratoid and rhabdoid tumors. *Cancer Res.* 1999;59(1):74–79.
13. Schneppenheim R, Fruhwald MC, Gesk S, et al. Germline nonsense mutation and somatic inactivation of *SMARCA4/BRG1* in a family with rhabdoid tumor predisposition syndrome. *Am J Hum Genet.* 2010;86(2):279–284.
14. Witkowski L, Carrot-Zhang J, Albrecht S, et al. Germline and somatic *SMARCA4* mutations characterize small cell carcinoma of the ovary, hypercalcemic type. *Nat Genet.* 2014;46(5):438–443.
15. Zamecnik M, Michal M. Ovarian carcinoma of hypercalcemic type: myoid features and lack of estrogen and progesterone receptors. *Virchows Arch.* 2003;442(2):186–187.
16. Araujo LH, Timmers C, Bell EH, et al. Genomic characterization of non-small-cell lung cancer in African Americans by targeted massively parallel sequencing. *J Clin Oncol.* 2015;33(17):1966–1973.
17. Strehl JD, Wachter DL, Fiedler J, et al. Pattern of *SMARCB1* (*INI1*) and *SMARCA4* (*BRG1*) in poorly differentiated endometrioid adenocarcinoma of the uterus: analysis of a series with emphasis on a novel *SMARCA4*-deficient dedifferentiated rhabdoid variant. *Ann Diagn Pathol.* 2015;19(4):198–202.
18. Harrison ML, Hoskins P, du Bois A, et al. Small cell of the ovary, hypercalcemic type – analysis of combined experience and recommendation for management. A GCIg study. *Gynecol Oncol.* 2006;100(2):233–238.
19. Powell JL, McAfee RD, McCoy RC, et al. Uterine and ovary conservation in advanced small cell carcinoma of the ovary. *Obstet Gynecol.* 1998;91(5 Pt 2):846–848.
20. Pautier P, Ribrag V, Duvillard P, et al. Results of a prospective dose – intense regimen in 27 patients with small cell carcinoma of the ovary of the hypercalcemic type. *Ann Oncol.* 2007;18(12):1985–1989.

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

Nové biomarkery v diagnostike IgA nefropatie

MUDr. Eva Ďurovcová, PhD.

Medirex, a. s., Košice

IgA nefropatia sa v súčasnosti považuje za autoimunitné ochorenie so špecifickým autoantigénom (galaktozyl-deficientné IgA1), špecifickými autoprotilátkami (IgG a IgA1), tvorbou imunokomplexov s ich následným ukladaním do mezangia a zápalovým poškodením glomerulov. Do patogenézy ochorenia zasahujú aj iní hráči vrátane genetiky, vonkajších faktorov a interakcie viacerých prítomných rizík. Nové poznatky sa postupne aplikujú v klinickej praxi, najmä v podobe stanovenia sérových biomarkerov u pacientov s IgA nefropatiou.

Kľúčové slová: IgA nefropatia, autoimunitné ochorenie, galaktozyl-deficientné IgA1, diagnostický marker

New diagnostic biomarkers in IgA nephropathy

IgA nephropathy has been clearly identified as an autoimmune disease with a unique autoantigen (galactose-deficient IgA1) specific autoantibodies (IgG and IgA1), and the formation of circulating immune complexes followed by their mesangial deposition and inflammatory damage of glomeruli. There are many other players involved into pathogenesis of the disease including genetics, environmental factors, and multiple hazards interaction. The application of that new knowledge is gradually spreading into clinical practice particularly in the form of serum biomarkers measurement in patients with IgA nephropathy.

Key words: IgA nephropathy, autoimmune disease, galactose-deficient IgA1, laboratory biomarker

NewsLab, 2016; roč. 7(2): 129–130

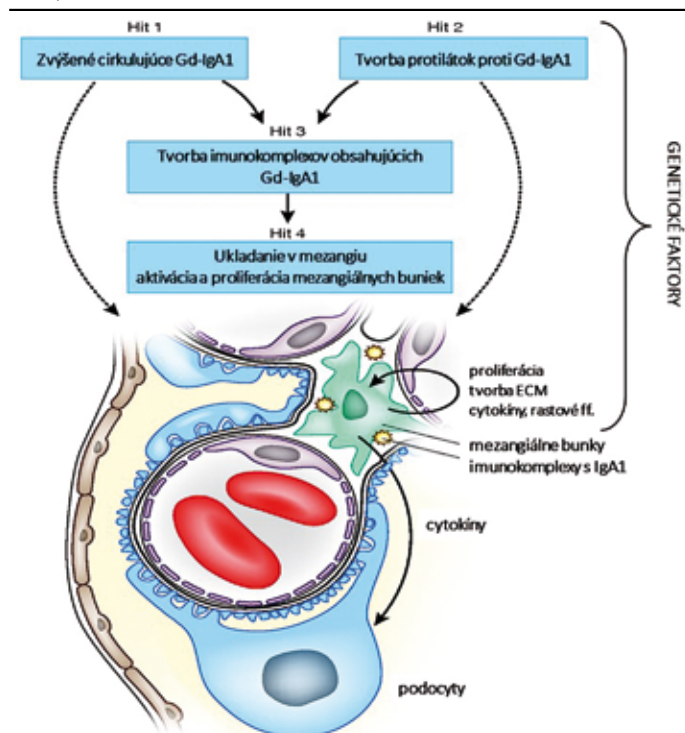
Úvod

IgA nefropatia (IgAN), po prvýkrát opísaná v roku 1968 ako Bergerova choroba, je celosvetovo najčastejšou primárnou glomerulonefritídou. U 20 – 40 % pacientov ochorenie v priebehu 20 rokov progreduje do chronického zlyhania obličiek. Na diagnózu je potrebná renálna biopsia s imunofluorescenčným vyšetrením, ktoré potvrdí prítomnosť depozitov komplexov IgA1 s IgG a zložkami komplementu v mezangiu glomerulov (1). Viac ako 50 % pacientov má zvýšené sérové koncentrácie IgA a cirkulujúcich imunokomplexov obsahujúcich IgA. Ochorenie sa prejavuje intermitentnou makroskopickou hematúriou a vo väčšine prípadov miernou proteinúriou (do 1 g/deň), ktoré slúžia aj ako indikátory aktivity ochorenia až do stanovenia diagnózy (2). Špecifické neinvazívne biomarkery sa pre toto ochorenie rutinne nepoužívajú.

Patogenéza

IgAN má známky autoimunitného ochorenia, v ktorom sú autoantigén aj autoprotilátka odvodené z rovnakej bunkovej línie (CD19+ B-lymfocyty). V centre viacerých patogenických faktorov stojí aberantná glykozylácia pántovej oblasti IgA1, ktorá je spôsobená väčšinou genetickými defektmi buniek produkujúcich IgA (3). Výsledkom sú polymérne molekuly IgA1 chudobné na galaktózu, ktoré sú rozpoznávané prirodzenými autoprotilátkami (oligoklonové IgG a možno aj IgA1) a u disponovaných jedincov vedú k tvorbe cirkulujúcich imunokomplexov. Tieto sa ukladajú v mezangiu glomerulov a ich unikátne chemické zloženie a trojrozmerná štruktúra spúšťajú kaskádu zápalových mediátorov ústiacu do poškodenia glomerulov (obrázok 1) (4).

Obrázok 1. Predpokladaná patogenéza IgA nefropatie – mechanizmus viacerých úderov (Upravené podľa: Suzuki H, et al. *JASN*. 2011;22:1795–1803.)



Vysvetlivky: Hit 1 – 4 predstavujú tvorbu nefritogénnych cirkulujúcich imunokomplexov, ich depozíciu v mezangiu a aktiváciu zápalu s následným poškodením glomerulov (plné čiary). Alternatívna teória predpokladá priame ukladanie aberantne glykozylovaných IgA1 do mezangia a tvorbu imunokomplexov in situ (prerušované čiary).

Potenciálne nové diagnostické a prognostické markery

Zlatým štandardom diagnostiky aj posúdenia aktivity ochorenia je obličková biopsia, ktorú však mnohokrát nemožno vykonať pre riziká s ňou spojené a tiež z etických či sociálno-ekonomických dôvodov. Hľadajú sa preto novšie citlivé a neinvazívne markery, ktoré by boli prínosom pri terapeutických rozhodnutiach v každom štádiu IgAN. V roku 2007 Moldoveanu et al. vyvinuli sérologický test na kvantifikáciu **galaktozyl-deficientnej formy IgA1** (Gd-IgA1), ktorý bol založený na špecifickej väzbe slimačieho lektínu (*Helix aspersa*) s acetyl-galaktozaminom v pántovej oblasti IgA1. Autori zistili, že sérové hladiny Gd-IgA1 mali 77 % senzitivitu a 94 % špecificitu pri odlíšení pacientov s IgAN a zdravých jedincov (5). Metódu s použitím lektínu využívali viacerí autori v základnom aj klinickom výskume. Berthoux et al. deklarovali, že koncentrácie Gd-IgA1 a imunokomplexov Gd-IgA1/IgG môžu mať prediktívnu hodnotu pri sledovaní progresie IgAN do štádia obličkového zlyhania (6). Iní autori sledovali sérové koncentrácie Gd-IgA1 a ich cirkulujúcich imunokomplexov ako neinvazívny marker na posúdenie aktivity ochorenia a našli ich dobrú koreláciu s hematúriou a proteinúriou (7). V súčasnosti sú dostupné ELISA testy využívajúce monoklonové protilátky proti Gd-IgA1, ktoré deklarujú väčšiu robustnosť a stabilitu v porovnaní s lektínovými metódami (8).

Iným študovaným markerom je **CD89, solubilný receptor pre IgA** (sCD89), exprimovaný na povrchu monocytov a makrofágov, ktorý v cirkulácii viaže imunokomplexy Gd-IgA1 – IgG alebo Gd-IgA1 – IgA. Tento trimolekulový komplex sa po väzbe s transferínovým receptorom (TfR) ukladá v mezangiu a prispieva k depozitom a zápalovému poškodeniu glomerulov. Uvoľňovanie sCD89 z povrchu cirkulujúcich myeloidných buniek nastáva na začiatku celého patogenetického procesu a mohlo by byť včasným indikátorom relapsu ochorenia po transplantácii (9).

Záver

Patologická glykozylácia IgA s tvorbou degalaktozovaných polymérnych molekúl IgA1 je jedným z kľúčových faktorov v patogenéze vzniku a progresie IgAN. Na klinickú manifestáciu nefritídy sú však potrebné ďalšie autoimunitné procesy modulované genetickými aj environmentálnymi

faktormi. Novšie neinvazívne biomarkery, ktoré sa priebežne validujú v klinických štúdiách, predstavujú sľubný neinvazívny prostriedok na identifikáciu rizikových jedincov, na diagnostiku ochorenia, sledovanie jeho aktivity a progresie v rôznych štádiách ochorenia.

Literatúra

1. Catran DC, et al. The Oxford classification of IgA nephropathy: rationale, clinicopathological correlations, and classification. Working Group of the International IgA Nephropathy Network and the renal Pathology Society [online]. *Kidney Int.* 2009;76(5):534–5. Available from: <<http://www.kidney-international.org/article/S0085-2538%2815%2954011-8/pdf>>. Accessed April 21, 2015.
2. Goto M, Wakai K, Kawamura T, et al. A scoring system to predict renal outcome in IgA nephropathy: a nationwide 10-year prospective cohort study. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24:3068–74.
3. Suzuki H, Moldoveanu Z, Hall S, et al. IgA1-secreting cell lines from patients with IgA nephropathy produce aberrantly glycosylated IgA1. *J Clin Invest.* 2008;118:629–639.
4. Novak J, Tomana M, Matoušovic K, et al. IgA1-containing immune complexes in IgA nephropathy differentially affect proliferation of mesangial cells [online]. *Kidney Int.* 2005;67(2):504–513. Available from: <<http://www.kidney-international.org/article/S0085-2538%2815%2950485-7/pdf>>. Accessed April 21, 2015.
5. Moldoveanu Z, Wyatt RJ, Lee JY, et al. Patients with IgA nephropathy have increased serum galactose-deficient IgA1 levels [online]. *Kidney Int.* 2007;71:1148–1154. Available from: <<http://www.kidney-international.org/article/S0085-2538%2815%2952272-2/pdf>>. Accessed April 21, 2015.
6. Berthoux F, Suzuki H, Thibaudin L, et al. Autoantibodies targeting galactose-deficient IgA1 associate with progression of IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23:1579–87.
7. Suzuki Y, Matsuzaki K, Suzuki H, et al. Serum levels of galactose-deficient immunoglobulin (Ig) A1 and related immune complex are associated with disease activity of IgA nephropathy. *Clin Exp Nephrol.* 2014;18:770–777.
8. Yasutake J, Suzuki Y, Suzuki H, et al. Novel lectin-independent approach to detect galactose-deficient IgA1 in IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2015;30:1315–1321.
9. Berthelot F, Robert T, Vuiblet V, et al. Recurrent IgA nephropathy is predicted by altered glycosylated IgA, autoantibodies and soluble CD89 complexes [online]. *Kidney Int.* 2015;88:815–822. Available from: <<http://www.kidney-international.org/article/S2157-1716%2815%2932243-7/pdf>>. Accessed May 2, 2016.



MUDr. Eva Ďurovcová, PhD.

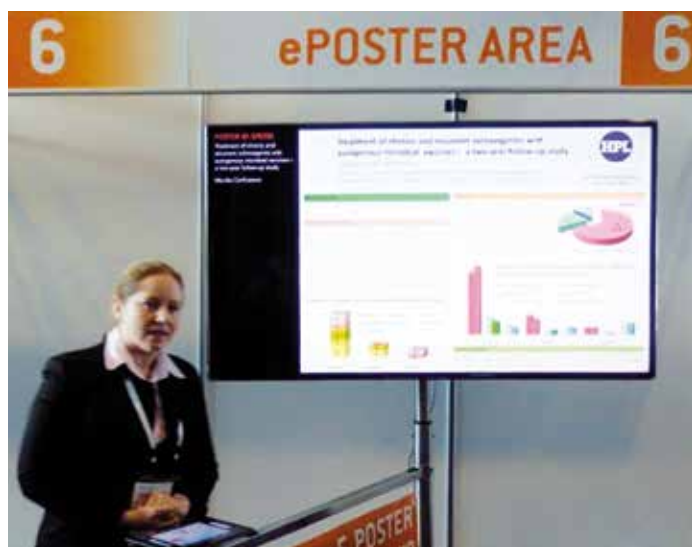
Medirex, a. s.
Magnezitárska 2/C, 040 13 Košice
eva.durovcova@medirex.sk

Európsky kongres klinických mikrobiológov a infektológov v Amsterdame – prezentácia našich výsledkov

MUDr. Monika Czirfuszová, PhD.

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

NewsLab, 2016; roč. 7(2): 131



Európsky kongres klinických mikrobiológov a infektológov – ECCMID, je každoročne najväčším odborným podujatím pre lekárov, laboratórnych pracovníkov, vedcov a výskumníkov v oblasti mikrobiológie a infekčných chorôb. Na tohoročnom v poradí 26. ECCMID bola opäť rekordne vysoká účasť – prišlo celkovo 11 640 účastníkov zo 123 štátov sveta. Štvordňový program pozostával zo 113 prednáškových blokov, zo 615 elektronických posterov prezentovaných ústne, z ďalších 985 elektronických posterov bez ústnej prezentácie a z 1 761 papierových posterov vystavených počas kongresu.

V rámci prednáškových blokov boli vzdelávacie workshopy zamerané na konkrétnu oblasť alebo aktuálnu problematiku, stretnutia s expertmi a rôzne sympóziá. Bližšie informácie o podujatí nájdete na webovej stránke <http://www.eccmid.org/>.

Po predchádzajúcej aktívnej účasti pred dvomi rokmi na 24. ECCMID v Barcelone, kde sa nám podarilo prvýkrát odprezentovať poster s predbežnými výsledkami liečby chronických a recidivujúcich kolpitíd autovakcínami, sa nám tentokrát podarilo prebojovať medzi elektronické postery s ústnou prezentáciou. Náš poster s názvom „Treatment of chronic and recurrent vulvovaginitis with autogenous microbial vaccines – a two year follow-up study“ po posúdení tromi nezávislými recenzentmi zaradili do elektronickej posterovej sekcie s názvom „Vaccine research news between microbiota, seroprotection and attitudes“ pod číslom EP0250. Sekciu moderovala Hanna M. Nohynek, expertka na vakcináciu z Helsínk. Poster som prezentovala v anglickom jazyku s 5 – 6-minútovým stručným prejavom, záujemcovia kládli 1 – 2 otázky.

Naša práca pozostávala z hodnotenia úspešnosti liečby súboru 61 pacientok liečených autovakcínami na chronické a recidivujúce kolpitídy počas rokov 2011 až 2013 a z hodnotenia ich zdravotného stavu počas dvoch rokov po ukončení liečby autovakcínami. U každej pacientky sme zaznamenávali informácie o zdravotnom stave a mikrobiologických kultivačných nálezochoch a hodnotili sme počet recidív, ktoré mali počas 10-mesačnej liečby a v období následného dvojročného sledovania. Štúdiu sme ukončili v októbri 2015. Do skupiny úspešne liečených pacientok sme zaradili pacientky, ktoré nemali recidívu alebo mali len jednu recidívu počas 10 mesiacov liečby autovakcínami (skupina S). Pacientky, ktoré mali 2 recidívy počas liečby, sme zaradili do skupiny čiastočne úspešne liečených (skupina P). Pacientky, ktoré mali 3 a viac recidív, sme zaradili do skupiny neúspešne liečených (skupina F). Na konci 10-mesačnej liečby sme mali 41 (67,21 %) úspešne liečených pacientok (skupina S), 12 (19,67 %) čiastočne úspešne liečených (skupina P) a 8 (13,12 %) neúspešne liečených pacientok (skupina F). Následne po ukončení liečby v prvom aj v druhom roku sledovania sme hodnotili počet recidív v jednotlivých skupinách pacientok. Ukázalo sa, že u 70 – 78 % pacientok skupiny S pretrvával výrazne zlepšený zdravotný stav počas 2 rokov po skončení liečby. Väčšina pôvodne čiastočne úspešne liečených (skupina P) a dokonca niekoľko pacientok z pôvodne neúspešne liečených (skupina F) bolo tiež bez recidív alebo maximálne s jednou recidívou počas dvojročného sledovania. Celkový podiel pacientok bez recidív alebo s jednou recidívou počas 1. roka sledovania bolo 67,21 % a v 2. roku 68,85 %.

Zistili sme, že táto forma liečby účinne redukuje počet recidív bakteriálnych a mykotických kolpitíd. Napriek tomu, že liečba autovakcínami je historicky zaužívaná liečebná metóda chronických infekcií odolávajúcich antimikrobiálnej liečbe v okolitých štátoch, ako sú Česká republika, Rumunsko, Poľsko, náš príspevok bol jediný, ktorý sa zaoberal touto problematikou. V odborných kruhoch sa však stále intenzívnejšie zdôrazňujú problémy spôsobené nedostatočnou účinnosťou antimikrobiálnej terapie a hľadajú sa alternatívne riešenia. Aj to môže byť dôvodom, prečo nám dali priestor na takom dôležitom podujatí, a bolo pre nás čťou a potešením prezentovať naše výsledky aj v zahraničí. Poster je dostupný na webovej stránke: <http://eccmidlive.org/#resourcegroups/query=ep0250>.

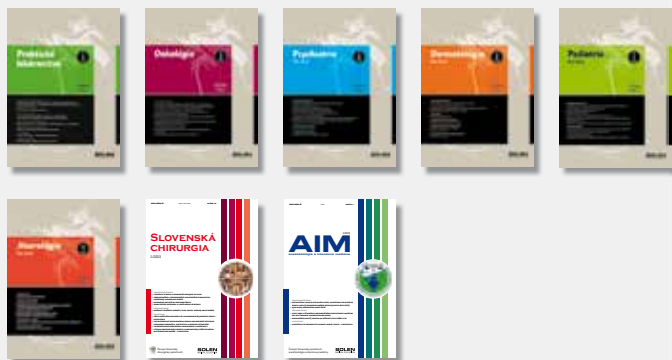


MUDr. Monika Czirfuszová, PhD.

Oddelenie klinickej mikrobiológie
HPL, spol. s r. o.
Mederčská 39, 945 01 Komárno
czirfuszova@hpl.sk

Odborné časopisy

Vydávame



Distribuuujeme



Internetové stránky
časopisov, archív,
sociálne siete
Facebook, Twitter,
Linked In



WWW.SOLEN.SK



Reprinty, edukačné
materiály, knihy
a odborné publikácie

Kongresy, semináre,
podujatia na klúč
a technické zabezpečenie



KMEŇOVÉ BUNKY V KLBOCH – ODBORNE UŽ AJ NA SLOVENSKU

Bunková terapia vlastnými bunkami stromálnej vaskulárnej frakcie (SVF) s obsahom mezenchymálnych kmeňových buniek je novinkou v liečbe artrózy, ktorá je od minulého roka dostupná aj na Slovensku v Nemocnici Malacky. Na liečbu sa využívajú kmeňové bunky získané z tukového tkaniva, spravidla z oblasti brucha.

PRINCÍP LIEČBY

Kmeňové bunky podporujú regeneráciu a hojenie spojivového tkaniva, pričom dochádza k novotvorbe vnútroklbovej tekutiny a chrupky. Čím je stupeň artrózy nižší, tým je táto metóda v reparácii chrupky účinnejšia.

ČO KMEŇOVÉ BUNKY DOKÁŽU

Bunky stromálnej vaskulárnej frakcie (SVF) s vysokým obsahom mezenchymálnych kmeňových buniek:

- ➔ sú schopné diferencovať sa na špecializované bunky spojivového tkaniva,
- ➔ podporujú opätovný rast zdravého tkaniva,
- ➔ majú imunomodulačné a protizápalové vlastnosti,
- ➔ spomaľujú degeneratívne zmeny a procesy starnutia,
- ➔ napomáhajú udržiavaniu aktívneho stavu spojivového tkaniva, pričom dochádza k tvorbe vnútroklbovej tekutiny a chrupky.

Posúdenie vhodnosti pacienta musí prebehnúť na základe predchádzajúceho MR vyšetrenia – kvôli bližšej charakteristike stavu chrupiek – defekty, ich veľkosti, plošné zúženie, popis jednotlivých chrupiek v jednotlivých kompartmentoch kĺbu a ostatných mäkkých tkanív v danom kĺbe. Pri patologickom náleze v oblasti mäkkých tkanív je potrebné riešenie i tohto nálezu (najčastejšie cestou ASK).

VÝSLEDKY LIEČBY KLBOV KMEŇOVÝMI BUNKAMI

Vo svete aj na Slovensku dosahujú unikátne čísla. Viac ako 60 % pacientov zaznamenalo zlepšenie stavu, čo dokázali aj MR vyšetrenia, na ktorých sa preukázala regenerácia chrupky a zníženie edémových subchondrálnych škvrn. Protizápalové účinky liečby nastupujú už po 10 dňoch od zákroku.

Liečbu na Slovensku v Nemocnici Malacky absolvovalo aj s následnou starostlivosťou a kontrolnými MR snímkami 127 pacientov. Vyše 77 % z nich po 6 mesiacoch od zákroku pociťovali zníženie bolestivosti kĺbu. Až 66 % potvrdilo zlepšenie pohyblivosti kĺbu a vyše 39 % z nich prestalo úplne užívať lieky proti bolesti.

NEMOCNICA MALACKY SPOLUPRACUJE S ODBORNÍKMI NA MEDZINÁRODNEJ ÚROVNI

Nemocnica Malacky, ako jediné medicínske zariadenie na Slovensku, spolupracuje so spoločnosťou Blue Horizon International, ktorá je nositeľom technológie spracovania a izolácie kmeňových buniek z tukového tkaniva. Nemocnica Malacky okrem iného disponuje špičkovým centrom rádiodiagnostiky s najmodernejším prístrojovým vybavením, ako je magnetická rezonancia, CT a pod.

BEZPLATNÉ CALL CENTRUM MEDIREX GROUP

MEDIREX GROUP
všetko pre vaše zdravie



HĽADÁTE DÔLEŽITÉ
INFORMÁCIE?

POTREBUJETE ODBORNÉ
KONZULTÁCIE?

CHCETE NAHLÁSIŤ
VÝSLEDKY VYŠETRENÍ?

POTREBUJETE DOOBJEDNAŤ
VYŠETRENIA?

POMÔŽEME VÁM
VYRIEŠIŤ NEJASNOSTI?

ŽELÁTE SI PREPOJIŤ
NA NAŠE PRACOVISKÁ?

VYUŽITE BEZPLATNÉ SLUŽBY NÁŠHO CALL CENTRA:

MEDIREX

0800 00 30 30

Pracovné dni: 7.00 h – 16.30 h

MEDICYT

0800 00 30 90

Pracovné dni: 7.00 h – 15.00 h

callcentrum@medirexgroup.sk

V prípade potreby poskytnutia informácií týkajúcich sa statimových vyšetrení po 16.30 h
a počas víkendov môžete kontaktovať priame telefónne linky našich pohotovostných prevádzok laboratórií.

Všetko pre Vaše laboratórium....

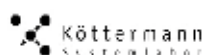
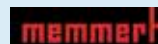
ponúkame:

- laboratórne sklo,
- nábytok,
- prístroje a zariadenia,
- chemikálie, štandardy a špeciálne reagenty,
- osobné ochranné prostriedky,
- spotrebný materiál (plasty),
- služby a riešenia pre Vaše nové laboratórium,
- riešenia pre optimalizáciu obnovy Vášho pôvodného laboratória,

VWR International, spoľahlivý partner pre Vaše laboratórium...



eppendorf
In touch with life



Má mama Emu?

Molekulárny test
na určenie
pohlavia plodu

**Neinvazívna prenatálna genetická detekcia
pohlavia plodu z krvi tehotnej ženy**
je dostupná na celom Slovensku:



jednoducho
zo vzorky krvi



skoro
odber krvi
od 10. týždňa



rýchlo
výsledok spravidla
do 5 pracovných dní



spoľahlivo
s presnosťou
vyšetrenia 99,5%

* V prípade, že je odber krvi realizovaný v 10. a 11. týždni tehotenstva, bude lehota na vydanie výsledku vyšetrenia primerane predĺžená. V súlade s uznesením Etickej komisie MZ SR môže laboratórium poskytnúť informáciu o pohlaví plodu až po ukončení 12. týždni tehotenstva.

Bezplatné CALL CENTRUM laboratórií Medirex 0800 00 30 30



www.babygen.sk

člen
MEDIREX GROUP
všetko pre vaše zdravie

BaBoY
Gen

World Leader in Acute Care Testing



ABL800 FLEX



ABL90 FLEX



AQT90 FLEX



TCM CombiM/400/Tosca



ABL



AQT

TCM

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

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

tcpO₂
tcpCO₂
SpO₂
Pulse rate

RADIOMETER s.r.o.

zastoupení pro ČR a SR

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

VYUŽÍVATE MODERNÚ DIAGNOSTIKU?



- Microarray a SureFISH sondy pre cytogenetiku a onkológiu
- certifikovaná Microarray pre In Vitro Diagnostiku
- HaloPlex, SureSelect a ClearSeq NGS riešenia pre prípravu vzorky na sekvenovanie v ten istý deň
- kontrola kvality vzoriek
- PCR, Real-Time PCR
- automatizácia pracovných postupov



TRISOMY*test*

ZDRAVIE PLODU NIE JE HÁDANKA

Príbeh vášho dieťaťa môžete rozlúštiť už dnes

TRISOMY test – spoľahlivý neinvazívny test na vylúčenie Downovho syndrómu a ďalších častých trizómií plodu z krvi matky

VYLÚČI

prítomnosť trizómií chromozómov 21, 18, 13

ODHALÍ

falošne pozitívne výsledky biochemického skríningu

MINIMALIZUJE

počet nutných amniocentéz

URČÍ

pohlavie plodu

SPOLIAHLIVO

s vysokou citlivosťou

BEZPEČNE

bez rizika pre plod

BEZBOLESTNE

z krvi matky

SKORO

už od 11. týždňa tehotenstva*

www.trisomytest.sk

*V súlade s uznesením Etickej komisie MZ SR poskytuje laboratórium výsledok analýzy až po ukončení 12. týždňa tehotenstva.

www.medirexgroupacademy.sk
www.laboratornadiagnostika.sk

