inLAB

ODBORNÝ ČASOPIS
SÍTĚ LABORATOŘÍ
AGELLAB

AGEL PARTNER portál

Pravidelná rubrika
Na odběru záleží

Detekce nádorového ložiska prsu značeného radioaktivním zrnem na pracovišti patologie

Diferenciální diagnostika anémií dle parametru MCV

Tuberkulóza u imunokompromitovaného pacienta – kazuistika

Herpetické viry u pacientů s těžkým průběhem onemocnění covid-19

Musí být genetická diagnóza vždy špatnou zprávou?

Záchyt neznámých nox v klinické toxikologii

November 2021

IV
2022

Vážené kolegyně, vážení kolegové, milí čtenáři,

S radostí Vám představujeme již čtvrté číslo našeho časopisu INLAB, v němž přinášíme odborné novinky i zajímavá servisní témata z prostředí laboratorního komplementu společnosti AGEL a.s.

Síť pracovišť AGELLAB patří mezi největší poskytovatele zdravotnických laboratorních služeb v České republice. Je to především komplexnost a šíře poskytovaných vyšetření, která nám umožňuje poskytovat kvalitní službu v oborech laboratorního komplementu na všech úrovních, od primární péče až k intenzivní spolupráci s vysoce specializovanými pracovišti v celé republice.

Ve všech odbornostech, které v našich laboratořích poskytujeme, jsme v tomto roce pokračovali v odborném rozvoji a systematickém zvyšování kvality zdravotní péče na základě aktuálních poznatků evidence-based medicine. Pro ilustraci odborného rozvoje si dovolím si uvést několik příkladů:
Laboratoř klinické imunologie a alergologie rozšířila portfolio o multiplexové metody potravinových intolerancí a další metody. Také laboratoř farmakologie a toxikologie významně rozšířila spektrum poskytovaných vyšetření lékových hladin a patří tak mezi přední pracoviště svého druhu v ČR. V laboratoři molekulární biologie jsme zahájili vyšetřování novými technologiemi masivního paralelního sekvenování. Rozšířili jsme onkogenetická vyšetření bioptického materiálu a zahájili kapacitní screeningová vyšetření novorozenců, vrozených poruch imunity a spinální muskulární atrofie. I v tomto roce jsme pokračovali ve vysokokapacitním testování onemocnění covid-19 metodou PCR.

Jsme velmi rádi, že se nám podařilo zrealizovat řadu odborných setkání, na nichž jsme se s Vámi měli možnost setkat a představit Vám aktuální trendy vývoje v našich laboratořích. Pro širokou klientelu z řad veřejnosti je nově dostupný e-shop laboratorních vyšetření.

Rád bych na tomto místě poděkoval všem zaměstnancům společnosti za jejich vysoce profesionální přístup a pracovní nasazení, které je základem špičkové laboratorní diagnostiky a multioborového přístupu s rychlou dostupností našich vyšetření. Dovolte, abych Vám za tým AGELLAB popřál poutavé čtení a poděkoval za Vaši přízeň a spolupráci.

RNDr. Tomáš Gucký, Ph.D.
předseda představenstva společnost Laboratoře AGEL a.s.
ředitel Odboru Laboratoří Skupiny AGEL a.s.

TIRÁŽ

INLAB – časopis sítě laboratoří AGELLAB

Ročník 4, 2022, číslo 1
vychází 1× ročně
Redakční rada: Mgr. Zuzana Birkáš, Bc. Daniela Galiová, RNDr. Andrea Ondrejková , Mgr. Hana Bílková Fránková, MBA, RNDr. Tomáš Gucký, Ph.D., Mgr. Spiros Tavandzis, Ing. Arpád Bóday, Ing. Elena Gaboňová, Mgr. Šárka Bahenský Šefraná
Vydavatel: Laboratoře AGEL, a. s., Revoluční 2214/35, 741 01 Nový Jičín, IČ 166 28 373
Zpracovatel: Laboratoře AGEL, a. s., Revoluční 2214/35, 741 01 Nový Jičín
Redakční zpracování: Jana Veličková, jana.velickova@lab.agel.cz
Grafické zpracování: Laboratoře AGEL, a.s., Jana Veličková
Vydavatel nenese odpovědnost za údaje a názory autorů jednotlivých článků či inzerátů.
Reprodukce obsahu je povolena pouze s přímým souhlasem redakce.

ISSN 2571-1865 / ISBN 978-80-11-02209-9

9 SERVISNÍ TÉMATA

10 AGEL PARTNER portál
Jindřich Maksant

14 Laboratoře skupiny AGEL a.s. instalovaly novou přístrojovou techniku
Lenka Kulíšková

18 Nová odběrová místa AGELLAB v síti společnosti AGEL a. s.
Lenka Kulíšková

19 PRAVIDELNÁ RUBRIKA – NA ODBĚRU ZÁLEŽÍ

20 Uzavřený odběrový systém – současné možnosti a klinický význam
Zdeňka Vahalová

25 PATOLOGIE

26 Detekce nádorového ložiska prsu značeného radioaktivním zrnem na pracovišti patologie
Lenka Maňáková, Romana Andělová

33 HEMATOLOGIE

34 Diferenciální diagnostika anémií dle parametru MCV
Martin Brejcha, Michaela Paulasová

37 KLINICKÁ ALERGOLOGIE A IMUNOLOGIE

38 Tuberkulóza u imunokompromitovaného pacienta – kazuistika
Andrea Ondrejková, Gustáv Ondrejka

43 Senzitivita na potraviny - pohyb na tenkém ledě. Stanovení IgG protilátek proti 287 potravinám multiplexovou metodou FOX
Barbora Pavlíková

51 KLINICKÁ MIKROBIOLOGIE

52 Herpetické viry u pacientů s těžkým průběhem onemocnění covid-19
Ondřej Juřena

57 Molekulární diagnostika virového onemocnění covid-19 v laboratorní praxi
Barbora Macúchová, Hana Bílková Fránková

66 Dalším vzácným nálezem laboratoře klinické mikrobiologie v Ostravě Vítkovicích byl původce tetanu
Dominika Riedlová

71 MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE A CYTOGENETIKA

72 Musí být genetická diagnóza vždy špatnou zprávou?
Věra Krutílková, Natálie Havranová, Arpád Bóday

77 Cytogenetická analýza získaných chromozomových aberací v lidských periferních lymfocytech
Bronislava Dřevojánková, Zuzana Lenčešová

83 FARMAKOLOGIE A TOXIKOLOGIE

84 Záchyt neznámých nox v klinické toxikologii
Zuzana Birkáš

91 Terapeutické monitorování biologik (Biologická léčba u IBD)
Kristýna Vlková, Vlasta Matušková, Tomáš Gucký

98 Rezistence a nadužívání ATB
Václava Adámková

109 KLINICKÁ BIOCHEMIE

110 November 2021
Adam Fojtík

113 Naše zkušenosti s automatickou močovou linkou Cobas 6500
Šárka Bahenský Šefraná, Ivana Kubalová

117 Vitamin D – Superhormon
Vlasta Matušková, Martin Švidrnoch, Kristýna Vlková, Spiros Tavandzis

Perfect Distribution
Člen skupiny AGEL

STÁLÝ DODAVATEL DEZINFEKČNÍCH PROSTŘEDKŮ A ZDRAVOTNICKÉHO MATERIÁLU

- Komplexní zásobování všech typů zdravotnických zařízení po celé ČR a na Slovensku
- Nejširší nabídka produktů nejvýznamnějších značek na trhu
- Služby šité na míru jednotlivým zákazníkům podle jejich individuálních potřeb
- Odborné poradenství profesionálního personálu

+420 800 166 661

perfectdistribution.agel.cz

SERVISNÍ TÉMATA

AGEL PARTNER portál

Jindřich Maksant

Skupina AGEL na začátku roku 2022 spustila na adrese https://agelpartner.cz pro své spolupracující lékaře vlastní webový portál – AGEL PARTNER PORTÁL (APP). Unikátní virtuální prostor sjednocující možnosti a hlavní benefity Skupiny AGEL napříč jejími společnostmi. Uživatel si na jednom místě zkontroluje laboratorní výsledky, bodovou bilanci a objedná pacienta na specializované vyšetření. APP nabízí přehledně veškeré informace o pacientovi, který byl odeslán do zdravotnických zařízení Skupiny AGEL na laboratorní či specializovaná vyšetření, případně k hospitalizaci. Všechna data jsou lékaři v portále dostupná z jakéhokoli zařízení Skupiny AGEL ihned po jejich vytvoření. APP představuje výrazný krok k celkové elektronizaci zdravotnictví a tím pádem i k úspoře času pro lékaře.

AGEL PARTNER portal

At the beginning of 2022, the AGEL Group launched its own web portal - „AGEL PARTNER PORTAL“ (APP) for its collaborating doctors at the address https://agelpartner.cz. A unique virtual space unifying the possibilities and main benefits of the AGEL Group across its companies. The user checks the laboratory results, point balance and orders the patient for a specialized examination in one place. The APP provides a clear overview of all information about a patient who has come to the AGEL Group's healthcare facilities for laboratory or specialized examinations, or for hospitalization. All data are available to doctors in the portal from any AGEL Group device immediately after they are created. APP represents a significant step towards the overall electronicization of the healthcare sector and thus also to save time for doctors.

Klíčová slova:
AGEL
portál
elektronizace
elektronické výsledky
elektronická dokumentace

Key words:
AGEL
portal
electronization
electronic results
electronic documentation

APP je modulární systém. Při jeho uvedení do provozu obsahoval tři základní moduly: Laboratorní výsledky, Zprávy a nálezy a Bodová bilance. Během letošního roku byl doplněn o další dva moduly: Objednávání pacientů na specializovaná vyšetření ve zdravotnických zařízeních Skupiny AGEL a modul Nabídky spolupráce lékařů v rámci PLS. A vývoj stále pokračuje. Mimo jiné i na základě zpětné vazby uživatelů. Portál má responzivní design a jeho zobrazení je komfortní jak na PC, telefonu nebo tabletu.

Aktuálně obsahuje dvě jazykové mutace, českou a anglickou. Systém dle lokality odkud se uživatel přihlašuje automaticky uživateli mutaci nastaví.

APP je mimo jiné i komunikační platformou. Uživateli se v na úvodní obrazovce ve formě měnícího se banneru zobrazují aktuální novinky, důležité informace

apod. V případě urgentní novinky nebo zprávy je uživatel upozorněn notifikační ikonou.

Zabezpečení a práva

Uživatel má v systému patřičná práva, která jsou v přímém vztahu k jeho IČP. V rámci jednoho IČP pak může existovat více uživatelských oprávnění. Například sestra mající přístupné pouze výsledky. Lékař pak může mít přístupné všechny moduly.

Přihlášení do systému může být dvoufaktorové (statické heslo + heslo v SMS). Toto nastavení si uživatel volí sám.

Laboratorní výsledky

Všechny laboratorní výsledky, u kterých je uživatel žadatelem, případně u jiného žadatele je uveden pro zaslání kopie, jsou v portále k dispozici do několika minut od jejich uvolnění z laboratoře. Zobrazení výsledků je nad jednotlivými událostmi, respektive časy odběru, viz. Obrázek č. 3. Ke každému výsledku má uživatel možnost zobrazit jeho historii v čase. Pro lepší orientaci je pak nápomocný graf vývoje daného parametru, viz. Obrázek č. 4. Výsledky je možné z portálu rovnou tisknout nebo uložit ve formátu pdf.

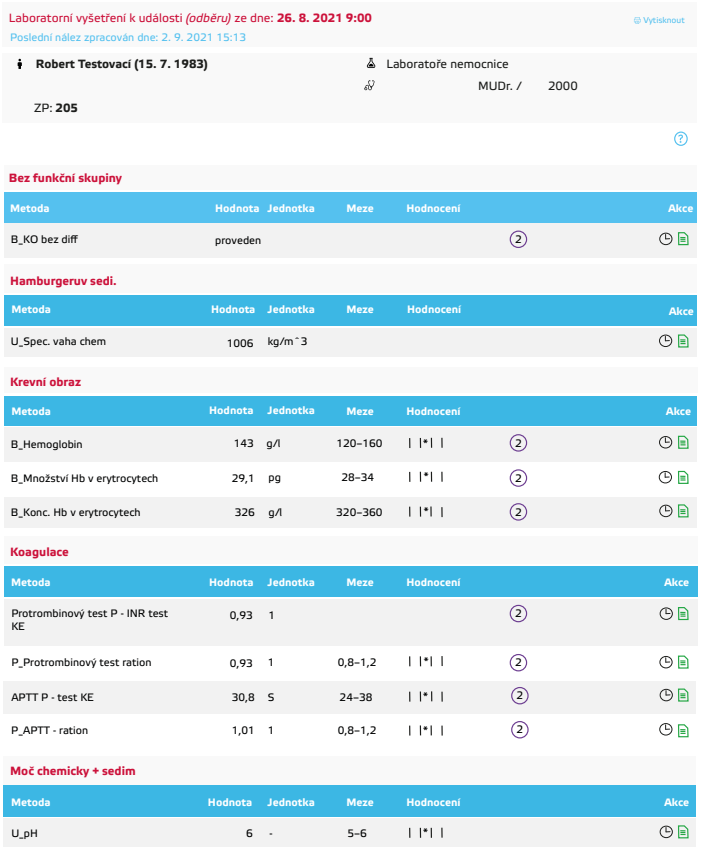
Nálezy pacienta

V modulu Nálezy pacienta jsou k dispozici vybrané typy zdravotnické dokumentace (např. nálezy z radiologických pracovišť - popisy RTG, ambulantní zprávy, propouštěcí zprávy a další), ze všech zdravotnických zařízení Skupiny AGEL, kde je uživatel uvedený jako žadatel, případně je praktickým lékařem pacienta. Uživateli se zobrazuje seznam dokumentace, který je možný třídit

Obr. 1 *AGEL PORTÁL - přihlašovací obrazovka*

Obr. 2 *AGEL PORTÁL - úvodní obrazovka*

Obr. 3 *AGEL PORTÁL - laboratorní výsledky*



Laboratorní vyšetření k události *(odběru)* ze dne: **26. 8. 2021 9:00**
Poslední nález zpracován dne: 2. 9. 2021 15:13
Vytisknout

Robert Testovací (15. 7. 1983)
ZP: **205**
Laboratoře nemocnice
MUDr. / 2000

Bez funkční skupiny

Metoda	Hodnota	Jednotka	Meze	Hodnocení	Akce
B_KO bez diff	proveden				

Hamburgeruv sedi.

Metoda	Hodnota	Jednotka	Meze	Hodnocení	Akce
U_Spec. vaha chem	1006	kg/m^3			

Krevní obraz

Metoda	Hodnota	Jednotka	Meze	Hodnocení	Akce
B_Hemoglobin	143	g/l	120–160	| |*| |	
B_Množství Hb v erytrocytech	29,1	pg	28–34	| |*| |	
B_Konc. Hb v erytrocytech	326	g/l	320–360	| |*| |	

Koagulace

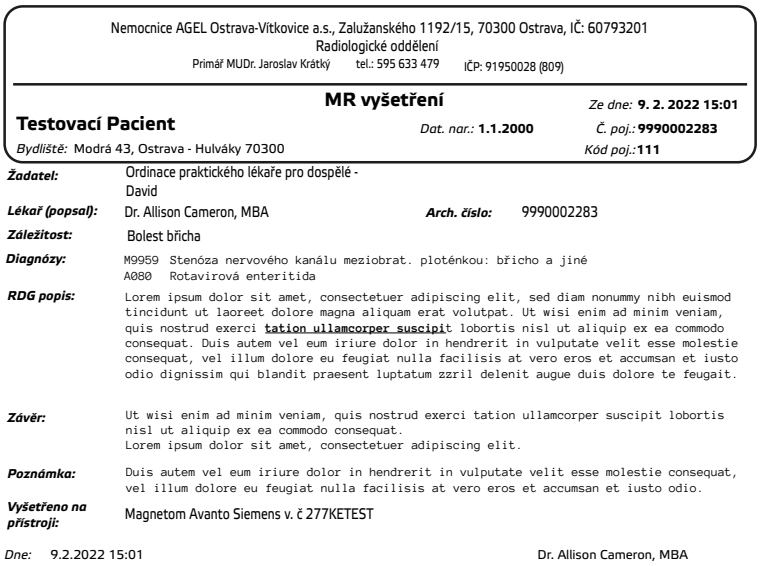
Metoda	Hodnota	Jednotka	Meze	Hodnocení	Akce
Protrombinový test P - INR test KE	0,93	1			
P_Protrombinový test ration	0,93	1	0,8–1,2	| |*| |	
APTT P - test KE	30,8	S	24–38	| |*| |	
P_APTT - ration	1,01	1	0,8–1,2	| |*| |	

Moč chemicky + sedim

Metoda	Hodnota	Jednotka	Meze	Hodnocení	Akce
U_pH	6	-	5–6	| |*| |	

Obr. 4 *AGEL PORTÁL - historie výsledku*

Obr. 5 *AGEL PORTÁL - nálezy pacienta*



Nemocnice AGEL Ostrava-Vítkovice a.s., Zalužanského 1192/15, 70300 Ostrava, IČ: 60793201
Radiologické oddělení
Primář MUDr. Jaroslav Krátký tel.: 595 633 479 IČP: 91950028 (809)

MR vyšetření *Ze dne:* **9. 2. 2022 15:01**

Testovací Pacient *Dat. nar.:* **1.1.2000** *Č. poj.:* **9990002283**

Bydliště: Modrá 43, Ostrava - Hulváky 70300 *Kód poj.:* **111**

Žadatel: Ordinace praktického lékaře pro dospělé - David

Lékař (popsal): Dr. Allison Cameron, MBA ***Arch. číslo:*** 9990002283

Záležitost: Bolest břicha

Diagnózy: M9959 Stenóza nervového kanálu meziobrat. ploténkou: břicho a jiné
A080 Rotavirová enteritida

RDG popis: Lorem ipsum dolor sit amet, consectetuer adipiscing elit, sed diam nonummy nibh euismod tincidunt ut laoreet dolore magna aliquam erat volutpat. Ut wisi enim ad minim veniam, quis nostrud exerci tation ullamcorper suscipit lobortis nisl ut aliquip ex ea commodo consequat. Duis autem vel eum iriure dolor in hendrerit in vulputate velit esse molestie consequat, vel illum dolore eu feugiat nulla facilisis at vero eros et accumsan et iusto odio dignissim qui blandit praesent luptatum zzril delenit augue duis dolore te feugait.

Závěr: Ut wisi enim ad minim veniam, quis nostrud exerci tation ullamcorper suscipit lobortis nisl ut aliquip ex ea commodo consequat.
Lorem ipsum dolor sit amet, consectetuer adipiscing elit.

Poznámka: Duis autem vel eum iriure dolor in hendrerit in vulputate velit esse molestie consequat, vel illum dolore eu feugiat nulla facilisis at vero eros et accumsan et iusto odio.

Vyšetřeno na přístroji: Magnetom Avanto Siemens v. č 277KETEST

Dne: 9.2.2022 15:01 Dr. Allison Cameron, MBA

a filtrovat. Každá jednotlivá zpráva se otevírá v formátu pdf a ve vzhledu odpovídajícímu tiskovému výstupu v daném zdravotnickém zařízení, viz. Obrázek č. 5. Zprávu je možné rovnou tisknout či uložit.

Bodová bilance

Modul bodové bilance zobrazuje přehledně v tabulce a grafu po jednotlivých plátcích počty bodů indikovaných ve zdravotnických zařízeních Skupiny AGEL. Statistika výkonnosti je průběžná vyjma laboratorního segmentu. Zde dochází k měsíčnímu účtování a kompletní data jsou tak k dispozici za minulý měsíc až po 15. dni aktuálního měsíce. viz. Obrázek č. 6.

Objednávání pacientů

Specializovaná pracoviště zdravotnických zařízení Skupiny AGEL mají ve svých diářích alokován časový prostor pro objednání pacientů uživatelů APP. Ti při rezervaci vyšetření vidí jednotlivé časové sloty, do kterých mohou rezervaci provést. Výhodou je nabídka těchto vyšetření napříč všemi zdravotnickými zařízeními Skupiny AGEL. Pacient má tak násobně větší variabilitu ve výběru vyhovujícího termínu. Jako potvrzení rezervace odchází uživateli email a SMS zpráva (na základě uděleného souhlasu pacienta). Systém pak bude automaticky odesílat připomínku termínu vyšetření pacientovi na jeho mobilní telefon.

Výsledky těchto vyšetření dostává nejen pacient při samotném vyšetření, ale i lékař. A to jak elektronicky do svého ambulantního informačního systému, tak jsou k dispozici v APP.

Další etapy vývoje

APP se bude nadále vyvíjet a mimo implementace některých požadavků od uživatelů v rámci zpětné vazby na APP budou realizovány v nejbližší době další tři moduly.

Modul **Objednání spotřebního materiálu** bude podobný logice e-shopu. Uživatel bude mít k dispozici kompletní nabídku spotřebního materiálu. Vyplní si pouze počet jednotlivých položek a objednávku odešle. Po zpracování na straně AGELLAB bude spotřební materiál doručen do ordinace tak, jak je klient zvyklý. Každá položka v nabídce bude obsahovat podrobné informace. Např. informace ke správné technice odběru apod.

Modul **Zdravotnické obrazové dokumentace** bude nabízet uživateli náhled na CT a RTG snímky u svých pacientů odeslaných do jakéhokoli zdravotnického zařízení Skupiny AGEL.

Modul **Elektronické žádanky** bude integrovatelný do ambulantních SW jako externí systém. Uživatel při požadavku na elektronickou žádanku jedním kliknutím přejde do APP, kde bude vyplněna hlavička pacienta a žadatele. Uživatel si vybere laboratorní požadavky a žádanku odešle. Mimo standardní vzhledy formulářů žádanky bude možné klientům vytvořit panely vyšetření na míru dle jejich požadavku.

Závěr

AGEL PARTNER PORTÁL je SW produkt Skupiny AGEL překračující hranice laboratorního segmentu do všech činností společností Skupiny AGEL jako celku.

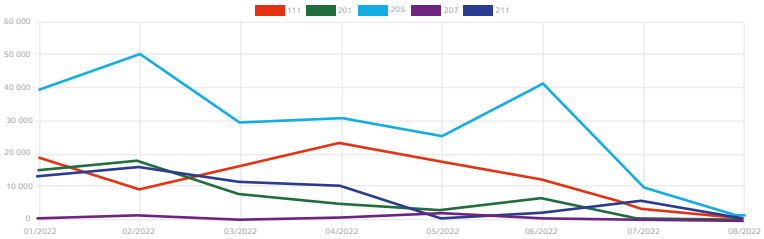
Obr. 6 *AGEL PORTÁL - bilance vyžádané péče*

Bilance vyžádané péče

Bilance vyžádané péče je rozdělena na dvě kategorie „**Komplement**“, který zahrnuje jak laboratorní pracoviště, tak pracoviště provádějící zobrazovací metody (*např. rentgenové vyšetření, magnetická rezonance, výpočetní tomografie, ultrazvukové vyšetření, PET, SPECT apod.*) a „**Ostatní**“, což je jiná klinická péče.
Měsíční zpracování dokladů ZP se v celé Skupině AGEL provádí vždy do **15. dne** následujícího měsíce. Pohled na bodovou bilnaci vyžádané péče je tedy vždy kopletní pro předcházející měsíc v **16. den** aktuálního měsíce. Bilance vyžádané péče za aktuální měsíc tedy ukazuje pouze pohled na průběžnou produkci ve všech zdravotnických zařízeních vyjma laboratoří, které se účtují souhrnně až ke konci měsíce.

Komplement

ZP / Období	01/2022	02/2022	03/2022	04/2022	05/2022	06/2022	07/2022	08/2022	Celkem
111	19176	9664	16361	23340	17295	12274	2977	0	101087
201	15072	17783	7517	5001	2426	6498	0	1061	55358
205	39729	50059	29444	30848	25278	41431	10106	187	227082
207	0	1713	0	807	2501	0	0	0	5021
211	13379	15910	11780	10142	168	2287	5461	0	59127



KONTAKTNÍ ÚDAJE:
Ing. Jindřich Maksant
AGEL a.s.
Oddělení laboratorních IT systémů
Jungmannova 28/17, 110 00 Praha 1,
Nové Město
e-mail: jindrich.maksant@agel.cz

Laboratoře skupiny AGEL a.s. instalovaly novou přístrojovou techniku

Lenka Kulíšková

Klíčová slova:
Laboratoře AGEL
laboratorní diagnostika
Roche
přístrojová technika

Key words:
AGEL laboratories
laboratory diagnostics
Roche
instrument technology

Laboratorní provozy skupiny AGEL, které jsou významnou součástí privátní sítě zdravotnických zařízení AGEL v České a Slovenské republice, provádějí vyšetření ve všech odvětvích laboratorní diagnostiky - klinická biochemie, klinická hematologie, klinická imunologie a alergologie, lékařská mikrobiologie, lékařská genetika a laboratoř patologie.

V průběhu roku 2019 se vedení společnosti AGEL rozhodlo vypsat indikativní poptávku na novou přístrojovou techniku do svých provozů. Oslovilo čtyři významné dodavatele s cílem vybrat novou instrumentaci do stěžejních laboratoří AGEL v obou republikách. Předložené indikativní nabídky byly pečlivě zhodnoceny výběrovou komisí, která v polovině roku 2020 vybrala a doporučila společnost Roche. Následoval schvalovací proces na úrovni představenstva společnosti AGEL a.s. a vítězná společnost Roche byla potvrzena a schválena.

Klíčovými parametry v rozhodování byly: plná automatizace velkých laboratorních provozů, dodávka poloautomatů do středních laboratoří, kvalitní diagnostické soupravy, spolehlivý autorizovaný servis, široká nabídka diagnostických setů, reference v obou republikách, podpora vzdělávání laboratorních pracovníků a v neposlední řadě také další možnosti spolupráce s dodavatelem v oblastech mimo indikativní nabídku.

Neustálá snaha o zvyšování kvality péče o pacienty ve zdravotnických zařízeních skupiny AGEL tak dostala zelenou v realizaci výměny přístrojové techniky v rámci předložené a schválené indikativní nabídky.

Implementace nových přístrojů probíhala v laboratořích klinické biochemie, mikrobiologie a sérologie.

Bez přerušení provozu a v těžké covidové době plné omezení jsme se po velmi pečlivé a zodpovědné přípravě pustili do jednotlivých instalací. Ve Slovenské republice v září 2020, v České republice v únoru 2021.

Diagnostické medicínské laboratoře provádějí denně statisíce biochemických, imunochemických a sérologických vyšetření v běžném nebo statimovém provozu, v nemocnicích navíc v nepřetržitém provozu.

V každé laboratoři bylo potřeba řešit náhradní umístění současných analyzátorů, provést analýzu workflow pracoviště a navrhnout na přechodnou dobu

dobrou organizaci provozu. Bylo nutno zajistit a sledovat přijatelné doby odezvy na vydání výsledků pro klinická pracoviště v době instalace. Ve spolupráci s technickým oddělením musely být s předstihem řešeny požadavky na reorganizaci laboratorních prostor pro nové přístroje, na kapacitu a umístění zdroje deionizované vody. Také se nesmělo zapomenout na kontrolu elektrických přípojek. Byl kladen velký důraz na kontinuální informovanost jak laboratorních pracovníků, tak klinických pracovišť vlastních i externích. Samotné instalace trvaly různě dlouhou dobu podle velikosti pracoviště, ale vždy měly nejméně dvě části – technickou a aplikační. Obě proběhly ze strany společnosti Roche na vysoké profesionální úrovni. Na technickou instalaci vždy ihned navazovalo napojení analyzátorů on-line do laboratorního informačního systému. Společnost Roche dodržela harmonogram instalací ze strany servisních techniků i aplikačních specialistů.

Průběh instalace v ČR

V průběhu instalací společnost Roche uskutečnila několik online školení pro naše zaměstnance. Školení obsahovala seznámení s jednotlivými typy analyzátorů, základní prvky ovládání analyzátorů, základy a způsob kalibrace diagnostických souprav, návrhy na provádění interní a externí kontroly kvality a mnoho dalších dobrých rad a návodů včetně diskuze k těmto tématům. Všechny školící materiály jsou pracovníkům i nadále k dispozici. Po ukončení jednotlivých instalacích analyzátorů od společnosti Roche musela vždy následovat časově náročná verifikace všech nových diagnostických souprav pro prováděná vyšetření. Verifikace se provádí podle doporučení odborných společností v souladu s mezinárodní normou

Obr. 1 *Přístrojová technika v laboratořích Nemocnice AGEL Prostějov, AGEL Středomoravská nemocniční*

Obr. 2 *Instalace nové přístrojové techniky v laboratoři bichemie, Laboratoře AGEL Nový Jičín*

Obr. 3 *Přístrojová technika v laboratoři biochemie, Laboratoře AGEL Nový Jičín*

pro zdravotnické laboratoře ČSN EN ISO 15189. Je potřeba porovnat nové a původní vyšetřovací postupy, odhadnout nejistoty měření a nastavit referenční intervaly. Správné provedení veri-

fikací odhalí náhodné chyby, systematické diference a proporcionální odchylky, určí specifikace nové instrumentace pro zajištění vydávání správných výsledků z laboratoře s kontinuálním výstupem na předchozí výsledky. Velkou předností na celorepublikové úrovni bylo sjednocení vyšetřování parametrů jako 1-84 intaktního parathormonu, NT-proBNP, jednotné výsledky u diagnostiky vyšetřování hormonů štítné žlázy, infekční sérologie a další.

Instalace plně automatizovaných linek pomocí cobas connection modules CCM včetně preanalytiky od společnosti Roche ve společnosti Laboratoře AGEL a.s. se sídlem v Novém Jičíně a na Oddělení laboratorní medicíny Nemocnice AGEL Prostějov jsou teprve třetí a čtvrtou v pořadí v České republice. **Zcela unikátní je na našem území on-line zapojení močového analyzátoru Cobas6500 Roche do CCM linky na Oddělení laboratorní medicíny v Prostějově.**

Zaškolení obsluhy bylo velice pečlivé, kromě běžných provozních záležitostí se důsledně zaměřovalo na provádění pravidelných údržeb.

Přes veškerá omezení v době covidové, za překonání technických, organizačních i jiných obtíží se nakonec vše podařilo realizovat podle plánu. První instalace proběhly v ČR **v únoru 2021** v Bílovecké nemocnici a.s. a na poliklinice Therapon v Kopřivnici, **v březnu** pak následoval provoz na OKBH v Nemocnici AGEL Ostrava-Vítkovice, **v dubnu** se připojily provozy v Nemocnici AGEL Říčany, v Nemocnici AGEL Třinec-Podlesí a na poliklinice v Brně-Židenicích, **v květnu** následovala Poliklinika AGEL Česká Třebová a provoz v Nemocnici AGEL Český Těšín. **V červnu** se uskutečnila výměna

Obr. 4 *Přístrojová technika v laboratořích Polikliniky AGEL Plzeň*

Obr. 5 *Přístrojová technika v laboratořích Polikliniky AGEL Praha Italská*

přístrojů v Nemocnici AGEL Nový Jičín. Během **července** byla dokončena jedna z největších instalací v centrálních provozech společnosti Laboratoře AGEL se sídlem v Novém Jičíně na poliklinice včetně instalace automatické preanalytické linky. Ještě v červenci pak také došlo k výměně analyzátorů na mikrobiologickém pracovišti ve Šternberku. **V srpnu** jsme pokračovali v Nemocnici AGEL Louny. **V září** 2021 jsme toho stihli opravdu hodně – Poliklinika AGEL Plzeň, Nemocnice AGEL Valašské Meziříčí, Nemocnice AGEL Podhorská – pracoviště Bruntál a Rýmařov. **V říjnu** se instalovala technika na imunologickém pracovišti v Novém Jičíně, v AGEL Středomoravské nemocniční – laboratoře

v Přerově a Prostějově. V prostějovské laboratoři opět včetně plně automatizované preanalytické linky. **V listopadu** se připojila Nemocnice AGEL Šternberk, mikrobiologie v Prostějově, Poliklinika AGEL Olomouc. Na konci roku 2021 proběhla výměna přístrojů v AGEL Hornické poliklinika v Ostravě a v mikrobiologickém pracovišti v rámci Nemocnice AGEL v Ostravě-Vítkovicích. V letošním roce 2022 jsme pak dokončili instalaci na Poliklinice AGEL Praha Italská.

Celkem bylo nainstalováno a zprovozněno 79 modulů ve 26 provozech.

Společnost AGEL a.s. bude vždy podporovat ty projekty, které posouvají kvalitu, efektivitu a spolehlivost laboratorních vyšetření a které vedou ke zlepšování pracovních podmínek našich laboratorních pracovníků.

Všem zúčastněným patří velké poděkování za přípravu a realizaci tak mimořádné akce, jakou byla výměna přístrojové techniky v laboratorních provozech společnosti AGEL a.s.

KONTAKTNÍ ÚDAJE:
RNDr. Lenka Kulíšková, MBA
Laboratoře AGEL a.s.
Garant provozu klinických laboratoří
Revoluční 2214/35, 741 01 Nový Jičín
e-mail: lenka.kuliskova@lab.agel.cz

Nová odběrová místa AGELLAB v síti společnosti AGEL a. s.

Lenka Kulíšková

Klíčová slova:
AGELLAB
AGEL
odběrová místa
odběry krve

Key words:
AGELLAB
AGEL
blood collection points
blood collection

Laboratornímu segmentu společnosti AGEL a.s. se v tomto roce podařilo otevřít 4 nová odběrová místa, která tak více pokrývají nabídku služeb klientům a zvyšují dostupnost laboratorní péče pro praktické lékaře a ambulantní specialisty.

od 1. 1. – Jeseník

Jesenická poliklinika, Dukelská ulice 456

Obr. 1 *Jesenická poliklinika*

od 1. 6. – Havířov

Léčebné centrum, Kochova 1227

Obr. 2 *Léčebné centrum Havířov*

od 15. 8. – Štětí

Lékařský dům Štětí, Obchodní 686

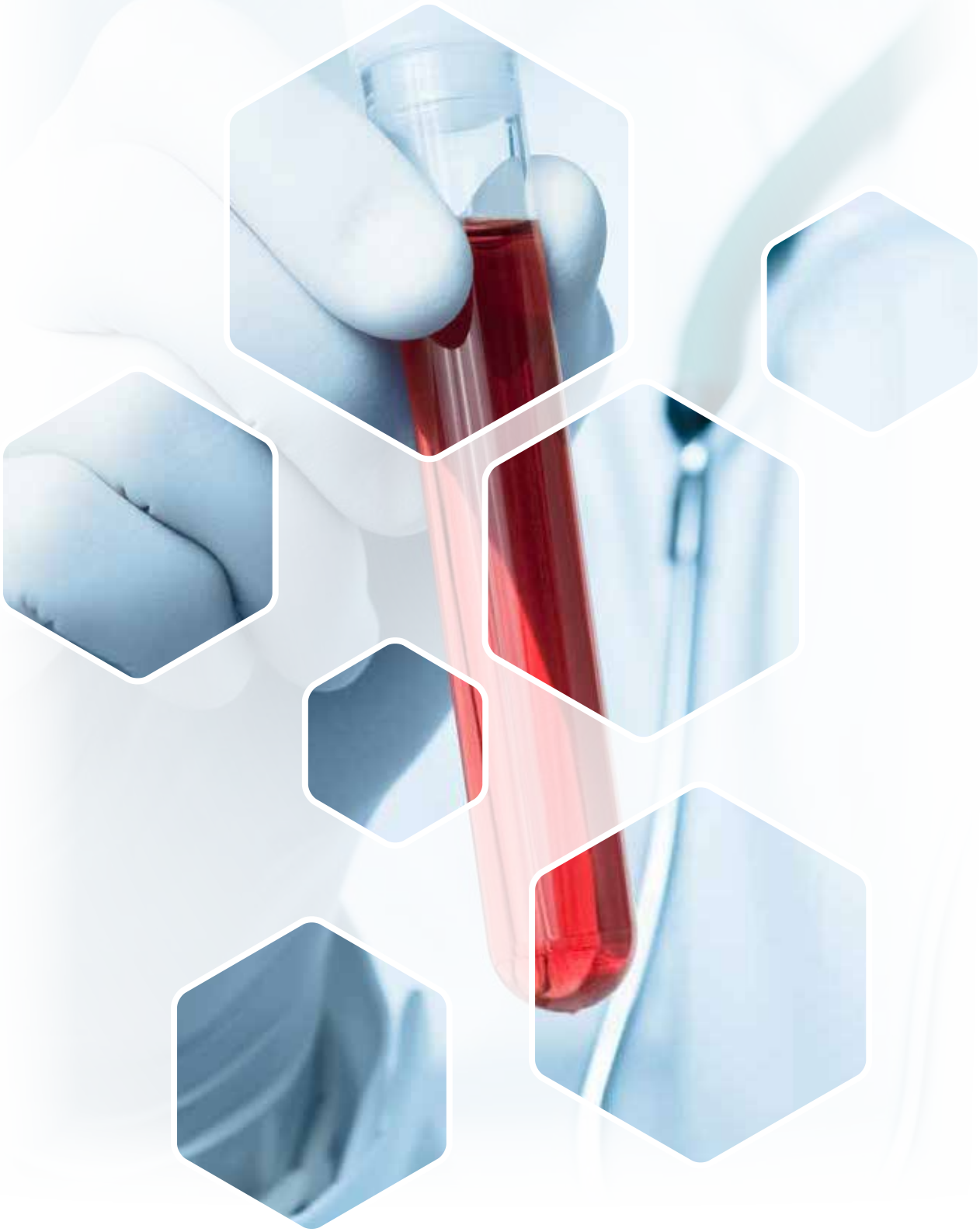
Obr. 3 *Lékařský dům Štětí*

od 5. 9. - Ostrava-Výškovice

Terapeut, Lumírova 639/2

Obr. 4 *Poliklinika Výškovice Terapeut*

PRAVIDELNÁ RUBRIKA NA ODBĚRU ZÁLEŽÍ



Uzavřený odběrový systém – současné možnosti a klinický význam

Zdeňka Vahalová

Klíčová slova:
klinické vzorky
transport
čas odezvy
potrubní pošta

Key words:
clinical samples
transport
response time
tube mail system

V minulých číslech v rubrice „ Na odběru záleží“ jsme se seznámili s úskalími, která mohou provázet kvalitní odběr krve.

Do preanalytické fáze odběru patří před samotnou analytickou částí vyhodnocení odebraného vzorku krve i transport vzorku do laboratoře.

Jak transportovat vzorek?

- Při plánování času odběru biologického materiálu je nutné počítat s rezervou pro dopravu a příjem vzorku v laboratoři.
- Biologický materiál je nutno po odběru transportovat tak, aby nedošlo k jeho znehodnocení fyzikálními vlivy a k ohrožení fyzických osob. Vždy je nutné při manipulaci považovat vzorek za potenciálně infekční! Teplota se během transportu musí pohybovat v rozmezí 15—25ºC, není–li pro dané vyšetření vyžadován transport za jiných specifických podmínek.
  Vzorky musí být dopraveny do laboratoře co nejdříve, nejpozději do 2 hodin, pokud není uvedeno jinak u vybraných analytů.
- Při odběru srážlivé krve je vhodné, aby se krev srazila v místě odběru (cca 20 minut při pokojové teplotě), čímž se zabrání možné hemolýze vzorku při okamžitém transportu po odběru. Vzorky srážlivé krve je nutné vložit do stojánku ve svislé poloze.
- Při odběru krve je nutné odběrové zkumavky důkladně promíchat otáčením, ale netřepat!
- Odběrové zkumavky s biologickým materiálem musí být dobře uzavřené a musí být transportovány ve svislé poloze ve stojánku. Stojánek se vzorky se musí vložit do dekontaminovatelného přepravního boxu tak, aby během přepravy vzorku do laboratoře nemohlo dojít k rozbití, rozlití nebo jinému znehodnocení vzorku.
- Součástí přepravních boxů by měly být teploměry pro monitorování transportní teploty.
- Pro transport jednotlivých vzorků lze použít jiné transportní obalové materiály na transport biologický, který má dvě části: uzavíratelná část pro vložení odběrových zkumavek nebo nádobek, oddělená část pro vložení žádanek.
- Žádanky musí být přepravované odděleně od biologického materiálu, aby nedošlo k jejich kontaminaci.
- Do laboratoře nesmí být odeslán vzorek bez žádanky. Žádanka může mít formu elektronické žádanky nebo předtištěného formuláře.
- Biologický materiál zřetelně označený STATIM je třeba dodat do labo-

ratoře co nejdříve po odběru odděleně od rutinních vzorků.

Známe několik možností, jak doručení zkumavek s biologickým materiálem dopravit do laboratoře.

V lůžkových zdravotnických zařízeních a ambulantním sektoru jsou postupy odlišné.

Způsoby doručení vzorků:

Pravidelný svoz

Svoz v rámci nemocničních provozů je realizován většinou v určitých časových obdobích podle svozového plánu.

Pneumatická potrubní pošta

Pokud je vybudována potrubní pošta, tak poskytuje možnost zasílání vzorků s nepřetržitým provozem. V případě výpadku je nutné zajistit odvoz biologického materiálu standardním způsobem. V místě potrubní pošty jsou umístěny tzv. odesílací stanice s jasnou předvolbou místa doručení (laboratoře). Vzorky materiálu musí být vloženy před odesláním do transportní přepravní patrony, podle pokynů pro manipulaci a zásad používání potrubní pošty.

Vzorky je nutno vkládat do patrony odděleně od žádanek.

Odběrové zkumavky do přepravní patrony by měly být zabaleny do přepravních sáčků a musí být vhodným způsobem zafixovány, tak aby bylo zamezeno jejich pohybu (prevence tvorby bublin, apod.).

Všechny odběrové nádobky musí být řádně uzavřeny.

Obr. 1 *Odběrové zkumavky v přepravní patroně*

Donáška kompetentním pracovníkem — sanitář

Biologický materiál doručený do laboratoře musí být řádně označený a doplněný žádankou. Za dodržení podmínek transportu zodpovídá klinické pracoviště.

Donáška pacientem

Lze přijmout řádně označený materiál se žádankou v transportním obalu na infekční materiál, dopravený do laboratoře. Za dodržení podmínek transportu zodpovídá klinické pracoviště.

S vývojem nových technologií přichází na trh nový unikátní transportní systém pro malé klinické vzorky.

- Vzorky jsou zasílány v běžných zkumavkách bez vkládání do přepravních patron a balení do ochranného obalu. Na příjem v laboratoři přichází zkumavky přímo z místa odběru – to znamená, že osoba odebírající vzorek krve je jedinou osobou, která se ho dotýká, dokud není analyzován v laboratoři.
- Po odebrání vzorku je zkumavka vložena do systému Tempus600® a do laboratoře dorazí jen několik sekund poté.

- Ovládání jedním dotykem šetří rozhodující čas.
- Eliminace rizika nozokomiálních nákaz = snížení rizika při „předávání“ vzorků mezi osobami.
- Žádná chybná dodání zkumavek se vzorky.
- Žádné ztracené zkumavky.
- Už nebudete muset čekat, až se systém uvolní, protože se jedná o vyhrazenou linku, která vede z bodu A (oddělení) do bodu B (laboratoř).
- Výrazné snížení času odezvy, tzn. zkrátí se čas od odběru na oddělení až po výsledek u lékaře.
- V současné době se tento čas pohybuje kolem 120–240 minut. Je ověřeno klinickou praxí, že při použití transportu zkumavek technologií Tempus600® se čas odezvy zkrátí na dobu kolem 60 minut.
- Pokud není centrální laboratoř, lze vyřešit rozdělení zkumavek do laboratoří pomocí přístroje Tempus600® Necto. Jde o automatizované řešení pro vysoce výkonný příjem vzorků, přístup a přepravu na dlouhé vzdálenosti.
- Vzorky jsou tříděny pomocí čárových kódů, typu zkumavky nebo jako kombinace.
- Identifikace barvy uzávěru a geometrie zkumavky pomocí kamery.
- Necto zjednodušuje celý proces registrace a třídění a umožňuje distribuci vzorků až do čtyř různých laboratoří, obsahuje dva místní sběrné koše.
- Odesílací modul Tempus600® lze připojit přímo k laboratorním automatizačním systémům.
- K systému Necto lze dokoupit jeden, dva nebo tři extra odesílací moduly. Kapacita velkoobjemového oddílu je přibližně 600 zkumavek.

Obr. 2 *Odesílání vzorků*

Obr. 3 *Manuální příjem vzorků v laboratoři*

Obr. 4 *Přístroj Tempus600® Necto*

- Díky velikosti vedení linek Tempus600® pro transport malých klinických vzorků se snadno umístí do stávajících rozvodů TZB budov nebo nemocnic.
- Instalace bez přerušení každodenního provozu.
- Minimální náklady a požadavky na stavební připravenost.
- Doba instalace v řádu 2—3 týdnů.

KONTAKTNÍ ÚDAJE:
Zdeňka Vahalová
SARSTEDT, spol. s r.o.
Pod Pekárnami 338/1, 190 00 Praha
e-mail: zdenka.vahalova@sarstedt.com

Obr. 5 *Vedení linek Tempus600®*

PATOLOGIE

Detekce nádorového ložiska prsu značeného radioaktivním zrnem na pracovišti patologie

Lenka Maňáková, Romana Andělová

V medicíně se neustále snažíme o aplikaci nových poznatků a technologií s využitím tzv. mikroinvazivních technik, které přispívají ke zkvalitňování diagnostiky a léčby nádorových lézí s minimálním zatížením pro pacienta. Zejména v oblasti karcinomů prsu dochází k obrovským pokrokům, které znamenají pro pacientky i pacienty zlepšení kvality jejich života. V nedávné době AGEL Diagnostické centrum zavedlo do praxe značení nádorových lézí prsu radioaktivním zrnem pod kontrolou ultrazvukem. Velmi malé i nehmatné léze označené radioaktivním zrnem jsou snadno detekovatelné pomocí gamma sondy, což umožní jejich šetrné odstranění, při kterém je odebrána s danou lézí co nejmenší porce okolní nenádorové prsní tkáně. Odstraněná nádorová léze se zavedeným radioaktivním zrnem je poté odeslána na patologii a kompletně zpracována s vyjmutím zrna a jeho likvidací dle platných doporučených postupů.

Detection of breast tumor lesions with a radioactive seed in the pathology department

In medicine, we are always trying to implement new knowledge and technologies using so-called microinvasive techniques, which contribute to improving the quality of diagnosis and treatment of tumor lesions with minimal burden on the patient. Especially in the area of breast cancer, huge advances are being made, which mean an improvement in the quality of life for patients. Recently, the AGEL Diagnostic Center has put into practice the marking of breast tumor lesions with a radioactive seed under ultrasound control. Very small and non-palpable lesions marked with a radioactive seed are easily detected using a gamma camera and will allow for their gentle removal, during which the smallest possible portion of surrounding non-cancerous breast tissue is removed with the given lesion. The lesion thus removed with the radioactive seed inserted is then sent to pathology department and completely processed with the removal of the seed and its disposal according to valid recommended procedures.

Klíčová slova:
radioaktivní zrno
karcinomy prsu
gamma sonda
mikroinvazivní metody
značení nádorové léze
peroperační biopsie

Key words:
radioactive seed
breast cancer
gamma camera
microinvasive technique
tumor marking
peroperative biopsy

Úvod

K nejnovějším pokrokům přispívajícím ke zkvalitňování diagnostiky a léčby nádorových lézí s minimálním zatížením pro pacienta patří i tzv. mikroinvazivní techniky. Mikroinvazivní zákrok umožňuje jeho provedení ambulantně, bez nutnosti hospitalizace pacienta, současně s minimem komplikací. Velkou novinkou, kterou se v loňském roce podařilo AGEL Diagnostickému centru zavést do rutinní praxe, se stalo značení nádorové tkáně prsu radioaktivním zrnem. Jedná se o minimálně invazivní zákrok, jehož pomocí dochází ke zjednodušení následujících léčebných kroků a zkrácení doby rekonvalescence pacienta vedoucí ke zkvalitnění jeho života.

Značení nádorového ložiska

Značení nádorové tkáně před operačním výkonem se běžně používá již řadu let. Hlavním důvodem označení nádorové tkáně je lokalizace i velmi malého či nehmatného nádorového ložiska a jistota odstranění celého nádorového ložiska s minimem porce okolní zdravé nenádorové tkáně prsu bez pozitivních resekčních okrajů. V případě předchozí neoadjuvantní léčby se tkáň prsu může zjizvit či nádorová léze přestane být hmatnou. I v těchto případech chirurg lézi snadno identifikuje a odstraní s minimálním lemem zdravé tkáně. Aplikovaná značka, ať už předmět či látka, musí být snadno detekovatelná např. pomocí ultrazvuku nebo gamma sondy. Běžně se užívají drátěné vodiče, kovové chirurgické klipy, methylenová modř, Technecium 99m či jiné radioaktivní substance. Každá technika má své výhody a nevýhody. Cílem je snadná aplikace, dobrá manipulace, nízká cena a pro možnost kompletního zpracování resekátu prsu patologem i snadné vyjmutí. Další důležitou podmínkou je, aby před operačním výkonem nedošlo k posunu značky mimo místo vložení.

Značení nádorového ložiska radioaktivním zrnem

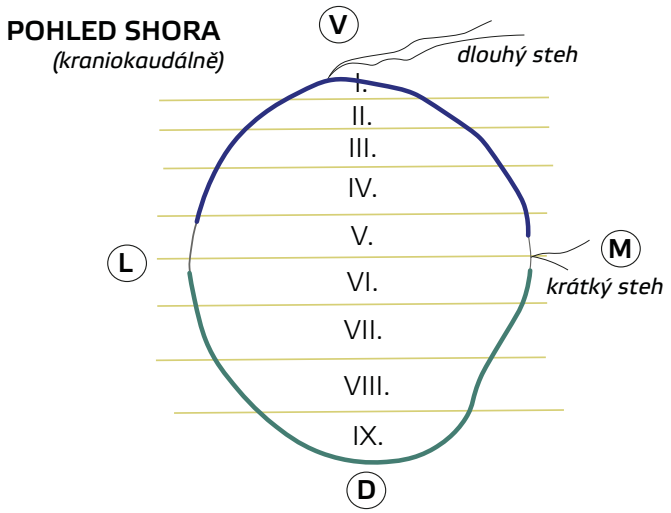
Mikroinvazivní technika lokalizující nádorové ložisko prsu, která byla zavedena v loňském roce do rutinní praxe v AGEL Diagnostickém centru, využívá radioaktivní jódové zrno. Společnost IsoAid dodává lokalizační jehly obsahující nízkoaktivní jodové zrno (zdroj ADVANTAGE™ I-125). Jedná se o laserově svářenou titanovou kapsli velikosti 4,5×0,8 mm, obsahující připojený jód 125, konkrétně jodid stříbrný, vydávající ionizující záření o energii 27,0–35,5 keV (průměrně 28,5 KeV). Jde o uzavřený radionuklidový zdroj o aktivitě 9,5 MBq, který je bezpečný pro pacienta i jeho okolí. Po aplikaci zrna do nádorového ložiska prsu je možné zrno detekovat několika způsoby, ultrazvukem, rentgenem, fluoroskopií (skiaskopií), počítačovou tomografií či gamma sondou (1).

Gamma sonda

Velmi malé či nehmatné nádorové ložisko je označeno intervenčním radiologem za pomocí lokalizační jehly radioaktivním zrnem pod kontrolou ultrazvukem. Takto označené nádorové ložisko je snadno detekovatelné na operačním sále chirurgem gamma sondou. Jedná se o scintilační sondu, která detekuje široké spektrum radioaktivních látek. Gamma sonda je velmi citlivá, i takto drobný zářič detekuje s velkou přesností. Po lokalizaci radioaktivního zrna v ložisku provede chirurg cílené odstranění s minimálním

Obr. 1 *Přikrajovací schéma resekátu prsu*

VYŠETŘENÍ NAZMRZLO MAMMA



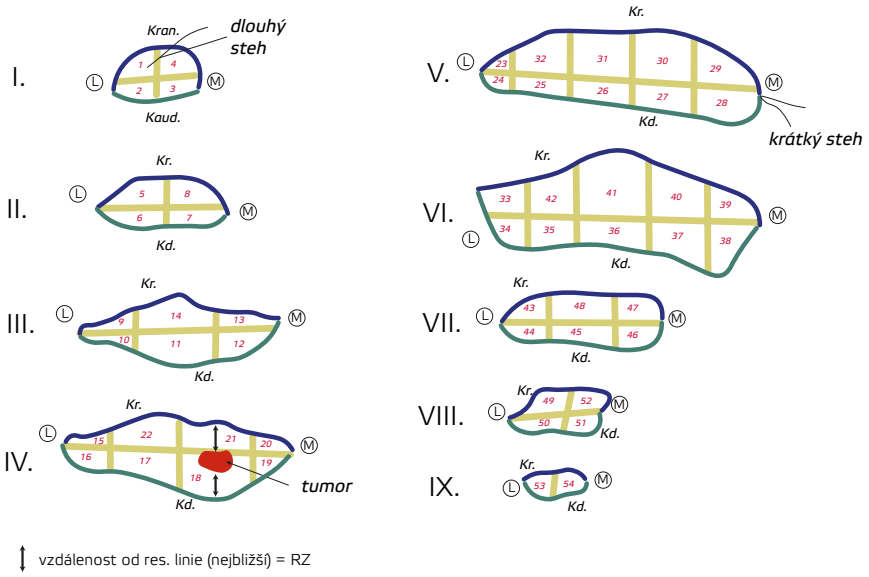
1. ZORIENTOVAT

- dle strany (L.DX., L.SIN.)
- dle stehů (V, Med.)

ventrálně: **modrá tuš**
dorzálně: **zelená tuš**

2. prokrájet ventro - dorzálně (při pohledu shora - kran.)

3. schéma řezů + orientace - zakreslit přikrojení do bloků



lemem okolní nenádorové tkáně prsu. Vzniklo mnoho studií se zaměřením na značení nádorového ložiska radioaktivním zrnem, značná část porovnávající radioaktivní zrno s jinými lokalizačními technikami (2–8).

Zpracování nádorové tkáně značené radioaktivním zrnem (^{125}I) na pracovišti patologie

Po odstranění nádorového ložiska chirurgem je odeslán resekát prsu na pracoviště patologie. K transportu slouží běžně používané nádoby. Na naše pracoviště přijímáme a ihned zpracováváme nativně dodané (nefixované) resekáty prsu, které zpracováváme dle protokolu. Postup je identický jako v případě zpracování peroperačních biopsií.

Po označení nádob a zaznamenání příjmu materiálu do laboratorního informačního systému patolog okamžitě pracuje s nativní tkání prsu. Na přikrajovně zorientuje stranově resekát prsu s pomocí označení resekátu chirurgem (ventrální strana resekátu je označená dlouhým stehem, mediální strana resekátu je označena krátkým stehem). Kraniální a kaudální plochu resekátu patolog označí dvěma různými barvami tuší. Následně dle schématu resekát patolog přikrojí na jednotlivé lamely (obr. č. 1).

Patolog je odkázán převážně na makroskopicky zřetelné ložisko, které změří a určí vzdálenost ložiska od resekčních okrajů. V případě rozpaků, nejčastěji z důvodu plošných fibrocystických změn ve tkáni prsu či jizvení po předchozí neoadjuvanci, nebo z důvodu podezření, že nádorové ložisko dosahuje do resekčního okraje, patolog suspektní ložisko přikrojí a laborantka vyhotoví preparát ze zmraženého řezu.

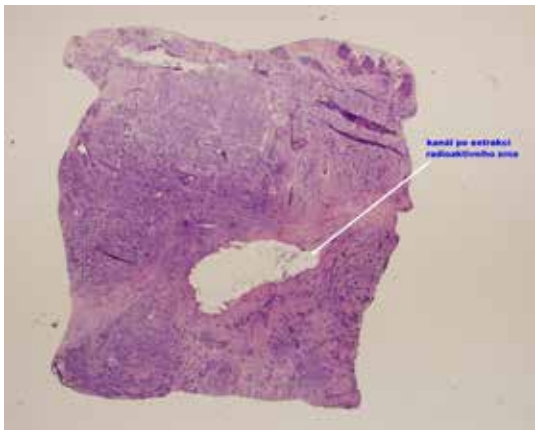
Při označení nádorového ložiska radioaktivním zrnem je orientace v resekátu prsu jednodušší i pro patologa, který pomocí totožné gamma sondy, jako se užívá na operačním sále, snadno lokalizuje v daném řezu nádorové ložisko (obr. č. 2). Po identifikaci radioaktivního zrna (zvukový i vizuální signál gamma sondy) má patolog ozřejmeno nádorové ložisko, které změří a určí jeho vzdálenost od resekčních okrajů, tu ověří peroperační biopsií. Po nahlášení kompletnosti či nekompletnosti resekce nádorového ložiska chirurgovi na operační sál patolog pomocí pinzety radioaktivní zrno vyjme z daného řezu a umístí jej do plastové nádobky, která je naplněna roztokem pro fixaci. Poté je plastová nádobka umístěna do stíněného olověného kontejneru. Patolog dále pokračuje v kompletním zpracování resekátu do kazetek a materiál je posléze zpracováván laboratoří dle standardů s vyhotovením histologických preparátů. Ve vyhotoveném preparátu můžeme v konkrétním řezu za-

Obr. 2 *Gamma sonda používaná na pracovišti patologie*

stihnout kanál po extrakci radioaktivního zrna (obr. č. 3).

Následující úkony jsou spojeny s likvidací zrna. Stíněný olověný kontejner je pracovníkem patologie odnesen na oddělení nukleární medicíny, kde je zajištěna jeho likvidace, resp. ve stíněných nádobách dojde k jeho vyzáření. Nakládání a používání radioaktivního zrna je přísně regulováno, dokumentováno a řídí se předpisy radiační ochrany.

Obr. 3 *Kanál po extrakci radioaktivního zrna v histologickém řezu*



Závěr

Aplikace nejnovějších poznatků s využitím mikroinvazivní techniky lokalizace nádorového ložiska prsu radioaktivním zrnem pomáhá zjednodušit následné léčebné a diagnostické kroky. Nenádorová tkáň prsu v okolí nádorového ložiska je maximálně zachována, což má pro pacienta neméně důležitý význam z hlediska estetického. Označená nádorová tkáň je pro hodnocení patologem gamma sondou snadno identifikovatelná a reportování vzdálenosti nádorového ložiska od resekčních okrajů je rychlejší a přesnější.

KONTAKTNÍ ÚDAJE:
MUDr. Lenka Maňáková
Laboratoře AGEL a.s.
Laboratoř patologie Nový Jičín
K Nemocnici 775/76
Nový Jičín 741 01
e-mail: lenka.manakova@lab.agel.cz

Literatura

1. ISOAID Lokalizační jehla radioaktivního zrna: Návod k použití a pravidla bezpečného zacházení při používání drobného zdroje schváleného typu. USA, 2016.

2. Gray RJ, Salud C, Nguyen K, Dauway E, Friedland J, Berman C, Peltz E, Whitehead G, Cox CE. Randomized prospective evaluation of a novel technique for biopsy or lumpectomy of nonpalpable breast lesions: radioactive seed versus wire localization. Ann Surg Oncol. 2001 Oct;8(9):711-5.

3. Gray RJ, Pockaj BA, Karstaedt PJ, Roarke MC. Radioactive seed localization of nonpalpable breast lesions is better than wire localization. Am J Surg. 2004 Oct;188(4):377-80.

4. Hughes JH, Mason MC, Gray RJ, McLaughlin SA, Degnim AC, Fulmer JT, Pockaj BA, Karstaedt PJ, Roarke MC. A multi-site validation trial of radioactive seed localization as an alternative to wire localization. Breast J. 2008 Mar-Apr;14(2):153-7.

5. Lovrics PJ, Goldsmith CH, Hodgson N, McCready D, Gohla G, Boylan C, Cornacchi S, Reedijk M. A multicentered, randomized, controlled trial comparing radioguided seed localization to standard wire localization for nonpalpable, invasive and in situ breast carcinomas. Ann Surg Oncol. 2011

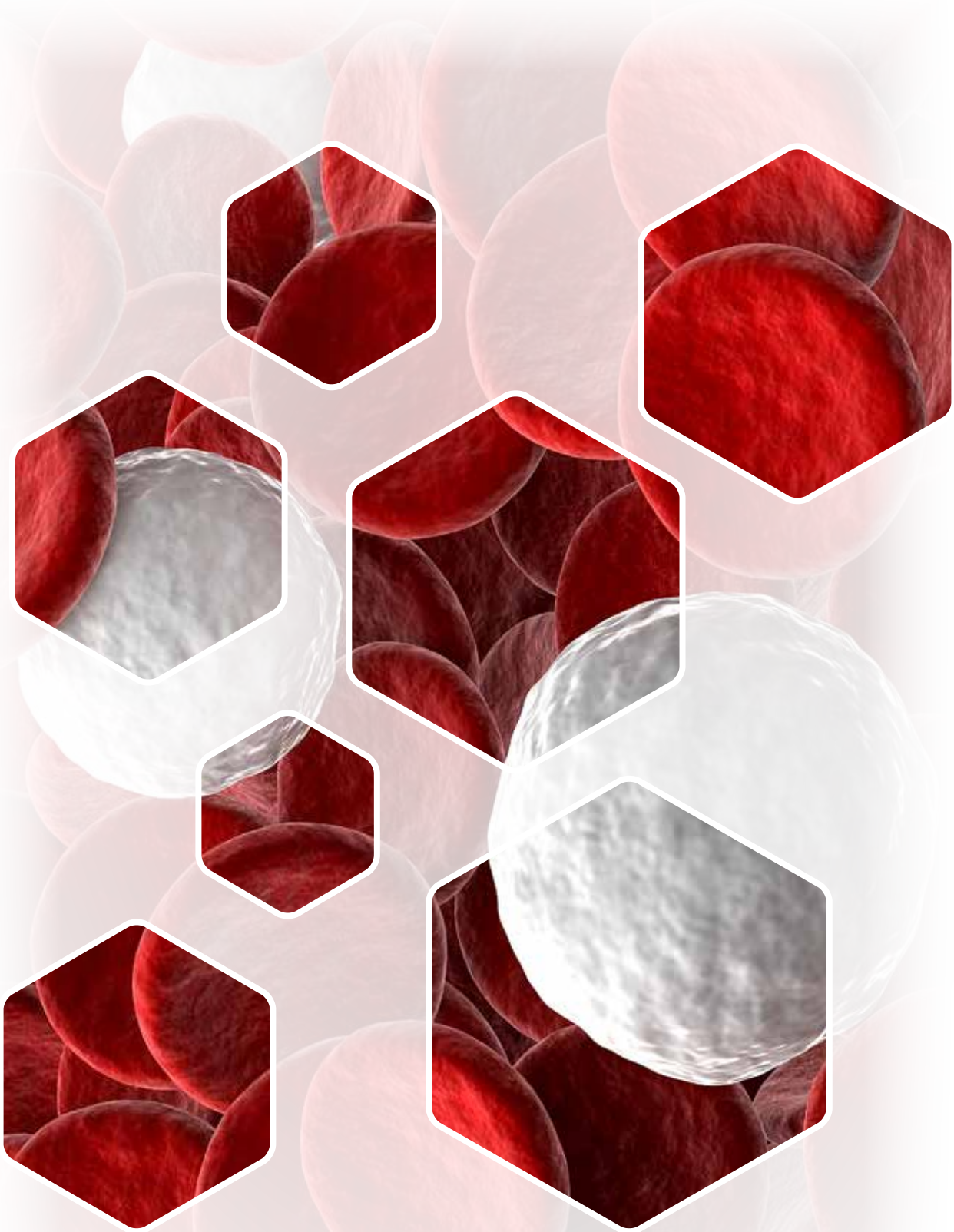
Nov;18(12):3407-14.

6. Milligan R, Pieri A, Critchley A, Peace R, Lennard T, O'Donoghue JM, Howitt R, Nicholson S, Cain H, Petrides G, Sibal N. Radioactive seed localization compared with wire-guided localization of non--palpable breast carcinoma in breast conservation surgery- the first experience in the United Kingdom. Br J Radiol. 2018 Jan;91(1081):20170268.

7. Kiruparan N, Kiruparan P, Debnath D. Use of wire-guided and radio-guided occult lesion localization for non-palpable breast lesions: A systematic literature review and meta-analysis of current evidence. Asian J Surg. 2022 Jan;45(1):79-88.

8. van der Noordaa ME, Pengel KE, Groen E, van Werkhoven E, Rutgers EJ, Loo CE, Vogel W, Vrancken Peeters MJ. The use of radioactive iodine-125 seed localization in patients with non-palpable breast cancer: a comparison with the radioguided occult lesion localization with 99m technetium. Eur J Surg Oncol. 2015 Apr;41(4):553-8.

HEMATOLOGIE



Diferenciální diagnostika anémií dle parametru MCV

Martin Brejcha, Michaela Paulasová

Anémie je charakterizována poklesem hladiny hemoglobinu pod fyziologickou mez (120 g/l u žen a 135 g/l u mužů). Anémie je vždy projevem nějakého jiného onemocnění a objasnění příčiny jejího vzniku je nezbytné ke stanovení správného léčebného postupu. Pro základní diagnostickou rozvahu je důležité zhodnocení objemu erytrocytů (MCV). Podle něj dělíme anémie na mikrocytární, normocytární a makrocytární. Změny objemu erytrocytů jsou typické pro jednotlivé druhy anémií a zhodnocení parametru MCV nám umožňuje cílené zaměření dalšího vyšetřovacího postupu.

Differential diagnosis of anemia according to the MCV parameter

Anemia is characterized by a decrease in hemoglobin level below the physiological limit (120 g/l in women and 135 g/l in men). Anemia is always a manifestation of some other disease, and finding out of the cause of its occurrence is necessary to determine the correct therapeutic approach. Evaluation of the erythrocyte cell volume (MCV) is important for the basic diagnostic balance. According to it, we divide anemia into microcytic, normocytic and macrocytic. Changes in erythrocyte volume are typical for individual type of anaemia and the assessment of the MCV parameter allows us to target further examination methods.

Klíčová slova:
anémie
objem erytrocytů

Key words:
anemia
erythrocyte volume

Úvod

Anémie může být způsobená krevními ztrátami, nedostatečnou tvorbou erytrocytů nebo jejich zkráceným přežíváním. V některých případech se můžou příčiny i navzájem kombinovat. Velmi důležitým parametrem pro diferenciální diagnostiku a naplánování dalšího vyšetřovacího postupu je zhodnocení MCV.

MCV je vypočítaný parametr, který se udává ve femtolitrech. Jedná se o hodnotu, kterou získáme vydělením hematokritu počtem erytrocytů (MCV=Hc/RBC), přičemž výsledek je automatickým výstupem při vyšetření krevního obrazu v analyzátoru. Podle hodnoty MCV dělíme anémie na mikrocytární, normocytární a makrocytární.

Mikrocytární anémie (MCV < 80 fl) je typická pro anémii z nedostatku železa, pro anémii chronických chorob a pro thalasémii. Makrocytární anémie (MCV > 95 fl) bývá projevem nedostatku vita-

minu B12 nebo folátu, dále se objevuje u abusu alkoholu, užívání některých léků (např. hydroxyurea, methotrexat, 6-mercaptopurin), hemolýzy, jaterních chorobách, hypothyreóze a myelodysplastickém syndromu. U normocytární anémie (MCV 80-95 fl) se příčiny většinou kombinují, popř. ji prokazujeme u anémie chronických chorob nebo po akutní krevní ztrátě.

Vyšetřovací postup při anémii

Prvním krokem je zhodnocení všech parametrů krevního obrazu, zároveň se standardně provádí základní biochemické vyšetření (urea, kreatinin, kyselina močová, bilirubin, ALT, AST, celková bílkovina, albumin). Následně doplňujeme další laboratorní testy, mezi které patří vyšetření zásob železa, hladina vitamínu B12, folátu, testy zaměřené na hemolýzu (LDH, bilirubin, haptoglobin, Coombsův test), elektroforeza bílkovin, hormony štítné žlázy. Zhodnocení parametru MCV nám umožňuje v některých případech provádět pouze cílená laboratorní vyšetření. Pokud prokážeme výraznou mikrocytózu, tak kromě základních biochemických vyšetření se stačí zaměřit pouze na vyšetření zásob železa v organismu. Naopak výrazná makrocytóza je typická pro deficit vitaminu B12. U pacientů s normocytární anémií, nebo u těch kde mikrocytóza nebo makrocytóza nejsou výrazné, provádíme zpravidla rovnou celý panel vyšetření.

Další diagnostický postup se odvíjí od výsledku laboratorních testů. U pacientů s průkazem sideropenie pátráme po zdroji chronických krevních ztrát, indikujeme gastroenterologické, gynekologické nebo urologické vyšetření. Vyšetření příčiny sideropenie musí být vždy důsledné, neboť jednou z jejích

Tab. 1 *Diferenciální diagnostika anemií dle velikosti erytocytů*

	Příčina anémie
Mikrocytóza **MCV < 80 fl**	sideropenická anémie anémie chronických chorob thalasémie
Normocytóza **MCV 80-95 fl**	kombinovaná příčina anémie chronických chorob akutní krevní ztráta
Makrocytóza **MCV > 95 fl**	anémie z nedostatku vitaminu B12 anémie z nedostatku kyseliny listové abusus alkoholu užívání některých léků (např. hydroxyurea, methotrexat, 6-mercaptopurin) hemolýza jaterní choroby hypothyreóza myelodysplastický syndrom

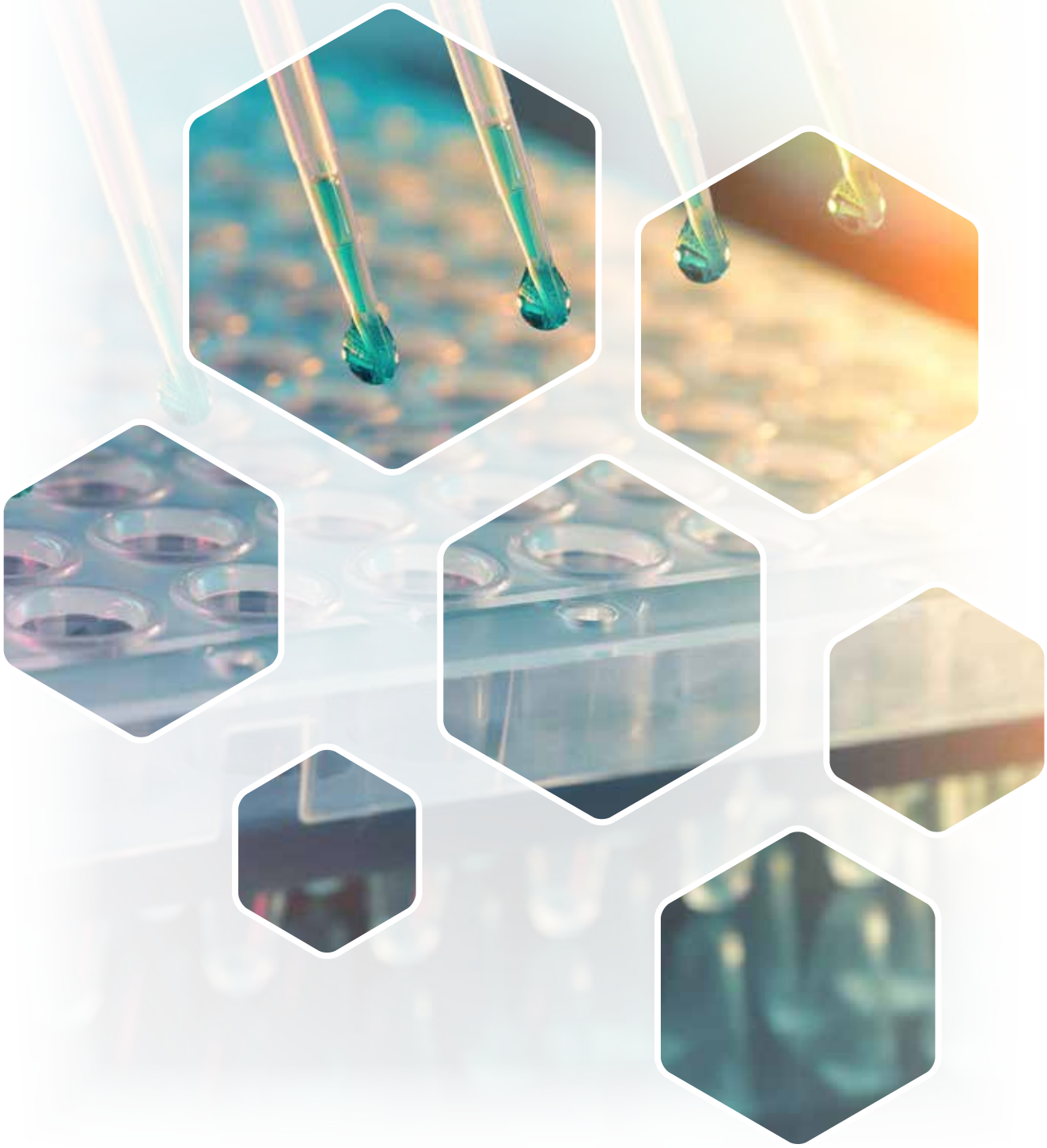
příčin mohou být nádorová onemocnění gastrointestinálního nebo urogenitálního traktu. Při průkazu deficitu vitaminu B12 je prováděna gastroskopie. Tito pacienti mají typicky atrofii žaludeční sliznice se sníženou produkcí kyseliny chlorovodíkové. U těchto jedinců je zvýšené riziko vývoje rakoviny žaludku, proto se gastroskopie provádí opakovaně přibližně jednou ročně. U pacientů s hemolytickou anémií je nutné vyloučit nádorové nebo revmatické onemocnění. Vyšetření kostní dřeně (aspirace, popř. trepanobiopsie) se provádí u především u pacientů s nevysvětlitelnou anémií, pancytopenií, leukoerytroblastovou reakcí, monoklonální gamapatií a anémií s velmi nízkým počtem retikulocytů.

KONTAKTNÍ ÚDAJE:
Prim. MUDr. Martin Brejcha, Ph.D.
Nemocnice AGEL Nový Jičín a.s.
Oddělení klinické klinické hematologie
a transfuzní oddělení
Purkyňova 2138/16, 741 01 Nový Jičín
e-mail: martin.brejcha@nnj.agel.cz

Literatura

1. Greer, John P.. Wintrobe's Clinical Hematology. Thirteenth edition. Philadelphia: Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins Health, 2014.

KLINICKÁ ALERGOLOGIE A IMUNOLOGIE



Tuberkulóza u imunokompromitovaného pacienta – kazuistika

Andrea Ondrejková, Gustáv Ondrejka

Počet onemocnění tuberkulózou vykazuje v České republice dlouhodobě klesající trend. Naproti tomu v současnosti zaznamenáváme významný nárůst tzv. nemocí „moderního věku" – alergií, nádorových a autoimunitních onemocnění. S tím jde ruku v ruce i vývoj nových léků, z nichž některé reprezentují cílenou biologickou léčbu, která je založena na modulaci složek imunitního systému. V práci prezentujeme případ mladého pacienta s revmatoidní artritidou, který v důsledku imunosupresivní terapie onemocněl tuberkulózou.

Tuberculosis of an immunocompromised patient – a case report

The number of tuberculosis cases in the Czech Republic shows a long-term decreasing trend. On the other hand, we are currently experiencing a significant increase in the so-called „modern age" diseases – allergies, cancer and autoimmune diseases. Subsequently, new drugs are being developed, some of which represent targeted biological treatments based on the modulation of immune system components. We present a case of a young patient with rheumatoid arthritis who developed tuberculosis as a result of immunosuppressive therapy.

Klíčová slova:
tuberkulóza
T-buněčná imunitní odpověď
biologická léčba
anti-TNF terapie
IGRA testy

Key words:
tuberculosis
T-cell immune response
biological treatment
anti-TNF therapy
IGRAs

Tuberkulóza

Tuberkulóza (TBC) je závažné infekční onemocnění způsobené bakterií ***Mycobacterium tuberculosis.*** Vzhledem k tomu, že nejčastější vstupní branou bakterií jsou dýchací cesty, bývají ve většině případů postiženy právě plíce. Infikován však může být kterýkoliv orgán, například nitrohrudní lymfatické uzliny, močové ústrojí, CNS, případně kosterní soustava.

Počet onemocnění TBC vykazuje v České republice dlouhodobě klesající trend a v mezinárodním srovnání již léta patříme k zemím s nízkým výskytem nemoci. Incidence tuberkulózy za rok 2020 byla dle Registru TBC 3,4 případů na 100 000 obyvatel (1).

Imunita a tuberkulóza

Mycobacterium tuberculosis je intracelulárně parazitující acidorezistentní tyčkovitá bakterie. Klíčovou roli v obraně proti mykobakteriím sehrává kooperace specifických T-lymfocytů, makrofágů a epiteliálních buněk. Aktivované imunokompetentní buňky produkují prozánětlivé a cytotoxické cytokiny a spouštějí tak imunitní reakci. Nejdůležitější roli sehrávají **interferon γ** (IFNγ), který stimuluje fagocytární a cytotoxické funkce plicních makrofágů, a **tumor nekrotizující faktor α** (TNF α), který má významnou roli při formování a zachování granulomu (2). Granulom je mikroskopický útvar, který vzniká v důsledku reakce imunitního systému na chronický zánět. Skládá se převážně z aktivních makrofágů a velkých mnohojaderných buněk. Humorální imunitní odpověď velmi pravděpodobně nehraje v obraně proti mykobakteriím žádnou roli.

Latentní tuberkulóza

U části infikovaných nedojde k úplné eliminaci patogenu. Mykobakterie přežívají uvnitř granulomu exponovaného jedince díky specifickým obranným mechanismům v klidovém stavu mimo dosahu imunitního systému hostitele. Jedná se o latentní (asymptomatickou) formu tuberkulózy (LTBC), která probíhá asymptomaticky a není detekovatelná přímými diagnostickými metodami jakými jsou mikroskopie, kultivace anebo detekce genomu bakterie. LTBC je infikována pravděpodobně třetina světové populace. Asi u 10—15 % latentně infikovaných jedinců dochází k vývoji aktivní TBC, nejčastěji vlivem oslabení buněčné imunity (3).

Biologická léčba

V současnosti zaznamenáváme významný nárůst nádorových a autoimunitních onemocnění. S tím jde ruku v ruce i vývoj nových léků, z nichž některé reprezentují cílenou biologickou léčbu, která je založena na modulaci složek imunitního systému – buď formou imunosuprese anebo aktivace. Jedním z nejvíce využívaných biologických léčiv jsou tzv. anti-TNF-α přípravky, které se uplatňují v léčbě revmatoidní artritidy, idiopatických střevních zánětů (Crohnova nemoc, ulcerózní kolitida) a jiných autoimunitních onemocnění. Vzhledem k tomu, že TNF-α je jedním z nejdůležitějších cytokinů v obranyschopnosti proti mykobakteriím, přináší anti-TNF-α přípravky kromě cílené terapie základního onemocnění i riziko exacerbace latentní formy tuberkulózy. Sekce pro tuberkulózu ČPFS vydala doporučení pro monitoring LTBC u pacientů léčených anti-TNF-α přípravky (4). Pravidelné kontroly zahrnují klinická vyšetření, anamnestické údaje, skiagramy hrudníku a výsledky dostupných IGRA testů (Interferon Gama Release Assay – QuantiFERON.*TB* test, T-SPOT.*TB*) pro nepřímou laboratorní diagnostiku LTBC.

Kazuistika

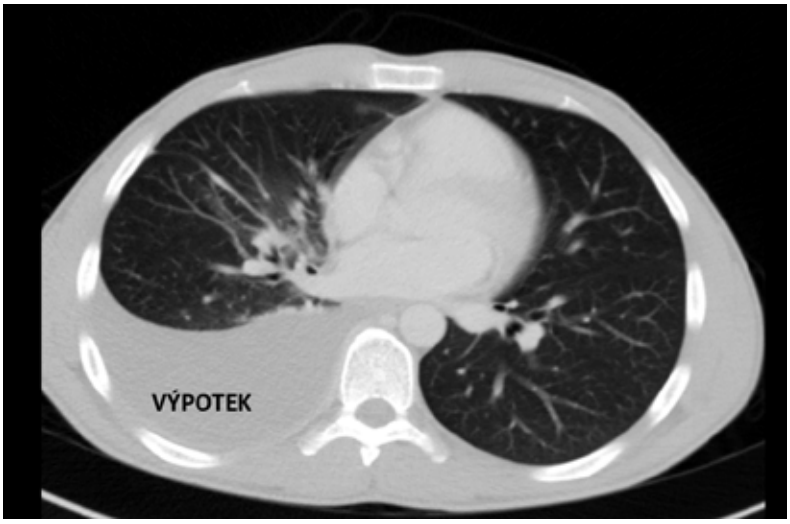
ANAMNÉZA:

- Muž, ročník 1987, séropozitivní revmatoidní artritida III.-IV. stádium.
- Od r. 2011 biologická terapie přípravkem anti-TNF-α.
- Na začátku terapie byla pneumologem vyloučena LTBC, QuantiFERON.*TB* test (IGRA) negativní.
- **Dále v průběhu biologické léčby nebyl vyšetřen pneumologem, IGRA**

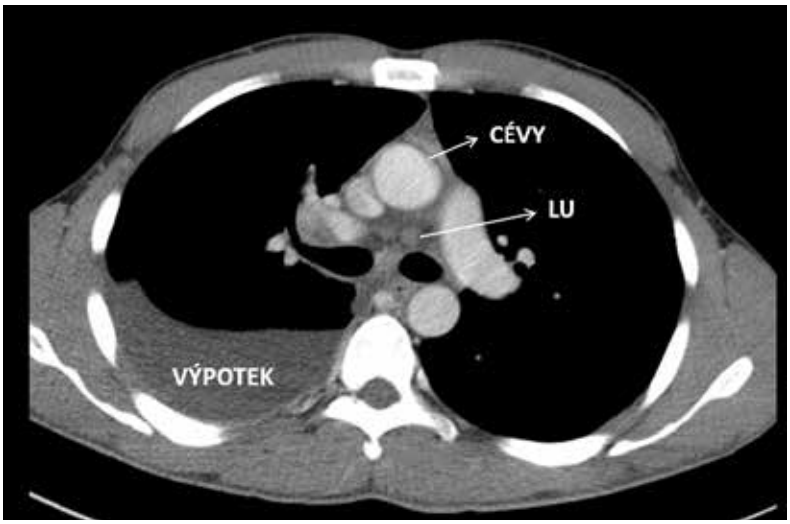
test k vyloučení LTBC při probíhající imunosupresivní terapii nebyl proveden!

- Začátkem listopadu 2016 febrilie, kašel, slabost. Hospitalizován na interním oddělení okresní nemocnice.
- Nález hodnocen jako pleuropneumonie. Přeléčen širokospektrálními antibiotiky (aminopeniciliny, makrolidy, cefalosporiny, chinolony).
- Po 5 týdnech přeložen na plicní oddělení Nemocnice v Novém Jičíně.

Obr. 1 *CT hrudníku, pleurální výpotek vpravo*



Obr. 2 *CT hrudníku, tzv. mediastinální okno. Pleurální výpotek vpravo, zvětšené lymfatické uzliny, cévy. LU – lymfatické uzliny.*



EPIKRÍZA:

- Biologická léčba přípravkem anti-TNF-α byla vysazena.
- **Sputum na *Mycobacterium tuberculosis* opakovaně negativní.**
- Sérologická pozitivita IgM a IgA na *Mycoplasma pneumoniae* – zahájena terapie doxycyklinem.
- CT nález – pleurální výpotek vpravo, mediastinální a hilová lymfadenopatie, dle popisujícího rentgenologa až obraz tumoru v pravém hilu, plicní parenchym bez jednoznačných ložiskových a infiltrativních změn – obr. 1 a 2.
- Sedimentace 22/44, krevní obraz v normě, vyšetření parametrů humorální a buněčné imunity v normě.
- **IGRA test (T.SPOT.*TB*) silně pozitivní** (cut off ≤ 5 spotů) – obr. 3.
- CYTOLOGIE A FENOTYPIZACE PLEURÁLNÍHO PUNKTÁTU: hodně buněčný, velmi pravděpodobně **reaktivní pleurální punktát lymfocytárního typu (74,5 %)** s predominancí T-lymfocytů s lehce zvýšeným poměrem CD4/CD8 (2,8), bez fenotypových známek maligního lymfoproliferativního onemocnění.
- MIKROBIOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ: **sputum, pleurální punktát, bronchoalveolární laváž opakovaně negativní na *Mycobacterium tuberculosis.*** V rámci přímé diagnostiky TBC byla provedena mikroskopie na acidorezistentní tyčky, kultivace, metabolická kultivace MGIT, PCR.
- BRONCHOSKOPICKÉ VYŠETŘENÍ: hlasivky symetrické, bez patologie. Trachea volná. Karina tracheální ostrá, pohyblivá. V dosahu optiky oboustranně všechna ústí volná. Sliznice klidná. Bez patologické vaskularizace.
- EBUS BRONCHOSKOPIE (obr. 4): bi-

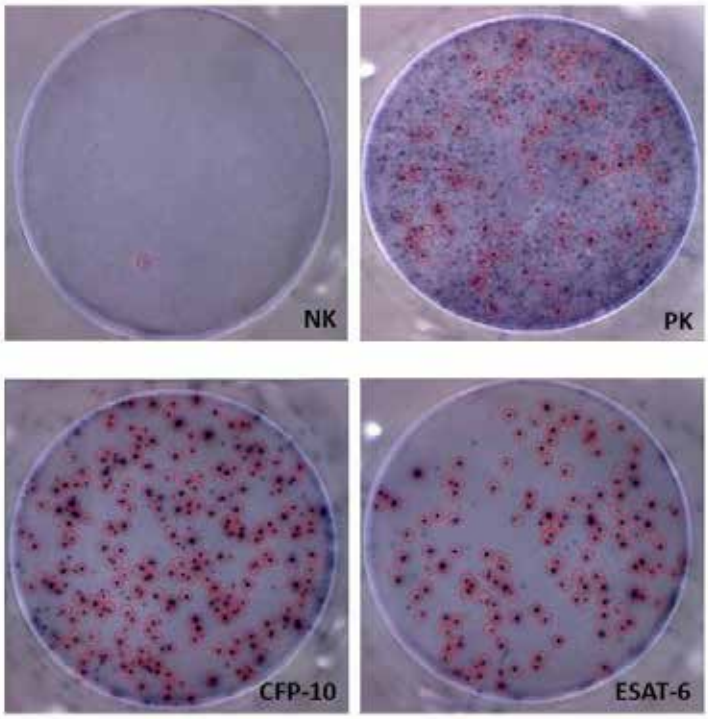
laterální mediastinální a hilová lymfadenopatie (zvětšená LU o průměru 1,56 cm).

- CYTOLOGICKÉ A HISTOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ BIOPSIE Z EBUS: maligní buňky nezachyceny, bez známek lymfoproliferativního procesu, bez nálezu granulomů.
- MIKROBIOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ ASPIRÁTU EBUS/TBNA: výsledky z biopsie lymfatické uzliny z 09/12/2016: **acidorezistentní tyčky ++, DNA *M. tuberculosis* complex (PCR) pozitivní, kultivace *M. tuberculosis* +++, MGIT – *M. tuberculosis* pozitivní,** citlivost na Streptomycin, Isoniazid (INH), Ethambutol (EMB), Rifampicin (RFA), Ofloxacin, Gentamicin.
- Zahájená antituberkulotická léčba (AT) v kombinaci INH, EMB, RFA ponechán i doxycyklin pro pozitivitu sérologie na *Mycoplasma pneumonie*, kortikoterapie Medrolem (indikace revmatologa).
- Překlad do Sanatoria Jablunkov, po 2 měsících redukce AT léčby (INH a RFA), kortikoterapie taktéž redukována.
- Regrese potíží, zlepšení stavu, normalizace nálezu na RTG hrudníku – obr. 5.

Závěr

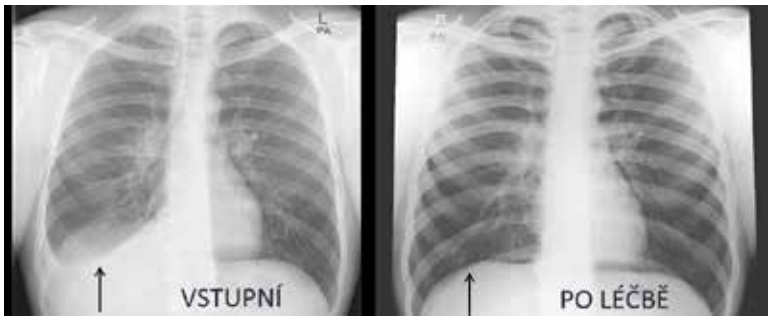
Prezentovali jsme ojedinělou kazuistiku **uzlinové formy TBC** u mladého pacienta s anti-TNFα terapií revmatoidní artritidy. V průběhu léčby pacient nebyl sledován na přítomnost latentní formy TBC. Po 5 letech dochází ke zhoršení zdravotního stavu, primární bylo podezření na maligní lymfoproliferativní onemocnění (zvětšené LU). Mikrobiologické vyšetření sputa, výpotku i BAL na *M. tuberculosis* byly negativní. **První podezření na TBC vyvolala silná pozitivita T.SPOT.*TB* testu.** Vzhledem k tomu, že se jedná o nepřímý průkaz infekce TBC, diagnostický proces pokračoval cílenou USG navigovanou biopsii **uzliny, která již byla pozitivní** mikroskopicky, PCR i kultivačně na ***M. tuberculosis.***

Obr. 3 *Výrazná pozitivita T.SPOT.TB testu (IGRA). CFP-10, ESAT-6: specifické antigeny Mycobacterium tuberculosis, (cut off ≤ 5 spotů), NK: negativní kontrola, PK: pozitivní kontrola*



Obr. 4 *EBUS/TBNA – cílená ultrasonograficky navigovaná biopsie. Umožňuje zobrazení lymfatických uzlin (LU) o velikosti od 3 mm, punkční biopsii LU již od 5 mm – cílená cytologie, histologie, genetika, mikrobiologie. Senzitivita 94 %, specificita 100 %. Zdroj: archiv, prim. MUDr. G. Ondrejka, Ph.D.*

Obr. 5 *RTG nález před léčbou a úprava nálezu po antituberkulózní terapii*



Pravidelné provádění IGRA testů (T.SPOT.*TB* test, QuantiFERON.*TB* test) k vyloučení latentní tuberkulózy výrazně přispívá k minimalizaci rizik biologické léčby.

KONTAKTNÍ ÚDAJE:
RNDr. Andrea Ondrejková
Laboratoře AGEL a.s.
Laboratoř klinické imunologie
a alergologie
Revoluční 2214/35, 741 01 Nový Jičín
e-mail: andrea.ondrejkova@lab.agel.cz

Literatura

1. ÚZIS ČR. Základní přehled epidemiologické situace ve výskytu tuberkulózy v České republice v roce 2020. https://www.uzis.cz/res/f/008358/tbc2020-cz.pdf

2. Jan Krejsek, Otakar Kopecký. Klinická imunologie, NUCLEUS HK, 2004

3. Solovič I, Klimentová Z. Latentná tuberkulózna infekcia a biologická liečba: Via practica, 2013, 10(3–4): 105–108, www.solen.sk

4. Jiří Homolka, Sekce pro tuberkulózu ČPFS. Doporučení pro biologickou léčbu preparáty blokujícími účinek TNF ALFA. Kap. 4.4., 2019. file:///C:/Users/andond001/Downloads/4_4_DP_pro_biologickou_lecbu_preparaty_blokujicimi_TNF_alfa%20(1).pdf

Senzitivita na potraviny - pohyb na tenkém ledě. Stanovení IgG protilátek proti 287 potravinám multiplexovou metodou FOX

Barbora Pavlíková

S nárůstem počtu pacientů s gastrointestinálními potížemi roste i snaha o zdokonalení diagnostických postupů v této oblasti. Multiplexová diagnostika specifických IgG protilátek proti různým potravinovým antigenům umožňuje odhalit možnou příčinu zažívacích problémů.

Food sensitivities - walking on thin ice. Determination of IgG antibodies against 287 foods by the FOX multiplex method.

As the number of patients with gastrointestinal problems increases, so does the effort to improve diagnostic procedures in this area. Multiplex diagnostics of specific IgG antibodies against various food antigens allows to reveal the possible cause of digestive problems.

Úvod

Zažívací potíže různého druhu trápí podle posledních průzkumů až 80 % dospělé populace. Převážně se jedná o obyvatele velkých měst a lidi, kteří jsou ve větší míře vystaveni stresovým situacím. Mezi nejčastější projevy poruch zažívání patří bolesti břicha, zvracení, zácpa anebo průjem, nadýmání, pocit plnosti, pálení žáhy případně syndrom dráždivého střeva. Kromě trávicích potíží mohou být doprovodným jevem „nesnášenlivosti" určitých potravin i migrény a další neurologické problémy, deprese či kožní problémy.

Nejčastější příčinou zažívacích potíží bývá většinou dietní chyba případně dlouhodobě špatná životospráva (stres, nedostatek spánku, přemíra alkoholu, kouření apod.). Časté neustupující problémy se zažíváním bez jednoznačně identifikovatelné příčiny mohou být projevem závažného onemocnění a je proto nutné navštívit odborného lékaře.

Klíčová slova:
antigen
senzitivita na potraviny
IgG protilátky
CCD (cross-reactive carbohydrate determinants)
multiplexová metoda FOX

Key words:
antigen
food sensitivity
IgG antibodies
CCD (cross-reactive carbohydrate determinants)
FOX multiplex method

Typy mechanismů nesnášenlivosti potravin

Dle mechanismu působení a klinických projevů můžeme problémy s potravinami (tzv. nesnášenlivost potravin) rozdělit do následujících kategorií.

- **Intolerance potravin** – jsou charakterizovány deficitem příslušného enzymu v organismu. Mezi nejčastější patří intolerance laktózy a histaminová intolerance. Příčinou intolerance laktózy je nedostatek enzymu laktázy, kterým je mléčný cukr štěpen. Příčinou histaminové intolerance je snížená funkce enzymu diaminooxidázy (DAO), který odbourává histamin v organismu.
- **Alergie na potraviny** – jedná se o reakci imunitního systému na daný potravinový alergen zprostředkovaný imunoglobuliny typu IgE. Ve většině případů se jedná o rychlé, někdy i závažné a život ohrožující reakce přicházející v řádu minut až hodin po konzumaci problémové potraviny.
- **Senzitivita na potraviny** – v populaci představuje nejčastější příčinu problémů se zažíváním. Jedná se o reakci imunitního systému na daný potravinový antigen zprostředkovaný imunoglobuliny typu IgG. Na rozdíl od alergie se zdravotní problémy po konzumaci dané potraviny dostavují později, v řádu dnů až týdnů.
- **Zažívací potíže na autoimunitním podkladu** – zde dochází k tvorbě autoprotilátek proti buňkám a orgánům tělu vlastním. Do této kategorie patří celiakie a nespecifické střevní záněty (Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida).

Obecně platí, že zažívací a s tím související další zdravotní potíže lze výrazně omezit správnou životosprávou a eliminací problémové potraviny z jídelníčku. Zatímco u celiakie a alergie je eliminace lepku a jiných problematických potravin doživotní, u intolerancí a senzitivity na potraviny je většinou toto omezení dočasné.

AGELLAB nabízí komplexní laboratorní vyšetření pro všechny výše zmiňované kategorie nesnášenlivosti potravin. Nicméně klinická diagnostika závažných příčin trávicích potíží, jakými jsou autoimunitní nemoci a alergie, patří do rukou lékařů s příslušnou odborností.

Příčiny vzniku senzitivit na potraviny

Nejpravděpodobnější příčinou senzitivity na určité potraviny může být **zvýšená propustnost střevní sliznice** společně s **narušenou střevní mikroflórou**, kdy se do mimostřevního prostoru dostávají nežádoucí fragmenty z potravin. Reakcí organismu je tvorba specifických protilátek typu IgG, které můžeme detekovat laboratorním vyšetřením z periferní krve. Závažnější příčinou zvýšené propustnosti střeva mohou být zánět GIT (infekční) anebo nespecifické střevní záněty (Crohnova nemoc, ulcerózní kolitida). V rámci dif. dg. je proto potřeba tato onemocnění vyloučit.

Laboratorní diagnostika senzitivit na potraviny

Nově AGELLAB nabízí semikvantitativní vyšetření specifických IgG protilátek (IgG podtřídy 1–4) proti **287 potravinovým antigenům** ze 13 zdrojů (viz níže) multiplexovou metodou FOX (The food Xplorer) na nanočásticích. **Vyšetření ale není hrazeno ze zdravotního pojištění, je určeno pouze pro samo-**

plátce. Seznam testovaných antigenů potravin je rozdělený do následujících kategorií.

Přehled testovaných potravin

- **MLÉKO A VEJCE:** podmáslí, camembert, ementál, gouda, sýr cottage, kravské mléko, mozzarella, parmezán, buvolí mléko, velbloudí mléko, kozí sýr, kozí mléko, křepelčí vejce, vaječný bílek, vaječný žloutek, ovčí sýr, ovčí mléko.
- **MASO:** kachní, hovězí, telecí, zvěřina, kozí, jelení, koňské, kuřecí, krůtí, králičí, jehněčí, pštrosí, vepřové, kančí maso.
- **RYBY A MOŘSKÉ PLODY:** kaviár, úhoř, rak říční, koukol (srdcovkovití, jedlý mořský mlž), krab, sleď atlantický, kapr, ančovička evropská, štika severní, treska atlantická, Abalone (tzv. mořské uši), humr, krevety mix, oliheň, ďas, treska jednoskvrnná, štikozubec, slávka, chobotnice, pstruh, ústřice, kreveta severní, hřebenatka, břitka (mořský mlž), platýs evropský, rejnok ostnatý, škeble venus, losos, sardinka evropská, pakambala (ryba), makrela, okouník atlantický, sépie, jazyk mořský, pražma královská, tuňák, mečoun obecný.
- **OBILOVINY A SEMENA:** amarant, oves, řepka, konopné semínko, merlík (quinoa), cizrna, dýňové semínko, pohanka, slunečnicové semínko, ječmen, slad (ječmen), lněné semínko, lupina semínko, rýže, proso, mák, piniový oříšek, žito, sezam, pšenice, pšeničné otruby, pšeničný gliadin (lepek), mladá pšenice (tráva), emmer pšenice (dvou zrnitá špalda), durum pšenice (semolina), pšenice jednozrnka, pšenice španělská, pšenice špalda, kukuřice.
- **OŘECHY:** kešu, para ořech, pekanový ořech, sladký kaštan, kokosové mléko, kokosový ořech, kola ořech, lískový ořech, zemní mandle, vlašský ořech, makadamový ořech, pistácie, mandle.
- **LUŠTĚNINY:** arašíd, sója, čočka, bílá fazole, zelené fazole, hrách, cukrový hrášek, tamarind, mungo fazole.
- **OVOCE:** kiwi, ananas, papája, limetka, citrón, vodní meloun, grapefruit, mandarinka, pomeranč, meloun cukrový, fík, jahoda, liči, jablko, mango, moruše, banán, marakuja, datle, physalis (mochyně), meruňka, třešně, švestka, broskev, nektarinka, granátové jablko, hruška, angrešt, červený rybíz, ostružina, malina, bezinka, borůvka, brusinka, hrozny, rozinky.
- **ZELENINA:** šalotka, cibule, pórek, česnek, pažitka, divoký česnek, celer, celer nať, křen, bílý chřest, bambusové výhonky, mangold, červená řepa, hlávkové zelí, květák, hlávková kapusta bílá, růžičková kapusta, kedlubna, brokolice, květolice (Romanesco), červené zelí, hlávková kapusta zelená, kadeřavá kapusta, tuřín, brukev čínská (druh zelí), čínské zelí, kapary, štěrbák (endivie, příbuzná čekance), čekanka červená (Radicchio), čekanka, tykev muškátová, dýně hokkaido, Kiwano (druh okurky), cuketa, okurka, artyčok, mrkev, rukola, fenykl (bulva), batáty, řeřicha, olivovník, pastinák, avokádo, ředkev, lilek, brambory, rajče, špenát, listy kopřivy, salát polníček.
- **KOŘENÍ:** kopr, estragon, paprika, kajenský pepř, chilli (červené), kmín, skořice, kari, koriandr, římský kmín, kurkuma, citronová tráva, kardamon, jalovec, bobkový list, muškátový oříšek, máta, bazalka, majoránka, oregano, petržel, anýz, pepř (černý, bílý, zelený, červený, žlutý),

rozmarýn, šalvěj, hořčice, hřebíček, tymián, pískavice semínka, vanilka, zázvor.

- **JEDLÉ HOUBY:** žampióny, hřib, liška, penízovka sametonohá (Enoki), hlíva máčková (královská), hlíva ústřičná.
- **NOVÉ POTRAVINY:** cvrček domácí, baobab, aloe, kořen lopuchu většího, aronie (černý jeřáb), světlicový olej, chlorella, ginkgo, kořen maky (maca peruánská), saranče stěhovavá, tapioka, ženšen, guarana, mandlové mléko, nori řasa, chia semínka, kořen yakonu, spirulina, kořen pampelišky, moučný červ, řasy wakame.
- **KÁVA A ČAJ:** čaj černý, čaj zelený, káva, ibišek, jasmín, heřmánek, máta peprná, moringa olejodárná, kakao.
- **OSTATNÍ:** agar, med, Aspergillus niger, chmel, pekařské droždí, třtinový cukr, pivovarské droždí, bezový květ, mikrobiální M-transglutamináza (přídatná látka v masných výrobcích, masové lepidlo), CCD (lidský laktoferin).

Princip a provedení testu

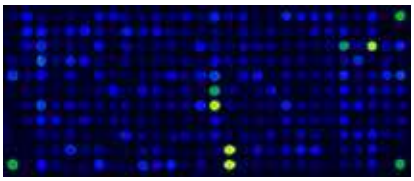
Testovací systém FOX (Food Xplorer) je založen na principu enzymové imunoanalýzy využívající pevnou fázi. Potravinové antigeny jsou navázány na nanočástice, které jsou systematicky uloženy na pevnou fázi. Antigeny navázané na částicích reagují se specifickými IgG protilátkami, které se nacházejí ve vzorku pacienta. Po inkubaci a následném promytí postup pokračuje přidáním enzymem značené detekční protilátky proti lidskému IgG, která vytvoří komplex se specifickým IgG navázaným na částici. Po druhém promývacím kroku je přidán substrát, který je enzymem změněn na nerozpustný zbarvený precipitát. Nakonec je reakce mezi enzymem a substrátem zastavena blokujícím činidlem. Množství precipitátu je úměrné koncentraci specifického IgG ve vzorku pacienta.

Obr. 1 *Testovací kazetka (https:// www.macroarraydx.com/products/fox)*

Obr. 2 *ImageXplorer (https://www.macroarraydx.com/products/systems)*

Obr. 3 *MAX45k (https://www.macroarraydx.com/products/systems)*

Obr. 4 *Analýza vzorku*



Testovací kazetka (Obr. 1) je po dokončení testu zpracována v zařízení ImageXplorer (Obr. 2) anebo pomocí automatického analyzátoru MultiArray Xplorer (MAX45k) (Macro array diagnostics) (Obr. 3). Pomocí hodnotícího softwaru Raptor MADx je provedena automatická analýza (Obr. 4) a vytvořena zpráva se shrnutím kvantitativních výsledků. Hodnoty stanovených specifických IgG protilátek proti jednotlivým antigenům jsou vyjádřeny v jednotkách µg/ml a jsou klasifikovány do 3 kvantitativních tříd (nízká, střední a vysoká hladina IgG) (Obr. 5, 6). Čím je vyšší hladina IgG, tím je větší pravděpodobnost nežádoucích klinických projevů. Detekované intolerance nižší než 20 ug/ml jsou nízké, spíše diagnosticky nevýznamné, nález je nutné posuzovat dle anamnézy a klinického stavu pacienta.

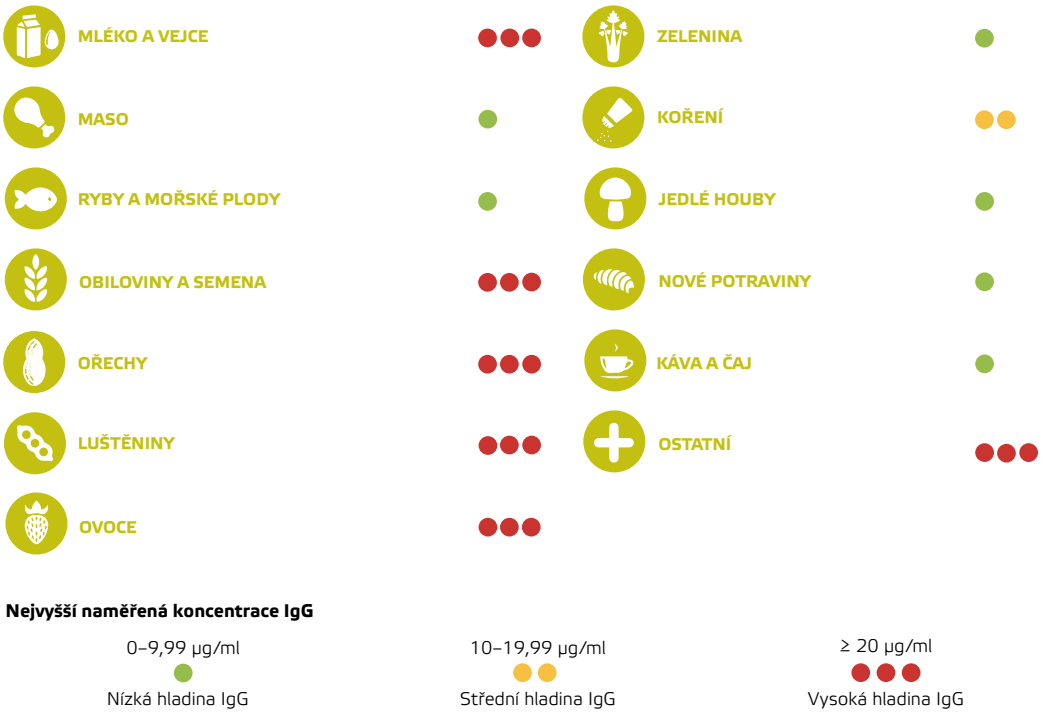
K provedení testu je možné použít vzorky séra nebo plazmy (heparin, citrát nebo EDTA) z kapilární či žilní krve, k provedení analýzy je potřeba pouze 10 µl biologického materiálu.

Závěr a diskuze

Od února 2021, kdy jsme poprvé začali testovat novou metodu FOX, do června 2022 jsme v naší laboratoři vyšetřili celkem 50 pacientů. Významně vysoká hladina IgG protilátek byla zaznamenána zejména u vejce, kiwi, hořčice, mléka, česneku, řepky, ořechů, pšenice, sýrů a rajčete (Tab. 1). Celkem u 3 pacientů z 50 nebyla detekována významně vysoká hladina IgG.

U významně vysokých hladin IgG detekovaných proti určitým potravinám (tzn. nad hladinu 20 µg/ml) vždy doporučujeme dané potraviny na určitou

Obr. 5 *Laboratorní zpráva: Přehled profilu IgG*



Obr. 6 *Náhled laboratorní výsledkové zprávy*

Mléko a vejce

Podmáslí	23,31 µg/ml	●●●	Kravské mléko Bos d 8 * (Kasein)	29,69 µg/ml	●●●
Camembert	27,48 µg/ml	●●●	Buvolí mléko	24,94 µg/ml	●●●
Ementál	23,74 µg/ml	●●●	Velbloudí mléko	≤ 5,00 µg/ml	●
Gouda	31,43 µg/ml	●●●	Kozí sýr	13,91 µg/ml	●●
Cottage cheese	30,71 µg/ml	●●●	Kozí mléko	30,53 µg/ml	●●●
Kravské mléko	28,43 µg/ml	●●●	Křepelčí vejce	≤ 5,00 µg/ml	●
Mozzarella	28,13 µg/ml	●●●	Vaječný bílek	21,59 µg/ml	●●●
Parmezán	23,83 µg/ml	●●●	Vaječný žloutek	16,70 µg/ml	●●
Kravské mléko Bos d 4 * (Alfa--Laktalbumin)	13,51 µg/ml	●●	Ovčí sýr	23,25 µg/ml	●●●
Kravské mléko Bos d 5 * (Beta--Laktoglobulin)	24,02 µg/ml	●●●	Ovčí mléko	30,85 µg/ml	●●●

Maso

Kachní maso	≤ 5,00 µg/ml	●	Kuřecí maso	≤ 5,00 µg/ml	●
Hovězí maso	≤ 5,00 µg/ml	●	Krůtí maso	≤ 5,00 µg/ml	●
Telecí maso	≤ 5,00 µg/ml	●	Králičí maso	≤ 5,00 µg/ml	●
Zvěřina	≤ 5,00 µg/ml	●	Jehněčí maso	≤ 5,00 µg/ml	●
Kozí maso	≤ 5,00 µg/ml	●	Pštrosí maso	≤ 5,00 µg/ml	●

dobu eliminovat z jídelníčku. Tyto potraviny mohou být méně tolerovány a způsobovat zažívací potíže. U senzitivity na potraviny je většinou toto omezení dočasné. Proto je tak důležitá pestrost skladby přijímaných potravin a s tím související zdravý mikrobiom spolu s přísunem probiotik a prebiotik. Vše souvisí s tím, jak moc máme narušenou bariéru střevní sliznice (tzv. druhý mozek). Velmi důležité je vyvarovat se jednoznačným spouštěčům zánětu ve střevě, které zvyšují propustnost střevní sliznice (stres, alkohol, léky, hormony, antibiotika, kortikoidy, přejídání, špatné složení stravy apod.).

Příznaky potravinových senzitivit se často objevují později a někdy není lehké si uvědomit spouštěcí mechanismus, proto stanovení FOX může pomoci odhalit někdy nejasné příčiny zdravotních problémů.

Tab. 1 *Četnost výskytu významně vysoké hladiny IgG protilátek proti určitým potravinám*

Potraviny	Četnost výskytu
vejce	33
kiwi	28
hořčice	23
mléko	23
česnek	21
řepka	19
mandle	13
kešu	12
pšenice	11
sýry	11
rajče	10
masové lepidlo	8
dýňové semínko	7
arašídy	7
para ořechy	6
vlašské ořechy	5
lískové ořechy	5
ananas	5

KONTAKTNÍ ÚDAJE:
Mgr. Barbora Pavlíková, Ph.D.
Laboratoře AGEL a.s.
Laboratoř klinické imunologie
a alergologie
Revoluční 2214/35, 741 01 Nový Jičín
e-mail: barbora.pavlikova@lab.agel.cz

Literatura

1. www.macroarraydx.com/products/fox.
2. Serological investigation of IgG and IgE antibodies against food antigens in patients with inflammatory bowel disease. HY Wang et al. 2019; World Journal of Clinical Cases
3. Prevalence of IgG-mediated food intolerance among patients with allergic symptoms. Shakoor et al. 2016; Annals of Saudi Medicine
4. Krejsek J., Kopecký O: Klinická imunologie. Nukleus HK, 2004.

EUROLabWorkstation ELISA

3 ELISA nej v 1 balení

NEJVĚTŠÍ KAPACITA – až 800 vzorků, 15 desek

NEJRYCHLEJŠÍ – ultimátní rychlost ředění vzorků a pipetování pomocí 10 jehel, zpracování až 200 testů/h

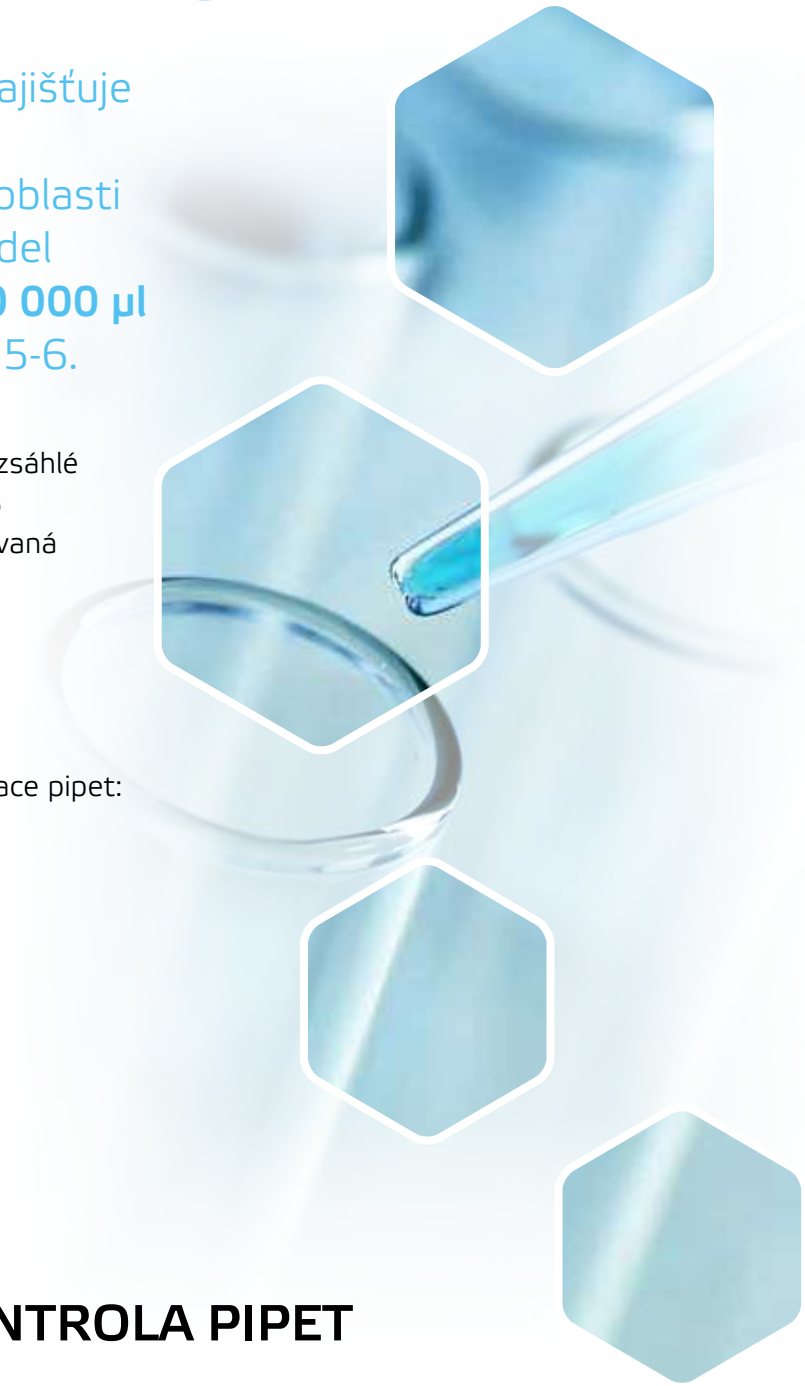
NEJINTELIGENTNĚJŠÍ – nejvyšší možná standardizace zpracování díky kompletnímu využití BAR/QR kódů, šetří Vaše náklady a přírodu - využívá minimální množství plastů/spotřebního materiálu, uživatelsky příjemný SW a výkonný algoritmus nové generace šetří čas pro obsluhu stroje i zpracování vzorků na minimum

EUROIMMUN a PerkinElmer company

DYNEX

KALIBRAČNÍ LABORATOŘ AGEL

Kalibrační laboratoř AGEL zajišťuje kalibrace s možnou justací a mezikalibrační kontrolu v oblasti pístových objemových měřidel s rozsahem **od 0,5 µl do 10 000 µl** dle normy ČSN EN ISO 8655-6.



Kalibrační laboratoř AGEL je součástí rozsáhlé sítě akreditovaných laboratoří AGELLAB v České republice. Laboratoř je akreditovaná dle mezinárodní normy ČSN EN ISO/IEC 17025:2018.

NABÍDKA SLUŽEB

Kalibrační laboratoř AGEL provádí kalibrace pipet:

- **fixních**
- **jednokanálových**
- **vícekanálových**
- **variabilních**
- **mechanických**
- **elektronických**
- **stepper**

Výstupem u kalibrací je kalibrační list.

MEZIKALIBRAČNÍ KONTROLA PIPET

Jedná se o zkrácené kalibrační měření pro kontrolu správnosti dávkování. Výstupem je protokol s naměřenými hodnotami.

Proč spolupracovat s Kalibrační laboratoří AGEL:

- kalibrace pipet **od nejmenšího objemu 0,5 µl**
- zapůjčení náhradních pipet po dobu kalibrace zdarma
- nízká cena
- kalibrace pipet do 5 pracovních dnů

Více informací:
Ing. Radka Janíčková
vedoucí kalibrační laboratoře
Tel.: +420 725 080 037
e-mail: radka.janickova@lab.agel.cz

www.agellab.cz

KLINICKÁ MIKROBIOLOGIE

Herpetické viry u pacientů s těžkým průběhem onemocnění covid-19

Ondřej Juřena

V souvislosti s výskytem nového typu koronaviru, který se následně stal příčinou vzniku celosvětové pandemie, se odborníci začali zabývat nejen původcem tohoto onemocnění, ale také dalšími agens, která byla u pacientů s covid-19 detekována. Odborná veřejnost zaznamenala především zvýšený záchyt herpetických virů, a to z různých biologických materiálů, často ve vysoké kvantitě. Tato indicie se stala předmětem zkoumání souboru pacientů s infekcí covid-19, hospitalizovaných od prosince 2020 do dubna 2021 na odděleních ARO a JIP v Nemocnicích AGEL Prostějov a Přerov.

Herpes viruses in patients with a severe course of the covid-19 disease

In connection with the occurence of a new type of coronavirus, which subsequently became the cause of a global pandemic, experts began to look not only at the causative agent of this disease, but also at other agents that were detected in patients with Covid-19. The expert community noticed above all an increased capture of herpesviruses, from various biological materials, often in high quantities. This clue became the subject of research of a group of patients with Covid-19 infection, hospitalized from december 2020 to april 2021 in the ARO and JIP of AGEL Hospitals Prostějov and Přerov.

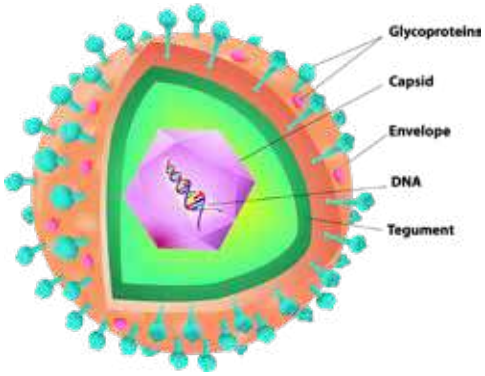
Klíčová slova:
herpetické viry
covid-19
HSV-1
RT-PCR
pneumonitida

Key words:
herpes viruses
covid-19
HSV-1
RT-PCR
pneumonitis

Herpetické viry

Herpetické viry jsou skupinou virů patřící do čeledi ***Herpesviridae***. Pro tyto viry je typické dlouhodobé přetrvávání (latence) v infikovaném organismu s následnou reaktivací, a to především u osob s oslabenou imunitou. V současnosti je známo osm lidských herpesvirů způsobijících celou řadu onemocnění (1). Patří sem Herpes simplex virus 1 (HSV-1), Herpes sim-

Obr. 1 *Struktura herpetického viru (7)*



plex virus 2 (HSV-2), Varicella zoster virus (VZV), Epstein-Barr virus (EBV), Cytomegalovirus (CMV), a lidské herpesviry 6, 7 a 8 (HHV 6-8) (2). Zjednodušená struktura herpetického viru je znázorněna na obr. č. 1.

Varicella zoster virus je znám především jako původce planých neštovic (varicella) a pásového oparu (herpes zoster). Při primární nákaze v organismu vzniká virémie s následným rozšířením agens do buněk pokožky, kde dochází k výsevu charakteristické vyrážky. Po odeznění varicelly virus zůstává latentní v gangliích nervových buněk. Reaktivace VZV je nejčastěji manifestována jako herpes zoster, u imunokompromitovaných pacientů může vyústit v diseminovanou viscerální infekci. (3)

Primární cytomegalovirová infekce má většinou bezpříznakový průběh, zatímco reaktivace latentního onemocnění může způsobovat život ohrožující stavy především u oslabených osob. Je prokázáno, že virus způsobuje oportunní infekce u pacientů po transplantacích či u HIV+ jedinců; možné jsou také infekce plodu. Klinickou manifestací reaktivací může být lymfadenitida, pneumonitida nebo například encefalitida. (4)

Herpes simplex virus se vyskytuje ve dvou sérotypech, a to HSV-1 a HSV-2. Herpes simplex virus 1 primárně postihuje orální sliznici, Herpes simplex virus 2 má vyšší afinitu ke sliznici genitální. (2) Některé rozdíly mezi HSV-1 a HSV-2 jsou shrnuty v tabulce č. 1.

Herpesviridae patří mezi virové čeledi, u kterých je k dispozici specifická virostatická terapie. V případě léčby HSV je nejčastěji používán acyclovir. Stejně jako v případě antibiotik, je i u antivirové terapie v poslední době pozorován častý vznik rezistence. (5)

Častá pozitivita PCR herpetických virů

U pacientů s onemocněním Covid-19 byla pomocí RT-PCR zjištěna zvýšená pozitivita některých herpetických virů, klinickou manifestací této superinfekce

Tab. 1 *Rozdíly mezi HSV-1 a HSV-2*

	HSV-1	HSV-2
Séroprevalence	70-80 %	15-50 %
Přenos	Sliny, sekrety	Pohlavní styk, vertikálně
Primární infekce	Gingivostomatitida Keratokonjuktivitida Hemoragicko – nekrotická encefalitida	Herpes genitalis Neonatální herpes Encefalitida
Reaktice	Herpes labialis **Pneumonitida** Hepatitida Ezofagitida	Rekurentní herpes genitalis **Pneumonitida** Hepatitida Ezofagitida

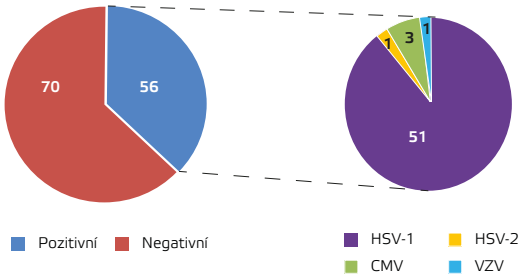
byla pneumonitida. Následné deskriptivní studii bylo podrobeno 126 pacientů hospitalizovaných v rozmezí 1.12. 2020 do 30.4. 2021 na jednotkách intenzivní péče Nemocnice AGEL Prostějov a Nemocnice AGEL Přerov. U pacientů byl dle indikace proveden přímý průkaz vybraných herpetických virů (HSV-1, HSV-2, VZV a CMV) z výtěru z nosohltanu. V případě HSV-1 a HSV-2 byla dále také provedena kvantifikace amplifikačního produktu.

U 126 pacientů bylo detekováno 56 pozitivních záchytů v rámci čeledi Herpesviridae. Největší část pozitivit herpetických virů byla tvořena HSV-1, a to 51 případů (90 %). Další herpetické viry byly zastoupeny minimálně – CMV - 3 pozitivní detekce, HSV-2 - 1 pozitivní detekce a VZV také pouze 1 pozitivní případ – graf č.1.

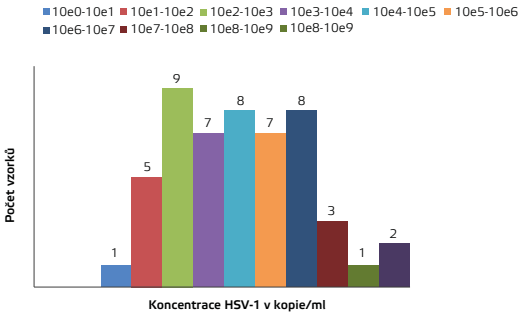
Kvantifikace HSV-1/2

Kvantifikace HSV-1 byla provedena u všech 51 HSV-1 pozitivních vzorků. Nejvyšší naměřená a vypočítaná koncentrace HSV-1 z naší série vzorků byla 2,72 x 10^9 kopií/ml. Průměrná naměřená koncentrace byla 9,78 x 10^7 kopií/ml, hodnota mediánu 3,52 x 10^4 kopií/ml. Četnost jednotlivých naměřených kvantit (koncentrací) je zobrazena v grafu č. 2.

Graf 1 *Četnost zastoupení jednotlivých herpetických virů*



Graf 2 *Rozložení naměřených koncentrací HSV-1 (kopie/ml) z výtěrů z nosohltanu*



HSV-1/2, acyklovir a letalita

Dalším cílem studie bylo zjednodušeně vyhodnotit, jakým způsobem prokázaná pozitivita HSV-1/2 ovlivňuje letalitu pacientů s covid-19 a jakou roli v této problematice hraje včasné podání cílené antivirové léčby – acykloviru.

Hrubá míra smrtnosti u pacientů s pozitivitou HSV-1/2 měla hodnotu 62,7 %.

Tab. 2 *Porovnání letality vybraných skupin pacientů*

Posuzovaná kohorta pacientů	Počet pacientů	Počet úmrtí	Letalita (%)
Všichni hospitalizovaní pacienti na ARO/PV, ARO JIP B/PV a AROX/PR od 1. 12. 2020 do 30. 4. 2021 s covid-19	297	124	41,8
HSV-1/2 pozitivní pacienti	51	32	62,7

Tab. 3 *Zjednodušené srovnání efektu terapie acyclovirem*

Acyklovir	Počet pacientů	Počet úmrtí	Letalita (%)
+	24	18	75 %
-	27	15	55,6 %

V porovnání s celkovou letalitou pacientů s covid-19 na definovaných odděleních, která měla hodnotu 41,8 %, šlo o navýšení letality o 20,9 %.

Pro posouzení efektu léčby herpetických infekcí acyklovirem ve vztahu k letalitě byli porovnáni pacienti s prokázanou reaktivací HSV-1/2, u kterých byl acyklovir podán, a pacienti s prokázanou reaktivací HSV-1/2, u kterých acyklovir nebyl zvolen do terapie. Z 51 HSV-1/2 pozitivních pacientů byl acyklovir indikován u 24 pacientů. V tab. č. 3 je porovnána letalita pacientů s prokázanou reaktivací HSV-1/2, u kterých byla indikována léčba antiherpetickým preparátem, s pacienty, u kterých acyklovir podán nebyl. Z výsledků plyne, že podání acykloviru HSV-1/2 pozitivním pacientům nevedlo ke snížení letality.

Závěrem

Vysoké procento pozitivit, především v případě HSV-1, může mít několik důvodů:

- jedná se o starší pacienty, průměrný věk testované kohorty je 67,4 let,
- u všech pacientů pozorujeme vysoký výskyt komorbidit (kardiovaskulární či onkologické onemocnění, autoimunitní choroby, diabetes mellitus, metabolický syndrom, obezita aj.…),
- pacientům s covid-19 je vstupně podávána nespecifická antivirová imunosupresivní léčba v podobě intravenózních kortikosteroidů,
- řízená plicní ventilace u většiny pacientů,
- vysoká séroprevalence primárních herpetických infekcí v populaci.

Za reaktivací herpetických virů stojí složitá molekulární kaskáda, jejímž spouštěcím mechanismem mohou být triviální etiologické principy jako vystavení UV paprskům, hormonální vlivy, nebo psychologický stres. U těžce nemocných pacientů pak hraje důležitou roli imunosuprese a febrilie, a to zvláště u diagnóz jako pneumonie, ARDS a meningitida. (6)

Vyšší hodnota pozorované letality nemusí souviset pouze se zmíněnou superinfekcí herpetickými viry, ale také se závažným klinickým stavem a špatnou prognózou imunodeficientních pacientů. Je však možné vyvodit, že právě koinfekce/superinfekce herpetickými viry je jedním z indikátorů fatálního stavu pacientů s infekcí covid-19.

Z výsledků souvisejících s podáním acykloviru HSV-1/2 pozitivním pacientům plyne poměrně překvapivý závěr, že i v případě včasného zahájení léčby nepozorujeme snížení letality, ale naopak její zvýšení. Tato zvýšená letalita může však být odrazem celkově velmi závažného klinického stavu konkrétních posuzovaných pacientů nejen s rozsáhlým postižením plic, ale i dalších orgánů, kdy ani adekvátní antiherpetická terapie nepomohla zvrátit fatální stav.

KONTAKTNÍ ÚDAJE:
Mgr. Ondřej Juřena
AGEL Středomoravská nemocniční a.s.
Nemocnice AGEL Prostějov
Oddělení laboratorní medicíny,
laboratoř lékařské mikrobiologie
Mathonova 291/1, 796 04 Prostějov
e-mail: ondrej.jurena@npv.agel.cz

Literatura

1. Ho, D. Y., Enriquez, K., &Multani, A. (2020). Herpes virusInfections Potentiated by Biologics. Infectious Disease Clinics of North America, 311–339.
2. Votava M a kol., Lékařská mikrobiologie speciální, 2003.
3. Laing KJ, Ouwendijk WJD, Koelle DM, Verjans GMGM. Immunobiology of Varicella-Zoster Virus Infection. J Infect Dis. 2018 Sep 22; 68-S74.
4. Griffiths P, Baraniak I, Reeves M. The pathogenesis of human cytomegalovirus. J Pathol. 2015 Jan;235(2):288-97.
5. Fajfr M, Štěpánová V, Herpesviry a rezistence k antivirotické terapii. Klin FarmakolFarm 2017,27-30.
6. Suzich JB, Cliffe AR. Strength in diversity: Understanding the pathways to herpes simplex virus reactivation. Virology. 2018 Sep;522:81-91.
7. https://www.creative-biolabs.com/vaccine/vaccines-for-virus-from-herpesviridae-family.html

Molekulární diagnostika virového onemocnění covid-19 v laboratorní praxi

Barbora Macúchová, Hana Bílková Fránková

V roce 2019 se v Číně objevil nový koronavirus, příbuzný viru SARS, způsobující respirační onemocnění až vážné plicní pneumonie. Virus byl nazván SARS-CoV-2 a pro jeho senzitivní a specifickou diagnostiku byla využívána metoda RT-PCR. Metoda je závislá na správném provedení odběru, vysoce kvalifikovaném laboratorním personálu a zodpovědné interpretaci výsledků. Článek popisuje cestu vzorku z odběrového místa až po vydání výsledků a ukazuje kritické fáze celého procesu.

Molecular diagnostics of the viral disease covid-19 in laboratory practice

In 2019, a new coronavirus appeared in China, a relative of the SARS virus, causing respiratory disease up to severe lung pneumonia. The virus was named SARS-CoV-2 and the RT-PCR method was used for its sensitive and specific diagnosis. The method depends on the correct sampling, highly qualified laboratory personnel and responsible interpretation of the results. The article describes the path of the sample from the collection point to the release of the results and shows the critical stages of the entire process.

Úvod

Virus SARS-CoV-2 se za čtyři měsíce od svého prvního popsání rozšířil prakticky po celé planetě a vyvolal pandemii, která trvá v některých zemích i v současné době. Onemocnění virem se projevuje symptomy jako je kašel, horečka, bolest v krku, bolest svalů, ztráta čichu, bolest hlavy a v krku. Onemocnění může přejít do akutní plicní nedostatečnosti a postihovat také další orgány. (1) Rychlé rozšíření viru bylo výzvou pro vytvoření rychlé, specifické a senzitivní diagnostiky, jejímž zlatým standardem stále zůstává real-time RT-PCR (polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí). Pro rychlou diagnostiku s výsledkem do desítek minut je možné využít antigenní testy, které ale mají nižší senzitivitu. Konfirmace výsledku antigenního testu není již nutné konfirmovat pomocí PCR, ale stále je vhodné využít PCR testu pro ověření. Na provedení tohoto testu je potřeba žádanky od lékaře, případně si test zaplatit jako samoplátce (2).

Klíčová slova:
covid-19
SARS-CoV-2
molekulární biologie
virová nákaza
moderní technologie v mikrobiologii

Key words:
covid-19
SARS-CoV-2
molecular biology
viral infection
modern technology in microbiology

Preanalytická fáze

Důležitým bodem v diagnostice SARS-CoV-2 je preanalytická fáze, tedy odběr vzorku a jeho následné uchovávání při transportu do laboratoře. Podle doporučení CDC je při odběru nejdůležitější odebrat vzorek ze správné lokality (nos, krk, tracheální trubice), použít pro odběr standardizovaný materiál a odběr zbytečně neuspěchat (je doporučeno držet odběrový tampon na místě pár sekund a několikrát jej protočit). Po odběru je nutné vzorek umístit do VTM – transportního média pro viry (3). Lze použít také UTM – univerzální transportní médium, které je vhodné i pro odběr na PCR vyšetření pro chřipku, RSV, ***Chlamydia pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae*** a jiné původce respiračních onemocnění (4,5).

Pro počáteční fáze onemocnění je doporučeno odebrat vzorky z horních cest dýchacích. Společný odběr z nasofaryngu a orofaryngu zvyšuje senzitivitu vyšetření. Oba odběrové tampony je možné umístit do společné zkumavky s transportním médiem. Pro zvýšení komfortu testování byly také použity odběry ze slin. Pro pozdější fáze onemocnění nebo v případech kdy je pacient SARS-CoV-2 negativní i přes klinické příznaky, jsou vhodnější vzorky z dolních cest dýchacích – sputa, endotracheální aspirát nebo bronchoalveolární laváž. (6).

Vzorky by měly dorazit do laboratoře co nejdříve po odebrání a měly by být přepravovány při teplotě 2—8 ºC (WHO, CDC). Teplota a čas nejsou nejdůležitější část preanalytické fáze. Pokud nedochází k extrémním výkyvům teplot (nad 37 ºC), jsou vzorky schopny vydržet při pokojové teplotě až 5 dní, ačkoliv chlazení vzorků v lednici zajišťuje vyšší reprodukovatelnost výsledků. U vzorků s malou virovou náloží (asymptomatičtí pacienti, začátek/konec onemocnění) je nejkritičtější právě samotný odběr, který při nesprávném provedení generuje falešně negativní výsledky (7, 8).

Analytická fáze

Největší vliv na výsledek RT-PCR analýzy má samotná extrakce nukleových kyselin viru – jejich kvalita a kvantita. Nejčastěji interferuje DNA a proteiny, které se izolují spolu s RNA a snižují efektivitu reakce. Zvolení vhodné extrakční procedury je klíčové pro získání kvalitních výsledků. Můžeme se setkat se dvěma hlavními přístupy – extrakce na kolonkách a extrakce s pomocí magnetických částic. Oba přístupy je možné automatizovat, ale rozšířenější jsou automaty na principu magnetických částic, které zvládnou izolovat 96 vzorků v řádu desítek minut.

Metoda spočívá ve smíchání pacientského vzorku s lyzačním roztokem. Pro velkokapacitní testování se využívá formát 96 jamkové destičky, kde se souběžně izoluje 94 pacientských vzorků, negativní kontrola a pozitivní kontrola. Lyzační roztok obsahuje látky porušující virové obaly pro uvolnění nukleové kyseliny a také proteiny, které denaturují RNázy – enzymy degradující RNA. Lyzát je následně obohacen o magnetické částice, které jsou uchovávány v roztoku ethanolu. Za stálého promíchávání na magnetické částice adsorbuje RNA a po dostatečné inkubaci je celá deska přenesena na magnetický podstavec, který stáhne magnetické částice ke dnu, aby bylo možné odsát zbytek lyzátu. Částice jsou několikrát promyty roztokem ethanolu, a nakonec je RNA eluována do PCR vody bez RNáz. (9)

V průběhu extrakce se mohou do vzorku RNA dostat také kontaminanty jako je ethanol, fenol, soli a zbytky magnetických částic – všechny tyto látky narušují průběh reakce. V takovém případě je vzorek nutné izolovat znovu. (5).

Molekulární diagnostika – detekce nukleových kyselin

SARS-CoV-2 je obalený, jednovláknový RNA virus s pozitivní polaritou a relativně velkým genomem (30 kb). Cíle RT--PCR analýzy jsou nejčastěji geny pro ORF1ab, nukleokapsid (N), obal (E), RNA--dependentní RNA polymeráza (RdRp) a spike (S), na které jsou designované primery. V prvních publikacích byl pro odvození primerů na SARS-CoV-2 použit gen S, protože byl specifický pro tento konkrétní typ koronaviru a nesdílel podobnost s geny jiných lidských koronavirů (10). Primery pro ORF1ab, N a RdRp mají vyšší senzitivitu a specifitu než S a E, které se používají pro obecnější screening a v analýze jsou vždy doplněny jedním z prvních tří jmenovaných (11). CDC doporučuje využívat primery pro N gen (N1 a N2), zatímco WHO doporučuje kombinaci primerů pro RdRp spolu s E. Ačkoliv se jedná o variabilní regiony, není tím zasažena citlivost primerů právě kvůli použití dvou různých genů pro detekci přítomnosti SARS-CoV-2. Je však stále nutné sledovat nové varianty viru, protože časem může dojít k natolik významné mutaci, že ovlivní navazování primerů. (12). WHO také doporučuje použití primerů pro gen S, který kóduje povrchový spike protein, zodpovědný za navázání viru na receptory buněk. Jedná se o intenzivně mutující region v genomu, a právě primery na jednotlivé mutace umožnily použití diskriminační PCR pro rozlišení jednotlivých variant koronaviru. (13).

rRT-PCR je doslovně polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí v reálném čase. Reverzní transkripce je proces, kdy se RNA viru přepisuje do cDNA, protože DNA polymeráza potřebuje jako templát dvouvláknovou nukleovou kyselinu. Diagnostické kity na většinu RNA virů kombinují reverzní transkripci spolu se samotnou polymerázovou řetězovou reakcí. Transkripce trvá obvykle 10—20 minut, zatímco PCR 60—120 min, čas je u každého výrobce odlišný. (14, 15).

Výsledek je odečten pomocí amplifikační křivky kdy, pokud je vzorek pozitivní, s každým cyklem reakce roste také fluorescence vzorku snímaná přístrojem. V případě negativity je přítomna pouze amplifikační křivka pro interní kontrolu, která se do reakce přidává pro kontrolu izolace a inhibice. V případě nepřítomnosti interní kontroly je nutné analýzu opakovat a pokud nevyjde ani poté, je třeba znovu odebrat vzorek pacienta. Pozitivní vzorky by měly mít Ct (cyklus reakce ve kterém se fluorescence zvýšila natolik, že vzorek prošel přes threshold) 40. Vzorky s Ct nad 40 jsou považovány za negativní, pokud nejsou známy bližší okolnosti ohledně pacienta (nemocný člen rodiny, diagnostické příznaky). Vzorky s Ct mezi 37—40 se také obvykle testují podruhé, v případě že i podruhé vyjdou stejně, opět se doporučuje opětovné odebrání vzorku. Rozpor mezi výrobci (negativní výsledek nad Ct 40, ideální je i takové vzorky opakovaně testovat) a doporučením MZ ČR (negativní výsledek nad Ct 35 při splnění určitých podmínek) vedl k tomu, že většina laboratoří přistoupila k jisté „střední cestě“ a došlo k vytvoření interních manuálů upravujících postup při nejasném výsledku testu. Při nastavování thresholdu (prahová hodnota, při které signál ze vzorku vystoupá nad měřený šum)

je nutné vzít do úvahy také aktuální epidemiologickou situaci. V případě mohutného rozšíření nemoci budou pravděpodobně pozitivní i vzorky s vysokým Ct, zatímco v době malého rozšíření by měly být Ct hodnoty nižší. (5).

Ct a virová nálož

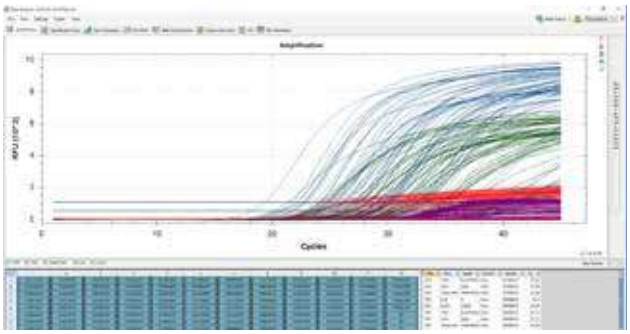
Data naznačují, že virová nálož je u pacienta nejvyšší v době nástupu symptomů a klesá jeden až tři týdny. Obecně po dvou týdnech (průměrně po 14,5 dnech) od nástupu symptomů bychom již ve vzorcích z horních cest dýchacích neměli detekovat přítomnost virové RNA, ačkoliv toto je u každého pacienta individuální. Ve vzorcích z dolních cest je možné RNA viru detekovat o něco déle (15,5 dne), jelikož pík virémie přichází později a virus zde přežívá déle. Vztah mezi virovou náloží, infekčností a detekovatelností SARS-CoV-2 není plně objasněn, jelikož přítomnost virové RNA ještě neznamená přítomnost živého viru. Studie ukazují, že covidoví pacienti mohou být infekční jeden až tři dny před nástupem příznaků a životaschopný virus byl izolován ze vzorků pacientů až šest dní před nástupem příznaků. Některé studie dokonce uvádějí izolaci viru i po 18 dnech. Virové nálože u symptomatických a asymptomatických pacientů se příliš neliší, ale je složité odlišit, jestli došlo k nákaze pre-symptomatickým nebo asymptomatickým člověkem (16). Doporučení ohledně izolace pozitivních se různí – WHO doporučuje 10 dní po pozitivním testu bez ohledu na to, zda má člověk příznaky (17). CDC doporučuje 5 dní izolace a minimálně dalších 5 dní striktního nošení respirátoru a v ČR je doba izolace 7 dní po pozitivním testu. Po rozšíření varianty Omikron se izolační doby zkrátily, protože nejčastěji docházelo k nákaze 1—2 dny před symptomy a 2—3 dny po nich (https://www.cdc.gov/media/releases/2021/s1227-isolation-quarantine-guidance.html, https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/coronavirus-disease-covid-19-home-care-for-families-and-caregivers https://covid.gov.cz/situace/onemocneni-obecne-o-opatrenich/izolace).

Virová nálož je spjata s hodnotou Ct, ale v kvalitativním rozlišení reakce (tzn. nemáme v každé reakci přesný kalibrátor) vypovídá o kvantitě pouze orientačně. Bez dalších souvislostí a informací nemůžeme považovat Ct hodnotu za rozhodující faktor pro určení skutečné pozitivity či negativity). Vysoké hodnoty Ct (nad 35) jsou odrazem množství viru vyizolovaného ze vzorku odebraného v určitém momentu. Může se jednat jak o začátek onemocnění, tak o jeho konec a také nemůžeme vyloučit chybu při odběru nebo samotném zpracování. Za pravděpodobně neinfekční mohou být považováni pacienti s Ct nad 35 pouze pokud jim byla již dříve prokázána pozitivita na covid (s odstupem max. 1 měsíc), mají pozitivní nález IgG protilátek na covid, nejsou v riziku reinfekce a nejsou imunitně kompromitovaní.

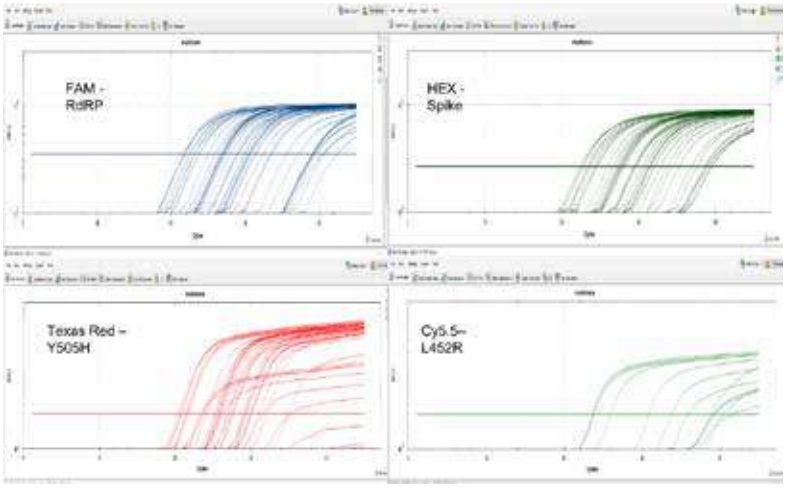
https://ppo.mzcr.cz/upload/files/narodni-strategie-testovani-onemocneni-covid-19-a-ostatni-dokumenty-komentar-k--interpretaci-slabe-pozitivnich-nalezu--metodou-pcr-s-vysokymi-hodnotami-ct--6061f4519a6d3.pdf

V prosinci loňského roku se objevila varianta Omikron a vytlačila všechny ostatní cirkulující varianty v populaci. Přibylo nakažených očkovaných pacientů oproti variantě Delta, ale tito lidé nebyli tak často hospitalizováni na jednotkách intenzivní péče a nemoci nepodléhali.

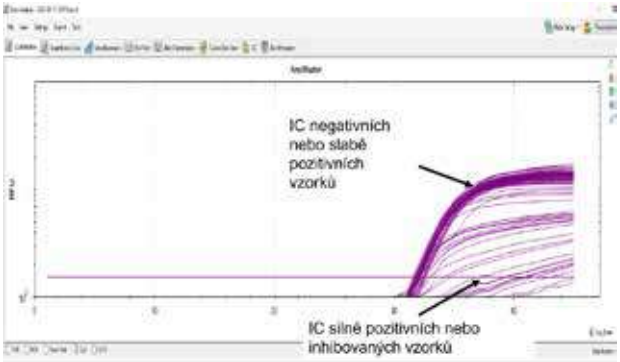
Obr. 1 *Surová data po ukončení RT-PCR analýzy covidu na 5 fluorescenčních kanálech. V každé analýze je možné pustit až 94 vzorků a k nim dvě kontroly – pozitivní a negativní. Na obrázku jsou data v lineárním módu, pro samotné vyhodnocení se spíše využívá logaritmický mód.*



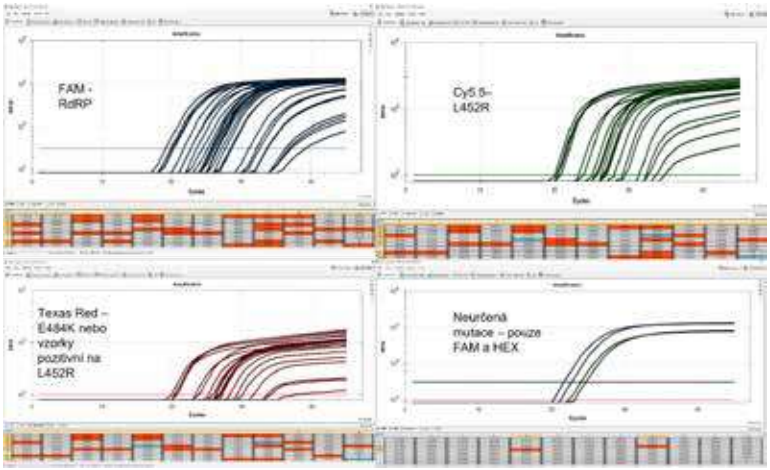
Obr. 2 *Pohled na jednotlivé fluorescenční kanály, na kterých je vyhodnocována pozitivita vzorku, případně mutace. Kanál FAM a HEX slouží pro určení pozitivity a odečtení Ct hodnot pro vzorky. Kanál Texas Red detekuje přítomnosti mutace Y505H typickou pro variantu Omikron (obě verze, jak BA.1 tak BA.2) a kanál Cy5.5 přítomnost (v dnešních dnech již nerozšířené) mutace L452R varianty delta. Při detekci mutace L452R dochází k nárůstu signálu také v kanálu Texas Red, proto je před odečtem z kanálu Texas Red nutné nejdříve odfiltrovat vzorky pozitivní v kanálu Cy5.5.*



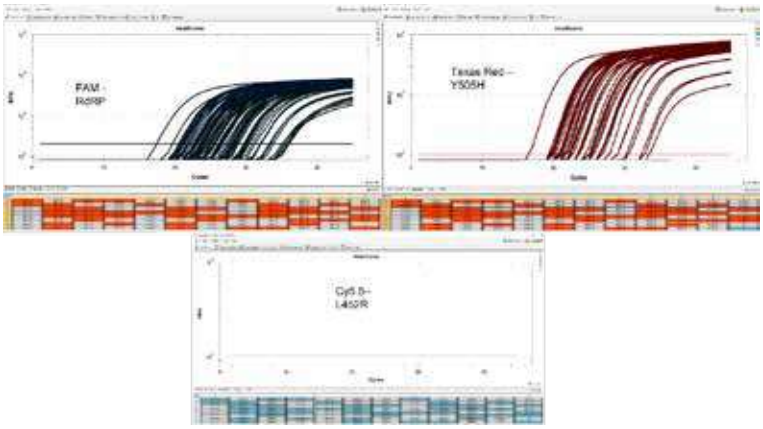
Obr. 3 *Pátý fluorescenční kanál Cy5 je vyhrazen interní kontrole (IC) izolace. Ta musí vyjít u všech negativních vzorků, u pozitivních bývá deformovaná. Deformace nebo nepřítomnost IC u negativního vzorku je důvod k opětovné izolaci a re-analýze vzorku. Pokud se ani po druhé neprokáže přesvědčivě pozitivita nebo negativita s dobrou interní kontrolou, je vyžadován nový odběr od pacienta z důvodu přítomnosti inhibitorů ve vzorku. Při odběrech slin je častá inhibice z důvodu nedodržení podmínek před samotných odběrem (konzumace potravin, nápojů, kouření nebo kloktání).*



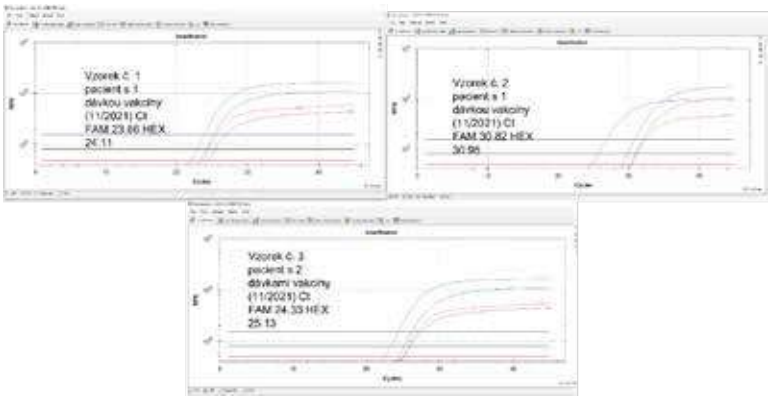
Obr. 4 *Použití aditiva DB-1244 COVID-19 Additive S:L452R|E484K, kde na kanálu Texas Red detekujeme mutaci E484K, případně pozitivní L452R. Na začátku tohoto roku se začaly objevovat vzorky, kde se s pomocí této soupravy mutace určit nedala. Byly to první případy varianty Omikron, která během pár týdnů převládla.*



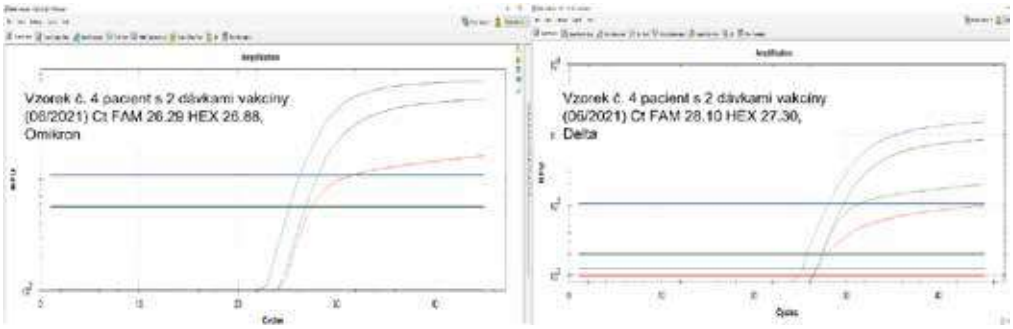
Obr. 5 *Rychlý nástup převahy varianty omikron. Analýza Obr. 4 proběhla 3.1. 2022 a analýza Obr. 5 21.1. 2022. Omikron se udržuje jako převládající varianta a na detailnějších diskriminačních PCR je možné rozlišit varianty BA.1 a BA.2. Většina vzorků, u kterých nevyjde mutace Y505H v první RT-P-CR reakci, jsou později identifikovány jako BA.2.*



Obr. 6 *Očkovaní nakažení omikronem mají relativně vysoké Ct hodnoty, bez ohledu na počet dávek vakcíny.*



Obr. 7 *Pacient s druhou dávkou vakcíny (17. 6. 2021), Ct hodnoty po infekci variantou Delta (14. 10. 2021) a Omikronem (28. 2. 2022). Ct hodnoty se výrazně neliší.*



Nebyl prokázán významný rozdíl v Ct hodnotách mezi jednotlivými variantami mezi očkovanými a neočkovanými. U varianty Delta byl menší záchyt viabilního viru ze vzorků u pacientů s boosterem, zatímco u Omikronu neměla vakcinace na záchyt infekčního viru vliv (17).

Většina laboratoří při interpretaci výsledků z analýzy všechny tyto informace o pacientovi nemá, proto ke všem vzorkům s hodnotami Ct mezi 35—40 přistupují obezřetně a často přihlížejí k doplňkovým informacím na žádankách od lékařů. Je však nutné mít na paměti, že při kvantu vzorků, které byly zpracovávány na vrcholu covidových vln je nemožné se každému vzorku věnovat dopodrobna. V naší laboratoři jsme zpracovali maximálně téměř 5 000 vzorků za den.

Přílohy – RT-PCR v praxi

Na všech vyobrazených fotkách z reálných analýz je použit PCR kit české firmy DIANA Biotechnologies s.r.o. (https://www.dianabiotech.com/), konkrétně souprava DB-1211 covid-19 Multiplex RT-PCR Kit v kombinaci s příslušnými aditivy, což jsou primery pro detekci mutací. Velkou výhodou tohoto kitu je možnost detekovat kromě genů pro RdRp a Spike také alespoň dvě mutace, v závislosti na přidaném aditivu (E484K – Jihoafrická mutace, L452R – delta, Y505H – omikron).

Závěr

Za dva roky soužití s covidem-19 byl vyvinut unikátní systém analýzy, kde je dbáno na kvalitu ve všech krocích zpracování vzorků. Pro správný výsledek je důležitá celá cesta vzorku – od odběru až po samotné vyhodnocení. Naprosto kritickou fází je právě odběr vzorku, který je ovlivněn i samotným pacientem. Obzvláště odběry slin jsou na jakoukoliv konzumaci nápojů, jídel nebo kouření velmi citlivé, a v případě že pacient nedodrží podmínky před odběrem, pak dochází k znehodnocení vzorku a laboratoř ho není schopna vyšetřit. Pokud plánujeme test na covid-19 před cestou do zahraničí, je nutné dbát všech pokynů odběrového místa.

Ačkoliv pandemie onemocnění SARS-CoV-2 slábne, je třeba mít neustále na paměti, s jakou rychlostí se toto onemocnění bylo schopno šířit a mutovat. Přes všechno zlé nám pandemie ukázala sílu molekulárně biologických vyšetření, které se za ten krátký čas posunuly k prakticky plné automatizaci, a díky tomu bylo možné zpracovávat najednou tisíce vzorků v krátkém čase. Laboratoře velmi rychle reagovaly a přešly od ruční

izolace k nízkokapacitním izolátorům, k automatům až ve finální fázi se ukázala jako nejlepší cesta kombinace automatických pipetorů s vysokokapacitními izolátory. Rychlé reakce výrobců kitů zajistily dobrý přehled laboratoří o cirkulujících mutacích a jejich rozšíření. Po této zkušenosti se také zvýšilo povědomí veřejnosti o molekulárně diagnostických metodách a o práci v klinických laboratořích, bez kterých by nebylo možné toto onemocnění sledovat.

Poděkování

Obrázky z analýz pochází ze společnosti skupiny laboratoří Agellab.

Poděkování patří všem, co se podíleli na testování, laborantům, řidičům, sanitářům, dodavatelům, odborným pracovníkům, brigádníkům a odběrovým pracovníkům.

KONTAKTNÍ ÚDAJE:
Mgr. Barbora Macúchová
Laboratoře AGEL a.s.
Laboratoř klinické mikrobiologie, pracoviště Ostrava-Vítkovice
Zalužanského 1192/15, 703 84 Ostrava – Vítkovice
e-mail: barbora.macuchova@lab.agel.cz

Literatura

1. Kevadiya, B. D., Machhi, J., Herskovitz, J., Oleynikov, M. D., Blomberg, W. R., Bajwa, N., Soni, D., Das, S., Hasan, M., Patel, M., Senan, A. M., Gorantla, S., McMillan, J., Edagwa, B., Eisenberg, R., Gurumurthy, C. B., Reid, S., Punyadeera, C., Chang, L., & Gendelman, H. E. (2021). Diagnostics for SARS--CoV-2 infections. Nature materials, 20(5), 593–605. https://doi.org/10.1038/s41563-020-00906-z

2. https://covid.gov.cz/situace/testovani/jak-se-nechat-otestovat

3. https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html

4. https://nvrl.ucd.ie/sites/default/files/uploads/pdfs/UTM-RT_Flocked_Polyester_Swabs.pdf

5. Rahbari, R., Moradi, N., & Abdi, M. (2021). rRT-PCR for SARS-CoV-2: Analytical considerations. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry, 516, 1–7. https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.01.011

6. https://www.who.int/publications/i/item/diagnostic-testing-for-sars-cov-2

7. Basso D, Aita A, Navaglia F, Franchin E, Fioretto P, Moz S, Bozzato D, Zambon CF, Martin B, Dal Prà C, Crisanti A, Plebani M. SARS-CoV-2 RNA identification in nasopharyngeal swabs: issues in pre-analytics. Clin Chem Lab Med. 2020 Jun 22;58(9):1579-1586. doi: 10.1515/cclm-2020-0749. PMID: 32573469.

8. Melina Hardt, Esther Föderl-Höbenreich, Stephanie Freydl, Antonio Kouros, Martina Loibner, Kurt Zatloukal, Pre-analytical sample stabilization by different sampling devices for PCR-based COVID-19 diagnostics, New Biotechnology, 2022, ISSN 1871-6784, https://doi.org/10.1016/j.nbt.2022.04.001. (https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871678422000279)

9. Klein S, Müller TG, Khalid D, Sonntag-Buck V, Heuser AM, Glass B, Meurer M, Morales I, Schillak A, Freistaedter A, Ambiel I, Winter SL, Zimmermann L, Naumoska T, Bubeck F, Kirrmaier D, Ullrich S, Barreto Miranda I, Anders S, Grimm D, Schnitzler P, Knop M, Kräusslich HG, Dao Thi VL, Börner K, Chlanda P. SARS-CoV-2 RNA Extraction Using Magnetic Beads for Rapid Large-Scale Testing by RT--qPCR and RT-LAMP. Viruses. 2020 Aug 7;12(8):863. doi: 10.3390/v12080863. PMID: 32784757; PMCID: PMC7472728.

10. Zhou, P., Yang, X. L., Wang, X. G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H. R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C. L., Chen, H. D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R. D., Liu, M. Q., Chen, Y., Shen, X. R., Wang, X., Zheng, X. S., … Shi, Z. L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. Nature, 579(7798), 270–273. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7

11. Li, D., Zhang, J., & Li, J. (2020). Primer design for quantitative real-time PCR for the emerging Coronavirus SARS-CoV-2. Theranostics, 10(16), 7150–7162. https://doi.org/10.7150/thno.47649

12. Peñarrubia, L., Ruiz, M., Porco, R., Rao, S. N., Juanola-Falgarona, M., Manissero, D., López-Fontanals, M., & Pareja, J. (2020). Multiple assays in a real-time RT-PCR SARS-CoV-2 panel can mitigate the risk of loss of sensitivity by new genomic variants during the COVID-19 outbreak. International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases, 97, 225–229. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.06.027

13. Mohamadian, M., Chiti, H., Shoghli, A., Biglari, S., Parsamanesh, N., & Esmaeilzadeh, A. (2021). COVID-19: Virology, biology and novel laboratory diagnosis. The journal of gene medicine, 23(2), e3303. https://doi.org/10.1002/jgm.3303

14. Caruana G, Croxatto A, Coste AT, Opota O, Lamoth F, Jaton K, Greub G. Diagnostic strategies for SARS-CoV-2 infection and interpretation of microbiological results. Clin Microbiol Infect. 2020 Sep;26(9):1178-1182. doi: 10.1016/j.cmi.2020.06.019. Epub 2020 Jun 25. PMID: 32593741; PMCID: PMC7315992.

15. Corman, Victor M et al. "Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR." Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin vol. 25,3 (2020): 2000045. doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045

16. Walsh, K. A., Jordan, K., Clyne, B., Rohde, D., Drummond, L., Byrne, P., Ahern, S., Carty, P. G., O'Brien, K. K., O'Murchu, E., O'Neill, M., Smith, S. M., Ryan, M., & Harrington, P. (2020). SARS-CoV-2 detection, viral load and infectivity over the course of an infection. The Journal of infection, 81(3), 357–371. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.06.067

17. World Health Organization. (2020). Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance, 2 March 2020. World Health Organization. https://apps.who.int/iris/handle/10665/331329

18. Fall, A., Eldesouki, R. E., Sachithanandham, J., Paul Morris, C., Norton, J. M., Gaston, D. C., Forman, M., Abdullah, O., Gallagher, N., Li, M., Swanson, N. J., Pekosz, A., Klein, E. Y., & Mostafa, H. H. (2022). A Quick Displacement of the SARS-CoV-2 variant Delta with Omicron: Unprecedented Spike in COVID-19 Cases Associated with Fewer Admissions and Comparable Upper Respiratory Viral Loads. medRxiv : the preprint server for health sciences, 2022.01.26.22269927. https://doi.org/10.1101/2022.01.26.22269927

Dalším vzácným nálezem laboratoře klinické mikrobiologie v Ostravě Vítkovicích byl původce tetanu

Dominika Riedlová

Klíčová slova:
tetanus
Clostridium tetani
tetanospasmin
tetanolyzin

Key words:
tetanus
Clostridium tetani
tetanospasmin
tetanolyzin

V některém z předchozích čísel časopisu InLab se čtenáři mohli dočíst o vzácném nálezu ***Cryptococcus neoformans***, který byl v naší laboratoři prokázán z likvoru. S dalšími vzácnými nálezy pokračujeme, tentokrát se nám podařilo vykultivovat původce tetanu, ***Clostridium tetani***.

Clostridium tetani je původcem onemocnění, známého jako tetanus. Je jedním ze 4 nejznámějších patogenů z rodu Clostridium, produkujících toxiny. Ačkoliv zavedení povinného očkování a jeho rozšíření celosvětově snížilo ohrožení tímto onemocněním, je tetanus stále brán jako potencionálně fatální stav. Proto je důležité včas rozpoznat klinické příznaky a zahájit okamžitou léčbu.

Jedná se o anaeorbní, šíthlou grampozitivní tyčinku, která je známá pro svoji schopnost tvořit toxiny a také spory, které jsou odolné vůči vysokým teplotám, vyschnutí i přítomnosti kyslíku. Spory se vyskytují v půdě, popelu, dále ve střevním traktu člověka a zvířat. Najít je můžeme také na povrchu zrezivělých nástrojů, jako jsou hřebíky a ostnatý drát a jsou také velmi dobře odolné proti dezinfekčním prostředkům. Na jejich jednom konci je přítomna terminální spora, proto svým tvarem často připomíná paličku na buben. Dle Grammova barvení se barví tedy do modra (1).

Obr. 1 *Mikroskopický obraz Cl. tetani*

Obr. 2 *Mikroskopický obraz Cl. tetani II*

Clostridium tetani při svém růstu produkuje dva toxiny, tetanospasmin vyvolávající klasické klinické příznaky nemoci a tetanolyzin, který působí destruktivně na erytrocyty a další buňky.

Zdrojem infekce u většiny lidí je rána, kdy se spory dostanou do organismu, většinou při poraněních doprovázených

zhmožděním a nekrózou tkáně. Vstupní branou mohou být také bércové vředy, operační rány, popáleniny nebo pupečník. Může se vyvinout také u intravenózních uživatelů drog.

Většina případů tohoto onemocnění se objevuje v rozvojových zemích, kde lidé nejsou očkovaní a v oblastech, kde došlo k přírodním katastrofám. Spory jsou přítomny v prostředí bez ohledu na zeměpisnou polohu. Ke vzniku tetanu jsou náchylné všechny věkové skupiny, pokud není zahájena okamžitá léčba, úmrtnost je velmi vysoká. V rozvojových zemích je zvýšen výskyt novorozeneckého tetanu, kdy se při stříhání pupeční šňůry používají nesterilní nástroje (2).

Po zanesení spor do hlubších částí rány bez přístupu vzduchu dojde k jejich vyklíčení a přeměně na vegetativní buňky, které se začnou množit a začnou produkovat toxiny. Tetanospasmin je syntetizován jako protein, složený z částí A, B a C. Právě části B a C jsou zodpovědné za průnik toxinu k cílovým místům, část A je hlavní účinnou složkou tetanospasminu. Z místa infekce se toxin dostává do krve a lymfy, kde je vychytáván na presynaptických zakončeních periferních motorických neuronů. Poté se retrográdně přenese uvnitř axonu do CNS. Toxin působí nejvíce na úrovni mozkového kmene a míchy, kde blokuje uvolňování inhibičních mediátorů na synapsích, což vede k svalovým křečím.

Inkubační doba tetanu se pohybuje v rozmezí 3 až 21 dní, nejčastěji činí 8 dní. Generalizovaná forma onemocnění manifestuje většinou bez prodromů zvýšeným napětím žvýkacích svalů s omezením otevírání úst, stahy mimického svalstva, spasmy hltanu s problematickým polykáním a strnulým svalstvem šíje. Poté dochází ke kontrakturám svalů trupu a končetin, generalizovaným tonickým křečím, kdy se tělo napíná do oblouku. Nemocný je plně při vědomí a křeče jsou pro něj silně bolestivé a úzkostné. Onemocnění se může zkomplikovat nejčastěji pneumonií.

Vzácnější formou je lokalizovaný tetanus, jehož příznaky jsou od začátku omezeny jen na určité svalové skupiny. Například cefalický tetanus s postižením svalstva inervovaným mozkovými nervy (1).

Novorozenecký tetanus vzniká po infekci pupečního pahýlu. Mortalita této formy je minimálně 90 %. Ke smrti v prvním týdnu dochází při zástavě dechu, v druhém týdnu od narození je příčinou sepse. Novorozenecký tetanus je problémem hlavně v rozvojových zemích, kdy je pupeční šňůra stříhána nesterilními nástroji nebo při porodu, kdy není provedena dostatečná hygiena porodníka (3).

Mezi komplikace, které mohou vzniknout během tetanu, patří zástava dechu, zlomeniny, kóma, poškození nervů, hypoxické poškození, srdeční arytmie a hypertenze, také paralytický ileus.

Metody laboratorního průkazu ***Cl. tetani*** zahrnují kultivaci, průkaz toxinu pokusem na zvířeti a molekulárně genetické vyšetření pomocí metody PCR. V naší laboratoři bylo ***Clostridium tetani*** prokázáno kultivačně.

Akutní léčba tetanu by se měla soustředit na zmírnění toxinů a agresivní léčbu symptomů včetně ochrany dýchacích cest. Rána, která je vstupní branou infekce, by měla být okamžitě řádně očištěna, aby se zabránilo dalšímu šíření

toxinu do krevního řečiště. Pacient by měl být umístěn v tichém, zatemněném prostředí. Cílem je neutralizace toxinu, proto se zahajuje aktivní imunizace tetanickým anatoxinem, jednorázově se podává hyperimunní lidský antitetanický imunoglobulin. Ke kontrole a tlumení křečí mohou být použity benzodiazepiny.

Tetanus je onemocnění, kterému lze zabránit očkováním. Vakcíny obsahují tetanový toxoid (TTCV).

Vakcína proti tetanickému toxinu byla poprvé vyrobena v roce 1924 a poprvé použita byla mezi vojáky v období druhé světové války. V současné době je k dispozici pětivalentní vakcína proti záškrtu, tetanu, pertusi, hemofilu B a hepatitidě B, která je nejčastěji používanou dětskou vakcínou na světě.

Vzhledem k tomu, že se ***Clostridium tetani*** běžně vyskytuje v prostředí, a tudíž nelze riziko infekce eradikovat, je důraz kladen na systematické očkování obyvatelstva tetanickým anatoxinem. Anatoxin po aplikaci 3 dávek vydrží spolehlivě chránit člověka 12–15 let. Také je zavedena imunoprofylaxe při úrazech, poraněních, nehojících se ranách a před některými léčebnými výkony. V ČR se tetanus vyskytuje již ojediněle, okolo 0–3 případů ročně. Naposled bylo hlášeno úmrtí muže na tetanus v roce 2015, jenž nebyl očkován.

Do laboratoře klinické mikrobiologie v Ostravě-Vítkovicích byl v květnu přijat stěr z rány od pacientky (nar. 1961) odebraný na chirurgické ambulanci. Lokalita odběru nebyla specifikována. Základní bakteriologické vyšetření stěru z rány spočívá v mikroskopii, aerobní a anaerobní kultivaci, následné identifikaci a stanovení antimikrobiální citlivosti. Co se týká aerobní kultivace, byl identifikován Citrobacter freundii a Enterococcus faecalis. Anaerobní kultivace po 48 hodinách byla velmi překvapivá. Kromě přítomného ***Clostridium perfringens*** a ***Clostridium bifermentans*** bylo identifikováno také ***Clostridium tetani***. Z narostlých kolonií na Wilkins Chalgrenově agaru byl zhotoven mikroskopický preparát, který byl nabarven pomocí Grammova barvení, v němž byly nalezeny G+ tyčky s uloženou terminální sporou, typicky pro ***Cl. tetani*** jak bylo zmíněno výše. Byla provedeno také stanovení citlivosti, testován byl penicilin, aminopenicilin s inhibitorem, klindamycin a metronidazol. Všechny tyto preparáty byly interpretovány jako citlivé.

Výsledek byl neprodleně hlášen do chi-

Obr. 3 *Vzhled kolonií Cl. tetani na Wilkins-Chalgren agaru*

Obr. 4 *Stanovení citlivosti Cl. tetani gradientovou difúzní metodou*

rurgické ambulance, kde byl stěr odebrán. Po konzultaci s lékařem bylo zjištěno, že se pacientka poranila při práci s kultivátorem na zahradě. Došlo k poranění prstu na ruce, kdy bylo nutno prst amputovat. Pacientka však byla očkovaná proti tetanu, tudíž se u ní příznaky nevyvinuly. K doléčení dalších nálezů byla podána kombinace antibiotik po předchozí konzultaci s antibiotickým střediskem. V odebraných kontrolních stěrech po léčbě již ***Cl. tetani*** nebylo prokázáno.

V naší laboratoři v Ostravě-Vítkovicích je to historicky první nález této bakterie, a proto jej tedy považujeme za vzácný, v dnešní době téměř raritní. Této zkušenosti si nesmírně vážíme a kmen byl ihned zamražen a uschován do naší sbírky kmenů.

KONTAKTNÍ ÚDAJE:
Mgr. Dominika Riedlová
Laboratoře AGEL a.s.
Laboratoř klinické mikrobiologie
Pracoviště Ostrava-Vítkovice
Zalužanského 1192/15,
703 00 Ostrava-Vítkovice
e-mail: dominika.riedlova@lab.agel.cz

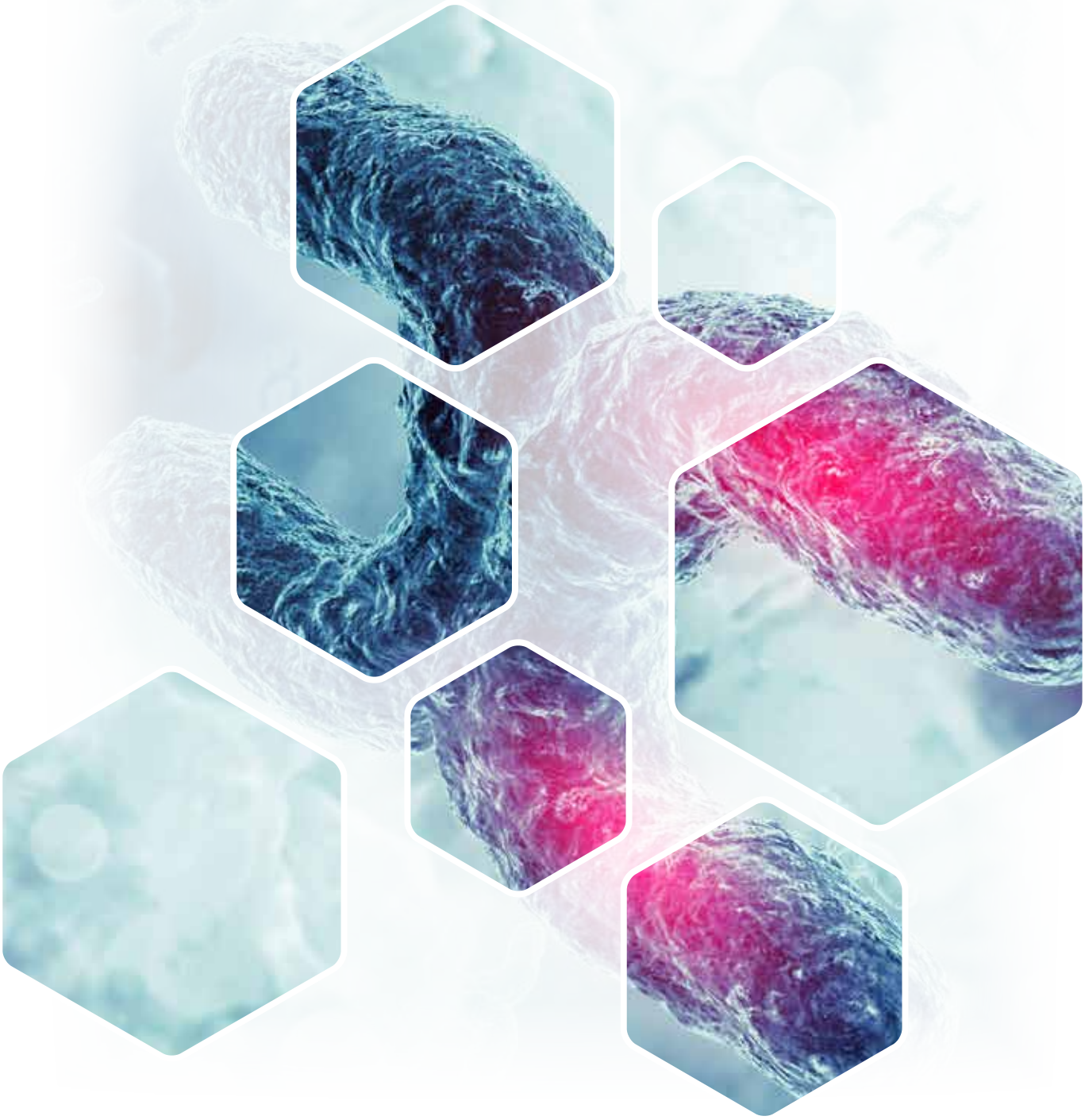
Literatura

1. SHARMA, Deepak a Mit SHAH. A Rare Case of Localized Tetanus. Indian Journal of Critical Care Medicine [online]. 2018, 22(9), 678-679 [cit. 2020-08-30]. DOI: 10.4103/ijccm.IJCCM_182_18. ISSN 0972-5229. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6161583/

2. TADELE, Henok, Laura TEISCH, Casey J. ALLEN a Gabriel RUIZ. Clinical profile and outcome of pediatrics tetanus: the experience of a tertiary hospital in Ethiopia. Ethiopian Journal of Health Sciences [online]. 2017, 27(5), 559-564 [cit. 2020-08-30]. DOI: 10.4314/ejhs.v27i5.14. ISSN 1029-1857. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5615017/

3. NJUGUNA, Henry N., Nasir YUSUF, Azhar Abid RAZA, Bilal AHMED a Rania A. TOHME. Progress Toward Maternal and Neonatal Tetanus Elimination — Worldwide, 2000–2018. MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report [online]. 2020, 69(17), 515-520 [cit. 2020-09-27]. ISSN 0149-2195. Dostupné z: doi:10.15585/mmwr.mm6917a2

MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE A CYTOGENETIKA



Musí být genetická diagnóza vždy špatnou zprávou?

Věra Krutílková, Natálie Havranová, Arpád Bóday

Genetické vyšetření plní důležitou úlohu v diferenciální diagnostice nespecifického kožního příznaku skvrn typu „café-au-lait" (CAL). Jedná se o symptom řady různých genetických jednotek s rozdílnou klinickou závažností a prognózou. Ve sdělení se stručně věnujeme diferenciální diagnostice a na příkladu dvou kasuistik ukazujeme význam genetického vyšetření pro další péči o dětského pacienta.

Does a genetic diagnosis always have to be bad news?

Genetic testing plays an important role in the differential diagnosis of the non-specific skin symptom of café-au-lait spots (CAL). It is a symptom of a number of different genetic entities with varying clinical severity and prognosis. In the article, we briefly discuss differential diagnosis and, using the example of two case studies, show the importance of genetic testing for the further care of pediatric patients.

Klíčová slova:
skvrny typu cafe-au-lait
neurofibromatóza 1. typu
Legius syndrom
genetické vyšetření

Key words:
cafe-au-lait spots
neurofibromatosis type 1
Legius syndrome
genetic examination

Jednou z častých indikací, pro kterou přicházejí především dětští pacienti na genetické vyšetření, jsou skvrny typu „café-au-lait" (CAL). Jedná se o kožní ploché pigmentace různé velikosti a tvaru barvy „bílé kávy" (obr. 1). Příčinou je zvýšená produkce melaninu v melanocytech ve stratum bazale v epidermis. V malém počtu jsou popisovány cca u 5—15 % lidí bez významnější klinické signifikance.

Na druhou stranu mohou být prvním symptomem závažných genetických onemocnění. Mezi nejznámější z této skupiny patří neurofibromatóza typu 1 (NF1). Podezření na toto onemocnění mají pacienti většinou uvedené jako důvod vyšetření.

Neurofibromatóza typu I (NFI)

Klinická diagnóza je stanovena na základě přítomnosti minimálně dvou z následujících příznaků:

- pět a více skvrn typu CAL o průměru nad 5 mm u dětí, nad 15 mm u dospělých,
- dva a více neurofibromů jakéhokoliv typu nebo jeden plexiformní neurofibrom,
- freckling v podpaží nebo v tříslech,
- dva a více Lisschových nodulů v duhovce,
- gliom optického nervu,
- kostní léze typu sfenoidální dysplázie

nebo ztenčení kortexu dlouhých kostí s nebo bez pseudoartrosy,
- prvostupňový příbuzný (rodič, sourozenec, dítě) s NF1 podle kritérií.

Příznaky se rozvíjí s věkem, takže u malých dětí (kojenců, batolat) s ještě nerozvinutými symptomy nelze diagnózu potvrdit nebo vyloučit pouze na základě klinického vyšetření.

Diagnóza NF1 je spojena s řadou rizik a postižení jedinci jsou pravidelně sledovaní. Jedná se o riziko benigních i maligních nádorů (maligní transformace je popisována u cca 10 % pacientů), malý vzrůst, cca 10 % riziko mentálního opoždění, poruchy učení a chování se vyskytují až u 60 % dětí s NF1 (1).

U jedinců s NF1 je doporučeno pravidelné sledování, léčba je symptomatická. Na obr. 2 je plně rozvinutý kožní nález pacienta s mnohočetnými fibrómy.

V rámci diferenciální diagnostiky je třeba zvážit řadu dalších jednotek, které se liší jak závažností, tak genovou podstatou, tab. 1 (2, 3).

Legius syndrom

Pro tento syndrom jsou typické především skvrny typu CAL, někdy freckling (obr. 3), macrocephalie, není významně zvýšeno riziko mentálního deficitu, daleko méně často se vyskytují poruchy učení či chování. Syndrom není spojen s rizikem benigních či maligních nádorů, jedinci nemusí být pravidelně sledovaní. Příčinou jsou mutace v genu *SPRED1*. Právě tato jednotka je nejčastěji zaměňována s NF1 (5 % jedinců splňuje klinická kritéria NF1).

Obr. 1 *Skvrny „bílé kávy" cafe-au-lait (CAL)*

Obr. 2 *Kožní neurofibromy u pacienta s NF1*

Noonanové syndrom

Pro Noonanové syndrom s mnohočetnými lentiginozními skvrnami nazývaný také LEOPARD syndrom jsou krom kožních příznaků typu CAL a lentiginózních skvrn typické srdeční vady, kardiomyopatie, malý vzrůst, deformity hrudníku, skoliosa, cca 30 % dětí má poruchy učení. Příčinou jsou mutace v genech *BRAF, MAP2K1, PTPN11, RAF1.*

Mccune-Albright syndrom

Pro tuto jednotku je krom kožních příznaků typu skvrn CAL, které bývají uspořádány v tzv. Blaschkových liniích, typická fibrosní kostní dysplázie, předčasná puberta a další endokrinopatie. Příčinou jsou postzygoticky vzniklé mutace v genu *GNAS*, které vedou k mozaicismu a tím je velmi ztížena diagnostika na molekulární úrovni. Mutace v genu často nelze zachytit v DNA izolované z periferní krve pacientů.

Syndromy s ring chromosomem

Jedná se o změnu chromosomů, kdy dochází ke ztrátě telomér. Přítomnost dalších příznaků závisí na rozsahu ztráty genetického materiálu, nejčastější je opoždění růstu. Diagnóza je stanovena na základě cytogenetického vyšetření.

Syndrom konstituční mismatch repair deficience (CMMRD syndrom)

Příčinou jsou bialelické mutace v mismatch repair genech *MLH1, MSH2, MSH6* nebo *PMS2*. Jde o geny podílející se na reparaci chyb vzniklých při replikaci DNA. U pacientů jsou časté skvrny typu CAL, a stejně jako u NF1, mohou mít pacienti freckling, Lishovy noduly, neurofibromy a tibiální pseudoartrosu. Syndrom je spjatý s rizikem širokého spektra malignit manifestujících se již v dětském věku. U dětí se objevují malignity hematologické, nádory centrální nervové soustavy, embryonální tumory, ale i nádory střev. Výjimkou nejsou u dětí s touto diagnózou ani vrozené vývojové vady.

Familiární caffe-au-lait skvrny

Tato diagnóza je stanovena, pokud prvostupňoví příbuzní mají kožní nález skvrny typu CAL bez přítomnosti dalších symptomů a není u nich zjištěna žádná z výše uvedených diagnóz. Příčina nálezu není jasná.

Z výše uvedeného přehledu vyplývá potřeba co nejčasnějšího upřesnění příčiny manifestace skvrn typu CAL především u dětských pacientů.

Tab. 1 *Klinické jednotky*

Klinická jednotka	Gen
Neurofibromatóza 1.typu	*NF1*
Legius syndrom	*SPRED1*
Noonanové syndrom	*BRAF, MAP2K1, PTPN11, RAF1*
Mccune-Albright syndrom	*GNAS* (mozaicismus)
Syndromy s ring chromozómem	Ring chromozóm
Syndrom konstituční mismatch repair deficience (CMMRD syndrom)	*MLH1, MSH2, MSH6, PMS2*
Familiární caffe-au-lait skvrny	Neznámý

Genetické vyšetření začíná v ambulanci klinického genetika pečlivým klinickým vyšetřením pacienta, zhodnocením osobní i rodinné anamnézy a kompletizací všech dosud provedených vyšetření. Následně je pacientovi odebrána krev, ze které je z leukocytů izolovaná DNA. Laboratoř testuje vzorek DNA indikovaných pacientů pomocí masivního paralelního sekvenování, tzv. NGS panelem. V naší laboratoři k diagnostice používáme panel pro vzácná onemocnění, který obsahuje několik set genů spojených s různými genetickými syndromy. Panel je určen k širokému využití v rámci diferenciální diagnostiky vzácných onemocnění. Díky tomuto způsobu jsou v jedné době vyšetřeny všechny známé geny asociované se sledovaným příznakem v rámci diferenciální diagnostiky (4), t.č. jde o 53 genů. Před érou NGS byly geny sekvenovány postupně, což značně vyšetření prodlužovalo i prodražovalo.

Genetické vyšetření má nezastupitelné místo v diferenciální diagnostice, upřesněním a potvrzením diagnózy pomáhá stanovit prognózu vývoje onemocnění, upřesňuje nutné sledování a stanovuje míru rizika pro příbuzné, především sourozence a děti.

Kasuistika 1

Ke genetickému vyšetření byl doporučen 9měsíční chlapec s cca deseti skvrnami typu CAL na trupu a končetinách. Má macrocephalii, dle kardiologického vyšetření foramen ovale apertum, motorický vývoj je lehce opožděný. Rodiče žádné kožní příznaky nevykazují. Provedené molekulárně genetické vyšetření u chlapce odhalilo mutaci c.5242C>T v genu ***NF1*** a tím potvrdilo diagnózu neurofibromatózy 1. typu. Dle doplněného vyšetřené rodičů se u chlapce jedná o de novo vzniklou variantu.

Obr. 3 *Freckling v axile*

Rodiče byli s nálezem a vyplývajícími riziky, včetně rizika onkologického, podrobně seznámeni, dítě je pravidelně sledováno řadou specialistů.

Kasuistika 2

Ke genetickému vyšetření byla doporučena 9letá dívka s podezřením na ***NF1***. Na trupu a končetinách má 6 větších (až 0,5 x 4,5 cm) skvrn CAL a 3 drobné nad 0,5 cm v průměru. Má lehkou skoliosu a deformitu hrudníku. Dívka měla normální psychomotorický vývoj, navštěvuje ZŠ s průměrnými výsledky, nemá žádné poruchy učení. Rodiče kožní ani jiné příznaky ***NF1*** nemají.

Molekulárně genetickým vyšetřením byla u dívky zjištěna mutace c. 292del v genu

SPRED1 a tím potvrzena diagnóza Legius syndromu.

Vyšetřením rodičů bylo potvrzeno, že mutaci v genu ***SPRED1*** nenesou a tedy, že se u dívky zase jedná o de novo vzniklou afekci.

Rodiče byli informováni, že daný syndrom, na rozdíl od původně zvažované neurofibromatózy typu 1, není spojen s významnými poruchami vývoje, chování či učení a především zde není riziko rozvoje gliomů optiku, neurofibromů a nádorové manifestace.

Z výše uvedených kasuistik vyplývá nemožnost rozlišit jednotky pouze dle klinického nálezu, při čemž každá z nich má zcela jinou závažnost a prognózu. Rodičům, kteří v době internetu mají povětšinou nastudované všechny možné konsekvence primárně zvažované diagnózy, jistě diagnóza Legius syndromu přinese velkou úlevu a zmírnění stresu zjištěním, že dítě není ohroženo výše uvedenými projevy a současně je dítě ušetřeno pravidelných a poměrně častých návštěv řady specialistů, včetně často indikované MRI centrálního nervového systému, která se u malých dětí provádí v celkové anestézii. Lze tedy říci, že v tomto případě je určení a potvrzení genetické diagnózy vlastně příznivou zprávou.

Závěrem bychom chtěli zdůraznit úlohu genetického vyšetření v diferenciální diagnostice nejen u dětských pacientů. Rovněž je dobré si uvědomit, že posun nastává i v otázkách léčby a diagnóza na úrovni genů může být v řadě případů spojena i s možností cílené terapie.

KONTAKTNÍ ÚDAJE:
MUDr. Věra Krutílková
Laboratoře AGEL a.s.
Ambulance klinické genetiky
Chlumčanského 497/5, 180 00 Praha 8
e-mail: vera.krutilkova@gen.agel.cz

Literatura

1. Hirbe AC, Gutmann DH. Neurofibromatosis type 1: a multidisciplinary approach to care. Lancet Neurol. 2014 Aug;13(8):834-43. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70063-8. PMID: 25030515.

2. Anderson S. Café au Lait Macules and Associated Genetic Syndromes. J Pediatr Health Care. 2020 Jan-Feb;34(1):71-81. doi: 10.1016/j.pedhc.2019.05.001. PMID: 31831114.

3. Messiaen L, Yao S, Brems H, Callens T, Sathienkijkanchai A, Denayer E, Spencer E, Arn P, Babovic-Vuksanovic D, Bay C, Bobele G, Cohen BH, Escobar L, Eunpu D, Grebe T, Greenstein R, Hachen R, Irons M, Kronn D, Lemire E, Leppig K, Lim C, McDonald M, Narayanan V, Pearn A, Pedersen R, Powell B, Shapiro LR, Skidmore D, Tegay D, Thiese H, Zackai EH, Vijzelaar R, Taniguchi K, Ayada T, Okamoto F, Yoshimura A, Parret A, Korf B, Legius E. Clinical and mutational spectrum of neurofibromatosis type 1-like syndrome. JAMA. 2009 Nov 18;302(19):2111-8. doi: 10.1001/jama.2009.1663. Erratum in: JAMA. 2010 Jun 23;303(24):2477. PMID: 19920235.

4. Giugliano T, Santoro C, Torella A, et al. Clinical and Genetic Findings in Children with Neurofibromatosis Type 1, Legius Syndrome, and Other Related Neurocutaneous Disorders. Genes (Basel). 2019;10(8):580. Published 2019 Jul 31. doi:10.3390/genes10080580

Cytogenetická analýza získaných chromozomových aberací v lidských periferních lymfocytech

Bronislava Dřevojánková, Zuzana Lenčešová

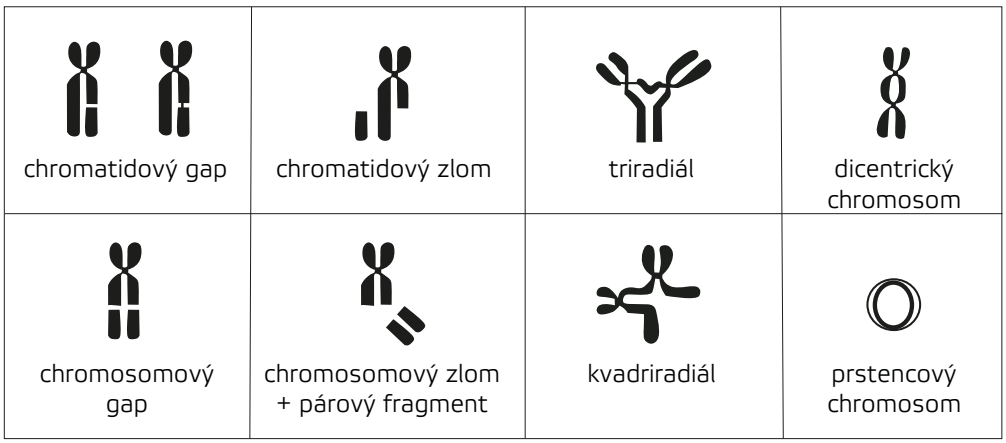
Klíčová slova:
cytogenetická analýza lidských periferních lymfocytů (CAPL)
karcinogenní činitelé
aberantní buňky

Key words:
cytogenetic analysis of human peripheral lymphocytes (CAPL)
carcinogenic agents
aberrant cells

Cytogenetická analýza lidských periferních lymfocytů (CAPL) je celosvětově rozšířená metoda, která vznikla v 70. letech minulého století. Je používána jako biologický expoziční test k monitorování populace, která je vystavena účinkům genotoxických faktorů - chemickým, fyzikálním či biologickým. Jedná se o mutagenní a karcinogenní látky pocházející z pracovního a environmentálního prostředí (1), viz Tabulka č. 1. Působením těchto látek na organismus dochází ke vzniku získaných chromozomových aberací v lidských somatických buňkách (nejčastěji ke zlomům a přestavbám viz Obrázek č. 1) a odráží jejich časný biologický účinek. Nahromadění těchto získaných změn v lidském genomu vede k aktivaci onkogenů a deaktivaci tumor supresorových genů (2, 3). Buňka ztrácí kontrolu nad buněčným dělením, růstem i buněčnou smrtí – apoptózou. Což výrazně souvisí se zvyšujícím se rizikem vzniku nádorových onemocnění a s progresí degenerativních onemocnění.

Metoda CAPL je v praxi nejčastěji využívána k monitorování především profesionální expozice, kdy na lidský organismus působí sledovaný rizikový faktor

Obr. 1 *Typy získaných chromozomových aberací (Kuglík, P. 2005. Vybrané kapitoly z cytogenetiky. Masarykova univerzita, Brno, upraveno)*



kontinuálně, každou pracovní směnu. Vyšetření zachycuje expoziční dávku za cca poslední tři měsíce. Nejčastěji sledovanou skupinou pracovníků jsou lidé, kteří přichází do každodenního styku s rizikovými faktory jako jsou např. ethylenoxid, formaldehyd, vinylchlorid, benzen, styrén, sloučeniny niklu a kadmia, výroba tabákových produktů, cytostatika, ale také práce spojená s radiologií a radiografií. Na vzniku sledovaných chromozomových aberací mají i významný podíl faktory životního stylu (např. kouření, strava, stres). Zákon o ochraně veřejného zdraví č. 258/200 Sb. definuje souhrn činností a opatření zdravých pracovních podmínek a zabránění ohrožení zdraví v souvislosti s vykonávanou prací. U pracovníků vybraných provozů s rizikem (§ 37 kategorizace prací) je pravidelně sledována úroveň biomarkeru v průběhu celého roku. Vyšetření CAPL probíhá v rámci prohlídek u závodního lékaře preventivní péče, a to při vstupní, preventivní i výstupní prohlídce. Žadatelem vyšetření je tedy závodní lékař preventivní péče (3, 9).

Vyšetření CAPL je prováděno z odběru periferní krve do heparinové zkumavky. Krev je nejpozději do 24 hodin nasazena do kultivačního média s obsahem fytohematoglutininu (PHA), pro stimulaci

Tab. 1 *Přehled některých karcinogenních činitelů souvisejících s BOZP (7)*

Chemické látky	*plyny*	vinylchlorid, formaldehyd
	kapaliny	trichlorethylen, tetrachlorethylen, methylchlorid, styren, benzen, xylen, minerální oleje, barva na vlasy
	tuhé látky	oxid křemičitý, prach ze dřeva, mastek obsahující azbestová vlákna, azbest, umělá minerální vlákna – keramická vlákna, olovo, sloučeniny niklu, sloučeniny šestimocného chromu, arsen, beryllium, kadmium, saze, asfalt
	výpary, kouř	svářečské dýmy, emise ze vznětových motorů, výpary z černouhelného dehtu, asfaltové výpary, spalování, emise ze spalovacích motorů, polycyklické aromatické uhlovodíky, tabákový kouř
Pesticidy		DDT, ethylendibromid, amitrol
Léčivé přípravky	*protinádorové léčivé přípravky*	mustargen, onkovin, prokarbazin, prednison
	anestetika	isofluran
Biologičtí činitelé	*bakterie*	Helicobacter pylori
	viry	Hepatitida B, Hepatitida C
	plísně produkující toxiny	ořechy, obilí, kukuřice, kávy, výroba živočišných krmiv, výroba piva a sladu, zpracování odpadů, kompostování, výroba potravin, práce s formami v uzavřeném prostoru, zahradnictví
Fyzikální činitelé	*ionizující záření*	radon, rentgenové záření
	ultrafialové (UV) záření	sluneční záření, umělé UV záření
	ergonomie	sedavé zaměstnání, dlouhé stání
Jiné		práce na směny způsobující poruchy denního rytmu
		obezita související se stresem, kouření, konzumace alkoholu a jiných omamných látek

dělení lymfocytů a následnému získání většího počtu mitotických buněk (mitóz). Celková doba kultivace trvá 48 hodin, a to z důvodu zachycení prvního buněčného dělení. Ve druhém buněčném dělení je totiž počet aberantních buněk výrazně snížen, např. díky reparačním mechanismům. Buněčné dělení je zastaveno pomocí kolcemidu, což je mitotický jed zastavující buněčný cyklus v metafázi mitózy, během které jsou chromozomy maximálně kondenzované, takže je lze velmi dobře hodnotit pod mikroskopem (4, 5). Buněčná suspenze je po dalším zpracování nakonec nakapána a fixována na sklo, obarvena konvenčním barvením Giemsa – Romanovski a následně hodnocena ve světelném mikroskopu při zvětšení 1000x (viz Obrázek č. 2). Do hodnocení preparátu zahrnujeme mitózy počtem chromozomů 46±2.

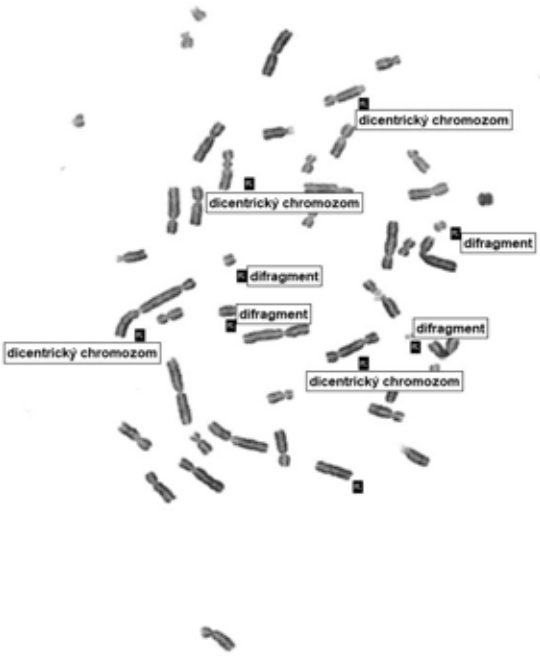
Podle počtu vyšetřovaných osob se používá individuální nebo skupinové hodnocení. Za statisticky významnou skupinu je považováno hodnocení 20 a více osob, při tomto hodnocení se analyzuje minimálně 100 mitóz/osobu. U menších skupin (10–20 osob) je analyzováno 200 mitóz/osobu. U skupin s menším počtem osob než 10 již nelze provést skupinový test. Individuální hodnocení pak zahrnuje hodnocení 200–300 mitóz/osobu (6). Na základě velkého množství dat z cytogenetických analýz byla stanovena frekvence aberantních buněk u neexponovaných osob (běžné populace) v České republice na 1,70 %. Jedná se o referenční hodnotu pro profesionálně neexponovanou populaci.

Skupinové hodnocení

< 2 % aberantních buněk:

- skupina s biologicky neefektivní expozicí genotoxickým látkám

Obr. 2 *Konvenční cytogenetická analýza chromozomů (laboratoř cytogenetiky, Laboratoře AGEL Nový Jičín 2022)*



- je shodná se spontánní frekvencí aberací u běžné, neexponované populace
- organismem tolerované

Doporučení: kontrolní vyšetření za 1–2 roky a vždy při změně pracovních podmínek.

2–4 % aberantních buněk:

- skupina s biologicky zvýšenou expozicí genotoxickým látkám
- organismem již netolerované

Doporučení: kontrolní vyšetření za 1 rok a vždy při změně pracovních podmínek.

> 4 % aberantních buněk:

- skupina s biologicky vysokou expozicí genotoxickým látkám
- pro vnímavé jedince představuje zvýšené riziko vzniku nádorového onemocnění, progrese degenerativních onemocnění, popř. vzniku vrozených vad u potomků exponovaného je-

dince

Doporučení:

- opakování vyšetření za 2–4 měsíce, kontrolní vyšetření za 1 rok
- nutné sledování jedinců s 5 a více % aberantními buňkami, při opakovaném nálezu u stejného pracovníka je nutné považovat tuto práci za kontraindikovanou
- je nutné určení genotoxické látky a účinné snížení expozice pro jednotlivce i celou skupinu (6, 8)

Individuální hodnocení:

Bylo dokázáno, že individuální průměrná frekvence chromozomových aberací je v průběhu let konstantní. Nicméně během roku mohou hodnoty výskytu aberantních buněk u běžné populace kolísat, a to v rozmezí od 0–5 %.

<5 % aberantních buněk:
jedinec s biologicky neefektivní expozicí genotoxickým látkám.

Doporučení: kontrolní vyšetření za 1–2 roky a vždy při změně pracovních podmínek.

5 % a více aberantních buněk:

- jedinec s biologicky vysokou expozicí genotoxickým látkám
- pro vnímavé jedince představuje zvýšené riziko vzniku nádorového onemocnění, progrese degenerativních onemocnění, popř. vzniku vrozených vad u potomků exponovaného jedince

Doporučení:

- nutnost okamžitého (někdy dočasného) vyřazení osoby z expozice
- nutnost opakování vyšetření za 2–4 měsíce
- pokud jsou zjištěny opakovaně zvýšené hodnoty, je nutné prokázat vysokou expozici genotoxickými látkami z hlediska hygieny práce a provést další klinická vyšetření (6, 8)

V České republice vznikl na sklonu 20. století, z iniciativy státního zdravotního ústavu, registr profesionálních expozic karcinogenům (REGEX). V registru jsou evidována data o profesionálních expozicích chemickým, fyzikálním a biologickým karcinogenům. Cílem registru je zajištění následné zdravotní péče u karcinogenům profesionálně exponovaných osob. Data slouží také k provádění analytických epidemiologických studií (databáze pro epidemiologický výzkum) (9).

KONTAKTNÍ ÚDAJE:
Mgr. Bronislava Dřevojánková
Laboratoře AGEL a.s.
Laboratoř cytogenetiky
Revoluční 2214/35, 741 01 Nový Jičín
e-mail:
bronislava.drevojankova@lab.agel.cz

Literatura

1. Šrám et al., Cytogenetic anylysis and occupational health in the czech Republic. Mutat Res. 2004 Jan;566(1):21-48

2. Hagmar L, Strömberg U, Bonassi S, Hansteen IL, Knudsen LE, Lindholm C, et al. Impact of types of lymphocyte chromosomal aberrations on human cancer risk: results from Nordic and Italic cohorts. Cancer Res. 2004 Mar 15;64(6):2258-63.

3. [online]. Dostupné z :http://Metody biologického monitorování genotoxických účinků faktorů prostředí Cytogenetická analýza periferních lymfocytů Aktualizace platné standardní metodiky (Příloha AHEM 20/1989, 5/2000)

4. [online]. Dostupné z: http://Guidelines and Quality Assurance for Acquired Cytogenetics A common European framework for quality assessment for banded chromosome studies and molecular cytogenetic investigations of acquired abnormalities. E.C.A. Permanent Working Group for Cytogenetics and Society

5. Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in human. Mutat Res. 2000 Aug;463(2):111-72

6. Očadlíková D, Bavorová H, Šmíd J. Cytogenetická analýza periferních lymfocytů. Aktualizace platné standardní metodiky. AHEM [online]. 2007 [cit. 2008-10-22];(1). Dostupný z: http://www.szu.cz/uploads/documents/knihovna_SVI/ pdf/2007/full_2007_01.pdf

7. [online]. Dostupné z: http://Expozice karcinogenům a rakovina z povolání: přezkum metod hodnocení Evropské observatorium rizik Shrnutí

8. Kůsová J. Proč využívat cytogenetickou analýzu periferních lymfocytů jako test expozice a časných biologických účinků genotoxických látek v pracovním prostředí. Čes Prac Lék. 2007;8(3):142-5.

9. Státní zdravotní ústav [online]. REGEX – závěrečná zpráva 2006 [cit. 2008-10-22]. Dostupný z: http://www.szu.cz/ uploads/documents/cpl/REGEX/zaver_zprava_06.pdf

FARMAKOLOGIE A TOXIKOLOGIE

Záchyt neznámých nox v klinické toxikologii

Zuzana Birkáš

Tento článek pojednává o postupu při indikaci k toxikologickému vyšetření. Na reálných případech je ukázána důležitost rychlého screeningového výsledku, ale také nedostatečnost imunochemických metod a nutnost konfirmačních analýz v laboratoři klinické toxikologie.

Detection of unknown nox in clinical toxicology

This article discusses the procedure of indication for toxicological examination. Real cases show the importance of a quick screening result, but also the inadequacy of immunochemical methods and the necessity of confirmatory analyzes in the clinical toxicology laboratory.

Klíčová slova:
toxikologický screening
konfirmace
LC-MS/MS
GC-MS

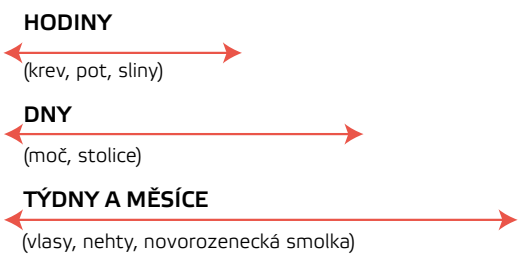
Key words:
toxicological screening
confirmation
LC-MS/MS
GC-MS

Klinická toxikologie se zabývá diagnostikou akutních otrav (předávkování léčivy, omamnými a psychotropními látkami, alkoholy aj.), abúzu návykových látek a kontrolou terapie. V klinické toxikologii je stěžejní správnost, přesnost výsledků a rychlost dodání výsledků (zejm. u akutních intoxikací) indikujícímu lékaři, kde se od výsledků analýzy odvíjí další terapeutický postup (3).

Biologické materiály

Nejběžnějšími biologickými materiály pro toxikologické vyšetření v klinické praxi je moč, krev event. žaludeční obsah (sliny, novorozenecká smolka). Při toxikologické diagnostice akutních intoxikací nebo v odvykací fázi toxikomanů je vhodná moč a kvalitativní průkaz látek. Při terapeutické kontrole je vhodná krev (sérum, plazma) a kvantitativní stanovení látek. Pro volbu vzorku je také výhodné znát dobu mezi poslední dávkou noxy a odběrem vzorku (tzv. detekční časová okna), event. farmakokinetiku látky. Detekční okna vychází ze skutečnosti, že časové limity pro detekci nox v jednotlivých typech biologických materiálů jsou různá, viz Obr. 1 (1)

Obr. 1 *Detekční časová okna pro toxikologické vyšetření; upraveno dle (3)*



Analytické metody

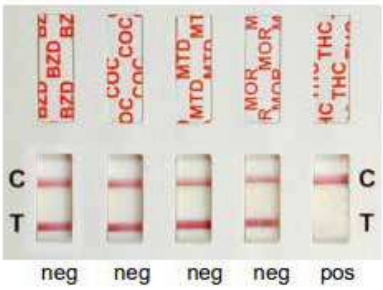
Imunochemické metody zaujímají významné místo v rutinním toxikologickém vyšetření v biologických materiálech. Obecně lze říci, že výhodou imunochemických analýz je rychlost získání výsledku, velmi malé množství materiálu bez jakéhokoli zpracování vzorku, nenáročnost na edukaci a kvalifikaci personálu, a cena testu je relativně nízká.

Zdravotnická zařízení (ambulance praktických lékařů, nemocnice) a menší laboratoře se základním laboratorním vybavením disponují jednoduchými imunotesty většinou ve formě proužků nebo kazet, kdy z jedné analýzy lze prokázat jednu skupinu nebo v případě multi testu 5, 10 i více skupin návykových látek najednou. Výhodou těchto základních testů je jednoduchost provedení (ponořením proužku do vzorku moče) a rychlost odečtu výsledků (podle vytvoření barevného proužku v testovací a kontrolní linii imunotestu; dle výrobce v průměru do 5 minut). Výsledek je odečítán subjektivně laboratorním pracovníkem, případně některé laboratoře využívají tzv. reader. Tyto testy mají o poznání nižší citlivost ve srovnání s imunochemickými metodami s elektronickou detekcí prováděnými v toxikologické laboratoři. Je nutné také uvažovat o ovlivnění výsledku testu četnými interferencemi s léčivy. Kvalita testů se může lišit mezi výrobci, ale také u různých šarží jednoho výrobce. Příklad komerčně dostupného rychlého testu a jeho vyhodnocení je zobrazeno na Obr. 2 a 3.

Vybavenější laboratoře mají analyzátory na principu imunochemické screeningové metody s elektronickou detekcí. Laboratorní analyzátory jsou pravidelně kontrolovány a kalibrovány a případná chybná měření rychle zjištěna a příčiny odstraněny, proto jsou výsledky z analyzátorů spolehlivější. Pro každou skupinu látek výrobce (případně individuálně laboratoř) stanovuje rozhodovací mez detekce (tzv. cut off) pro odlišení negativních a pozitivních nálezů. Analyzátor zobrazí výsledek jako číselný údaj, který však nekoreluje se skutečnou koncentrací dané noxy ve vzorku. Je tomu proto, že každá metoda je nakalibrována na jednu konkrétní noxu a jakkoliv jiná noxa má jinou odezvu na detektoru, viz Obr. 4. Získá se tedy výsledek se semikvantitativní koncentrací. Mezi výhody využití laboratorního analyzátoru při toxikologickém vyšetření oproti jednoduchým kazetovým imunotestům je vyšší citlivost, specifičnost a spolehlivost; nevý-

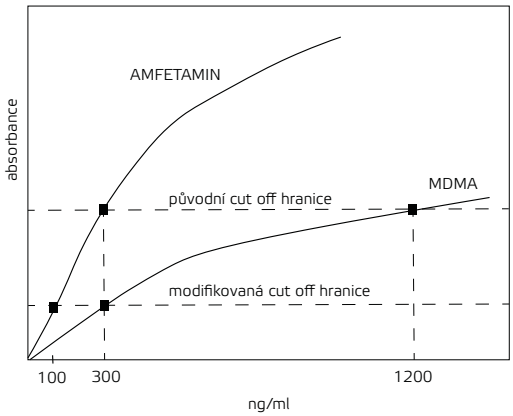
Obr. 2 *Příklad komerčně dostupného jednoduchého imunochemického testu (multiparametrového a jednoparametrového) na přítomnost návykových látek v moči. (Převzato z příbalového letáku rychlotestů nal von minden Drug-screen)*

Obr. 3 *Příklad výsledku rychlotestu přítomnosti návykových látek v moči. V reakční oblasti se nachází testovací linie (T) u negativních nálezů, nenachází se testovací linie (T) u pozitivního nálezu, kontrolní linie (C) se nachází u všech testů – validní test. (Převzato z příbalového letáku rychlotestů nal von minden Drug-screen)*



hodou je vyšší cena testu. Zásadní nevýhody a úskalí imunochemického screeningu jsou popsány v samostatném odstavci níže, viz Úskalí imunochemických metod (1).

Obr. 4 *Příklad různé odezvy imunochemické metody z analyzátoru při vyšetření dvou látek (amfetaminu a 3,4-methylendioxymethamfetaminu) o stejných koncentracích. Optimalizace cut-off hodnoty je žádoucí pro látky z vyšetřované skupiny právě z důvodu jejich různé odezvy (3)*



V toxikologické praxi je výsledek imunochemické metody vnímán pouze jako nespecifický a orientační. Pozitivní nález je nutné potvrdit jinou nezávislou technikou, tj. více specifickou chromatografickou metodou. Dnešní toxikologické laboratoře jsou vybavené plynovými a/nebo kapalinovými chromatografy s hmotnostní detekcí (GC-MS, LC-MS/MS), které jsou schopny identifikovat konkrétní noxy i jejich metabolity, případně stanovit koncentraci v dodaném materiálu. Na základě typu dodaného materiálu, zdravotní dokumentace a anamnestických dat pacienta odborný laboratorní pracovník zvolí vhodný postup zpracování vzorku (izolace širšího spektra nox vs. specifická izolace pro danou noxu) a vhodnou analytickou separační metodu. Předpokladem odborných pracovníků v toxikologické laboratoři je teoretická znalost farmakokinetiky a farmakodynamiky látek v organismu. Analýza chromatografickými metodami je časově náročná. Výsledky jsou vydány řádově v hodinách po příjmu do laboratoře (někdy i déle dle komplikovanosti případu) (1).

Tab. 1 *Příklady falešně negativních a falešně pozitivních nálezů při imunochemickém screeningu vyšetření omamných a psychotropních látek (1, 2)*

Vyšetřovaná skupina látek imunochemicky	Falešně negativní výsledek	Falešně pozitivní výsledek
Amfetaminy	nové syntetické drogy („designer drugs“)	tramadol, citalopram, chlorpromazin, promethazin, trazodon, vysoká koncentrace biogenních aminů
Opiáty	tramadol, oxykodon, oxymorfon, buprenorfin, fentanyl, syntetické opioidy	dextrometorfan, chinolonová antibiotika
Benzodiazepiny	alprazolam, flunitrazepam	Sertalin, selegilin
Antidepresiva	antidepresiva II. až IV. generace	
Kanabinoidy	syntetické kanabinoidy	Naproxen
Metadon		verapamil, quetiapin, chlorpromazin
Fencyklidin		tramadol, venlafaxin, ibuprofen

Úskalí imunochemických metod

Ačkoliv imunoanalytické metody se používají naprosto rutinně, je zapotřebí zmínit jejich zásadní negativum. V praxi se velmi často setkáváme s falešně negativním nebo falešně pozitivním výsledkem, což může představovat značnou komplikaci pro samotného pacienta. V případech intoxikací drogami může být falešně negativní výsledek pro pacienta i život ohrožující. Naopak falešně pozitivní výsledek může mít pro pacienta také nepříjemné následky (právní, pracovní, léčebné, osobní nebo jiné) (2). Příklady falešně negativních a falešně pozitivních výsledků při imunochemickém screeningu jsou uvedeny v Tab. 1.

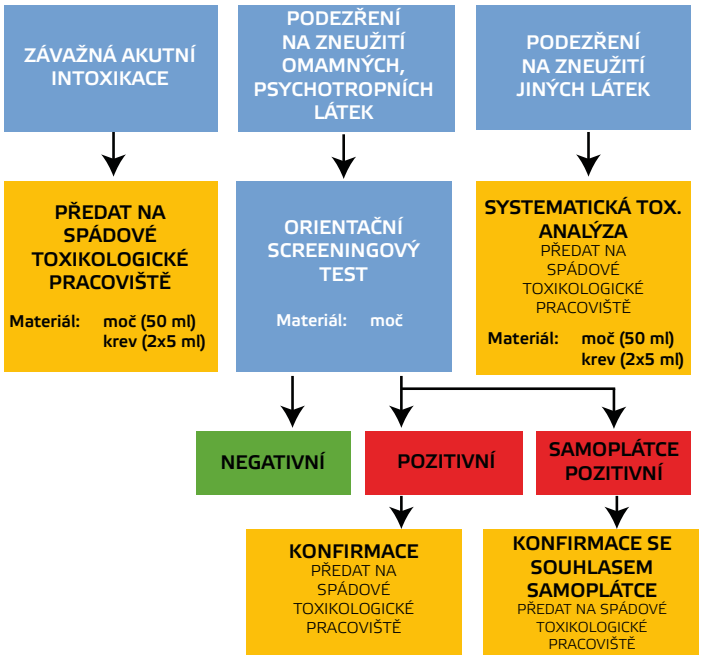
Falešně negativní nález může být způsoben nízkou citlivostí testu, charakterem testované skupiny (např. strukturní deriváty, novější léčiva, jejich dávkování a biotransformace v organismu), záměrnou manipulací se vzorkem moči (ředění, přídavek interferujících látek), prodlevou mezi zneužitím a odběrem (1, 3).

Falešně pozitivní výsledek může být nejčastěji způsoben zkříženou reaktivitou strukturně podobných látek například v případě užívání léků, ale také i endogenními látkami. Jak už bylo výše zmíněno, jedná se pouze o orientační nespecifické skupinové reakce, které nerozliší a neidentifikují jednotlivé noxy ve skupině. Například vyšetření opiátů nerozliší, zda jde o kodein podaný terapeuticky na tlumení kašle nebo jde o zneužití kodeinu a morfinu (případně zneužití heroinu). Nelze opomenout také možnou pozitivitu, typicky v případě opiátů, při konzumaci potravin obsahující větší množství máku. Proto je nutné nálezy potvrdit a identifikovat noxu specifickou metodou (GC-MS, LC-MS/MS). Vzhledem ke skutečnosti, že velké množství zneužívaných návykových látek (např. nové drogy) nelze běžným imunochemickým screeningem odhalit, tak toxikologické laboratoře často provádí screeningové vyšetření metodou GC-MS nebo LC-MS/MS (1).

Algoritmus toxikologického vyšetření

Pracoviště klinické farmakologie a toxikologie Laboratoře AGEL a.s. v Novém Jičíně je vybaveno velmi dobrou přístrojovou technikou - imunochemickým analyzátorem pro rychlý screening a samozřejmě LC-MS/MS a GC-MS pro specifickou konfirmační analýzu biologického materiálu. Jak postupovat při indikaci toxikologického vyšetření je zobrazeno na Obr. 5.

Obr. 5 *Algoritmus toxikologického vyšetření*



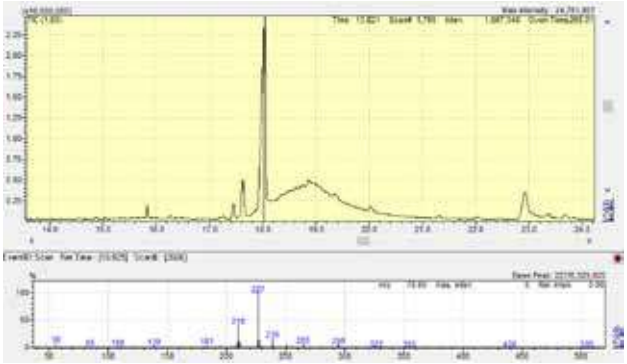
Kazuistiky

Kazuistika č. I: Kontrola účinnosti léčby

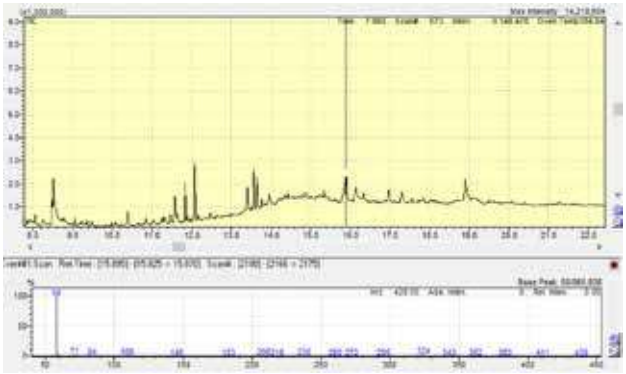
Žena 23 let, přijata RZP pro suicidální pokus paralenem (neznámé množství, pravděpodobně 10 tablet o síle 500 mg para-

cetamolu), proveden výplach žaludku a podáno antidotum N-acetylcystein; vstupně alkohol negativní, toxikologický screening na jednorázovém imunotestu negativní. Do laboratoře dodána krev na stanovení koncentrace paracetamolu, s krví dodána i moč (bez žádosti na její vyšetření). Odběr krve byl proveden asi po 8 hodinách po intoxikaci. Výsledek z toxikologické laboratoře: Naměřená koncentrace paracetamolu v séru byla 90 mg/l, dle Matthew-Rumackova nomogramu je pravděpodobná hepatotoxicita, doporučení podat N-acetylcystein a opakovat odběr po 12ti hodinách. Naměřená koncentrace paracetamolu v séru po 12ti hodinách byla 25 mg/l a nyní hepatotoxicita málo pravděpodobná.

Obr. 6 *GC-MS chromatogram a hmotnostní spektrum quetiapinu*



Obr. 7 *GC-MS chromatogram a hmotnostní spektrum citalopramu*



Dále na základě telefonické doobjednávky byla provedena systematická analýza neznámých látek v moči. Výsledek z toxikologické laboratoře: Metodou GC-MS byla v dodané moči prokázána přítomnost quetiapinu a jeho metabolitů (viz Obr. 6). V dodané krvi byla naměřena koncentrace quetiapinu 1200 µg/l (toxická mez od 1000 µg/l). Závěr: byly prokázány a stanoveny toxické hladiny paracetamolu a psychofarmaka quetiapinu. Během časového intervalu byl prokázán klesající trend koncentrace paracetamolu a účinnost léčby.

Kazuistika č. 2: Falešná pozitivita toxikologického screeningu

Muž 32 let, přijat RZP pro úraz hlavy, léková anamnéza: citalec, vstupně hladina alkoholu 1,52 g/kg, toxikologický screening na jednorázovém imunotestu pozitivní na amfetaminy. Do laboratoře dodána moč a krev. V toxikologické laboratoři screening amfetaminů semikvantitativně >2000 µg/l. Byla provedena toxikologická konfirmace pozitivního screeningového nálezu amfetaminů v moči metodu GC-MS. Výsledek z toxikologické laboratoře: Metodou GC-MS nebyla v dodané moči prokázána přítomnost látek ze skupiny amfetaminů, byla prokázána přítomnost citalopramu a jeho metabolitu (viz Obr. 7). V dodané krvi byla naměřena koncentrace citalopramu 85 µg/l (terapeutické rozmezí: 50–110 µg/l), N-desmethylcitalopramu 42 µg/l, metabolický poměr 0,49 (referenční rozmezí 0,31–0,60). Závěr: Přítomnost citalopramu ve vzorku moče vykazuje zkříženou reaktivitu s látkami ze skupiny amfetaminů, tzn. falešně pozitivní nález.

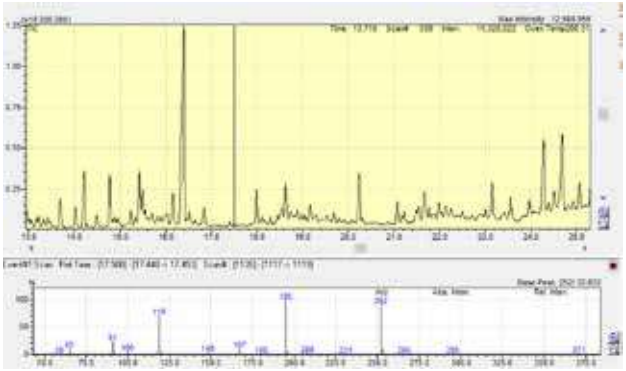
Kazuistika č. 3: Falešná negativita toxikologického screeningu

Žena 17 let, s drogovou minulostí od 14ti let (abúzus pervitinu), bylo provedeno screeningové toxikologické vyšetření s negativním výsledkem. Na základě komunikace s praktickou lékařkou byla provedena systematická toxikologická analýza se zaměřením na nové syntetické drogy. Výsledek z toxikologické laboratoře: Metodou GC-MS byla v dodané moči prokázána přítomnost mefedronu (syntetického kathinonu, viz Obr. 8). Závěr: Běžně dostupnou screeningovou imunochemickou metodou nelze odhalit některé nové syntetické drogy. Je tedy nutné vzorky analyzovat specifickou chromatografickou metodou.

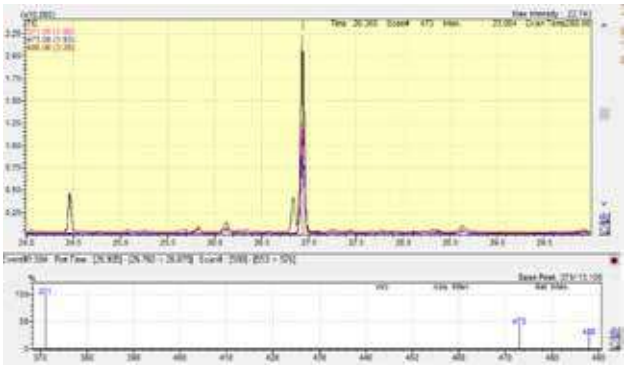
Kazuistika č. 4: Kontrola abstinence

Muž 28 let, 130 kg, 175 cm, přijat do psychiatrické léčebny k léčbě závislosti na marihuaně. V léčebně po 3 dnech po přijetí byl proveden toxikologický screening na jednorázovém imunotestu s pozitivními kanabinoidy. Do laboratoře dodána moč. V toxikologické laboratoři screening kanabinoidů semikvantitativně 720 µg/l a byla provedena toxikologická konfirmace (viz Obr. 9). Výsledek z toxikologické laboratoře: Metodou GC-MS byla v dodané moči prokázána přítomnost tetrahydrokanabinol-karboxylové kyseliny (jedná se o metabolit THC). V průběhu 10ti dnů byly provedeny další testy pro ověření abstinence pacienta, v toxikologické laboratoři byly naměřeny semikvantitativní koncentrace 152 → 98 → 25 µg/l, vždy s pozitivní konfirmační analýzou. Další test byl již negativní. Závěr: Je důležitá kontrola abstinence a sledování trendu naměřených koncentrací ideálně normalizovaných na močový kreatinin (v této kazuistice není normalizace uvedena).

Obr. 8 *GC-MS chromatogram a hmotnostní spektrum mefedronu*



Obr. 9 *GC-MS chromatogram a hmotnostní spektrum tetrahydrokanabinol-karboxylové kyseliny v SIM módu*



Závěr

Imunochemické metody pro analýzu přítomnosti návykových látek v biologickém materiálu mají výhradně postavení nespecifických a orientačních kvalitativních metod. Pozitivní nález imunochemického toxikologického vyšetření lze hodnotit vždy jen jako suspektní a pro definitivní potvrzení přítomnosti konkrétní návykové látky se vyžaduje potvrzení s použitím přísně specifické chromatografické metody. Tento postup je v souladu s doporučeními mezinárodních i národních odborných společností. V současnosti jsou upraveny požadavky na postup toxikologických vyšetření pro analýzu návykových látek mimo jiné Metodickým pokynem ve Věstníku MZ ČR, částka 9, s. 2. Smyslem konfirmační analýzy je vyloučit případný

falešně pozitivní nález orientačního screeningového vyšetření, který může být způsoben například přítomností vysoké koncentrace některého běžně užívaného léčiva v biologickém materiálu a dále přesně identifikovat látky, které byly zneužity.

KONTAKTNÍ ÚDAJE:
Mgr. Zuzana Birkáš
Laboratoře AGEL a.s.
Laboratoř farmakologie a toxikologie
Revoluční 2214/35, 741 01 Nový Jičín
e-mail: zuzana.birkas@lab.agel.cz

Literatura

1. Habrdová V. et al.: Výhody, nevýhody a úskalí imunochemických analytických metod v toxikologické praxi. 2009 Klin. Biochem. Metab., 17 (38)
2. Nešpor K.: Falešná pozitivita vyšetření na psychoaktivní látky a užívání léků. 2011 Practicus
3. Balíková M.: Forenzní a klinická toxikologie. 2004 Galén

Terapeutické monitorování biologik (Biologická léčba u IBD)

Kristýna Vlková, Vlasta Matušková, Tomáš Gucký

Crohnova choroba a ulcerózní kolitida jsou hlavními zástupci idiopatických střevních onemocnění (IBD) a jejich prevalence v populaci stále narůstá. Biologická léčba monoklonálními protilátkami cílenými na specifické struktury je již standardní součástí terapie těchto onemocnění a vede ke zvýšení kvality života pacientů, nižší potřebě kortikoterapie, snížení počtu relapsů nemoci, prodloužení doby remise a také přispívá k minimalizaci nutnosti chirurgického zásahu. Terapeutické monitorování biologik je pak účinným nástrojem k dosažení co nejvyšší efektivity terapie s cíli optimalizovat dávkování, zabránit vzniku závažných nežádoucích účinků a zejména včas zachytit vznik protilátek proti biologiku s možností tento stav zvrátit.

Therapeutic Monitoring of Biologics (Biologic Treatment in IBD)

Crohn's disease and ulcerative colitis are the main representatives of inflammatory bowel diseases (IBD) and their prevalence in the population is still increasing. Biological treatment with monoclonal antibodies targeting specific structures became already a standard part of the therapy of these diseases and leads to a life quality improvement of patients, a lower need of corticotherapy, a reduction in the occurrence or number of relapses of the disease, and to the minimization of surgical intervention. Therefore, therapeutic monitoring of biologics is an effective tool to achieve the higher possible effectiveness of therapy with the aims of optimizing dosage, preventing the occurrence of severe adverse effects and, above all, early detection of the formation of antibodies against the biologic with the possibility of reversing this condition.

Zánětlivá idiopatická střevní onemocnění (inflammatory bowel disease IBD) zahrnující Crohnovu chorobu (CD) a ulcerózní kolitidu (UC) jsou řazeny mezi autoimunitní onemocnění, u kterých dochází k neadekvátní reakci imunitního systému na vlastní zdravé tkáně a orgány. Etiologie těchto onemocnění není známá, pravděpodobně se však jedná o kombinaci environmentálních, imunitních a bakteriálních faktorů geneticky citlivých jedinců. Crohnova choroba způsobuje chronické granulomatózní a transmurální záněty v různých částech trávicí soustavy, nejčastěji však v terminálním ileu. Častými symptomy jsou bolesti břicha, nevolnost, průjem, krvácení do stolice, horečka či úbytek hmotnosti

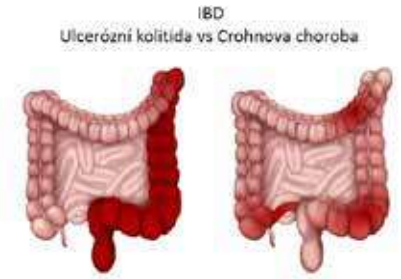
Klíčová slova:
terapeutické monitorování
biologická léčba
Crohnova choroba
IBD

Key words:
therapeutic monitoring
biological treatment
Crohn's disease
IBD

(1, 2). Ulcerózní kolitida je hemoragicko-katarální nebo ulcerózní zánět sliznice tlustého střeva a konečníku a lze ji dle místa postižení rozlišit na pankolitidu (postižení celého tračníku), subtotální formu (postižení tračníku od konečníku po slezinné ohbí), levostrannou formu (postižení tračníku od konečníku po jaterní ohbí) a proktosigmoitidu (postižení konečníku a esovitého tračníku) (1, 2). Prevalence onemocnění má v Evropě zřejmý severo-jižní a západo-východní rostoucí trend a dosahuje hodnot kolem 200/100 000 (3). Incidence v ČR dosahuje hodnot 22–28/100 000 (4).

Léčba IBD

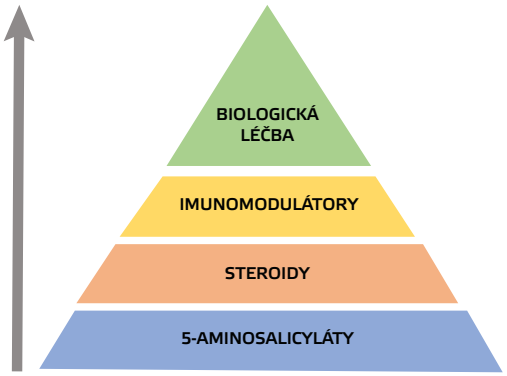
Obr. 1 *Zobrazení rozdílu mezi střevem postiženým Crohnovou nemocí (postihuje různé části střeva) a střevem postiženým ulcerózní kolitidou (postihuje kompaktní část střeva) (7)*



Mechanismem účinku lékových forem konvenční terapie je zejména tlumení zánětlivé reakce a zásah do patogeneze nemoci, neboť kauzální terapie dosud není k dispozici a tedy tato onemocnění nelze plně vyléčit. Základními terapeutiky užívanými k léčbě CD a UC jsou aminosalicyláty (např. mesalazin, sulfasalazin), kortikoidy (např. budesonid, prednison, methylprednisolon), imunosupresiva (např. azathioprin, methotrexát, cyklosporin A) a při nedostatečném efektu konvenční léčby je indikována biologická léčba nebo konkomitantní imunosupresivní terapie zvyšující účinnost léčby biologiky (1, 5, 6).

Biologická terapie zahrnující přípravky proti cíleným antigenům: tumor nekroti-

Obr. 2 *Znázornění postupu terapie IBD onemocnění. Například u ulcerózní kolitidy se podávají nejprve aminolsalicyláty, dále pak steroidní imunosupresiva, imunomodulátory či biologická léčba. Pro mírné formy onemocnění je obvykle dostačující postupovat ve znázorněné pyramidě směrem nahoru. U vážnějších stavů je možno využívat konkominantní přístup léčby a postupovat také v opačném směru pyramidy (8)*



zujícímu faktoru α (TNFα; infliximab, adalimumab, golimumab), integrinovým receptorům α4β7 (vedolizumab) či podjednotce p40 interleukinu IL12/23 (ustekinumab), je účinnou formou léčby pacientů se středně těžkými až těžkými formami idiopatických střevních zánětů (IBD). Monoklonální protilátky jsou připravované biotechnologickými postupy s vysokou selektivitou a jedná se o specifické bílkoviny produkované hybridomovou linií vznikající fúzí jednoho B-lymfocytu a jedné speciálně připravené nádorové buněčné linie. Výsledným produktem jsou identické protilátky s vysoce specifickou vazbou na cílový antigen.

Dávkování biologik, resp. dávkovací intervaly se liší v závislosti na indukční nebo udržovací fázi léčby. V obou případech může probíhat léčba i konkomitantně s imunosupresivy. Cílem léčby biologiky je navození odpovědi pacienta vedoucí k remisi onemocnění. K posouzení účinnosti léčby se využívá vyšetření

klinické, laboratorní vyšetření krve a stolice – zejména CRP a fekální kalprotektin, endoskopické vyšetření a vyšetření zobrazovacími metodami (sonografie, CT, MR). (1,5,6).

Před zahájením biologické léčby

Před zahájením biologické léčby je nutno provést screening latentní TBC a v klinické praxi je doporučeno provádět vakcinaci proti Streptococcus pneumoniae, HBV, eventuálně proti chřipce. Dále je vhodné vyloučit přítomnost bakterie Clostridium difficile a cytomegalovirové infekce (1, 5, 6).

Nežádoucí účinky konvenční léčby a biologické léčby

Podobně jako u konvenčně užívaných imunosupresiv může i u biologické léčby docházet ke vzniku oportunních infekčních komplikací (fungální, virové, bakteriální). Podávání biologik je spojeno s rizikem indukce tvorby autoprotilátek (např. ANA, anti-dsDNA) a je doporučováno monitorovat také tyto protilátky vzhledem k možnosti vzniku SLE (systémový lupus erythematodes) či jiných forem autoimunitních onemocnění. Mírné zvýšení rizika vývoje malignit také není vyloučeno (1, 5, 6).

Gravidita a laktace v terapii biologiky

Na rozdíl od některých konvenčních terapeutik (např. thiopuriny, methotrexát) je terapie anti-TNFα preparáty (infliximab, adalimumab) považována za bezpečnou v těhotenství i laktaci. Transport placentou během 1. a 2. trimestru gravidity je minimální, od 26. týdne pak stoupá. Z tohoto důvodu je vhodné během 3. trimestru biologickou léčbu nepodávat, ale pokud je přínos podávání jasně převažující nad potenciálním rizikem, lze terapii biologiky zvážit. Hladiny biologik u novorozence jsou pak až trojnásobně vyšší než u matky vzhledem k nedozrálému retikuloendotelovému systému a snížené clearance. Zvýšená hladina může u novorozence přetrvávat 6–12 měsíců a proto je nutné před jeho očkováním stanovit hladinu biologika (pupečníková krev) a nepoužívat živé vakcíny do doby odbourání léčiva z krevního oběhu.

Adekvátní údaje o podávání ustekinumabu či vedolizumabu během gravidity jsou limitované a z důvodu bezpečnosti se doporučuje jejich podávání v závislosti na závažnosti onemocnění v těhotenství ukončit (1, 5, 6).

TDM biologik

V klinické praxi rozlišujeme pacienty s primární neodpovídavostí na léčbu, tedy primární non-respondery (10–20% pacientů), a pacienty, u kterých je relaps onemocnění důsledkem sekundárního selhání léčby. Pro účely rozlišení primárních non-responderů od sekundárního selhání léčby je významné provádět terapeutické monitorování (TDM) biologické léčby. V rutinní praxi obvykle sledujeme terapeutické trough hladiny biologika (nejnižší sérové hladiny léčiva před podáním další dávky). Měření vrcholových hladin není tak významné, neboť pracujeme převážně s centrálním kompartmentem, jehož velikost lze dobře odhadnout. Protože monoklonální protilátky mohou být imunogenní, je velmi důležité monitorovat vedle trough hladin biologik také možnou přítomnost protilátek proti biologiku. V průběhu let bylo provedeno několik retrospektivních studií, na jejichž základě vznikl mezinárodní konsensus definující diagnostický algoritmus, který

doporučuje terapeutické trough hladiny (zejména pro infliximab a adalimumab) a cut-off hodnoty pro protilátky. Bylo prokázáno, že v případě přítomnosti protilátek proti biologiku dochází k významným změnám ve farmakokinetice a to z hlediska zvýšené hodnoty clearance a snížené hodnoty biologického poločasu biologika (1, 5, 6).

Naše laboratoř preferuje tzv. proaktivní přístup TDM, kdy jsou sledovány trough hladiny biologika se současnou detekcí protilátek proti biologiku v pravidelných intervalech s cílem včasného zachycení protilátek proti cílené léčbě, kdy pod určitou cut-off hodnotu lze tuto situaci zvrátit fortifikací léčby nebo zkrácením dávkovacích intervalů. V současnosti však dominuje reaktivní přístup TDM, který je prováděn často až při podezření na selhávání terapie. K farmakodynamickému selhání může dojít v situaci, kdy v patogenezi onemocnění hrají dominantní roli jiné mediátory zánětu než TNF-α a v laboratoři obvykle sledujeme terapeutické trough hladiny. V takovém případě je vhodné zaměnit preparát cílený na TNF-α za biologikum s jiným mechanismem účinku (např. infliximab za vedolizumab, tzv. swap metoda). Farmakokinetické selhávání léčby je charakteristické nízkými trough hladinami biologika a může být způsobeno vlivem zvýšené clearance léčiva při těžkém zánětu, katabolickým stavem organismu, zvýšenou ztrátou biologika do střeva nebo zvýšenou tvorbou protilátek proti

Tab. 1 *Dávkování a trough hodnoty biologik užívaných k léčbě IBD. (*Pro infliximab byla stanovena hodnota cut-off protilátek, která je již ukazatelem nutnosti změnit podávané biologikum. U ostatních preparátů je uvedena horní mez pracovního rozsahu dle doporučení dodavatele, nicméně pro určení jejich cut-off hodnot je nutno provést další studie (9))*

	INFLIXIMAB (Remicade®)	ADALIMUMAB (Humira®)	VEDOLIZUMAB (Entyvio®)	USTEKINUMAB (Stelara®)
Mechanismus účinku	Chimérická monoklonální protilátka IgG1 proti TNFα	Humánní monoklonální protilátka IgG1 proti TNFα	Humanizovaná monoklonální protilátka IgG1 proti leukocytárním integrinovým receptorům α4β7	Humánní monoklonální protilátka IgG1 proti podjednotce p40 interleukinu 12 a 13
Způsob podání	Infuze	Subkutánní injekce	Infuze	Infuze / subkutánní injekce
Dávkování indukční fáze	0. týden: 5 mg/kg 2. týden: 5 mg/kg poté každý 6–8. týden	1. den: 2 x 80 mg 15. den: 80 mg	0. týden: 300 mg 2. týden: 300 mg 6. týden: 300 mg	260–520 mg i. v. infuze
Dávkování udržovací fáze	Každý 6.–8. týden: 5 mg/kg	Každý druhý týden: 40 mg	Každý 8. týden: 300 mg	Každý 8. týden: 90 mg subkutánně
Trough hladiny indukční/postindukční fáze	**≥ 20–25 mg/l** (2. týden) **≥ 10 mg/l** (6. týden) **≥ 3–7 mg/l** (14. týden)	**≥ 5–7 mg/l** (4. týden)	**≥ 28 mg/l** (2. týden) **≥ 24 mg/l** (6. týden) **≥ 13–17 mg/l** (14. týden)	**≥ 3,5 mg/l** (8. týden)
Trough hladiny udržovací fáze	**≥ 3–7 mg/l**	**≥ 5–8 mg/l**	**≥ 12–14 mg/l**	**≥ 1–4,5 mg/l**
Protilátky	200 ng/ml (cut-off*)	160 mg/ml	500 ng/ml	100 AU/ml

biologiku. Takovou situaci lze řešit intenzifikací léčby nebo záměnou biologika v rámci jedné skupiny (tzv. switch metoda) nebo více skupin léčiv (infliximab za adalimumab nebo jiné).

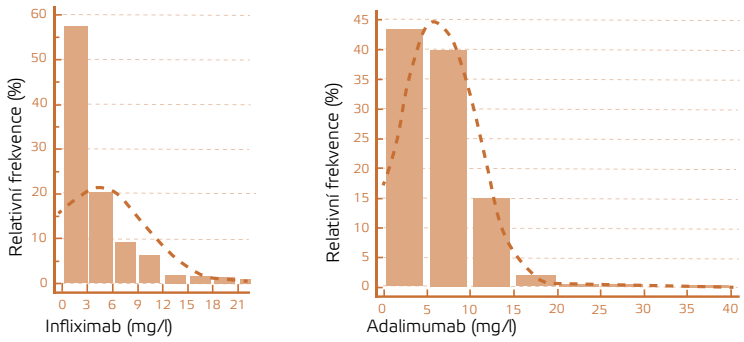
Cílem TDM biologik je dosažení dobré korelace mezi koncentrací léčiva a klinickým účinkem, tedy optimalizace účinnosti a bezpečnosti léčby, prodloužení doby remise, zamezení relapsu onemocnění a v neposlední řadě zlepšení farmakoekonomické situace.

Dosavadní výsledky naší laboratoře ukazují, že více než polovina pacientů v udržovací fázi terapie infliximabem nemá individualizované dávkování a nedosahuje tak doporučených trough hladin (≥ 3 mg/l; Obr. 3). V případě adalimumabu je situace podobná, procento pacientů s nedostačujícími hladinami léku před podáním však nepřesahuje hodnotu 50 %. Vzhledem k těmto získaným výsledkům považujeme proaktivní přístup TDM za klíčový ke zlepšení individualizované terapie.

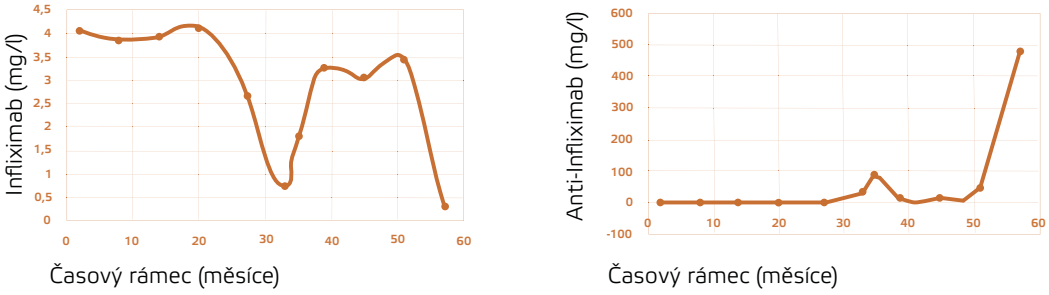
Kazuistika TDM infiliximabu a protilátek

U pacientky (žena, 32 let) léčené s Crohnovou chorobou infliximabem konkomitantně s azathioprinem bylo nastaveno dávkování 5 mg/kg infliximabu co 8 týdnů. V pravidelných intervalech pak byly měřeny trough hodnoty léčiva včetně protilátek (obr. 4). Současně byly stanovovány hodnoty CRP a fekálního kalprotektinu (tabulka 2). V prvních 20 měsících se trough hladina infliximabu pohybovala v doporučených mezích, nicméně již ve 27. měsíci byl pozorován pokles trough hladiny. Ve 33. měsíci byl tento pokles již významný a zároveň byly pozorovány zvyšující se hladiny protilátek, které v 27. měsíci ještě nebylo možné detekovat (vliv non-neutralizujících imunokomplexů). Zároveň byly ve 33. měsíci naměřeny vysoké hodnoty CRP i fekálního kalprotektinu. Proto byla od 33. měsíce dávka infliximabu fortifikována na 7 mg/kg, čímž se podařilo snížit koncentraci protilátek proti infliximabu, dosáhnout terapeutických trough hladin infliximabu a fyziologických hodnot CRP a kalprotektinu. Toto dávkování bylo účinné do 51. měsíce, kdy došlo k opětovnému nárůstu protilátek a v 57. měsíci již koncentrace protilátek přesáhla hodnotu cut off. V takovém případě již nemělo význam v terapii infliximabem pokračovat a bylo nutné zaměnit biologikum za jiné metodou switch nebo swap.

Obr. 3 *Naměřené trough hladiny v udržovací fázi léčby vybraných skupin pacientů léčených infliximabem (698 pacientů) a adalimumabem (365 pacientů)*



Obr. 4 *Naměřené hladiny infliximabu a jeho protilátek v daném časovém rozmezí u vybrané pacientky s CD*



Tab. 2 *Sledované parametry u vybrané pacienty s CD v časovém rozmezí 57 měsíců*

Měsíc	Infliximab (mg/l)	Infliximab-protilátky (ug/l)	CRP (mg/l)	Kalprotektin (ug/g)	Dávka (mg/kg)
2	4,02	0,5	15	263	5
8	3,85	0,5	17	x	5
14	3,92	0,5	3	x	5
20	4,1	0,5	8	78	5
27	2,63	0,5	15	x	5
33	**0,74**	**35**	**43**	**320**	**7**
35	1,82	86	25	x	7
39	3,22	5	12	x	7
45	3,05	11	3	32	7
51	3,43	44	7	x	7
57	**0,25**	**480**	**20**	**220**	**0**

Závěr

TDM biologické léčby se provádí zpravidla před dalším podáním léku (sledování trough hladin). Proaktivní TDM s včasnou detekcí protilátek proti biologiku zvyšuje bezpečnost a účinnost terapie a má také jednoznačný přínos z hlediska optimalizace léčby, remise onemocnění, zabránění relapsu a farmakoekonomiky.

Co nabízíme

ELISA metodou stanovujeme hladiny infliximabu, adalimumabu, vedolizumabu a ustekinumabu včetně protilátek. V závislosti na poptávce vyšetření jsme schopni naše portfolio obohatit o stanovování hladin a protilátek dalších preparátů používaných k léčbě nejen IBD onemocnění, včetně konzultací.

KONTAKTNÍ ÚDAJE:
Kristýna Vlková
Laboratoře AGEL a.s.
Laboratoř farmakologie a toxikologie
Revoluční 2214/35, 741 01 Nový Jičín
e-mail: kristyna.vlkova@lab.agel.cz

Literatura

1. Feuerstein, J. D. et al. AGA Institute Clinical Guidelines Committee. AGA Clinical Practice Guidelines on the Management of Moderate to Severe Ulcerative Colitis. Gastroenterology 2020, 158(5):1450-1461. doi: 10.1053/j.gastro.2020.01.006.

2. https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/crohns-disease/symptoms-causes/syc-20353304

3. https://www.prolekare.cz/kreditovane-kurzy/ulcerozni-kolitida-126713/ulcerozni-kolitida

4. Jarkovský, J. et al. Epidemiologie, hospitalizační léčba a migrace IBD pacientů za specializovanou péčí v České Republice. Gastroenterologie a hepatologie. Praha: Česká lékařská společnost J. E. Purkyně 2017, 71(6):501-509. ISSN 1804-7874.

5. Papamichael, K. et al. Appropriate Therapeutic Drug Monitoring of Biologic Agents for Patients With Inflammatory Bowel Diseases. Clin Gastroenterol Hepatol. 2019, 17(9):1655-1668.e3. doi: 10.1016/j.cgh.2019.03.037.

6. Bortlík M. et al.; Guidelines for the administration of biological therapy in patients with inflammatory bowel diseases: fourth, updated edition. Gastroent Hepatol 2019, 73(1):11–24. doi:10.14735/amgh201911

7. Nikolaus, S. et al. Diagnostics of inflammatory bowel disease. Clin. Gastroenterol. Hepatol. 2007, 133(5):1670-1689.

8. Step-up treatment pathway for Crohn's disease and ulcerative colitis: https://www.ibdrelief.com/learn/treatment/medication-for-ibd/step-up-treatment-pathway-for-crohns-disease-and-ulcerative-colitis

9. www.bridgeibd.com/optimizer

Rezistence a nadužívání ATB

MUDr. Václava Adámková, Ph.D.

Infekční onemocnění provázela lidstvo po celou dobu jeho existence, protože mikroorganismy zde byly dříve než vyšší živočichové a s největší pravděpodobností tu budou i po nás.

Klíčová slova:
antibiotika
rezistence
antibiotický stewardship (ABS)
kumulativní antibiogramy

Key words:
antibiotics
resistance
antibiotic stewardship (ABS)
cumulative antibiograms

Objev penicilinu a jeho uvedení do praxe během druhé světové války znamenaly obrovský průlom v medicíně. Avšak již sir Alexander Fleming v roce 1945 během své přednášky u příležitosti udělení Nobelovy ceny upozornil na fakt, že není obtížné „udělat" bakterii rezistentní k penicilinu. *„Ta doba prý nastane, až si lidstvo bude moci koupit penicilin v obchodě a člověk díky své neznalosti a ignorantství si antibiotikum poddávkuje, přičemž tato expozice subinhibičním dávkám povede k selekci rezistentních bakterií"* (1). Jeho slova se záhy potvrdila. Objevení se a rychlé šíření rezistentních bakterií během posledních dvou dekád nám odkrylo hloubku našich neznalostí o evoluci bakteriální rezistence a ekologických procesech uvnitř mikrobiální populace. Masivní nárůst rezistence v posledních letech je spolu s omezeným spektrem nových účinných antibiotik důvodem zamyslet se nad racionálním přístupem k antiinfekční terapii (2).

Determinanty rezistence cirkulují v mikrobiomu miliony let a existovaly i před érou komerčně připravovaných antibiotik, jak dokládají metagenomické analýzy pravěké DNA z permafrostu, které identifikovaly geny kódující rezistenci k betalaktamům, tetracyklinům a glykopeptidům; a tyto geny jsou velmi podobné genům dnes izolovaným od rezistentních bakterií vyvolávajících infekce spojené s poskytovanou zdravotní péčí (3).

Obr. 1 *ATB rezistence*

Role antibiotik

Slovo antibiotikum jako podstatné jméno použil poprvé v roce 1941 Selman Waksman pro popis malých molekul produkovaných mikroorganismy, které antagonizují růst ostatních mikrobů (4).

Dnes je antibiotikum definováno jako substance biologického, semisyntetického nebo syntetického původu, která vykazuje selektivní toxicitu proti bakteriím a je tudíž potenciálně použitelná

k léčbě infekcí. Dezinfience a antiseptika nejsou do této definice zahrnuta.

Avšak molekuly s antibakteriální aktivitou zde existovaly od nepaměti. Produkce antibiotik mikroorganismy je nesmírně složitý metabolický proces, kdy jsou do syntézy jednotlivých molekul zahrnuty enzymaticky katalyzované procesy syntézy bílkovin či mastných kyselin. Například penicilin je odvozený od tripeptidu tvořeného cysteinem, valinem a alfa-aminoadipátem. Tyto peptidové prekurzory jsou posttranslačně modifikovány do finální podoby. Biosyntéza tetracyklinu je úzce spojená se syntézou mastných kyselin a základní stavební molekulou streptomycinu je sacharidový monomer. Lze říct, že biosyntéza antibiotik je modulárním procesem a pozměnění jakéhokoliv modulu má za následek diametrálně odlišný produkt. Zároveň je třeba si uvědomit, že geny, které kódují tyto biosyntetické procesy a ostatní sekundární metabolity, paralelně kódují i mechanismy rezistence. Tyto geny se šíří horizontálně, a proto snadno dochází k přenosu rezistence i na ostatní mikroorganismy v okolí.

Je tedy zřejmé, že aby mohly mikroorganismy, resp. bakterie přežít do současnosti, tak si musely vytvořit obranné mechanismy, mezi které patří mimo jiné i odolnost vůči látkám s antibakteriálním působením, které se v prostředí přirozeně vyskytují.

Evoluce bakteriální rezistence je složitá a to, že ji plně nechápeme, je dáno především naší primární neznalostí role antibiotik v přírodě (5).

My víme, co mohou antibiotika udělat pro nás (boj s infekčními chorobami), ale proč jsou důležitá pro produkující mikroorganismy? Dle nejnovějších studií je patrné, že v koncentracích výrazně nižších, než jsou nutné k inhibici růstu ostatních bakterií, mohou antibiotika modulovat transkripční profil cílových bakterií. Tudíž je lze označit za signální molekuly, které dokážou „zabíjet" bakterie, jsou-li aplikovány v nepřirozeně vysokých koncentracích.

Z tohoto úhlu pohledu produkty genů rezistence spíše tlumí vysílanou informaci, než že by poskytovaly nějakou ochranu dané bakterii. Krátce řečeno, nevíme nic o ekologické roli molekul, které nazýváme antibiotiky (6).

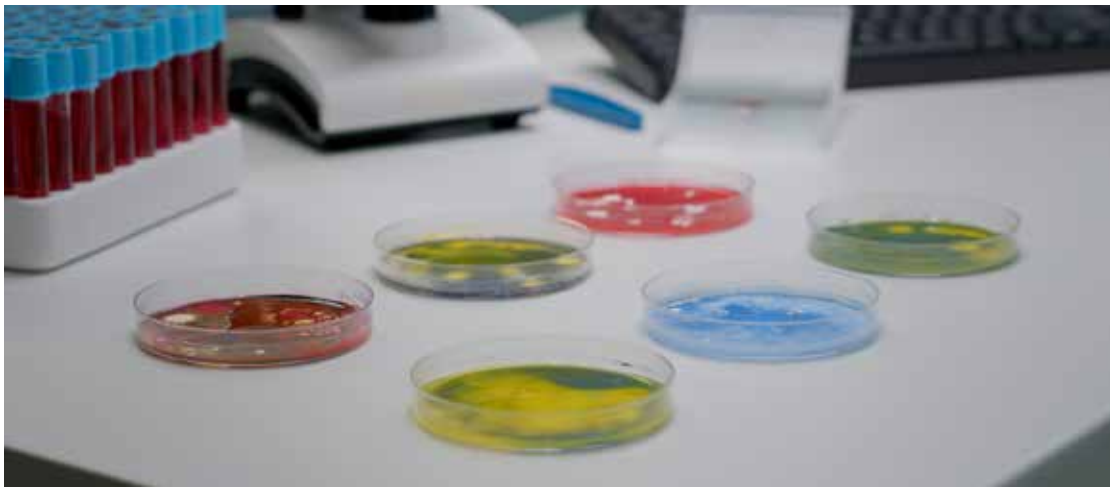
Zjednodušeně lze říct, že lidstvo svým nezodpovědným přístupem k používání antibiotik rezistenci nevytvořilo, ale výrazně umožnilo její rozšíření mezi bakteriemi.

Multirezistentní bakterie

Dlouhou dobu byla antibiotika vnímána jako zcela bezpečná léčiva, která vymýtí bakteriální infekce, ale tak tomu není a ani z podstaty věci být nemůže. Dnes se stále více hovoří o narůstajícím počtu pacientů, kteří zemřou v důsledku infekce vyvolané rezistentní bakterií. To je sice fakt, ale zavádějící, neboť samotná rezistence vůči antibiotiku není příčinou vzniku infekce. Problém je, že pacient nemusí dostat účinná antibiotika, protože lékař neví, že původce infekce není citlivý na běžně používaná antibiotika, a pak léčba selhává a pacient může zemřít.

Poslední dekáda přinesla signifikantní nárůst rezistence napříč celým bakteriálním spektrem a bakterie sdružené pod akronym ESCAPE (vankomycin rezistentní enterokoky, meticilin rezistentní

Obr. 2 *Laboratorní analýza bakterií*



S. aureus, Clostridium difficile, Acinetobacter baumanii, Pseudomonas aeruginosa, enterobakterie produkující širokospektré beta-laktamázy či karbapenemázy) se staly skutečnou hrozbou pro zdraví celé populace (7).

Nejenom že se zvyšuje incidence těchto bakterií jako původců infekcí, ale zároveň se signifikantně zvyšuje jejich rezistence a tím i morbidita a mortalita v porovnání s infekcemi vyvolanými citlivými kmeny těchto bakterií. V případě infekcí vyvolaných těmito multirezistentními bakteriemi je dokumentováno opoždění zahájení adekvátní antibiotické léčby až o 5 dnů, což je spojeno s vyšší mortalitou především u pacientů v intenzivní péči, kde každá hodina zpoždění rapidně snižuje šance na přežití (8). Proto je důležité optimalizovat používání antibiotik, zrychlit laboratorní diagnostiku, aby se adekvátní léčba zahájila co nejdříve. A zejména je třeba včas identifikovat pacienty, u kterých by se mohly tyto multirezistentní kmeny vyskytnout, a to na základě znalosti rizikových faktorů sdružených s jejich výskytem.

Narůstající problém s antibakteriální rezistencí vede k potřebě a nutnosti správné klasifikace a definice jednotlivých rezistentních infekčních agens, proto Evropská společnost klinické mikrobiologie a infekčních chorob vydala návrh standardních definičních kritérií pro bakterie se získanou rezistencí. Jako MDR (multidrug-resistant) jsou definovány bakterie, které získaly necitlivost alespoň ke třem různým skupinám antibiotik, do kategorie XDR (extensively drug-resistant) patří bakterie se zachovalou citlivostí k jedné, maximálně dvěma skupinám antibiotik a PDR (pandrug-resistant) zahrnují bakterie necitlivé vůči všem stávajícím kategoriím antibiotik (9).

Počet infekcí vyvolaných bakteriemi rezistentními na běžně užívaná antibiotika se celosvětově zvyšuje (10).

Rezistence bakterií k antibiotikům

Při příležitosti Světového dne zdraví v roce 2011 ředitelka Světové zdravotnické organizace varovala před narůstající rezistencí s tím, že svět míří k postantibiotické éře, kterou později nazvala *„the end of modern medicine as we know it"* (11,12).

Aby byla zachována účinnost stávajících antibiotik a s tím související možnost efektivní léčby, je nezbytná aktivní spolupráce kliniků a mikrobiologů v monitorování a predikci výskytu rezistence. Systematicky prováděná surveillance umožňuje sledovat dlouhodobé trendy vývoje rezistence i vyhodnotit dopady intervenčních opatření zaměřených na snížení výskytu a šíření rezistentních bakterií (13). V roce 2015 Světová zdravotnická organizace připravila globální akční plán, kde je surveillance antimikrobiální rezistence zmiňována jako základní kámen kontroly AMR (Antimicrobial Resistance) (14).

Problém narůstající rezistence je alarmující o to více, že v preklinickém výzkumu je jen velmi málo nových účinných molekul, a nelze proto v blízké budoucnosti očekávat zásadní rozšíření současného spektra dostupných antibiotik (15).

Nadměrná spotřeba antibiotik zvyšuje pravděpodobnost selekce rezistentních kmenů nejen u léčeného jedince, ale následně vede i k nárůstu rezistence na lokální úrovni. V klinické praxi se u kriticky nemocných s nadměrným a neindikovaným podáváním antibiotické léčby setkáváme často. Za hlavní příčinu antibiotické polypragmazie je považována obava z prodlení zahájení empirické terapie nebo podání neúčinných antibiotik, neboť neadekvátní a pozdě zahájená antibiotická terapie je faktorem zvyšujícím morbiditu i mortalitu kriticky nemocných. Proto je u pacientů s předpokládanou nebo prokázanou infekcí doporučováno časné zahájení léčby antibiotikem s co nejširším spektrem účinku (empirická terapie), nicméně je třeba se vyvarovat neadekvátně dlouhého podávání širokospektrých antibiotik bez provedení cílené úpravy dle mikrobiologických nálezů (16).

Z klinického pohledu je alarmující skutečnost, že dochází jak k vzestupu počtu infekcí vyvolaných rezistentními bakteriálními kmeny, tak k signifikantnímu zvyšování počtu antibiotik, ke kterým jsou uvedené bakterie rezistentní. Infekce vyvolané multirezistentními kmeny jsou v porovnání s infekcemi vyvolanými citlivými kmeny spojeny s významně vyšší morbiditou i mortalitou, ne však proto, že by rezistence k antibiotikům byla faktorem virulence, ale proto, že není účinná léčba zahájena včas (17, 18, 19). Opoždění adekvátní antibiotické terapie je přitom u kriticky nemocných spojeno s vyšší mortalitou, riziko nepříznivého klinického vývoje a úmrtí stoupá de facto úměrně s každou hodinou opoždění (20). Adekvátní a racionální antibiotická terapie proto vyžaduje:

- senzitivní a specifickou laboratorní diagnostiku k potvrzení infekční etiologie stavu (biomarkery infekce);
- včasně a správně provedené mikrobiologické vyšetření k časné identifikaci vyvolávajícího agens (případně molekulární diagnostika patogenu);
- odpovídající empirickou antibiotickou léčbu (širokospektré antibiotikum a/nebo jejich kombinace, časná aplikace, adekvátní dávkování, úměrná doba podávání);
- a v neposlední řadě identifikaci pacientských rizikových faktorů spojených s vyšším výskytem infekcí vyvolaných multirezistentními kmeny (21).

Z těchto důvodů jsou do empirické antimikrobiální terapie stále častěji zahrnovány další faktory, včetně lokální úrovně rezistence nejčastěji izolovaných původců, které by měly vést k tomu, že zahájená léčba bude co nejúčinnější. Mnohé mikrobiologické laboratoře proto posky-

tují klinickým pracovištím pravidelně tzv. kumulativní antibiogramy, které jsou nedílnou součástí antibiotického stewardshipu (ABS).

Kumulativní antibiogramy

Kumulativní antibiogram může být definován jako přehled výskytu rezistence k jednotlivým antibiotikům u bakterií izolovaných z biologického materiálu pacienta (22).

Užitečnost kumulativních antibiogramů závisí především na robustních vstupních datech (tj. standardizované testování citlivosti k bakterií k antibiotikům) stejně jako na transparentnosti a shodném vytváření antibiogramů napříč různými mikrobiologickými laboratořemi (23, 24).

Spolehlivé kumulativní antibiogramy mohou výrazně pomoci jak při zamezení nesprávné volby antibiotika, tak při snížení excesivního používání širokospektrých antibiotik v okamžiku, kdy u konkrétního pacienta výsledky mikrobiologického vyšetření a stanovení citlivosti na antibiotika ještě nejsou k dispozici (25).

Kumulativní antibiogramy by měly být pravidelně poskytovány nejenom klinickým lékařům, kterým slouží jako podklad při volbě vhodného antibiotika, ale zároveň i členům nemocničních ABS týmů, kteří by měli na jejich podkladě zavčas odhalit problém narůstající bakteriální rezistence či objevení se nového fenotypu rezistence. Surveillance bakteriální rezistence musí být prováděna ve spolupráci klinického mikrobiologa a ABS týmu (23). Objevení neobvyklého fenotypu rezistence je z mikrobiologického hlediska velmi zajímavé, ne vždy se však jedná o potvrzený případ, ale pouze o interpretační či laboratorní chybu, kterou správně vytvářené antibiogramy mohou relativně snadno odhalit. Zde je zcela nezastupitelná role klinického mikrobiologa, který nový či atypický fenotyp objeví v rámci denní praxe a ověří, zdali je tento opravdu správný, většinou konfirmací v Národní referenční laboratoři pro antibiotika, a nález je poté referován (26). Jestliže se ale přijde na takovýto výsledek až v rámci hodnocení zpracovaného kumulativního antibiogramu, tak se pravděpodobně jedná o chybu, která byla přehlédnuta v rutinním provozu (27). Eliminace chyb je možná pouze pravidelnou analýzou dat a kontrolou dodržování doporučení pro přípravu kumulativních antibiogramů, což není vždy úplně jednoduché. Zapantis a kol. (28) analýzou 209 kumulativních antibiogramů odhalili 14 % „neobvyklých" výsledků, jako např. enterokoky citlivé k cefalosporinům nebo kmeny ***Stenotrophomonas maltophilia*** citlivé k imipenemu. Obdobná zjištění byla konfirmována i dalšími autory (23, 27). Častou chybou, nejenom při tvorbě kumulativních antibiogramů, je též reportování nedoporučených kombinací původce–antibiotikum, jako například ***Pseudomonas aeruginosa – cotrimoxazol*** nebo ***Enterobacter cloacae*** complex – potencovaný aminopenicilin (23), což vede k zavádějícímu dojmu výskytu multirezistentních kmenů, ačkoliv se jedná o tzv. přirozené (primární) rezistence.

Na druhou stranu dlouhodobá analýza lokálních kumulativních antibiogramů umožňuje laboratoři aktivní přístup k selektivnímu sdělování výsledků, což je jednou ze součástí ABS a je doporučováno odbornými společnostmi jako důležitý faktor ovlivňující preskripci antibio-

tik. Přesto mnoho laboratoří stále poskytuje plné výsledky všech testovaných antibiotik, včetně nedoporučených kombinací patogen–antibiotikum, což může vést ke zbytečnému nadužívání širokospektrých antibiotik, zvláště v případech klinicky méně závažných infekcí vyvolaných dobře citlivými kmeny bakterií, např. infekce dolních močových cest a terapie fluorovanými chinolony či cefalosporiny vyšších generací (29, 30, 31).

Spotřeba antibiotik a rezistence

Faktorů podílejících se na vzniku a rozvoji rezistence bakterií k antibiotikům je celá řada, ale zcela nepopiratelný vliv hraje spotřeba antibiotik (32, 33).

Pravděpodobný vliv na enormní nárůst rezistence *E. coli* k potencovaným aminopenicilinům v našich národních datech lze spatřovat i v nárůstu spotřeby chráněných penicilinů v ČR, kdy v roce 2008 byla jejich spotřeba 3,7 DDD na 1 000 obyvatel/den a v roce 2018 již 5 DDD na 1 000 obyvatel/den, v porovnání s některými jinými evropskými státy je tento nárůst až padesátinásobně vyšší, například v Norsku v roce 2018 byla spotřeba chráněných penicilinů pouze 0,1 DDD na 1 000 obyvatel/den a v Německu 0,58 DDD na 1 000 obyvatel/den (34).

Antibiotický stewardship (ABS) – systematický a optimalizovaný přístup, který definuje správné používání antimikrobiálních látek v zdravotním systému s cílem zabránit nadužívání antibiotik, oddálit nástup rezistentních kmenů bakterií a zvýšit bezpečnost a účinnost antimikrobiální léčby.

Závěr

Co s tím? Každý z nás, ať již pacient, nebo lékař, by si měl uvědomit, že antibiotika jsou obrovským přírodním dědictvím, a měl by se k nim chovat tak, aby jejich účinnost byla zachována i pro příští generace. Je třeba se vyvarovat nepřiměřeně dlouhého podávání antibiotik bez následné úpravy dle dostupných klinických a laboratorních nálezů. Znalost lokální epidemiologické situace je esenciální pro optimalizaci vhodné antibiotické léčby, na druhou stranu i při vysokém podílu výskytu rezistentních kmenů nelze antibiotickou terapii paušalizovat. Antibiotický stewardship se tak stává etickým imperativem v éře multirezistentních mikroorganismů.

Pro praxi

- Antibiotika nejsou antipyretika – pouze zvýšená teplota není indikací k předepsání antibiotik.
- Před zahájením antibiotické léčby se pokusit zajistit klinicky validní materiál pro detekci původce.
- Jestliže antibiotická terapie nevykazuje žádný účinek za 3–4 dny, tj. 72–96 hodin (s výjimkou infekční endokarditidy), je třeba zvážit následující možnosti: nevhodná volba antibiotika; antibiotikum nedosahuje dostatečnou koncentraci v místě probíhající infekce; špatná identifikace původce (viry, kvasinky); léková horečka.
- Jestliže není antibiotická terapie nezbytná, okamžitě ukončit její podávání – čím déle jsou antibiotika podávána, tím vyšší je riziko nežádoucích účinků, toxicity a selekce rezistence. Mnohá lokálně podávaná antibiotika mohou být nahrazena antiseptiky.
- Termín „citlivý“ v antibiogramu ne-

musí nutně znamenat, že antibiotikum bude klinicky účinné – až 20 % výsledků vykazuje falešnou pozitivitu či negativitu; ne všechny laboratoře používají standardizované postupy/metody.

- Správný odběr a transport materiálu do laboratoře jsou esenciální pro správnou diagnostiku a následnou volbu antibiotické léčby.

KONTAKTNÍ ÚDAJE:
MUDr. Václava Adámková, Ph.D.
Primářka Klinické mikrobiologie a ATB centra Všeobecné fakultní nemocnice a 1. LF UK v Praze, Ke Karlovu 2, Praha 2
e-mail: vaclava.adamkova@vfn.cz

Literatura

1. https://www.nobelprize.org/uploads/2018/06/fleming-lecture.pdf.

2. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. P T. 2015; 40(4): 277-283.

3. D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WW, Schwarz C, Froese D, Zazula G, Calmels F, Debruyne R, Golding GB, Poinar HN, Wright GD. Antibiotic resistance is ancient. Nature. 2011; 477: 457-461.

4. Waksman, SA, and Tishler, M. The Chemical Nature of Actinomycin, an Anti-microbial Substance Produced by Actinomyces Antibioticus. J. Biol. Chem. 1942; 142, 519-528.

5. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol Mol Biol Rev. 2010; 74(3): 417-433.

6. Wencewicz TA. Crossroads of Antibiotic Resistance and Biosynthesis. J Mol Biol. 2019; 431(18): 3370-3399. doi:10.1016/j.jmb.2019.06.033.

7. Peterson LR. Bad Bugs, No Drugs: No ESCAPE Revisited. CID 2009; 49:992-3.

8. Kumar A, Ellis P, Arabi Y. Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. Chest. 2009; 136(5): 1237-1248. doi: 10.1378/chest.09-0087. Epub 2009.

9. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistence. Clin Microbiol Infect. 2012; 18: 268-281.

10. World Health Organisation (WHO). Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. Geneva: WHO; 2014; dostupné z: http://www.who.int/drugresistance/ ocuments/surveillancereport/en/.

11. World Health Organisation (WHO). World health day 2011. Geneva: WHO; 2011. dostupné z: http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2011/whd_20110407/en/.

12. World Health Organisation (WHO). Antimicrobial resistence in the European Union and the world. Geneva: WHO; 2012; dostupné z: http://www.who.int/dg/speeches/2012/amr_20120314/en/.

13. Critchley IA, Karlowsky JA. Optimal use of antibiotic resistance surveillance systems. Clin Microbiol Infect 2004; 10: 502-11.

14. World Health Organisation (WHO). Global action plan on antimicrobial resistance. Geneva: WHO; 2015; dostupné z: http://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/ global-action-plan/en/).

15. Theuretzbacher U, Outterson K, Engel A, Karlén A. The global preclinical antibacterial pipeline. Nat

Rev Microbiol. 2020; 18(5): 275-285. doi:10.1038/s41579-019-0288-0.

16. Bassetti M, De Waele JJ, Eggimann P, Garnacho-Montero J, Kahlmeter G, Menichetti F, Nicolau DP, Paiva JA, Tumbarello M, Welte T, Wilcox M, Zahar JR, Poulakou G. Preventive and therapeutic strategies in critically ill patients with highly resistant bacteria. Intensive Care Med. 2015; 41:776-795.

17. Vardakas KZ, Dimitrios K.Matthaiou DK, Matthew E, Falagas ME, Elli Antypa E, Asimoula Koteli A, Antoniadouc E. Characteristics, risk factors and outcomes of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae infections in the intensive care unit. J Infect 2015; 70: 592-9.

18. Friedman ND, Temkin E, Carmeli Y. The negative impact of antibiotic resistence. Clin Microbiol Infect 2016; 22: 416-422.

19. Lepape A, Jean A, De Waele J, et al. European intensive care physicians' experience of infections due to antibiotic-resistant bacteria. Antimicrob Resist Infect Control 2020; 9: 1. Published 2020 Jan 2.

20. Kollef MH, Bassetti M, Francois B, Burnham J, Dimopoulos G, Garnacho-Montero J, et al. The intensive care medicine research agenda on multidrug-resistant bacteria, antibiotics, and stewardship. Intensive Care Med. 2017; 43(9): 1187-1197.

21. guideline from the Clinical and Laboratory Standards Institute. Clin Infect Dis. 2007; 44(6): 867-873.

22. NCCLS. 2002. Analysis and presentation of cumulative susceptibility testdata; approved guideline. NCCLS document M39-A. NCCLS, Wayne, Pa.

23. Moehring RW, Hazen KC, Hawkins MR, Drew RH, Sexton DJ, Anderson DJ. Challenges in Preparation of Cumulative Antibiogram Reports for Community Hospitals. J Clin Microbiol 2015; 53(9): 2977-2982. doi:10.1128/JCM.01077-15.

24. Hindler JF, Stelling J. Analysis and presentation of cumulative antibiograms: a new consensus guideline from the Clinical and Laboratory Standards Institute. Clin Infect Dis. 2007; 44(6): 867-873.

25. Laupland KB, Ross T, Pitout JD, Church DL, Gregson DB. Investigation of sources of potential bias in laboratory surveillance for anti-microbial resistance. Clin Invest Med. 2007; 30(4): E159-66.

26. Staphylococcus aureus resistant to vancomycin – United States, 2002. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2002; 51(26): 565-7. Also available from: URL: http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5126a1.htm.

27. Boehme MS, Somsel PA, Downes FP. Systematic review of antibiograms: A National Laboratory System approach for improving antimicrobial susceptibility testing practices in Michigan. Public Health Rep. 2010; 125 Suppl 2(Suppl 2): 63-72.

28. Zapantis A, Lacy MK, Horvat RT, et al. Nationwide antibiogram analysis using NCCLS M39-A guidelines. J Clin Microbiol. 2005; 43(6): 2629-2634.

29. Barlam TF, Cosgrove SE, Abbo LM, et al. Executive Summary: Implementing an Antibiotic Stewardship Program: Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America. Clin Infect Dis. 2016; 62(10): 1197-1202.

30. Tan TY, McNulty C, Charlett A, Nessa N, Kelly C, Beswick T. Laboratory antibiotic susceptibility reporting and antibiotic prescribing in general practice. J Antimicrob Chemother. 2003; 51(2): 379-384.

31. McNulty CA, Lasseter GM, Charlett A, et al. Does laboratory antibiotic susceptibility reporting influence primary care prescribing in urinary tract infection and other infections?. J Antimicrob Chemother. 2011; 66(6):1396-1404.

32. Stapleton PJ; Lundon DJ; McWade R; Scanlon N; Hannan MM; O'Kelly F; Lynch M. Antibiotic resistance patterns of Escherichia coli urinary isolates and comparison with antibiotic consumption data over 10 years, 2005–2014. Ir. J. Med. Sci. 2017; 186, 733-741.

33. Klein EY, Van Boeckel TP, Martinez EM, et al. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018;115(15): E3463-E3470.

34. Centrální koordinační skupina NAP ČR: Spotřeba antibiotik v České republice v letech 2008–2018 – 1. část. Farmakoterapeutické informace 1/2020; dostupné z http://www.sukl.cz/sukl/2020.

Komplexní panel kostních markerů

Pro management metabolických poruch kostí

ß-CrossLaps (CTX)
referenční marker kostní resorpce*[1,2]

Total P1NP
referenční marker kostní novotvorby*[1,3]

Nově doporučeno ČSKB a SMOS ČLS JEP***[1]

N-MID Osteocalcin
marker celkového kostního obratu [1,4]

25-OH Vitamin D Total III
marker koncentrace celkového 25-OH vitaminu D[5]

Calcitonin
marker poruch štítné žlázy a příštítných tělísek[6]

ALP
marker koncentrace celkové alkalické fosfatázy**[7]

PTH a PTH [1-84]
markery pro určení příčin hyperkalcemie a hypokalcemie[8]

* Referenční markery dle Mezinárodní nadace pro osteoporózu (IOF) a Mezinárodní federace klinické chemie a laboratorní medicíny (IFCC)

** Podle Mezinárodní federace klinické chemie a laboratorní medicíny (IFCC)

*** Česká společnost klinické biochemie a Společnost pro metabolická onemocnění skeletu České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně

Reference: 1. Pikner R et al. Clin Osteol 2020; 25(2): 65–82. **2.** Metodický list Elecsys® ß-CrossLaps/serum. 2021-04, V 1.0. **3.** Metodický list Elecsys® total P1NP. 2021-10, V 6.0. **4.** Metodický list Elecsys® N-MID Osteocalcin. 2021-11, V 6.0. **5.** Metodický list Elecsys® Vitamin D totalIII. 2021-03, V 1.0. **6.** Metodický list Elecsys® Calcitonin. 2021-09, V 4.0. **7.** Metodický list ALP2. 2021-11, V 14.0. **8.** Metodické listy Elecsys® PTH 2020-03, V 2.0. a PTH (1-84) 2022-01, V 2.0.

COBAS a ELECSYS jsou ochranné známky společnosti Roche.

Reagenční soupravy Elecsys® jsou diagnostické zdravotnické prostředky *in vitro*. Elecsys® ß-CrossLaps/serum je určen pro imunochemické kvantitativní stanovení degradačních produktů kolagenu typu I v lidském séru a plazmě jako pomůcka při hodnocení resorpce kostí. Test lze použít jako pomůcku při sledování antiresorpčních terapií u pacientů s osteoporózou. Měřicí rozsah 0,01–6,00 ng/ml. Elecsys® total P1NP je určen pro imunochemické kvantitativní stanovení celkového P1NP v lidském séru a plazmě jako pomůcka k monitorování léčby osteoporózy a Pagetovy choroby. Měřicí rozsah 5–1200 ng/ml. Elecsys® N-MID Osteocalcin je určen pro kontrolu účinnosti antiresorpční terapie, např. u pacientů s osteoporózou nebo hyperkalcemií. Měřicí rozsah 0,5–300 ng/ml. Elecsys® Vitamin D total III je určen pro kvantitativní stanovení celkového 25-hydroxyvitaminu D v lidském séru a plazmě. Test je určen jako pomůcka pro posouzení dostatku vitaminu D. Měřicí rozsah 3,00–120 ng/ml. Celková doba stanovení 27 minut. Opakovatelnost a mezilehlá preciznost se liší dle typu analyzátoru. Elecsys® Calcitonin je určen pro imunochemické kvantitativní stanovení lidského kalcitoninu v lidském séru a plazmě. Test lze použít jako pomůcku při diagnostice a léčbě onemocnění štítné žlázy a příštítných tělísek. Měřicí rozsah 0,5–2000 pg/ml. Elecsys® PTH je určen pro imunochemické kvantitativní stanovení intaktního parathormonu v lidském séru a plazmě. Test lze použít pro diferenciální diagnostiku hyperkalcemie a hypokalcemie. Měřicí rozsah 1,2–5000 pg/ml. Elecsys® PTH (1-84) je určen pro imunochemické kvantitativní stanovení biointaktního parathormonu PTH (1-84) v lidském séru a plazmě. Test lze použít pro diferenciální diagnostiku hyperkalcemie a hypokalcemie. Měřící rozsah 5,5–2300 pg/ml. Elektrochemiluminiscenční imunostanovení Elecsys® jsou určeny pro použití na automatických analyzátorech cobas e. Reagenční souprava ALP2 je diagnostický zdravotnický prostředek in vitro. Test je určen pro fotometrické kvantitativní stanovení alkalické fosfatázy (ALP) v lidském séru a plazmě. Vzestup aktivity ALP nastává u cholestázy, při onemocněních kosterního systému, u zlomenin a maligních nádorů. Aktivita ALP roste také u dětí a mladistvých. Stanovení se provádí na systémech Roche/Hitachi cobas c. Měřicí rozsah 5–1200 U/l.
Výsledky testů je nutné interpretovat v kontextu klinického stavu a anamnézy pacienta. Určeny k použití odborníky ve zdravotnictví. Více informací najdete na **go.roche.com/Navody**.

ROCHE s.r.o., Diagnostics Division, Na Valentince 3336/4, 150 00 Praha 5
© Roche, **www.roche-diagnostics.cz**, 05/2022

MC-CZ-00966

Roche **Kardio trio**

Unikátní kombinace 3 biomarkerů rozšiřuje možnosti komplexní diagnostiky poškození myokardu[1-9]

Reference: 1. Metodický list Elecsys® GDF-15, 2021-11, V 4.0 **2.** Metodický list Elecsys® proBNP II, 2022-02, V 3.0 **3.** Metodický list Elecsys® Troponin T, 2021-08, V 2.0 **4.** Schwinger R. Cardiovasc Diagn Ther 2021;11(1):263-276. **5.** Mishra, PK. et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2019; 317: H891–H922. **6.** Wu MY. et al. Cell Physiol Biochem 2018;46:1650-16. **7.** Michalak M. and Agellon LB. Front. Cardiovasc. Med. 2019;5:168. **8.** Demisseiet BG. et al. European Journal of Heart Failure 2017;19, 1001–1010. **9.** McDonaugh B. and Whyte MB. EMJ Cardiol. 2020;8[1]:97-10.

COBAS a ELECSYS jsou ochranné známky společnosti Roche.

Reagenční souprava **Elecsys®** proBNP II je diagnostický zdravotnický prostředek *in vitro*. Test je určen pro imunochemické kvantitativní stanovení N terminálního natriuretického propeptidu typu B v lidském séru a plazmě. Test lze použít při diagnostice kongestivního srdečního selhání, při detekci mírných forem kardiálních dysfunkcí, ke stratifikaci rizika u akutního koronárního syndromu a kongestivního srdečního selhání, při monitorování průběhu léčby pacientů s dysfunkcí levé komory, při hodnocení kardiovaskulárního rizika u DM 2. typu, při identifikaci rizikových pacientů s DM 2. typu bez známých kardiovaskulárních onemocnění v anamnéze k optimalizaci kardioprotektivní léčby a k identifikaci starších jedinců s vysokým rizikem fibrilace síní. Rozsah měření 5–35 000 pg/ml nebo 0,6–4130 pmol/l.

Reagenční souprava **Elecsys®** GDF-15 je diagnostický zdravotnický prostředek *in vitro*. Test je určen pro imunochemické kvantitativní stanovení růstového diferenciačního faktoru-15 (GDF-15) v lidském séru a plazmě. Test lze použít při stratifikaci rizika u pacientů s akutním koronárním syndromem nebo chronickým srdečním selháním a při predikci rizika závažného krvácení u pacientů s fibrilací síní. Rozsah měření 400–20 000 pg/ml.

Reagenční souprava **Elecsys®** Troponin T hs je diagnostický zdravotnický prostředek *in vitro*. Souprava slouží pro imunochemické kvantitativní stanovení srdečního troponinu T v lidském séru a plazmě. Stanovení lze použít při diferenciální diagnostice akutního koronárního syndromu (AKS), při stratifikaci rizika u pacientů s AKS a pro odhad srdečního rizika u pacientů s chronickým renálním selháním. Stanovení dále slouží k odhadu perioperačního rizika srdečních příhod před nekardiální operací, pro diagnostiku perioperačního infarktu myokardu a poškození myokardu po nekardiální operaci. Rozsah měření 3–10 000 pg/ml.

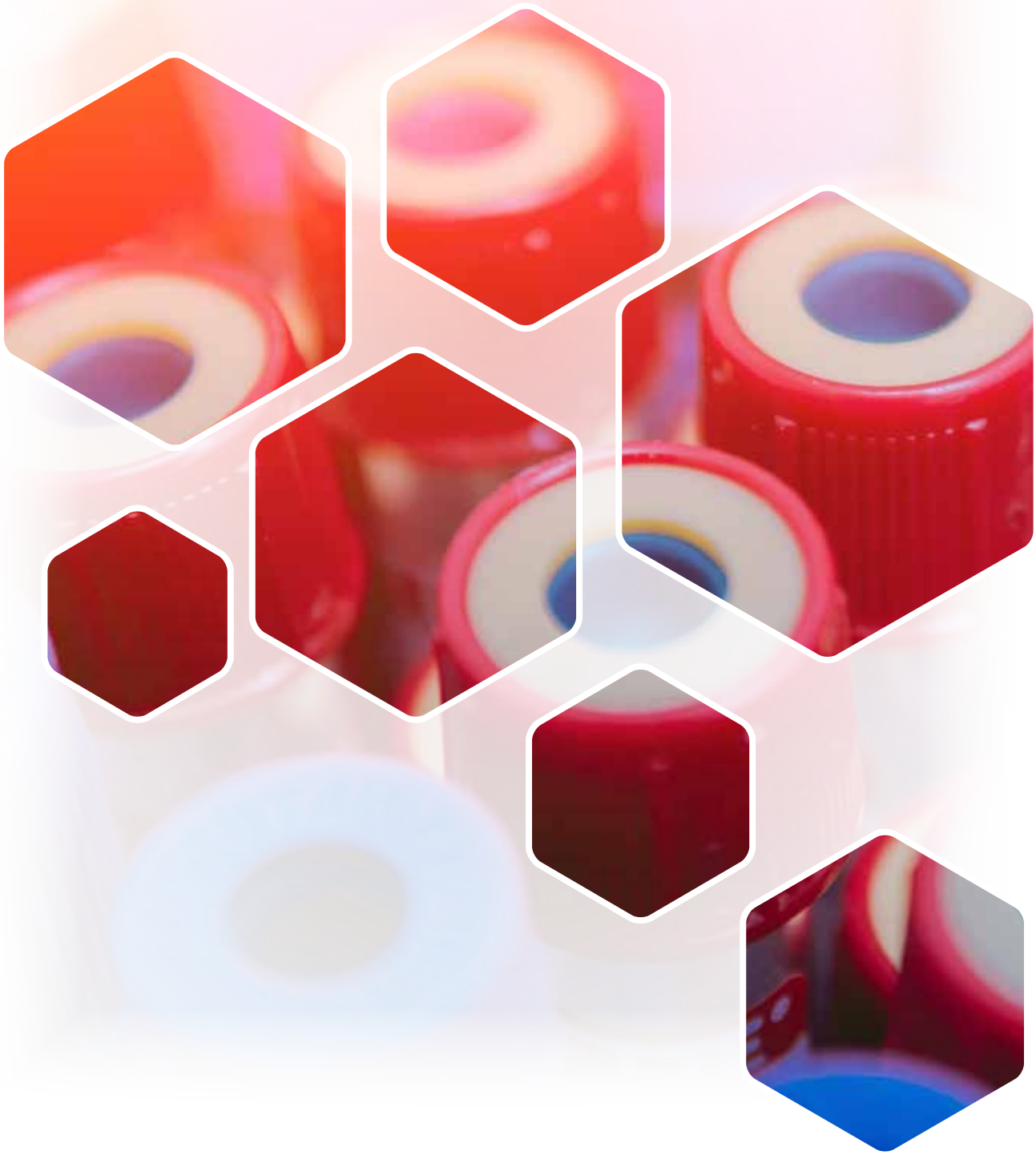
Imunostanovení uvedených biomarkerů se provádí metodou elektrochemiluminiscence na automatických analyzátorech **cobas e**. Výsledky stanovení je nutné interpretovat v kontextu klinického stavu a anamnézy pacienta.

Určeno k použití odborníky ve zdravotnictví. Potřebujete-li více informací, čtěte prosím potřebné metodické listy, návod k použití příslušného analyzátoru a jednotlivé aplikační listy, které najdete na **go.roche.com/Navody**.

ROCHE s.r.o., Diagnostics Division, Na Valentince 3336/4, 150 00 Praha 5
© Roche, **www.roche-diagnostics.cz**, 05/2022

MC-CZ-00966

KLINICKÁ BIOCHEMIE



Movember 2021

Adam Fojtík

Karcinom prostaty je jedním z nejčastějších karcinomů u mužů, jeho výskyt je vázán na věk a vysoké riziko představuje rodinná anamnéza tohoto onemocnění. Laboratoře AGEL se snaží pomoci s prevencí tohoto onemocnění a pomocí bezplatné a rychlé formy vyšetření zachytit potencionální výskyt onemocnění.

Movember 2021

Prostate cancer is one of the most common cancers in men, its incidence is linked to age, and a family history of this disease poses a high risk. Laboratoře AGEL try to help with the prevention of this disease and to detect the potential occurrence of the disease using a free and quick form of examination.

Klíčová slova:
PSA (prostatický specifický antigen)
PHI (index zdraví prostaty)
karcinom prostaty
statistika karcinomu prostaty
Movember

Key words:
herpes viruses
covid-19
HSV-1
RT-PCR
pneumonitis

Po roční pauze, kdy jsme se v roce 2020 snažili vyhnout kumulaci lidí na odběrových místech z důvodu pandemie onemocnění covid-19, se v listopadu 2021 uskutečnila opět akce Movember. Při této příležitosti jsme nabídli mužské části populace vyšetření parametrů prostaty. Zdarma, bez rozdílu věku, bylo zájemcům vyšetřeno PSA (prostatický specifický antigen). V případě, že byla hodnota vyšší než 1,6µg/l (ng/ml), laboratoř automaticky vyšetřila fPSA (volná frakce PSA) a p2PSA (forma fPSA – pro-PSA). Z těchto tří hodnot je pak možné vypočítat PHI (index zdraví prostaty) a na jeho základě nasměřovat některé pacienty ke konzultaci k jejich praktickým lékařům. V případě nejasností je právě konzultace u lékaře zásadní. Jako laboratoř jsme schopni garantovat správnost výsledků a objasnit, jestli jsou v normě, případně v některé z patologických hladin. Samotný výsledek PHI je důležitý v kombinaci s dalšími vyšetřovacími a zobrazovacími metodami, klinickým stavem pacienta, případně rodinnou anamnézou. Samotná laboratorní interpretace může být zavádějící a nemusí odpovídat stavu pacienta.

U hodnot PSA nižších než 1,6 µg/l (ng/ml), hrozí při změření a výpočtu PHI falešně pozitivní výsledek (chyba malých čísel) a s tím spojené „stresující“ výsledky v rukou pacientů.

V průběhu akce byly vzorky ze všech odběrových míst sváženy do tří laboratoří, které vyšetření prováděly. Jednalo se o AGEL Středomoravská nemocniční Prostějov, Dopravní zdravotnictví a.s. Plzeň a Laboratoře Agel Nový Jičín. Při samot-

ném vyšetření bylo nutné kontrolovat jednotlivé výsledky, případně správně indikovat „dovyšetření" zbývajících analytů fPSA a p2PSA. Celkově bylo během akce vyšetřeno 1073 vzorků pacientů z čeho 83 připadlo na AGEL Středomoravskou nemocniční Prostějov, 237 na Dopravní zdravotnictví Plzeň a 753 na Laboratoře AGEL Nový Jičín.

Z vyšetřených pacientů v laboratořích AGEL Nový Jičín (753):

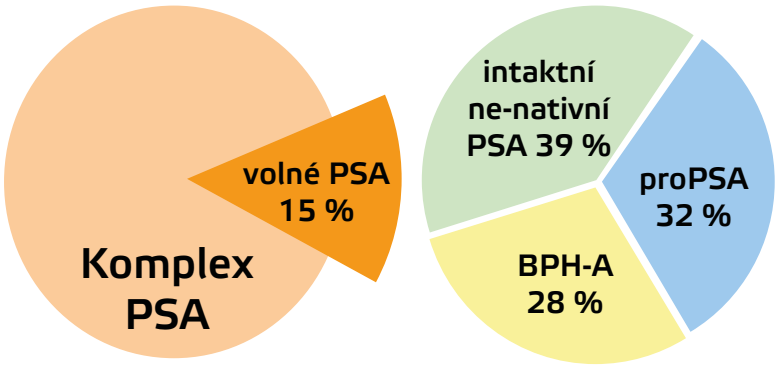
- 113 pacientů mělo PSA vyšší než 1,6 µg/l. U těchto pacientů bylo vyšetřeno fPSA a p2PSA.
- 37 pacientů mělo PSA v rozmezí 3 – 10 µg/l (riziková hodnota).
- 5 pacientů mělo PHI >100 (vysoké riziko karcinomu prostaty). U těchto pacientu vycházel i poměr volného a celkového PSA do 0,2, resp. <0,15, což opět svědčí pro karcinom prostaty.

Karcinom prostaty data a statistika

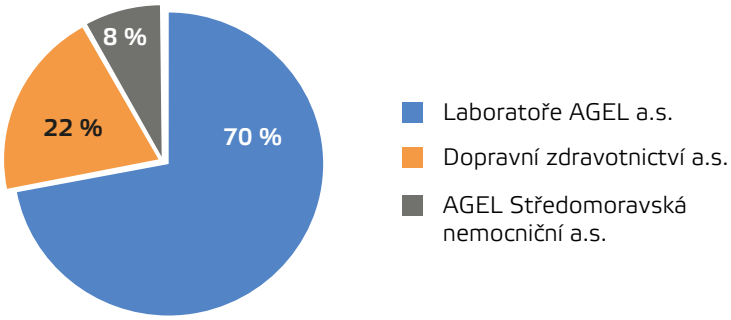
Karcinom prostaty je jedním z nejčastějších karcinomů u mužů. Výskyt tohoto onemocnění je výrazně vázán na věk. U mladších mužů se prakticky nevyskytuje, naopak jeho výraznější výskyt se začíná objevovat po 60 roce života. S maximem kolem 70 roku života.

Průběh onemocnění je většinou asymptomatický a klinicky se projeví až v pokročilém stádiu, což může být z hlediska léčby problematické. Zvláště při tomto onemocnění je tedy důležitá prevence a záchyt potencionálního rizika hned v počátku. Tím je možné výrazně zlepšit prognózu, případně předejít pozdějším potížím. S rozvojem diagnostických a zobrazovacích technik kolem roku 2000 se výrazně zvýšil záchyt pacientů v časném stádiu tohoto onemocnění a v důsledku tohoto se daří snižovat jeho index mortalita / incidence.

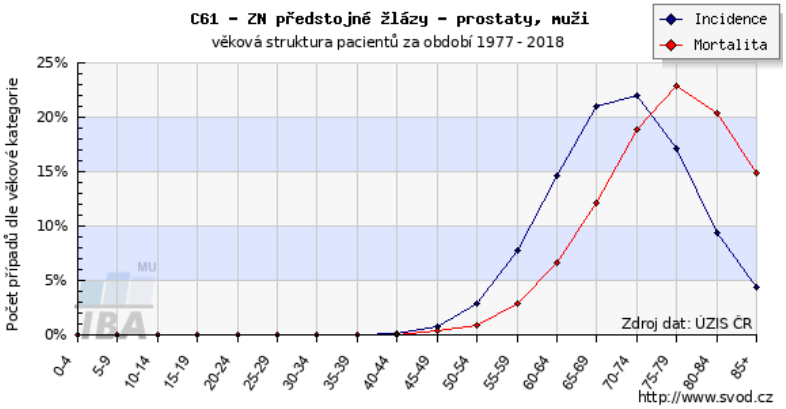
Graf 1 *Sérum s PSA 4-10 ng/ml*



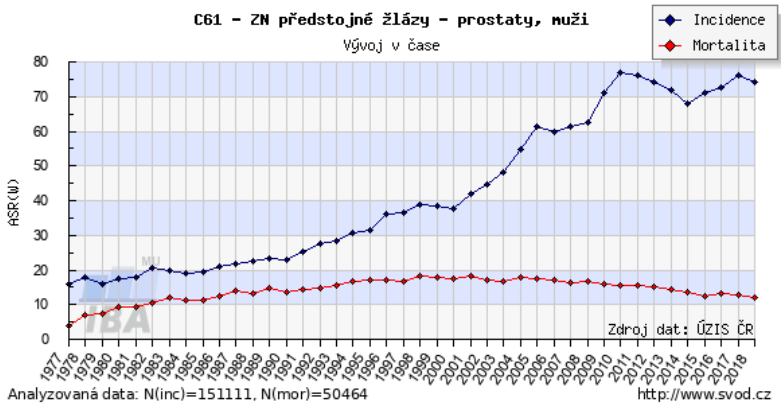
Graf 2 *Počty vzorků v laboratořích*



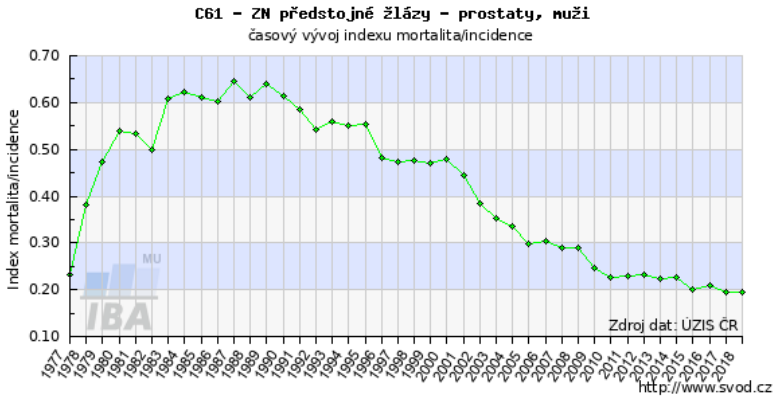
Graf 3 *C61 – ZN předstojné žlázy – prostaty muži , věková struktura pacientů za období 1997—2018*



Graf 4 *C61 – ZN předstojné žlázy – prostaty muži , vývoj v čase*



Graf 5 *C61 – ZN předstojné žlázy – prostaty muži , časový vývoj indexu mortalita/incidence*



Stejně jako u většiny onemocnění i v tomto případě je včasná prevence velice důležitá. Po 50 roku života by si měl každý muž jednou ročně nechat stanovit hodnotu PSA. Pokud se u pacientů v rodinné anamnéze vyskytuje karcinom prostaty, měli by u lékaře o toto stanovení zažádat ještě dříve a to od 40 roku života. U mladších pacientů, vzhledem k provázanosti onemocnění s věkem, nemá stanovování PSA příliš význam. Mezi výhody akce Movember patří i to, že pacient může absolvovat odběr kdykoliv během otevírací doby odběrové místnosti a to bez žádanky od svého lékaře. Snahou laboratoře bude opět i letos akci v podobném duchu uspořádat.

KONTAKTNÍ ÚDAJE:
Mgr. Fojtík Adam
Laboratoře AGEL a.s.
Laboratoř klinické biochemie
Revoluční 2214/35, 741 01 Nový Jičín
e-mail: adam.fojtik@lab.agel.cz

Literatura

1. Beckman Coulter, prezentace p2PSA
2. Beckman Coulter, příbalový leták
3. Grafy: www.svod.cz

Naše zkušenosti s automatickou močovou linkou Cobas 6500

Šárka Bahenský Šefraná, Ivana Kubalová

Klíčová slova:
automatická močová linka
Cobas 6500
ROCHE

Key words:
automatic urinal line
Cobas 6500
ROCHE

Nedílnou součástí portfolia vyšetření, které naše laboratoř provádí, je chemické a morfologické vyšetření moče. V loňském roce jsme nainstalovali automatickou linku pro analýzu moče Cobas 6500 firmy Roche, která zajistí pohodlné zpracování až 1 000 vzorků moči za den.

Tato linka je tvořena analytickým modulem U601 pro plně automatizované vyšetření moče pomocí testovacích proužků a modulem U701 pro mikroskopické vyšetření močového sedimentu. Spojení těchto dvou modulů standardizuje celý postup vyšetření, což vede ke zvýšení produktivity a efektivity práce v laboratoři. Je zde jeden společný prostor pro vkládání a výstup vzorků, což snižuje počet zásahů obsluhujících pracovníků.

Optimalizace pracovního procesu

- Spotřební materiál je do analyzátorů vkládán ve formě kazet, které mají kapacitu 400 kusů. Proužky a kyvety jsou v samostatných kazetách, kde jsou chráněny před vlhkostí.
- Pro provoz není potřeba reagencií, analyzátory potřebují pouze destilovanou vodu. Její hladina je automaticky kontrolována stejně jako stav spotřebního materiálu.
- Vzorky jsou vkládány v pětimístných stojáncích, stejně jako u jiných přístrojů firmy ROCHE pro plynulou manipulaci se vzorky v celé laboratoři.
- Snadná kontrola výsledků a možnost automatické validace.
- Oba přístroje mohou pracovat samostatně nebo v kombinaci.
- Přístroje jsou nenáročné na údržbu.

Velkou výhodou této modulové sestavy je možnost připojení do linky Cobas 8000. Toto spojení bylo plánované i pro naši laboratoř, ale z prostorových a provozních důvodů tak nakonec nebylo učiněno.

Obr. 1 *Cobas 6500*

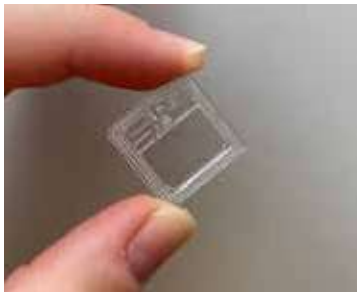
V analytickém modulu U601 jsou používány diagnostické proužky Combur 10Test® pro stanovení erytrocytů a hemoglobinu, leukocytů, nitritů, bílkoviny, ketonů, urobilinogenu, bilirubinu a pH moči. Reagenční proužek detekuje intaktní i lyzované erytrocyty a je rezistentní vůči kyselině askorbové. Přístroj disponuje novou technologií fotometru na odečítání proužků, obrazový senzor (kamerový čip) provádí fotometrické měření reflektance každého testovacího políčka na proužku při 4 vlnových délkách. Barva, zákal a specifická hmotnost je stanovena pomocí měřící cely. Kapacita tohoto modulu je až 240 vzorků na hodinu.

Mikroskopický analyzátor U701 pro hodnocení močového sedimentu je plně automatizovaný systém pro in vitro kvantitativní, semikvantitativní a kvalitativní určení částic v moči. Cobas U701 provádí kompletní mikroskopické hodnocení všech parametrů sedimentu s využitím skutečných obrazů. Vzorek promíchá a pipetuje do jednotlivých kyvet, čímž je zamezeno kontaminaci mezi vzorky. Poté kyvety centrifuguje a vkládá pod mikroskop. Z každého vzorku zachytí 15 snímků, které jsou softwarem automaticky vyhodnoceny. Analyzátor umožňuje vyšetřit až 116 vzorků za hodinu.

Výsledky z obou modulů jsou zobrazeny společně na jedné ploše ovládacího počítače, což umožňuje přehlednou a rychlou validaci. Tato linka tak zajišťuje plnou automatizaci všech kroků, eliminuje variabilitu operátorů a snižuje počet zásahů obsluhy. I po instalaci linky Cobas 6500 nadále v laboratoři 10–15 % nejednoznačných vzorků zpracováváme a odečítáme na klasickém mikroskopu.

Obr. 2 *Diagnostické proužky pro U601*

Obr. 3 *Jednorázové kyvety pro U701*



Provozní zkušenosti

Po instalaci jsme zahájili měsíční zkušební provoz, který nám umožnil seznámit se se softwarem a nastavením přístroje.

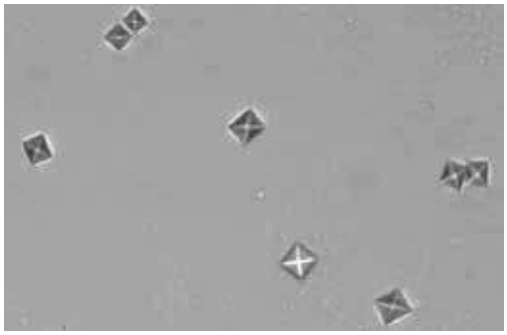
Výhodou Cobas 6500 je možnost variabilního nastavení vyhodnocení samotným uživatelem. To umožňuje každé laboratoři vytvořit vlastní nastavení a specifická kritéria pro hodnocení vzorku. Naše laboratoř vycházela ze Stanoviska výboru ČSKB LS JEP k vydávání výsledků moče a močového sedimentu.

Systém automatické mikroskopie modulu U701 je pro nás posunem oproti předchozímu přístroji Dirui 2000, který pracoval na principu snímání částic v usměrněném toku kapaliny v průtokové kyvetě se softwarem pro automatickou identifikaci částic. Bylo důležité, aby obsluha nové močové linky získala přehled o zobrazení a vyhodnocení automatické mikroskopie.

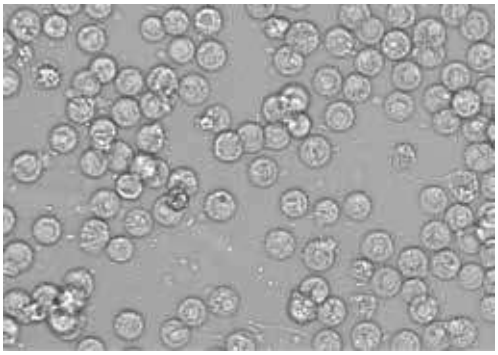
Následoval přechod do rutinního provozu. Prvotní nadšení z kvality a možností hodnocení vzorků, bylo vystřídáno poruchami přístroje v běžném provozu. Většinou se jednalo o problémy se spotřebním materiálem. U podavače diagnostických proužků modulu U601 docházelo k nesprávnému posunu proužků, vzorek nemohl být správně napipetován a docházelo tak k znehodnocení celé kazety s proužky. U modulu U701 jsme zaznamenali problémy s vysouváním kyvet z kazety do pozice pro pipetování vzorku a s odstraněním použitých kyvet do odpadního prostoru, které se hromadily uvnitř přístroje a nebylo možné měřit další vzorky.

Software je pro obsluhu poměrně přehledný, bohužel zatím nedostupný v českém jazyce. Do budoucna by byla přínosem obrazová knihovna pro porovnání elementů ve vzorcích.
Instalace močové linky Cobas 6500 splnila naše požadavky, jak z hlediska kvality vyšetření, tak i z hlediska vlastní automatizace. Pro laboratoře, které doposud nepoužívali automatizované vyšetření močového sedimentu, je toto řešení vhodnou volbou.

Obr. 4 *Snímek z U701 – oxaláty*



Obr. 5 *Snímek z U701 – erytrocyty, leukocyty a bakterie*



Tab. 1 *Parametry měřené přístroji cobas u 601, cobas u 701 a cobas® 6500*

Systems	cobas u 601		cobas u 701		cobas 6500			
Available parameters / tests	ERY	Erythrocytes and hemoglobin	RBC[1]	Red blood cells	ERY	Erythrocytes and hemoglobin	RBC[1]	Red blood cells
	LEU	Leukocytes	WBC[1]	White blood cells	LEU	Leukocytes	WBC[1]	White blood cells
	NIT	Nitrite	NEC[2]	Non-squamous epithelial cells	NIT	Nitrite	NEC[2]	Non-squamous epithelial cells
	PRO	Protein	SEC[2]	Squamous epithelial cells	PRO	Protein	SEC[2]	Squamous epithelial cells
	GLU	Glucose	YEA[3]	Yeasts	GLU	Glucose	YEA[3]	Yeasts
	KET	Ketones	CRY[3]	Crystals	KET	Ketones	CRY[3]	Crystals
	UBG	Urobilinogen	BAC[2]	Bacteria	UBG	Urobilinogen	BAC[2]	Bacteria
	BIL	Bilirubin	HYA[2]	Hyaline casts	BIL	Bilirubin	HYA[2]	Hyaline casts
	ph		SPRM[3]	Sperm	ph		SPRM[3]	Sperm
	SG	Specific gravity	MUC[3]	Mucus	SG	Specific gravity	MUC[3]	Mucus
	COL	Color	PAT[3]	Pathological casts	COL	Color	PAT[3]	Pathological casts
	CLA	Clarity			CLA	Clarity		

KONTAKTNÍ ÚDAJE:
Mgr. Šárka Bahenský Šefraná
Laboratoře AGEL a.s.
Laboratoř klinické biochemie
Revoluční 2214/35, 741 01 Nový Jičín
e-mail: sarka.sefrana@jlab.agel.cz

Literatura

1. Combur10 Test strip, M. S., 2017, str. 2. eLabDoc. [On-line] Dostupné na: https://dialog1.roche.com [Ze dne 30. června 2022].

2. Vyhodnocení výkonnostních parametrů automatické močové linky cobas®, Ing. H. Ferdová [On-line] Dostupné na: https://www.labor-aktuell.cz/vyhodnoceni-vykonnostnich-parametru-automaticke-mocove-linky-cobas-6500 [Ze dne 30. června 2022].

3. Automatická močová linka cobas® 6500, Ing. H. Ferdová [On-line] Dostupné na: https://www.labor-aktuell.cz/automaticka-mocova-linka-cobas-6500 [Ze dne 30. června 2022].

4. cobas® 6500 urine analyzer series One tube, one touch – fully automated urine workflow

Vitamin D – Superhormon

Vlasta Matušková, Martin Švidrnoch, Kristýna Vlková, Spiros Tavandzis

Většina evropské a americké populace nenaplňuje doporučený denní příjem vitaminu D, což lze považovat za hypovitaminózu. Vitamin D se účastní celé řady procesů v organismu a ovlivňuje velký počet genů, jedná se tedy o důležitou strukturu s duální funkcí. Nižší hladiny nebo deficit vitaminu D může nepříznivě ovlivňovat stav organismu. V některých patologických případech postačuje saturace na optimální hladinu vitaminu D ke zlepšení zdravotního stavu, v článku uvádíme rozdíly ve stanovených prahových hodnotách vitaminu D a zároveň výsledky studií vlivu jeho suplementace.

Vitamin D – Superhormone

The majority of the European and American population does not meet the recommended daily intake of vitamin D which can be considered as hypovitaminosis. Vitamin D participates in a whole range of processes in the body and affects a large number of genes, therefore vitamin D is an important structure with a dual function. Lower levels or deficiency of vitamin D can adversely affect the human health. In some pathological cases, saturation to the optimal level of vitamin D is sufficient to improve the health status. In this article we present the differences in the determined threshold values of vitamin D and at the same time the results of studies on the effect of its supplementation.

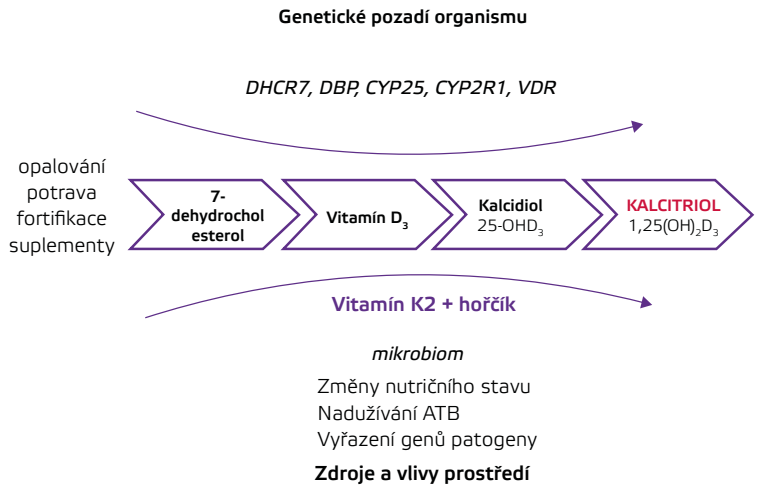
Klíčová slova:
vitamin D
kalciofosfátový metabolismus
kalcifediol
hořčík

Key words:
vitamin D
calcium phosphate metabolism
calcifediol
magnesium

Vitamin D plní v organismu duální funkci, uplatňuje se jako vitamin, ale zároveň se také při určitých koncentracích přímo podílí v jádře buňky na regulaci exprese přibližně 2000 genů, tedy funguje jako pleiotropní steroidní hormon. Evolučně je považován za jeden z nejstarších hormonů vůbec (1). Hladiny vitaminu D jsou ovlivňovány nejen jeho endogenní syntézou v kůži nebo jeho příjmem potravou, ale uplatňují se zde také genetické a negenetické faktory jako jsou například mutace v proteinech účastnících se metabolizace nebo transportu, nebo aktuální stav organismu a hladiny iontů hořčíku nebo vápníku (obr. 1).

Z biochemického hlediska se rozlišují dvě hlavní formy, a to cholekalciferol (vitamin D3) a ergokalciferol (vitamin D2). Vitamin D2 se vyskytuje především u hub a rostlin a vzniká z ergosterolu. V lidském těle je vitamin D3 produkován fotochemickou reakcí 7-dehydrocholes-

Obr. 1 *Faktory ovlivňující metabolismus vitaminu D*

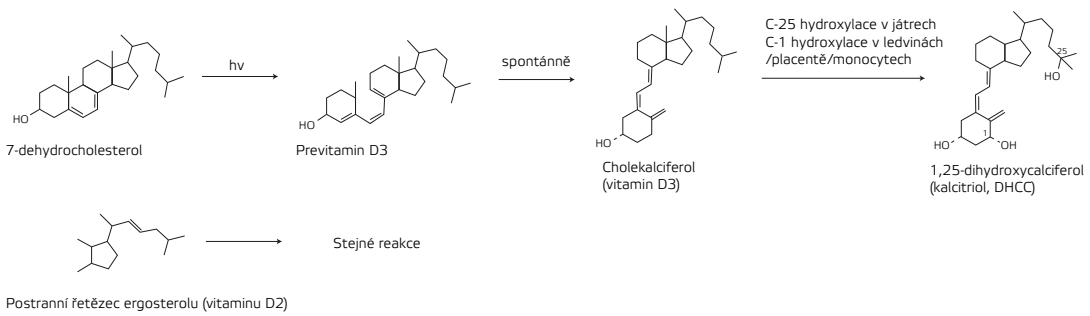


terolu, který se vyskytuje zejména v buněčných membránách a cytosolu epidermis a dermis, s účinnou UVB složkou záření (280–320 nm). Odtud je vitamin D3 uvolněn do krve a transportován po navázání na vitamin D vázající protein (DBP) (2). Vitamin D lze považovat spíše za steroidní hormon, ale na rozdíl od klasických hormonů není tvořen žádnou endokrinní žlázou a oproti jiným v tucích rozpustným vitaminům se neukládá v játrech (3). Vitamin D je důležitý pro metabolismus kostí a minerálů a je prokázáno, že nedostatek vitaminu D může způsobit křivici a osteomalacii (úbytek anorganické složky kostní hmoty) (4). Jeho nedostatek lze dále pozorovat např. u hypoparathyroidismu či zánětlivých idiopatických onemocnění (IBD), naopak vysoké hladiny např. u primárního hyperparathyroidismu či sarkoidózy. Protože obě formy vitaminu D (cholekalciferol i ergokalciferol) přijímané ze stravy nebo vytvořené fotochemicky v kůži nejsou biologicky aktivní, je nutná jejich aktivace dvoukrokovou hydroxylací prostřednictvím enzymů v játrech a ledvinách (5). První hydroxylace cholekalciferolu na uhlíku C25 probíhá v játrech za vzniku 25-hydroxyvitaminu D (kalcidiol, 25(OH)D) a druhá hydroxylace pak v ledvinách vede ke vzniku biologicky aktivní formy - 1,25-dihydroxyvitaminu D (kalcitriol, 1,25(OH)2D), (obr. 2).

Vitamin D a kalciofosfátový metabolismus

Kalciofosfátový metabolismus je řízen prostřednictvím tří hormonů – parathormonu (PTH), kalcitoninu a vitaminu D (resp. jeho aktivovanou formou – kalcitriolem). Mezi kalcémií a fosfatémií existuje reciproční vztah, kdy plazmatická hladina kalcia stoupá s klesající hladinou fosfátů a naopak. S kalcémií je spojena celá řada fyziologických funkcí – například skeletální a zubní mineralizace, neuromuskulární činnost, srdeční aktivita či hemokoagulace. Intracelulární vápník hraje také zásadní úlohu v akčním potenciálu buňky. Vitamin D je spolu s PTH a kalcitoninem jedním z hlavních regulátorů kalcémie. Klasická endokrinní regu-

Obr. 2 *Metabolismus vitaminu D a jeho aktivní forma (kalcitriol)*



lace prostřednictvím negativní zpětné vazby zajišťuje homeostázu vápníku v těle. Snížení sérového Ca^{2+} inaktivuje receptory pro vápník na membránách buněk příštítných tělísek, což zde vede ke zvýšení sekrece PTH. Zvýšené hladiny PTH pak stimulují ledviny ke zvýšení sekrece kalcitriolu, který aktivuje receptor pro vitamin D (VDR) ve střevě a tím zvyšuje absorpci Ca^{2+}. Kalcitriol dále snižuje sekreci PTH v příštítných tělíscích a zvyšuje resorpci Ca^{2+} v kostech. Naproti tomu vzestup hladiny Ca^{2+} v séru vede ke stimulaci sekrece kalcitoninu štítnou žlázou, který inhibuje aktivitu osteoklastů a stimuluje vychytávání Ca^{2+} kostmi, ale také snižuje reabsorpci vápníku ledvinami. Když se hladina Ca^{2+} v krvi stabilizuje, štítná žláza přestane kalcitonin vylučovat.

Kalcitriol zvyšuje střevní absorpci fosfátů zvýšením exprese transportéru NPT2b a stimuluje renální absorpci fosfátů zvýšením exprese NPT2a a NPT2c v proximálním tubulu. Kalcitriol také zvyšuje produkci FGF23 a potlačuje syntézu PTH. FGF23 je hormon fosfatonin, produkován osteocyty a v menší míře osteoblasty, který inhibuje renální tubulární reabsorpci fosfátu a snižuje hladinu kalcitriolu v oběhu snížením exprese 1-α-hydroxylázy (mitochondriální cytochrom P450 monooxygenáza CYP27B1, zodpovědná za hydroxylaci v pozici C1 v ledvinách a tím pádem za vznik aktivní formy) a zvýšením exprese 24-hydroxylázy, jejíž působení vede ke vzniku neaktivní formy vitaminu D. (6, 7)

Receptor vitaminu D

Receptory pro vitamin D (VDR) se nacházejí ve většině tkání lidského organismu včetně buněk imunitního sytému. Polymorfismy v genu kódujícím VDR mohou hrát významnou roli při stanovení individuální citlivosti jedince na vitamin D. Alely asociované s lepší funkcí VDR poskytují jedinci výhodu u hypovitaminózy, ale v případě suplementace jsou nebezpečné z důvodu hypervitaminózy. Bylo také zjištěno, že nádory se standardní funkcí VDR (VDR^{+}) mají ve srovnání s nádory VDR^{-} lepší prognózu onemocnění. (8)

Vitamin D a hořčík

Vitamin D aktivuje absorpci hořčíku i vápníku. Mezi absorpcí Mg^{2+} a Ca^{2+} existuje reciproční vztah. Exkrece Mg je ovlivněna resorpcí vápníku (ten ji inhibuje) vlivem PTH. Homeostáza Mg^{2+} v krevním oběhu je regulována pomocí zpětnovazebného mechanismu, kdy snížené hladiny Mg^{2+} způsobují zvýšení sekrece PTH a naopak při zvýšených hladinách Mg^{2+} je sekrece PTH blokována. Důsledkem velmi nízkých hladin hořčíku však může být i hypokalcémie, a to v případě, kdy dojde ke snížení sekrece PTH a také jeho schopnosti zvýšit tvorbu kalcitriolu. Významné je také stanovení koncentrace Mg^{2+} v erytrocytech, neboť Mg^{2+} je převážně uložen intracelulárně. U pacientů s latentní tetanií či hypomagnesemií lze dokonce sledovat koncentrace Mg^{2+} v séru v referenčních mezích, ale celkové zásoby Mg^{2+} v organismu jsou nedostačující. Je také známo, že Mg^{2+} přispívá k enzymatické přeměně kalcidiolu na kalcitriol a zároveň může ovlivnit kinetické změny chování Mg-dependentních enzymů 1-α-hydroxylázy a 24-hydroxylázy (9).

Vitamin D a vitamin K2

Vitamin K2 byl nedávno uznán jako účinný a bezpečný při léčbě ztráty kostní hmoty, protože přispívá ke strukturální integritě osteokalcinu (OC), hlavního nekolagenního proteinu, který se typicky

nachází v kostní matrici. Několik studií prokázalo, že nízký příjem vitaminu K2 je spojen s úbytkem kostní hmoty a se zvýšeným rizikem zlomenin (10). Vitamin D a vitamin K jsou důležité pro celkovou homeostázu vápníku a fosfátu v těle a přímo regulují vstřebávání a vylučování vápníku a fosforu ze střeva a ledvin. Absorpce vápníku vyvolaná vitaminem D ve střevě je řízena jak paracelulárními, tak transcelulárními drahami, které pomáhají zvýšit absorpci vápníku ze stravy. Vitamin K také reguluje hladiny vápníku a fosfátu v kostech a bioaktivní analoga vitaminu K2 (MK-4 a MK-7) byly použity jako nutraceutické doplňky určené pro zlepšení zdraví kostí a kardiovaskulárního systému. Bylo prokázáno, že kombinace vitaminu D a vitaminu K2 mají synergické účinky na zlepšení zdraví kostí a tato kombinace je účinná v léčbě osteoporózy (11).

Zdroje vitaminu D a jejich rizika

Hlavním zdrojem vitaminu D je přirozená endogenní syntéza v kůži působením slunečního UVB záření. V kontrastu s výše uvedeným však dermatologové opalování jako hlavní zdroj vitaminu D nedoporučují a to především z důvodu rizika vzniku kožních malignit a stárnutí kůže. V tomto ohledu by byla vhodná osvětová kampaň týkající se postupu a bezpečnosti opalování. Vitamin D lze také získávat potravou, například z tučných ryb nebo vajec. Bylo však zjištěno, že je nepravděpodobné, aby potravinové zdroje vitaminu D tvořily u dospělého člověka více než 5–10 % celkového příjmu vitaminu D (12). Tato skutečnost je podpořena také daty Státního zdravotního ústavu, která ukazují, že méně než 1 % Čechů je schopných získat potřebnou dávku vitaminu D ze stravy. Navíc zvýšená a jednostranná konzumace ryb nebo mořských plodů z nezjištěných oblastí může být spojena s rizikem intoxikace těžkými kovy, především rtutí a kadmiem (13). Účinným způsobem zvýšení jeho příjmu je fortifikace potravin vitaminem D. V ČR jsou však fortifikované potraviny poměrně omezené a zaměřují se především na kojeneckou stravu.

Vitamin D a jeho suplementace

Vitamin D a jeho suplementace bývá často spojována s primární prevencí různých forem onemocnění, jako jsou nádorová, autoimunitní nebo kardiovaskulární. Tyto souvislosti se však ne vždy podařilo hodnověrně potvrdit.

V rámci onkologické prevence dosavadní studie spíše nenaznačují, že by suplementace vitaminu D snižovala výskyt nádorových onemocnění. Nicméně optimální nebo vyšší hladiny kalcidiolu mohou snižovat úmrtnost a zlepšovat prognózu tohoto onemocnění (8). Ve studii provedené USPSTF (United States Preventive Services Task Force) bylo zjištěno, že v současnosti není možné z důvodu nedostatečných důkazů posoudit rovnováhu přínosů a nebezpečí používání doplňků vitaminu D k prevenci rakoviny (14). Toto zjištění dále potvrzuje rozsáhlá klinická studie VITAL zabývající se vztahem suplementace vitaminu D a primární prevence onkologických a kardiovaskulárních onemocnění (15) a na ni navazující sekundární studie. V rámci tohoto rozsáhlého výzkumu nebyl prokázán vztah mezi suplementací vitaminem D a snížením incidence nádorů. Byl však zjištěn vliv suplementace na snížení incidence pokročilých forem nádorů v rámci celé studované kohorty, přičemž nejvýznamnější snížení rizika bylo pozorováno u jedinců s normální hmotností (viz tab. 1); (15, 16). V kontextu primární prevence onko-

Tab. 1 *Výběr vědeckých prací zabývajících se vlivem suplementace na prevenci nebo prognózu různých onemocnění*

Zaměření	Název studie	IU/den	N	Trvání (roky)	Potvrzeno	Pozn.	Publikace
Suplementace x snížená incidence nádorů	VITAL	2000	25000	5	NE		USA (15)
Suplementace x snížení výskytu pokročilého ca prostaty	VITAL	2000	1600	sekundárně	ANO	Možná redukce rizika pokročilého ca prostaty	USA (15)
Suplementace x redukce autoimunitních onemocnění	VITAL	2000	300	sekundárně	ANO		USA (20)
Suplementace x snížení výskytu invazivních nádorů	FIND	1600-3200	2500	5	NE	Z důvodu dostatečných hladin u vyšetřovaných	Finsko (27)
Suplementace x odstranění klinických symptomů endometriózy	-	3500	60	12 týdnů	NE		Irán (28)
Suplementace x prevence výskytu nádorů ovarií	-	-	>2700	Meta analýza	ANO		Čína (29)

logických onemocnění a příjmu vitaminu D je však zapotřebí další výzkum.

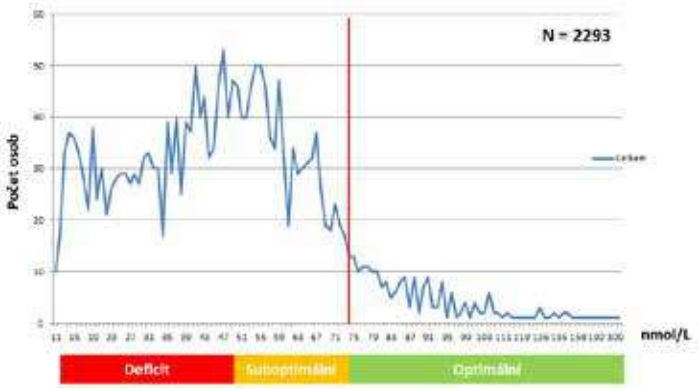
U kardiovaskulárních onemocnění (KVO) se ukazuje, že suplementace vitaminem D nesnižuje riziko jejich vzniku, a to ani u lidí s nízkými koncentracemi kalcidiolu (pod 20 nmol/l) zjištěnými na počátku léčby (17, 18). Z důvodu nedostatečného množství důkazů odborníci také nedospěli k žádné pevné shodě ohledně toho, zda vitamin D může pomoci předcházet vzniku roztroušené sklerózy (RS); (19). Výzkum navíc dále neprokázal, že by suplementace vitaminem D zmírňovala příznaky a symptomy aktivní formy RS nebo snižovala míru relapsů. Bylo však zjištěno, že suplementací vitaminem D po dobu pěti let lze snížit riziko výskytu autoimunitního onemocnění až o 22 % (20).

Přesto, že se nepodařilo jednoznačně prokázat vliv suplementace na primární prevenci u všech výše zmíněných onemocnění, jeho optimální hladina má obecně prokazatelně pozitivní vliv na zlepšení prognózy některých onkologických onemocnění či snížení rizika výskytu autoimunitního onemocnění. Výsledky mnoha studií ukazují, že dlouhodobá suplementace vitaminem D je velmi důležitá zejména pro kvalitu kostní hmoty a zvýšení její denzity (21). Pro zjištění dostatečné saturace vitaminem D lze proto doporučit pravidelné měření jeho hladiny a v případě deficitu zahájit jeho suplementaci. V případě pacientů patřících do více ohrožené skupiny (např. senioři, lidé ohrožení malnutricí či karencí vitaminů a jiných nutrientů, ženy po menopauze či chronicky nemocní) je na místě zvažovat stanovení nejen celkové hladiny vitaminu D (tj. všech jeho forem), ale rovněž diferencovat biologicky aktivní formu – kalcitriol. Stanovení kalcitriolu má rovněž velký význam u pacientů s renální insuficiencí či chronickým selháním ledvin, neboť u nich je biosyntéza kalcitriolu značně oslabena. Vedle samotného stanovení vitaminu D je s ohledem na jeho metabolismus přínosné doplnit laboratorní vyšetření také o stanovení hořčíku v erytrocytech.

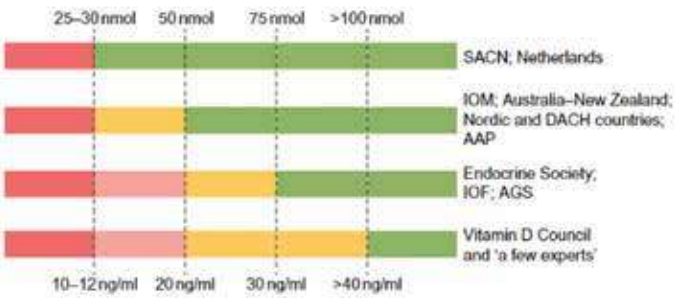
Vitamin D, dávkování a fyziologické hodnoty

Většina evropské a americké populace nenaplňuje doporučený denní příjem vitaminu D. Z epidemiologického pohledu se jedná o hypovitaminózu (22–24).

Graf 1 *Sérové koncentrace 25(OH)D měřené v Laboratořích AGEL a.s. u souboru běžné populace (N=2293) bez rozlišení pohlaví a věku. Červená svislá čára označuje hodnotu 75 nmol/L, která je stanovena jako práh rozdělující optimální a suboptimální koncentrace.*



Obr. 3 *Rozdíly v prahových hodnotách optimálních hladin celkového vitaminu D v séru stanovené různými organizacemi. Zeleně je označen optimální stav, oranžově suboptimální a červeně deficit. V České republice je běžně používaná prahová hodnota 75 nmol/l (26).*



Tento fakt podporují také měření provedená v Laboratořích AGEL a.s. na souboru běžné populace 2293 osob. V grafu č. 1 lze vidět, že pouze malá část souboru přesáhla prahovou hodnotu 75 nmol/L, většina osob měla suboptimální koncentrace vitaminu D v séru nebo jeho značný deficit.

Rozpory v optimálních hladinách 25(OH)D

Optimální sérové koncentrace 25(OH)D jsou odbornými organizacemi v různých zemích stanovovány často na základě meta analýz poolovaných dat předchozích studií. Závěry pak mohou být ovlivněny zkreslením vzniklým z důvodů různorodostí použitých nestandardizovaných metod měření či rozdíly v počtech a typech dalších měřených parametrů zahrnutých do výsledků v rámci jednotlivých prací (25). Tyto rozdíly se pak projevují v nastavené prahové hodnotě, jak lze vidět na obr. 3. Tento problém může vyřešit standardizace vztažením použité metody ke zlatému standardu např. LC-MS, která je doporučována standardizačním programem (26).

Vyšetření celkové hladiny vitamínu D i jeho aktivní formy kalcitriolu a rovněž stanovení hořčíku v erytrocytech je prováděno v Laboratoři klinické biochemie, resp. v Laboratoři farmakologie a toxikologie společnosti Laboratoře AGEL a.s. jako rutinní vyšetření.

KONTAKTNÍ ÚDAJE:
Laboratoře AGEL a.s.
Laboratoř klinické biochemie
Laboratoř farmakologie a toxikologie
Revoluční 2214/35, 741 01 Nový Jičín
Tel.: 556 416 172, 556 416 249

Literatura

1. Pludowski, P. et al. Vitamin D supplementation guidelines. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2018, 175: 125-135.

2. Kawakami, M. et al. Turnover of the plasma binding protein for vitamin D and its metabolites in normal human subjects. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1981, 53: 1110-1116.

3. Kulda, V. Metabolizmus vitaminu D. Vnitr Lek. 2012, 58(5): 400-404.

4. Táborský, P. Deficit vitaminu D - hlavní viník renální kostní choroby? Med. praxi 2012, 9: 326-329.

5. Spoustová, V. et al. Vitamin D: synthesis, metabolism, regulation, and an assessment of its deficiency in patients with chronic renal disease. Vnitř. Lék. 2004, 50: 537-543.

6. Renkema, K. Y. et al. Calcium and phosphate homeostasis: Concerted interplay of new regulators. Annals of Medicine 2008, 40(2), 82–91.

7. Peacock, M. et al. Calcium Metabolism in Health and Disease. CJASN 2010, 5 (Supplement 1) S23-S30

8. Buttigliero, C. et al. Prognostic role of vitamin d status and efficacy of vitamin D supplementation in cancer patients: a systematic review. Oncologist. 2011;16(9): 1215-27.

9. Capozzi, A. et al. Calcium, vitamin D, vitamin K2, and magnesium supplementation and skeletal health. Maturitas 2020 (140): 55-63.

10. Capozzi, A. et al. Role of vitamin K2 in bone metabolism: a point of view and a short reappraisal of the literature, Gynecological Endocrinology 2020, 36(4): 285-288.

11. Gasmi, A. et al. Phosphocalcic metabolism and the role of vitamin D, vitamin K2, and nattokinase supplementation. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2021, 1–17.

12. Nowson, C. A. et al. Vitamin D intake and vitamin D status of Australians. Med. J Aust. 2002, 177(3): 149-52.

13. Pandion, K. et al. Potential health risk caused by heavy metal associated with seafood consumption around coastal area. Environ. Pollut. 2022, 294: 118553.

14. Moyer, V. A. et al. Vitamin, mineral, and multivitamin supplements for the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: U. S. Preventive Services Task Force recommendation statement. Ann. Intern. Med. 2014, 160: 558-64.

15. Paulette, D. C. et al. Effect of vitamin D3 supplements on development of advanced cancer. A secondary analysis of the VITAL randomized clinical trial. JAMA Netw Open. 2020, 3(11):e2025850.

16. Song, M. No Association between vitamin D supplementation and risk of colorectal adenomas or serrated polyps in a randomized trial. Clin. Gastroenterol. Hepatol. 2021, 19: 128-135.e6

17. Manson, J. E. et al. Vitamin D supplements and prevention of cancer and cardiovascular disease. N. Engl. J. Med. 2019, 380: 33-44.

18. Scragg, R. et al. Effect of monthly high-dose vitamin D supplementation on cardiovascular disease in the Vitamin D Assessment Study: A randomized clinical trial. JAMA Cardiol 2017, 2: 608-16.

19. Marrie, R. A. et al. Preventing multiple sclerosis: To (take) vitamin D or not to (take) vitamin D? Neurol. 2017, 89: 1538-9.

20. Hahn, J. et al. Vitamin D and marine omega 3 fatty acid supplementation and incident autoimmune disease: VITAL randomized controlled trial. BMJ 2022, 376: e066452.

21. Burt, L. A. et al. Effect of High-Dose Vitamin D supplementation on volumetric bone density and bone strength: A randomized clinical trial. JAMA 2019, 322(8): 736-745.

22. Houghton, L. A. et al. The case against ergocalciferol (vitamin D2) as a vitamin supplement. Am. J. Clin. Nutr. 2006, 84(4): 694-697.

23. WHO. (2004). Vitamin and mineral requirements in human nutrition, 2nd Edition. Geneva, Switzerland

24. Ross, D. et al. Dietary reference intakes for calcium and vitamin D. Washington D. C: Institute of Medicine (IOM), National Academy of Sciences 2011: 1132.

25. Sempos, C. T. et al. Vitamin D assays and the definition of hypovitaminosis D. Results from the First International Conference on Controversies in Vitamin D. Br. J. Clin. Pharmacol. 2018, 84: 2194-207.

26. Sempos, C. T. et al. 25-Hydroxyvitamin D assay standardisation and vitamin D guidelines paralysis. Public Health Nutrition 2020, 23: 1153-64.

27. Virtanen, J. K. et al. Vitamin D supplementation and prevention of cardiovascular disease and cancer in the Finnish Vitamin D Trial: a randomized controlled trial. Am. J. Clin. Nutr. 2022, 115(5): 1300-1310.

28. Mehdizadehkashi, A. et al. The effect of vitamin D supplementation on clinical symptoms and metabolic profiles in patients with endometriosis. Gynecol. Endocrinol. 2021, 37(7): 640-645.

29. Guo, H. et al. The role of vitamin D in ovarian cancer: epidemiology, molecular mechanism and prevention J Ovarian Res 2018, 11(71).

800 700 701

www.agellab.cz

AGELLAB