

Ročník VIII.

newslab

časopis laboratórnej medicíny

2
2017

**Poruchy plodnosti: imunologické príčiny a možnosti
liečebného ovplyvnenia**

Fertility disorders: immunological causes and possible
curative impact

**Prvé skúsenosti so stanovením degalaktozylovaného
IgA1 v diagnostike a monitorovaní pacientov s IgA nefro-
patiou**

The first results of galactose-deficient IgA1 measurement
in diagnosis and monitoring of patients with IgA nephro-
pathy

**Využitie autovakcín v liečbe chronických a recidivujúcich
kolpitíd**

Application of autovaccines in the treatment of chronic and
recurrent colpitis

Infekcie bedrových endoprotéz

Infections of the hip endoprostheses

Neinvazívne markery pečenej fibrózy

Non-invasive markers of liver fibrosis

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

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

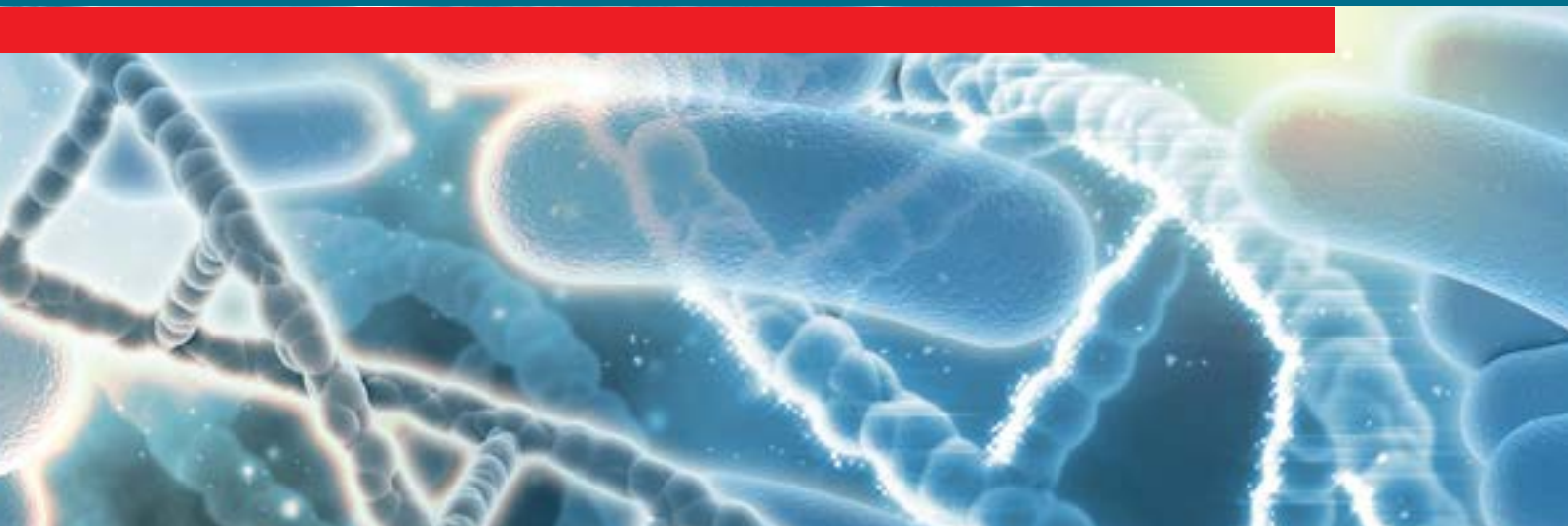
Časopis má pridelenú citačnú skratku, čo v praxi znamená, že autorom sa ich príspevky započítavajú do publikačnej činnosti. Zároveň je indexovaný v Bibliographia Medica Slovaca (BMS) a citácie sú spracované v CiBaMed.

Všetky uverejnené príspevky autorov sú recenzované a honorované.

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

Aktuálne vydanie nájdete na stránke www.newslab.sk.

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



Uplynul ďalší polrok a máme tu nové vydanie nášho časopisu. Od „obnovy“ Newslabu je to v poradí už tretie číslo, čo znamená že „nový“ Newslab už nie je žiadnou novinou, skôr pokračujúcim, fungujúcim odborným časopisom. Po „vyšumení“ novoty sa však niekedy prihodí, že sa veci stanú fádny. Úloha pripraviť úvodné slovo padla síce tentoraz na mňa, ale chcel by som vás uistiť v mene celej redakčnej rady, že sme v našej snahe priniesť vám, čitateľom, kvalitné a zaujímavé čítanie nepovolili napriek tomu, že už nerobíme niečo úplne nové. Preto pevne veríme, že ani toto vydanie nezaostáva za prvými dvoma číslami obnoveného Newslabu. Zároveň by sme sa chceli poďakovať autorom aj recenzentom aktuálne prinášaných príspevkov, keďže bez ich svedomitej práce by naša snaha bola úplne márna. Prirodzene ďakujeme každému, kto sa spolupodieľal na vytvorení tohto čísla, či už zo strany vydavateľa, z technickej, alebo z informatickej stránky. To, čo sa deje s konkrétnym číslom časopisu pred jeho vydaním, je teda hotové a jednotlivé výtlačky uzreli svetlo sveta... ak chceme, tak sa narodili. V determinácii postnatálneho osudu vydania je však teraz rad na vás, čitateľoch. Ak čítate tento text, tak to osobne považujem minimálne za čiastočný úspech, lebo sa k vám časopis dostal, zobrali ste si ho do ruky a čítate minimálne prvú stránku. Ak v tejto vašej aktivite budete pokračovať, myslím v listovaní a čítaní, bude to ďalší úspech tohto vydania. Ak pri čítaní vo vás vzkriesi myšlienku napísať vlastný príspevok do časopisu, bude to ešte väčší úspech. Pôvodné práce prinášajú vo väčšine prípadov zaujímavé dáta, špecifické pre slovenskú populáciu a slovenské pomery, ktoré budete vo svetových publikáciách márne hľadať. Ak nájdete takú informáciu, ktorá je použiteľná pre váš vlastný budúci príspevok, či už do Newslabu, alebo inam, neváhajte a nezabudnite prosím vás citovať zdrojový dokument, keďže citácie sú osobným úspechom každého autora a autorského kolektívu. Najväčší náš úspech však bude spočívať jednoznačne v tom, ak sa z prečítaných príspevkov dozviete niečo nové, zapamätáte si to a rozšíri to vaše vedomosti, aby ste sa stali ešte lepšími a ešte rozhladnutejšími odborníkmi v oblasti, v ktorej pracujete.



Teší nás preto, že aj v tomto čísle vám prinášame rôznorodé tematicky, v ktorých, ako pevne veríme, si každý čitateľ bude môcť nájsť niečo hodné a zaujímavé na prečítanie. Mikrobiológia vás bude oslovovať štyrmi príspevkami s témami od infekcie bedrových endoprotéz a mäkkých tkanív, cez diagnostiku syfilisu až po liečbu kolpitíd autovakcínami. Dozvedieť sa niečo nové budete môcť aj z oblasti imunológie, napríklad o význame autoprotílátok v neinvazívnej diagnostike autoimunitných ochorení, konkrétne systémovej sklerózy a IgA nefropatie, ale aj o imunologických príčinách porúch plodnosti. Neinvazívnej a preventívnej diagnostike pomocou vhodných biomarkerov sa však budeme venovať aj v iných prípadoch. Detekcii špecifických mikroRNA alebo kombinovanému hodnoteniu rôznych sérových markerov sme venovali články zamerané na problematiku preeklampsie alebo pečenej fibrózy.

Podľa nášho sľubu pokračujeme v pravidelných rubrikách „Novinky, názory a pohľady“ a „Uspeli sme v zahraničí“. Diagnostika, nielen laboratórna, má mnoho tvárí a rôzne úrovne. V prvej z uvedených rubriek sme sa snažili upriamiť pozornosť na pokroky v oblasti nositeľných medicínskych zariadení, populárne nazývaných *wearable devices* alebo jednoducho *wearables*, ktoré sú už teraz bezpochyby neoddeliteľnou súčasťou komplexného medicínskeho diagnostického postupu. Ako sa budete môcť dozvedieť z príslušnej rubriky, tieto zariadenia sa dostávajú do nášho tela – a tak aj do diagnostickej medicínskej praxe – čoraz hlbšie a hlbšie. V druhej rubrike dávame do pozornosti postrehy našich kolegov z 27. ročníka Európskeho kongresu klinickej mikrobiológie a infekčných chorôb (ECCMID 2017).

Na záver úvodu mi teda nezostáva nič iné, ako sa vám poďakovať hneď za niekoľko vecí. Po prvé za to, že ste si toto nové číslo vzali do rúk. Tiež za chvíľku, ktorú ste venovali prečítaniu tohto editoriálu, a za ešte viac času, ktorý, ako dúfame, budete môcť a chcieť venovať čítaniu zvyšnej časti jesenného vydania Newslabu.

RNDr. Ján Radvánszky, PhD.

Pôvodné práce

Poruchy plodnosti: imunologické príčiny a možnosti liečebného ovplyvnenia 73

PharmDr. Mária Ondrejčíková
RNDr. Elena Tibenská, PhD.
MUDr. Katarína Bergendiová, PhD.

Prvé skúsenosti so stanovením degalaktozylovaného IgA1 v diagnostike a monitorovaní pacientov s IgA nefropatiou 78

MUDr. Lenka Oravcová
MUDr. Tatiana Baltosová, PhD.
MUDr. Jaroslav Rosenberger, PhD.
RNDr. Marcela Popovňáková
MUDr. Mariana Toperczerová

Využitie autovakcín v liečbe chronických a recidivujúcich kolpitíd 83

MUDr. Monika Czirfuszová, PhD.
RNDr. Gabriela Bertaová

Laboratórna diagnostika syfilisu 90

RNDr. Tatiana Kopilcová

Prehľadové práce

Využitie nepriamej imunofluorescencie pri detekcii autoprotílátok asociovaných so systémovou sklerózou 94

Mgr. Simona Duranková

Neinvazívne markery pečenej fibrózy 100

MUDr. Eva Ďurovcová, PhD.
MUDr. Lenka Oravcová

Anaeróbne infekcie mäkkých tkanív 105

MUDr. Eva Csölleyová
MUDr. Štefan Jacák
MUDr. Monika Czirfuszová, PhD.

Preeklampsia v súvislosti s exozómami a mikroRNA 110

Mgr. Lucia Striešková
Mgr. Martina Belková

Ovarian cancer: a short review 114

RNDr. Miroslav Tomka, PhD.

Kazuistika

Infekcie bedrových endoprotéz 118

MUDr. Štefan Jacák
MUDr. Ján Kayser

Novinky, názory a pohľady

Nositel'né medicínske zariadenia budúcnosti... možno nie až takej ďalekej... 123

RNDr. Ján Radvánszky, PhD.

Uspeli sme v zahraničí

Európsky kongres ECCMID 2017 a slovenskí parazitológovia 126

RNDr. Vojtech Boldiš, PhD.

Ročník 8, 2017, číslo 2

Vychádza 2 x ročne

Dátum vydania: september 2017

Redakčná rada:

Šéfredaktorka:

RNDr. Elena Tibenská, PhD.

Členovia:

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

Vydavateľ:

MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o.

Sídlo vydavateľa a adresa redakcie:

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

Výkonná redaktorka:

Mgr. Slavomíra Šindelářová

Technická redaktorka:

Ing. Danica Paulenová

Grafická úprava:

Lucia Vecseiová

Všetky články sú plne recenzované.

Registrácia MK SR pod číslom EV 5164/15

ISSN 1338-9661 (tlačené vydanie)

ISSN 2454-0021 (online)

Časopis je indexovaný v Bibliographia Medica Slovaca (BMS).

Citácie sú spracované v CIBaMed.

Citacia skratka: newslab

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

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

Poruchy plodnosti: imunologické príčiny a možnosti liečebného ovplyvnenia

PharmDr. Mária Ondrejčíková¹, RNDr. Elena Tibenská, PhD.², MUDr. Katarína Bergendiová, PhD.³

¹Lekáreň Kvačalova, Bratislava

²Medirex, a. s., Bratislava

³ImunoVital Centrum, Bratislava

Cieľom práce bolo porovnať vybrané patologicky zvýšené imunologické parametre u pacientok s poruchami plodnosti pred liečbou a po liečbe tromi skúšanými liekmi a na základe výsledkov navrhnúť liečivá prvej voľby pri rôznych imunopatologických stavoch. V súbore 81 pacientok sme sledovali produkciu IFN- γ a TNF v bunkách s povrchovými markermi CD3⁺ aj CD3⁺CD4⁺, pomer T_H1-/T_H2-lymfocytov, percento NK-buniek a hodnoty antifosfolipidových protilátok (APA) pred liečbou a po 6 – 12 týždňoch liečby, v ktorej sme použili buď liek Subcuvia (imunoglobulíny), Dexamed (dexametazón) alebo Medrol (metylprednizolón). Najvýraznejšie zníženie zvýšených hodnôt IFN- γ sa dosiahlo pri liečbe metylprednizolónom. Pri zvýšených hodnotách TNF aj NK-buniek boli pozorované najlepšie výsledky pri liečbe kortikosteroidmi. Zvýšené hodnoty APA sa najefektívnejšie upravili pri liečbe dexametazónom a imunoglobulínmi.

Kľúčové slová: poruchy plodnosti, subkutánne imunoglobulíny, dexametazón, metylprednizolón, antifosfolipidové protilátky

Fertility disorders: immunological causes and possible curative impact

The aim of this study was to compare selected pathologically increased immunological parameters in infertile women before and after therapy with three tested drugs and in accordance with acquired results to propose the first-line drugs in various immunopathologic states. In the group of 81 patients, we compared IFN- γ and TNF levels in the cells with CD3⁺ and CD3⁺CD4⁺ markers, T_H1/T_H2 lymphocyte balance, percentage of NK cells and antiphospholipid antibodies (APA) levels before the therapy and after 6 – 12 week-treatment with the prepareate Subcuvia (immunoglobulins), Dexamed (dexamethasone) or Medrol (methylprednisolone). Methylprednisolone achieved the highest reduction of increased IFN- γ levels. When examining TNF levels and NK cell levels, the best results were observed in both cases after treatment with corticosteroids. Increased levels of APA were most effectively reduced with dexamethasone and immunoglobulins.

Keywords: reproductive disorders, subcutaneous immunoglobulins, dexamethasone, methylprednisolone, antiphospholipid antibodies.

NewsLab, 2017; roč. 8 (2): 73 – 77

Úvod

Príčiny patologického priebehu tehotenstva môžu byť rôzne. Po vylúčení genetickej, hormonálnej, anatomickej, infekčnej a hematologickej príčiny poruchy plodnosti sa testuje prítomnosť patologických mechanizmov imunitného systému. Tie zodpovedajú až za 40 – 60 % neobjasnených prípadov porúch plodnosti. Často sa na neplodnosti podieľa niekoľko faktorov súčasne. Imunitný systém má výraznú úlohu pri intolerancii plodu najmä u pacientok s už rozvinutým systémovým patoimunologickým stavom (imunodeficiencie, alergie, autoimunitné ochorenia). Reprodukčná schopnosť môže byť zasiahnutá abnormálne regulovanými funkciami na rôznych úrovniach. V zárodočných tkanivách muža aj ženy môže byť prítomná akútna aj chronická zápalová reakcia, ktorej výsledkom je lokálne znížená tolerancia semialogénneho plodu. U žien môže byť príčinou infertility autoimunitná (napr. systémový lupus erythematosus) aj aloimunitná reakcia organizmu⁽¹⁾.

Aloimunitné reakcie vznikajú v dôsledku poruchy v regulácii imunitných efektorov, ktorej výsledkom je reakcia nami-

ená proti plodu namiesto navodenia tolerancie. Dôležitú úlohu pri neplodnosti má porušenie preklopenia pomeru T_H1-/T_H2-lymfocytov. Ak sa hladina T_H2-lymfocytov a cytokínov nimi produkovaných (najmä IL-4) nezvýši na úroveň, ktorá dokáže zabezpečiť utlmenie embryotoxickéj aktivity T_H1-lymfocytov a ich efektorov, významne sa zvyšuje riziko odvrhnutia plodu materským organizmom. T_H1-lymfocyty produkujú cytokíny, ktoré aktivujú ďalšie efektoary namierené proti plodu. Spomedzi nich je výrazná aktivácia NK-buniek a makrofágov. Z cytokínov, ktoré produkujú T_H1-lymfocyty, má významnú úlohu pri aktivácii embryotoxických efektorov najmä IL-1 a IFN- γ . IFN- γ je okrem priameho toxického pôsobenia na plod schopný aktivovať trofoblast na tvorbu HLA-znakov. Zvýraznený povrch trofoblastu je potom jednoduchší terč pre protilátky aj bunky s cytotoxickým pôsobením⁽¹⁾. T_H1-lymfocyty produkujú aj IL-2 a TNF, ktoré spolu s IFN- γ pôsobia embryotoxicky, t. j. poškodzujú endotel cievneho zásobenia plodu. TNF pôsobí ako stimulátor programovanej smrti buniek vilózneho trofoblastu. IFN- γ spôsobuje deštrukciu buniek trofoblastu mediovaných TNF⁽²⁾. Spomínané mechanizmy

rezultujú do prokoagulačných procesov, ktoré sa končia trombózou, ischémiou a smrťou plodu.

Autoimunitné reakcie môžu prebiehať proti zárodočným bunkám pohlavného systému žien aj mužov. Neplodnosť mužov môže byť zapríčinená autoprotiilátkami proti spermiami aj imunitnými celulárnymi mechanizmami namierenými proti spermiami. U žien s poruchami plodnosti sa môžu nachádzať autoprotiilátky proti ováriám, zona pellucida a protiilátky proti spermiami. Z autoimunitných procesov, ktoré poškodzujú priamo plod, je najčastejší antifosfolipidový syndróm (APS). Pri APS sa vyskytujú v tele ženy antifosfolipidové protiilátky proti β 2-glykoproteínu I, ktorý je súčasťou membrán cievneho endotelu, protiilátky proti anexínu V a množstvo iných. Aktivita antifosfolipidových protiilátok spočíva v poškodzovaní ciev v deciduu a placentе, čo má za následok trombotické príhody a miestne infarkty⁽³⁾.

Pre každý z týchto stavov je potrebné stanoviť najefektívnejšiu liečbu. V súčasnosti sa najčastejšie využíva liečba imunoglobulínmi alebo kortikosteroidmi. Každá z nich však nesie negatíva; imunoglobulíny sú nákladné a nie vždy sa nimi dosiahne uspokojivý účinok, na druhej strane kortikosteroidy majú široké spektrum nežiaducich účinkov, ktoré sa prejavujú u pomerne veľkého percenta užívateľov. Keďže neexistuje oficiálny algoritmus pre voľbu konkrétnej liečby pre dané problémy, lekári sa pri voľbe liečebnej schémy riadia skôr empiricky. Pri rastúcej incidencii porúch plodnosti je potrebné jednoznačne stanoviť, aké konkrétne liečivo a pri ktorých patologicky zvýšených parametroch bude metódou prvej voľby. Umožnilo by to rýchlejšiu a terapeuticky aj ekonomicky efektívnejšiu liečbu.

Metodika práce

V štúdiu sme spracovali údaje z chorobopisov pacientok, ktoré sa liečili v imunologickom centre ImunoVital od novembra 2014 do februára 2016. Súbor pozostával z 81 žien v reprodukčnom veku, ktoré trpeli poruchami plodnosti, t. j. spontánnymi opakovanými potratmi alebo neplodnosťou (neschopnosťou počať plod). Sledovaným pacientkam sa odobrala krv na komplexné imunologické vyšetrenie, na základe ktorého sme určili, ktoré parametre sa nachádzajú mimo referenčných hodnôt. Pacientky následne podstúpili jednu z troch skúšaných terapií: subkutánna aplikácia imunoglobulínov (liek Subcuvia), injekčná aplikácia dexameta-

zónu (Dexamed) alebo perorálna aplikácia metylprednizolónu (Medrol). Dĺžka terapie sa pohybovala v rozmedzí 6 – 12 týždňov. Po tomto čase nasledovalo kontrolné imunologické vyšetrenie tých parametrov, ktoré vykazovali pri vstupnom vyšetrení patologicky zvýšené hodnoty. Všetky laboratórne údaje sa získali z imunologického laboratória spoločnosti Medirex, a. s. V rámci analytickej časti práce sme pacientky rozdelili do troch skupín, pričom kritériami na zaradenie do danej skupiny boli v 1. skupine zvýšené hodnoty IFN- γ alebo TNF, v 2. skupine zvýšené percento NK-buniek a v 3. skupine zvýšené hodnoty antifosfolipidových protiilátok nad referenčné hodnoty. Imunologické parametre sme spracovali Studentovým párovým t-testom v programe Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft, USA). Následne sme sa snažili určiť, ktorá liečba sa javí ako najvhodnejšia na úpravu jednotlivých patologicky zvýšených parametrov na fyziologické hodnoty.

Výsledky

Na základe stanovenia intracelulárnej hladiny IFN- γ v bunkách s povrchovými znakmi CD3⁺ a CD3⁺CD4⁺ sme zistili, že pri bunkách s CD3⁺ znakmi došlo k štatisticky významnému zníženiu hladiny IFN- γ pri všetkých typoch liečby (Subcuvia: pokles priemerne o 2,23 percentuálneho bodu ($p = 0,026$), Dexamed: pokles o 3,74 percentuálneho bodu ($p = 0,0007$), Medrol: pokles o 4,6 percentuálneho bodu ($p = 0,004$)) a pri bunkách s povrchovými znakmi CD3⁺CD4⁺ sme zaznamenali štatisticky významný terapeutický efekt len pri liečbe Medrolom (pokles IFN- γ o 2,54 percentuálneho bodu ($p = 0,019$)). Prehľad výsledkov uvádzame v **tabuľke 1**.

V ďalšom kroku sme analogicky stanovili intracelulárne hodnoty TNF. Podávanie Subcuvia nejavilo štatisticky významné zníženie hladín TNF ($p > 0,05$). Po podávaní oboch kortikoidov došlo k štatisticky významnému poklesu hladín TNF (Dexamed: v bunkách so znakmi CD3⁺ pokles o 5,01 percentuálneho bodu ($p = 0,002$) a v bunkách s CD3⁺CD4⁺ znakmi pokles o 6,20 percentuálneho bodu ($p = 0,002$), Medrol: v bunkách s CD3⁺ znakmi pokles o 5,96 percentuálneho bodu ($p = 0,022$) a v bunkách so znakmi CD3⁺CD4⁺ pokles o 5,73 percentuálneho bodu ($p = 0,025$)). Prehľad výsledkov znázorňuje **tabuľka 2**.

Následne sme stanovili pomer T_{H1}/T_{H2} -lymfocytov, ktorý bol reprezentovaný pomerom cytokínov produkovaných T_{H1} -lymfocytmi (IFN- γ a TNF) k principiálnemu cytokínu

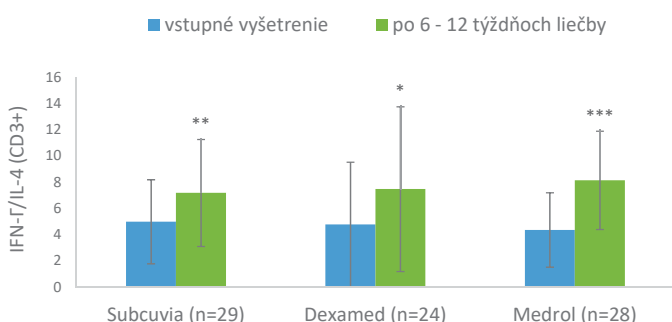
Tabuľka 1. Porovnanie intracelulárnej produkcie IFN- γ (CD3⁺ a CD3⁺CD4⁺) pred začiatkom liečby a po 6 - 12 týždňoch liečby liekmi Subcuvia, Dexamed a Medrol

IFN- γ (CD3 ⁺)	Subcuvia (n = 29)				IFN- γ (CD3 ⁺ CD4 ⁺)	Subcuvia (n = 29)			
	Priemer	Smer. odch.	Rozdiel	p-value		Priemer	Smer. odch.	Rozdiel	p-value
Vstupné vyšetrenie	33,30	± 6,45	-2,23	0,026	Vstupné vyšetrenie	25,05	± 7,28	0,33	0,351
Po 6 - 12 týždňoch liečby	31,07	± 6,54			Po 6 - 12 týždňoch liečby	25,38	± 7,22		
	Dexamed (n = 24)					Dexamed (n = 24)			
	Priemer	Smer. odch.	Rozdiel	p-value		Priemer	Smer. odch.	Rozdiel	p-value
Vstupné vyšetrenie	33,92	± 8,24	-3,74	0,0007	Vstupné vyšetrenie	25,12	± 8,46	0,6	0,341
Po 6 - 12 týždňoch liečby	30,18	± 8,74			Po 6 - 12 týždňoch liečby	25,72	± 10,69		
	Medrol (n = 28)					Medrol (n = 28)			
	Priemer	Smer. odch.	Rozdiel	p-value		Priemer	Smer. odch.	Rozdiel	p-value
Vstupné vyšetrenie	35,26	± 5,01	-4,6	0,004	Vstupné vyšetrenie	28,03	± 6,82	-2,54	0,019
Po 6 - 12 týždňoch liečby	30,66	± 7,28			Po 6 - 12 týždňoch liečby	25,49	± 7,06		

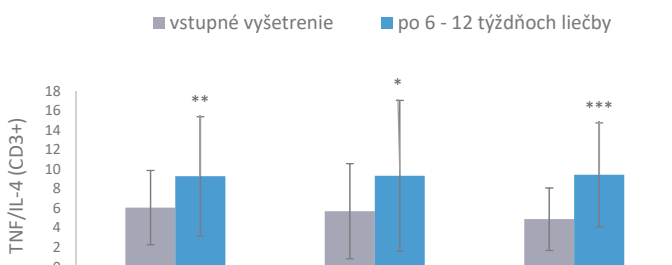
Tabuľka 2. Porovnanie intracelulárnej produkcie TNF (CD3⁺ a CD3⁺CD4⁺) pred začiatkom liečby a po 6 - 12 týždňoch liečby liekmi Subcuvia, Dexamed a Medrol

TNF (CD3 ⁺)	Subcuvia (n = 29)				TNF (CD3 ⁺ CD4 ⁺)	Subcuvia (n = 29)			
	Priemer	Smer. odch.	Rozdiel	p-value		Priemer	Smer. odch.	Rozdiel	p-value
Vstupné vyšetrenie	41,92	± 10,55	-2,80	0,079	Vstupné vyšetrenie	43,04	± 11,20	-3,12	0,086
Po 6 - 12 týždňoch liečby	39,12	± 9,32			Po 6 - 12 týždňoch liečby	39,92	± 10,54		
Dexamed (n = 24)					Dexamed (n = 24)				
	Priemer	Smer. odch.	Rozdiel	p-value		Priemer	Smer. odch.	Rozdiel	p-value
Vstupné vyšetrenie	41,07	± 10,08	-5,01	0,002	Vstupné vyšetrenie	42,92	± 10,41	-6,20	0,002
Po 6 - 12 týždňoch liečby	36,06	± 9,90			Po 6 - 12 týždňoch liečby	36,72	± 11,97		
Medrol (n = 28)					Medrol (n = 28)				
	Priemer	Smer. odch.	Rozdiel	p-value		Priemer	Smer. odch.	Rozdiel	p-value
Vstupné vyšetrenie	40,80	± 9,40	-5,96	0,022	Vstupné vyšetrenie	41,67	± 10,06	-5,73	0,025
Po 6 - 12 týždňoch liečby	34,84	± 11,32			Po 6 - 12 týždňoch liečby	35,94	± 11,67		

Graf 1. Porovnanie pomeru IFN- γ /IL-4 (CD3⁺) pred začiatkom liečby a po 6 - 12 týždňoch liečby liekmi Subcuvia, Dexamed a Medrol



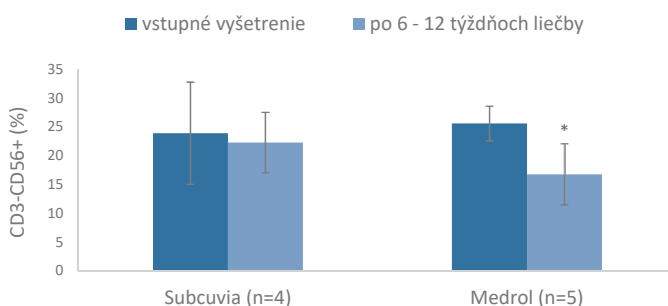
Graf 2. Porovnanie pomeru TNF/IL-4 (CD3⁺) pred začiatkom liečby a po 6 - 12 týždňoch liečby liekmi Subcuvia, Dexamed a Medrol



produkovanejmu T_H2-lymfocytm (IL-4). Pri sledovaní pomeru IFN- γ /IL-4 (CD3⁺) sme odhalili pri všetkých skúšaných liekoch štatisticky významné zvýšenie pomeru v prospech T_H1-lymfocytov (Medrol: nárast pomeru o 3,78 jednotky v prospech IFN- γ (p = 0,00002), Dexamed: nárast o 2,69 jednotky (p = 0,026), Subcuvia: nárast o 2,19 jednotky (p = 0,003) (**graf 1**). Analogicky sme postupovali aj pri bunkách nesúcich povrchové markery CD3⁺CD4⁺ (Medrol: nárast pomeru o 6,67 jednotky, Subcuvia a Dexamed nss (p > 0,05).

Ďalej sme sledovali pomer T_H1-/T_H2-lymfocytov prezentovaný cytokínmi TNF a IL-4 pri bunkách s CD3⁺ znakmi (Medrol: nárast pomeru TNF/IL-4 o 4,54 jednotky (p = 0,0001), Dexamed: nárast pomeru o 3,62 jednotky (p = 0,013), Subcuvia: nárast o 3,21 jednotky (p = 0,004)) (**graf 2**) a CD3⁺CD4⁺ znakmi (Medrol: nárast o 8,52 jednotky (p = 0,00003), Dexamed a Subcuvia nss (p > 0,05).

Graf 3. Porovnanie zastúpenia NK-buniek (CD3-CD56⁺) pred začiatkom liečby a po 6 - 12 týždňoch liečby liekmi Subcuvia a Medrol



Ďalším z cieľov štúdie bolo porovnať populáciu NK-buniek (CD3-CD56⁺). Dexamedom bola liečená iba jedna pacientka, preto sme ho nezahrnuli do štatistického spracovania dát (populácia NK-buniek pred liečbou 17,77 %, po liečbe pokles na 8,37 %). Významný bol pokles NK-buniek po liečbe Medrolom, priemerne pokles o 8,84 percentuálneho bodu (p = 0,011). Pri liečbe Subcuviou neboli pozorované štatisticky významné zmeny v populácii NK-buniek (**graf 3**).

V poslednej časti štúdie sme monitorovali hladiny antifosfolipidových protilátok (APA). Najvyššiu úspešnosť dosiahla liečba Dexamedom, ktorú podstúpilo 6 pacientok (n = 5 pokles APA na referenčné hodnoty, n = 1 bez odpovede). Liek Subcuvia sa podával 3 pacientkam (n = 2 pokles APA na fyziologické hodnoty, n = 1 bez odpovede). Perorálnym kortikosteroidom Medrol sa liečilo 9 pacientok (n = 4 úprava hladín APA na fyziologické, n = 5 bez odpovede).

Diskusia

Ako prvé sme u pacientok s imunologicky zapríčinenými poruchami plodnosti porovnávali hodnoty prozápalových T_H1 cytokínov (IFN- γ , TNF) pred liečbou a po 6 - 12 týždňoch liečby Subcuviou, Dexamedom a Medrolom. Dostupné zdroje uvádzajú, že vhodnými liečivami na zníženie hladín daných cytokínov sa zdajú imunoglobulíny a glukokortikoidy⁽⁴⁾. Z našich výsledkov vyplýva, že liečba metylprednizolónom (Medrol) má najvýraznejší efekt na zníženie zvýšených hodnôt IFN- γ . Zvýšené hodnoty TNF sa účinne znížili aplikáciou kortikosteroidov, pričom účinnosť dexametazónu a metylprednizolónu sa zdá podobná. Z výsledkov možno usudzovať, že pri zvýšených hodnotách T_H1 cytokínov je najvhodnejšia

liečba perorálne podávaným metylprednizolónom. Táto liečba je zároveň najlacnejšia a najjednoduchšie sa aplikuje, čo môže prispieť k zvýšeniu kompliance pacientok.

V ďalšej časti práce sme vytvorili pomer T_H1 -/ T_H2 -lymfocytov na základe pomeru cytokínov produkovaných týmito bunkami, t. j. pomer $IFN-\gamma/IL-4$ a $TNF/IL-4$. Dalo by sa očakávať, že keď jednotlivé liečivá znižujú hodnoty prozápalových T_H1 cytokínov, pomer T_H1 -/ T_H2 -lymfocytov sa bude znižovať. Výsledkom liečby však bolo vo všetkých prípadoch zvýšenie pomeru v prospech T_H1 -lymfocytov. Dá sa to vysvetliť tým, že aj keď hodnoty prozápalových cytokínov klesajú, hodnoty tlmivého $IL-4$ klesajú ešte výraznejšie. Je diskutabilné, či má zmysel sledovať pomer T_H1 -/ T_H2 -lymfocytov pred samotným počatím. Až do momentu oplodnenia je pre telo fyziologické, že T_H1 -lymfocyty v krvi prevládajú – svojím pôsobením zabezpečujú boj proti cudzorodým antigénom, ktorý je nevyhnutný na zachovanie integrity organizmu. Až po oplodnení nastáva fyziologické preklopenie pomeru v prospech tlmivých T_H2 -lymfocytov. Výsledky môžu byť nápomocné v prípadoch, keď sú okrem zvýšených T_H1 cytokínov zároveň znížené hodnoty T_H2 cytokínov. V týchto prípadoch je dôležité, aby liečba popri znižovaní prozápalových cytokínov nevedla k ešte výraznejšiemu prehĺbeniu deficitu tlmivých T_H2 cytokínov. Keďže pomer T_H1 -/ T_H2 -lymfocytov vo všetkých skupinách najmenej zvyšovala liečba imunoglobulínmi (Subcuvia), v týchto situáciách sa zdá vhodnou voľbou. Mimo týchto prípadov snahou zostáva čo najviac znížiť

T_H1 cytokíny, ktoré pre svoje embryotoxické pôsobenie predstavujú pre tehotenstvo väčšie riziko.

Najvýraznejšia redukcia zvýšenej populácie NK-buniek sa dosiahla pri liečbe kortikosteroidmi. Tieto výsledky súhlasia s výsledkami viacerých publikovaných štúdií⁽⁵⁾. Aj keď vo všeobecnosti sa žiadne z používaných liečiv nepovažuje za špecifické pre NK-bunky, za najúčinnnejšie sa pokladajú imunoglobulíny a metylprednizolón⁽⁶⁾.

Pri zvýšených hodnotách APA dosiahla najvyššiu úspešnosť liečba Dexamedom. Viaceré dostupné štúdie porovnávali úspešnosť liečby pacientok s APA počas tehotenstva. Vaquero a kol. dokázali približne rovnakú účinnosť prednizónu a imunoglobulínov pri značne nižšom počte tehotenských komplikácií u IVIg⁽⁷⁾. Výsledky našej práce potvrdzujú úspešnosť liečby imunoglobulínmi, výraznejší efekt sa však ukázal pri liečbe dexametazónom.

Záver

Snahou tejto práce bolo priniesť závery, ktoré by pomohli lekárom s voľbou vhodného liečiva a slúžili ako základ pre ďalšie skúmanie problematiky. Je samozrejmé, že v oblasti medicíny pracujeme s výraznou interindividuálnou variabilitou a odpoveď každej pacientky na tú istú liečbu sa môže líšiť. Preto zdôrazňujeme potrebu širšieho výskumu problematiky na väčšej vzorke pacientok. Výsledkom ďalších výskumov by tak mohlo byť zostavenie algoritmu na liečbu porúch plodnosti, ktorý na poli slovenskej medicíny absentuje.



ALL YOU NEED FOR HISTOLOGY & CYTOLOGY

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



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

LITERATÚRA

1. Nouza K, Madar J, Nouza M, et al. Imunologie a imunopatologie reprodukčního procesu – Imunologie těhotenství, opakovaného potrácení a poruch implantace blastocysty. *Alergie* 2007; 3:221-228.
2. Yui J, Garcia-Lloret M, Wegmann TG, et al. Cytotoxicity of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and gamma interferon (IFN- γ) against primary human placental trophoblasts. *Placenta* 1994; 15(8): 819-826.
3. Buliková A, Crha I. Antifosfolipidové protilátky a antifosfolipidový syndrom v porodnictví. *Praktická gynekologie* 2004; 1: 6-10.
4. Carp HJA. *Recurrent Pregnancy Loss: Causes, Controversies, and Treatment*. 2nd Ed. Boca Raton: CRC Press 2015. 456 s.
5. Thum MY, Bhaskaran S, Abdalla HI, et al. Prednisolone suppresses NK cell cytotoxicity *in vitro* in women with a history of infertility and elevated NK cell cytotoxicity. *Am J Reprod Immunol* 2008; 59(3): 259-265.
6. Kovacs G. *How to Improve your ART Success Rates: An Evidence-Based Review of Adjuncts to IVF*. Cambridge: Cambridge University Press 2011. 262 s.
7. Vaquero E, Lazzarin N, Valensise H, et al. Pregnancy outcome in recurrent spontaneous abortion associated with antiphospholipid antibodies: A comparative study of intravenous immunoglobulin versus prednisone plus low-dose aspirin. *Am J Reprod Immunol* 2001; 45(3): 174-179.



PharmDr. Mária Ondrejčková

Lekáreň Kvačalova

Čapkova 1, 811 04 Bratislava

e-mail: maria.ondrejckova@gmail.com

Prvé skúsenosti so stanovením degalaktozylovaného IgA1 v diagnostike a monitorovaní pacientov s IgA nefropatiou

MUDr. Lenka Oravcová¹, MUDr. Tatiana Baltesová, PhD.², MUDr. Jaroslav Rosenberger, PhD.³, RNDr. Marcela Popovňáková⁴, MUDr. Mariana Toperczerová⁵

¹Medirex, a. s., Košice

²Transplantačné oddelenie, Univerzitná nemocnica L. Pasteura Košice

³FMC – dialyzačné služby, s. r. o., Košice

⁴Oddelenie imunológie Medirex, a. s., Košice

⁵Logman, a. s., Košice

IgA nefropatia (IgAN) je najčastejšou primárnou glomerulonefritídou u adolescentov a dospelých a predstavuje autoimunitné ochorenie s patogenézou viacerých úderov (multi-hit), ktorá je modulovaná rôznymi genetickými aj vonkajšími faktormi. Kľúčovú úlohu v patogenéze IgAN má degalaktozylovaná forma IgA1 (Gd-IgA1). Viaceré štúdie potvrdili zvýšenie a aj prognostický význam Gd-IgA1 u pacientov s IgAN v porovnaní so zdravými kontrolami. Stanovenie diagnózy IgAN vyžaduje biopsiu obličky, a preto sú v klinickej praxi cenné neinvazívne metódy, ktoré slúžia na monitorovanie aktivity choroby a umožňujú individualizovať liečbu a minimalizovať jej nežiaduce účinky. V práci poskytujeme literárny prehľad potenciálnych biomarkerov relevantných pre IgAN a prvé výsledky stanovenia Gd-IgA1 u chorých s chronickým nefritickým syndrómom a nefrotickým syndrómom. V našom súbore pacientov bolo zvýšenie Gd-IgA1 pozorované u 6 pacientov (7 %), štatisticky významné rozdiely medzi vyšetrovanými skupinami a kontrolami a ani medzi jednotlivými skupinami pacientov sme nezistili.

Kľúčové slová: IgA nefropatia, degalaktozylovaná forma IgA1, neinvazívne biomarkery, hematuria, proteinúria

The first results of galactose-deficient IgA1 measurement in diagnosis and monitoring of patients with IgA nephropathy

IgA nephropathy (IgAN) is the most common primary glomerulonephritis in adolescence and adult patients and is defined as an autoimmune disease with multi-hit pathogenesis and contributing genetic and environmental factors. Galactose-deficient IgA1 plays a major role in this pathogenetic process. High serum levels of Gd-IgA1 are found in most patients with IgAN, and they are associated with poor prognosis, as confirmed by various studies. A renal biopsy is required for accurate diagnosis, and hence the application of noninvasive biomarkers can be helpful in monitoring disease activity, choosing an individual approach for therapy and decreasing side effects. In our study, we provide a review about noninvasive biomarkers of IgAN and the first results of Gd-IgA1 measurement in patients with chronic nephritic and nephrotic syndromes, increased serum Gd-IgA1 levels were observed in 6 patients (7%). The difference among groups was not statistically significant.

Keywords: IgA nephropathy, galactose-deficient IgA1, noninvasive biomarkers, hematuria, proteinuria

NewsLab, 2017; roč. 8(2): 78 – 82

Úvod

IgA nefropatia (IgAN) je najčastejšou primárnou glomerulonefritídou u adolescentov a dospelých. Od nástupu klinických príznakov progreduje do koncového štádia obličkového ochorenia 1,5 % pacientov ročne a približne 25 – 30 % pacientov vyžaduje dialýzu alebo transplantáciu obličky do 20 – 25 rokov trvania ochorenia. Japonskí autori uvádzajú aj pomerne vysoký výskyt subklinickej formy IgAN („lanthanic IgAN“), ktorú histologicky potvrdili u 16 % potenciálnych žijúcich darcov obličky bez akýchkoľvek klinických prejavov choroby⁽¹⁾. Typickými klinickými príznakmi v čase stanovenia diagnózy sú hematuria alebo kombinácia hematurie s mierne až stredne závažnou proteinúriou (< 2 g/24 h), pričom hematuria je často asociovaná s infekciou horných dýchacích ciest. Niektorí pacienti majú už v čase stanovenia diagnózy príznaky zlyhávania obličiek a hypertenziu⁽²⁾. Pre IgAN je charakteristická mužská predispozícia, nástup ochorenia

v druhej až tretej dekáde života, široké spektrum klinických príznakov a variabilná rýchlosť progresie ochorenia po stanovení diagnózy⁽¹⁾.

Potvrdenie diagnózy IgAN naďalej vyžaduje biopsiu obličky⁽²⁾. Charakteristickým histopatologickým znakom sú renálne depozity cirkulujúcich imunokomplexov s dôkazom imunoglobulínu A (IgA) v mezangiu glomerulov často sprevádzaného imunoglobulínom G (IgG) a C3 zložkou komplementu⁽³⁾. Približne 50 % pacientov s IgAN má zvýšené hodnoty IgA a IgA obsahujúcich imunokomplexy v sére⁽⁴⁾.

IgAN je definovaná ako autoimunitné ochorenie s typickou patogenézou viacerých úderov (multi-hit), ktorá je modulovaná rôznymi genetickými aj vonkajšími faktormi.

Kľúčovú úlohu v patogenéze IgAN má degalaktozylovaná forma IgA1 (Gd-IgA1)⁽²⁾. Pôvod buniek secernujúcich Gd-IgA1 nie je presne známy. Cirkulujúci IgA1 je produkovaný hlavne v kostnej dreni, kým Gd-IgA1 môže byť syntetizovaný

ako odpoveď na slizničnú infekciu. Predpokladá sa, že abnormality v slizničnej odpovedi na bežný mikrobiálny alebo potravinový antigén môžu preto viesť k produkcii Gd-IgA1⁽⁵⁾.

Podtriedy IgA1 a IgA2 sa líšia hlavne prítomnosťou unikátnej dlhej závesnej oblasti tzv. „hinge“ regiónu u IgA1. Táto závesná oblasť je tvorená reťazcom 18 aminokyselín, na ktoré sa môže viazať až šesť sacharidových zvyškov O-glykozylovou väzbou⁽⁶⁾. (**obrázok 1**)

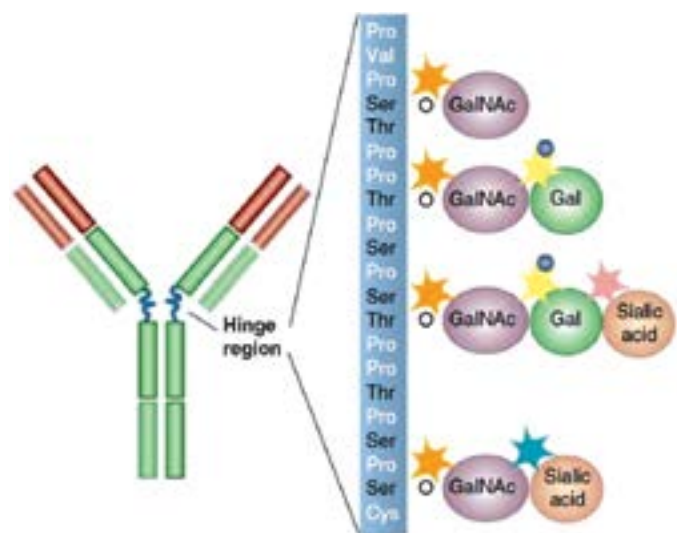
U zdravých jedincov je väčšina O-reťazcov kompletne glykozylovaná s Gal (najmenej štyri až šesť reťazcov je kompletných), kým väčšina reťazcov u pacientov s IgAN je nekompletne galaktozylovaných alebo skrátených (najviac dva reťazce zo šiestich sú kompletné)⁽⁶⁾.

Gd-IgA1 sa uplatňuje ako autoantigén, ktorý je rozlišovaný špecifickými autoprotiilátkami s následnou tvorbou cirkulujúcich imunokomplexov⁽³⁾.

Vysoké koncentrácie Gd-IgA1 sami o sebe nevedú k poškodeniu obličiek. V patogenéze ochorenia vyúsťujúcej do renálneho poškodenia sa uplatňujú štyri procesy – aberantná glykozylácia IgA1, syntéza protiilátok proti Gd-IgA1, formácia imunokomplexov a ukladanie imunokomplexov v mezangiu obličiek⁽⁵⁾.

Obrázok 1. O-glykozylácia IgA1

Kompletný reťazec je zložený z prvej molekuly sacharidu – N-acetylgalaktozamínu (GalNAc), druhou molekulou sacharidu je galaktóza (Gal) a treťou molekulou ja sialová kyselina. Pomedzi tieto kompletne sacharidové reťazce sú v prípade Gd-IgA1 vložené nekompletne sacharidové reťazce bez terminálnej alebo laterálnej sialylácie alebo Gal. Najjednoduchší reťazec je O-GalNAc. (Upravené podľa Boyd a kol., 2012.)



Tieto komplexy nie sú efektívne metabolizované pečeňou, čo vedie k tvorbe glomerulových depozitov, aktivácii a proliferácii mezangiálnych buniek, lokálnej aktivácii komplementu, produkcii extracelulárnej matrix a cytokínov, ktoré môžu ovplyvniť expresiu génov podocyty a glomerulárnu permeabilitu. Postihnutie mezangia a podocytov vedie k proteinúrii a tubulointersticiálnym zmenám⁽²⁾.

IgAN predstavuje systémové ochorenie, čo potvrdzuje aj fakt, že pri transplantácii obličky darcu so subklinickou IgAN príjemcovi s non-IgAN obličkovou chorobou došlo krátko po transplantácii obličky k vymiznutiu depozitov IgA⁽⁵⁾.

Prvé testy na detekciu Gd-IgA1 boli založené na väzbovej aktivite voči špecifickým lektínom – helix aspersa (HAA), helix promatia (HPA) alebo vicia villosa (VV) – prírodne sa vyskytujúce molekuly s vysokou väzbovou kapacitou voči sacharidovým zvyškom so špecifickosťou ku GalNAc zvyškom. Yasutake a kol. vyvinuli ELISA test použitím novej Gd-IgA1 špecifickej monoklonovej protiilátky KM55⁽⁷⁾.

V súčasnosti sú pre klinickú prax dostupné aj ďalšie testy, ktorými možno stanoviť koncentrácie Gd-IgA1. V našej práci sme použili systém Human Galactose-Deficient IgA1 ELISA Kit firmy Abbexa. Princípom vyšetrenia je zmena sfarbenia produktu po naviazaní protiilátky (chicken anti-Galactose-Deficient IgA1) na cieľový antigén (Protein A). Intenzita novovzniknutého žltého sfarbenia je proporcionálna ku koncentrácii GdIgA1. O.D. absorbancia je meraná spektrofotometricky pri 450 nm.

Cieľom našej práce bolo overenie klinickej využiteľnosti komerčne dostupného setu na stanovenie Gd-IgA1 pri diagnostike a sledovaní aktivity IgA nefropatie.

Materiál a metodika

Do nami vyšetřovaného súboru sme zaradili 87 vzoriek pacientov a zdravých kontrol zozbieraných v období 01. 12. 2016 – 30. 04. 2017. Celý súbor sme rozdelili na štyri skupiny:

- skupina 1: pacienti so základnou diagnózou IgAN po transplantácii obličky (n = 14),
- skupina 2: pacienti po transplantácii obličky, ktorí nemajú IgAN ako základnú diagnózu a ani glomerulové zmeny v protokolárnej biopsii transplantovanej obličky (n = 25),
- skupina 3: pacienti s biopsicky dokázanou IgAN (n = 4) a suspektnou IgAN na základe klinických a laboratórných nálezov (n = 23),
- skupina 4: zdravé kontroly (n = 21).

Detailnejšie údaje o podskupinách vyšetřovaného súboru sú v **tabuľke 1**.

Tabuľka 1. Charakteristika jednotlivých podskupín súboru

	skupina 1	skupina 2	skupina 3	skupina 4	p
počet	14	25	27	21	
vek (roky) priemer ± SD min – max	43,1 ± 8,8 25 – 58	46 ± 15,2 16 – 72	36,9 ± 20,7 2 – 71	43,6 ± 14 11 – 65	ns
S-kreatinín (µmol/l) priemer ± SD min – max	224,4 ± 202,1 103,7 – 867,1	134,3 ± 40,7 87,3 – 266,0	140,9 ± 164,9 10,5 – 868,8	81,3 ± 15,8 44,4 – 104,0	*p < 0,001
proteinúria (g/deň) priemer ± SD min – max	1,7 ± 3,2 0,12 – 12,5	0,53 ± 0,45 0,14 – 1,9	1,6 ± 1,4 0,04 – 4,3	0,08 ± 0,03 0,03 – 0,15	*p < 0,001

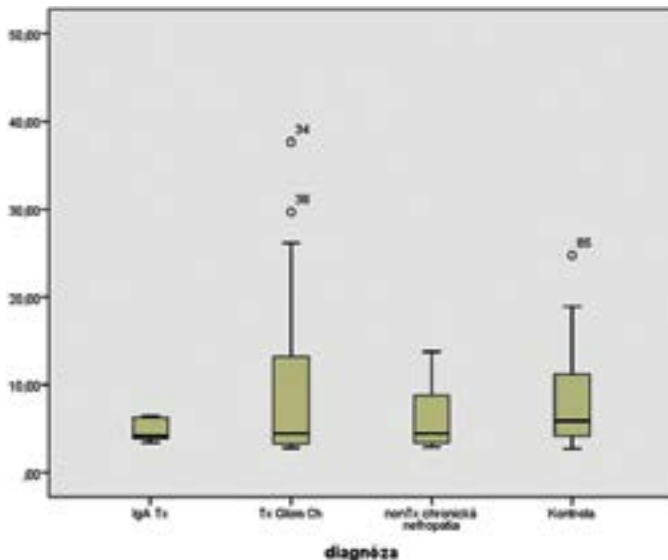
Pacienti s IgAN v skupine 1 boli 9 – 83 mesiacov po transplantácii obličky, najčastejším typom liečby bola trojkombinácia imunosupresív – kortikoidy, mykofenolát sodný a takrolimus (78,5 % pacientov). 12 pacientov malo funkčnú transplantovanú obličku, 1 pacientka mala zlyhávajúci štep a 1 pacient bol po zlyhaní štepu v dôsledku rekurencie IgAN znovuzaradený do hemodialyzačného programu. V skupine 2 mali všetci pacienti stabilnú funkciu transplantovanej obličky, 88 % z nich malo štandardnú imunosupresívnu liečbu (kortikoidy, mykofenolát sodný a takrolimus) a doba od transplantácie bola 1 – 83 mesiacov.

Na štatistické spracovanie sme použili Kruskal-Wallisov test, údaje sme spracovali programom SPSS1.

Výsledky

Priemerné sérové koncentrácie Gd-IgA1 v skupinách 1, 2, 3 a 4 boli: 58,05 µg/l, 10,53 µg/l, 165,2 µg/l a 6,4 µg/l – **graf 1**. Štatisticky významné rozdiely medzi vyšetřovanými skupinami a kontrolami a ani medzi jednotlivými skupinami pacientov sme nezistili.

Graf 1. Sérové koncentrácie Gd-IgA1 (µg/l) v jednotlivých skupinách vyšetřovaných pacientov (horizontálna čiara vyjadruje medián, žltý rámček 25 – 75. percentil a čierna úsečka 5 – 95. percentil stanovených hodnôt, pacienti s hodnotami nad uvedené rozmedzie sú označení krúžkom)



Tabuľka 2. Klinické a laboratórne charakteristiky pacientov so zvýšenými sérovými koncentraciami Gd-IgA1

Parameter	Pacient 1 (Ž, 39 r.)	Pacient 2 (Ž, 37 r.)	Pacient 3 (M, 47 r.)	Pacient 4 (M, 43 r.)	Pacient 5 (Ž, 35 r.)	Pacient 6 (M, 4 r.)
Gd-IgA1 (µg /l)	752,36	853,24	946,75	633,15	362,99	1285,17
tx obličky	áno	nie	nie	nie	nie	nie
proteinúria (g/deň)	0,3	2,78	3,4	2,5	3,4	0,93
S-kreatinín (µmol/l)	159	232	209	125	105	29
doba sledovania (mesiace)	29	240	13	8	60	12
progresia choroby	áno	áno	áno	nie	nie	nie
histologický nálež	2017 bez patologických glomerulových zmien IF nerealizovaná	2005 IgAN	nemá	nemá	2013 FSGS	2017 malé abnormality glomerulov IF bez expresie IgA
imunosupresívna liečba	prednizón, takrolimus, mykofenolát-mofetil	prednizolón	nie	nie	nie	prednizón

skratky: Tx – transplantácia; IF – imunofluorescenčné vyšetřenie; FSGS – fokálna segmentálna glomeruloskleróza

Zvýšené hodnoty Gd-IgA1 malo 6 pacientov (7 %) z celého súboru – jedna pacientka v skupine 1 a piati pacienti zo skupiny 3. Koncentrácie Gd-IgA1 u týchto pacientov dosahovali 43 – 152-násobok priemernej koncentrácie Gd-IgA1 u zdravých kontrol. V **tabuľke 2** uvádzame vybrané klinické a laboratórne charakteristiky pacientov so zvýšenými sérovými koncentraciami Gd-IgA1. U pacientky po transplantácii obličky bola koncentrácia Gd-IgA1 stanovená v čase akútneho zhoršenia funkcie štepu. V histologickom vyšetření neboli opísané patologické morfológické zmeny glomerulov, ale chýba nám imunofluorescenčné vyšetřenie. U pacientky 2 s histologicky potvrdenou IgAN bol po redukcii imunosupresie pri stabilnom funkčnom renálnom náleze zaznamenaný vzostup sérového kreatinínu a proteinúrie. Pacienti 3 a 4 nemajú realizovanú renálnu biopsiu. U týchto pacientov môžu zvýšené hodnoty Gd-IgA1 podporovať diagnózu IgAN. Prekvapivé sú nálezy u pacientov 5 a 6, ktorí majú biopsicky potvrdenú FSGS a malé abnormality glomerulov s negatívnou expresiou IgA pri imunofluorescenčnom vyšetření.

V prvej skupine boli dvaja pacienti so včasným zlyhaním transplantovanej obličky v dôsledku rekurencie IgAN, u ktorých sa zvýšené hodnoty Gd-IgA1 nepotvrtili.

Diskusia

Neinvazívne biomarkery IgAN by mohli potenciálne viesť ku skoršej diagnostike ochorenia, k detailnejšiemu monitorovaniu klinického priebehu ako aj odpovede na liečbu. Hlavným kandidátom spomedzi týchto biomarkerov je Gd-IgA1⁽⁸⁾. Moldoveanu a kol. vyšetřili Gd-IgA1 ako diagnostický marker u pacientov s IgAN. Analýza ROCC (Receiver Operating Characteristic Curve) potvrdila senzitivitu 0,77 a špecifickosť 0,90 pri rozlíšení pacientov s IgAN od zdravých kontrol⁽⁵⁾. Viaceré štúdie potvrdili zvýšenie Gd-IgA1 u pacientov s IgAN v porovnaní so zdravými kontrolami⁽⁹⁾. V našom súbore pacientov sme toto pozorovanie nepotvrtili, čo vysvetľujeme malým počtom pacientov s histologicky potvrdenou IgAN a možným vplyvom imunosupresívnej liečby u časti pacientov. Zvýšené hodnoty Gd-IgA1 boli opísané u pacientov kaukazského, ázijského aj afrického pôvodu s variáciou u jednotlivých pohlaví a etnických skupín. Zvýšené hodnoty Gd-IgA1 boli pozorované aj u 5 % zdravých jedincov⁽⁸⁾.

40 – 50 % prvostupňových príbuzných chorých má zvýšené hodnoty Gd-IgA1 porovnateľné s hodnotami pacientov, z čoho vyplýva vysoký podiel dedičnosti na tomto ochorení

a taktiež fakt, že aberantná glykozylácia IgA1 predchádza klinicky zjavnú chorobu a predstavuje dedičný rizikový faktor IgAN. Tento dedičný defekt však nepostačuje na vyvolanie IgAN, o čom svedčí aj to, že nie všetky osoby so zvýšenou hodnotou Gd-IgA1 majú klinickú symptomatológiu renálneho postihnutia a že pri poškodení obličiek sa uplatňujú aj ďalšie patofyziologické mechanizmy⁽⁵⁾. V našom súbore máme zaradený príbuzenský pár rodič – dieťa, v ktorom príjemca obličky má IgAN. Ani jeden z vyšetovaných nemá v súčasnosti zvýšené hodnoty Gd-IgA1, avšak je potrebné sledovanie dynamiky koncentrácií Gd-IgA1, prípadne aj iných neinvazívnych markerov IgAN, ktoré uvádzame v **tabuľke 3**. Pre skupinu pacientov s kontraindikáciou renálnej biopsie, ako sú pacienti so solitárnou obličkou vrátane žijúcich darcov obličky, je dostupnosť uvedených vyšetrení veľmi významná.

V súvislosti so zistením zvýšenej hodnoty Gd-IgA1 u pacientov s inými typmi glomerulopatií (FSGS a malé abnormality glomerulov) sme v literatúre našli údaj o asociácii nefritídy a Gd-IgA1 komplexov u chorých s Henochovou-Schoenleinovou purpurou a IgA1 myelómom⁽¹⁰⁾. Pacient 6 má v anamnéze potravinovú alergiu, ktorá je spojená s poruchou slizničnej imunity, a preto na základe literárnych údajov možno predpokladať aj tento mechanizmus zvýšenej produkcie Gd-IgA1⁽⁵⁾.

Podľa Zhao a kol. sú vysoké hodnoty sérového Gd-IgA1 asociované aj so zvýšeným rizikom progresie ochorenia a majú prognostický význam⁽⁹⁾, podľa niektorých štúdií však sérové hodnoty Gd-IgA1 nekorelujú s hodnotou proteinúrie a s poklesom glomerulovej filtrácie, ale percento Gd-IgA1/celkové IgA koreluje s klinickými faktormi nepriaznivej prognózy, ktorými sú pokles glomerulovej filtrácie a závažnosť proteinúrie⁽⁸⁾.

Jedným z cieľov našej štúdie bolo interpretovať hodnoty Gd-IgA1 v skupine pacientov s IgAN po transplantácii obličky, ktorí užívajú imunosupresívnu liečbu. Je dokázané, že imunosupresívna terapia ovplyvňuje hodnoty Gd-IgA1. Kim a kol. (2016) hodnotili vplyv imunosupresívnej liečby na koncentrácie Gd-IgA1 po 3 a 6 mesiacoch od transplantácie, pričom po 3 mesiacoch bola imunosupresívna liečba redukovaná.

Hodnoty Gd-IgA1 boli signifikantne nižšie po 3 mesiacoch od transplantácie, po redukcii imunosupresívnej liečby boli hodnoty Gd-IgA1 po 6 mesiacoch signifikantne vyššie. Zmeny koncentrácií Gd-IgA1 boli asociované hlavne so zmenami v dávkovaní prednizónu⁽¹¹⁾. V čase odberu krvných vzoriek na stanovenie Gd-IgA1 užívalo prednizón 93 % pacientov v skupine 1 a 92 % pacientov v skupine 2. Priemerná dávka prednizónu bola 7,5 mg v oboch skupinách. Vyšetrenie Gd-IgA1 bolo zrealizované iba raz, čo považujeme za nedostatok našej štúdie. Preto u našich pacientov nemôžeme hodnotiť vplyv redukcie dávky prednizónu na koncentráciu Gd-IgA1.

Rekurencia IgAN v transplantovanej obličke po transplantácii nie je zriedkavá. Histologické známky rekurencie možno nájsť až u 60 % pacientov, pričom 25 % má známky dysfunkcie štetu a u 5 % pacientov vedie rekurencia IgAN k strate štetu⁽¹²⁾. Berthelot a kol. (2015) potvrdili, že pacienti s rekurenciou IgAN po transplantácii obličky mali vyššie koncentrácie Gd-IgA1 predtransplantačne ako transplantovaní pacienti bez rekurencie a ako kontrolná skupina pacientov⁽¹³⁾. Pre našu analýzu sme nemali k dispozícii predtransplantačné séra na vyšetrenie Gd-IgA1. V súbore pacientov sú dvaja pacienti s rekurenciou IgAN, ktorá viedla k zlyhaniu štetu. Títo pacienti nemali zvýšené koncentrácie Gd-IgA1. Niektorí autori však uvádzajú vyššiu prediktívnu hodnotu ostatných biomarkerov, ako sú napr. protilátky proti Gd-IgA1 a solubilné CD89 komplexy. Prehľad týchto biomarkerov uvádzame v **tabuľke 3**.

Yanagawa a kol. (2014) potvrdili signifikantne vyššie hodnoty sérových anti-Gd-IgA1 IgG a IgA autoprotílátok u pacientov s IgAN v porovnaní s pacientmi s non-IgAN chronickou obličkovou chorobou. 91 % pacientov s IgAN a normálnou hodnotou Gd-IgA1 malo zvýšené hodnoty anti-Gd-IgA1 IgG autoprotílátok, produkcia autoprotílátok je preto pravdepodobne nezávislá od koncentrácie Gd-IgA1.

Sérové hodnoty anti-Gd-IgA1 IgA autoprotílátok korelujú s intenzitou mezangiálnych IgA depozitov a sérové hodnoty IgG autoprotílátok sú asociované s histologickým stupňom a so závažnosťou proteinúrie⁽¹⁴⁾.

Tabuľka 3. Biomarkery IgAN a ich klinické asociácie (upravené podľa Maixnarova a kol., 2016)

Biomarkery	Klinická asociácia
Sérové biomarkery	
Gd-IgA1	korelácia s IgAN, predikcia progresie
anti-Gd-IgA1 IgA/IgG protilátky	korelácia s IgAN, predikcia progresie
CD89	inverzná korelácia s progresiou IgAN
Močové biomarkery	
solubilný transferínový receptor	vyššie hodnoty u pacientov s IgAN a HSP nefritídou, hodnoty korelujú s proteinúriou
α1- a β2-mikroglobulín	korelácia s proteinúriou
molekula poškodenia obličiek-1 (KIM-1)	korelácia s proteinúriou, spolu s hodnotou sérového kreatinínu sú asociované s horšou prognózou
interleukín-6/epidermálny rastový faktor	marker progresie IgAN
epidermálny rastový faktor/monocytový chemotaktický proteín	korelácia s histologickou závažnosťou a renálnou prognózou
fraktalkín	korelácia s patogenézou imunokomplexami sprostredkovanej glomerulonefritídy
laminín G-like peptid (perlecan)	znížené hodnoty inverzne korelujú s histologickým nálezom
voľné ľahké reťazce kappa	znížené hodnoty inverzne korelujú s histologickým nálezom
uromodulín	zvýšené hodnoty predikujú IgAN
α1-antitrypsín	zvýšené hodnoty v moči sú asociované s nefrotickým syndrómom
podocalyxín	asociácia s histologickými nálezmi poškodenia obličiek
lektín viažuci manózu	korelácia s funkciou obličiek a proteinúriou
C4a desArg peptid	asociácia so závažnosťou histologických zmien

HSP – Henoch-Schönleinova purpura

Záver

Stanovenie diagnózy IgAN, najčastejšej primárnej glomerulonefritídy v adolescentnom a dospelom veku, vyžaduje biopsiu obličky. V klinickej praxi sú veľmi cenné neinvazívne metódy, ktoré slúžia na monitorovanie aktivity choroby a umožňujú individualizovať liečbu a minimalizovať jej nežiaduce účinky. V práci poskytujeme literárny prehľad poten-

ciálnych biomarkerov relevantných pre IgAN a prvé výsledky stanovenia Gd-IgA1 u chorých s chronickým nefritickým syndrómom a nefrotickým syndrómom. Významnejší potenciál opisovaného vyšetrenia možno očakávať pri pravidelnom dlhodobejšom vyšetrovaní pacientov.

LITERATÚRA

1. Barratt J and Feehally J. IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 2088-2097.
2. Maixnerova D, Reily C, Bian Q, et al. Markers for the progression of IgA nephropathy. *J Nephrol* 2016; 29(4): 535-541.
3. Raška M, Zdražil J, Stuchlová Horynová M, a kol. IgA nefropatie – otázky, které nastolil výzkum. *Vnitř Lék* 2016; 62(12 Suppl 6): 6S67-6S77.
4. Moldoveanu Z, Wyatt RJ, Lee JY, et al. Patients with IgA nephropathy have increased serum galactose-deficient IgA1 levels. *Kidney International* 2007; 71: 1148- 1154.
5. Suzuki H, Kiryluk K, Novak J, et al. The Pathophysiology of IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22: 1795-1803.
6. Berthoux F, Mohey H, Maillard N, et al. IgA nephropathy: new aspects in pathophysiology and pathogenesis. *EMJ Neph* 2015; 3(1): 97-103.
7. Coppo R. A new monoclonal antibody for detecting degalactosylated IgA1 as serum biomarker of IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2015; 30: 1234-1236.
8. Hastings MC, Moldoveanu Z, Suzuki H, et al. Biomarkers in IgA nephropathy: relationship to pathogenetic hits. *Expert Opin Med Diagn* 2013; 7(6): 615-627.
9. Zhao N, Hou P, Lv J, et al. The level of galactose-deficient IgA1 in the sera of patients with IgA nephropathy is associated with disease progression. *Kidney Int* 2012; 82(7): 790-796.
10. Knoppova B, Reily C, Maillard N, et al. The origin and Activities of IgA1 – Containing Immune Complexes in IgA Nephropathy. *Front Immunol* 2016; 7: 117.
11. Kim MJ, Schaubi S, Molyneux K, et al. Effect of Immunosuppressive Drugs on the Changes of Serum Galactose-Deficient IgA1 in Patients with IgA Nephropathy. *PLoS ONE* 2016; 11(12): e0166830.
12. Floege J. Recurrent IgA nephropathy after renal transplantation. *Semin Nephrol* 2014; 24(3): 287-291.
13. Berthelot L, Robert T, Vuiblet V, et al. Recurrent IgA nephropathy is predicted by altered glycosylated IgA, autoantibodies and soluble CD 89 complexes. *Kidney Int.* 2015; 88(4): 815-822.
14. Yanagawa H, Suzuki H, Suzuki Y, et al. A Panel of Serum Biomarkers Differentiates IgA Nephropathy from Other Renal Diseases. *PLoS ONE* 2014; 9(5): e98081.
15. Boyd J, Cheung ChK, Molyneux K, et al. An update on the pathogenesis and treatment of IgA nephropathy. *Kidney International* 2012; 81: 833- 843.

MUDr. Lenka Oravcová

Medirex, a. s.

Magnezitárska 2/C, 040 13 Košice

e-mail: lenka.oravcova@medirex.sk



ALL YOU NEED FOR PROTEOMICS

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

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



Využitie autovakcín v liečbe chronických a recidivujúcich kolpitíd

MUDr. Monika Czirfuszová, PhD., RNDr. Gabriela Bertaová

Medirex, a. s., Komárno

Liečba autovakcínami v čase hroziaceho nástupu postantibiotickej éry prežíva renesanciu. Je vhodná pre pacientky s chronickými a recidivujúcimi kolpitídami, u ktorých opakovaná antimikrobiálna liečba, prípadne aj liečba hromadne vyrábanymi imunomodulátormi mikrobiálneho pôvodu, nepriniesla požadovaný efekt. Cieľom našej práce bolo zhodnotiť priebeh liečby autovakcínami a následne sledovať klinický stav a mikrobiologické kultivačné nálezy pacientok 1. a 2. rok po skončení liečby autovakcínami. V súbore žien liečených 10 mesiacov perorálnymi hyposenzibilizačnými autovakcínami pre chronické a recidivujúce kolpitídy (n = 84) sme úspešne liečili 62 (73,81 %) pacientok a čiastočne úspešne 12 (14,29 %) pacientok. Výrazne zlepšený stav sme dosiahli u 63 (75 %) pacientok počas 1. roka a u 65 (77,38 %) pacientok sledovaných počas 2. roka po skončení liečby. Čiastočné zlepšenie stavu nastalo u ďalších 9 (10,71 %) pacientok v 1. roku a 7 (8,33 %) pacientok v 2. roku po skončení liečby. Naše výsledky poukazujú na prínos perorálnej hyposenzibilizačnej liečby autovakcínami ako doplnkovej liečby pacientok s chronickými a recidivujúcimi kolpitídami. U viac ako 80 % liečených pacientok sme touto liečbou dosiahli zníženie počtu recidív infekcie a zlepšenie kvality ich života.

Kľúčové slová: autovakcína, chronické a recidivujúce kolpitídy, hyposenzibilizačná liečba, imunomodulácia

Application of autovaccines in the treatment of chronic and recurrent colpitis

Treatment with autovaccines at the time of the imminent onset of the post-antibiotic era is experiencing a renaissance. It is suitable for patients with chronic and recurrent colpitis whose repeated antimicrobial treatment or perhaps even treatment with mass-produced immunomodulators of microbial origin did not achieve the desired effect. The aim of our study was to evaluate the course of the treatment and subsequently, to follow up the clinical condition and microbiological cultivation results of patients in the 1st and 2nd year after the autovaccine treatment. In the group of women treated for 10 months for chronic and recurrent colpitis (n=84) we have successfully treated 62 (73.81 %) of patients and partially successfully further 12 (14.29 %) of patients. We have achieved a markedly improved condition in 63 (75.00 %) patients during the 1st year and in 65 (77.38 %) patients observed during the 2nd year after the end of the treatment. Partial improvement occurred in further 9 (10.71 %) patients in the 1st year and 7 (8.33 %) patients in the 2nd year after the end of the treatment. It follows from the results of our work that per oral hyposensitisation autovaccine treatment is beneficial as a complementary treatment in patients with chronic and recurrent colpitis. In more than 80% of treated patients, we achieved reduction in the number of recurrence of infection and improved quality of their life.

Keywords: autovaccine, chronic and recurrent colpitis, hyposensitisation treatment, immunomodulation

NewsLab, 2017; roč. 8 (2): 84 – 89

Úvod

Liečba mikrobiálnymi autovakcínami sa používa viac ako 100 rokov⁽¹⁾. Tento terapeutický princíp sa ukázal ako veľmi prospešný v období, keď medicína nemala k dispozícii účinné antimikrobiálne látky. V dobe antibiotík sa dostala do úzadia, dnes je opäť jedným z dostupných spôsobov liečby chronických a recidivujúcich infekcií po opakovanej a neúspešnej antimikrobiálnej terapii. V čase hroziaceho nástupu postantibiotickej éry sa čoraz viac stretávame s problémom zlyhania antimikrobiálnej liečby z rôznych dôvodov. Pacienti s chronickými infekciami sú často opakovane preliečovaní antibiotikami bez trvalého efektu. Hlavným cieľom liečby autovakcínami je prerušenie tohto bludného kruhu, predĺženie asymptomatického stavu, redukcia počtu recidív infekcie až dosiahnutie trvalej bezpríznakovosti a zlepšenia kvality života. Posilnenie vrodených imunitných mechanizmov pravidelným užívaním antigénneho komplexu mikroorganizmov vyvolávajúcich chronickú a rekurentnú infekciu je jedna

z možností liečby týchto infekcií. Na tento účel sa používajú hromadne pripravované mikrobiálne lyzáty obsahujúce imunogénne komponenty baktérií alebo kvasiniek, vyrábané rôznymi výrobcami liekov. Sú však prípady, keď je potrebné liečbu individualizovať a pripraviť mikrobiálnu vakcínu z aktuálnych mikrobiálnych kmeňov pacienta – autovakcínu alebo zmes, mikrobiálnu vakcínu z kmeňov, ktoré kolujú v populácii – tzv. stock vakcínu. Jednou z hlavných indikácií liečby autovakcínami, resp. stock vakcínami, sú chronické a recidivujúce infekcie urogenitálneho systému.

Mechanizmus účinku autovakcín

Mikrobiálne antigény sú pre imunitný systém človeka najprírodzenejšími antigénymi podnetmi⁽²⁾. Je relatívne málo vedeckých prác a štúdií zameraných na rozpoznanie účinku autovakcín na imunitné mechanizmy človeka. Výsledky existujúcich vedeckých prác je problematické interpretovať a porovnávať vzhľadom na rôzny pôvod použitých

mikrobiálnych kmeňov, na rôzne zloženie a dávkovanie a odlišný spôsob podávania autovakcín. Napriek tomu doterajšie poznatky naznačujú, že autovakcíny pôsobia na nešpecifickú imunitu, najmä na úrovni cytokínov. V experimentálnych podmienkach ex vivo po stimulácii periférnych polymorfonukleárnych leukocytov pacientov riedeniami autovakcíny v koncentrácii $3 \times 10^2 - 3 \times 10^6$ CFU/ml pripravenými z *Escherichia coli* Rusch a spol. pozorovali signifikantný pokles uvoľňovania GM-CSF a IFN- γ a štatisticky významné zvýšenie tvorby IL-1 β ⁽³⁾. Po intenzívnom podávaní autovakcíny s koncentráciou mikrobiálneho antigénneho komplexu (MAK) *Escherichia coli* 6×10^8 CFU/ml 2x týždenne subkutánne počas 2 týždňov a následne 10 dní perorálne pacientom s chronickými infekciami močových ciest spôsobenými *E. coli* Nolte a spol. zaznamenali pokles periférnych polymorfonukleárnych leukocytov, zvýšenie proliferatívnej aktivity lymfocytov, zvýšenie tvorby cytokínov IFN- γ , TNF- α ⁽⁴⁾. Pri subkutánnom podávaní autovakcíny s obsahom MAK *Staphylococcus aureus* s koncentráciou $1,5 \times 10^8$ CFU/ml pacientom s chronickou infekciou kože a horných dýchacích ciest spôsobených *S. aureus*, poľskí vedci Szkaradkiewicz a spol. pozorovali signifikantné zvýšenie sérovej hladiny TNF- α , IL-1 β , IFN- γ a IL-17A u 79,60 % pacientov ich súboru⁽⁵⁾. Existujú práce dokazujúce pokles zápalovej aktivity bronchiálnej sliznice u ľudí s respiračnými alergiami pri liečbe autovakcínami. Predpokladá sa, že liečba autovakcínami posúva imunitný systém smerom k Th1 odpovedi, čo teoreticky môže byť prospešné pre alergikov, u ktorých prevláda Th2 odpoveď, ale jednoznačné dôkazy v zmysle štatisticky signifikantného zníženia markerov alergie (ECP, celkové IgE protilátky, alergénovo špecifické IgE protilátky) zatiaľ chýbajú⁽⁶⁾. Viacerí autori poukazujú na riziko vzniku autoimunitných procesov na základe dominance Th1 odpovede navodenej liečbou autovakcínou^(2,6). Porucha rovnováhy Th1/Th2 a posun reaktivity imunitného systému v smere Th1 môže vyprovokovať autoimunitné ochorenia, z toho dôvodu je táto liečba kontraindikovaná u ľudí s dokázaným alebo so suspektným autoimunitným ochorením.

Najčastejší pôvodcovia chronických kolpitíd

Vznik chronickej bakteriálnej alebo mykotickej infekcie je podmienený nielen poruchou obranyschopnosti hostiteľa, ale aj faktormi patogenity pôvodcu infekcie, ktoré podmieňujú jeho zotrvanie a patogénne pôsobenie v určitých lokalitách ľudského organizmu. Mikroorganizmy majú geneticky kódované mechanizmy, ktoré im zabezpečujú adhéziu na povrch kože a slizníc, kolonizáciu týchto oblastí, prístup k živinám a únik pred obrannými mechanizmami hostiteľa. Povrchové štruktúry mikroorganizmov sú potentnými stimulátormi imunitnej odpovede. Ochorenie je výsledkom priameho poškodenia faktormi mikroorganizmu a reakcie imunitných mechanizmov na prítomnosť infekcie⁽⁷⁾. V podmienkach rutinného laboratória je najčastejším kultivačným nálezom u pacientok s chronickými a recidivujúcimi kolpitídami kvasinka *Candida albicans*, z baktérií sa najčastejšie vyskytuje *Streptococcus agalactiae*.

Kvasinky rodu *Candida* sú častými komenzálmi na sliznici a v prítomnosti predisponujúcich faktorov, ako je napr. dlhodobá antimikrobiálna liečba alebo porucha lokálnych obranných mechanizmov, sa stanú patogénnymi. Približne 75 % žien prekoná vulvovaginálnu kandidózu raz za svoj život, u 40-50 % z nich sa infekcia objaví aj druhýkrát. Asi

5-8 % žien má recidivujúcu vulvovaginálnu kandidózu minimálne so štyrmi epizódami tejto infekcie za rok⁽⁸⁾. Medzi faktory virulencie kandid patrí zmena morfológie z kvasinkovej formy na vláknitú formu, expresia adhezínov a invazínov na povrchu bunky, tigmotropizmus, tvorba biofilmov a sekrécia hydrolytických enzýmov. Ďalšími mechanizmami podporujúcimi prežitie kandid je rýchla adaptabilita na zmeny okolitého pH, flexibilita metabolizmu, výkonný systém na získavanie živín a zvládanie stresu⁽⁹⁾. Vaginálne epitelové bunky produkujú menej cytokínov, indukujú slabšiu imunitnú odpoveď, sú tolerantnejšie k mikroorganizmom a škodlivým faktorom prostredia. Toto môže byť jeden z kľúčových faktorov pochopenia problematiky chronických a rekurentných infekcií v tejto oblasti ľudského tela⁽¹⁰⁾.

Zdrojom *Streptococcus agalactiae* je gastrointestinálny systém, rektálna a vaginálna kolonizácia sa vyskytuje u 10 – 30 % žien⁽¹¹⁾. Problematika vaginálnej kolonizácie, resp. infekcie *S. agalactiae* je najviac preskúmaná v populácii tehotných žien, relatívne málo štúdií existuje na dôkaz etiologickej súvislosti *S. agalactiae* so zápalom pošvy v populácii negravidných žien. Leclair a spol.⁽¹¹⁾ študovali skupinu negravidných žien s vyrovnanou hladinou estrogénov vo veku nad 18 rokov, ktoré boli bezpríznakové a absolvovali preventívne gynekologické vyšetrenie alebo mali príznaky vaginitídy. Zistili, že signifikantným prediktorom kultivačného nálezu *S. agalactiae* je zvýšené pH vagíny a prítomnosť výtoku. Pri pH > 4,5 zaznamenali 4-násobne častejší kultivačný záchyt *S. agalactiae*, pri prítomnosti patologického výtoku bol tento nález trojnásobne častejší. Autori poukázali na skutočnosť, že kolonizácia touto baktériou je indikátorom narušenia vaginálneho ekosystému a kauzálna súvislosť nálezov s vaginitídou je stále diskutabilná. Najdôležitejším faktorom virulencie *S. agalactiae* je kapsulárny polysacharid, ktorý bráni fagocytóze. Sú snahy vyvinúť účinnú očkovaciu látku, ktorá navodí systémovú aj slizničnú imunitnú odpoveď. Shen a kol.⁽¹²⁾ publikovali výsledky slizničnej imunizácie myši konjugovanou subjednotkovou vakcínou obsahujúcou kapsulárny polysacharid III. typu *S. agalactiae*, konjugovaný B podjednotkou cholerového toxínu. Stanovovali sérové a slizničné protilátky v triedach IgG a IgA po perorálnej, intranazálnej, vaginálnej a rektálnej aplikácii konjugovanej vakcíny. Najvýznamnejšie zvýšenie sérových IgG protilátok proti kapsulárnemu polysacharidu typu III *S. agalactiae* zaznamenali po rektálnej aplikácii. Pri tejto forme aplikácie došlo aj k zvýšeniu slizničných IgA protilátok v rekte, črevnom trakte a vo vaginálnom sekréte. Autori štúdie považujú túto formu aplikácie konjugovanej vakcíny za najúčinnnejšiu.

Cieľom našej práce bolo:

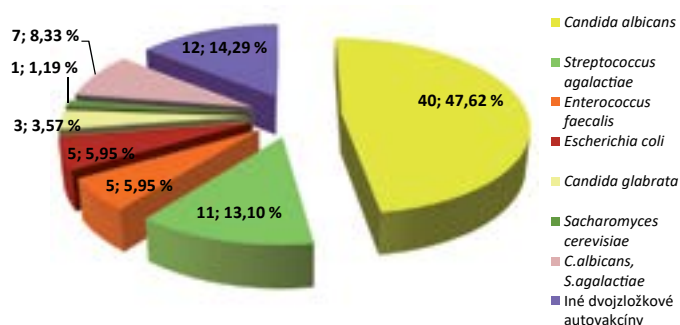
- zhodnotenie priebehu a úspešnosti liečby súboru pacientok s chronickými a recidivujúcimi kolpitídami mikrobiálnymi autovakcínami podávanými na základe hyposenzibilizačnej dávkovacej schémy,
- sledovanie klinického stavu a mikrobiologických kultivačných nálezov súboru pacientok počas 1. roka od skončenia liečby a ich zhodnotenie,
- sledovanie klinického stavu a mikrobiologických kultivačných nálezov súboru pacientok počas 2. roka od skončenia liečby a ich zhodnotenie.

Materiál a metódy

Výber a charakteristika súboru

Do súboru sme zaradili 84 pacientok, ktoré boli liečené perorálnymi hyposenzibilizačnými autovakcínami pre chronické a recidivujúce kolpitídy v období od júna 2011 do júna 2015. Všetky mali chronické a recidivujúce zápaly pošvy v trvaní 2 až 16 rokov, s recidívami 4- až 10× za rok po opakovanej liečbe lokálnymi a/alebo celkovými antibiotikami a/alebo antimykotikami s krátkotrvajúcim efektom. Celkový zdravotný stav pacientok a ich vhodnosť na liečbu mikrobiálnymi autovakcínami hodnotili indikujúci lekári na základe anamnézy a laboratórnych analýz s prihliadnutím na indikácie a kontraindikácie liečby autovakcínami dostupnými na našej webovej stránke <http://www.hpl.sk/ponuka-hpl/vyroba-autovakcin> (t. č. informácie dostupné na www.laboratornadiagnostika.sk), resp. po telefonicknej konzultácii so zodpovedným pracovníkom na prípravu mikrobiálnych autovakcín HPL spol. s r. o. Imunologické vyšetrenie bolo odporúčané v prípadoch, keď anamnestické údaje pacienta svedčili o nedostatočnosti imunity, resp. bolo potrebné vylúčiť autoimunitnú chorobu. Prípravu mikrobiálnych autovakcín indikovali u 68 (80,95 %) žien gynekológovia a u 16 (19,05 %) žien lekári so špecializáciou klinická imunológia a alergiológia. Mikrobiálne antigénne komplexy (MAK) na prípravu autovakcín boli vyhotovené v laboratóriu klinickej mikrobiológie HPL, spol. s r. o., v Komárne a riedenia MAK (1 : 10 000, 1 : 1 000, 1 : 100, 1 : 10, 1 : 1) boli vyrobené v spolupráci s partnerskou lekárnou. Počet a percentuálne zastúpenie autovakcín podľa ich zloženia je znázornené na **grafe 1**. Autovakcíny boli podávané pacientkam podľa hyposenzibilizačnej dávkovacej schémy v stúpajúcej koncentrácii a dávke, po ktorej nasledovala udržiavacia liečba týždenne 10 kvapiek z riedenia MAK 1 : 1. Celková dĺžka liečby bola 10 mesiacov.

Graf 1. Počet a percentuálne zastúpenie autovakcín na liečbu chronických a recidivujúcich kolpitíd podľa ich zloženia



Jednozložkové autovakcíny obsahovali mikrobiálny antigénny komplex (MAK) *Candida albicans*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Candida glabrata* a *Sacharomyces cerevisiae*. Zloženie jednozložkových autovakcín uvádzame v **tabuľke 1**. Zloženie dvojzložkových autovakcín uvádzame v **tabuľke 2**.

Príprava autovakcín

Mikroorganizmy na prípravu autovakcín sme izolovali z výterov z pošvy a cervixu pacientok s chronickou alebo recidivujúcou kolpitídou, u ktorých predpokladaním pôvodcovia infekcie pretrvávali, resp. recidivovali napriek opakovanej cieľenej celkovej alebo lokálnej liečbe antibiotikami alebo antimykotikami. Boli to prevažne kvasinky a/alebo rôzne podmienené patogénne baktérie kultivovateľné na agarových pôdach v aeróbných alebo mikroaerofilných podmienkach. S izolovanými kmeňmi sme ďalej pracovali podľa nášho štandardného postupu v súlade s modifikovanou štandardnou metódou na prípravu bakteriálnych imunomodulačných „stock“ vakcín⁽¹³⁾. Kontaminácii vzoriek sme predchádzali očkovaním izolovaných kmeňov na predinkubované kultivačné pôdy (35 °C, 24 – 48 hod.), používaním sterilných laboratórnych pomôcok a prácou v laminárnom boxe triedy A. Kmene sme rozmnožili kultiváciou na celofáne⁽¹⁴⁾. Celofánový kruh sme asepticky priložili na povrch nechromogénneho kultivačného média vhodného na kultiváciu pôvodcu infekcie, na jej povrch sme kvapli sterilnou jednorazovou Pasteurovou pipetou asi 0,3 ml sterilného fyziologického roztoku, v ktorom sterilnou umeľohmotnou kľučkou ohnutou do 90-stupňového uhla sme suspendovali 3 až 5 kolónií mikroorganizmu a rovnomerne rozotrelí na povrchu celofánu. Kultivovali sme 24 – 48 hod. v podmienkach vhodných na kultiváciu naočkovaného mikroorganizmu. Po kultivácii vyrástol naočkovaný mikroorganizmus na povrchu celofánu v rovnomernej vrstve. Pomocou sterilnej Pasteurovej pipety sme opláchli kultúru z povrchu celofánu 3-6 ml sterilným fyziologickým roztokom. Suspenziu sme pipetovali do 6-8 sterilných skúmaviek s fyziologickým roztokom tak, aby hustota suspenzie v skúmavkách

Tabuľka 1. Zloženie jednozložkových autovakcín na liečbu chronických a recidivujúcich kolpitíd

Zloženie autovakcín	Koncentrácia MAK	Počet	Podiel
<i>C. albicans</i>	1 x 10 ⁸ CFU/ml	40	47,62 %
<i>S. agalactiae</i>	1,5 x 10 ⁸ CFU/ml	11	13,10 %
<i>E. faecalis</i>	4 x 10 ⁸ CFU/ml	5	5,95 %
<i>E. coli</i>	6 x 10 ⁸ CFU/ml	5	5,95 %
<i>C. glabrata</i>	1 x 10 ⁸ CFU/ml	3	3,57 %
<i>S. cerevisiae</i>	1 x 10 ⁸ CFU/ml	1	1,19 %

Tabuľka 2. Zloženie dvojzložkových autovakcín na liečbu chronických a recidivujúcich kolpitíd

Zloženie autovakcín	Koncentrácia MAK	Počet	Podiel
<i>C. albicans</i> , <i>S. agalactiae</i>	3 x 10 ⁷ CFU/ml, 6 x 10 ⁷ CFU/ml	7	8,34 %
<i>C. albicans</i> , <i>E. faecalis</i>	3 x 10 ⁷ CFU/ml, 8 x 10 ⁷ CFU/ml	1	1,19 %
<i>C. albicans</i> , <i>E. coli</i>	3 x 10 ⁷ CFU/ml, 2 x 10 ⁸ CFU/ml	2	2,38 %
<i>S. agalactiae</i> , <i>E. coli</i>	6 x 10 ⁷ CFU/ml, 2 x 10 ⁸ CFU/ml	4	4,76 %
<i>S. agalactiae</i> , <i>E. faecalis</i>	6 x 10 ⁷ CFU/ml, 8 x 10 ⁷ CFU/ml	2	2,38 %
<i>S. agalactiae</i> , <i>S. cerevisiae</i>	6 x 10 ⁷ CFU/ml, 3 x 10 ⁷ CFU/ml	1	1,19 %
<i>E. coli</i> , <i>E. faecalis</i>	2 x 10 ⁸ CFU/ml, 8 x 10 ⁷ CFU/ml	2	2,38 %

zodpovedala hodnote 5 McFarland a objem suspenzie v jednotlivých skúmavkách bol 6 ml. Čistotu suspenzie v jednotlivých skúmavkách sme kontrolovali mikroskopickým preparátom a vyočkovaním na vhodné kultivačné médiá. Po kontrole čistoty sme inaktivovali mikrobiálnu suspenziu 3,6-percentným roztokom formaldehydu. Získali sme tak sterilný MAK, ktorého sterilitu sme kontrolovali vyočkovaním na vhodné agarové kultivačné médium a očkovaním do tioglykolátového tekutého média a tryptónovo-sójového bujónu v súlade s postupom na kontrolu sterility farmaceutických surovín a produktov, uvedeným v aktuálnom vydaní Európskeho liekopisu (PhEur)⁽¹⁵⁾. So sterilným MAK-om sme pracovali ďalej v priestoroch spĺňajúcich zásady správnej výrobných praxe, t. j. v laminárnom boxe triedy A umiestnenom v miestnosti triedy čistoty B, vybavenom vzduchotechnikou s HEPA filtrami. Sterilný MAK sme centrifugovali 20 minút pri 3 000 otáčkach za minútu a 6 °C. Na prípravu autovakcín sme použili sediment po odstránení supernatantu, ktorý sme zriedili do požadovanej koncentrácie podľa typu mikroorganizmu. Táto koncentrácia je rádovo 10⁸ pri jednozložkových autovakcínach a 10⁷ – 10⁸ v prípade dvojzložkových autovakcín. Z pripravených MAK-ov sme v spolupráci s lekárnou pripravili konečnú liekovú formu autovakcíny riedením MAK v riediacom roztoku. Autovakcíny sme expedovali v priehľadných polyetylénových liekovkách s kvapkadlom, sterilizovaných etylénoxidom. Liekovky boli číslované a označené farebnými štítkami, na ktorých bolo uvedené číslo autovakcíny, zloženie a dátum expirácie. Každé balenie autovakcíny obsahovalo nami vypracovaný príbalový leták s uvedením zloženia autovakcíny, indikácií, kontraindikácií liečby dôležitých informácií týkajúcich sa spôsobu jej užívania a dávkovací kalendár. Hotové autovakcíny boli kontrolované na sterilitu na oddelení farmaceutického skúšania HPL, spol. s r. o., v Komárne v súlade s kapitolou č. 2. 6. 1 PhEur⁽¹⁵⁾.

Kritériá a metódy hodnotenia liečby

Pri hodnotení účinnosti liečby autovakcínami sme sledovali klinický stav a mikrobiologické kultivačné nálezy pacientok. Potrebné informácie o klinickom stave a o výsledkoch mikrobiologických kultivačných analýz pacientov pred liečbou autovakcínami v priebehu liečby v intervaloch vyznačených v dávkovacom kalendári a po ukončení liečby v stanovených intervaloch (3 mesiace, 6 mesiacov, 1 rok, 2 roky) boli získavané z laboratórneho informačného systému a od ošetrovujúcich lekárov formou dotazníkov alebo telefonickej konzultácie.

U pacientok sme hodnotili priebeh liečby (počas 10-mesačného podávania autovakcín) a následne 1. rok a 2. rok od ukončenia liečby autovakcínou. Získané výsledky sme usporiadali do grafov.

Tabuľka 3. Skupiny pacientok podľa úspešnosti liečby

Skupiny	Kategórie
Úspešná liečba	0 – bez recidívy počas liečby I – 1 recidíva počas liečby
Čiastočne úspešná liečba	II – 2 recidívy počas liečby
Neúspešná liečba	III – 3 recidívy počas liečby IV – viac ako 3 recidívy počas liečby

Ukazovateľom úspešnosti liečby bol počet recidív počas podávania autovakcín. Na základe počtu recidív počas podávania autovakcín sme pacientky rozdelili do kategórií: **kategória 0** – bez recidívy počas 10-mesačnej liečby, **kategória I** – jedna recidíva počas 10-mesačnej liečby, **kategória II** – dve recidívy počas 10-mesačnej liečby, **kategória III** – tri recidívy počas 10-mesačnej liečby,

kategória IV – viac ako tri recidívy počas 10-mesačnej liečby.

Na základe uvedených kategórií sme rozdelili pacientky do skupín podľa úspešnosti liečby (**tabuľka 3**).

V období 1. a 2. roka po liečbe autovakcínami sme naďalej sledovali zdravotný stav a kultivačné nálezy pacientok. Stav pacientok sme hodnotili podľa kritérií zhrnutých v **tabuľke 4**.

Výsledky

Hodnotenie liečby – podávania autovakcín u pacientok liečených pre chronické a recidivujúce kolpitídy

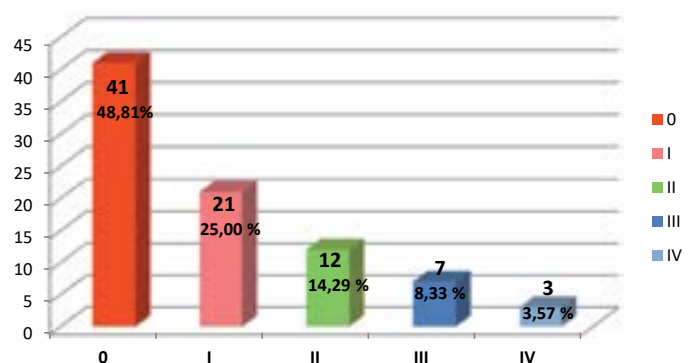
Sledovaním klinického stavu a mikrobiologických kultivačných náleзов pacientok počas 10-mesačného podávania autovakcín sme zistili, že 41 (48,81 %) z nich nemalo recidívu, 21 (25 %) pacientok malo 1 recidívu, 12 (14,29 %) pacientok malo 2 recidívy, 7 (8,33 %) pacientok 3 recidívy a u 3 (3,57 %) pacientok boli viac ako 3 recidívy počas sledovaného obdobia liečby (**graf 2**).

Na konci 10-mesačnej liečby autovakcínami sme zaznamenali 62 (73,81 %) úspešne liečených pacientok, u ktorých sa počas liečby nevyskytla recidíva alebo mali len jednu recidívu, 12 (14,29 %) čiastočne úspešne liečených pacientok celkovo s dvomi recidívami a 10 (11,90 %) neúspešne liečených pacientok, u ktorých sa nepodarilo dosiahnuť zníženie

Tabuľka 4. Kritériá hodnotenia stavu pacientok počas 1. a 2. roka po skončení liečby autovakcínami

Výrazne zlepšený	bez recidívy počas 1., resp. 2. roka po skončení liečby 1 recidíva počas 1., resp. 2. roka po skončení liečby
Čiastočne zlepšený	2 recidívy počas 1., resp. 2. roka po skončení liečby
Bez zmeny	3 a viac recidív počas 1., resp. 2. roka po skončení liečby

Graf 2. Počet recidív počas podávania autovakcín u pacientok súboru



0 – bez recidívy, **I** – 1 recidíva, **II** – 2 recidívy, **III** – 3 recidívy, **IV** – viac ako 3 recidívy počas liečby autovakcínami

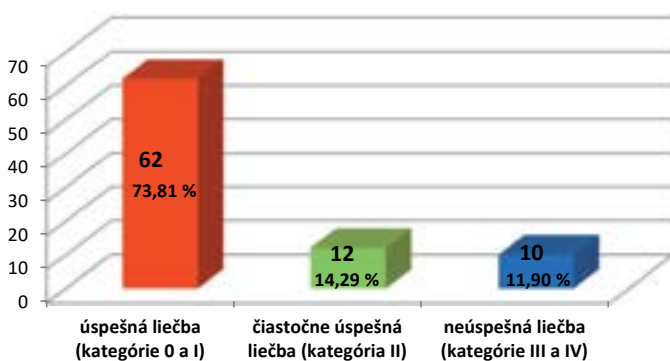
počtu recidív počas celého obdobia liečby. U žiadnej z liečených pacientok nedošlo k zhoršeniu zdravotného stavu (**graf 3**).

V skupine úspešne liečených pacientok (bez recidív alebo s jednou recidívou počas liečby) boli aplikované autovakcínny obsahujúce mikrobiálny antigénny komplex (MAK) *Candida albicans* u 28 (33,33 %) pacientok, v skupine čiastočne úspešne liečených (2 recidívy počas liečby) bol podiel autovakcín s obsahom MAK *C. albicans* 8 (9,52 %) a v skupine neúspešne liečených pacientok tvorili autovakcínny s obsahom MAK *C. albicans* iba 4 (4,76 %) (**graf 4**). Vzhľadom na nízky počet autovakcín s obsahom MAK iných mikroorganizmov a autovakcín s obsahom MAK dvoch alebo troch mikroorganizmov, t. č. sa nemožno vyjadriť k otázke, či a/alebo ako ovplyvní zloženie autovakcín úspešnosť liečby.

Hodnotenie klinického stavu pacientok súboru počas 1. roka po skončení liečby autovakcínami

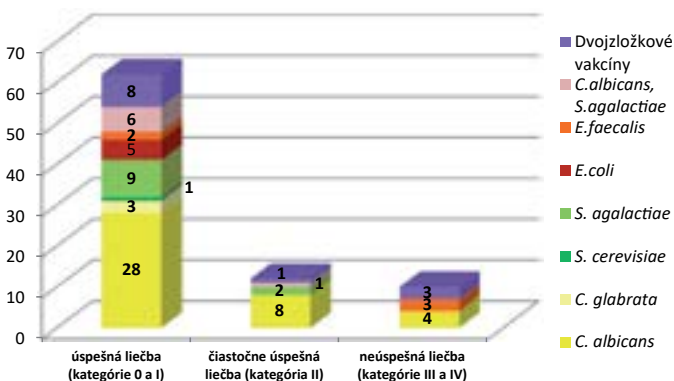
Sledovali sme počet klinicky zjavných a kultivačne potvrdených recidív u pacientok súboru počas 1. roka po skončení liečby autovakcínami. Počet recidív počas 1. roka po skončení

Graf 3. Celková úspešnosť liečby autovakcínami po jej ukončení v súbore pacientok



Úspešná liečba (kategórie 0 a I) – bez recidív alebo 1 recidíva počas liečby autovakcínami; **čiastočne úspešná liečba (kategória II)** – 2 recidívy počas liečby autovakcínami; **neúspešná liečba (kategórie III a IV)** – 3 a viac recidív počas liečby autovakcínami

Graf 4. Zloženie autovakcín v skupinách rozdelených podľa úspešnosti priebehu liečby



Úspešná liečba (kategórie 0 a I) – bez recidív alebo 1 recidíva počas liečby autovakcínami; **čiastočne úspešná liečba (kategória II)** – 2 recidívy počas liečby autovakcínami; **neúspešná liečba (kategórie III a IV)** – 3 a viac recidív počas liečby autovakcínami

liečby autovakcínami v jednotlivých kategóriách pacientok je znázornený na **grafe 5**.

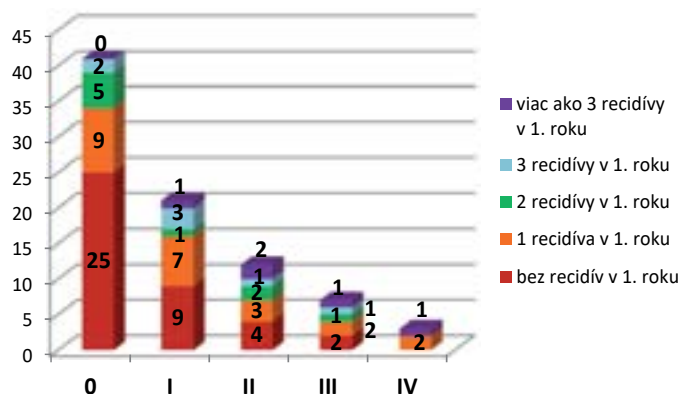
Na konci 1. roka po skončení liečby autovakcínami sme zaznamenali 63 (75 %) pacientok s výrazne zlepšeným stavom (bez recidívy alebo s jednou recidívou počas 1. roka po skončení liečby), 9 (10,71 %) pacientok s čiastočne zlepšeným stavom (2 recidívy počas 1. roka po skončení liečby) a 12 (14,29 %) pacientok bez zlepšenia stavu (3 a viac recidív počas 1. roka po skončení liečby). Zhoršenie stavu v 1. roku po liečbe sme nezaznamenali u žiadnej liečenej pacientky (**graf 6**).

Hodnotenie klinického stavu pacientok počas 2. roka po skončení liečby autovakcínami

Sledovali sme počet klinicky zjavných a kultivačne potvrdených recidív u pacientok súboru počas 2. roka po skončení liečby autovakcínami. Počet recidív počas 2. roka po skončení liečby autovakcínami v jednotlivých kategóriách pacientok je znázornený na **grafe 7**.

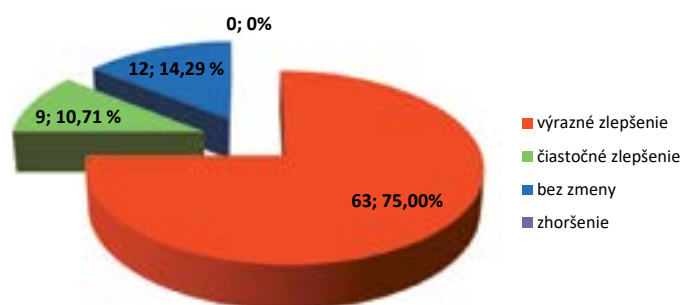
Na konci 2. roka po skončení liečby autovakcínami sme zaznamenali 65 (77,38 %) pacientok s výrazne zlepšeným stavom (bez recidívy alebo s jednou recidívou počas 2. roka po skončení liečby), 7 (8,33 %) pacientok s čiastočne zlepšeným stavom (2 recidívy počas 2. roka po skončení liečby) a 12 (14,29 %) pacientok bez zlepšenia stavu (3 a viac recidív počas 2. roka po skončení liečby). Zhoršenie stavu v 2. roku po liečbe sme nezaznamenali u žiadnej liečenej pacientky (**graf 8**).

Graf 5. Počet recidív počas 1. roka po skončení liečby autovakcínami v kategóriách 0 až IV

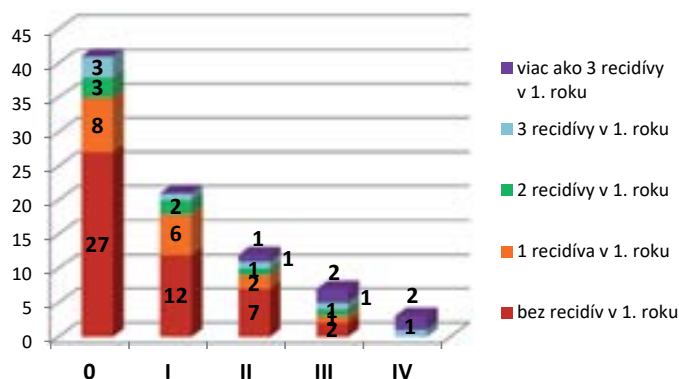


0 – bez recidív; I – 1 recidíva; II – 2 recidívy; III – 3 recidívy; IV – viac ako 3 recidívy počas liečby autovakcínami

Graf 6. Hodnotenie zdravotného stavu pacientok počas 1. roka po skončení liečby autovakcínami



Graf 7. Počet recidív počas 2. roka po skončení liečby autovakcínami v kategóriách 0 až IV



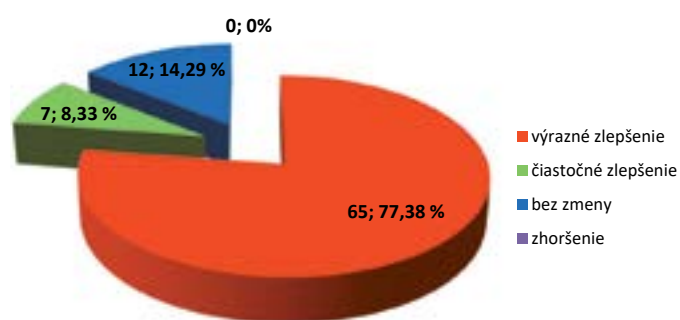
0 – bez recidív, I – 1 recidíva, II – 2 recidívy, III – 3 recidívy, IV – viac ako 3 recidívy počas liečby autovakcínami

Diskusia

Je relatívne málo publikovaných výsledkov liečby chronických a recidivujúcich kolpitíd autovakcínami. Výsledky liečby najväčšieho súboru pacientok zverejnila Rutová zo Zdravotného ústavu so sídlom v Ostrave⁽¹⁶⁾. Vo svojej práci prezentovala výsledky liečby autovakcínami pripravenými na oddelení bakteriológie a mykológie v laboratóriu na prípravu imunomodulátorov počas rokov 1985 – 1995. Za toto obdobie pripravili pre pacientky s gynekologickými zápalmi 408 autovakcín, z nich 92 % bolo indikovaných pre chronické mykotické kolpitídy. Z pripravených autovakcín bolo 90 % injekčných. Úspešnosť liečby hodnotili na súbore 248 pacientok bezprostredne po skončení liečby. Zlepšenie stavu dokumentovali u 74,90 %, bez zmeny stavu bolo 12,50 % a liečbu nedokončilo 12,50 % pacientok. Imunologické vyšetrenie absolvovalo iba 15 % pacientok, z toho dôvodu vplyv liečby na parametre imunitného systému nebol hodnotený. Pacientky nášho súboru boli liečené perorálnymi hyposenzibilizačnými autovakcínami, zlepšenie stavu (úspešná a čiastočne úspešná liečba) na konci liečby sme zaznamenali u 74 (88,10 %) z nich. Napriek odlišnostiam (napr. v spôsobe podávania) sme zaznamenali výrazne lepšie výsledky.

Autorky Viktorinová a Koukalová⁽¹⁷⁾ publikovali výsledky kožných testov 80 pacientok s chronickou vaginálnou kandidózou. Signifikantnú precitlivosť včasného typu v súbore chorých pacientok dokázali iba na antigény *C. albicans*. V súbore chorých žien bola znížená neskorá odpoveď na všetky testované antigény – *C. albicans*, *C. krusei* a *C. glabrata*. Podľa autoriek tento nález nepriamo poukazuje na zníženú bunkovú imunitnú odpoveď u žien s chronickou a recidivujúcou vaginálnou kandidózou. V publikácii sa odvolávajú na výsledky ich vlastnej štúdie, v ktorej zistili, že u 68,10 % pacientok s recidivujúcou vaginálnou kandidózou je znížená fagocytárna aktivita leukocytov a u 36,60 % zistili výskyt zníženého počtu CD4+ T-lymfocytov. Po imunostimulačnej liečbe vaginálnou alebo perorálnou vakcínou Kanvakol, obsahujúcou mikrobiálny lyzát zložený z kvasiniek *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* a baktérie *Propionibacterium acnes*, došlo k úprave týchto parametrov, preto autori predpokladajú významnú úlohu CD4+ T-lymfocytov v obranyschopnosti proti mykotickým infekciám. Koukalová a spol.⁽¹⁸⁾ publikovali výsledky vakcinoterapie recidivujúcich kvasinkových zápalov pošvy

Graf 8. Hodnotenie zdravotného stavu pacientok počas 2. roka po skončení liečby autovakcínami



použitím vakcíny Kanvakol vyvinutej na ich pracovisku. Do štúdie zaradili 91 pacientok, výsledky štúdie hodnotili u 66 z nich, 41 pacientok bolo liečených perorálnou tabletovou formou vakcíny, 11 pacientok vakcínou vo forme vaginálnych globúl a 14 pacientok obidvomi formami súčasne. Kontrolnú skupinu tvorilo 16 žien liečených antimykotikami. Terapia vaginálnou formou vakcíny bola úspešná u 81,80 % pacientok a liečba perorálnou formou u 80,40 % pacientok. Liečba obidvomi formami naraz bola úspešná u 71,40 % pacientok. Veľmi dobrý liečebný účinok dosiahli celkovo u 78,80 % pacientok. Priaznivý účinok pretrvával priemerne 9,9 mesiaca u 35 pacientok (53 %), u ďalších 17 (25,76 %) došlo k 1 recidíve v období 7 – 18 mesiacov po skončení liečby.

Úspešnosť liečby v našom súbore je porovnateľná s úspešnosťou liečby súboru pacientok publikovaných autorkami Koukalová a spol.⁽¹⁸⁾. Výrazne zlepšený stav v 1. roku po skončení liečby sme zaznamenali u 63 (75 %) pacientok, v 2. roku u 65 (77,35 %) pacientok.

Vzhľadom na rôznorodosť a často neporovnateľnosť výsledkov publikovaných inými autorskými kolektívami, našou snahou je štandardizovať podávanie a spôsob hodnotenia úspešnosti liečby pacientok autovakcínami. Nami publikované výsledky sú výsledkami liečby pacientok liečených perorálnymi hyposenzibilizačnými autovakcínami podávanými podľa štandardnej dávkovacej schémy a pri hodnotení liečby a následného obdobia po liečbe sme použili rovnaké hodnotiace kritérium – počet recidív infekcie. Prvé nami publikované výsledky z roku 2016⁽¹⁹⁾ boli výsledkami liečby súboru pacientok (n = 101) liečených autovakcínami, ktoré boli podávané podľa hyposenzibilizačnej, imunizačnej a kombinovanej schémy. Úspešnosť liečby bola porovnateľná, po skončení liečby sme zaznamenali úspešnú liečbu u 68 (67,33 %) pacientok, čiastočne úspešnú liečbu u 20 (19,80 %) a neúspešnú liečbu sme evidovali u 13 (12,87 %) pacientok. V 1. roku po liečbe autovakcínami bolo 73 (72,28 %) pacientok vo výrazne zlepšenom stave, u ďalších 11 (10,89 %) pacientok bol stav čiastočne zlepšený a bez zlepšenia stavu bolo 17 (16,83 %) pacientok.

Záver

Na základe našich výsledkov môžeme konštatovať, že liečba perorálnymi hyposenzibilizačnými autovakcínami má svoje jasné opodstatnenie a prínos ako doplnková liečba chronických a recidivujúcich kolpitíd u žien, u ktorých opakovaná antimikrobiálna liečba neprinesla zlepšenie. Posúdenie

potreby a vhodnosti tejto formy liečby pre konkrétne pacientky je na odbornom lekárvi gynekológovi, imunológovi, ktorý po zhodnotení doterajšieho priebehu liečby a celkového zdravotného stavu pacientky môže indikovať túto liečbu. Ne treba zabúdať, že aj táto liečba má kontraindikácie, neodporúčame ju tehotným ženám, imunodeficientným pacientkam a pacientkam s autoimunitnými chorobami.

LITERATÚRA

1. Duniill M. The Plato of Praed Street: the Life and Times of Almoth Wright. Reviewed by John Henderson, J R Soc Med 2001; 94(7): s. 364-365.
2. Bystroň J. Perorální bakteriální imunomodulátory a medicína založená na dôkazoch. Alergie 2003; 5: 284-289.
3. Rusch V, Ottendorfer D, Zimmermann K, et al. Results an open, non-placebo controlled pilot study investigating the immuno-modulatory potential of autovaccine. In: Old Herborn University Seminar Monograph 15. Herborn: Herborn Literae, 2002; p.121-131, ISBN 3-923022-26-3, ISSN 1431-6579.
4. Nolte O, Bidewald A, Weiss H, Sonntag HG. Eradication of multi-resistant *Escherichia coli* from a patient with urinary tract infection using specific autovaccination therapy. 3rd Annual Conference on Vaccine Research, Washington D.C., 2000; P1.
5. Szkaradkiewicz A, Karpinski TM, Giedrys-Kalemba S, Tuiecka T. Effectiveness of immunotherapy using *S. aureus* autovaccine in chronic staphylococcal diseases 22nd ECCMID 2012; Oral session: Clinical and experimental immunology, abstrakt dostupný na internete: https://www.escmid.org/escmid_publications/escmid_elibrary
6. Rose M, Weigand B, Schubert R, et al. Safety, tolerability and impact on allergic inflammation of autologous *E.coli* autovaccine in the treatment of house dust mite asthma – a prospective open clinical trial. BMC Complementary & Alternative Medicine 2011; 11: 45.
7. Murray P, et al. Medical microbiology. 6th edition. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2009. ISBN 978-0-323-05470-6.
8. Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. Lancet 2007; 369: s. 1961-1971.
9. Mayer FL, Wilson D, Hube B. Candida albicans pathogenicity mechanisms. Virulence 2013; 4(2): s. 119-128.
10. Moyes DL, et al. Candida albicans yeast and hyphae are discriminated by MAPK signaling in vaginal epithelial cells. PLoS ONE 2011; 6: s. e26580.
11. Leclair CM, Hart AE, Goetsch MF. Group B streptococcus prevalence in a nonobstetric population. J Low Genit Tract Dis 2010; 14(3): s. 162-166.
12. Shen X, Lergard T, Yang Y. Systemic and mucosal immune responses in mice after mucosal immunization with Group B Streptococcus type III Capsular Polysaccharide-Cholera Toxin B Subunit Conjugate Vaccine. Infection and immunity 2000; 68(10) s. 5749-5755.
13. Kotulová D, et al. Návrh na štandardné metódy prípravy bakteriálnych imunomodulačných „stock“ vakcín. Acta Hygienica, Epidemiologica et Microbiologica 1991. príloha č. 2, ISSN 0862-5956.
14. Maršálek E, Černá I, et al. Příprava mikrobiálního alergického komplexu k diagnostice a léčbě infekčně alergických onemocnění. Čs. epidemiologie, mikrobiologie, imunologie 1971; 20: s. 175-183.
15. European Pharmacopoeia 7th edition, suppl. 7.8, Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2013; čl. 2. 6. 1, ISBN/ISSN: 978-92-871-7224-2.
16. Rutová J. Autovakcíny při léčbě chronických a recidivujících kolpitid. Medicína 1998; 5(6): příloha Imunologie dnes, s. 21.
17. Viktorinová M., Koukalová D. Mikrobiální kožní testy u pacientek s chronickou vaginální kandidózou. Čes-slov Derm 2000; 75(4): s. 147-151.
18. Koukalová D., Viktorinová M, et al. Vakcinoterapie recidivujících kvasinkovitých zánětů pochvy. Klinická mikrobiologie a infekční lékařství 1998; 4(10): s. 306-310.
19. Czirfuszová M, Autovakcíny v léčbě chronických a recidivujících kolpitid. Zdravotnictví a sociální práce 2016; 11(3): s. 21 - 31 ISSN 1336-9326.

Autori publikácie srdečne ďakujú spolupracujúcim gynekológom a imunológom za poskytnutie informácií o klinickom stave a kultivačných nálezocho súboru.



MUDr. Czirfuszová Monika, PhD.

Medirex, a. s.

Mederčská 39, 945 01 Komárno

e-mail: monika.czirfuszova@medirex.sk

Laboratórna diagnostika syfilisu

RNDr. Tatiana Kopilcová

Medirex, a. s., Bratislava

Syfilis je systémové infekčné venerické ochorenie vyvolané fragilnou špirálovitou baktériou *Treponema pallidum*. Cesta prenosu je vo väčšine prípadov sexuálnym kontaktom s infekčnými léziami – získaný syfilis. Podľa údajov Európskeho centra pre prevenciu a kontrolu chorôb (ECDC) takmer dve tretiny prípadov so známym spôsobom prenosu sa týkajú mužov, ktorí majú sex s mužmi. Nebezpečná je možnosť prenosu z matky na plod *in utero* – kongenitálny syfilis – a transfúziou krvných derivátov. Sú tri dôležité aspekty stanovenia diagnózy syfilisu: epidemiologická analýza, klinické vyšetrenie a laboratórna diagnostika. V našom laboratóriu používame na skrining netreponémové RPR (Rapid Plasma Reagin) a špecifické treponémové TPPA (*Treponema* Passive Particle Agglutination Assay) testy alebo CMIA (Chemiluminiscent Microparticle ImmunoAssay). Všetky reaktívne vzorky confirmujeme metódou imunoblot IgM a IgG.

Kľúčové slová: *Treponema pallidum*, získaný syfilis, kongenitálny syfilis, netreponémové testy, treponémové testy

Laboratory diagnosis of syphilis

Syphilis is a systemic infectious venereal disease caused by the fragile spiral bacterium *Treponema pallidum*. The route of transmission is mostly by sexual contact with infectious lesions – acquired syphilis. According to the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), almost two-thirds of the syphilis cases with information on transmission category were reported in men who have sex with men (MSM). Dangerous is the possibility of transmission from mother to foetus *in utero* – congenital syphilis and by blood products transfusion. There are three aspects of syphilis diagnosis: clinical history, physical examination and laboratory diagnosis. In our laboratory, we use for screening non-treponemal RPR (Rapid Plasma Reagin), and specific treponemal TPPA (*Treponema* Passive Particle Agglutination Assay) tests or CMIA (Chemiluminescent Microparticle Immuno-Assay). All reactive samples we confirm with immunoblot IgM and IgG test.

Keywords: *Treponema pallidum*, acquired syphilis, congenital syphilis, non-treponemal tests, treponemal tests

NewsLab, 2017; roč. 8 (2): 91 – 93

Úvod

Syfilis (lues) je historicky známe chronické multisystémové pohlavne prenosné infekčné ochorenie spôsobené baktériou *Treponema pallidum*. Uvažuje sa o možnosti, že do Európy sa dostal s námorníkmi Christophera Columba po návrate z Nového sveta. Pomerne rýchlo zachvátil mnoho európskych krajín a prepukol do rozsiahlej epidémie. Predpokladá sa, že mnoho významných osobností trpelo týmto ochorením, napríklad Beethoven, Karol VIII., Ivan Hrozný, Shakespeare, Vincent Van Gogh, Oscar Wilde, Adolf Hitler a Abraham Lincoln. Napriek súčasným možnostiam diagnostiky a liečby je to stále aktuálny problém zdravotníctva na celom svete. V SR má od roku 1990 alarmujúco stúpajúci trend. S ochorením sa stretávame hlavne u sexuálne aktívnych dospelých, keď sa infekcia akviruje sexuálnym kontaktom s infekčnými léziami. Podľa údajov Európskeho centra pre kontrolu chorôb (ECDC) takmer dve tretiny novodiagnostikovaných prípadov tvoria muži majúci sex s mužmi. Veľké nebezpečenstvo spočíva v prieniku *T. pallidum* cez placentu na novorodencov u neliečených alebo nedostatočne liečených séropozitívnych matiek, čo je, žiaľ, u nás aktuálny problém najmä v sociálne slabších vrstvách. Možný je aj prenos transfúziou krvných derivátov. Veľmi príležitostne sa stretávame so získaním infekcie cez porušený kožný kryt. Jediný známy prirodzený hostiteľ je človek.

Pôvodca

Treponema pallidum subs. *pallidum* (obrázok 1) z čeľade Spirochetaceae je fragilný špirálovitý mikroorganizmus

0,18 µm široký, 20 µm dlhý so 4 až 14 pravidelnými závitmi. Z oboch koncov vyčnievajúce axiálne fibrily, podobné bakteriálnym bičikom, umožňujú rotáciu v priestore. Protoplazmatický valec je obalený 3-vrstvovou stenou, ktorá obsahuje kyseliny muramové, a udržiava vláknitý tvar. Celé telo je obalené tenkou fragilnou membránou. Virulentné kmene majú na svojom povrchu slizovú vrstvu. Treponémy majú nízku odolnosť a sú citlivé na vplyvy vonkajšieho prostredia, ničia ich aj zriedené roztoky bežných dezinfekčných prostriedkov a kyslík. Pri teplote nad 39,5 °C hynú za 4 hodiny a v krvných konzervách neprežijú 4 dni. Inkubačný čas je od 10 do 90 dní, priemerne asi 3 týždne. Treponémy sú veľmi invazívne, prenikajú kožou alebo sliznicami a špecificky sa viažu na rôzne druhy

Obrázok 1. *Treponema pallidum*, elektrónová fotomikrografia zv. 36 000x



Zdroj: CDC/NCHSTP/Division of STD Prevention, STD Clinical Slides

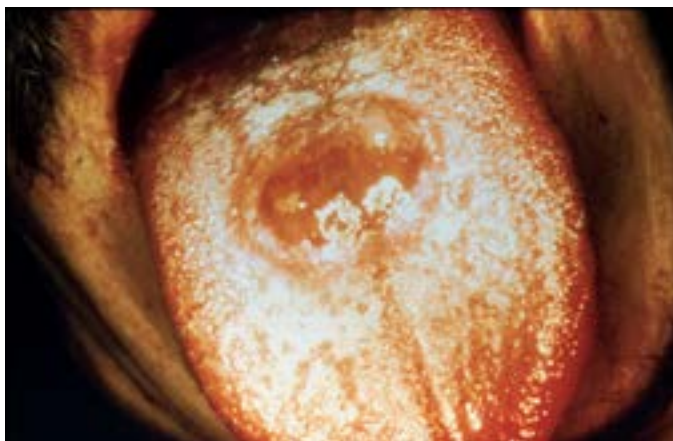
buniek. K diseminácii dochádza relatívne skoro po inokulácii.

Rozmnožujú sa extracelulárne. Ich lipoproteíny indukujú perivaskulárny zápalový proces. Môžu byť fagocytované makrofágmi a endoteliami krvných vlásočníc, poškodzujú kapiláry a zhoršujú ich funkciu. Vďaka unikátnej štruktúre vonkajšej membrány vedú uniknúť hostiteľskej imunitnej odpovedi. Obsahujú enzým degradujúci hyalurónovú kyselinu, čo umožňuje hematogénny rozsev napriek vysokému titru cirkulujúcich protilátok. Následné imunopatologické procesy sú spôsobené komplexmi antigénu s protilátkou. Slizová vrstva chráni baktérie pred účinkom protilátok a komplementu. Špecifická protilátková (IgM, IgG) i bunková obrana môže viesť k spontánnemu uzdraveniu. Imunita sa rozvíja pomaly, asi za 2 roky po infekcii. Napriek komplexnej imunitnej odpovedi v priebehu prvej epizódy syfilisu sú však možné reinfekcie. Umožňuje ich existencia 7 diskretných variabilných (V) regiónov *Treponema pallidum* repeat protein K (TprK). Protilátková odpoveď v priebehu infekcie je namierená práve proti týmto V regiónom. Diverzita proteínu K (TprK) je prekážkou rozvoja účinnej vakcíny.

Štádiá syfilisu

Primárne po 10 až 90 dňoch od akvizovania infekcie sa vyskytne nebolestivý tvrdý vred (**obrázok 2**) v mieste prenosu. Progreduje od makuly cez papulu do vysokoinfekčného ulcus durum, z ktorého môžu byť treponémy izolované. V infiltráte

Obrázok 2. Primárne štádium – lézia na jazyku



Zdroj: CDC/NCHSTP/Division of STD Prevention, STD Clinical Slides

Obrázok 3. Sekundárny syfilis – generalizovaný raš



Zdroj: Cincinnati STD/HIV Prevention Training Center

nachádzame lymfocyty, plazmatické bunky a makrofágy, zápalová reakcia spôsobuje obliteratívnu endoarteritídu. Po 3 až 12 týždňoch sa i bez liečby spontánne vyhojí. Celé primárne štádium je sprevádzané regionálnou lymfadenopatiou. V skoršej fáze tohto štádia môžu byť sérologické testy na syfilis negatívne. Protilátková odpoveď nezabráni rozvoju druhého štádia.

Sekundárne štádium (obrázok 3) sa rozvinie po 4 až 10 týždňoch od objavenia sa primárnej lézie. Treponémy sa množia a zaplavujú organizmus. Systémová manifestácia zahŕňa nesvrbivý generalizovaný makulopapulózny raš, nevoľnosť, horúčku, myalgie, artralgie, lymfadenopatiu. Objavujú sa condylomata lata a alopecia. Výrazne stúpa koncentrácia protilátok a tvoria sa komplexy antigénu s protilátkou.

Pri prvom i druhom štádiu syfilisu môžu príznaky ustúpiť a v **latentnej** podobe môže pôvodca syfilisu prežívať u infikovaného aj niekoľko rokov alebo až do konca života. Získaný primárny, sekundárny a včasný latentný syfilis sa podľa Európskeho centra pre prevenciu a kontrolu chorôb (ECDC) a Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) definuje ako **včasný syfilis** (infekčný syfilis). Približne 30 % neliečených pacientov v priebehu 1 až 20 rokov progreduje do **terciárneho** štádia. Klinicky sa prejavuje ako gumatózny syfilis, parenchymatózny neurosyfilis a kardiovaskulárny syfilis. Nastávajú orgánové zmeny, poškodenie ciev a centrálnaj nervovej sústavy (CNS). Treponémy sa v tomto štádiu dokazujú iba výnimočne. V ktoromkoľvek štádiu infekcie môže dôjsť k rozvoju **neurosyfilisu**, keď spirochety invadujú CNS. Môže byť asymptomatický, ale aj s veľmi vážnymi klinickými prejavmi. Včasný sa po niekoľkých mesiacoch až rokoch po infekcii prejaví ako syfilitická meningitída, meningovaskulárny alebo okulárny syfilis. Neskorý sa ukáže dekády po infekcii a charakteristické sú parézy a tabes dorsalis. Môže sa končiť úplnou paralýzou, stratou reflexov a demenciou s rozpadom osobnosti. Neskorý latentný a terciárny (gumatózný syfilis, kardiovaskulárny a neurosyfilis) sa definujú ako **neskorý syfilis (obrázok 4)**. **Kongenitálny** syfilis je dôsledok penetrácie *T. pallidum* cez placentu alebo k akvizovaniu dochádza v infikovanom pôrodnom kanáli. Od 70 do 100 % novorodencov matiek s neliečeným včasným syfilisom je infikovaných a v jednej tretine prípadov sa plod narodí mŕtvy. Avšak aj primerane liečeným matkám sa môže narodiť mŕtvy alebo infikovaný novorodenec. Deti s kongenitálnym syfilisom sa rodia predčasne, sú dehydratované, majú nízku pôrodnú

Obrázok 4. Neskorý syfilis – ulcerujúce gummy



Zdroj: CDC/NCHSTP/Division of STD Prevention, STD Clinical Slides

hmotnosť. Príznaky zodpovedajú sekundárnemu štádiu – exantémové kožné prejavy, zväčšená pečeň. Potom nastáva fáza latencie. Po viac ako dvoch rokoch infekcie hovoríme o neskorom vrodennom syfilise, pri ktorom sa objavujú ťažké poškodenia orgánov – hluchota, intersticiálna keratitída až slepota, perforácie podnebia, nosa, súdkovitý tvar rezákov.

Terapia

Určená je výhradne dermatovenerológom. Liekom prvej voľby je G penicilín, vhodnejšie je parenterálne podávanie a β -laktámové antibiotiká. Pri alergii na penicilín je vhodný tetracyklín a doxycyklín. V prípade azitromycínu a iných makrolidov narastá podiel rezistencie spôsobený bodovou mutáciou génu pre 23S rRNA. Dobrú penetráciu do mozgovomiechového moku majú tetracyklín, doxycyklín a ceftriaxon.

Laboratórna diagnostika

Na stanovenie diagnózy syfilisu (Dg. A50 – A53) sú nutné tri základné aspekty: epidemiologická anamnéza, klinické vyšetrenie a laboratórna diagnostika.

Možnosti **priamej laboratórnej diagnostiky** sú pomerne obmedzené. Na umelých kultivačných pôdach treponémy nerastú, nemnožia sa v kuracom embryu ani v tkanivových kultúrach. Metódy molekulárnej biológie sa rutinne nevyužívajú pre viac ako 95 % homológiu DNA patogénnych treponém (*T. pallidum subsp. pallidum*, *T. pallidum subsp. pertenue*, *T. pallidum subsp. endemicum*, *T. carateum*). Užitočné sú iba pri diagnostike z primárne sterilných tekutín, ako je mozgovomiechový mok, amniotická alebo očná tekutina. *T. pallidum* nie je vizualizovateľná Gramovým farbením pre jej minimálnu hrúbku. Možná je identifikácia živých treponém v tkanivovom moku získanom zo spodiny ulcus durum na základe ich rotačného a kývavého pohybu mikroskopiou v tmavom poli. Táto metodika patrí do rúk dermatovenerológov. Je veľmi prácná, zaťažená subjektívnou chybou pozorovateľa a možnosťou získania falošne pozitívnych aj negatívnych výsledkov. Striebrnenie podľa Levadetiho je podobne veľmi náročné, priama imunofluorescencia s využitím polyklonálnych protilátok identifikuje treponémy v léziách. Základ laboratórnej diagnostiky tvoria **sérologické testy**. Treba si však uvedomiť, že žiaden z týchto testov nerozliší venerický syfilis od nevenerických treponematóz (yaws, bejel, endemický syfilis a pinta). Tieto patogény sú morfologicky a antigénne podobné a odlíšiť ich vieme iba na základe spôsobu získania, epidemiológie a klinickej manifestácie a dnes už aj DNA sekvenovaním. Všetky osoby s pozitívnymi sérologickými nálezmi by mali byť liečené na syfilis. Laboratórne sa syfilis diagnostikuje kombináciou netreponémových a treponémových testov. V **netreponémových (nešpecifických) reagínových testoch** dokazujeme v sére po 10 až 15 dňoch, v likvore po 4 – 8 týždňoch po objavení sa tvrdého vredu zmes heterofilných IgM a IgG proti kardiolipínu, lecitínu a cholesterolu, uvoľneného rozpadom tkanív hostiteľa v priebehu ochorenia a naviazaného ako haptén na proteíny treponém. Titre reagínov korelujú s aktivitou ochorenia, monitorujú jeho aktivitu a úspešnosť liečby. Pri absencii terapie kulminujú po 1 až 2 rokoch. V praxi sa stretávame s rôznymi obmenami týchto testov: VDRL (Venereal Disease Research Laboratory), BWR (Bordetova-Wassermanova reakcia), RPR (Rapid Plasma Reagin) a RRR (Rapid Reagin Reaction). V našom laboratóriu používaný RPR test využíva flokuláciu kardiolipínového antigénu naviazaného na uhlíkové častice protilátkami (reagínmi) v patientskom sére. V **treponémových**

(špecifických) testoch sa stanovujú špecifické IgM a IgG protilátky proti pôvodcovi ochorenia *Treponema pallidum*. Väčšina z nich využíva rekombinantné antigény treponém. Najčastejšie sa používajú testy TPPA (*Treponema* Passive Particle Agglutination Assay), TPHA (*Treponema pallidum* Haemagglutination Assay), EIA (Enzyme Immunosorbent Assay), CMLA (Chemiluminescent Microparticle ImmunoAssay) – IgM, IgG, konfirmačný test imunoblot – IgM, IgG a FTA-abs test (Fluorescent Treponemal Antibody absorption test) v referenčnom laboratóriu. Rýchly Point of Care test pre jeho suboptimálnu senzitivitu odporúča ECDC aj WHO iba pre rozvojové krajiny. Treponémové testy začínajú byť reaktívne 1 až 2 týždne po objavení sa tvrdého vredu, i keď z praxe vieme, že je to veľmi individuálne a niekedy to môže trvať až do troch mesiacov. Stanovenie titrov špecifických protilátok v diagnostike a manažmente syfilisu nie je prínosné. Význam stanovenia titrov je len v diagnostike kongenitálneho syfilisu a neurosyfilisu. Špecifické treponémové protilátky zostávajú u väčšiny pacientov pozitívne po celý život a identifikujú osoby úspešne liečené aj osoby s neliečeným syfilisom. Treba si uvedomiť možnosť biologicky falošnej reaktivity sérologických testov, často pri autoimunitných ochoreniach, v gravidite a pri borelióze, preto sa reaktívne vzorky konfirmujú. Optimálna je metóda imunoblot, kde stanovujeme IgM a IgG protilátky proti jednotlivým membránovým proteínom *T. pallidum*. Potvrdenie IgM protilátok je zvlášť cenné pri diagnostike kongenitálneho syfilisu.

Diagnostika v MEDIREX-e

Podľa **odborného usmernenia NRC pre syfilis (2005)** pre skrining syfilisu podliehajú vyhľadávaniu nových prípadov (špecifický + nešpecifický test) všetci dospelí po 50. roku pri prvej hospitalizácii v roku, do 50. roku pri každej hospitalizácii, každý STD chorý, každá tehotná 2x počas gravidity (3.-4.m. a 7.-8.m.), všetci darcovia krvi, kostnej drene, tkanív, orgánov a spermií a novorodenci. Keďže kombinácia testov RRR + TPPA je prácná a časovo náročná a výsledky sú až na 2. deň po doručení vzorky do laboratória, zaviedli sme v našich laboratóriách na skrining syfilisu špecifický test CMLA IgM + IgG. Vďaka detekcii IgM protilátok je reaktívny od 2. týždňa ochorenia, plne automatizovaný a negatívny výsledok je v deň doručenia vzorky do laboratória. Kombináciu testov RRR + TPPA sme ponechali štandardne pre dermatovenerologických pacientov a novorodencov. Každé reaktívne sérum v teste CMLA overujeme testami RRR a TPPA a všetky novodiagnostikované nálezy konfirmujeme metódou imunoblot IgM a IgG. Séra nových sérologicky diagnostikovaných suspektných ochorení zasielame na konfirmačné vyšetrenie do RÚVZ – Národného referenčného centra pre syfilis v Košiciach. Špecifickou súčasťou našej činnosti je vyšetrenie z plodovej a očnej tekutiny a diagnostika neurosyfilisu. Intratekálnu produkciu protilátok stanovujeme porovnaním titra TPPA v sére a v likvore.

Odber biologického materiálu a transport do laboratória

Odoberá sa krv v množstve 5 – 7 ml do špeciálnej odberovej súpravy určenej na odber a transport krvi. Do dvoch hodín sa môže krv transportovať pri izbovej teplote. Plodovú vodu, očnú tekutinu a likvor je vhodné zasielať v množstve min. 1 ml.

Ak transport vyžaduje dlhší čas, je potrebné vzorku transportovať a uchovávať pri 2 – 8 °C.

Tabuľka 1. Vyšetrenie špecifických protilátok metódou TPPA alebo CMIA v rokoch 2008 – 2016

Materiál	Celkový počet vyšetrení	Počet pozitívnych	Percento pozitivity
Sérum	753 865	9 367	1,24 %
Likvor	1 258	49	8,39 %
Očná tekutina	16	4	25 %

Záver

Z prehľadu klinických prejavov syfilisu vyplýva, že nie každý symptóm je typický pre toto ochorenie, štádium latencie je bez klinických prejavov, ale pacient môže byť infekčný, preto skrining a následná liečba sú dôležitým preventívnym opatrením proti šíreniu syfilisu. V **tabuľke 1 a 2** je uvedený celkový počet vyšetrení špecifických protilátok na našom oddelení v rokoch 2008 až 2016 a celkový počet pozitívnych vzoriek

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, et al. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, D.C. 9th edition 20036-2904 USA 2009; 987-1003.
2. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Lawetz, Melnick, &Adelberg's Medical Microbiology. Lange Medical Books/Mc Graw-Hill 27th edition New York 2001; 285-288.
3. Bednár M, Fraňková V, Schindler J, et al. *Lékařská mikrobiologie*, Marvill 1996; 185-188.
4. Baroňáková A. Syfilis, *Via pract* 2005; 2 (3): 138-140.

Tabuľka 2. Vyšetrenie špecifických protilátok metódou TPPA alebo CMIA v rokoch 2008 – 2016 u gravidných žien a novorodencov

	Celkový počet vyšetrení	Počet pozitívnych	Percento pozitivity
Gravidné ženy	107 788	486	0,45 %
Novorodenci	53 177	264	0,49 %

séra 9 367 je alarmujúci. Na druhej strane je potešiteľné, že sme nezaznamenali ani jedného novorodenca s reaktivitou špecifických protilátok, ktorý by mal zároveň pozitívitu netreponémových testov a IgM v konfirmačnom teste imunoblot, takže sme nepotvrdili ani jeden kongenitálny syfilis, iba prenesené materské protilátky. Potvrdzuje to správnosť skriningu v gravidite. Menej uspokojivé je zistenie 49 prípadov neurosyfilisu v sledovanom období na našom pracovisku.

5. Martinásková K. Syfilis v detskom veku. *Dermatol Prax* 2015; 9(4): 137-142.
6. European guideline on the management of syphilis, European Academy of Dermatology and Venereology 2014.
7. EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION A CONTROL. 2014/07 A. Sexually transmitted infections in Europe 2012: surveillance report. Štokholm: ECDC, 2014; 110 s. ISBN 978-92-9193-579-6.

RNDr. Tatiana Kopilcová

Medirex, a. s.

Galvaniho 17/C, Bratislava

e-mail: tatiana.kopilcová@medirex.sk

GUTTA

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

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

MOLEKULÁRNA DIAGNOSTIKA

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



UZATVORENÉ / VÁKUOVÉ ODBEROVÉ SYSTÉMY

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



LBC - CYTOLÓGIA

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

Využitie nepriamej imunofluorescencie pri detekcii autoprotílátok asociovaných so systémovou sklerózou

Mgr. Simona Duranková
Medirex, a. s., Bratislava

Systémová skleróza je autoimunitné ochorenie charakteristické prítomnosťou antinukleárných protílátok proti rôznym extrahovateľným antigénom. V sérach pacientov možno detegovať autoprotílátky špecifické pre systémovú sklerózu (autoprotílátky proti topoizomerase I, centromére-A, centromére-B, RNA polymeráze III -RP11, -RP155) a autoprotílátky asociované so systémovou sklerózou (autoprotílátky proti fibrilláriu, NOR90, Th/To, PM-Scl100, PM-Scl75, Ku, PDGFR, Ro-52). Jednotlivé typy autoprotílátok môžu byť asociované s rôznymi klinickými prejavmi pacienta a ich správna detekcia môže napomôcť pri diagnostike, prognóze a v manažmente ochorenia.

Kľúčové slová: autoprotílátky, autoantigén, systémová skleróza

Use of indirect immunofluorescence in the detection of autoantibodies associated with systemic sclerosis

Systemic sclerosis is an autoimmune disease characterised by the presence of antinuclear antibodies against various extractable antigens. In patient's sera, we can detect autoantibodies specific for systemic sclerosis (autoantibodies against topoisomerase I, centromere-A, centromere-B, RNA polymerase III -RP11, RP155) and autoantibodies associated with systemic sclerosis (autoantibodies against fibrillarin, NOR90, Th/To, PM-Scl100, PM-Scl75, Ku, PDGFR, Ro-52). Individual types of autoantibodies may be associated with various clinical manifestations of the patient, which may help in the diagnosis and management of the disease.

Keywords: autoantibodies, autoantigen, systemic sclerosis

NewsLab, 2017; roč. 8(2): 94 – 98

Systémová skleróza (SSc) je zriedkavé, chronické autoimunitné ochorenie spojivového tkaniva s neznámou príčinou vzniku. Charakterizuje ho výrazná fibróza kože, degeneratívne zmeny a vaskulárne abnormality, ktoré postihujú kožu, kĺby a vnútorné orgány (najmä pažerák, gastrointestinálny trakt, pľúca, srdce a obličky)⁽¹⁾. Na celom svete trpí týmto ochorením približne 2 – 50 zo 100 000 ľudí, pričom postihuje 3-4x častejšie ženy ako mužov (obvykle medzi 44. až 55. rokom života).

Vzhľadom na to, že SSc sa prejavuje rôznymi formami a na rôznych častiach tela, pričom sa dokonca môže dostať aj do pokojovej fázy, klinická diagnóza je pomerne náročná⁽²⁾.

Formy SSc:

- 1. Difúzna sklerodermia (dcSSc)** – zhrubnutie kože na tvári, trupe a na horných i dolných končatinách.
- 2. Limitovaná sklerodermia (lcSSc)** – zhrubnutie kože na obmedzených miestach distálne od lakťov a kolien, ale postihuje tiež tvár a krk. Synonymom je CREST syndróm (C – podkožná kalcifikácia, R – Raynaudov fenomén, E – porucha motility pažeráka, S – sklerodaktília, T – teleangiektázia).
- 3. Bez kožnej sklerodermie** – bez zjavných klinických kožných prejavov (s výnimkou tváre), ale s charakteristickými zmenami na vnútorných orgánoch, cievnyimi prejavmi a so sérologickými nálezmi.
- 4. Prekrývajúci sa syndróm** – SSc spĺňajúca zároveň aj kritériá systémového lupus erythematosus (SLE), reumatoidnej artritídy (RA) alebo polymyozitídy (PM).

5. Nediferencované ochorenie spojivového tkaniva/OVER-LAP syndróm – Raynaudov fenomén s klinickými a/alebo laboratórnymi prejavmi SSc (anticentromérové protílátky, zmeny mikrovaskulatury, ischemické defekty, edém a ulcerácie prstov), ale bez nálezu zhrubnutia kože a orgánových prejavov systémovej sklerodermie^(6,7).

Prítomnosť autoprotílátok je charakteristickou črtou SSc, ale aj iných autoimunitných ochorení. Stanovenie autoprotílátok v sérach pacientov s SSc je zvlášť dôležité – napomáha pri sledovaní priebehu ochorenia, prognóze a diferenciálnej diagnostike (najmä odlišenie od iných kolagenóz – napr. SLE, PM, Sharpov syndróm, Sjögrenov syndróm)^(2,3,4).

Približne v 95 % SSc prípadov možno nájsť v sére pacientov antinukleárne protílátky (ANA). ANA sú detegované metódou nepriamej imunofluorescencie (NIF) na kultivovaných Hep-2 bunkách v kombinácii so substrátom opičej pečene. Táto metóda slúži ako skriningový test na detekciu autoprotílátok, pretože je vysokosenzitívna a poskytuje základné informácie o detegovanej štruktúre. Na Hep-2 bunkách možno vo všeobecnosti popísať fluorescenčné obrazy, napr. homogénne jadro, jemne zrnité/zrnité/hrubo zrnité jadro, jadierka a iné štruktúry, ktorých prítomnosť je spôsobená rôznymi antigénmi. Na potvrdenie konkrétneho antigénu je indikovaný imunošpecifický test (ELISA, imunoblot a pod.). Imunoblot je metóda detekcie, pri ktorej sú na stripoch fixované všetky v súčasnosti známe autoantigény charakteristické pre SSc, ktoré sa rozdeľujú do dvoch skupín: SSc špecifické (topoizomerase I, centroméra-A, centroméra-B, RNA polymeráza III

-RP11, -RP155) a SSc asociované (fibrilarín, NOR90, Th/To, PM-Scl100, PM-Scl75, Ku, PDGFR, Ro-52). Prevalencia auto-protilátok proti SSc antigénom je uvedená v **tabuľke 1**^(2,3,4,5).

Autoprotilátky proti centroméram (anti-CENP)

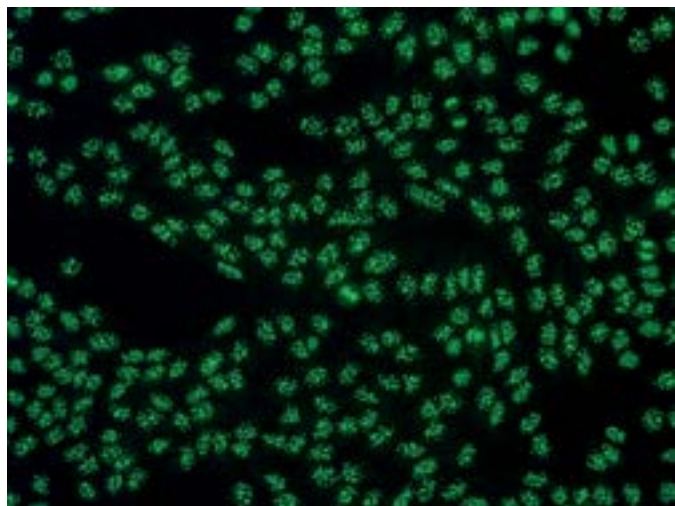
Anti-CENP rozoznávajú 4 proteíny, najčastejšie CENP-A, -B, -C, -D. Centromérové proteíny umožňujú väzbu kinetochórov na centromérovú oblasť chromozómov a interakciu s vretienkom mitotického aparátu počas mitózy^(5,8).

Anti-CENP sa častejšie vyskytujú pri lcSSc alebo pri CREST syndróme. Prítomnosť týchto autoprotilátok je asociovaná s lepšou prognózou a oneskoreným nástupom postihnutia vnútorných orgánov. Takíto pacienti majú limitované kožné ochorenie bez postihnutia srdca či obličiek a zriedkavo závažnú intersticiálnu fibrózu pľúc (IF). Napriek tomu u viac ako polovice pacientov, ktorí zomierajú v súvislosti s SSc, je príčinou úmrtia pokročilá pľúcna hypertenzia (PHT). U pacientov s anti-CENP protilátkami sa nevyvinie dcSSc a v takom prípade nemusia byť monitorovaní pre prípadnú renálnu krízu a intersticiálnu fibrózu^(2,3,4). Anti-CENP protilátky boli nájdené aj v sérach pacientov s SLE, primárnou biliárnou cirhózou (PBC), RA a so Sjögrenovým syndrómom (SS)⁽⁴⁾.

Tabuľka 1. Prehľad SSc špecifických a SSc asociovaných autoprotilátok^(2,4,14)

Autoprotilátka	Hlavný autoantigén	Forma SSc
Anti-centroméra	CENP-A, CENP-B	80 – 95 % limitovaná
Anti-Scl70	DNA topoizomeráza I	25 – 75 % difúzna
Anti-RNA polymeráza III	RNA polymeráza	4 % difúzna
Anti-Th/To	H1/8-2 a Th/7-2 RNA, komponenty RN-ázy	< 5 % vzácna
Anti-fibrilarín	U3-RNP	5 – 10 % difúzna
Anti-NOR90	jadierkový organizátor	< 5 % vzácna
Anti-PM-Scl	antigénový komplex 11-16 polypeptidov, hlavné antigény PM-Scl100, PM-Scl75	13 % difúzna
anti-Ku	80 a 70kDa DNA viažuci dimérický proteín	< 5 % vzácna
anti-PDGFR	PDGFR	

Obrázok 1. Anti-CENP⁽²¹⁾



Mikroskopický obraz NIF ANA: 40 – 60 bodiek v interfázovom jadre, bodkovaná fluorescencia chromatinovej platničky počas mitózy (**obrázok 1**)⁽⁸⁾. Vzhľadom na to, že anti-CENP vykazuje charakteristický fluorescenčný obraz, nie je potrebné potvrdenie imunošpecifickým testom.

Autoprotilátky proti topoizomeráze I (anti-Scl70)

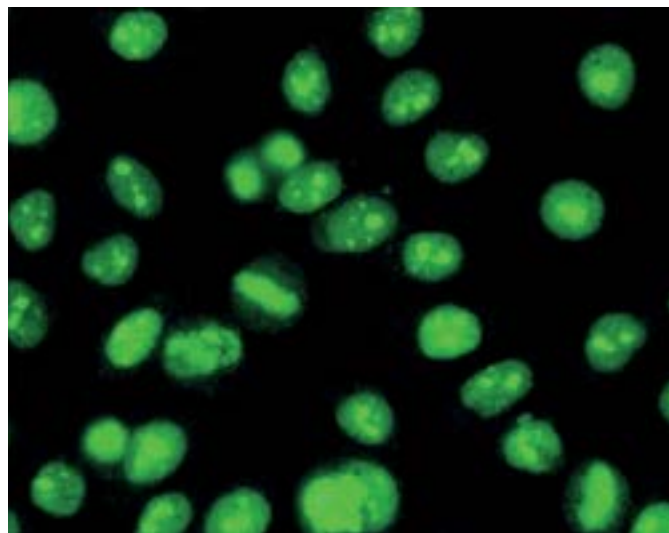
Scl70 (70kDa) je degradačným produktom topoizomerázy-I (topo I). Topo I je enzým lokalizovaný v nukleoplazme, jadričkách a v oblasti organizátora jadierka. Jeho funkciou je katalyzovať odvíjanie dsDNA pred syntézou dcérskych vláken DNA počas replikácie⁽⁸⁾.

Henault a kol. odhalili priame patogénne účinky autoprotilátok nájdených v SSc. Vo svojej štúdii uviedli, že autoantigén topo I uvoľnený z apoptotických endotelialných buniek sa špecificky viaže na fibroblasty, kde ho u pacientov s SSc rozpozná protilátka anti-Scl70. Táto väzba následne indukuje adhéziu a aktiváciu monocytov, ktorá vedie k vývoju SSc⁽¹⁰⁾.

Protilátky anti-Scl70 sú u pacientov s SSc považované za marker zlej prognózy. Ich prítomnosť je asociovaná s dcSSc a so skorým nástupom postihnutia vnútorných orgánov. U pacientov s týmto typom autoprotilátok je vyššia pravdepodobnosť výskytu IF v skorých štádiách, periférnej vaskulárnej choroby, postihnutia srdca, renálnej krízy a malignít. Rôzne štúdie opisujú asociáciu protilátok anti-Scl70 s vysokou úmrtnosťou, pričom pacienti s IF zomierajú na komplikácie priemerne do 10 rokov po diagnostikovaní SSc^(4,5). Anti-Scl70 sa zvyčajne nevyskytuje u zdravých jedincov, ani u pacientov s Raynaudovým syndrómom alebo s inými ochoreniami spojivového tkaniva. Pravdepodobnosť výskytu anti-Scl70 a anti-CENP súčasne je veľmi nízka a vyskytuje sa len u 0,5 % pacientov⁽³⁾.

Mikroskopický obraz NIF ANA: Jemne zrnitá až homogénna fluorescencia jadra v interfáze, pozitívna fluorescencia chromatinovej platničky počas mitózy, často s pozitívnymi jadričkami (**obrázok 2**)⁽⁸⁾. Vzhľadom na to, že fluorescenčný obraz anti-Scl70 nie je vždy jednoznačný, je potrebné potvrdenie imunošpecifickým testom.

Obrázok 2. Anti-Scl70⁽²²⁾



Autoprotilátky proti RNA polymeráze III (anti-RNAP III)

RNA polymeráza III je enzým, ktorý katalyzuje prepis tRNA, časť rRNA a niektorých malých RNA. Ide o komplex proteínov pozostávajúci z > 12 podjednotiek, napr. RP11 a RP155, ktoré sú asociované s SSc⁽¹¹⁾.

Anti-RNAP III sa vyskytujú u pacientov s SSc v 5 – 20 % a sú asociované s dcSSc a progresívnym zhrubnutím kože, vysokým rizikom pre vývoj renálnej krízy, progresívnejším priebehom ochorenia, malignitami, bez prítomnosti IF. Prežívanie pacientov s anti-RNAP III je v porovnaní s anti-Sc170 lepšie, pretože renálna kríza je v súčasnosti ľahšie liečiteľná ako IF. Prítomnosť protilátok anti-RNAP III u pacientov s SSc môže byť považovaná za marker rozvoja renálnej krízy^(4,5,9,11).

Mikroskopický obraz NIF ANA: Jemne zrnitá fluorescencia jadra v interfáze bunky, chromozomálna oblasť počas mitózy je negatívna (**obrázok 2**)^(5,12). Fluorescenčný obraz pri anti-RNAP III nie je jednoznačne odlišiteľný od iných autoprotilátok s podobnou fluorescenciou, preto je potrebné potvrdenie imunošpecifickým testom.

Autoprotilátky proti Th/To

Protilátky anti-Th/To rozoznávajú 40kDa proteín spoločný pre dva malé ribonukleoproteíny obsahujúce 7-2 RNA (RNáza MRP – RNA zložka mitochondriálnej RNA endoribonukleázy) a 8-2 RNA (RNAáza P – ribonukleáza P)⁽⁸⁾.

Anti-Th/To protilátky sú asociované prevažne s lcSSc formou, hoci celková frekvencia u pacientov s SSc je iba 2 – 5 %. Pacienti s protilátkou anti-Th/To majú sklon ku kratšiemu trvaniu Raynaudovému syndrómu pred nástupom iných symptómov, ako je napr. opuch rúk. Závažné ischemické komplikácie sú zriedkavé, avšak prítomnosť tejto protilátky sa spája s IF a PHT, ktoré sa často vyskytujú už v skorom štádiu ochorenia. Táto zvýšená frekvencia a závažnosť pľúcnych komplikácií vedú k horšiemu prežívaniu v porovnaní s pacientmi s lcSSc bez prítomnosti tejto protilátky^(3,4,5).

Mikroskopický obraz NIF ANA: Bodkovaná fluorescencia jadriek v interfáze bunky, chromozomálna oblasť počas mitózy je negatívna⁽³⁾. Fluorescenčný obraz pri anti-Th/To nie je jednoznačne odlišiteľný od iných autoprotilátok s podobnou fluorescenciou, preto je potrebné potvrdenie imunošpecifickým testom.

Autoprotilátky proti fibrilarínu/U3RNP

Hlavným autoantigénom anti-U3RNP je fibrilarín, 34kDa proteín, zložka U3-ribonukleoproteínového komplexu^(3,8).

Prevalencia antifibrilarínu je u pacientov s SSc 4 – 10 %⁽⁵⁾. Anti-U3RNP protilátky sú všeobecne považované za protilátky špecifické pre SSc a vzájomne sa vylučujú s protilátkami anti-CENP, anti-Sc170 a anti-RNAP, boli však opísané aj u pacientov s SLE, nediferencovaným ochorením spojivového tkaniva (UCTD) a Raynaudovým syndrómom. Niektoré klinické príznaky sú ovplyvnené etnicitou. Belosi, Afroameričania a Japonci s anti-U3RNP trpia prevažne dcSSc, periférnou vaskulopatiou, vredmi a gangrénou. U belochov a Afroameričanov je v porovnaní s Japoncami opísané častejšie postihnutie orgánov, IF, PHT či renálna kríza a s nimi súvisiaca horšia prognóza. Prítomnosť anti-U3RNP u pacientov s lcSSc vylučuje rozvoj PHT^(3,13).

Mikroskopický obraz NIF ANA: Chuchvalcovitá fluorescencia jadriek v interfáze, bunky v mitóze vykazujú

perichromozomálnu fluorescenciu⁽¹⁴⁾. Fluorescenčný obraz pri anti-U3RNP nie je jednoznačne odlišiteľný od iných autoprotilátok s podobnou fluorescenciou, preto je potrebné potvrdenie imunošpecifickým testom.

Autoprotilátky proti NOR90

Protilátky anti-NOR90 sú namierené proti oblasti organizácie jadierka (NOR), kde sa po mitóze formujú jadierka. Štúdie preukázali, že autoantigénom pre protilátku anti-NOR90 je transkripčný faktor RNA polymerázy I viažuci sa proti smeru transkripcie (hUBF)^(5,8).

Anti-NOR90 nepatria medzi SSc špecifické protilátky, avšak boli detegované u pacientov s ochoreniami spojivového tkaniva ako Raynaudov syndróm, RA, SLE, SS a u pacientov s malignitami. Čoraz častejšie sa spomína asociácia medzi protilátkami anti-NOR90 a lcSSc, miernou formou postihnúťia kože a priaznivou prognózou^(3,4).

Mikroskopický obraz NIF ANA: Zrnitá fluorescencia jadriek počas interfázy. V chromatinovej oblasti mitotickej bunky pozorované bodky, ktoré sú považované za oblasť organizácie jadierka⁽⁸⁾. Fluorescenčný obraz pri anti-NOR90 nie je jednoznačne odlišiteľný od iných autoprotilátok s podobnou fluorescenciou, preto je potrebné potvrdenie imunošpecifickým testom.

Autoprotilátky proti PM-Sc175, PM-Sc100

Autoantigén PM-Scl je makromolekulový komplex 11 – 16 polypeptidov, z ktorých najdôležitejšie majú molekulovú hmotnosť 75kDa a 100kDa: anti-PM-Sc175, anti-PM-Sc100. V bunkovom jadre sa zúčastňuje na štiepení prekursorovej rRNA a v cytoplazme napomáha degradovať zrelú mRNA⁽¹⁵⁾.

Zatiaľ čo autoprotilátky proti CENP a Sc170 sú typické pre SSc, o autoprotilátkach proti PM-Sc175 a PM-Sc100 sa uvažuje ako o sérologických markeroch pre overlap syndróm, pričom PM-Sc175 by mohol pôsobiť ako hlavný cieľový antigén pri dcSSc. Anti-PM-Scl protilátky sa najčastejšie vyskytujú u pacientov s prekrývajúcim sa syndrómom PM a SSc (31 %), vzácnejšie pri samotnej myozitíde (8 – 11 %) alebo SSc (2 %)^(15,19). Pacienti s týmto typom autoprotilátok často trpia subakútnou myozitídou, Raynaudovým fenoménom a sklerodermiou kože⁽⁵⁾. Dôkaz týchto autoprotilátok je spojený s lepšou prognózou ochorenia⁽¹⁵⁾.

Mikroskopický obraz NIF ANA: Homogénna fluorescencia jadriek a súčasne slabšia, jemne zrnitá fluorescencia nukleoplazmy v interfáze, negatívna fluorescencia chromatinovej platničky počas mitózy⁽¹⁴⁾. Fluorescenčný obraz pri anti-PM-Sc175, -100 nie je jednoznačne odlišiteľný od iných autoprotilátok s podobnou fluorescenciou, preto je potrebné potvrdenie imunošpecifickým testom.

Autoprotilátky proti Ku

Anti-Ku protilátky boli opísané ako marker overlap syndrómu sklerodermie/PM, avšak zaznamenaný bol aj ich výskyt pri iných autoimunitných ochoreniach. Autoantigénom pre anti-Ku je proteín Ku s dvoma podjednotkami, viažuci DNA, zúčastňujúci sa na oprave dsDNA. Prevalencia anti-Ku protilátok u SSc pacientov je 1,5 – 16 %^(3,16,17).

Anti-Ku je primárne detegované u SSc pacientov s overlap syndrómom. Väčšina pacientov má typické príznaky ako Raynaudov fenomén, sklerodermia kože a obvykle aj lcSSc⁽⁵⁾.

Anti-Ku sa zriedkavo vyskytuje aj u pacientov s SLE bez znakov SSc, pričom ďalšie autoprotilátky asociované s SLE, napr. anti-dsDNA, sú vždy pozitívne. Menej často sa vyskytuje postihnutie vnútorných orgánov, ktoré je však mierne, zatiaľ čo artritída je bežná. Anti-Ku protilátka je taktiež asociovaná s menším počtom vaskulárnych prejavov, ako je napr. teleangiectázia⁽¹⁸⁾.

Mikroskopický obraz NIF ANA: Jemne zrnitá až škvrnitá fluorescencia jadra v interfáze, chromozomálna oblasť počas mitózy je negatívna. Anti-Ku možno odlíšiť od iných autoprotilátok na základe substrátu opičej pečene, na ktorom vykazuje perinukleárnu až chumáčkovitú fluorescenciu⁽⁹⁾. Vzhľadom na to, že fluorescenčný obraz anti-Ku nie je vždy jednoznačný, je potrebné potvrdenie imunošpecifickým testom.

Autoprotilátky proti PDGFR (platelet derived growth factor – rastový faktor odvodený od trombocytov)

Anti-PDGFR patria medzi protilátky asociované s SSc a boli detegované aj pri iných ochoreniach: SLE, SS, RA a IF⁽⁴⁾. Jedným z prvých prejavov v patogenéze SSc je mikrovaskulárne poškodenie a akumulácia buniek exprimujúcich receptor PDGFR. Autoprotilátky anti-PDGFR hrajú úlohu v patogenéze

SSc, pretože konvertujú normálne fibroblasty *in vitro* na bunky podobné SSc, ktoré sú schopné indukovať fibrózu *in vivo*. Ďalšie štúdie týchto protilátok môžu pomôcť v prevencii závažných komplikácií, ako sú ulcerácie, PHT a renálna kríza, ktoré sú zodpovedné za podstatné skrátenie času prežívania a zhoršenie kvality života⁽²⁰⁾.

Mikroskopický obraz NIF ANA: Nie je opísaný špecifický fluorescenčný obraz, preto jediná možnosť dôkazu anti-PDGFR je imunošpecifický test.

Záver

Autoprotilátky detegované pri SSc sú veľmi špecifické a asociované s rôznymi klinickými prejavmi pacienta. Ich prítomnosť by mala byť zvážená pri monitorovaní pacienta, stanovení liečby a ďalšej prognóze. Objasnenie špecificity SSc protilátok a s nimi súvisiacich odlišných klinických prejavov by mohlo napomôcť lepšie pochopiť patogenézu SSc. Význam autoprotilátok pri SSc ochorení je stále pomerne nejasný, aj keď čoraz viac štúdií nasvedčuje tomu, že tieto protilátky nie sú len diagnostickými markermi ochorenia, ale taktiež vedia predpovedať vývoj ochorenia či prípadné postihnutie orgánov.



NOVÁ GENERÁCIA PORTFÓLIA Z OBLASTI GENOMIKY

Stačí si iba vybrať...



LITERATÚRA

1. Rovenský J, Vašáková M. Sine syndróm pri systémovej skleróze. *Via practica*. 2010; 7(6): 262-265.
2. EUROIMMUN: Protilátky proti špecifickým antigénom systémovej sklerózy. Návod na provedení testu Systemic Sclerosis (Nucleoli) Profile EUROLINE (IgG).
3. Hamaguchi Y. Autoantibody profiles in systemic sclerosis: Predictive value for clinical evaluation and prognosis. *Journal of Dermatology* 2010; 37: 42-53.
4. Wielosz E, Dryglewska M, Majdan M. Serological profile of patients with systemic sclerosis. *Postepy Hig Med Dosw (online)* 2014; 68: 987-991. e-ISSN 1732-2693.
5. Kuwana M. Circulating anti-nuclear antibodies in Systemic sclerosis: utility in diagnosis and disease subsetting. *J Nippon Med Sch* 2017; 84(2): 56-63.
6. Bečvář R. Současný pohled na diagnostiku a léčbu systémovej sklerodermie a Sjögrenova syndromu. *Med Pro Praxi* 2008; 5(3): 109-112.
7. Shoenfeld Y, Meroni PL. *The General Practice Guide to Autoimmune Diseases*. Pabst Science Publishers 2012: ISBN 978-3-89967-770-6
8. Bradwell AR, Hughes RG. *Atlas of HEp-2 patterns*. The Binding Site Ltd. 2007: ISBN 0704425955.
9. Steen VD. Autoantibodies in Systemic Sclerosis. *Semin Arthritis Rheum* 2005; 35: 35-42.
10. Henault J, Robitaille G, Senecal JL, a spol. DNA topoisomerase I binding to fibroblasts induces monocyte adhesion and activation in the presence of anti-topoisomerase I autoantibodies from systemic sclerosis patients. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 963-973.
11. Kuwana M, Kimura K, Kawakami Y. Identification of an Immunodominant Epitope on RNA Polymerase III Recognized by Systemic Sclerosis Sera: Application to Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Arthritis & Rheumatism* 2002; 46: 2742-2747.
12. Parker JC, Burlingame RW, Webb TT, a spol. Anti-RNA polymerase III antibodies in patients with systemic sclerosis detected by indirect immunofluorescence and ELISA. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47(7): 976-979.
13. Ho KT, Reveille JD. The clinical relevance of autoantibodies in scleroderma. *Arthritis Research & therapy* 2003; 5(2): 80-93.
14. https://www.euroimmun.com/documents/Indications/Autoimmunity/Rheumatology/ANA/FA_1510_I_UK_B.pdf
15. Pleštilová L, Vencovský J. Anti-PM-Scl protilátky u myositid. *Čes Revmatol* 2009; 17(4): 200-204.
16. Hoa S, Hudson M, Troyanov Y, a spol. Single-specificity anti-Ku antibodies in an international cohort of 2140 systemic sclerosis subjects: clinical associations. *Medicine* 2016; 95: 35.
17. Mimori T, Akizuki M, Yamagata H, a spol. Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap. *J Clin Invest*. 1981; 68: 611-620.
18. Rozman B, Cucnik S, Sodin-Semrl S, a spol. Prevalence and clinical associations of anti-Ku antibodies in patients with systemic sclerosis: a European EUSTAR-initiated multi-centre case-control study. *Ann Rheum Dis* 2008; 67: 1282-1286.
19. <http://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar2614>
20. Svegliati S, Amico D, Spadoni T, a spol. Agonistic Anti-PDGFR receptor autoantibodies from patients with systemic sclerosis impact human pulmonary artery smooth muscle cells function *in vitro*. *Frontiers in Immunology* 2017; 8: 75.
21. *Archív Imunológia, Medirex.*
22. https://www.researchgate.net/figure/45281682_fig7_Fig-8-Fine-grainy-nucleoplasmic-staining-Scl-70-like



Mgr. Simona Duranková

Medirex, a. s.

Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava

e-mail: simona.durankova@medirex.sk

ABL90
FLEX PLUS



AQT90
FLEX



TCM5



HEMOCUE



pH
cH⁺
pCO₂
pO₂
cCl⁻
cCa²⁺
cK⁺
cNa⁺
cGlu
cLac
ctBil
ctHb
sO₂
FO₂Hb
FCOHb
FMetHb
FHHb
FHbF
cUrea
cCrea

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

tcpO₂
tcpCO₂
SpO₂
Pulse rate

Glukóza
Hemoglobin
WBC / WBC Diff
Plasma Low/Hb

WORLD LEADER
IN ACUTE CARE
TESTING

NOVĚ V NABÍDCE
OD 4.Q 2017

RADIOMETER s.r.o.
zastoupení pro ČR a SR | Křenova 3, 162 00 Praha 6
+420 220 400 300, office@radiometer.cz, www.radiometer.cz

Neinvazívne markery pečeňovej fibrózy

MUDr. Eva Ďurovcová, PhD., MUDr. Lenka Oravcová

Medirex, a. s., Košice

Potvrdenie prítomnosti a stupňa fibrózy je dôležitou súčasťou posudzovania závažnosti ochorenia u pacientov s chronickými hepatopatiami. Biopsia pečene je zlatým štandardom na určenie rozsahu fibrózy a zápalového postihnutia, má však svoje obmedzenia, ako je napr. chyba pri odbere vzorky a variabilita v hodnotení. V uplynulých desaťročiach boli validované viaceré neinvazívne metódy, t. j. sérové biomarkery a zobrazovacie metódy, ktoré preukázali porovnateľnú prediktívnu hodnotu pri potvrdení alebo vylúčení závažnej fibrózy alebo cirhózy, pričom ich prediktívna schopnosť je nižšia pri klasifikácii počiatočných a miernych stupňov fibrózy. Kombinácia neinvazívnych testov môže byť užitočná pri identifikácii pacientov, ktorí vyžadujú antivirotickú liečbu a tiež pri monitorovaní antifibrotickej liečby bez potreby biopsie.

Kľúčové slová: chronické ochorenia pečene, fibrogenéza, neinvazívne biomarkery, skórovacie systémy

Non-invasive markers of liver fibrosis

Determining the presence and degree of fibrosis is an important step in the assessment of disease severity in patients with the chronic liver disease. Liver biopsy has been the gold standard for estimating the extent of fibrosis and inflammation, although the procedure has some limitations such as sampling error and variability in interpretation. Non-invasive tests, e. g. serum biomarkers and imagine-based tests have been validated during the past decades and have been shown to be equally predictive in ruling out fibrosis or ruling in advanced fibrosis or cirrhosis, with more limited predictive ability when classifying intermediate stages. Using a combination of serum markers and imaging tests can help identify patients who require antiviral treatment sooner and also in the monitoring of antifibrotic therapy without the need for biopsy.

Keywords: chronic liver disease, fibrogenesis, non-invasive biomarkers, scoring systems

NewsLab, 2017; roč. 8 (2): 100 – 104

Úvod

Výskyt chronických ochorení pečene (COP) v dnešnej modernej dobe narastá a celosvetovo predstavujú poprednú príčinu mortality. Špecifické postavenie pečene v centre metabolických funkcií organizmu a unikátne krvné zásobenie predisponujú tento orgán na viacnásobné potencionálne riziko poškodenia. Pečeň je atakovaná vírusmi, toxínmi (alkohol, lieky, drogy) a naším nezdravým a rýchlym životným štýlom, ktorý zahŕňa fyzickú inaktivitu, nadbytočný príjem kalórií, nezdravý fastfood alebo prechemizované potraviny. Nie je prekvapením, že najčastejšími príčinami COP sú vírusové hepatitídy typu C a B (VHC, VHB), nealkoholová tuková choroba pečene (NAFLD) a alkoholová choroba pečene (ALD). Kým mortalita na kardiovaskulárne, onkologické a respiračné choroby vykazuje stabilizovaný, až mierne klesajúci trend, mortalita na COP narastá.

V súčasnosti je takmer 30 miliónov obyvateľov Európy postihnutých rôznymi formami COP. Vírusom hepatitídy C je v európskych krajinách infikovaných 19 miliónov z celkového počtu 750 miliónov obyvateľov, pričom prevalencia infekcie v jednotlivých krajinách kolíše medzi 0,15 – 3,26 %⁽¹⁾. Prevalencia NAFLD, najčastejšej hepatopatie v európskej populácii, kolíše v dospeljej populácii medzi 4 – 49,6 % a u pacientov s diabetom 2. typu medzi 42,6 – 69,5 %^(2,3).

Súčasťou štrukturálnych a funkčných zmien pri chronických ochoreniach pečene je fibróza, ktorá priamo koreluje s rizikom vzniku cirhózy a jej komplikácií (portálna hypertenzia, hepatocelulárny karcinóm). Stupeň fibrózy predstavuje najvýznamnejší prognostický faktor COP. Manažment

pacientov s COP zahŕňa potvrdenie a staging fibrózy, ktorý identifikuje jedincov so zvýšeným rizikom progresie do cirhózy, a tiež grading fibrózy, ktorý posúdi stupeň zápalovej alebo metabolickej odpovede a v prípade VHC predikuje pravdepodobnosť dosiahnutia trvalej liečebnej odpovede na antivirotickú liečbu⁽⁴⁾.

Fibrogenéza

Pečeňovú fibrózu možno definovať ako štrukturálnu predstavbu tkaniva s nadmerným ukladaním väzivovej hmoty. Fyziologickou reakciou na nekrózu či apoptózu hepatocytov je aktivácia zápalovej kaskády a následne fibrogenézy. Tento proces zahŕňa ukládanie extracelulárnej hmoty (ECM), ktorá vedie k oprave a regenerácii, ak je vyvážená fibrolýzou. Fibrogenéza aj fibrolýza sú indukované a udržiavané pôsobením viacerých typov pečeňových buniek, ktoré sa aktivujú rôznymi vyvolávajúcimi príčinami (**obrázok 1**).

Kľúčové postavenie medzi špecializovanými bunkami pečeňovej fibrogenézy majú hviezdicovité bunky, nazývané aj perisinusoidálne lipocyty alebo Itove bunky, ktoré sú schopné premeny na myofibroblasty. K aktivácii a proliferácii hviezdicovitých buniek prispieva celá plejáda profibrogénnych a promitogénnych faktorov uvoľňovaných z iných typov buniek, napr. hepatocytov (IL-33), Kupferových buniek (TGF- β , TGF- α – transforming growth factor- β , α), trombocytov (PDGF – platelet-derived growth factor, TGF- β), endotelových sínusoidálnych buniek (endotelín), monocytov a ďalších prevažne zápalových buniek (CTGF – connective tissue derived growth factor, INF- γ , IL1- β , CD163).

Extracelulárna hmota pozostáva z 2 typov makromolekúl: a. kolagénov typu I, III, V a VI a b. nekolagénových molekul: glykoproteínov (fibronektín, laminín, tenascín), proteoglykánov a glykozaminoglykánov (kyselina hyalurónová, chondroitínsulfát, dermatansulfát). Počas fibrogenézy pribúda v pečeni kolagén typu I, ktorého podiel sa zvyšuje až na 60 – 70 % celkového kolagénu, kým v zdravej pečeni sú kolagény I a III zastúpené v pomere 1 : 1.

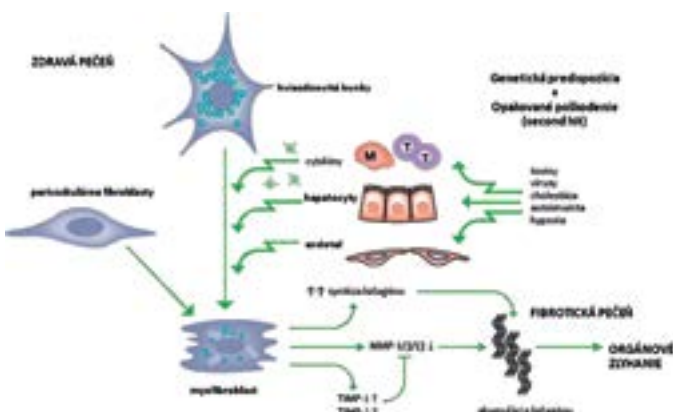
Rozvoj pečenej fibrózy je výsledkom nerovnováhy medzi zvýšenou tvorbou ECM a jej zníženým odbúraním. Na odbúranie ECM sa zúčastňujú tkanivové enzýmy, metaloproteinázy (MMP), ktorých funkciu modulujú viaceré tkanivové inhibítory (TIMP-1, -3)⁽⁵⁾. V situácii, keď fibrogenéza prevažuje nad fibrolýzou, napr. pri pretrvávajúcom etiologickom faktore, prejaví sa patologickým zhrubnutím väzivového tkaniva, vaskulárnymi aj nodulárnymi regeneratívnymi zmenami, vedúcimi k poruche štruktúry a následne funkcie pečene.

Diagnostika fibrózy

Pečeňová biopsia ostáva historicky zlatým štandardom v určovaní tzv. stagingu a gradingu pečenej choroby vírusovej aj nevírusovej etiológie. V prvom prípade sa hodnotí stupeň zápalu a nekrózy hepatocytov, v druhom stupeň zjazvenia, t. j. rozsah periportálnej fibrózy až cirhózy. Z mnohých histologických stupnic na hodnotenie fibrózy pečene sa najčastejšie používa skórovací systém Ishak a Metavir, oba vyvinuté pre vírusové hepatitídy (**tabuľka 1**).

Nevýhodou biopsie je jej invazivita, subjektivita pri hodnotení nálezu, bolestivosť, emočná záťaž u pacienta (strach), zriedkavo aj krvácajúce komplikácie. Príčinou veľkých intra- a interindividuálnych rozdielov v hodnotení (až do 38 %) je

Obrázok 1. Schéma hepatálnej fibrogenézy zahŕňajúca zúčastnené bunky, aktivačné a regulačné pôsobky a priame aj nepriame biomarkery fibrózy (podľa Liu, 2012)



Tabuľka 1. Hodnotenie pečenej fibrózy

Ishak	Metavir	Hodnotenie fibrózy	Prognóza a riziko
0	0	žiadna	Dobrá stredno-aj dlhodobá prognóza
1	1	nízky stupeň	Dobrá strednodobá prognóza, veľmi malé riziko vzniku cirhózy alebo jej dekompenzácie do 5 rokov
2	2	mierna fibróza	
3	3	pokročilá fibróza	Riziko cirhózy alebo jej dekompenzácie do 5 rokov výrazne zvýšené
4			
5	4	cirhóza	Riziko výskytu pažerákových varixov a hepatocelulárneho karcinómu (1 – 4 % ročne)
6			

najčastejšie nedostatočná veľkosť vzorky, jej nehomogenita a miesto odberu. V snahe optimalizovať význam pečenej biopsie pri hodnotení fibrózy sú navrhnuté odporúčania týkajúce sa dĺžky (> 15 mm s minimálne 5 portobiliárnymi priestormi), priemeru vyšetrovanej vzorky (> 16 nm), použitia vhodného skórovacieho systému a erudovanosti hodnotiaceho patológa⁽⁴⁾.

U pacientov s NAFLD sa navyše vzhľadom na vysoký výskyt steatózy s nízkym rizikom progresie do cirhózy biopsia pečene nepovažuje za vhodný test prvej voľby⁽⁶⁾.

Sérové a zobrazovacie neinvazívne markery

V posledných dvoch desaťročiach sa intenzívne skúmali neinvazívne metódy hodnotenia pečenej fibrózy a cirhózy najmä s ohľadom na riziká, obmedzenia a kontraindikácie pečenej biopsie. Ich diagnostickú efektívnosť vyjadruje vypočítaná hodnota plochy pod operačnou krivkou AUROC (Area Under the Receiver Operating characteristic Curve), ktorá sa vzťahuje k referenčnému štandardu – biopsii pečene. Skúmaný diagnostický test či metóda sa vo všeobecnosti hodnotí ako dobrý, ak hodnota AUROC dosahuje viac ako 80 % a ako excelentný, ak AUROC je viac ako 90 %.

Neinvazívne metódy hodnotenia pečenej fibrózy sa delia na dve skupiny: 1. kvantitatívne stanovované sérové biomarkery, ktoré viac alebo menej odrážajú zmeny v pečeni a 2. meranie tuhosti pečene (elastografia), ktorá odráža fyzikálne vlastnosti pečenej tkaniva zmeneného fibrózou.

Sérové biomarkery

Viaceré biomarkery boli identifikované ako vhodné indikátory pečenej fibrózy. Žiaden z nich nespĺňa kritériá na ideálny biomarker, ale ich diagnostická hodnota sa výrazne zvyšuje, ak sú použité v kombináciách. Sérové markery pečenej fibrózy možno rozdeliť do dvoch základných skupín:

Nepriame markery – prevažne široko dostupné tzv. hepatálne testy, ktoré len nepriamo odrážajú produkciu a kvantitu väziva v pečeni a ich koncentrácie v krvi sa menia sekundárne v dôsledku zmien štruktúry pečene či sleziny a nárastu portálneho tlaku:

- tradičné „pečenej“ enzýmy odrážajúce poruchu integrity až nekrózu hepatocytov (AST, ALT) alebo cholestázu (GMT, ALP);
- markery odrážajúce sekundárny hypersplenizmus alebo zníženú syntézu koagulačných faktorov (trombocyty, protrombínový čas, INR – International Normalized Ratio);
- proteíny syntetizované alebo degradované pečeňou (α2-makroglobulín, albumín, feritín, imunoglobulíny);
- zápalové cytokíny, o ktorých je známe, že pochádzajú z hepatocytov alebo aktivovaných zápalových buniek v pečeni (IL-6, TNF-α a pod.)

Priame markery – pochádzajú priamo z procesu fibrogenézy a v krvi sa zvyšujú v dôsledku ich zvýšeného vychytávania v hepatálnych sínusoidoch. V klinickej praxi sa doposiaľ najviac študovali nasledujúce (prehľad v 7):

N-terminálny peptid prokolagénu typu III (PIIINP) – je markerom fibrogenézy. Odštiepuje sa enzymaticky z molekuly prokolagénu III pred jeho integráciou do ECM. Nevýhodou markera je jeho nízka špecifickosť pre pečeň a možná interferencia fibrózy iného pôvodu (pľúca, obličky, črevo a pod.)

Kyselina hyalurónová (HA) – glykozaminoglykán prítomný v ECM, je rovnako priamym markerom fibrogenézy. V štúdiách s rôznymi typmi COP, avšak najmä pri chronickej VHC a NAFLD, bola potvrdená jej schopnosť detegovať pokročilú fibrózu, cirhózu a tiež poklesom reagovať na úspešnú liečbu pacientov s VHC.

Metaloproteinázy (MMP-1, -2, -9) – 3 enzýmy typu koloagenáz a gelatináz, ktoré sa priamo zúčastňujú na degradácii ECM. Ich koncentrácia v krvi nepriamo koreluje so závažnosťou fibrózy aj nekrózy pečene. V klinickej praxi sa veľmi neosvedčili.

Tkanivový inhibitor metaloproteinázy-1 (TIMP-1) – jeden z viacerých tkanivových proteínov, ktorých koncentrácia v krvi odráža intenzitu fibrogenézy. Zvýšené hodnoty TIMP-1 boli opakovane referované v rôznych štádiách fibrózy najmä u pacientov s chronickou VHC.

Cytokíny a chemokíny priamo viazané na proces fibrózy pečene boli študované najmä vo vzťahu k progresii ochorenia. TGF- β je najdôležitejším stimulátorom ukladania ECM. TGF- α podporuje proliferáciu pečenevých hviezdovitých buniek a PDGF sa zdá najúčinnejším mitogénom hviezdovitých buniek in vitro. Všetky pôsobky preukázali koreláciu so stupňom fibrózy a/alebo zápalu.

Nevýhodou všetkých spomenutých priamych markerov je ich nízka orgánová špecifickosť pre pečeň a možná interferencia fibrózy iného pôvodu (pľúca, črevo a pod.) Biochemické markery pečenevej fibrózy boli v početných štúdiách validované najmä pre pacientov s chronickou VHC, VHB, NAFLD, v menšej miere pre iné chronické ochorenia pečene, napr. alkoholovú chorobu pečene a len ojedinele pre zriedkavé autoimunitné alebo metabolické pečenevé ochorenia.

Boli vypracované mnohé matematické modely založené na kombináciách priamych a nepriamych sérových markerov, prípadne na kombinácii sérových markerov a zobrazovacích elastografií, ktoré sa rôznou mierou stali súčasťou rutínnej praxe v hepatológii (**tabuľka 2**). Mnohé vzorce na výpočet skóre sú patentované (FibroTest, Hepascore, FibroMeter), iné sú nepatentované (napr. APRI, Fornosov index, FIB-4). Tieto rozhodovacie algoritmy umožnili neinvazívnym spôsobom kategorizovať viac ako 90 % pacientov do kategórií nízkej, stredne závažnej a závažnej fibrózy. Treba zdôrazniť, že väčšina biomarkerov opísaných v literatúre má schopnosť predikovať pokročilú fibrózu (> 2 Ishak alebo > 2 Metavir), ale v porovnaní s pečeneovou biopsiou neodlišuje dostatočne presne počiatkové štádiá fibrózy a zdravú pečeň.

U pacientov s NAFLD malo najväčšiu diagnostickú efektivitu použitie modifikovaného FibroMeter testu alebo NAFLD skóre počítaného pomocou online kalkulatéra, FIB-4 alebo APRI index mali nižšiu senzitivnosť a špecifickosť^(8,9). Najviac údajov o validácii sérových biomarkerov pečenevej fibrózy je u pacientov s chronickou VHC. Slovenskí autori tiež prispeli k vytvoreniu vlastného skórovacieho systému NSF (neinvazívne skóre fibrózy), ktorý bol validovaný na 104 pacientoch s VHC pred plánovanou liečbou⁽¹⁰⁾.

Tabuľka 2. Diagnostická efektivita vybraných neinvazívnych skórovacích systémov vo vzťahu k pečenevej fibróze (voľne podľa Fallatah, 2014)

Názov	Parametre pre výpočet skóre	Cutoff pre fibrózu (\geq F2)	Typy COP	AUROC	SN/SP %
APRI	AST, trombocyty	>2,0	VHC VHB NAFLD	0,564 – 0,87	88/74 89/84
NAFLD skóre	vek, BMI, DM/PGT, ALT, AST, trombocyty albumín		NAFLD	0,825 – 0,89	77/73
FIB-4	vek, AST, ALT, trombocyty	> 3,25: cirhóza <1,25: vylučuje fibrózu	VHC VHB NAFLD	0,785 – 0,86 0,80 – 0,85	74/80 67/71 84/90
Fibrotest/Fibrosure modifikácie pre VHC, NAFLD, ALD	bilirubín, haptoglobín, α 2-makroglobulín, GMT, apoproteinA,	> 0,6: významná fibróza	VHC, VHB NAFLD ALD	0,72 – 0,87 0,89 0,80 – 0,83	81/84 61/80 92/91
NSF	α 2-makroglobulín, AST, ALT, ALP, Tr, feritín, inzulín, vek,	> 0: vysoké riziko fibrózy	VHC	0,895	87/92
Fibrometer	trombocyty, INR, AST, GMT, α 2-makroglobulín, HA, urea, vek	> 0,54	VHC VHB NAFLD ALD	0,88 – 0,96 0,81	81/84 92/93
ELF	HA, PIIINP, TIMP-1, vek	> 9,8: pokročilá fibróza 7,7 - 9,8: mierna fibróza	VHC, VHB NAFLD ALD	0,77 – 0,98 0,99	86/75 94/93 93/100
Fibrospect	HA, TIMP-1, α 2-makroglobulín,	> 0,42: predikuje fibrózu	VHC	0,77 – 0,831	80/71
Hepascore	Bilirubín, α 2-makroglobulín, HA, GMT, vek	\geq 0,50: významná fibróza \geq 0,84: cirhóza	VHC VHB ALD	0,	
Fornosov index	trombocyty, GMT, cholesterol, vek	> 6,9	VHC	0,90 – 0,96	94/51

Vysvetlivky: DM – diabetes mellitus; PGT – porucha glukózovej tolerancie

Medzi skórovacie systémy založené na meraní priamych biomarkerov, presadzované v súčasnosti, patrí tzv. ELF (Enhanced Liver Fibrosis) test, ktorý je súčasťou NICE odporúčaní pre manažment COP vo Veľkej Británii a v praxi používaný tiež v Austrálii⁽¹¹⁾. Test je založený na výpočte ELF skóre z meraných sérových markerov syntézy a odbúravania extracelulárnej hmoty – kyseliny hyalurónovej, PIIINP a TIMP-1. Podobne ako mnohé ďalšie modely výpočet ELF skóre zohľadňuje vek a pohlavie pacienta. Viaceré štúdie deklarovali schopnosť ELF skóre rozlíšiť závažnú, miernu a žiadnu fibrózu pečene (AUROC 0,90 – 0,82 – 0,76) a predikovať komplikácie COP^(12,13). Neinvazívny ELF test bol použitý aj v nedávnej štúdií Tanwara a kol. na monitorovanie 24-mesačnej antivirotickej liečby u pacientov s chronickou VHC (pred liečbou, po 12 a 24 mesiacoch), ktorí podstúpili aj biopsiu pečene na začiatku a na konci sledovaného obdobia⁽¹⁴⁾. Absolútne zmeny hodnôt ELF skóre po 12 mesiacoch signifikantne korelovali so zmenami ELF aj histológie po 24 mesiacoch. Výsledky tejto štúdie naznačujú, že zmeny sérových biomarkerov predikujú vývoj pečenej fibrózy účinkom liečby v zmysle jej regresie (AUROC 0,81 – 0,84) aj progresie (AUROC 0,86 – 0,91). Porovnanie priamych a nepriamych sérových biomarkerov ukázalo, že ich diagnostická efektivita pri predikcii fibrózy pečene je porovnateľná, avšak náklady, a tým aj dostupnosť priamych biomarkerov sú oveľa vyššie^(15,16). Vo väčšine európskych krajín nie sú priame markery fibrózy hrazené zo zdravotného poistenia, preto sú skúsenosti s ich využitím v rutinej klinickej praxi minimálne.

Zobrazovacie metódy na posúdenie fibrózy

Tranzientná ultrazvuková elastografia (TE) je neinvazívna metóda merania tuhosti pečenej tkaniva, ktorá sa zvyšuje so závažnosťou fibrózy aj so stúpajúcou vaskulárnou rezistenciou a portálnym venóznym tlakom. Metóda vyžíva vysokofrekvenčný ultrazvuk (MHz) a sondu, ktorá generuje a emituje do pečene nízko-frekvenčné vibrácie (50 Hz). Rýchlosť šírenia týchto vibrácií je priamoúmerná tuhosti tkaniva, ktorá je vyjadrená v kilopascaloch (kPa). Senzitivita a špecifickosť TE je vysoká u pacientov s cirhózou (až do 90 %), avšak u pacientov so stredne závažnou až pokročilou fibrózou (F2 – F4) TE dosahuje len 70 % senzitivitu a 80 % špecifickosť. Cut-off hodnoty TE na potvrdenie cirhózy u pacientov s chronickou VHC kolíšu v rozmedzí 11 – 17 kPa^(17,18).

Modernou metódou na stanovenie elastických vlastností pečenej parenchýmy je aj magnetická rezonancia vo

forme tzv. **MR elastografie**. Podobne ako TE metóda využíva mechanické vibrácie s frekvenciou 40 – 90 Hz, generované pomocou zdroja nízko-frekvenčných vln. Po prechode pečeňou tieto vlny spôsobujú pohyby častíc a druhotné vlnenie, ktoré je zachytávané špeciálnymi MR technikami a softvérom na generovanie MRE obrazov vznikajú MRE elastogramy. Senzitivita MRE pre štádiá fibrózy F2 až F4 podľa Metaviru bola 98 %, 95 % a 100 %⁽¹⁹⁾.

Porovnanie neinvazívnych markerov fibrózy pečene

Priame a nepriame sérové biomarkery boli porovnávané navzájom aj vo vzťahu k TE v desiatkach štúdií. Metaanalýza Hounota a kol. (2016) 71 štúdií z obdobia 2001 – 2014 systematicky preskúmala pomocou matematicko-štatistických metód priame porovnania štyroch najčastejšie používaných a diskutovaných neinvazívnych metód u pacientov s chronickou VHC a VHB, a to FibroTest, APRI a FIB-4 skóre a tranzientnú elastografiu⁽²⁰⁾. Ich analýza potvrdila lepšiu diagnostickú efektivitu FibroTestu v porovnaní s APRI, FIB-4 a TE pri diagnóze závažnej fibrózy, kým pri diagnóze cirhózy sa testy nelíšili. Toto zistenie možno zovšeobecniť pre väčšinu komplexných skórovacích systémov založených na priamych biomarkeroch alebo kombinácii priamych a nepriamych sérových biomarkerov. Obe skupiny neinvazívnych metód na diagnózu pečenej fibrózy majú svoje výhody aj nevýhody (**tabuľka 3**), ich klinická využiteľnosť závisí vo väčšine krajín od ich dostupnosti a ceny.

Záver

Klinici majú k dispozícii dve neinvazívne alternatívy na identifikáciu závažnej fibrózy alebo cirhózy pečene. Vyšetrenie elasticity pečene najčastejšie pomocou ultrazvukovej TE je rýchle, bezpečné a relatívne dostupné. Sérové biomarkery sa používajú najmä v rôznych kombináciách na výpočet rozhodovacieho skóre alebo cut-off hodnoty, ktorá v danom skórovacom systéme slúži na vylúčenie alebo predikciu fibrózy⁽⁴⁾. Dostupnosť dostatočne citlivých a špecifických sérových biomarkerov umožňuje skrining a monitorovanie závažného ochorenia pečene vo veľkých skupinách pacientov a posúdenie skutočného rozsahu COP v bežnej populácii. Neinvazívne markery pečenej fibrózy majú svoje miesto pri určovaní štádia fibrózy u pacientov bez jasnej indikácie biopsie, u pacientov s chronickými hepatitídami vyžadujúcimi dlhodobé monitorovanie progresie fibrózy, u pacientov s autoimunitnými hepatitídami, ktorí vyžadujú monitorovanie

Tabuľka 3. Porovnanie neinvazívnych markerov fibrózy pečene

Metóda	Výhody	Nevýhody
Sérové biomarkery	Neinvazivita Automatizácia Nie je nutná hospitalizácia Reprodukovateľnosť Vysoká úroveň validácie Možnosť opakovaných vyšetrení	Nešpecifické pre pečeň Zlé rozlíšenie v nízkych štádiách fibrózy Nízka dostupnosť priamych markerov klinických laboratóriách Interferencie (zápal, hemolýza, Gilbertov syndróm)
Tranzientná elastografia	Neinvazivita Nie je nutná hospitalizácia Reprodukovateľnosť Vysoká úroveň validácie	Viazané na USG vybavenie Obmedzenia u pacientov s obezitou, úzkymi interkostálnymi priestormi, ascitom, zápalom Zlé rozlíšenie v nízkych štádiách fibrózy
MR elastografia	Dostupná na štandardných MRI zariadeniach Vyšetří celú pečeň SN a ŠP podobná s TE	Vysoká cena Limitácie u stavov s preťažením železom

dlhodobej imunosupresívnej liečby. Vývoj nových liečiv pre vybrané typy pečenej ochorenia, napr. chronickej VHC, VHB a NAFLD rovnako zvyšuje potrebu častejšieho posúdenia fibrózy v rámci monitorovania efektu liečby. Neinvazívne markery môžu byť použité aj na monitorovanie antifibrotickej liečby, pretože korelujú s histologickým nálezom pacientov a umožňujú včasnú identifikáciu pacientov, ktorí môžu profitať z dlhodobej liečby.

LITERATÚRA

1. Negro F. Epidemiology of hepatitis C in Europe. *Dig Liv Dis* 2014; 46: S158-S164.
2. Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, et al. The burden of liver disease in Europe: A review of available epidemiological data. *J Hepatol* 2013; 58: 593-608.
3. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif B, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease – Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 2016; 64: 73-84.
4. European association for the Study of the Liver. EASL-ALEH Clinical practice guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis. *J Hepatol* 2015; 63: 237-264.
5. Liu T, Wang W, Karsdal MA, et al. Molecular serum markers of liver fibrosis. *Biomarker Insights* 2012; 7: 105-117.
6. Buzzetti E, Lombardi R, De Luca L, et al. Noninvasive assessment of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Endocrinol* 2015; 2015: Article ID 343828, 9 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/343828>
7. Fallatah HI. Noninvasive biomarkers of liver fibrosis: An overview. *Advances in Hepatology* 2014; 2014: Article ID 357287, 15 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/357287>.
8. Machado MV, Cortez-Pinto H. Non-invasive diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2013; 58: 1007-1019.
9. Boursier J, Vergniol J, Guillet A, et al. Diagnostic accuracy and prognostic significance of blood fibrosis tests and liver stiffness measurements by FibroScan in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatology* 2016; 65: 570-578.
10. Koller T, Kollerová J, Huorka M, et al. Noninvasive scoring algorithm to identify significant liver fibrosis among treatment-naive chronic hepatitis C patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2014; 10: 1108-1115.
11. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): assessment and management. (júl 2016). Dostupné na Internete: NICE guideline [NG49]: www.nice.org.uk
12. Guha IN, Parkers J, Chattopadhyay D, et al. Noninvasive markers of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: Validation the European Liver Fibrosis Panel and exploring simple markers. *Hepatology* 2008; 47: 455-460.
13. Kim BK, Kim H-S, Yoo EJ, et al. Risk assessment of clinical outcomes in Asian patients with chronic hepatitis B using enhanced liver fibrosis test. *Hepatology* 2014; 60: 1911-1919.
14. Tanwar S, Trembling PM, Hogan BJ, et al. Noninvasive markers of liver fibrosis: on-treatment changes of serum markers predict the outcome of antifibrotic therapy. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2017; 29: 289-298.
15. Castera L. Noninvasive methods to assess liver disease in patients with hepatitis. *Gastroenterology* 2012; 142: 1293-1302.
16. Chindamo MC, Boursier J, Luiz RR, et al. Fibrosis assessment using FibroMeter combined to first generation tests in hepatitis C. *W J Hepatol* 2017; 28: 310-317.
17. Friedrich-Rust M, Ong M-F, Martens S, et al. Performance of transient elastography for staging of liver fibrosis: Meta-analysis. *Gastroenterology* 2008; 137: 960-974.
18. Tsochatzis A, Gurusamy K, Burroughs A, et al. Elastography for the diagnosis of severity of fibrosis in chronic liver disease: A metaanalysis of diagnostic accuracy. *J Hepatol* 2011; 54: 650-659.
19. Huwart L, Salameh N, ter Beek L, et al. MR elastography of liver fibrosis: preliminary results comparing spi-echo and echo-planar imaging. *Eur radiology* 2008; 18: 2535-2541.
20. Houot M, Ngo Y, Munteanu M, et al. Systemic review with meta-analysis: direct comparisons of biomarkers for diagnosis of fibrosis in chronic hepatitis C and B. *Aliment Pharmacol Ther* 2016; 43: 16-29.

Aj keď v súčasnosti neinvazívne markery nie sú schopné nahradíť biopsiu pečene, významnou mierou znižujú jej potrebu. Vývoj nových špecifických biomarkerov a biomarkerov v kombinácii s novými zobrazovacími a fyzikálnymi metódami môže v budúcnosti navodiť stav, keď použité biopsie pri vyšetreniach pečene bude výnimočné.



MUDr. Eva Ďurovcová, PhD.

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

Anaeróbne infekcie mäkkých tkanív

MUDr. Eva Csölleyová, MUDr. Štefan Jacák, MUDr. Monika Czirfuszová, PhD.

Medirex, a. s., Galanta, Medirex, a. s., Komárno

Anaeróbne infekcie sú vyvolané baktériami, ktoré sa nedokážu množiť v prítomnosti kyslíka. Rôzna miera tolerancie až intolerancia prítomnosti kyslíka je limitujúcim faktorom ich rastu a prežitia v biologických materiáloch odobratých na laboratórne analýzy. Anaeróbne infekcie postihujú obe pohlavia. Vyskytujú sa v každom veku, niektoré sú typické pre ranný vek (neonátálne infekcie), iné pre staršiu populáciu s častejšími predisponujúcimi faktormi. Výskyt ochorení, ktoré spôsobujú, súvisí aj s úrovňou poskytovanej zdravotnej starostlivosti, úrazmi a vojnovými poraneniami. Anaeróbne baktérie sa podieľajú na rozvoji rôznych zápalových ochorení, a to ako izolované bakteriálne agensy, alebo častejšie ako súčasť zmiešanej bakteriálnej flóry.

Kľúčové slová: anaeróbne baktérie, infekcie mäkkých tkanív, rizikové faktory, laboratórna diagnostika, terapia

Anaerobic infections of soft tissues

Anaerobic infections are caused by bacteria that are not able to proliferate in the presence of oxygen. The different rate of tolerance till intolerance to oxygen is the limiting factor of growth and survival in biological samples taken for laboratory analyses. Anaerobic infections affect both genders. They occur at any age. Some are typical for early age (neonatal infections), others for the elderly population with more frequent predisposing factors. The incidence of diseases caused by them is also related to the level of provided health care, accidents and war injuries. Anaerobic bacteria are involved in the development of various inflammatory diseases, either as isolated bacterial agents or more frequently as part of a mixed bacterial flora.

Keywords: anaerobic bacteria, infections of soft tissues, risk factors, laboratory diagnostics, therapy

NewsLab, 2017; roč. 8 (2): 100 – 109

Pôvodcovia ochorenia

Anaeróbne baktérie sú rozšírené v prírode. Väčšina ich rodov tvorí súčasť mikrofóry ľudského tela⁽¹⁾. Niektoré z nich hrajú dôležitú úlohu aj vo fyziológii hostiteľa⁽²⁾.

Majú tieto spoločné vlastnosti:

1. nemajú enzýmy oxidatívneho metabolizmu (katalázy, peroxidázy a superoxid – dismutázy), preto nie sú schopné vpraviť molekulárny kyslík do svojich biosyntéz. Bunky nie sú poškodzované molekulami kyslíka priamo, letálny účinok na bakteriálnu bunku majú vysokoreaktívne látky, ktoré vznikajú v priebehu respirácie, napr. peroxid vodíka, superoxid⁽³⁾.
2. na rozmnožovanie vyžadujú nízke hodnoty oxidačno-redukčného potenciálu (chýbajú im enzýmy schopné zaviesť do oxidačno-redukčných dejov látkovej premeny kyslík). Na oxidačno-redukčné pochody využívajú proteíny, ktoré prenášajú elektróny⁽⁴⁾.
3. látková premena pri anaeróboch neprebíha tak výdatne a prijaté látky nevyužívajú tak hospodárne ako aeróbne mikroorganizmy. Anaeróbne baktérie nemajú schopnosť syntetizovať aminokyseliny, preto ich množenie je pomalšie ako pri aeróbných baktériách⁽¹⁾.
4. konečné splodiny ich látkovej premeny nie sú rozložené. Do prostredia sa uvoľňujú zápachajúce produkty (kyselina mliečna, maslová, sírovodík, etanol, atď.).

Z taxonomického hľadiska tvoria anaeróby rôznorodú skupinu mikroorganizmov, ktorá zahŕňa grampozitívne

i gramnegatívne baktérie rôzneho tvaru. Anaeróbne mikroorganizmy delíme na **nesporulujúce** a **sporulujúce**^(1,4,5). Gramnegatívne nesporeujúce baktérie zahŕňujúce rody *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas* a *Fusobacterium* spôsobujú až 43 % všetkých anaeróbných infekcií. Baktérie zo skupiny *Bacteroides fragilis* group (*B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. distasonis*, *B. vulgatus*, *B. ovatus* atď.) sú primárnymi vyvolateľmi intraabdominálnych abscesov a spolu s inými druhmi aeróbných patogénnych baktérií sa podieľajú na vzniku a progresii infekcií dolných končatín u dlhodobo hospitalizovaných pacientov. Do druhej skupiny spôsobujúcej polymikrobiálne infekcie patria grampozitívne anaeróbne koky, ktoré sú súčasťou bežnej slizničnej a kožnej flóry. Sú izolované pri zmiešaných anaeróbných infekciách. Patogénna aktivita grampozitívnych nesporeujúcich anaeróbných paličiek sa prejavuje pri zmiešaných endogénnych anaeróbných infekciách. Aktinomycéty sú pôvodcami ochorenia, ktoré sa podstatne líši od ochorenia spôsobených inými nesporeujúcimi anaeróbnymi. Organizmus na ich prítomnosť v tkanivách reaguje leukocytárnou infiltráciou a hyperprodukciou väziva^(3,6). **Sporulujúce anaeróbne baktérie** tvoria veľmi odolné spóry. Tvorba rezistentných spór je mechanizmom, ktorý baktérie získali v evolúcii, aby mohli prežiť. Vo vhodnom prostredí rýchlo vyklíčia a dávajú vznik novým vegetatívnym bunkám. Hlavným prostredím, odkiaľ pochádzajú, je pôda, prach a črevný trakt. Infekcie, ktoré spôsobujú, sú časté po úrazoch pri dopravnej nehode alebo v poľnohospodárstve. Vyskytujú sa aj ako endogénna infekcia pri operáciách na tráviacom trakte, perforácii alebo ulcerácii čreva.

Patogenéza

Faktory virulencie anaeróbných baktérií sú rozmanité. Okrem puzdra, ktoré ich chráni pred opsonizáciou a fagocytózou, majú ďalšie dôležité faktory virulencie a patogenity⁽²⁾. **Exotoxíny** enzymatickej a neenzymatickej povahy rozkladajú organické látky vo svojom okolí, ktorými si zabezpečujú živiny a stavebné látky pre rast⁽¹⁾. Baktérie tvoria proteolytické enzýmy a faktory podporujúce koaguláciu a prienik do tkanív: proteáza, hyaluronidáza, heparináza, kolagenáza, lecitináza, neuraminidáza, fibrinolýzín a faktory adhérencie. Prilnutie na epitelové bunky je prvou podmienkou na uplatnenie ich patogénneho účinku⁽⁷⁾. Niektoré exotoxíny sú schopné vyvolať imunitnú odpoveď tvorbou antitoxínov. **Produktmi metabolizmu** (ako je sérotonín, histamín, edémový faktor) napádajú bielkoviny v ložisku. Prchavé mastné kyseliny, biologicky účinné amíny a rôzne plyny svojím tlakom zhoršujú krvné zásobenie ložiska. Produkovaný sírovodík a čpavok dráždia tkanivo⁽³⁾. **Endotoxín – toxický lipopolysacharidový komplex** v stene gramnegatívnych paličiek vyvoláva endotoxínový šok^(3,7). Tieto infekcie sú často zmiešané, spôsobené anaeróbnymi, mikroaerofilnými, fakultatívne anaeróbnymi a aeróbnymi baktériami. Ich vzájomná kooperácia je oxidoredukčnej a metabolickej povahy a je založená na princípe, že aeróbne baktérie spotrebujú v uzavretom priestore voľný kyslík⁽¹⁾. Anaeróbne infekcie sú obvykle spôsobené **endogénnymi anaeróbnymi baktériami** – nastupujú sekundárne, pri porušení ekologickej rovnováhy fyziologickej flóry alebo pri preniku do miest, kde sa prirodzene nevyskytujú. Tieto infekcie vyvolávajú aj **exogénne anaeróbne baktérie** – kontamináciou rán pri rozsiahlych poraneniach znečistených pôdou obsahujúcou napr. spóry klostrídií⁽⁴⁾. V rane je devitalizované tkanivo ideálnym prostredím na rozvoj bakteriálnej infekcie a je aj prekážkou procesu hojenia. Zníženie dostupnosti kyslíka má vplyv na tvorbu kolagénu, angiogénu a epitelizáciu⁽⁷⁾. Okrem kontaminácie rany je pre manifestáciu ochorenia potrebný výskyt lokálnych predispozičných faktorov. Prirodzená ochrana proti anaeróbnym je nedostatočná. Bunková imunita i prirodzené ochranné mechanizmy sú blokovanie nedostatočným cievny zásobením. Polymorfonukleárne leukocyty nemajú dosť kyslíka pre oxidatívne vzplanutie, ktorý je ich základným mechanizmom zabíjania. Zložky humorálnej imunity (komplement, protilátky) prenikajú do málo prekrvených tkanív len obmedzene⁽¹⁾.

Faktory vzniku anaeróbných infekcií

Invazivita anaeróbov je všeobecne malá. Anaeróbne infekcie neprebiehajú epidemicky. Hodnotíme ich u každého jedinca zvlášť. Prítomnosť virulentnej anaeróbnej baktérie ešte neznamená, že ide o infekciu⁽⁸⁾. Pri rozvoji klinických príznakov ochorenia nehrá úlohu len množstvo, ale i druh mikroorganizmu^(7,9). Pre striktné anaeróby sa môžu vytvoriť vhodné podmienky v poškodených tkanivách s nedostatočným krvným zásobením alebo za spoluúčasti fakultatívnych anaeróbov a aeróbov, ktoré odčerpávajú kyslík⁽¹⁾. Základným faktorom, ktorý vedie k anaeróbnej infekcii, je **nedostatočne prekrvené tkanivo**, keď tenzia kyslíka v tkanivách klesá pod fyziologickú hranicu. Spôsobujú to procesy v organizme, ktoré vedú k narušeniu krvného zásobovania tkanív (poranenie tepien, ateroskleróza, diabetické angiopatie, Buergerova choroba, embólie, hlboká žilová trombóza a ďalšie)^(1,9).

K anaeróbnej infekcii najviac inklinuje rana s poškodenou veľkou cieľou. Krv z anastomóz nestačí saturovať sval kyslíkom. Následná ischemia zvyšuje reflektorický lokálny spazmus a prestupom proteínov z kapilár do okolitého tkaniva sa zvyšuje tenzia v poškodenom svale. Cievny sa naďalej stláčajú a hypoxia sa zvyšuje^(9,12). Ďalším faktorom je **znížená odolnosť organizmu** napr. po operačných zákrokoch, cukrovka, podávanie cytostatík, imunosupresív, chemoterapia, vyšší vek, porucha krvnej cirkulácie, podvýživa a znížený počet neutrofilov. Riziko predstavujú **invazívne lekárske zákroky, prítomnosť cudzieho telesa a úrazy**, ktoré porušujú integritu kože a umožňujú prienik baktérií do vnútorného prostredia hostiteľa.

Klinický obraz

Anaeróbne baktérie vyvolávajú rôzne veľmi závažné ochorenia a majú zvyčajne tri fázy:

1. **lokálnu** – môže sa manifestovať ako infiltrát, absces, flegmóna alebo nekrotický rozpad tkaniva
2. **rozšírenú do krvného obehu**,
3. **metastatický proces** – prebieha rýchlo⁽¹⁰⁾.

Nesporulujúce anaeróby vyvolávajú typicky oportúnne infekcie, sú spravidla endogénne, pyogénneho charakteru, s výraznou nekrotizujúcou zložkou, často ohraničené na určité ložisko. Infekciou trombov dochádza k tromboflebitíde, septikopémii a hematogénnym metastázam do orgánov. Základom patogénneho pôsobenia nesporulujúcich anaeróbov je metabolický rozvrat tkanív vyvolaný ich kyslými metabolickými produktmi⁽³⁾. Tieto infekcie s proťahovaným priebehom nemajú pre svoj endogénny pôvod charakter infekčného ochorenia. Ich vznik podporujú rozličné diagnostické a terapeutické výkony⁽⁹⁾. Anaeróbne nesporulujúce baktérie majú prvoradý význam pri infekciách v abdominálnej oblasti, najmä pooperačných peritonitídach, pri tvorbe abscesov. Typy ochorenia nesporulujúcimi anaeróbnymi baktériami: **špecifický zápalový proces**, napr. aktinomykóza – granulomatózný zápalový proces s tvorbou početných hnisavých abscesov, navzájom komunikujúcich s tvorbou píšťal a typických drúz a **nešpecifický zápalový proces**: hnisavé infekcie brušnej dutiny, hnisavé infekcie ženského genitálu, hrudné empyémy, sínusitída, aspiračné pneumónie, sepsy – asi 3 %⁽¹⁾.

Sporulujúce anaeróby: najzávažnejšie infekcie spôsobujú mikroorganizmy zaradené do rodu **Clostridium**. Klostrídie sú sporulujúce, ubikvitné, všade sa vyskytujúce mikroorganizmy. Nachádzajú sa v pôde, vo vode, v prachu, v potravinách, ale aj v čreve človeka a zvierat⁽¹⁾. Sú to baktérie metabolicke veľmi aktívne, ktoré sa v prírode zúčastňujú na kolobehu dusíka a uhlíka. **Medicínsky významné klostrídiové infekcie** delíme na: **toxoinfekcie** – otravy z potravín, ich diagnostika je klinická a **čisté intoxikácie** spôsobené sporulujúcimi mikroorganizmami⁽³⁾. Nemajú invazívny charakter, ale ak nastanú vhodné podmienky pre germináciu spór a rozmnoženie baktérií, stávajú sa patogénnymi vzhľadom na tvorbu vysokoaktívnych exotoxínov. *C. perfringens* produkuje 14 exotoxínov: 4 letálne toxíny – alfa, beta, epsilon, iota, ďalších 9 toxínov a enterotoxín^(2,5). Toxíny sa líšia štruktúrou, biologickými vlastnosťami a rozdielne sú aj ich mechanizmy toxického účinku⁽⁴⁾. Alfa toxín – lecitináza je hlavným faktorom zodpovedným za patologické poškodenie tkaniva a vznik

plynovej gangrény^(2,11). Lecitináza svojím dermonekrotickým a hemolytickým účinkom štiepi lecitín na diglycerid a fosforolcholín. Štiepenie lecitínu v tkanivách sa prejavuje zvýšenou permeabilitou kapilár, v dôsledku čoho vzniká edém, hemorágie, zvýšený tlak vo svaloch a šok. Deštrukcia buniek vedie k nekróze^(7,12).

Podľa typu ochorenia ich delíme na **neurotoxické** – vyvolávatelmi sú *C. tetani*, *C. botulinum* a **histotoxické** – vyvolávatelmi sú *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. novyi*, *C. difficile*, *C. histolyticum*, *C. sordellii* a ďalšie⁽⁴⁾. Histotoxické klostrídiá produkujú toxíny a enzýmy degradujúce tkanivá s výrazne nekrotizujúcim účinkom. Leukocyty, ktoré sú zápalovými mediátormi smerované do miesta infekcie, sú klostrídióvymi toxínmi lyzované, preto týmto infekciám chýba purulentný charakter. Typy ochorenia histotoxických klostrídií delíme na toxoinfekcie mäkkých tkanív, toxoinfekcie viscerálnych orgánov a toxoinfekcie v čreve.

Infekcie mäkkých tkanív prebiehajú perakútne a bez včasnej a správnej terapie je 100 % úmrtnosť. Klostrídióve infekcie sa vyskytujú v dvoch hlavných patologických formách: celulitída a myonekróza. Počas niekoľkých hodín až dní sa infekcia klostrídiami prejaví ako **anaeróbna celulitída**. Ochorenie sa začína pozvoľna, bolesťou, opuchom postihnutého tkaniva. Pri tlaku na kožu počuť praskanie. Klostrídie v tkanive menia glykogén na metán, ktorý vytvára bubliny plynu. **Nekrotizujúca fascitída** postihuje fascie, prejavuje sa krepitáciou, ktorá je spôsobená malými bublinkami plynu v hubovito zmenenom tkanive, edémom, farebnými zmenami na koži, bolesťou v okolí rany a sekréciou⁽⁹⁾. Charakteristickým rysom klostrídióvych infekcií je prenikanie baktérií hlbšie do svalov, kde spôsobujú gangrénu⁽⁷⁾.

Klostrídióva myonekróza (gangraena emphysematosa) je fulminantná infekcia s charakteristickými lokálnymi a systémovými prejavmi. Klostrídióvu myonekrózu spôsobuje najčastejšie *Clostridium perfringens*, *C. novyi*, *C. septicum* a *C. bifermentans*. Inkubačná lehota je 6 hodín až 4 dni⁽¹⁾. Plynová gangréna môže byť klasifikovaná ako posttraumatická, pooperačná alebo spontánna. Posttraumatická plynová gangréna predstavuje 60 % celkovej incidencie⁽¹³⁾. Vzniká najčastejšie v hlbokých rozdrvených ranách, ktoré postihujú väčšie svalové skupiny s poruchou cievneho zásobenia⁽⁴⁾. Rana je edematózna a veľmi bolestivá. Intenzita prenikavej bolesti sa výrazne stupňuje. Na koži sa vytvárajú pľuzgieriky naplnené hemoragickou tekutinou a ložiská nekrózy. Krepitácia nie je taká výrazná ako pri klostrídióvej celulitíde. Z rany sa šíri prenikavý sladkastý zápach, ktorý je spôsobený mastnými kyselinami. Edém sa rýchlo šíri, celkový stav pacienta sa dramaticky zhoršuje. Ak toxíny preniknú do krvného obehu, nastáva intravenózna hemolýza, diseminovaná porucha hemokoagulácie a toxémia. Pacient je subfebrilný, bledý, spotený, má tachykardiu a hypotenziu. Môže byť nepokojný alebo apatický, vedomie býva zachované. Po toxémii sa môže rozvinúť toxický šok. Pacient stráca vedomie. Prognóza je vážna a v priebehu krátkeho obdobia môže viesť k smrti. Pacient zomiera pod obrazom sepsy a multiorgánového zlyhania alebo septického šoku⁽¹⁾. Ku komplikáciám anaeróbnych infekcií patrí gangréna okolitého svalstva, ktorá môže viesť k amputácii, k zlyhaniu krvného obehu a k poškodeniu obličiek a pečene.

Diagnostika anaeróbnych infekcií sa odvíja od anamnézy, klinických príznakov, výsledkov laboratórných analýz a nálezov

zobrazovacích metód. Pri určovaní diagnózy je potrebné vždy pátrať po etiologickom agense⁽⁹⁾. Na možnosť prítomnosti anaeróbnych baktérií je nutné myslieť pri primárnych odberoch biologického materiálu na kultiváciu pri hnisavých procesoch, keď hnis odporne a prenikavo páchne, pri endokarditídach a septických stavoch s negatívnymi hemokultúrami a ak je aeróbna kultivácia hnisu negatívna.

Odber materiálu a transport

Pri podozrení na anaeróbnú infekciu je potrebné dodržať správny postup odberu a transportu vzoriek.

Zásady odberu na anaeróbnú kultiváciu: včasný – v akútnej fáze ochorenia, zásadne pred nasadením antibiotickej terapie, cielený – zameraný na materiál, kde možno očakávať najviac aktívne sa množiacich baktérií, aseptický – do sterilných odberových nádob. Na kultivačnú analýzu pri podozrení na anaeróbnú infekciu sa odoberajú: časti nekrotických tkanív, exsudát, hnis – z hĺbky ložiska, pretože povrch ložiska môže byť kontaminovaný baktériami nesúvisiacimi s etiológiou zápalu, ktoré sťažujú izoláciu patogénov a interpretáciu výsledku. Ster je vhodné zobrať najlepšie z rozhrania zdravého a patologicky zmeneného tkaniva, kde je najviac životaschopných mikroorganizmov. Pri rozsiahlejších ranách je vhodné vykonať niekoľko sterov súčasne z rôznych miest, kúsok excidovaného tkaniva – pri myonekróze z miest, kde proces postupuje do šírky, alebo z niekoľkých drobných excízií. Je potrebné odobrať dostatočné množstvo materiálu^(7,12).

Transport – rýchly transport materiálu do laboratória za anaeróbnych podmienok. Citlivé mikroorganizmy zahynú alebo sa rozmnožia mikroorganizmy, ktoré rast skutočného pôvodcu ochorenia potlačia^(7,14). Prioritne je potrebné odobrať tekutý materiál v striekačke na jedno použitie a po vypudení vzduchu pre bezpečnosť pri transporte je vhodné konic striekačky zataviť, prípadne ihlu zabodnúť do gumovej zátky, v hemokultivačných nádobách na anaeróbnú kultiváciu alebo v špeciálnych anaeróbnych transportných nádobách. Transportné médium možno použiť pri odbere materiálu tampónom, ktorý sa zasunie do transportného média. Pri predpokladaní malého množstva biologického materiálu je vhodnejší a využívaný odber materiálu pri lôžku pacienta s okamžitým naočkovaním kultivačných médií.

Laboratórna diagnostika anaeróbnych infekcií sa opiera hlavne o tieto bakteriologické analýzy: mikroskopické vyšetrenie vzorky, kultivácia, izolácia a následná identifikácia mikroorganizmov^(11,12,15,16). **Mikroskopické vyšetrenie** poskytuje prvotnú informáciu o prítomnosti zápalovej reakcie a počte baktérií vo vzorke. Vyšetrenie náterov farbených podľa Grama umožní rozlíšiť morfológické typy gramnegatívnych a grampozitívnych baktérií^(1,9). Pri podozrení na klostrídióvu infekciu mikroskopický nález grampozitívnych hrubých paličiek v materiáli z rany diagnózu potvrdí. Výsledok analýzy môže byť oznámený do niekoľkých minút až do hodiny. Z klinického hľadiska je informácia o etiológii anaeróbnej infekcie veľmi dôležitá a posluží pri rozhodovaní o začatí empirickej liečby.

Kultivácia spojená s identifikáciou získaných kultúr je pomerne náročná. Podmienkou úspešnej kultivácie je správny odber a transport materiálu, ktoré umožnia anaeróbnym baktériám prežiť. Podmienkou je zábrana prístupu vzduchu k materiálu a odstránenie kyslíka z kultivačných pôd

i z prostredia⁽⁸⁾. Anaeróbne baktérie potrebujú pôdy, ktoré obsahujú redukujúce látky znižujúce redoxný potenciál. Dôležitá je atmosféra, v ktorej sa anaeróbne mikroorganizmy kultivujú (dusík 90 %, CO₂ 5 %, vodík 5 %). Táto atmosféra sa dá dosiahnuť fyzikálnou, biologickou, chemickou absorpčnou alebo katalytickou metódou, ktorá sa najčastejšie používa v rutinej mikrobiologickej diagnostike⁽⁹⁾. Na vytvorenie vhodnej atmosféry sa využívajú anaerostaty alebo anaeróbne boxy s mikroprocesorovou reguláciou (LAS – Latalov anaeróbny systém). Základná kultivácia je 48 hod. pri teplote 36 ± 1 stupeň Celzia. Použitie jednoduchých testov spolu s makroskopickým vzhľadom kolónií, mikroskopickou morfológiou izolátov môže byť v niektorých prípadoch postačujúca na rodovú alebo i druhovú identifikáciu. Identifikácia anaeróbnych baktérií sa vykonáva komerčnými biochemickými testami, rýchlymi enzymatickými testami, PCR metódou a metódou hmotnostnej spektrografie MALDI-TOF, ktorej výhodou je vysoká citlivosť a rýchlosť v porovnaní s tradičnými metódami. **Dôkaz špecifických toxínov:** testy in vivo (letálny účinok, nekróza kože, erytém) a testy na neživých systémoch – cytopatický efekt, hemolýza, lecitinázová reakcia^(1,14,15,16).

Terapia

Anaeróbne infekcie si vyžadujú urgentné riešenie, radikálne incízie a náročnú pooperačnú starostlivosť. Pri anaeróbnych infekciách ide často o polymikrobiálnu a rýchlo progredujúcu infekciu ohrozujúcu pacienta na živote. Nevyhnutná je aj protišoková liečba. Pri liečbe anaeróbnych infekcií chirurgická a antibiotická liečba sú rovnocenné, nezastupiteľné^(13,17,18). Pri **chirurgickej** intervencii treba otvoriť všetky priestory, resekovať nekrotické tkanivá, zaistiť drenáž. Často je nutná i amputácia postihnutej končatiny^(7,19). **Antimikrobiálna liečba** musí byť rýchla, adekvátna a komplexná. Pre dlhý čas rastu anaeróbnych baktérií sa začína empirická liečba. Antibiotiká sú podávané intravenózne s baktericídny účinkom, vo vyšších dávkach než pri infekciách postihujúcich dobre prekrvené tkanivá. Pri ATB terapii je nutné zvažovať aj prienik antibakteriálnej látky do miesta infekcie^(1,13). **Séroterapia** – ak sa v patogenéze uplatňuje toxín – ovplyvňuje celkové toxické príznaky. **Celková intenzívna liečba** pozostáva z rehydratácie, monitorovania pacienta, oxygenoterapie, podľa potreby podávania transfúzií, diuretík, analgetík a pod. Súčasťou komplexnej liečby je **hyperbarická terapia**, ktorá zvyšuje účinnosť leukocytov, toxicky pôsobí na



BiOG
MEDICÍNSKA TECHNIKA



anaeróbne baktérie a prebytok kyslíka podporuje celý imunitný systém⁽¹³⁾. **Prognóza choroby:** ide o ťažké, životohrožujúce ochorenie, ktorého priebeh je spravidla rýchly.

O prognóze pacienta rozhodujú hodiny.

Prevenia: Nešpecifické preventívne opatrenia majú odstrániť príčiny a stavy, ktoré vytvárajú podmienky na rozvoj anaeróbnej infekcie. Endogénnym infekciám možno čiastočne predchádzať šetrnými operačnými technikami a profylak-

tickým podávaním antibakteriálnych látok tak, aby v čase operácie bola vytvorená dostatočná koncentrácia antibiotika v mieste chirurgického výkonu a v krvi na eradikáciu očakávaných patogénov. Epidemiologická požiadavka – pacient s plynovou gangrénou má byť ošetrovaný v izolačnom režime s dodržiavaním štandardných bariérových opatrení⁽¹⁾. Riziko prenosu infekcií spôsobených anaeróbnymi baktériami je pre zdravé osoby zanedbateľné.

LITERATÚRA

1. Beneš J. Infekční lékařství. Praha, Česká republika: Galen; 2009: 264-270.
2. Howard JB, Keiser JF, Smith TF, et al. Clinical and pathogenic microbiology. 2nd ed. St. Louis, MO: Mosby-Year Book, Inc.; 1994: 417-418.
3. Bednář M, Fraňková V, Schindler J, a kol. Lékařská mikrobiologie. Praha, Česká republika: Marvil; 1996: 230-233, 238-240, 288-297.
4. Patočka F. Lékařská mikrobiologie. Praha, Česká republika Avicenum; 1972: 68, 507-557.
5. Votava, M. Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody: Brno, Neptun, 2010, 495 strán.
6. John C, Korych B, Schindler J a kol. Lékařská mikrobiologie. Praha, Česká republika: Státní pedagogické nakladatelství; 1982: 132-135, 146.
7. Goering R, Dockrell H, Zuckerman M, a kol. Mimsová lékařská mikrobiologie, Praha, Triton, 2016: 353-354, 434-440.
8. Chmelář, D. Lékařská mikrobiologie v kostce: (pro zdravotnické obory a mediky). 1. vyd. Ostrava: Ostravská univerzita v Ostravě, 2013. 163 s.
9. Nováková E, Porubská A, Kopaniková J, a kol. Lékařská mikrobiologie. Martin, Slovenská republika: Lekárska fakulta Univerzity Komenského; 2010: 33-36, 62-64.
10. Kato N, Kato H, Watanebe K, et al. Association of Enterotoxigenic Bacteroides fragilis with Bacteremia. Clin. Infect. Dis. 1996; 23(1):83-86.
11. Murray P, Baron EJ, Pfaller MA, et al. Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. Washington, D.C. American Society for Microbiology; 1995: 125-127, 574-584.
12. Juránková J. a kol. Klinická mikrobiologie v laboratorní praxi. Brno, Česká republika: Masarykova univerzita; 2011: 73.
13. Nier H, Kremer K: Plynová gangréna – stále diagnostický a terapeutický problém. Zentralbl Chir 1984.
14. Scharfen J. ml. Diferenciální diagnostika v klinické mikrobiologii, Nucleus HK 2013:70-85-9.
15. Zavadová M. Anaerobní bakterie a anaerobní infekce. Praha, Česká republika: Avicenum; 1986: 212.
16. Czirfuszová M, Hanzen J, Hučková D, a kol. Aktuálne možnosti laboratórnej diagnostiky klinickej mikrobiológie. Bratislava, Slovenská republika: A+M print, s. r. o.; 2013: 20-25.
17. Summanen P, Baron EJ, Ciron DM, a kol. Anaeróbne bakteriologie manual. 6th ed. Wadsworth, Belmont, CA: Hviezda Publishing; 2002.
18. Hájek M. Chirurgie praktického lékaře. Praha, Česká republika: Grada Publishing; 1995: 323.
19. Way LW. Současná chirurgická diagnostika a léčba. Praha, Česká republika: Grada Publishing; 1998: 1659.

MUDr. Eva Csölleyová

Medirex, a. s.

Hodská 68, 924 01 Galanta

e-mail: eva.csolleyova@medirex.sk

Preeklampsia v súvislosti s exozómami a mikroRNA

Mgr. Lucia Striešková^{1,2}, Mgr. Martina Belková¹

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Bratislava,

²Geneton, s. r. o., Bratislava

Preeklampsia (PE) je multisystémová porucha súvisiaca s vysokou mortalitou a morbiditou matky a plodu. Jedným z najzávažnejších aspektov preeklampsie je, že zatiaľ neexistujú žiadne včasné varovné príznaky alebo rizikové markery a patogenéza PE je tak stále zle vysvetlená. Objav miRNA priniesol nové poznatky v základnom poznaní o regulácii génovej expzie, no nachádza uplatnenie aj v klinickej praxi ako nový typ biomarkerov. Exozómy môžu mať potenciálnu úlohu ako aktivačné činidlá pri endotelovej dysfunkcii charakteristickej pre PE. Podľa aktuálnych poznatkov existujú mikroRNA s odlišnou expresiou v prípadoch s PE a môže byť dôležitá v samotnej patofyziológii ochorenia. MikroRNA markery PE môžu pomôcť pri pochopení stavu a patogenézy a môžu byť nástrojom pre preventívne stratégie na zníženie prevalence, závažnosti ochorenia a súvisiacich komplikácií.

Kľúčové slová: exozómy, miRNA, sekvenovanie novej generácie, preeklampsia

Preeclampsia in connection with exosome and miRNA

Preeclampsia (PE) is a multisystemic disorder related to high mortality and morbidity of a mother and her fetus. One of the most serious aspects of preeclampsia is that there are no early warning signs or risk markers and pathogenesis of PE is still poorly explained. The discovery of microRNA has brought new insights into the basic knowledge of the regulation of gene expression, but it has also been found as an application of a new type of a biomarker in clinical practice. Exosomes may have a potential role as activating agents in endothelial dysfunction, a hallmark of PE. According to current knowledge, microRNA with different expression in PE cases exists and may be important in the pathophysiology of the disease. MicroRNA markers of PE could help in understanding the condition and pathogenesis and could be a tool for preventive strategies to reduce the prevalence, the severity of the disease and related complications.

Key words: exosomes, miRNA, next generation sequencing, preeclampsia

NewsLab, 2017; roč. 8 (2): 110 – 113

Úvod

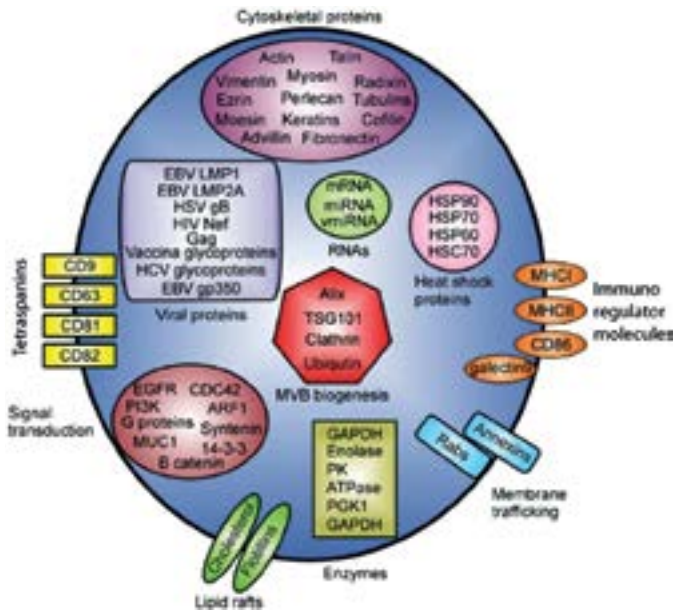
Každý rok sa preeklampsia (PE) rozvinie u 10 miliónov žien na celom svete, pričom niektoré z nich zomrú na PE a s ňou súvisiace hypertenzné ochorenia. Počet detí, ktoré zomrú na tieto komplikácie, je tiež veľmi vysoký. PE predstavuje jednu z najzávažnejších komplikácií počas tehotenstva, ktorá postihuje 2 – 8 % všetkých tehotných žien a je zodpovedná takmer za 40 % predčasných pôrodov pred 35. týždňom tehotenstva⁽¹⁾. PE je klinicky definovaná ako nový nástup hypertenzie počas druhej polovice tehotenstva. Predpokladá sa, že PE sa začína asymptomatickou fázou počas prvého trimestra gravidity, keď už dochádza k nedostatočnej invázii trofoblastu a k neúplnej remodelácii špirálových artérií. Oba tieto procesy prispievajú k zvýšeniu oxidačného stresu a vzniku systémovej endotelovej dysfunkcie, ktorá vedie k charakteristickým prejavom PE v neskorších fázach ochorenia⁽²⁾. V súčasnosti neexistuje účinná liečba, ktorá by zabránila dlhodobým následkom PE, pretože samotná patofyziológia ochorenia nie je úplne objasnená.

Exozómy a tehotenstvo

Exozómy sú malé bioaktívne vezikuly, tvorené rôznymi typmi buniek, z ktorých sú sekretované do okolitých telových tekutín. Produkujú ich najmä T-bunky, B-bunky, dendritické bunky, kmeňové bunky, neuróny, epitelové bunky, krvné bunky, tumorové či placentárne bunky. Vyskytujú sa najmä v krvnej plazme, moči, plodovej vode, cerebrospinálnej tekutine či v materskom mlieku. Veľkosť exozómov sa pohybuje od 40 do 100 nm. Ich obsah je veľmi variabilný a širokospektrálny. Obsahujú dôležité proteíny z mnohých proteínových rodín, ktoré sa zúčastňujú na viacerých bunkových procesoch. Prítomné sú tiež lipidy. Dôležitou súčasťou exozómov sú aj nukleové kyseliny, najmä mikroRNA (miRNA) a mRNA⁽³⁾ (**obrázok 1**).

Počas tehotenstva sa matkin organizmus prispôsobuje mnohým zmenám a procesom. Túto úlohu plní najmä placenta, ktorá sa tiež podieľa na regulácii rastu a vývoja plodu. Nedávne štúdie potvrdili, že počas tehotenstva placentárne bunky, konkrétne cytotrofoblasty a syncytiotrofoblasty

Obrázok 1. Exozóm



už od 6. týždňa uvoľňujú exozómy, ktoré sa následne dostávajú do matkinej cirkulácie⁽⁴⁾. Placentou produkované exozómy majú rovnaký tvar a veľkosť ako ostatné exozómy, avšak obsahujú špecifické proteíny a miRNA, na základe ktorých ich vieme odlíšiť. Exprimujú typické markery CD63 a PLAP, tiež proapoptotické molekuly FasL a TRAIL⁽⁵⁾. V porovnaní s inými exozómami majú absenciu expresie MHC molekúl, namiesto nich na svojom povrchu exprimujú molekuly MICA/B a RAET1/ULBP1-5 podobné MHC. Je preukázané, že koncentrácia exozómov v periférnej krvi matky je vyššia ako u netehotej ženy a možno ich kvantifikovať pomocou markera PLAP. Počas fyziologického tehotenstva sa táto koncentrácia v plazme matky zvyšuje, ale v závislosti od štádia tehotenstva sa môže meniť⁽⁶⁾. Placentou produkované exozómy môžu v období tehotenstva ovplyvňovať aj imunitný systém matky. Vďaka svojim špecifickým proteínom môžu znížiť proliferáciu a aktiváciu T-buniek, supresiu cytokínovej signalizácie, možnú indukciu apoptózy, a tak prispievať k celkovej ochrane plodu. Na druhej strane však nadmerné potlačenie imunitného systému matky môže zvýšiť riziko infekcií v priebehu tehotenstva. Počas tehotenstva neprodukuje exozómy iba placenta, ale aj samotné embryo či iné materské tkanivá⁽⁵⁾.

Celkový počet exozómov prítomných v materskej plazme je približne 2-násobne vyšší u žien medzi 11. až 14. týždňom tehotenstva, u ktorých bol medzi 22. – 28. týždňom diagnostikovaný gestačný diabetes mellitus, v porovnaní so ženami s normoglykemickým tehotenstvom. Tieto údaje naznačujú, že zmeny v koncentrácii exozómov prítomné v materskom krvnom obeh v počiatkových štádiách tehotenstva prispievajú k rozvoju tehotenských komplikácií (diabetes a PE) neskôr počas tehotenstva⁽⁷⁾.

Predchádzajúce in vitro štúdie ukázali, že hypoxia indukuje uvoľňovanie exozómov z trofoblastických buniek, ktoré ovplyvňujú obsah aj interakciu s inými bunkami. PE je spojená s placentárnou hypoxiou, ktorá vedie k nedostatočnej remodelácii špirálovej artérie počas prvých 20 týždňov

tehotenstva⁽⁸⁾. Tieto pozorovania podporujú domnelú užitočnosť placentárných exozómov ako biomarker v ranom tehotenstve s rizikom vzniku PE u žien. Avšak doteraz je málo informácií o exozómovom profile počas PE tehotenstiev.

mikroRNA

V súčasnosti sa pozornosť sústreďuje čoraz viac na molekuly miRNA. miRNA je malá, približne 18 až 24 nukleotidov dlhá nekódujúca sekvencia, ktorej najdôležitejšou vlastnosťou je podieľanie na regulácii génovej expresie. Tú ovplyvňuje na základe svojej komplementarity s mRNA na 3' konci. Ľudský genóm kóduje viac ako 1 000 druhov miRNA a zdá sa, že môžu ovplyvňovať až 60 % génov. Väčšina miRNA molekúl je lokalizovaných v bunkách, no niektoré miRNA, známe aj ako cirkulujúce, sa nachádzajú v extracelulárnom priestore, napríklad v telových tekutinách. Nezvyčajná expresia miRNA je pozorovaná pri rôznych patológiách a pri zmenách fyziologického stavu⁽⁹⁾.

Extracelulárne miRNA (ECmiRNA) sú v súčasnosti považované za vhodné biomarkery rôznych ochorení, keďže ich expresný profil z extracelulárných telových tekutín zobrazuje patofyziologický stav organizmu. Na izoláciu ECmiRNA je potrebné zvoliť vhodnú telovú tekutinu. Periférna krv sa neukazuje ako vhodný zdroj, pretože bunkové pozostatky z bielych a červených krviniek tiež obsahujú miRNA, ktorá môže ovplyvniť ECmiRNA analýzu. Výhodnejšie sa preto zdá použitie plazmy⁽¹⁰⁾.

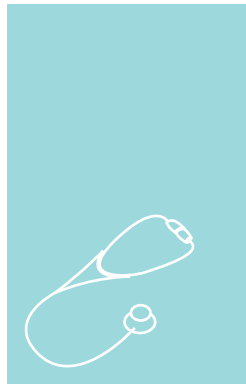
Vďaka svojmu unikátnemu zloženiu sú exozómy vhodné aj na rôzne diagnostické účely. Na diagnostiku mnohých ochorení sa využívajú najmä ich proteíny a miRNA. Zmena koncentrácie exozomálnych proteínov je asociovaná s patológiami alebo aj s ich progresiou či odpoveďou na oxidačný stres⁽⁴⁾.

miRNA a tehotenstvo

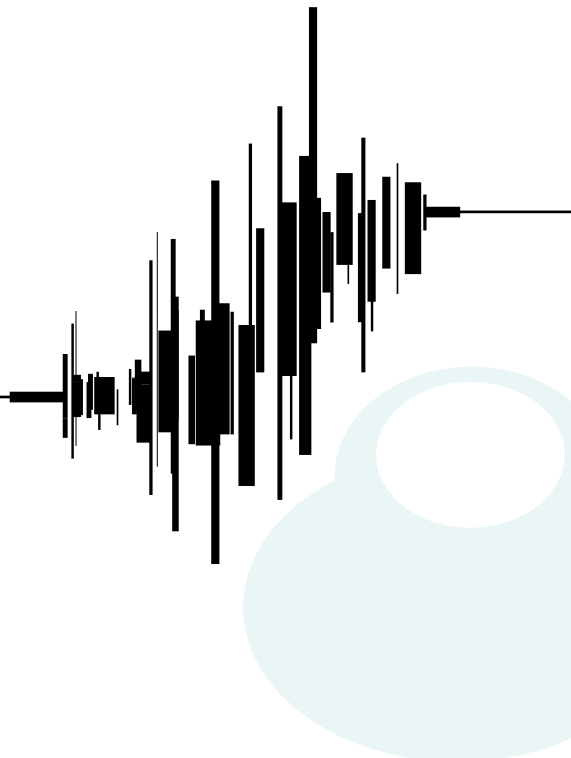
Expresia miRNA nie je zmenená len v priebehu ochorenia, ale aj počas tehotenstva. Vtedy sú miRNA produkované najmä trofoblastickými bunkami placenty a predpokladá sa, že majú vplyv na angiogézu, diferenciáciu trofoblastu a reguláciu imunitného systému matky i plodu. V priebehu tehotenstva môžu byť takisto využité ako biomarkery, pretože pozmenená expresia miRNA môže byť predzvesťou komplikácií. Či už je tehotenstvo komplikované, alebo nie, placentárne miRNA sú primárne lokalizované v štyroch polycistronických klastroch. Klastre C19MC a miR-371-3 sa nachádzajú na chromozóme 19, miR-17-92 na chromozóme 13 a M14MC na chromozóme 14. Počas tretieho trimestra placenta okrem týchto klastrov exprimuje let-7 rodinu, miR-34 rodinu, miR-29 klastre, miR-195 klastre a miR-181c. miRNA produkované chromozómom 21, miR-99a, miR-125 b-2 a miR-155, môžu byť nadexprimované u tehotných žien v porovnaní s netehotnými⁽¹¹⁾.

Najväčší známy ľudský miRNA klastre je C19MC a skladá sa z 54 miR génov. Okrem placenty je exprimovaný nediferencovanými bunkami a uvoľňuje miRNA do matkinho obehu pomocou exozómov tvorených placentou. Zvyšné klastre obsahujú podstatne menej génov⁽¹²⁾.

Expresia miR génov neostáva počas celého tehotenstva rovnaká, miR z klastra C19MC sa zvyšujú od prvého trimestra až po tretí. Gény z klastra C14MC sú upregulované v prvom



stačí
Impuls



office@impuls-leasing.sk
www.impuls-leasing.sk

trimestri a v treťom už klesajú. Oproti prvému trimestru je v treťom trimestri tiež upregulovaný let-7 a miR-34 rodiny a miR-29a, miR-195 a miR-181c. Tieto rodiny väčšinou zohrávajú úlohu v diferenciácii, proliferácii či apoptóze buniek. Počas gestačného obdobia miRNA produkované placentou zohrávajú dôležitú úlohu aj v imunitnom systéme, na úrovni vrodenej aj získanej imunitnej odpovede. Na rozdiel od iných miRNA sú exprimované počas celého tehotenstva⁽¹³⁾.

Preeklampsia v súvislosti s exozómami a miRNA

Ako regulačné molekuly môžu miRNA svojou dysreguláciou významne ovplyvňovať procesy spájané s vývinom placenty a s celým tehotenstvom. Mnoho štúdií preukázalo, že zmenená úroveň expresie miRNA v placente je spájaná s preeklampiou⁽¹⁴⁾. Pozorovanými dysreguláciami sú napríklad DNA metylácia a modifikácia histónov, a teda pravdepodobne nie je náhoda, že práve miRNA má schopnosť regulovať gény týmto spôsobom. Najčastejšími zmenenými miRNA pri preeklampsii sú miR-210, miR-223 a miR-126, ktoré úzko súvisia s patogenézou preeklampsie⁽¹⁵⁾.

Dôležitú úlohu zohráva miRNA v procese angiogenézy, ktorá je rozhodujúca pri remodelácii špirálovitých artérií. Podľa mnohých štúdií viacero upregulovaných miRNA v preeklampickej placente, napr. miR-210, miR-20 b, bráni angiogenéze a/alebo proliferácii trofoblastu, invázii a migrácii. Avšak niektoré down-regulované (miR-378a-5p, miR-376c), naopak, podporujú proliferáciu trofoblastu aj inváziu⁽¹⁶⁾. Počas angiogenézy sú nenahraditeľné angiogénne faktory, ktorých bohatým zdrojom je najmä placenta, endometrium a deciduum. Proces angiogenézy je iniciovaný rastovými faktormi FGF, VEGF či PIGF. Gény týchto faktorov sú však cieľom pre rôzne miRNA. Nasvedčuje to tomu, že miRNA majú kritickú úlohu pri tvorbe angiogénnych faktorov počas preklinického štádia preeklampsie. Zistilo sa, že miR-16, miR-26 b, miR-29 b, miR-181a, miR-195, miR-222 a miR-335 sú nielen zvýšené v preeklampickej placente, ale ich cieľom sú práve VEGF-A a PIGF. Okrem toho niektoré z nich ovplyvňovali CYR61, ktorý je dôležitý pre vaskulárnu integritu⁽¹⁷⁾. Ďalšia štúdia poukazuje na miR-126, ktorej cieľom je negatívny regulátor faktora VEGF. Táto miRNA by preto mohla byť v budúcnosti zvolená ako možný terapeutický cieľ. Okrem týchto faktorov však miRNA pozitívne aj negatívne vplyvajú na ďalšie faktory spájané s placentárnou angiogenézou. So vznikom hypoxie zrejme súvisí aj miR-210, ktorej zvýšená úroveň expresie je spájaná s hypoxiou citlivými faktormi HIF-1 α a NF- κ B. Na základe bioinformatickej analýzy sa predpokladá, že miRNA z rodiny miR-17, miR-20 a miR-20 b tiež súvisia s angiogenézou svojím vplyvom na HIF-1 α , interleukín-8, EFNB2, EPHB4 a VEGF⁽¹⁸⁾. Bunky syncytiotrofoblastu produkujú špecifické placentárne typy miRNA, ktoré sa z buniek placenty vbaľujú do exozómov a následne prechádzajú do teľových tekutín. Priamo z placenty sa teda miRNA môže izolovať, ale jedine pri pôrode, pretože počas tehotenstva je to bez ohrozenia plodu a matky nemožné. Preto sa izolácia placentárných exozómov z maternálnej plazmy javí ako vhodný neinvazívny prístup na získanie placentárných miRNA s cieľom prenatalnej diagnostiky⁽¹⁹⁾.

miRNA sekvenovanie

Vďaka rýchlemu pokroku pri technológiách sekvenovania novej generácie vieme sekvenovať aj molekuly RNA s cieľom zistiť expresný profil. Najčastejšie ide o mRNA a miRNA. Vďaka vysokoparalelnému sekvenovaniu môže byť analyzovaná celá ľudská miRNA populácia, ktorá môže byť analyzovaná aj pomocou qRT-PCR či RNA mikročipu⁽²⁰⁾. qRT-PCR a Microarray sú relatívne lacné a zaužívané analytické metódy, no ich nevýhodou je, že vedia analyzovať jedine známe sekvencie. Pomocou sekvenčnej analýzy možno objaviť aj nové, doposiaľ neidentifikované typy miRNA.

LITERATÚRA

1. Duley L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Seminars in Perinatology* 2009; 33: 130-137.
2. Maynard SE, Karumanchi SA. Angiogenic factors and preeclampsia. *Seminars in Nephrology* 2011; 31: 33-46.
3. Qin J, Xu Q. Functions and applications of exosomes. *Acta Poloniae Pharmaceutica* 2014; 71: 537-543.
4. Salomon C, Ryan J, Sobrevia L, et al. Exosomal Signaling during Hypoxia Mediates Microvascular Endothelial Cell Migration and Vasculogenesis. *PLoS One* 2013; 8: e68451.
5. Mincheva-Nilsson L, Baranov V. The role of placental exosomes in reproduction. *Am J Reprod Immunol* 2010; 63: 520-533.
6. Sarker S, Scholz-Romero K, Perez A, et al. Placenta-derived exosomes continuously increase in maternal circulation over the first trimester of pregnancy. *J Transl Med* 2014; 12: 204.
7. Murray MD, Hassendriani PN, Mihar K, et al. Placental Exosomes in Normal and Complicated Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2015; 213: 173-181.
8. Rice GE, Scholz-Romero K, Sweeney E, et al. The Effect of Glucose on the Release and Bioactivity of Exosomes From First Trimester Trophoblast Cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100: 1280-1288.
9. Sohel MH. Extracellular/Circulating MicroRNAs: Release Mechanisms, Functions and Challenges. *Achievements in the Life Sciences* 2016; 10: 175-186.
10. Pritchard CC, Kroh E, Wood B, et al. Blood cell origin of circulating micro RNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prev Res* 2012; 5: 492-497.
11. Kotlabova K, Doucha J, Chudoba D, et al. Extracellular chromosome 21-derived microRNAs in euploid & aneuploid pregnancies. *Indian J Med Res* 2013; 138: 935-943.
12. Noguer-Dance M, Abu-Amero S, Al-Khtib M, et al. The primate-specific microRNA gene cluster (C19MC) is imprinted in the placenta. *Hum Mol Genet* 2010; 19: 3566-3582.
13. Gu Y, Sun J, Groome LJ, et al. Differential miRNA expression profiles between the first and third trimester human placentas. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013; 304: E836-843.
14. Gunel T, Hosseini MK, Gumusoglu E, et al. Future Perspective of Preeclampsia by miRNA. *Global J. Hum. Genet. Gene Ther* 2014; 2: 68-78.
15. Soleymanlou N, Jurisica I, Nevo O. Molecular evidence of placental hypoxia in preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 4299-4308.
16. Gunel T, Hosseini MK, Gumusoglu E, et al. Future Perspective of Preeclampsia by miRNA. *Global J. Hum. Genet. Gene Ther* 2014; 2: 68-78.
17. Hu Y, Li P, Hao S, et al. Differential expression of microRNAs in the placentae of Chinese patients with severe pre-eclampsia. *Clin Chem Lab Med* 2009; 47: 923-929.
18. Chen DB, Wang W. Human placental microRNAs and preeclampsia. *Biol Reprod* 2013; 88: 130.
19. Sheikh AM, Small HY, Currie G, et al. Systematic Review of Micro-RNA Expression in Pre-Eclampsia Identifies a Number of Common Pathways Associated with the Disease. *PLoS One* 2016; 11: e0160808.
20. Wang J, Raimondo M, Guha S, et al. Circulating microRNAs in pancreatic juice as candidate biomarkers of pancreatic cancer. *J Cancer* 2005; 5: 696-705.

Záver

Vývoj technológie sekvenovania miRNA poskytol nové možnosti aj pre prenatálnu diagnostiku. V súčasnosti sa vieme zamerať na špecifické placentárne miRNA pri rizikových tehotenstvách. Dôležitá je napríklad diagnostika preeklampsie, ktorá často ohrozuje život matky aj plodu. Zmena expresného profilu týchto molekúl môže nielen zabezpečiť včasnú diagnostiku, ale aj pomôcť objasniť príčiny tohto ochorenia či nájsť vhodnejšie terapie.



Mgr. Lucia Striešková

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

Ovarian cancer: a short review

RNDr. Miroslav Tomka, PhD.

MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o.

Medirex, a. s., Bratislava

Ovarian cancer is one of the leading causes of female cancer deaths in the most developed countries. The reason may lie in absence of early key signs and symptoms that can clearly distinguish ovarian cancer from the other benign conditions. Moreover, ovarian cancer is highly heterogeneous disease with multiple histological subtypes, of those, epithelial tumors are the most common form. New methods brought new insight into molecular background of different subtypes of ovarian cancer and depicted new paths leading to personalized treatment. This short review is focused on some aspects of this disease.

Key words: ovarian cancer, epithelial tumors, mutations, array comparative genomic hybridization (array CGH)

Ovariálne nádory: krátky prehľad

Nádorové ochorenia vaječníkov predstavujú jednu z najčastejších onkologických príčin úmrtia žien vo vysokorozvinutých krajinách. Podstata môže spočívať v absencii skorých príznakov a symptómov, ktoré jasne odlišujú nádorové ochorenia ovárií od iných nezhubných stavov. Nádory vaječníkov sú navyše značne heterogénnou skupinou s rôznymi podtypmi, z ktorých sa najčastejšie vyskytujú epitelové nádory. Nové metódy odкрývajú podstatu ochorenia a ponúkajú možnosť personalizovaného prístupu k terapii. Predkladaný článok sa venuje niektorým aspektom tohto závažného typu ochorenia.

Kľúčové slová: nádory vaječníkov, epitelové nádory vaječníkov, mutácie, array komparatívna genómová hybridizácia (array CGH)

NewsLab, 2017; roč. 8 (2): x – x

Introduction

Ovarian cancer is the fifth-most common cause of cancer death in women in the USA and the other developed countries. According to the American Cancer Society ovarian cancer was responsible for 14 240 cancer-related deaths in 2016 and estimates that there will be diagnosed 22 440 new cases of ovarian cancer in the US in 2017⁽¹⁾. The age-standardized incidence has been estimated at 9.4 per 100 000 population in more developed areas, and 5 per 100 000 population in less developed areas⁽²⁾. Slovakia has one of the highest incidence rate among the European countries. In 2010, there were 511 registered cases of ovarian cancer what represents standardized incidence of 11.3 per 100 000 population. Out of registered cases, 277 women died from ovarian cancer in 2010⁽³⁾.

Relatively poor prognosis and high death rate is linked to the late presentation in most cases. The symptoms of ovarian cancer are often subtle, painless, and may mimic much more common disorders such as dyspepsia, irritable bowel syndrome, menstruation and menopause⁽⁴⁾. Symptoms commonly associated with ovarian cancer involve abdominal distension, abdominal or pelvic bloating, abdominal mass, loss of appetite and abdominal or pelvic pain, then diarrhea, isolated abdominal pain, weight loss, change in bowel habits, constipation, urinary frequency or urgency, dyspepsia, and abnormal vaginal bleeding⁽⁴⁾.

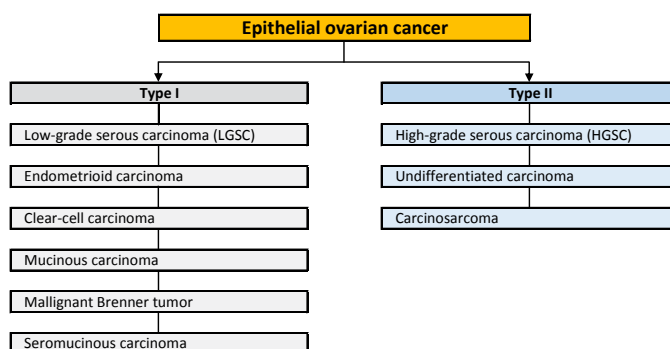
There are several accepted risk factors that increase the probability of developing ovarian cancer, including increasing age (over 55), nulliparity, early menarche or late menopause (all associated with number of ovulation cycles), familial

history of ovarian and other types of cancer, overweight^(5,6). Contrary, there are some positive factors that lower the risk of ovarian cancer, including full-term pregnancies, breast feeding, oral contraceptives^(1,6). The role of diet in the development of ovarian cancer is not clearly understood and results are often controversial⁽⁷⁾.

Classification of ovarian cancer

Ovarian cancer is highly heterogeneous disease with different histological subtypes. Primary ovarian tumors fall into four main groups according to the type of cells from which cancer can develop: epithelial, sex cord-stromal, germ cell, and mixed-cell type (**Figure 1**).

Figure 1. Histological subtypes of ovarian cancer and classification of epithelial ovarian cancer based on tumor histology and grade (reviewed in 24)



Epithelial ovarian carcinoma is the most common form and comprises approximately 90% of all cases⁽⁶⁾. Histological subtypes of epithelial ovarian cancer include serous, endometrioid, clear cell, mucinous, malignant Brenner tumors, and mixed-cell type tumors, which are not longer included in the 2014 WHO classification.

Epithelial ovarian cancer may be grouped based on their clinicopathologic features and genetic profile into two types (**Figure 2**). Type I involves slowly developing tumors including low-grade serous carcinoma, endometrioid carcinoma, clear-cell carcinoma, mucinous carcinoma then very rare malignant Brenner tumors, and seromucinous carcinoma. Most type I tumors are believed to arise from endometriosis or borderline serous tumors. This group of cancer accounts for about 25% of ovarian malignancies and cause 10% deaths. Type II comprised more aggressive tumors including the high-grade serous carcinomas, high-grade endometrioid, and rare undifferentiated carcinomas and carcinosarcomas. Tumors of this type are believed to arise from fallopian tube. Type II accounts for 75% of ovarian cancers and cause 90% of deaths^(8,9).

Ovarian sex cord-stromal tumors are formed by cells that normally give rise to cells surrounding the oocytes and contain the cells that produce ovarian hormones⁽¹⁰⁾. These tumors are presented in younger patients as a low-grade disease and are usually not aggressive. Surgery is a key treatment with generally favorable prognosis. They accounts for about 7% of all primary ovarian cancer⁽¹⁰⁾. The World Health Organization reclassified this group ovarian cancer into pure stromal tumors, pure sex cord tumors, and mixed sex cord-stromal tumors⁽¹¹⁾.

Germ cell tumors of the ovary are uncommon tumors developing from the ovarian germ cells. These tumors are frequently unilateral, and despite they are aggressive, they are generally curable and treatable if found early⁽¹²⁾. Germ cell tumors account for about 20-25% of ovarian neoplasms, but only 5% are malignant. Group of germ cell tumors includes, in order of frequency: dysgerminomas, immature teratomas, yolk sack tumors, and mixed germ cell tumors. Less common germ cell tumors include embryonal carcinomas, choriocarcinomas, and malignant struma ovarii tumors⁽¹³⁾.

Molecular background of ovarian cancer

Although majority of ovarian cancers are sporadic, family history is one of the strongest risk factors. Approximately 10% of ovarian cancers are hereditary and, of those, 90% cases are closely associated with germline mutations in *BRCA1* (17q21.31) and *BRCA2* (13q13.1) genes⁽¹⁴⁾. Pal et al., 2005

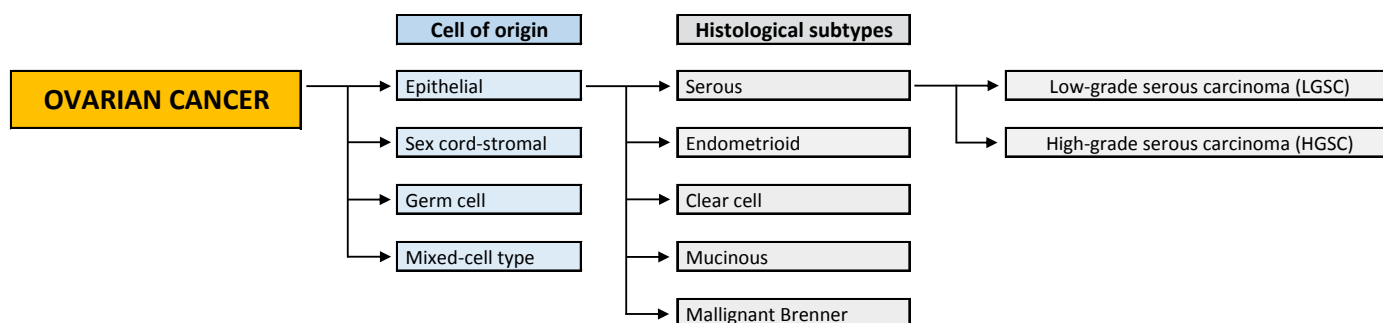
performed full genes sequencing of *BRCA1* and *BRCA2* genes in cohort of 232 women with epithelial ovarian carcinomas⁽¹⁵⁾. Invasive ovarian carcinoma was diagnosed in 209 women, 32 women (15.3%) had mutations in *BRCA1* or *BRCA2* genes. Of these, 20 women had mutations in *BRCA1*, 12 in *BRCA2* gene, respectively. Variants of uncertain significance were detected in 8.2% of women with invasive ovarian carcinoma. No mutations were identified in women with borderline or invasive mucinous tumors. Among the *BRCA* mutation-positive women, 63% had serous tumors. A family history of breast and/or ovarian carcinomas was reported in 65% of relatives of *BRCA1* carriers, 75% *BRCA2* carriers, and 43.5% non *BRCA1/2* carriers, respectively⁽¹⁵⁾. Interestingly, *BRCA2* mutations show clearly genotype-phenotype correlation. Central part of the gene (nt 3035-6629 in exon 11) is named ovarian cluster region and are associated with increased risk of ovarian, rather than breast cancer. Studies on *BRCA1* mutations are less conclusive⁽¹⁶⁾.

Some other malignant syndromes may develop ovarian cancer as one of their symptoms. Hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC, or Lynch syndrome) exhibits ovarian cancer as an extracolonic manifestation of Lynch syndrome II subtype. Lynch syndrome is caused by mutations in mismatch repair (MMR) genes, including *MSH2*, *MLH1*, *MLH6*, *PMS1*, and *PMS2*. Women with a germline mutation in one of the MMR genes *MLH1*, *MSH2* or *MSH6* have 6-8% life time risk of ovarian cancer⁽¹⁷⁾. Grindedal et al.,⁽¹⁸⁾ performed a retrospective study of 144 women with ovarian cancer due to mutations in mentioned genes. They found 51 women (35.4%) had a mutation in *MLH1*, 78 (54.2%) had a mutation in *MSH2*, and 15 (10.4%) had a mutation in *MSH6*. They also found that overall survival of women with mutation in MMR genes is better than those with *BRCA1/2* mutation⁽¹⁸⁾. Ovarian cancers associated with Lynch syndrome are predominantly clear-cell or endometrioid in histology⁽¹⁹⁾.

Peutz-Jeghers syndrome (PJS) is an autosomal dominant inherited disorder which is characterized by interstitial hamartomatous polyps, mucocutaneous melanin deposition, and increased risk of cancer, including ovarian and breast. In most PJS patients germ line inactivating mutations of the *STK11/LKB1* gene (19p13.3) has been indentified⁽²⁰⁾. Women with PJS have an increased incidence of rare sex cord tumor with annular tubules (SCTAT). SCTAT accounted for 1.4% of ovarian sex cord-stromal tumors and are all benign⁽²¹⁾.

To screen other germ line mutations in 12 tumor suppression genes, Walsh et al.⁽²²⁾ used targeted capture and massively parallel genomic sequencing. Study was conducted on

Figure 2. Classification of epithelial ovarian cancer based on clinicopathologic and molecular features (reviewed in 24)



360 women with ovarian carcinomas. 24% carried germ-line loss-of-function mutations: 18% in *BRCA1* or *BRCA2* and 6% in *BARD1*, *BRIP1*, *CHEK2*, *MRE11A*, *MSH6*, *NBN*, *PALB2*, *RAD50*, *RAD51C*, and *TP53*⁽²²⁾. However, the risk associated with majority of these genes is not well understood yet.

Epithelial ovarian tumors are heterogeneous in the term of histological features and molecular profiling. Each subtype is characterized by the presence of certain gene mutations. The Cancer Genome Atlas Research Network⁽²³⁾ reported that high-grade serous ovarian cancer (or type II) is characterized by *TP53* mutations in almost all tumors (96% of 489 high-grade serous ovarian adenocarcinomas). On the other hand, *TP53* is rarely affected in type I tumors, except mucinous one. These tumors are characterized by mutations in regulators of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway (e.g. *KRAS* or *BRAF*), as well as a number of other genomic variants, including *PIK3CA*, *PTEN*, *ARID1A*, *CTNNB1*, *CDKN2A*⁽²⁴⁾. These evidence underline the prediction that low grade serous carcinoma is unlikely to be a precursor lesion for high grade serous carcinoma but rather they are two separated entities.

The array comparative genomic hybridization is a method for genome-wide screening for genomic abnormalities. Caserta et al.⁽²⁵⁾ performed BAC array CGH in ovarian adenocarcinoma in 10 patients with familial history⁽²⁵⁾. The most common findings were loss of 6q (4 cases with mosaic loss of 6q), 9p (4 cases), 10q (3 cases), 21q (3 cases), 22q (4 cases); and gain of 8q and 9q (8 cases) and 12p (1 case). They observed two cases with monosomy X, and two cases with a micro deletion of 17p terminal. Some cases showed genomic profile with total or mosaic segmental gain on chromosomes 2p, 3q, 4q, 7q and 13q⁽²⁵⁾.

Gunn et al.⁽²⁶⁾ used array CGH to identify somatic chromosomal aberrations in 90 clinically relevant genes in 18 ovarian tumors. They found one patient was positive for *HER2* gene amplification, four positive for *CCNE1* gene amplification and four for *MYC* gene amplification. They detected high level amplification of *KRAS* in one patient, as well as in *CCND2*. Other two high-risk patients had amplification of *CCND3*, and *PLAG1* genes. In patients with high level *CCNE1* amplification was observed co-amplification of *CCND1*, *CCND3*, *MYC* and *ETV6* genes; high level amplification of *CCND3* tumors was accompanied with co-amplification of *MYC* and *AKT2* genes; and high level of *MYC* tumors showed co-amplification of *JAK2*, *FGFR3*, and *MYB* genes. One tumor with high level *MYC* gene amplification also showed bi-allelic *PTEN* gene deletion. Eight tumors were positive for amplification of the chromosome 3q26 region which contains *MECOM*, *SnoN/SkiL*, and *ECT2* genes. All these genes were showed to be implicated in ovarian pathogenesis in high grade serous carcinomas. Interestingly, no *TP53* aberration has been detected which points to the fact that primary mechanism of *TP53* lost of function is caused by point mutations⁽²⁶⁾.

REFERENCES

1. American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2017. Atlanta, GA: American Cancer Society; 2017.
2. Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61(2): 69-90.
3. Cancer Incidence in the Slovak Republic 2010. National Health Information Center, National Cancer Registry. Bratislava, 2017.
4. Ebell MH, Culp MB, Radke TJ. A Systematic Review of Symptoms for the Diagnosis of Ovarian Cancer. *Am J Prev Med* 2016; 50(3): 384-394.

Ovarian cancer screening and prevention

High mortality rate of ovarian cancer is mainly associated with lack of key signs of disease and absence of reliable screening tests⁽²⁴⁾. Currently, the most widely used screening methods are transvaginal ultrasound and serum cancer antigen CA-125 but the efficacy of this approach is disputable. Partridge with co-workers estimated the risk of ovarian malignancy among asymptomatic women with abnormal transvaginal ultrasound and CA-125. They concluded that screening for ovarian cancer using simultaneous CA-125 and transvaginal ultrasound did not reduce ovarian cancer mortality and was associated with high false-positive tests⁽²⁷⁾. False positive results may lead to unwanted surgery which is associated with its own risks and its benefit may be questionable.

To prevent development of ovarian cancer prophylactic surgical removal of the ovary may be considered in some cases. Bilateral salpingo-oophorectomy can be recommended for women with identified *BRCA1* or *BRCA2* gene mutations and strong family history of ovarian cancer associated syndromes, for women who are 35-40 years of age and have completed childbearing. However, this intervention is linked to physical and psychosocial issues⁽²⁸⁾.

Conclusion

Ovarian cancer is highly heterogeneous disease characterized by several histological subtypes, which are, in turn, characterized by their own molecular profile. Introduction of the genome-wide technologies such as aCGH or next-generation sequencing brought new insights into understanding the fundamental of disease, classification, prognostics and treatment. Searching for specific changes on the gene level can help to predict the course of disease and find the suitable targeted treatment for women.

Acknowledgements

This work was created with the support of the OP Research and Development for the project: „Completion of technical infrastructure in the field of research of diagnostic procedures and methods of early diagnosis of the most common oncological women diseases“ ITMS 26210120026, co-financed by the European Regional Development Fund.

Podakovanie

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

5. Beral V, Hermon C, Peto R, et al. Ovarian cancer and body size: individual participant meta-analysis including 25,157 women with ovarian cancer from 47 epidemiological studies. *PLoS Med* 2012; 9(4): e1001200.
6. Reid BM, Permuth JB, Sellers TA. Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biol Med* 2017; 14(1): 9-32.
7. Crane TE, Khulapatee BR, Alberts DS, et al. Dietary intake and ovarian cancer risk: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014; 23(2): 255-273.

8. Denel-Bobrowska M, Lukawska M, Oszczapowicz I, Marczak A. Histological subtype of ovarian cancer as a determinant of sensitivity to formamide derivatives of doxorubicin – in vitro comparative studies with SKOV-3 and ES-2 cancer cell lines. *Asian Pac J Cancer Prev* 2016; 17(9): 4223-4231.
9. Shih IM, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol* 2004; 164(5): 1511-1518.
10. Horta M, Cunha TM. Sex cord-stromal tumors of the ovary: a comprehensive review and update for radiologists. *Diagn Interv Radiol* 2015; 21(4): 277-286.
11. WHO classification of ovarian neoplasms. PathologyOutlines.com website. <http://www.pathologyoutlines.com/topic/ovarytumorwhoclassif.html>.
12. PDQ® Adult Treatment Editorial Board. PDQ Ovarian Germ Cell Tumors Treatment. Bethesda, MD: National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/types/ovarian/hp/ovarian-germ-cell-treatment-pdq>.
13. Shaaban AM, Rezvani M, Elsayes KM, et al. Ovarian malignant germ cell tumors: cellular classification and clinical and imaging features. *Radiographics* 2014; 34(3): 777-801.
14. Prat J, Ribe A, Gallardo A. Hereditary ovarian cancer 2005; 36: 861-870.
15. Pal T, Permuth-Wey J, Betts JA, et al. BRCA1 and BRCA2 mutations account for a large proportion of ovarian carcinoma cases. *Cancer* 2005; 104(12): 2807-2816.
16. Levy-Lahad E, Friedman E. Cancer risks in BRCA1 and BRCA2 carriers. *Br J Cancer* 2005; 96: 11-15.
17. Lu KH, Daniels M. Endometrial and ovarian cancer in women with Lynch syndrome: update in screening and prevention. *Fam Cancer* 2013; 12(2): 273-277.
18. Grindedal EM, Renkonen-Sinisalo L, Vasen H, et al. Survival in women with MMR mutations and ovarian cancer: a multicentre study in Lynch syndrome kindreds. *J Med Genet* 2010; 47: 99-102.
19. Vierkoetter KR, Ayabe AR, VanDrunen M, et al. Lynch Syndrome in patients with clear cell and endometrioid cancers of the ovary. *Gynecol Oncol* 2014; 135(1): 81-84.
20. Gruber SB, Entius MM, Petersen GM, et al. Pathogenesis of adenocarcinoma in Peutz-Jeghers syndrome. *Cancer Res* 1998; 58: 5267-5270.
21. Qian Q, You Y, Yang J, et al. Management and prognosis of patients with ovarian sex cord tumor with annular tubules: a retrospective study. *MBC Cancer* 2015; 15: 270.
22. Walsh T, Casadei S, Lee MK, et al. Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(44): 18032-18037.
23. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analysis of ovarian carcinoma. *Nature* 2011; 474(7353): 609-615.
24. Rojas V, Hirshfield KM, Ganesan S, Rodriguez-Rodriguez L. Molecular characterization of epithelial ovarian cancer: Implication for diagnosis and treatment. *Int J Mol Sci* 2016; 17(12). pii:E2113.
25. Caserta D, Benkhalifa M, Baldi M, et al. Genome profiling of ovarian adenocarcinomas using pangenomic BACs microarray comparative genomic hybridization. *Mol Cytogenet* 2008; 1: 10.
26. Gunn S, Reveles X, Weldon K, et al. Molecular cytogenetics as a clinical test for prognostic and predictive biomarkers in newly diagnosed ovarian cancer. *J Ovarian Res* 2013; 6(1): 2.
27. Partridge EE, Greenlee RT, Riley TL, et al. Assessing the risk of ovarian malignancy in asymptomatic women with abnormal CA 125 and transvaginal ultrasound in the prostate, lung, colorectal, and ovarian screening trial. *Obstet Gynecol* 2013; 121(1): 25-31.
28. Hartmann LC, Lindor NM. The role of risk-reducing surgery in hereditary breast and ovarian cancer. *N Engl J Med* 2016; 374: 454-468.



RNDr. Miroslav Tomka, PhD.

MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o.

a Medirex, a. s.

Galvaniho 17/C, 821 04 Bratislava

e-mail: miroslav.tomka@medirex.sk



Váš partner pre

Alergológiu a imunológiu

Infekčné choroby

Molekulárnu diagnostiku

Onkológiu a genetické testy

Prístroje a servis

Mikrobiológiu

Sérológiu

Patológiu

Infekcie bedrových endoprotéz

MUDr. Štefan Jacák¹, MUDr. Ján Kayser²

¹Medirex, a. s., Galanta

²Oddelenie úrazovej chirurgie a ortopédie, NsP sv. Lukáša, Svet zdravia, Galanta

Infekcie bedrových kĺbových náhrad predstavujú aj v súčasnosti stále veľký problém. Napriek rôznym profylaktickým režimom, operačnej technike, rôznym úpravám povrchu endoprotéz, budovaniu supersterilných operačných sál sa výskyt týchto infekcií drží na úrovni 1 až 2 % z celkového počtu náhrad bedrového kĺbu za rok. Diagnóza infekcie kĺbovej náhrady je nesmierne závažný problém pre pacienta a pre jeho ošetrojúceho lekára.

Z diferenciálne diagnostického hľadiska najväčší problém predstavujú mitigované infekcie s dvoj- až trojročným odstupom od primoimplantácie, kde bolestivosť vzniknutá pri uvoľnení endoprotézy kladie nároky na ortopédov, aby odlíšili aseptické uvoľnenie od infekčného. Na túto oblasť sa v súčasnosti sústreďuje najväčšie úsilie a spolupráca ortopédov s mikrobiológmi bude musieť byť oveľa intenzívnejšia. V praxi disponujeme veľkým množstvom negatívnych nálezov a ortopéd sa tak pri liečbe nemá o čo oprieť. Bude nutné postupne zavádzať do mikrobiologickej diagnostiky metódy, ktoré zvýšia výťažnosť kultivácií ako napríklad sonikácia.

Kľúčové slová: endoprotetika, periprotetická infekcia, biofilm, sonikácia

Infections of the hip endoprostheses

Infections of the hip replacements are still a major problem in endoprotection today. Despite various prophylactic regimens, surgical techniques, various modifications of the surface of the endoprostheses, and the construction of super sterile surgery rooms, the incidence of these infections is between 1 and 2% of the total number of hip replacements per year. The diagnosis of articular replacement infection is a highly serious problem for the patient and his physician.

From a differential diagnostic point of view, the most serious problems are the mitigating infections, appearing two or three years after the primoimplantation, where the pain caused by the release of endoprostheses is a challenge for orthopaedists to distinguish aseptic release from infectious. The greatest effort is currently being concentrated on this area, and the collaboration of orthopaedists with microbiologists will have to be more intensive. In practice, we have many negative findings, and there is no support for orthopedists in the treatment. It will be necessary to gradually introduce microbiological diagnostic methods which will increase cultivation yield, such as the use of sonication.

Key words: endoprotection, periprosthetic infection, biofilm, sonication

NewsLab, 2017; roč. 8 (2): 118 – 122

Úvod

Infekcia bedrovej endoprotézy je jedna z troch najčastejších komplikácií, ku ktorej dochádza po primoimplantácii kĺbovej náhrady v rôznom časovom odstupe. Nie je najčastejšia, ale patrí medzi najobávanejšie a najzávažnejšie lokálne komplikácie^(1,2).

Definuje sa ako rast a množenie baktérií na povrchu implantátu alebo v jeho okolí, čo vedie k poškodeniu periprotetického tkaniva zápalovou reakciou a vo väčšine prípadov sa končí rejekciou endoprotézy⁽³⁾.

Podľa lokalizácie delíme tieto infekcie na povrchové a hlboké. Z časového aspektu sa rozlišujú skoré infekcie (akútne), mitigované (resp. chronické) a neskoré hematogénne infekcie (Coventry)^(2,3).

1. typ infekcie je **akútny**, pooperačný s manifestáciou do 3 mesiacov od operácie. Klinický obraz je príznačný a diagnostika nerobí ťažkosti⁽³⁾.

2. typ infekcie je **chronický**, od 3 mesiacov do 2 rokov po operácii. Symptomatika je menej špecifická. Podmienkou je trvajúci mierny diskomfort od operácie. Môže pripomínať aseptické uvoľnenie. Rozhodujúci je čas, ktorý uplynul od pri-

moimplantácie. Čím je kratší, tým je menej pravdepodobná možnosť aseptického uvoľnenia endoprotézy⁽³⁾.

3. typ infekcie je **hematogénny**, s rozvojom po viac než 2 rokoch od operácie s tým, že nový kĺb fungoval istý čas bez problémov. Vzniká z plného zdravia a typickým príznakom býva horúčka a bolesť v kĺbe⁽³⁾.

Etiológia a epidemiológia

Vznik a rozvoj periprotetickéj infekcie je komplexný proces. Závisí od mnohých faktorov, ktorých rizikovosť je veľmi variabilná a individuálna. V súčasnosti neexistujú štúdie, ktoré by potvrdili kauzalitu a významnosť medzi vznikom a počtom periprotetických infekcií a rôznymi operačnými technikami, rôznymi režimami profylaxie a spôsobmi fixácie implantátu, resp. dodnes nebola preukázaná závislosť medzi uvedenými javmi a rozvojom periprotetických infekcií⁽¹⁾.

Faktory zvyšujúce riziko vzniku infekcie endoprotézy: vyšší vek pacienta, operácia trvajúca viac než 3 hodiny, poruchy hojenia rany, chronické choroby zvyšujúce Charlsonov index (diabetes mellitus, hepatopatie, stavy po infarkte myokardu, hemoglobinopatie, systémové zápalové choroby,

chronická kortikoterapia a imunosupresíva), alkoholizmus, malnutrícia, fajčenie, osteomyelitída a detské infekcie v anamnéze, infekčné ložiská v tele, nosičstvo *Staphylococcus aureus*, malignity, obezita, ASA klasifikácia 3 a viac, pohlavie (muži majú zvýšené riziko), infekcie v okolí kĺbu (reumatoidná artritída, erysipel, psoriáza, celulitída)⁽³⁾.

Výskyt periprotetických infekcií bedrových kĺbov sa všeobecne uvádza **pod 2 %**⁽³⁾. **Revidovanosť**, teda množstvo umelých náhrad, ktoré sa skomplikovali a bolo treba opakovanne pristúpiť k operácii, kolíše na našich ortopedických pracoviskách **medzi 7 až 10 %**⁽¹⁴⁾. Najčastejším dôvodom na revíziu totálnej endoprotézy bedrového kĺbu je aseptické uvoľnenie, nasleduje luxácia a infekčné príčiny, ktorých podiel na celkovom počte reoperácií je okolo 5,5 %^(3,14).

V rebríčku etiologických agensov sú na prvom mieste **stafylokoky s negatívnou koagulázou**, nasleduje *Staphylococcus aureus* a ďalšie grampozitívne koky, ktorých podiel na infekciách bedrových endoprotéz sa pohybuje od 50 do 70 %⁽³⁾. Z gramnegatívnych baktérií sú často izolované *Enterobacteriaceae* a *Pseudomonas* spp. Z anaeróbov boli izolované *Propionibacterium acnes*, *Fingoldia magna* a *Peptostreptococcus* spp.⁽³⁾.

Klinický obraz

Škála objektívnych a subjektívnych príznakov je veľmi pestrá. Podozrenie na periprotetickú infekciu vzniká v prítomnosti týchto faktorov:

- **klinický obraz a laboratórne nálezy:** lokálne a systémové známky infekcie (bolesť v kĺbe, horúčka, dlhodobý diskomfort, hnisavá secernácia v okolí kĺbu, fistula, absces, dehiscencia rany, elevácia zápalových markerov)^(1,2,3).
- **porucha funkcie endoprotézy**, jej uvoľnenie (nemusí sa vždy dostaviť)
- **pozitívna kultivácia:** identifikácia mikroorganizmu z povrchu implantátu alebo z periprotetických tkanív, abscesu, pyartrózy

Doc. Jiří Gallo z Ortopedickej kliniky na LF UP v Olomouci rozdelil kritériá na tri skupiny (2006):

1. **veľmi silné:** hnis v kĺbovej dutine, fistula komunikujúca s kĺbom, dehiscencia rany
2. **silné (štandardné):** pozitívna kultivácia, pozitívna histológia a cytológia z punkcie kĺbovej dutiny, typický status localis ex inflammatione, pozitívny röntgenový obraz
3. **slabé (podporné):** pozitívna anamnéza, **FW nad 35 mm/h**, **CRP nad 10 mg/l**, elevácia IL-6, pozitívne PCR a scintigrafia^(3,4,10).

Na zvýšenie pravdepodobnosti diagnózy infekcie bedrovej endoprotézy odporúča skupina doc. Galla prítomnosť jedného veľmi silného kritéria alebo dvoch silných, prípadne jedného silného a aspoň dvoch slabých kritérií. Na jej potvrdenie, presné určenie mikrobiologickej etiológie, odlišenie aseptického uvoľnenia pri nešpecifických príznakoch v rámci diferenciálne diagnostického procesu slúžia zložité algoritmy vychádzajúce z odporúčaní AAOS (American Academy of Orthopaedic Surgeons) a ESCMID (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases).

Kazuistika 1. Prípad povrchovej pooperačnej periprotetickej infekcie

Anamnéza

a. osobná: žena, vek: 67 rokov, ischemická choroba srdca (IChS), diabetes mellitus (DM) 2. typu, anémia, arteriálna hypertenzia 1. st. ESH/ECH, stav po subtotálnej tyreoidektómii pre m. Hashimoto, stav po hysterektómii a adnexektómii, stav po totálnej endoprotéze kolena vpravo, chronický dyspeptický syndróm, stav po totálnej endoprotéze (TEP) bedrového kĺbu vľavo

b. terajšie ochorenie: 15. 11. 2016 operovaná na ortopedickom oddelení v Nemocnici sv. Lukáša s poliklinikou v Galante pre primárnu artrózu. Od operácie je prítomný edém v mieste zákroku, palpačná citlivosť rany a okolia s opakovanou secernáciou. Prijatá na revíziu mäkkých tkanív pre bolesti pri chôdzi a subfebrilitu.

Status praesens generalis: pri plnom vedomí, orientovaná časom, priestorom, miestom, eupnoická, s eleváciou BMI medzi 25-30 (hmotnosť: 83 kg, výška 168 cm), mobilná za pomoci barlí. Ostatný nález je v medziach fyziologických noriem.

Status praesens localis: coxa sinistra: erytém v hornej časti pooperačnej jazvy, obliterovaná fistula v jazve s malou seróznou secernáciou, dorzálne subtrochantericky podkožná fluktuujúca rezistencia. Aktívne elevuje dolnú končatinu do 80 stupňov, pasívne do 100 stupňov, periféria bez patológie, dolné končatiny súmerné, bez skrátene a iných deformít.

Pacientka bola hospitalizovaná so suspektnou subakútnou povrchovou periproteticou infekciou.

Výšetrenia, ich výsledky a profylaxia

- **biochemické analýzy:** CRP 33,5 mg/l,
- **hematologické analýzy:** krvný obraz v norme,
- **mikrobiologická kultivácia výterov z rany:** negatívne,
- **antibiotická profylaxia** pri revíznom zákroku: podaný ciprofloxacín 400 mg i. v. pol hodiny pred incíziou, 200 mg i. v. po zákroku

Priebeh a terapia

Pacientka bola prijatá na oddelenie s cieľom operačnej revízie rany. Po predoperačnej príprave bol vykonaný zákrok. V blízkom okolí jazvy bola prítomná drobná séromová dutina, lokálne ošetrovaná – debridement a laváž roztokom betadinu, zavedený Redon drén, indikované boli pravidelné preväzy so sterilným krytím, 7 dní bol podávaný klindamycín 2x 150 mg á 8 hod. i. v. Po týždni hospitalizácie bola rana pokojná, pacientka afebrilná, subjektívne bez ťažkostí, v dobrom stave a kardiopulmonálne kompenzovaná, prepustená do ambulancie starostlivosti. V tomto prípade nebolo potrebné pristúpiť k výmene bedrovej endoprotézy, keďže k jej uvoľneniu nedošlo a mäkké tkanivá boli v dobrej kondícii.

Vyhodnotenie a mikrobiologický aspekt

Diagnostika periprotetickej infekcie vychádzala z typického klinického obrazu a elevácie zápalových markerov. Kultivačný nález steru z rany bol negatívny. Možné dôvody, pre ktoré sa nepodarilo kultivovať etiologický agens:

- odber bol realizovaný v čase antibiotického krytia

- absentovala požiadavka na prolongáciu kultivácie steru na 14 dní
- nebol odobratý tekutý materiál retinovaný v okolí kĺbu, hmatateľný ako fluktuujúca rezistencia na kultivačnú analýzu
- na kultiváciu neboli odobrané tkanivá poškodené zápalom, odstránené debridementom z viacerých lokalít

Kazuistika 2. Prípad hlbokoj hematogénnej periprotetickej infekcie

Anamnéza

- a. osobná:** muž, 71-ročný, stav po TEP coxae I. sin v roku 2010, arteriálna hypertenzia, ICHS, DM neguje, obezita
- b. terajšie ochorenie:** pacient po implantácii TEP coxae I. sin v roku 2010. V marci v roku 2016 došlo k uvoľneniu TEP, ktorá bola extrahovaná. Dočasne bol vložený spacer s antibiotikami a s plánovanou reimplantáciou TEP v druhej fáze na september 2016

Status praesens generalis: pri vedomí, orientovaný, afebrilný, eupnoe, mobilný s barlamí, ostatný nález v medziach fyziologických noriem.

Status praesens localis: coxa sinistra bez známok zápalu, jazva pokojná, nebolestivá, difúzne zvýšená palpačná citlivosť. Stehná a lýtka voľné, Homans negat. Aktívne elevuje dolnú končatinu do 40 stupňov, pasívne do 60 stupňov, vykonávané pohyby sú bolestivé. Dolné končatiny bez skrátene a iných deformít.

Výšetrenia, ich výsledky a profylaxia

- **biochemické analýzy:** CRP 47 mg/l v čase uvoľnenia (3/2016),
- **hematologické analýzy:** krvný obraz v norme pri prijatí na reimplantáciu,
- **rádiologické vyšetrenie:** výrazné osteolýzy v okolí implantátu,
- **mikrobiologická kultivácia steru z povrchu endoprotézy:** negatívna,
- **antibiotická profylaxia** pri revízii: klindamycín i. v. 2x 150 mg podaný hodinu pred operáciou

Priebeh

Primoimplantácia v roku 2010 bola indikovaná pre primárnu artrózu bedrového kĺbu. V marci roku 2016 pre dlhotrvajúce bolesti v okolí operovaného kĺbu bola vykonaná extrakcia endoprotézy a bol zavedený spacer s antibiotikami. V septembri 2016 v celkovej anestézii pod antibiotickým krytím bola vykonaná reimplantácia. Pooperačné bolesti boli primerané, hojenie rany per primam intentionem, bez secernácie. Pacient bol preložený na oddelenie fyziatrie a rehabilitácie.

Pri pátraní po možných zdrojoch významnej bakteriémie ako príčiny hlbokoj infekcie endoprotézy lekári prvého kontaktu úspešní neboli. Výtery z tonzíl a z nosa boli negatívne. Kultivačný nález v moči bol tiež negatívny. Infekčné ložiská na koži prítomné neboli.

Terapeutický zákrok

Dvojfázová operácia TEP coxae sin., v prvej fáze extrakcia pôvodnej TEP, dezinfekcia kostného lôžka výplachmi a zavedenie spaceru s ATB, v druhej fáze po 6 mesiacoch reimplantácia TEP coxae sin (necementovaná). Po prepustení pacient užíval per os Dalacin 300 mg 1 – 1 – 1, ktorý bol naordinovaný na ďalšie 3 týždne, analgetiká podľa potreby, prevencia trombembolickej choroby.

Vyhodnotenie a mikrobiologický aspekt

Diagnostika periprotetickej infekcie bola v tomto prípade komplikovanejšia. Manifestácia uvoľnenej endoprotézy nebola výrazná. Na základe subjektívnych príznakov pacienta nebolo možné jednoznačne vysloviť podozrenie na infekčnú etiológiu. Laboratórne nálezy, naopak, poukazovali na prebiehajúcu zápalovú aktivitu. Na rtg. obraze boli nápadné osteolytické oblasti v okolí kĺbovej náhrady. Na základe týchto objektívnych faktorov ošetrojúci lekár predpokladal infekčnú komplikáciu⁽³⁾. Kultivácia steru z povrchu extrahovanej endoprotézy však bola negatívna. Možné dôvody:

- odber bol vykonaný v čase antibiotického krytia
- najpravdepodobnejší vyvolávateľ infekcie vytvoril na povrchu kĺbovej náhrady **biofilm**. Ani sterom, ani zoškrabnutím nemožno získať z biofilmu planktonické bunky etiologického agensu
- absentovala požiadavka o prolongáciu kultivácie na 14 dní
- nebol použitý **sonikátor na extrahované komponenty**, zvlášť acetabulárnu a femorálnu, ktorý by biofilmovú štruktúru rozrušil a uvoľnil tak planktonické formy mikroorganizmu z povrchu endoprotézy. Jedine planktón vieme zachytiť kultiváciou na bežne dostupných agarových pôdach.

Zvýšiť úspešnosť pri objasňovaní identity mikroorganizmu, ktorý spôsobí rozvoj periprotetickej infekcie, by pomohlo, keby sa na mikrobiologickú analýzu odoslali:

- **punktát z kĺbovej dutiny.** Ide o **zlatý štandard v diagnostike** hlbokých infekcií kĺbových endoprotéz. Senzitivita punkcií je 94 – 97 % a špecifická 88 – 98 %⁽¹⁰⁾.
- **peroperačné biopsie periprotetických tkanív** z rôznych lokalít. ESCMID odporúča 5 až 10 kúskov tkanív z okolia protézy, kde prebieha zápal⁽⁵⁾.

Pri použití sonikátora sa odporúča nastaviť parametre: nízka frekvencia: 40 kHz, energia: 0,25 W/cm². Jednotlivé časti endoprotézy vložíme do nádob s roztokom a umiestnime do prístroja. Odporúča sa použitie Ringerovho roztoku. Endoprotézu je nutné ošetrovať ultrazvukom aspoň 5 až 6 minút. Po skončení cyklu je predpoklad, že došlo k rozrušeniu biofilmu a časť bakteriálnych buniek sa uvoľnila do roztoku. Vzniknutú suspenziu, tzv. **sonikát**, je potrebné vytrepať na vortexe s cieľom jej homogenizácie minimálne 30 sekúnd. Na kultiváciu by sa následne použil sonikát jeho inokuláciou na príslušné agary pre aeróbnú a anaeróbnú mikrobiologickú analýzu. Senzitivita kultivácie sonikátu je vyššia ako pri steroch z rán či povrchov endoprotéz, dosahuje až 80 – 85 % a špecifická je okolo 95 %⁽⁴⁾. Ako spôsob transportu sa odporúča striekačka s hermeticky uzavretou ihlou alebo v nádobách systémom BACTEC pre aeróbnú a anaeróbnú kultiváciu⁽³⁾. **(obrázok 1)**

Obrázok 1. Sonikátor



(prevzaté z http://bandelin.com/prospekte/Bactosonic_Flyer_GB_BANDELIN.pdf)

Diskusia a odporúčania

Stery z povrchu endoprotéz sa dnes neodporúčajú a považujú sa za najmenej vhodný typ vzorky na objasnenie etiológického agensu periprotetickej infekcie. Potvrďuje to aj prax vzhľadom na vysoký podiel kultivačne negatívnych sterov. Príčinou je, že väčšinu periprotetickej infekcií spôsobujú kmene so schopnosťou tvoriť biofilm na povrchu endoprotézy⁽⁵⁾.

ESCMID odporúča po extrakcii jednotlivých komponentov vystaviť ich účinkom ultrazvuku s nízkou energiou a frekvenciami. Jeho cieľom je dezintegrovať biofilm na povrchu endoprotézy a získať tak planktonické formy mikroorganizmov bez poškodenia ich buniek.

Otázne je, kde by sa mali **sonikátory** nachádzať. Či by mali byť súčasťou výbavy operačných sál, alebo mikrobiologických laboratórií. V prvom prípade by lekári odosielali tekuté vzorky, tzv. sonikát, do laboratória na spracovanie. V druhom prípade by museli posielat' do laboratórií jednotlivé komponenty v sterilných nádobách, tzv. kontajneroch, alebo nasucho zabalené v sterilných rukaviciach.

Ďalším **zlatým štandardom sú biopsie periprotetickeho tkaniva** poškodeného zápalom. Čím viac, tým lepšie a z rôznych lokalít. Je nutné nezabúdať na požiadavku prolongovanej kultivácie o jeden až dva týždne. Dôvodom sú pomaly rastúce kmene stafylokokov s negatívnou koagulázou, tzv. **small colony variants (SCV)**, ktoré po 24- až 48-hodinovej kultivácii nedokážeme zachytiť a sú najčastejšou príčinou mitigovaných, chronických infekcií kĺbových náhrad^(2,5).

Pri abscesoch sa odporúča odosielat' na kultiváciu až **poslednú porciu hnisu**, ktorý vypíňal dutinu. Dobré je urobiť aj niekoľko sterov zo steny abscesovej dutiny, čo najhlbšie uloženej, aby sme sa vyhlili kontaminácii vzorky a dostali sa k miestam, kde prebieha aktívny zápal a granulácia nového tkaniva. Kultivačné analýzy hnisu odobraného inak, ako je tu zaznamenané, vedú k falošne negatívnym nálezom, keďže obsahom hnisu sú mŕtve biele krvinky a rozložené bakteriálne bunky.

Skupina stafylokokov s negatívnou koagulázou sa neustále rozširuje o nové druhy. Preto sa odporúča ich presnejšia identifikácia hmotnostnou spektrometriou, tzv. metódou MALDI-TOF, alebo pri tekutých materiáloch pomocou metód molekulárnej biológie (real-time-PCR). Ak sa z opakovanej kultivácie viacerých vzoriek z rôznych odberov nepotvrdí rovnaký druh stafylokokov s negatívnou koagulázou, je možné, že ide o kontamináciu vzorky z telesného povrchu. Vysloviť záver, že identifikovaný mikroorganizmus je pôvodcom infekcie, môžeme na základe kultivačného dôkazu rovnakého druhu so zhodným antibiogramom z viacerých vzoriek z rôznych lokalít (predoperačný punkčat' získaný aspiráciou hnisu z kĺbovej dutiny, peroperačné biopsie periprotetickej tkanív, stery z viacerých miest v rane poškodenej zápalom).

Obaja pacienti dostali počas primárnych operácií pri zavádzaní totálnych endoprotéz **predoperačnú antibiotickú profylaxiu** cefazolin (Kefzol) 2 g i. v. 30 minút pred operáciou v súlade s najnovšími odporúčaniami vydanými Ministerstvom zdravotníctva Slovenskej republiky⁽¹⁵⁾. Biologický polčas cefazolinu sú 2 hodiny, čo stačí na profylaktické krytie 3-hodinovej operácie. Pri alergii na betalaktámové antibiotiká je alternatívou klindamycín 600 až 900 mg i. v. podaný 30 minút pred prvou incíziou. **Pri revíznych zákrokoch** sa podáva klindamycín alebo ciprofloxacín 400 mg 2 hodiny pred operáciou intravenózne^(9,15). Klindamycín sa preferuje v týchto prípadoch hlavne pre jeho dobrú priepustnosť do kostí – 80 až 150 % sérovej hladiny preniká do kostného tkaniva^(1,15).

Otázka pooperačnej profylaxie dodnes nie je vyriešená v ortopedickej obci. Význam a prínos rôznych schém líšia sa dĺžkou a spôsobom podávania antibiotík po operácií nie je dodnes podložený žiadnou štúdiou⁽¹⁾.

Záver

V článku opísané kazuistiky ukázali, že z mikrobiologického hľadiska neboli využité všetky možnosti, ktoré sú dnes dostupné pri objasňovaní príčiny periprotetickej infekcie. Vysoké percento falošne negatívnych nálezov kultivačných analýz sa pripisuje na vrub nízkej informovanosti ošetrovujúcich lekárov, čo je následok nedostatočnej spolupráce s lekármi v mikrobiologickom laboratóriu. Zvýšiť podiel pozitívnych kultivácií pomôžu biopsie periprotetickej tkanív, čo by mali byť vzorky prvej voľby vždy s požiadavkou na predĺženú kultiváciu.

Z každodennej praxe vidíme, aké nevyhnutné je, aby sa zefektívnila komunikácia medzi lekárom mikrobiológom a lekárom, ktorí sú v prvom kontakte s pacientom. Lekár mikrobiológ by mal byť súčasťou tímu, ktorý sa stará o pacientov na oddeleniach s ťažkými infekciami, mal by kontrolovať správnosť preskripcie antibiotík a brániť ich nadmernému používaniu. Podieľať by sa mal na informovaní, ako správne odoberať klinické vzorky, ich množstvo, rôzne druhy a o spôsoboch ich transportu.

Záujmom každého mikrobiologického laboratória by mal byť pokrok a snaha byť čo najužitočnejší pre pacienta. Aj preto verím, že už to nebude dlho trvať a metódy ako sonikácia sa čoskoro stanú rutinou aj u nás.

LITERATÚRA

1. Čech O, Džupa V. Revízní operace náhrad kyčelního kloubu, Praha, Czech Republic, Galén; 2004; 234 s.
2. Jahoda D, Sosna A, Nyč O, et al. Infekční komplikace kloubních náhrad, Praha, Czech Republic, Triton; 2008; 220 s.
3. Landor I, Vavřík P, Gallo J, Sosna A. Revízní operace totálních náhrad kyčelního kloubu, Praha, Czech Republic, Maxdorf; 2012; 398 s.
4. Rulík M, Holá V, Ružička F, Votava M, et al. Mikrobiální biofilmy, Olomouc, Czech Republic, Univerzita Palackého v Olomouci, 2011; 447 s: 151-174.
5. Hoiby N, Bjarnsholt T, Moser C, et al. for the ESCMID Study Group for Biofilms (ESGP) and Consulting External Expert Werner Zimmerli ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014; 25 s.
6. Švec A. Periprotetická infekcia po implantácii totálnej endoprotézy bedrového a kolenného kĺbu, 1. Traumatologicko-ortopedická klinika, LF UK, UNB Bratislava, Slovenská republika, Bedeker Zdravia, Ortopédia, 2011; 64 s: 4-10.
7. Murray P, et al. Manual of clinical microbiology. 9th edition. Washington D.C.: ASM Press; 2007.
8. Isenberg HD, Clinical microbiology procedures handbook, 2nd ed. Washington D.C.: ASM Press; 2004;
9. Katzung B.G. Základní a klinická farmakologie, Lange Medical Books, H & H, 2006; 1106 s: 805-819,
10. Zima T, et al. Laboratorní diagnostika, Praha, Czech Republic, Galén, 2013; 1146 s: 537-541.
11. Jahoda D, Nyč O, Pokorný D, Landor I, Sosna A. Antibiotika v prevenci infekčních komplikací u operací kloubních náhrad, ACTA CHIRURGIAE ORTHOPAEDICAE ET TRAUMATOLOGIAE ČECHOSL., 73, 2006; p. 108-114.
12. American Academy of Orthopaedic Surgeon. Guideline on The Diagnosis of Periprosthetic Joint Infections of the Hip and Knee [on-line] <http://www.aaos.org/research/guidelines/PJIsummary.pdf> 2010
13. American Academy of Orthopaedic Surgeon. The diagnosis of periprosthetic joint infections of the hip and knee [on-line] <http://www.aaos.org/research/guidelines/PJIguideline.pdf> 2010
14. Nečas L, Katina S, Uhlárová J. Analýza prežívania aloplastických operácií bedrového a kolenného kĺbu. Slovenský artroplastický register. 2013; 87 s [on-line] <http://sar.mfn.sk/file/subory/Výročná%20správa%20za%20rok%202011.pdf>
15. Odborné usmernenie Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky pre antibiotickú profylaxiu chirurgickej ranovej infekcie č. 12372/2010 OZS z 28. 9. 2010 v súlade s § 45 ods. 1 písm. b) zákona č. 576/2004 Z.z. o zdravotnej starostlivosti, službách súvisiacich s poskytovaním zdravotnej starostlivosti a o zmene a doplnení niektorých zákonov v znení neskorších predpisov.



MUDr. Štefan Jacák

Medirex, a. s.

Hodská 68, 924 01 Galanta

e-mail: stefan.jacak@medirex.sk

ECOLAB®

Everywhere It Matters.™

Pomáhame Vám

- ▲ zabráňovať šíreniu infekcií
- ▲ optimalizovať pracovné postupy a výsledky
- ▲ školiť a vzdelávať personál
- ▲ účinne využívať dostupné zdroje
- ▲ hygiena rúk a pokožky
- ▲ čistenie a dezinfekcia lekárskeho nástroja
- ▲ dezinfekcia plôch a povrchov
- ▲ dávkovacie zariadenia

OBJAVTE OXY ÚČINOK

Objavte OXY účinok

- ▲ účinný nový rad čistiacich a dezinfekčných prípravkov s technológiou High-Speed H₂O₂™ používaných v zdravotníctve
- ▲ čistenie a dezinfekcia v jednom kroku
- ▲ dostupné vo verzii penového spreja a utierok



Kontakt: 02/ 572 049 15-16, www.sk.ecolab.eu

Nositel'né medicínske zariadenia budúcnosti... možno nie až takej ďalekej...

RNDr. Ján Radvánszky, PhD.

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

NewsLab, 2017; roč. 8(2): 123 – 125

V prvej časti našej novej rubriky sme načrtli určitú víziu personalizovanej medicíny, čiže medicíny „šitej na mieru“. Dotkli sme sa pritom aj tematiky „nositeľných zariadení“, ktoré by mali umožniť kontinuálne monitorovanie základných fyziologických funkcií organizmu, rozširujúc tak možnosti diagnostiky a sledovania zdravotného stavu pacientov v reálnom čase. Pri výbere dnešnej témy sme sa rozhodli rozvinúť práve túto tematiku, avšak z pohľadu toho, čo nás pravdepodobne očakáva za hranicami klasických nositeľných zariadení ako ich v súčasnosti poznáme. Znova, vzhľadom na tých čitateľov, ktorým sa nechce stráviť dni až týždne študovaním nudnej vedeckej literatúry, sa aj dnes odvolávame na článok písaný popularizačným štýlom. Východiskovým bodom je tentoraz jediný článok londýnskej reportérky časopisu *Nature* Elizabeth Gibneyovej s názvom *The body electric* (2015; 5287580): 26-28), v ktorom sa čitatelia môžu dočítať o vybranej téme viac.

Vnímanie fyziologických funkcií nášho tela je už v súčasnosti „vylepšované“ mnohými nositeľnými zariadeniami, akými sú naše *smart* telefóny, *smart* náramky alebo *smart* hodinky. Tie však majú zatiaľ jeden veľký spoločný menovateľ, všetky sú od organizmu pomerne silno izolované, predstavujú doslova externé zariadenia. Aktuálne sme však svedkami rozvoja, ktorý s najväčšou pravdepodobnosťou povedie k novým generáciám nositeľných zariadení, fungujúcim v oveľa užšom prepojení s organizmom, než sme na to doteraz zvyknutí. V tejto prirodzenej transformácii sa elektronika dostáva čoraz bližšie k nášmu telu, dokonca až do nášho tela, a pomaličky sa stáva jej integrálnou súčasťou.

Prvým krokom v tomto smere sú bezdrôtové senzory prilepené k pokožke, schopné zbierať z tela informácie ako teplota, pulz, krvný tlak a frekvencia dýchania a odovzdať ich na hodnotenie externému zdroju. Niečo, čo si možno najlepšie vieme predstaviť ako dočasné *smart* tetovania. V tomto prípade má materiálový výskum za úlohu vytvoriť látky schopné zvládnuť biologické funkcie pokožky ako ohnutie, ťaženie a zdrenie. Ako príklad sa dá uviesť „epidermálna elektronika“ vo forme flexibilných, biodegradovateľných náplastí napodobňujúcich dočasné detské tetovania, avšak obsahujúce plejádu senzorov. Pri hrúbke približne 30 mikrometrov a ploche asi 3,5 cm x 2 cm si tu nájdeme miesto zariadenia ako teplotný senzor, elektrokardiogramový senzor, elektromyogramový senzor, súčiastky na rádiový frekvenčný komunikáciu, bezdrôtová zdrojová cievka, anténa, LED, tenzometer, a iné. Testované sú pritom napr. na monitorovanie vitálnych známkov v intenzívnej novorodeneckej starostlivosti alebo na

sledovanie známkov ochorenia u pacientov s Parkinsonovou chorobou. Ako zaujímavosť sa oplatí pripomenúť publikovaný test, v ktorom takáto epidermálna elektronika „nalepená“ na hrdle umožnila cez jej elektromyogramový senzor neinvazívne sledovanie svalovej aktivity počas reči. Umožnila následne rozoznať špecifické vzory limitovaného súboru slov, ktoré zase cez špeciálny algoritmus schopný rozoznať tieto vzory umožnili hlasové ovládanie jednoduchej videohry (Sokoban). Iná pracovná skupina sa rozhodla odpútať od silikónového základu týchto elektronických zariadení a testovať možnosti ponúkané organickými elektronickými obvodmi. Podarilo sa im dosiahnuť mikrometer tenký plastový film pomerne veľkých rozmerov, naložený senzormi, ktorý je schopný fungovať ako „elektronická pokožka“ zvládajúca ohnutia a ťaženia aj v takých namáhaných oblastiach, ako sú kĺby. Predstavte si vysoko špecializované senzorické elektronické zariadenie, ktorého všetky elektronické aj senzorické funkcie zostanú nedotknuté aj pri pokrčení ako kus celofánového obalu zo sladkostí, pri vysokých teplotách alebo aj vo vodnom prostredí. Schopné je pritom zbierať údaje, ako je teplota, vlhkosť, pulz a koncentrácia kyslíka v krvi.

Nezdá sa však, že nositeľné technológie „plánujú“ zostať na povrchu tela. Z hlbších oblastí organizmu sa dajú extrahovať ďalšie a ďalšie fyziologické informácie, čo je vlastne dôvodom aj toho, prečo sa lekárske vyšetrenia začínajú odberom a analýzou krvi. Týmto presunom z konvenčných nositeľných zariadení na implantovateľné však pribúdajú aj výzvy, napr. ohľadne toxicity, biokompatibility, stability, ovládania a fungovania prístrojov vnútri ľudského organizmu. Tetovanie aj v tomto prípade posluží ako prirovnávanie, tentoraz však nie v detskej „nálepkovej“ forme, ale v jej trvalejšej verzii injektovanej pod kožu. Syntetické detektory, napr. vo forme karbónových nanotrubic, zmiešané s gélovou látkou na báze vody sa môžu vstreknúť pod pokožku. Tieto nanotrúbice pritom môžu byť obalené polymérnymi štruktúrami špecificky rozpoznávajúcimi konkrétny biomarker záujmu. Ak daný biomarker z krvi interaguje s polymérom štruktúrou, zmenia sa aj vlastnosti samotných nanotrubic. Biochemické zmeny v krvi vedú takýmto spôsobom ovplyvniť napr. optické vlastnosti farby tetovania, naznačujúc tak zmenu pH, hladiny oxidu dusnatého, sodíka, glukózy alebo iných látok.

V tomto bode sa však invenčnosť nezastaví. Pracuje sa totiž aj na novej generácii zariadení implantovateľných hlbšie do organizmu, napr. do srdca alebo do mozgu. V týchto prípadoch by mohli byť informácie zbierané priamo z orgánov, aj terapeutické látky podávané priamo do orgánov určenia,

obchádzajúc tak nielen problém akútnych stavov, ale aj mnohé systémové vedľajšie účinky liekov. Pod intenzívnym vývinom sú flexibilné elektronické senzory, založené na báze vodivých polymérov, schopné zachytiť napr. charakteristické elektrické vzory mozgovej aktivity pacientov s epilepsiou alebo Parkinsonovou chorobou. Testujú sa tiež organické elektronické pumpy, schopné na základe elektrického výboja uvoľniť malé nabitie častice liekov zo svojich rezervoárov. S cieľom dosiahnuť lokálne elektronicky kontrolované podanie liečiv podľa aktuálnych potrieb pacientov sa tiež intenzívne testujú možnosti spojenia takýchto senzorov a iónových púmp so schopnosťou reagovať napr. na epileptický záchvat uvoľnením liečiva priamo do potrebnej časti mozgu. Podobnej technike sa tiež venuje pozornosť s cieľom skúmať možnosti administrácie analgetík priamo do miechy u pacientov s chronickými neuropatickými bolesťami. Kombináciou implantovateľných senzorov so systémami administrácie liečiv sa niektorí vedci snažia dosiahnuť rovno uvoľňovanie terapeutických látok v tele, pričom tieto terapeutiká môžu byť uložené v kapsule obklopenej polymérom, schopnej reagovať na rôzne látky prítomné v prostredí. Víziou do budúcnosti je pritom možnosť automatickej detekcie symptómu ochorenia (cez konkrétny biomarker v krvi alebo iný merateľný prejav ochorenia) s následnou rýchlou a automatickou administráciou terapeutickú látku nielen do krvného obehu, ale dokonca na konkrétne miesta určenia v rámci organizmu.

Doteraz testované iónové pumpy však majú jednu veľkú nevýhodu. Potrebujú mať vyriešené elektrické napájanie a vyžadujú spojenie s vonkajším prostredím vo forme káblov, čo predstavuje nielen nepohodlie, ale aj potenciálny zdroj infekcií. V prípade zariadení nachádzajúcich sa na pokožke a plynko pod ňou sú tieto problémy už viac-menej vyriešené. Na zabezpečenie bezdrôtového napájania často využívajú blízke magnetické polia, rádiové vlny alebo dokonca fotovoltické princípy. Pri hlbšie uložených zariadeniach však tieto systémy zatiaľ nefungujú. Ako jedno z možných riešení na tento problém sa navrhlo využitie konverzie pohybu tela na elektrickú energiu, napr. vo forme využitia statickej energie generovateľnej pri nádychu a výdychu pacienta. Takýto nanogenerátor môže využívať napr. dva polymérové povrchy stlačené medzi elektródy a prepojené do obvodu. Pri nádychu a výdychu sa tieto povrchy zblížia a oddialia ťahajúc medzi sebou elektróny. Vzniknutý náboj vedie k toku rádovo miliampérov prúdu v obvode. Na základe účelu zariadení však aj úlohy na vyriešenie môžu byť odlišné. V niektorých prípadoch je potrebné zabezpečiť fungovanie implantovaného prístroja na celý život pacienta, v iných je táto potreba časovo limitovaná. Na takéto prípady sa testujú biodegradovateľné baterky, založené na netoxických látkach schopných rozpustiť sa v organizme.

DYNEX = KOMPLETNÍ ŘEŠENÍ



Reagencie

Včetně diagnostických souprav pro detekci patogenů a genetické testování

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

Přístroje

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

Služby

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



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

Problémov na vyriešenie je však viac, medzi inými komunikácia nositeľných a implantovateľných zariadení s vonkajším prostredím. Pri bezdrôtových vysielaniach cez rádiové vlny je nutné myslieť napr. na ochranu citlivých personálnych údajov a na možné *hekerské* útoky. Jednou z možností je znížiť množstvo prenášaných dát alebo absolútne nevyužiť rádiové vlny na prenos informácií. Na prenos signálu s nízkou frekvenciou sa dá využiť napr. samotná voda nachádzajúca sa v organizme, ktorá môže navzájom spájať rôzne zariadenia v tele, prípadne aj externé zariadenie (*smartfón*) cez priamy dotyk rukami, zabezpečujúc tak dostatočné súkromie. Inou

možnosťou je zase spracovanie potrebných informácií priamo zariadením bez potreby vysielania informácií na externé zariadenia.

Podľa hlavičky nášho zdrojového dokumentu výskumníci chcú popretkávať ľudské telo senzormi, ktoré môžu zbierať množstvo údajov, transformujúc tak zdravotnú starostlivosť. Pre zdravých ľudí sa táto predstava môže zdať čudná, ba až bizarná. Pre tých, ktorí trpia potenciálnymi cieľovými ochoreniami, to však môže byť jedna z najkrajších vízií. Je dôležité pri úvahách si uvedomiť, na aké podporné zdravotné prístroje a zariadenia sú títo pacienti odkázaní dnes.



RNDr. Ján Radvánszky, PhD.

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

Správne odpovede autoidaktického testu z NEWSLABU 1/2017:

- | | | |
|------|-------|-------|
| 1. b | 8. b | 15. a |
| 2. b | 9. a | 16. d |
| 3. b | 10. c | 17. a |
| 4. d | 11. a | 18. c |
| 5. a | 12. a | 19. b |
| 6. b | 13. b | 20. c |
| 7. a | 14. a | |

Európsky kongres ECCMID 2017 a slovenskí parazitológovia

RNDr. Vojtech Boldiš, PhD.

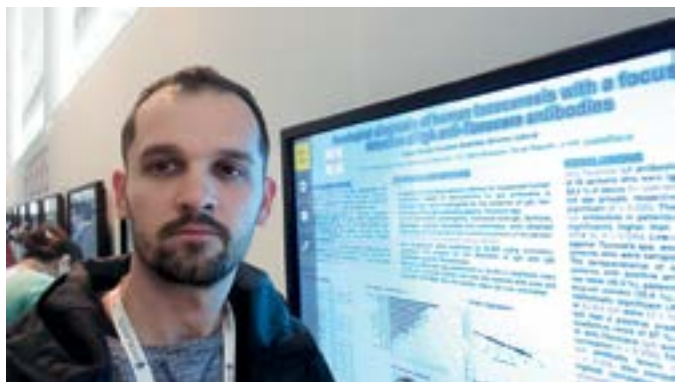
Medirex, a. s., Bratislava

NewsLab, 2017; roč. 8(2): 126

Tohtoročný 27. európsky kongres klinickej mikrobiológie a infekčných chorôb ECCMID 2017, ktorý sa konal koncom apríla vo Viedni, sa skončil rekordnou účasťou. Na konferencii bolo prítomných 12 494 ľudí zo 126 krajín celého sveta. Išlo o multiodborové stretnutie laboratórnych, klinických a vedeckých pracovníkov, ktorí sa zaoberajú mikrobiologickou, mykologickou, virologickou a parazitologickou problematikou. Prezentované boli najnovšie poznatky v oblasti klinickej mikrobiológie a infekčných ochorení s dôrazom na aktuálne objavy v laboratórnej diagnostike, v terapii a prevencii infekčných ochorení. Podujatie bolo rozdelené do viacerých sekcií: sympózií, kľúčových lekcii, prednášok, posterov, integrovaných sympózií organizovaných komerčnými firmami, edukačných seminárov a stretnutí s expertmi v daných odboroch.

Aktívne sa zúčastniť na tejto celosvetovej akcii nie je jednoduché, a to z dôvodu veľmi prísnej revízie odborných príspevkov. Nám sa však podarilo uspieť s prácou s názvom „Serological diagnosis of human toxocarosis with a focus on detection of IgA anti-Toxocara antibodies“, ktorú pripravil kolektív autorov RNDr. Vojtech Boldiš, PhD., doc. RNDr. František Ondriska, PhD., a Mgr. Simona Lipková (**obrázok 1**).

Obrázok 1. Vojtech Boldiš počas prezentácie a diskusie príspevku na kongrese ECCMID 2017 vo Viedni



Viac informácií k problematike v nasledujúcich odborných článkoch:

LITERATÚRA

1. Antolová D, Jarčuška P, Janičko M, et al. Hepameta Team. Seroprevalence of human *Toxocara* infections in the Roma and non-Roma populations of Eastern Slovakia: a cross-sectional study. *Epidemiol Infect* 2015; 143: 2249-2258.
2. Boldiš V, Ondriska F, Špitalská E, Reiterová K. Immunodiagnostic approaches for the detection of human toxocarosis. *Exp Parasitol* 2015; 159: 252-258.

V štúdiu sme sa zaoberali infekčným ochorením známym pod názvom humánna toxokaróza. Toxokaróza je jednou zo závažných zoonóz, ktorá je spôsobená larvami parazitických červov *Toxocara canis* (škrkavka psia) a *T. cati* (škrkavka mačacia; **obrázok 2**). Človek sa nakazí požitím vajíčok, ktoré pochádzajú z výkalov definitívneho hostiteľa (pes alebo mačka). Na Slovensku je výskyt larválnej toxokarózy vysoký a stále narastá v súvislosti so zvyšujúcim sa počtom psov a mačiek. Ochorenie je vyvolané migrujúcimi larvami škrkaviek, ktoré sa dostávajú do rôznych ľudských orgánov. Rutinná diagnostika humánnej toxokarózy je založená na detekcii špecifických protilátok triedy IgG. Na rozlíšenie akútnej a chronickej infekcie však detekcia IgG špecifických protilátok nie je postačujúca. Z tohto dôvodu sme imunodiagnostiku humánnej toxokarózy rozšírili o detekciu IgA antitoxokarových protilátok, o determináciu avidity IgG špecifických protilátok proti *Toxocara* spp. a v neposlednom rade o zistenie hladín eozinofilov či celkových IgE protilátok vyšetrovaných pacientov, ktoré patria medzi významné markery a dopĺňajú nami vytvorenú sérologicko-diagnostickú mozaiku toxokarózy.

Obrázok 2. Uvoľnenie larvy *T. canis* z vajíčka, nativný preparát (fotografia: V. Boldiš)



3. Elefant GR. Human toxocarosis: humoral response (IgG, IgA and IgE) anti-*Toxocara canis* and clinical-laboratorial correlation in patients following chemotherapy. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2004; 46: 76.
4. Ondriska F, Mačuhová K, Melicherová J, et al. Toxocarosis in urban environment of western Slovakia. *Helmintologia* 2013; 50: 261-268.



RNDr. Vojtech Boldiš, PhD.

Medirex, a. s.

Galvaniho 17/C, 820 16, Bratislava

e-mail: vojtech.boldis@medirex.sk

MEDIREX GROUP ACADEMY n. o. vás pozýva na druhý ročník podujatia

MEDIREX GROUP ACADEMY PRE MLADÝCH

STRETNUTIE MLADÝCH LEKÁROV A ZDRAVOTNÝCH PRACOVNÍKOV

10.-11.
NOVEMBRA 2017

Konferenčná miestnosť MEDIREX GROUP ACADEMY n. o.
Galvaniho 17/C, Bratislava, 5. poschodie

Základnou ideou podujatia je poskytnutie priestoru na prezentáciu mladým pracovníkom v laboratórnej medicíne, ktorí sa tak budú môcť podeliť s ostatnými o svoje pracovné skúsenosti a nadobudnúť vzájomne aj množstvo nových vedomostí. Preto ak spĺňate základnú podmienku – vek do 35 rokov – prihláste sa ako aktívny účastník a predstavte sa v rámci programu podujatia so svojou odbornou prezentáciou alebo posterom (téma je ľubovoľná).

Registrácia aktívnych účastníkov je podmienená zaslaním abstraktu najneskôr do **30. 9. 2017** prostredníctvom webovej stránky www.medirexgroupacademy.sk, v sekcii Odborné podujatia.

Na podujatí bude vyhodnotená najlepšia prednáška aj najlepší poster. Výhercovia budú odmenení hodnotnými cenami.

Registrácia pasívnej účasti je bez vekového obmedzenia. Vašu účasť, prosím, potvrdte takisto prostredníctvom webovej adresy www.medirexgroupacademy.sk v sekcii Odborné podujatia do **3. 11. 2017**.

Účasť je bezplatná.

HLAVNÝ ORGANIZÁTOR

MEDIREX GROUP ACADEMY n. o.

INFORMÁCIA O KREDITOCH

Podujatie je zaradené do kontinuálneho medicínskeho vzdelávania Slovenskej lekárskej komory a bude hodnotené kreditmi.

ODBORNÝ GARANT PODUJATIA

MUDr. Anna Stecová, CSc.,
Medirex, a. s., člen MEDIREX GROUP

KOORDINÁTORKA PODUJATIA

Mgr. Laura Lippová
Tel.: +421 918 321 047
E-mail: laura.lippova@medirexgroup.sk

PROGRAMOVÝ VÝBOR

MUDr. Peter Krížan, CSc., Medirex, a. s., člen MEDIREX GROUP | MUDr. Katarína Vlniešková, Medirex, a. s., člen MEDIREX GROUP | MUDr. Silvia Remiašová, Medirex, a. s., člen MEDIREX GROUP | MUDr. Eleonóra Molnárová, Medicyt, s. r. o., člen MEDIREX GROUP | MUDr. Eva Ďurovcová, PhD., Medirex, a. s., člen MEDIREX GROUP | MUDr. Ján Lazúr, Medirex, a. s., člen MEDIREX GROUP | MUDr. Alica Elbertová, Medirex, a. s., člen MEDIREX GROUP | MUDr. Pavol Janega, PhD., MEDIREX GROUP ACADEMY n. o., člen MEDIREX GROUP | MUDr. Emília Miková, Medirex, a. s., člen MEDIREX GROUP | RNDr. Csilla Patasi, PhD., Medirex, a. s., člen MEDIREX GROUP | Mgr. Simona Duranková, Medirex, a. s., člen MEDIREX GROUP

www.newslab.sk
www.medirexgroupacademy.sk

