



[labMED]

časopis laboratórnej medicíny

č. 20/máj 2021

Prinášame retrospektívny
a prospektívny pohľad na
zavedenie a vývoj molekulového
testovania SARS-CoV-2

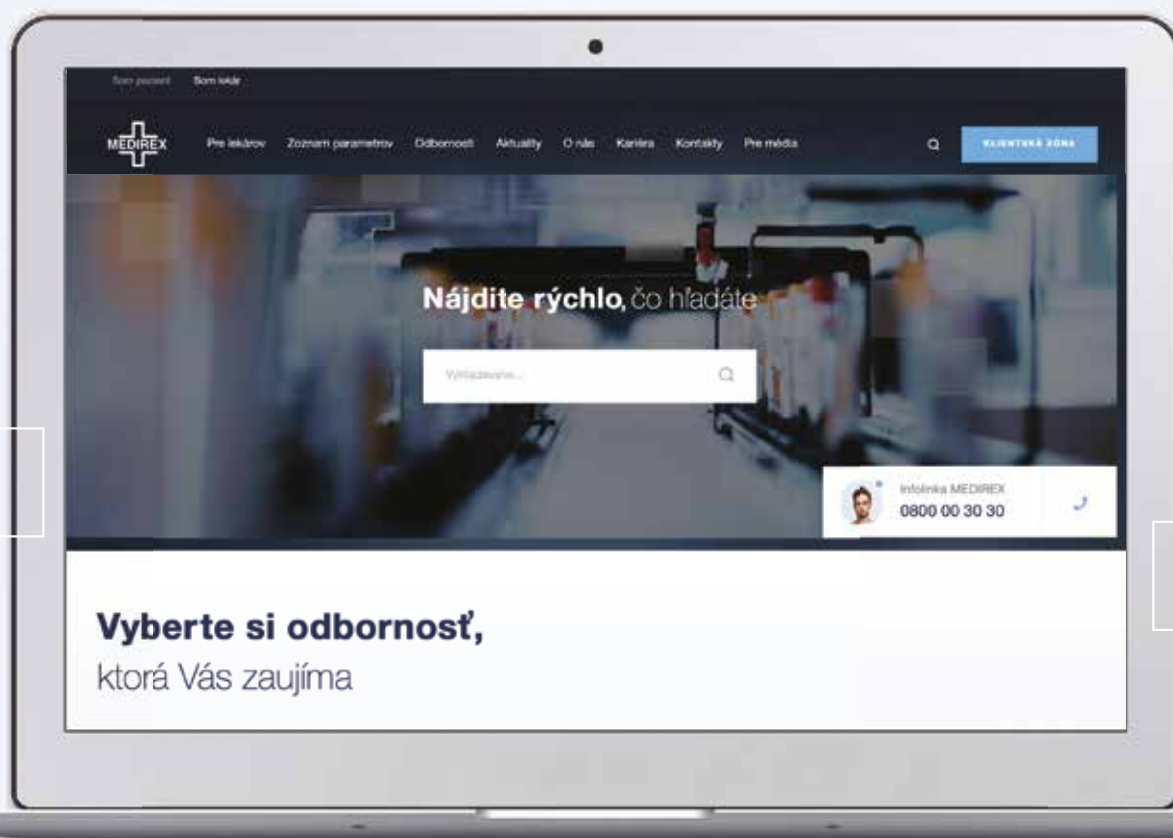
Gyncare oslavuje svoje
20. narodeniny

S alergoimunológom
a imunologičkou
o rozmanitosti ich práce
a o zaujímavostiach z praxe

Genetická diagnostika chronickej
myeloidnej leukémie

KLIENTSKA ZÓNA

- ✓ Online výsledky laboratórnych vyšetrení
- ✓ Jednoduchý spôsob registrácie na odborné podujatia
- ✓ Včasné informácie o novinkách či zmenách
- ✓ Dôležité informácie o legislatívnych usmerneniach v zdravotníctve



Milí čitatelia,

celý svet žije pandémie ochorenia COVID-19. Je to, prirodzene, aj preto, že všetci máme úplne aktuálne a vo všeobecnosti najmä negatívne skúsenosti s touto **pandémiou**. Prakticky každému z nás pandémia v nejakej podobe strpčuje **život**, či už priamo prostredníctvom výskytu ochorenia v rodine, alebo nepriamo prostredníctvom dosahu opatrení, ktoré majú šírenie pandémie obmedziť, v ideálnom prípade úplne zastaviť. Na druhej strane nám umožnila v niektorých oblastiach predtým bezprecedentný rozmach, či zistiť viac o sebe, svojom okolí, ako aj o tom, ako si s takýmto stavom vieme **poradiť** nielen **individuálne**, ale aj **ako spoločnosť**, resp. **štát**. Do veľkej miery sme mali možnosť byť konfrontovaní s tým, aký veľký vplyv má zmena na úrovni jednotlivca na to, ako sa pandemická situácia vyvíja v celej krajine. V tomto smere môžeme nájsť množstvo **pozitívnych príkladov**, jedným z najviditeľnejších je **kommunikácia** voči verejnosti zo strany našej **prezidentky** vychádzajúca z argumentácie „založenej na **dôkazoch**“, ako aj množstvo negatívnych príkladov, kde sa asi všetci zhodneme, že jedným z najviditeľnejších je **malígna komunikácia** zo strany už aktuálne **bývanej vlády** vychádzajúca z argumentácie „založenej na **náladách a emóciách**“. Ako to však vo všeobecnosti býva, ak chceme niečo na situácii zmeniť, musíme začať od seba, a to platí opäť na rôznych úrovniach – jednotlivec, komunita, spoločnosť, krajina.

V kontexte sveta laboratórnej diagnostiky, v ktorom fungujeme profesionálne a ktorej neoddeliteľnou súčasťou je spoločnosť Medirex, je možné odprezentovať celú škálu možností, ako na vzniknutú situáciu dokážeme zareagovať tak, aby sme aj my všetci mohli byť pozitívnym príkladom „ako na to“. Ak by sme mali začať na úrovni **jednotlivca**, tak skvelým príkladom je nasadenie konkrétnych zamestnancov našej firmy, ktorí boli ochotní pracovať na zlepšení procesov ako na úrovni administratívy, tak aj na úrovni laboratórnych činností, keď napriek rôznym problémom svojou individuálnou aktivitou, vysoko prekračujúcou rámec bežných pracovných povinností, zabezpečili všetko potrebné materiálne vybavenie pre laboratóriá (napriek vážnym problémom s jeho dostupnosťou na celosvetovej úrovni) a umožnili exponenciálny nárast kapacity spracovaných vzoriek v rámci diagnostiky (prácou v trojzmennom režime s plným nasadením aj v čase inak voľných víkendových dní či počas sviatkov).

Ako **komunita** (laboratórnych a vedeckých špecialistov) sme významnou mierou prispeli k priebežnému monitoringu stavu pandémie prostredníctvom realizácie rutínnej diagnostiky vo veľkokapacitných laboratóriách, ktoré v našich prevádzkach v Bratislave, Košiciach a v Nitre vznikli špeciálne na tento účel. Práve postupným, no zároveň skokovým zvyšovaním kapacity týchto COVID-19 diagnostických laboratórií bolo možné zabezpečiť nevyhnutné kapacity s pôsobnosťou na úrovni celej **krajiny**, pričom podiel realizovaných testov na všetkých na Slovensku realizovaných diagnostických RT-qPCR testoch predstavuje až 30 %. Takéto vysoké číslo bolo možné dosiahnuť vďaka optimalizácii laboratórnych procesov a výberu prakticky čo najefektívnejších a kvalitatívne čo najlepších komponentov použitých v rámci rutínnej diagnostiky využívajúcej metódu RT-qPCR.

Zároveň sme vďaka **úzkej spolupráci vedeckých pracovníkov** dokázali potvrdiť vysoké zastúpenie rizikovejšieho „britského“ variantu prostredníctvom masívneho paralelného sekvenovania pozitívne testovaných vzoriek. V tomto prípade však informácia bola pre obmedzenú dostupnosť potrebnej infraštruktúry získaná neskôr, ako by bolo žiaduce, čo sa nepriamo odzrkadlilo na náraste infikovaných a hospitalizovaných v januári a vo februári, keď na Slovensku vrcholila druhá vlna pandémie



s extrémne nepriaznivými dosahmi na kritickej úrovni obmedzujúcej poskytovanie inak bežne dostupnej lekárskej starostlivosti na všetkých úrovniach. Jedným z kľúčových nástrojov na zmiernenie priebehu, resp. skoré ukončenie pandémie je **očkovanie**, ktoré už časť našich zamestnancov prichádzajúcich do bezprostredného kontaktu s infekčnými vzorkami, absolvovala ako súčasť kritickej štátnej infraštruktúry. Mnohí z nich sa vďaka zapojeniu do štúdie realizovanej v našich laboratóriách a zameranej na monitoring imunitnej odpovede podieľajú na získaní pre **spoločnosť** veľmi potrebných informácií, ktoré budú využité pri hodnotení úspešnosti vakcinácie s dosahom na nastavenie vakcinačnej stratégie na **národnej**, potenciálne aj na **medzinárodnej úrovni**.

V nadväznosti na prebiehajúce **štúdie** asociované s aktuálnou pandemiou s aplikáciou získaných poznatkov aj na prípadné ďalšie ohrozenie podobného charakteru sa v rámci vedeckovýskumných projektov **MEDIREX GROUP ACADEMY** realizuje **výskum** zameraný na **skoré zachytenie nových potenciálne pandemických patogénov**, zabezpečenie prakticky **neobmedzených zásob kľúčových komponentov** pre rutinnú diagnostiku, **identifikáciu nových biomarkerov pre personalizovaný klinický manažment osôb** s vysokým rizikom závažných prejavov akútnych respiračných ochorení, medzi ktoré patrí aj **COVID-19**. Práve rozsahom a intenzitou môže nebývalý vedecký záujem v budúcnosti priniesť nové poznatky, ktoré nám umožnia **zvládnuť rýchlejšie a efektívnejšie** ak už nie túto **pandémiu**, tak tú ďalšiu.

RNDr. Gabriel Minárik, PhD.

manažér rozvoja genetiky

OBSAH

NOVÉ V MEDIREX GROUP

5 Zavedenie a vývoj molekulového testovania SARS-CoV-2 v (prostredí) Medirex, a.s. – retrospektívny a prospektívny pohľad

18 Gyncare oslavuje svoje 20. narodeniny

DOBRÉ VEDIETĚ

10 SARS-CoV-2 – stanovenie protilátok a interpretácia sérologických výsledkov

12 Čo všetko treba zabezpečiť, aby testovanie na mobilnom odberovom mieste bezchybne fungovalo?

30 Chronická lymfocytová leukémia

34 Genetická diagnostika chronickej myeloidnej leukémie

38 Prehľad vakcín proti ochoreniu COVID-19

40 Očkovanie očami MUDr. Emílie Dulinovej z oddelenia klinickej biochémie z Centrálného laboratória v Košiciach

ROZHOVOR

15 S Medirex partnerom MUDr. Martinom Lešťanom: „*Alergológovia sú neraz ako detektívi, ktorí pátrajú po príčine.*“

22 RNDr. Marcela Popovňáková o práci v imunologickom laboratóriu v Košiciach: „*Práca na imunológii je trpezlivá, precízna a každý deň iná.*“

PRÍPAD Z PRAXE

24 Sekrečný karcinóm malej slinnej žľazky tvrdého podnebia ústnej dutiny – case report

METODICKÉ LISTY

IMUNOLÓGIA

Peptest

MIKROBIOLÓGIA

SARS-CoV-2 – COVID-19: protilátky IgA, IgM, IgG

DE IURE

41 COVID-19: Dobrovoľné alebo povinné očkovanie?

TIP NA ODDYCH

43 Ako si vynahradiť wellness v domácom prostredí

Zavedenie a vývoj molekulového testovania SARS-CoV-2 v (prostredí) Medirex, a.s. – retrospektívny a prospektívny pohľad

Podobne zásadným spôsobom, akým pandémia COVID-19 zasiahla do fungovania spoločnosti, sa extrémne urgentné požiadavky na rýchlu identifikáciu pozitívnych prípadov podpísali aj na našom pracovnom – laboratórnom živote. Prakticky zo dňa na deň bolo potrebné vyriešiť množstvo administratívnych, logistických, technických, procesných a personálnych problémov so zámerom dosiahnuť čo najefektívnejšie, no zároveň čo najkvalitnejšie riešenia.

Naše dlhoročné skúsenosti a laboratórne kapacity spolu s možnosťou paralelného riešenia vznikajúcich problémov a otázok dávali dobrý predpoklad na to, že podobne ako v ostatných odvetviach laboratórnej medicíny sa aj v tejto oblasti bude môcť potreba rozsiahleho a expresného testovania oprieť o našu spoločnosť. Jednou z oblastí, ktoré si vyžadovali okamžitú pozornosť, bolo zavedenie a optimalizácia nevyhnutných laboratórnych postupov a procesov pre detekciu SARS-CoV-2 vírusu v biologických vzorkách. Na tento účel sme sa v laboratóriách v relatívne krátkom čase museli intenzívne zaoberať výberom, zavedením a optimalizáciou protokolov pre extrakciu nukleových kyselín (RNA) a následnú RT-qPCR metódu, ktorá sa celosvetovo etablovala ako príslušný „zlatý štandard“. Preto sme nielen v prvej fáze zavádzania rutinného testovania, ale aj priebežne testovali, zlepšovali, rozširovali, zrýchľovali, dopĺňali v danom čase používané laboratórne riešenia. V prípade bližšieho špecifikovania zefektívňovania procesov by sme mohli cielene uviesť mnohé príklady, z ktorých výber je prezentovaný ďalej.

Zároveň je našim všeobecným záujmom nielen testovať a implementovať komerčne dostupné riešenia, ale získané know-how sa snažíme ďalej využívať aj na ďalšie zefektívňovanie laboratórnych procesov a tiež pre biomedicínsky výskum, ktorý sa realizuje predovšetkým prostredníctvom partnerskej organizácie **MEDIREX GROUP ACADEMY (MGA)**.

Extrakcia nukleových kyselín (RNA)

Vzhľadom na prvý krok spracovania primárnych klinických vzoriek, teda extrakciu RNA, sme sa v laboratóriách venovali testovaniu rôznych prístupov spracovania vzoriek. Postupne sa v laboratóriách prešlo z používania „kolónkových“ extrakčných kitov, ktoré mali vysoké nároky na manuálne spracovanie vzoriek (individuálne spracovanie vzoriek), na extrakčné kity založené na extrakcii prostredníctvom magnetických partikul (individuálne aj platničkové spracovanie vzoriek). Takýto prechod bol nevyhnutný z dôvodu zvyšovania výkonu laboratórií predovšetkým preto, že použitie magnetických partikul umožňuje výrazne zjednodušiť zavedenie automatizácie. Vďaka automatizácii sa na jednej strane zrýchli celý proces, na druhej strane sa tak minimalizuje možnosť individuálnej chyby vnesenej personálom, čo v prípade vydania nesprávneho výsledku, či už falošne pozitívneho (zbytočná karanténa jednotlivca), alebo falošne negatívneho (nežiaduce šírenie ochorenia prostredníctvom neidentifikovaného infekčného jedinca), vedie k významnému zásahu do života nielen na úrovni jednotlivca, ale aj jeho širokého okolia. Pri

VYPRACOVALI

RNDr. Gabriel Minárik, PhD.
MEDIREX GROUP ACADEMY n.o.

RNDr. Renata Lukačková, PhD.
oddelenie lekárskej genetiky
Medirex, a.s.

porovnávaní rôznych komerčne dostupných riešení sme v prvom kole pracovali so 4 kitmi, pričom porovnanie sa v úvode realizovalo prostredníctvom manuálneho spracovania vzoriek. Sumarizácia výsledkov porovnania je uvedená v *tab. 1*.

Tab. 1: *Vyhodnotenie porovnania efektivity extrakcie nukleových kyselín pri manuálnom spracovaní vzoriek, „najlepšie“ riešenie z pohľadu senzitivity je uvedené na prvom mieste*

Poradie	Kit	Medián C_t^*
1.	MagMAX Viral/Pathogen Kit	28,48
2.	SeraSil-Mag Virus/Pathogen Kit**	29,82
3.	LifeRiver RNA Isolation Kit (Paramagnetic)	30,36
4.	Hui He et al. (2017)***	30,90

* Medián C_t – relatívna hodnota vyjadrujúca výťažok extrakcie RNA (nižšia hodnota = vyšší výťažok).

** Výrobca neskôr zmenil názov kitu na SeraXtracta Virus/Pathogen Kit (pozri tab. 2).

*** V laboratóriu zavedená nekomerčná metóda vychádzajúca z publikácie He H, et al. (2017).

Tab. 2: Vyhodnotenie porovnania efektivity extrakcie nukleových kyselín pri automatickom spracovaní vzoriek, „najlepšie“ riešenie z pohľadu senzitivity je uvedené na prvom mieste

Poradie	Kit	Medián C_t^*	Čas/plasty**
1.	MagMax Viral/Pathogen Kit	27,25	27/6
2.	Zybio Nucleic Acid Extraction Kit	27,53	17/5
3.	SeraXtracta Virus/Pathogen Kit	27,76	25/5
4.	RNA Viral Prep 480 Kit	28,86***	15/6
5.	Maxwell HT Viral TNA Kit	29,39	45/6
6.	BeaverBeads Viral DNA/RNA Kit	29,51	30/6
7.	RealBest UniMag Kit	31,04	60/5
8.	viRNAtrap Extraction Kit	31,25	10/5
9.	innuPrep RNA Virus Plus Kit	31,51	50/7
10.	GeneAid Magnetic Beads Virus DNA/RNA Kit	31,62	40/7

* Medián C_t – relatívna hodnota vyjadrujúca výťažok extrakcie RNA (nižšia hodnota = vyšší výťažok).

** Čas/plasty – časová náročnosť protokolu v minútach/spotreba plastového materiálu.

*** Protokol využíva v porovnaní s ostatnými kitmi polovičný vstupný objem primárnej vzorky, preto je teoretickú hodnotu mediánu C_t možné upraviť na 27,86.

V druhom kole bolo porovnaných 10 kitov, ktoré vychádzali z komerčných riešení a boli testované v rámci zavádzania a testovania automatizovanej extrakcie nukleových kyselín. Výsledky štúdie porovnania efektivity (rozšírenej o výkonnosť a ekonomický rozmer – čas protokolu a spotreba plastového materiálu) extrakcie nukleových kyselín sú sumarizované v tab. 2.

Na základe uvedených výsledkov sa pri rutinnom laboratórnom spracovaní vzoriek využívajú predovšetkým kity, ktoré sa umiestnili na pozíciách 2 a 3, dôvodom je okrem lepšej ekonomickej a časovej náročnosti aj ich dobrá dostupnosť na lokálnom trhu. Je potrebné podotknúť, že

klúčový parameter (medián C_t) reprezentujúci relatívnu senzitivitu sa medzi kitmi na pozíciách 1 – 4 prakticky nelíši.

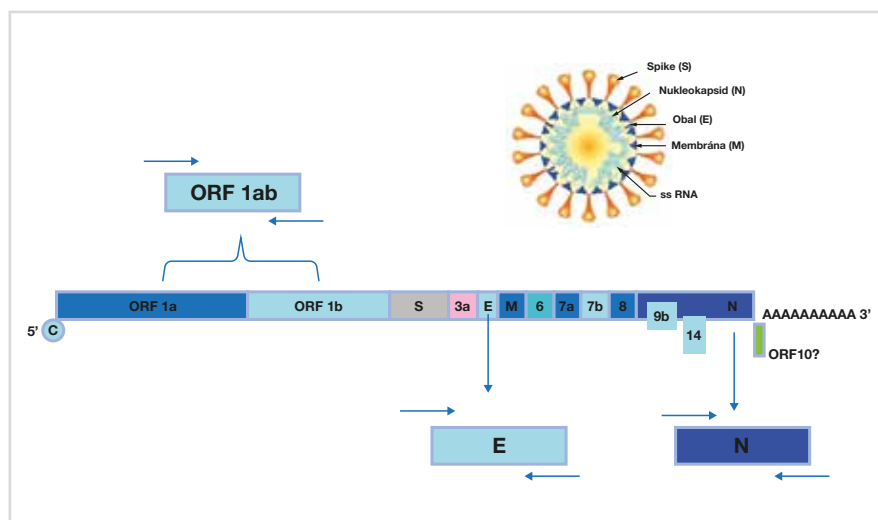
V rámci testovania automatizácie boli v laboratóriách postupne testované a rutinne zavedené tri rôzne automatické extrakčné platformy – MagnaPure od spoločnosti Roche, KingFisher Flex od spoločnosti ThermoFisher a Zybio EXM6000 od spoločnosti Zybio (a tiež Zybio EXM3000 – menej výkonná platforma s rovnakou špecifikáciou od spoločnosti Zybio). V súčasnosti sa vzhľadom na celkovú efektivitu v rutinných laboratóriách využívajú platformy KingFisher Flex a Zybio EXM6000 (prípadne Zybio EXM3000).

Detekcia vírusovej RNA prostredníctvom RT-qPCR metódy

RT-qPCR – (Quantitative Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) sa považuje za „zlatý štandard“ v diagnostike infekcie spôsobujúcej ochorenie COVID-19.

RT-qPCR je metóda vhodná na priamu detekciu prítomnosti a kvantifikáciu špecifického genetického materiálu – RNA – koronavírusu SARS-CoV-2. Táto technika umožňuje analyzovať prítomnosť SARS-CoV-2 vírusu v izoláte z nasopharyngeálneho výteru, prípadne z iných alternatívnych odberov, ako sú napríklad sliny, kloktacie odberové súpravy alebo výter z rekta. Detekciu vírusovej RNA máme validovanú na všetky spomínané odbery.

Na genetickú detekciu SARS-CoV-2 bolo vyvinutých niekoľko súprav založených na RT-qPCR. Protokol odporúčaný Svetovou zdravotníckou organizáciou bol vyvinutý vo Virologickom ústave univerzitnej kliniky Charité v Berlíne (tzv. berlínsky protokol). RT-qPCR zahŕňa reverznú transkripciu SARS-CoV-2 RNA špecifických oblastí do komplementárnych reťazcov DNA (cDNA), po ktorej bezprostredne nasleduje PCR amplifikácia. Medzi vírusovými genómami súvisiacimi so SARS objavili tri konzervatívne oblasti: (1) gén *RdRP* (gén pre polymerázu RNA v oblasti otvoreného čítacieho rámca *ORF1ab*), (2) gén *E* (gén pre obalový proteín) a (3) gén *N* (gén pre nukleokapsidový proteín). Test môže byť navrhnutý ako dvojkrokový systém, kde jeden primer všeobecne deteguje skupinu koronavírusov vrátane SARS-CoV-2 a druhá skupina primerov špecificky deteguje iba SARS-CoV-2. Touto cestou sme sa vybrali na začiatku pandémie, ale pre časovú náročnosť sme zvolili cestu multiplexnej analýzy (detekcia viacerých cieľov v jednej reakcii – jednom kroku) – na ilustráciu, ktoré gény sú zahrnuté v analýze, je schéma na obr. 1.

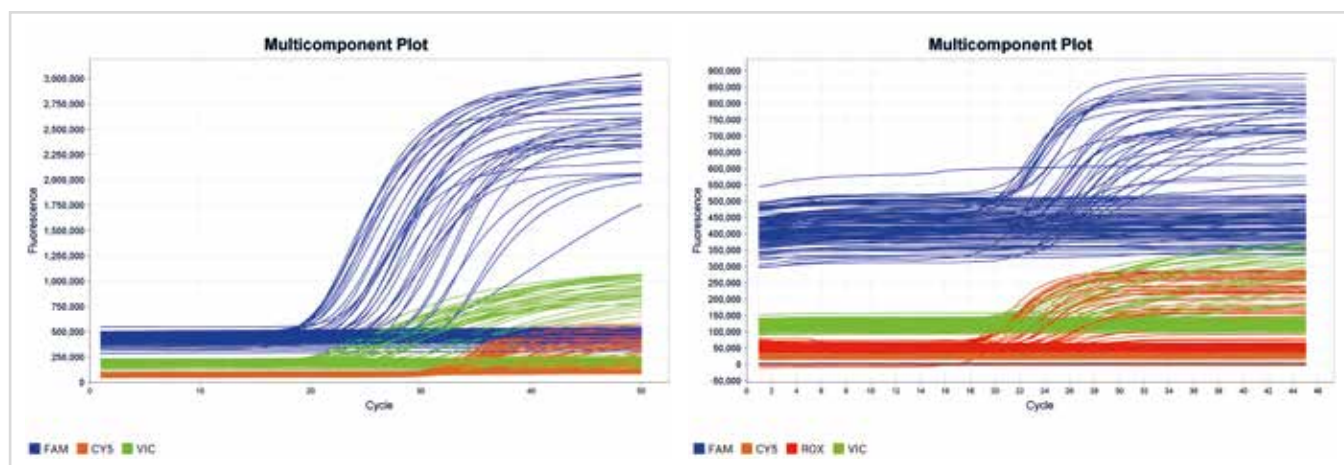


Obr. 1: Schéma vírusu a genómu SARS-CoV-2, vyznačenie cieľových sekvencií pre primery a próby pre multiplexnú RT-qPCR – Liferiver Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real Time Multiplex RT-PCR Kit.

Vzhľadom na zabezpečenie kvalitného riešenia pre RT-qPCR časť analýzy vzoriek boli pri dodržaní stále platných odporúčaní príslušných autorít v režime testovania a zavádzania do laboratórnej rutiny posudzované viaceré komerčne dostupné kity v kombinácii s rôznymi real-time PCR prístrojmi (Cobas Z480 – Roche, LightCycler 96 – Roche, ABI 7500 – ThermoFisher, QuantStudio 5 – ThermoFisher). Pri rozhodovaní o rutinnom využívaní sa

C	A	B	D
1	1	1	1
2	2	2	2
3	3	3	3
4	4	4	4
5	5	5	5
6	6	6	6
7	7	7	7
8	8	8	8
9	9	9	9
10	10	10	10
11	11	11	11
12	12	12	12
13	13	13	13
14	14	14	14
15	15	15	15
16	16	16	16
17	17	17	17
18	18	18	18
19	19	19	19
20	20	20	20
21	21	21	21
22	22	22	22
23	23	23	23
24	24	24	24
25	25	25	25
26	26	26	26
27	27	27	27
28	28	28	28
29	29	29	29
30	30	30	30
31	31	31	31
32	32	32	32

Obr. 2: Detekcia SARS-CoV-2 pozitívnych vzoriek na identickom súbore vzoriek. Testované boli parametre senzitivity, špecificity a podiel neinformatívnych výsledkov vizualizované po porovnaní štyroch rôznych komerčne dostupných RT-qPCR kitov (A – D). Červeným podfarbením sú označené pozitívne, zeleným negatívne, oranžovým hranične pozitívne a žltým neinformatívne výsledky. Kity sú zľava doprava zoradené od najsensitívnejšieho po najmenej senzitivity.



Obr. 3: Významný rozdiel vo fluorescencii cieľovej esej (modré krivky) pri identifikácii rovnakých SARS-CoV-2 pozitívnych vzoriek medzi dvomi porovnávanými RT-qPCR kitmi. Rozdiel je reprezentovaný hodnotami RFU (Y-os) dosahujúcimi v prípade prvého kitu (vľavo) 3 000 000 RFU a v prípade druhého kitu (vpravo) 900 000 RFU.

zohľadňoval celý rad výkonnostných parametrov ako senzitivity, špecificity, podiel neinformatívnych výsledkov multiplexing, interná kontrola (aj v podobe *housekeeping* génu), a tiež za bežnej situácie neočakávané aj dostupnosť na lokálnom trhu. Postupne boli na základe výsledkov testovania v rutinných laboratóriách používané kity Modular Wuhan CoV E-gene (Roche), Modular Wuhan CoV RdRP-gene (Roche), Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real Time Multiplex RT-PCR Kit (Liferiver), gb SARS-CoV-2 Multiplex EndoC (Generi Biotech) a SARS-CoV-2 Nucleic Acid Detection Kit (Zybio). Hodnotené rozdiely v sledovaných výkonnostných parametroch medzi porovnávanými kitmi sú pre detailnejšiu ilustráciu prezentované na obr. 2 – 4.

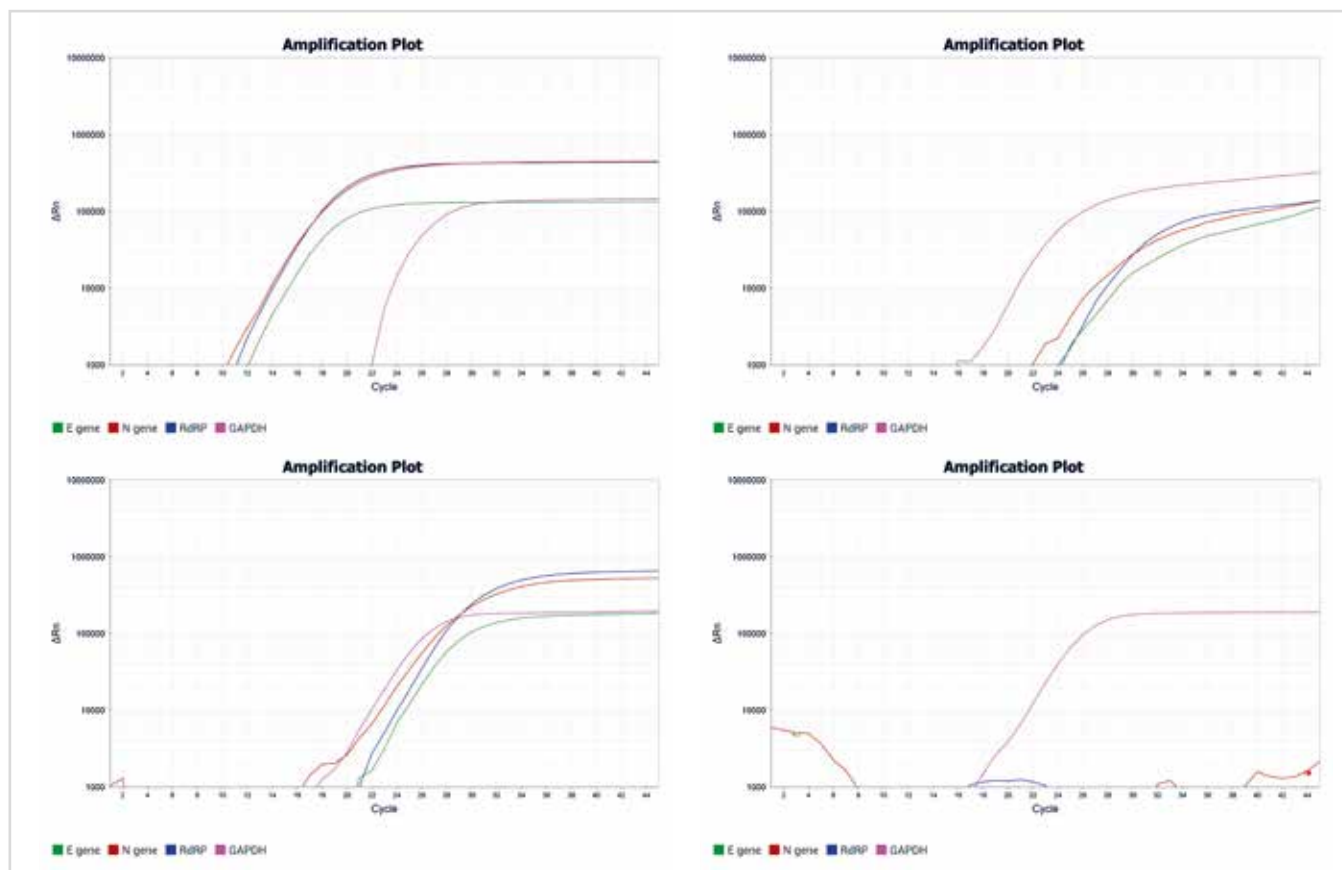
PCR metóda má svoje limitácie, a to napríklad v niektorých prípadoch (skoré štádium infekcie, prípadne pacient tesne pred vyliečením) môžu (z dôvodov nízkej koncentrácie vírusových častíc v respiračnom trakte) byť odobraté vzorky

diagnostikované ako falošne negatívne. Problémy nastávajú pri nízkej hladine vírusu vo vzorke, keď je interpretácia výsledku sťažená v dôsledku detekčného limitu metódy. Je to v prípade, keď hodnota C_t (threshold cycle – hodnota prahového cyklu PCR, keď exponenciálne stúpa amplifikačná krivka a je možné spoľahlivo hodnotiť pozitívny výsledok) je viac ako 41, čo zodpovedá len desiatkam až stovkám viriónov vo vzorke. Čím viac vírusu je vo vzorke, tým skôr je zachytený amplifikovaný signál (detekcia pri nižšej hodnote C_t). Podľa usmernenia MZ SR vydávame pozitívnemu pacientovi C_t hodnotu len *E génu*. Táto hodnota má pomôcť lekárom zatriediť pacientov do troch skupín s rôznym rizikom infekčnosti, schematické znázornenie je na obr. 5.

Avšak C_t hodnota je orientačný – relatívny údaj, pokiaľ sa na detekciu nepoužíva kit s endogénnou kontrolou (*housekeeping* génom). Pre potreby normalizácie dát sme zvalidovali SARS-CoV-2 Nucleic Acid Detection Kit od spoločnosti Zybio, ktorého

súčasťou je esej pre *housekeeping* gén, pomocou ktorého je možné normalizovať variabilitu v množstve celkovej extrahovanej RNA, vďaka čomu je možné stanoviť množstvo vírusovej RNA výrazne presnejšie.

Súčasťou analýz realizovaných v rutinnej praxi bolo aj otestovanie relevantného počtu vzoriek s cieľom identifikácie a stanovenia podielu „britského“ variantu SARS-CoV-2 v našej populácii. Výsledky z druhej polovice februára 2021 preukázali vyšší ako 90 % podiel v pozitívne detegovaných prípadoch. Retrospektívnou analýzou anonymizovaných vzoriek sme zistili, že už v druhej polovici novembra 2020 bol podiel týchto prípadov na úrovni viac ako 20 %. Žiaľ, takto retrospektívne získaná veľmi dôležitá informácia už nemohla ovplyvniť vo februári sa zhoršujúcu pandemickú situáciu na Slovensku s následnými extrémne negatívnymi dosahmi na úrovni nemocničnej zdravotnej starostlivosti a tiež vysoké počty úmrtí na ochorenie COVID-19.



Obr. 4: Vizualizácia multiplexnej detekcie SARS-CoV-2 RNA cieľových sekvencií (E gén, N gén, RdRP gén) a housekeeping endogénnej kontroly (GAPDH gén) v jednej reakcii. Zľava doprava sú prezentované vzorky s vysokým, so stredným, s nízkym podielom vírusovej RNA a bez prítomnosti vírusovej RNA v analyzovanej vzorke.

Vlastné know-how a budúci výskum a vývoj

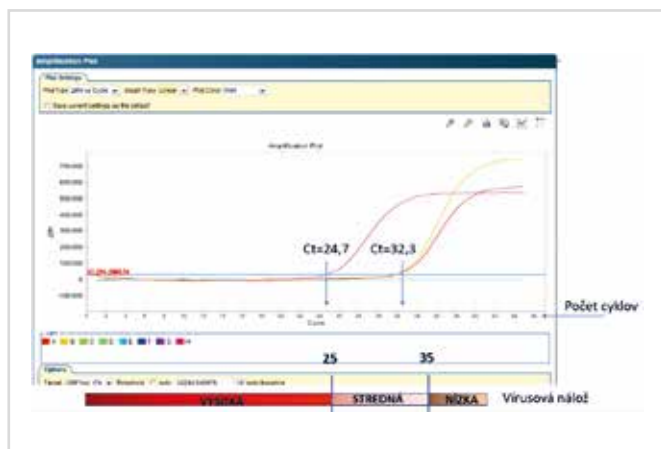
Keďže nie všetky aspekty laboratórneho testovania je možné pokryť štandardnými postupmi optimalizácie, bolo potrebné v rámci neustálych zmien súvisiacich s extrémnym nárastom potrieb testovania reagovať aj na nové problémy, resp. požiadavky. V tejto nadväznosti bolo hneď v úvode nevyhnutné nastaviť procesy v laboratóriách tak, aby bolo možné denne spracovať tisíce (potenciálne infekčných) klinických vzoriek v laboratóriách kategórie BSL2. V čase vzniku pandemickej situácie boli takéto laboratóriá na Slovensku dostupné a rutinne využívané len ojedinele a ich denná kapacita zďaleka nedosahovala potrebnú úroveň. V rámci Medirex, a.s., preto expresne museli vzniknúť takéto laboratóriá, a to aj vzhľadom na ich využívanie vo vysokopriepustnom móde v spojení s automatizáciou kritických krokov v rámci spracovania vzoriek. V súvislosti so zavedením automatizácie bolo dôležité presunúť, resp. rozšíriť personálne kapacity

laboratórií tak, aby v čase najvyššieho využitia RT-qPCR metód v laboratóriách (aktuálne sú tri v rámci Slovenska) bolo možné pracovať v troch zmenách prakticky v „24/7“ pracovnom režime pre zabezpečenie analýzy všetkých vzoriek, ktoré do laboratória boli dodané, do 48 hodín. Toto sa podarilo dosiahnuť s pomocou zapojenia 45 zamestnancov pracujúcich v období najväčšieho dopytu po testovaní v rámci laboratórnej časti. Zároveň, a najmä na interné účely ďalších optimalizácií a zefektívňovania laboratórných procesov neustále pokračovalo testovanie v rutinej diagnostike využívaných procesov, protokolov a kitov. Toto ďalšie zefektívňovanie zahŕňalo okrem iného aj úpravu podmienok realizovaných analýz, napr. skrátenie protokolov a pracovných cyklov, úpravu zloženia kitov, úpravu podmienok RT-qPCR.

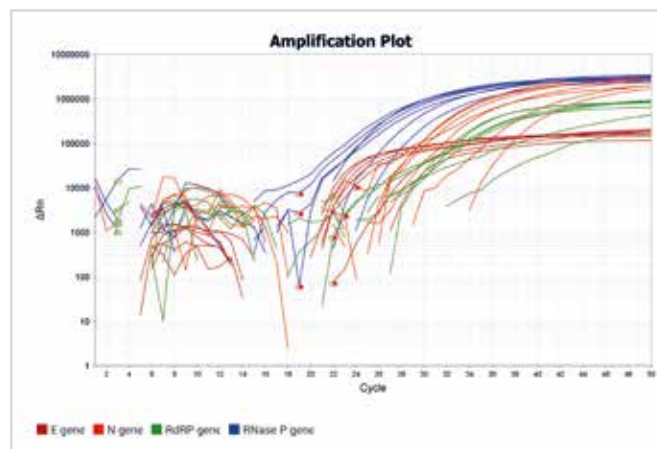
V úvodnej fáze zavádzania SARS-CoV-2 detekčných metód vychádzajúcich principiálne z RT-qPCR metódy vznikol celosvetový problém s dostupnosťou detekčných súprav a v tejto súvislosti bol v našich laboratóriách

pripravený alternatívny „kit“ vyskladaný z jednotlivých komponentov, teda z kategórie „home made“. Tento „kit“ a jeho efektívnosť bola testovaná a z kvalitatívnej stránky bola dosiahnutá v tom čase požadovaná senzitivita umožňujúca vo vzorke detegovať limitné množstvo vírusovej RNA na úrovni 100 kópií/reakcia. Zavedený „kit“ vychádzal z už vyššie spomínaného „berlínskeho“ protokolu. V našich laboratórnych podmienkach bol zavedený protokol v multiplexnom vyhotovení, vizualizácia detekcie SARS-CoV-2 pozitívnych vzoriek týmto „kitom“ je prezentovaná na obr. 6.

Na účely dlhodobej archivácie vybraných vzoriek pre využitie v rámci ďalších vedeckovýskumných projektov v biobanke MGA bolo v rámci minimalizácie zásahu do rutinej analýzy takýchto vzoriek a zároveň zachovania požadovaných kvalitatívnych a kvantitatívnych charakteristík primárnych vzoriek potrebné zaviesť protokol umožňujúci ich aspoň krátkodobú stabilizáciu. V tejto súvislosti boli testované dva rôzne komerčne dostupné stabilizačné



Obr. 5: Detekcia troch pozitívnych vzoriek s využitím RT-qPCR (amplifikačné krivky ružovej, žltej a červenej farby). Ružová amplifikačná krivka pretína prah (modrá čiara) skôr, teda má nižšiu hodnotu C_t a indikuje vo vzorke viac vírusovej RNA, ako je vo vzorkách so žltou a s červenou krivkou.



Obr. 6: Vizualizácia analýzy SARS-CoV-2 pozitívnych vzoriek prostredníctvom alternatívneho „home made“ RT-qPCR kitu.

roztoky – DNA/RNA Shield od spoločnosti Zymo Research a viRNAtrap Lysis Buffer Concentrate od spoločnosti GeneSpector. Výsledky použitia oboch stabilizačných roztokov preukázali zníženie hodnôt C_t pri stabilizácii a krátkodobom skladovaní (2 – 5 dní pri 2 – 8 °C) o hodnoty v rozpätí od 0,825 do 1,769, teda napriek použitiu stabilizačného roztoku už v krátkodobom horizonte dochádza k zníženiu množstva detegovateľnej vírusovej RNA 1,6-násobne – 3,5-násobne. V súčasnosti pokračujú testy zamerané na ďalšiu optimalizáciu stabilizácie a stanovenie maximálneho časového obdobia, v ktorom je možné požadovanú úroveň stabilizácie primárnych vzoriek zabezpečiť.

Sumár

Pandémia COVID-19 zasiahla do mnohých oblastí medicíny a zdravotnej starostlivosti na celom svete a jej vývoj sa dá len veľmi ťažko predvídať. Situácia sa komplikuje tým, že vírus sa ako biologický systém neustále vyvíja a pri replikácii neustále vznikajú nové mutácie, ktoré sa v špecifickej konštelácii môžu podpísať pod vznik nových variantov (tzv. britský, juhoafrický, brazílsky), ktoré môžu mať navzájom odlišné prejavy (infekčnosť, mortalita). Kľúčová je preto stále včasná detekcia vírusu SARS-CoV-2 pomocou diagnostických metód, medzi ktorými zlatým štandardom naďalej zostáva RT-qPCR metóda, ktorá je výrazne citlivejšia ako antigénové testovanie a vďaka aktuálne už dobre vybudovanej infraštruktúre laboratórií poskytuje nielen svoj vysoký diagnostický potenciál, ale je aj vysoko spoľahlivá pri

monitorovaní stavu ochorenia COVID-19. Nami využívaná RT-qPCR súprava zachytáva aj doteraz objavené „nové“ varianty (britský, brazílsky a aj juhoafrický). Presné stanovenie diagnózy pomocou validovaného kitu s vysokou senzitivitou a špecificitou je rozhodujúce pre obmedzenie šírenia ochorenia COVID-19. Kit s nízkou senzitivitou nedokáže zachytiť infikovaných jedincov pred nástupom ochorenia s nízkou vírusovou náložou a títo jedinci sú hrozbou pre šírenie nebezpečného vírusu, preto je nesmierne dôležité pracovať s najkvalitnejším a najefektívnejším PCR testom. Počas našej validácie sme vybrali tie najlepšie kity, či už na izoláciu vírusovej RNA a na jeho samotnú detekciu pomocou RT-qPCR, celý proces sme zefektívniť zjednodušením, automatizáciou, časovým skrátením laboratórnych procesov a personálnym

manažmentom. Vďaka týmto nastaveniam dokážeme kvalitne spracovať denne tisíce vzoriek. Moderná molekulárna diagnostika poskytuje základné diagnostické riešenie a umožňuje vykonať veľké množstvo testov v primeranom čase, a tak zabrániť šíreniu infekcie.

Podakovanie

Tento príspevok vznikol vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Výskum progresívnych metód diagnostiky COVID-19 a biomarkerov umožňujúcich skorú detekciu jedincov so zvýšeným rizikom ťažkého priebehu ochorenia, kód ITMS: 313011ATA2, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

1. He H, et al. Integrated DNA and RNA extraction using magnetic beads from viral pathogens causing acute respiratory infections. *Sci Rep.* 2017 Mar 23;7:45199.
2. Corman VM, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *2020 Euro Surveill.* 2020 Jan;25(3):2000045.
3. Yuzhong Xu, Minggang Cheng, et al. Current approaches in laboratory testing for SARS-CoV-2, *International Journal of Infectious Diseases*, Volume 100, 2020, Pages 7-9, ISSN 1201-9712, <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.08.041>.
4. Da Silva SJR, Silva CTAD, et al. Clinical and Laboratory Diagnosis of SARS-CoV-2, the Virus Causing COVID-19. *ACS Infect Dis.* 2020 Sep 11;6(9):2319-2336. doi: 10.1021/acscinfecdis.0c00274. Epub 2020 Aug 20. PMID: 32786280; PMCID: PMC7441751.
5. Reijns MAM, Thompson L, Acosta JC, et al. A sensitive and affordable multiplex RT-qPCR assay for SARS-CoV-2 detection. *PLoS Biol.* 2020 Dec 15;18(12):e3001030. doi: 10.1371/journal.pbio.3001030. PMID: 33320856; PMCID: PMC771873.

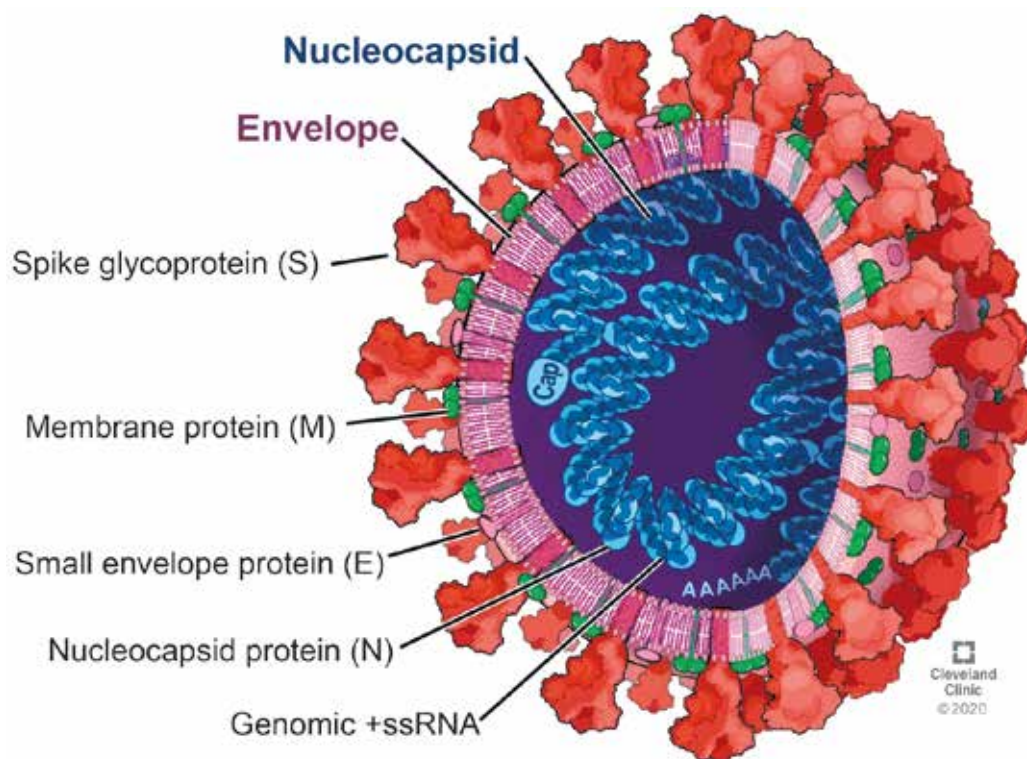
SARS-CoV-2 – stanovenie protilátok a interpretácia sérologických výsledkov

VYPRACOVALA

MUDr. Emília Miková
Medirex, a.s.

SARS-CoV-2 patrí k 7 koronavírusom, ktoré sú patogénne pre ľudí. Koronavírusy sú obalené, jednovláknové RNA vírusy s pozitívnou polaritou RNA. Majú 4 hlavné štrukturálne proteíny – nukleokapsidový (N), spike (S), malý obalový proteín (E) a membránový proteín (M).

Proteín S má dve podjednotky, S1 zabezpečuje prichytenie k hostiteľskej bunke a S2 fúziu s bunkovou membránou pri vstupe vírusu do bunky. M proteín tvorí podstatnú časť vírusovej membrány. N proteín je naviazaný na genóm vírusu. E proteín je najmenší proteín vírusu. M, N a E proteíny



Obr. 1: Štruktúra koronavírusu (Bergmann CC and Silverman RH, 2020).

sa podieľajú na replikácii vírusu. (Sakr MM, et al., 2021)

Po strete človeka s vírusom sa rozvíja komplexná imunitná odpoveď. V rámci špecifickej imunitnej reakcie dochádza k tvorbe protilátok, avšak v boji s vírusmi sa vo väčšej miere uplatňujú zložky bunkovej imunity. Protilátky sú látky bielkovinovej povahy, ktoré významne prispievajú k boju s vírusmi. Viazu sa na ich štruktúrne súčasti – antigény a v súčinnosti s ďalšími zložkami imunitného systému sa podieľajú na eliminácii pôvodcov infekcie z organizmu. Rozlišujeme 5 tried protilátok – IgM, IgA, IgG, IgE a IgD. Do interakcie človeka s vírusom sa zapájajú predovšetkým protilátky triedy IgM, IgA a IgG. Protilátky triedy IgM sú protilátky akútnej fázy infekcie. IgA sa uplatňujú predovšetkým v rámci slizničnej imunity. IgG patria k hlavným imunoglobulínom, ktoré vznikajú v neskoršej fáze imunitnej reakcie, a najmä počas sekundárnej imunitnej reakcie. Tvoria až 75 % celkových imunoglobulínov. (Buc M, 2009)

SARS-CoV-2 vyvoláva tvorbu protilátok u väčšiny infikovaných ľudí. U symptomatických jedincov bola v rámci štúdií priemerná tvorba IgM protilátok 4 – 14 dní a IgG 10 až 15 dní od začiatku ochorenia. IgA protilátky sa merali v menšom množstve štúdií a priemer sérokonverzie bol u väčšiny od 4 do 11 dní od začiatku príznakov. IgM dosiahli vrchol v priebehu 2 – 5 týždňov a klesali ďalších 3 – 5 týždňov. IgG dosiahli vrchol medzi 3. až 7. týždňom a pretrvávali minimálne 8 týždňov. (Post N, et al., 2020) Napriek relatívne skorému nástupu tvorby protilátok majú sérologické testy vykonávané 2 týždne po vzniku príznakov vyššiu diagnostickú presnosť v porovnaní s testami vykonávanými skôr. (Chen M, et al., 2021)

Protilátky vznikajú v rôznej miere proti jednotlivým komponentom SARS-CoV-2. Sérologické testy sú zamerané predovšetkým na detekciu protilátok proti S proteínu a N proteínu. Stanovenie anti-N protilátok má význam predovšetkým u ľudí, ktorí ochorenie prekonali. Protilátky proti S proteínu vznikajú ako po prekonaní, tak aj po očkovaní dostupnými vakcínami. Prítomnosť špecifických protilátok dokáže stanoviť väčšina sérologických metód. V rámci diagnostiky protilátok proti SARS-CoV-2 sa v laboratóriách bežne využívajú metódy enzýmová imunoanalýza (ELISA), chemiluminiscenčná imunoanalýza

(CMIA/CLIA) a elektrochemiluminiscenčná imunoanalýza (eCLIA), ktoré zachytávajú protilátky proti N proteínu a S proteínu vírusu samostatne, alebo spolu v rámci jedného testu. Mnohé testy zároveň umožňujú aj kvantitatívny dôkaz protilátok.

Na potvrdenie akútnej infekcie majú svoju nezastupiteľnú úlohu práve molekulárno-biologické metódy, ktoré detegujú prítomnosť RNA SARS-CoV-2. Priamy dôkaz SARS-CoV-2 metódou PCR je vhodný na začiatku klinických príznakov, respektíve na ôsmy deň karantény po kontakte so SARS-CoV-2 pozitívnou osobou. Detekcia protilátok zohráva svoju úlohu v neskoršej fáze infekcie, respektíve po prekonaní ochorenia. Optimálne načasovanie odberu je po 2 týždňoch od vzniku príznakov, prípadne kedykoľvek po prekonaní ochorenia v rámci diagnostiky postkovidového syndrómu. Aktuálne používané vakcíny obsahujú genetickú informáciu na vznik S proteínu. Po očkovaní je teda možné stanovovať hladinu protilátok proti S proteínu. Plná ochrana je dosiahnutá dva týždne po podaní druhej dávky očkovacej látky. Nie je však definovaná minimálna protektívna hladina protilátok, po dosiahnutí ktorej by protilátky zabránili infekcii, respektíve ochoreniu. Stanovenie protilátok po očkovaní má iba informatívnu hodnotu o ich prítomnosti. Ako sme už spomenuli, na komplexnej protivírusovej imunitnej odpovedi majú významnú úlohu zložky bunkovej imunity, ktoré sa však po

očkovaní, respektíve po prekonaní rutinne nestanovujú.

Interpretácia sérologických výsledkov je komplexná. Vždy zohľadňuje výsledky z predchádzajúcich odberov vrátane PCR a dostupné anamnestické údaje. Pri hraničnom alebo pozitívnom zachytení v triede protilátok IgA alebo IgM ide pravdepodobne o akútnu infekciu, resp. nedávnu infekciu, a preto sa odporúča doplnenie PCR testu na dôkaz SARS-CoV-2 RNA. Pozitívne zachytenie všetkých troch tried, respektíve triedy IgM a IgG môže znamenať nedávnu infekciu. Protilátky triedy IgG sa začínajú tvoriť približne po 14. dni, avšak tvorba môže byť posunutá aj o pár dní skôr, prípadne neskôr. Hraničné hodnoty IgG alebo hodnoty tesne nad hranicou positivity môžu byť spôsobené čerstvou tvorbou protilátok, a preto je rovnako vhodné doplnenie testu o PCR. Pozitívne IgG protilátky pri negatívnom teste PCR, respektíve opakovane pozitívne IgG protilátky s odstupom 2 týždňov značia prekonanú infekciu. Z hodnoty IgG protilátok sa však nedá jednoznačne určiť, kedy došlo k prekonaniu.

Stanovenie protilátok má jednoznačný prínos v diagnostike SARS-CoV-2 v neskorších fázach infekcie, pri pretrvávajúcom podozrení na ochorenie a negatívnom výsledku PCR, na epidemiologické štúdie na účely zistenia stavu populácie a v rámci diagnostiky postkovidového syndrómu.

Literatúra

1. Sakr MM, Elsayed NS, El-Housseiny GS. Latest updates on SARS-CoV-2 genomic characterization, drug, and vaccine development; a comprehensive bioinformatics review. *Microbial Pathogenesis* 2021. 154: 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104809>.
2. Bergmann CC, Silverman RH. COVID-19: Coronavirus replication, pathogenesis, and therapeutic strategies. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* Jun 2020, 87 (6) 321–327; DOI: 10.3949/ccjm.87a.20047.
3. Buc M. Imunoglobulíny. In: *Základná a klinická imunológia*. Bratislava, Univerzita Komenského, 2009. 51–72.
4. Post N, et al. Antibody response to SARS-CoV-2 infection in humans: A systematic review. *PLoS ONE* (2020) 15(12): e0244126. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244126>.
5. Chen M, et al. Clinical applications of detecting IgG, IgM or IgA antibody for diagnosis of COVID-19: A meta-analysis and systematic review. *International Journal of Infectious Diseases* 2021. 104: 415–422.

Čo všetko treba zabezpečiť, aby testovanie na mobilnom odberovom mieste bezchybne fungovalo?

Príprava mobilných odberových miest v súvislosti s testovaním na ochorenie COVID-19 si vyžaduje dôslednú organizáciu, za ktorou sa skrýva zohratý tím kolegov. Zo svojich skúseností prezradili, v čom spočíva príprava a objednávanie osobných ochranných pracovných prostriedkov (OOPP), ako prebieha tlač žiadaniek a balenie odberových setov či aký je postup pri plánovaní personálu do odberových tímov.

Príprava a objednávanie OOPP v stovkách kusov

K testovaniu metódou RT-PCR na mobilných odberových miestach (MOM) bezodkladne patrí používanie osobných ochranných pracovných prostriedkov. Bez nich by boli personál aj klienti vystavení riziku nákazy. V súčasnosti je zriadených 18 mobilných odberových miest, pre ktoré je potrebné zabezpečiť týždenne stovky kusov OOPP. „Pri objednávkach vychádzame predovšetkým z predpokladaného počtu pacientov na jednotlivých odberových miestach. Mimoriadne nám však pomáha predplánovanie personálu z dôvodu výberu rozličných veľkostí oblekov či rôzneho stupňa ochrany na jednotlivých pozíciách,“ uvádza Samuel Žužič, referent OOPP. Medzi štandardné ochranné pracovné pomôcky patria overaly, rukavice, ochranné štíty, respirátory FFP3 a FFP2, rúška, gumáky či okuliare. Všetky zo spomínaných slúžia na jednorazové použitie okrem gumákov a ochranných štítov, ktoré po každom použití smerujú pod UV žiaričku na rýchlu dezinfekciu.

V prípade výjazdov do firiem sú plánovanie a príprava OOPP o čosi náročnejšie. „Na mieste odberu musíme vytvoriť dočasné mobilné miesto so všetkým, čo k odberom patrí. Nesmieme zabúdať na drobnosti, ktoré sú inak bežne k dispozícii na

našich odberových miestach,“ upozorňuje Mgr. Dominika Pavlovčinová, manažérka covidového tímu. Z prostriedkov ide najmä o dezinfekciu, stojan na odberové médiá, vrece, odpadovú nádobu, drevené paličky či napríklad aj papierovú pásku na zalepenie škatúl. Z pomôcok pre pacientov nemožno zabudnúť na servítky, vlhčené obrúsky, jednorazové rukavice či perá. Myslieť treba skutočne na každý detail. „Počas odberov

v skorých ranných a nočných hodinách sa stala čelovka nevyhnutnou výbavou pre zdravotníka vykonávajúceho odber. Aj na takéto situácie sme museli byť pripravení,“ spomína S. Žužič.

Tlač žiadaniek nie je veda, ale vyžaduje si koncentráciu

Podobný postup ako v predchádzajúcom kroku je aj v prípade tlače žiadaniek



a balenia testovacích súprav. Najskôr je potrebné odhadnúť počet pacientov na dané obdobie a na základe tohto odhadu sa zrealizuje objednávka na pracovné pomôcky až po samotné čisté žiadanky či tonery do tlačiarň.

Tlač žiadaní sa vykonáva plošne pre všetky odberové miesta Medirex vrátane partnerských miest. V súčasnosti sa denne vytlačí približne 1 000 žiadaní v Centrálnom laboratóriu v Bratislave a zhruba o polovicu menej v Centrálnom laboratóriu v Košiciach. V priemere sa však za celé obdobie denne vytlačí okolo 2 000 žiadaní v Bratislave a v Košiciach sa pohybuje denná hranica približne na úrovni 700 – 1 000 kusov.

Podľa slov manažérky covidového tímu Mgr. Dominiky Pavlovčinovej nie je sice tlač žiadaní žiadne „štiepenie atómu“, ale je to veľmi zodpovedná práca, ktorá je náročná na sústredenie. Každá žiadanka musí byť vytlačená absolútne čitateľne a správne. „Počas svojej práce musím dávať pozor hneď na niekoľko vecí. Jednak kontrolujem stav tonera v tlačiarňi a zároveň dohliadam na to, aby bola žiadanka zreteľná, čitateľná a so správne načítaným kódom. Okrem toho je veľmi dôležité, aby boli absolútne presne, správne a čitateľne označené kódy zo spodnej časti žiadanky, ktoré sa pri odbere lepia na odobraný materiál klienta. Každú moju prvú žiadanku dôkladne kontrolujem, či spĺňa tieto kritériá a až potom pokračujem v ďalšej práci“, vymenúva RNDr. Mária Ragulová z Centrálného príjmu v Bratislave.

V košickom centrálnom laboratóriu sa tlačí žiadanki a príprave odberových setov venuje skupina zdravotníckych laborantov. „Spoločne tlačíme a kontrolujeme všetky žiadanky podľa aktuálneho rozpisu. Pochybiť nesmieme pri načítavaní kódu na žiadanke“, vysvetľuje zdravotníčka laborantka Lea Fedírková z Centrálného laboratória v Košiciach. Okrem tlače pripravujú odberové súpravy, ktoré so všetkými potrebnými náležitosťami vkladajú do škatúl. Tie, samozrejme, označujú podľa jednotlivých odberových miest, pre ktoré sú určené.

Situácia sa v súčasnosti stabilizuje a počty vykonaných PCR testov postupne klesajú. Spôsob práce sa však od základu zmenil, keď sa pandemická situácia začala počas druhej vlny zhoršovať. „Na začiatku pandémie sme pracovali 2 – 3 hodiny



Na mobilnom odberovom mieste je nevyhnutnou činnosťou dezinfekcia OOPP.



Naši kolegovia počas príprav odberových setov a tlače žiadaní.

denne, neskôr začala práca narastať. Veľmi rada spomínam na deň, keď sme počas prvého celoplošného testovania intenzívne pracovali bez prestávky aj 10 hodín. Bolo to náročné a hektické, ale vďaka skvelej organizácii sme odvedli obrovské množstvo kvalitnej práce,“ spomína M. Ragulová.

Počas večerných hodín strávených pri tlači žiadaní začali postupne vznikať aj priateľstvá. „Vďaka tejto práci sme mali možnosť bližšie sa spoznať s ostatnými kolegyňami, z čoho sa veľmi teším. Sme

akoby jedna rodina,“ priznáva Lýdia Semanová, zdravotníčka laborantka z košického centrálného laboratória.

Za každým pripraveným testom hľadajte človeka

Významnú úlohu zohráva aj balenie odberových setov. Kolegovia musia totiž pripraviť odberové súpravy na výtery z hltana a nosohltana a najnovšie už aj na odber zo slín. Odberové sety balia do špeciálnych vrecúšok, ktoré sa pripravujú pre jednotlivé MOM na základe počtu

pacientov a typu odberu. Odberový set musí obsahovať sterové tyčinky na výter z nosohltanu a hltana, médium a malé mikroténové vrecúško slúžiace na uloženie samotného odberu.

Ako v každej práci aj tu bolo na začiatku dôležité nájsť si systém, ktorý by efektívne a rýchlo fungoval. „*Najideálnejším systémom bolo vytvorenie tzv. jednotlivých kôpok odoberaného materiálu, ktoré má set obsahovať,*“ vysvetľuje Milan Paiser, vodič Medirex, a.s., ktorý sa po ukončení jeho hlavnej pracovnej činnosti podieľa na

príprave setov RT-PCR testov. Hoci sa na prvý pohľad môže zdať, že ide o rutinnú prácu, nie je to celkom pravda. „*K tejto práci musíme pristupovať zodpovedne,*“ upozorňuje šoférka Ivana Bardoňová a k jej tvrdeniu sa prikláňa aj kolega M. Paiser: „*Za každým pripraveným PCR testom treba vidieť človeka.*“

Pred prípravou odberových súprav nesmú kolegovia zabudnúť na dôležité kroky. „*V prvom rade musíme dbať na hygienu, aby počas balenia nedošlo k narušeniu sterility odoberacieho materiálu, ktorý by sa mohol*

stať kontaminovaný vonkajším prostredím a mohlo by tak dôjsť k nepravdivým výsledkom z odoberaného biologického materiálu,“ pripomína vodič Milan. „*V druhom kroku si musíme dávať pozor, aby balíček obsahoval všetok potrebný materiál,*“ dopĺňa kolegyňa Ivana Bardoňová.

Zaujímavosťou je posielanie všetkých setov a žiadaniek v prepravných krabiciach, ktoré kolegovia „recyklujú“ z jednotlivých oddelení celého laboratória. „*Je úsmevné, keď nám už aj cudzí ľudia nosia krabice, aby sme ich mali dostatok,*“ priznáva D. Pavlovčinová. Krabice však nachádzajú opätovné využitie, až kým sa neznehodnotia. „*Z každého výjazdu či mobilného odberového miesta sa snažíme škatule vracať a používať znova, rovnako ako nepoužité odberové sety,*“ prezrádza Juliana Hurtová, zdravotníčka laborantka z Centrálného laboratória v Košiciach.

Chémia pri plánovaní personálu do odberových tímov

Plánovanie personálu do odberových tímov je ďalším zásadným kľúčom k fungovaniu celého testovania. Podľa Dominiky Pavlovčinovej je niekedy spomínané plánovanie naozaj umenie. „*Na každý deň, na každé odberové miesto či výjazd je potrebné pripraviť plán personálu. Denne pracujeme pre západné Slovensko s približne 30 – 40 ľuďmi v teréne, čo nie je také jednoduché zosúladiť. Navyše, na naše najväčšie odberové miesto na Pasienkoch posielame aj 10 zamestnancov, ktorí pracujú v dvojzmennej prevádzke, kde odoberajú vzorky aj 800 pacientom,*“ vymenúva.

Tím štandardne tvoria zdravotník vykonávajúci odbery, administrátor a koordinátor. Pri výbere tímu treba prihliadať na odbornosť a vyškolenie jednotlivých osôb. „*Občas sa snažíme pozeráť aj na to, aká je chémia medzi jednotlivými členmi tímu, aby sme zabezpečili plynulý chod prevádzky. Predsa len, v dobrej nálade ide práca od ruky,*“ prezrádza Dominika. Okrem testovania na mobilných odberových miestach je z času na čas nutné vyraziť na testovanie do firiem, kde covidový tím sprevádza vodič. „*Šofér je pre mňa regulárnou súčasťou tímu, pretože je zvyčajne veľmi nápomocný. Touto cestou by som sa rada poďakovala aj všetkým z oddelenia nákupu, logistiky a veľkodistribúcie a zvlášť tímlídovi dopravy Zolimu Botlikovi, ktorý na naše bláznivé požiadavky nikdy nepovie nie,*“ s vďakou uzatvára manažérka covidového tímu.



Žiadanky a odberové sety sa triedia podľa aktuálnych rozpisov.



Súčasťou covidového tímu sú aj vodiči.

PREDSTAVUJEME MEDIREX PARTNERA

MUDr. Martin Lešťan:

„Alergológovia sú neraz ako detektívi, ktorí pátrajú po príčine.“

Alergoimunológ MUDr. Martin Lešťan je vedúcim lekárom Alergoimunologického centra v Prešove a v Sabinove, kde liečia pacientov s poruchami imunity, alergiami a reprodukčnými problémami. V zaujímavom rozhovore nám porozprával, aká skupina pacientov najčastejšie zaplňa ich ambulancie, prečo sa zvýšil nárast alergií a aký je súčasný pohľad pacienta na lekára a naopak. V spojitosti s koronavírusom prezradil aj to, do akej miery ich pandémie ovplyvnila a čo bolo a stále je najnáročnejšie.

Vaše centrum navštevujú pacienti, ktorí sa na vás obracajú so žiadosťou o pomoc. Dá sa konkretizovať, s akými ťažkosťami k vám v súčasnosti najčastejšie pacienti prichádzajú?

Spektrum ochorení, s ktorými nás vyhľadávajú pacienti, je pestré. Alergické ochorenia sú na vzostupe, takže neprekvapí, že pacienti s týmito ochoreniami plnia naše ambulancie. Inhalačné alergie, potravinové, liekové, hmyzie alergie sú našim každodenným chlebičkom. Roky sa venujeme aj kontaktnej a profesijnej alergii. Tradičnými pacientmi sú pacienti s prieduškovou astmou, alergickou nádchou a ekzémom. Srdcovkou sú pre mňa aj rôzne formy potravinových alergií a intolerancií. Roky je v našom tíme nutričná špecialistka, keďže po našej diagnostike pacienti potrebujú sprievodcu svojou výživou. Alergológia je krásna v tom, že sa týka celého organizmu. Mali sme pacientov, kde jediným prejavom inhalačnej alergie boli úporné bolesti hlavy, a kým sa pacientka dostala do našich rúk, absolvovala množstvo iných vyšetrení a hospitalizácií. U nás sme jej diagnostikovali príčinu jej stavu a zrazu akoby mávnutím zázračným prúťkom jej mnohoročné ťažkosti odišli. Alergológovia sú neraz ako detektívi a pátrajú po príčine. Ďalšou obrovskou škálou ochorení, ktorými sa zaoberáme, sú poruchy imunity, vrodené

aj tie získané – časté infekcie dýchacích ciest, ťažké priebehy vírusových ochorení, opakované infekcie urogenitálneho traktu, autoimunitné ochorenia, prejavy chronickej únavy, reprodukčné problémy. Tieto týždne čelíme aj novému fenoménu – pacientom po prekonaní COVID-19. Pacientov je veľmi veľa a čaká nás obrovské množstvo práce.

V porovnaní s minulosťou pribúda stále viac pacientov s alergiami rôzneho druhu, ale aj astmatikov. Prečo je to tak? Môže za to z určitej časti životný štýl, ktorý vedieme? Predsa len, viac dbáme o čistotu prostredia, ochutnávame exotické potraviny alebo, naopak, v dôsledku nedostatku času sa stravujeme stereotypne a často siahame po polotovarochoch.

V materiáloch Európskej akadémie alergológie a klinickej imunológie sa uvádza, že len v Európe máme vyše 150 miliónov alergikov. Je to ochorenie týkajúce sa oboch pohlaví a každého veku. Nie je raritou vidieť v ambulancii päťročného dieťaťa a vzápätí na prvom vyšetrení sedemdesiatnika. Predpokladá sa, že v blízkej dobe bude nejakou formou alergie trpieť každý druhý človek. Alergie už teraz patria medzi civilizačné ochorenia. Sprezdávali ľudstvo odepamäti, nie je to nové ochorenie. Čo je však nevídané, je nárast alergií. Vieme o genetických faktoroch,

ale tie nie sú určite hlavným vinníkom tohto nárastu. Veď predsa sa genetická informácia za posledné desaťročia až tak veľmi nezmenila. Čo sa zmenilo, je náš životný štýl, zmeny v prostredí, naše stravovacie návyky. Trávime veľa času v interiéroch, do nášho života sme pustili lieky, chémiu, modifikované potraviny. Naš imunitný systém nás miluje, ale tak rýchlo nevie na tieto zmeny reagovať. Predstavme si na chvíľu priemernú rodinu pred 200 rokmi a porovnajme si ju s dnešnou rodinou. Čo jedli, kde trávili svoj čas, ako prebiehal ich čas po zotmení, v akom vzťahu boli s prírodou. Obrovská zmena v spôsobe života ľudstva si vyberá svoju daň.

Včasná diagnostika a správne nastavená liečba sú pre pacienta so zdravotnými ťažkosťami kľúčové. Mnoho pacientov má však problém získať skorší termín vyšetrenia. V spolupráci s Medirexom poskytujete samoplatcovské vyšetrenia, ktoré umožňujú pacientom dozvedieť sa viac o svojom zdraví s možnosťou eliminovať dĺžku čakania na vyšetrenie. Využívajú už v súčasnosti pacienti tieto služby? Ktoré vyšetrenia sú u vás najčastejšie vyhľadávané?

Tradičný pohľad na lekára ako na silnú autoritu a pacienta ako na pasívneho prijímateľa rád lekára už neplatí. Pacienti

sa stávajú našimi partnermi na ich ceste za zdravím. Zaujíma ich podstata ich ťažkostí, sledujú dostupné informácie na internete, neuspokoja sa s nekomunikatívnym lekárom, ktorý len v tichosti napíše nález a predpíše liek. Na strane druhej sú tu lekári, ktorí sú pod tlakom poisťovní. Tie regulujú spektrum možných vyšetrení, ktoré svojim poistencom uhrádzajú, a potom je

tu hlad pacientov po dokonalej diagnostike. Samoplatcovský program je logickým vyústením tejto nerovnováhy. Úprimne povedané, určitá regulácia zo strany poisťovní je namieste, keďže verejné zdroje sú a vždy budú limitované. Samoplatcovský program vnímam v dvoch rovinách – prvá je nadštandardné vyšetrenie nad rámec úhrady poisťovne, ktoré si samoplatca

vyberá po dohovore s lekárom, druhá rovina sú vyšetrenia, ktoré si objednáva klient sám bez predchádzajúcej rady lekára. Obe tieto vyšetrenia však vyžadujú následnú odbornú konzultáciu s lekárom. **Laik nemusí totiž vedieť, že výsledky vyšetrení sú niekedy zatažené chybovosťou, falošnou pozitivitou či negativitou a že len na základe jednorazového vyšetrenia sa nedá vždy postaviť správna diagnóza. Lekár – pacient – laboratórium. Tento trojuholník musí byť stále dodržaný.** Spektrum samoplatcovských vyšetrení je rozmanité, od reakcií na potraviny cez parametre imunity, hladiny vitamínov až po pohlavne prenosné ochorenia.

Špecializujete sa aj na oblasť reprodukčnej imunológie. S akými poruchami imunity v rámci vyšetrenia neplodnosti sa vo vašej ordinácii najčastejšie stretávate? Existuje prevencia?

Až 15 % všetkých neplodností a neschopnosti donosiť plod je zapríčinených imunologickými faktormi. Našími pacientmi sú páry, ktoré nás vyhľadávajú po viacerých spontánných potratoch, po dlhom období, keď sa im nedarí otehotnieť či po neúspešných umelých oplodneniach. Čoraz častejšie máme aj páry, ktoré prichádzajú preventívne, keďže majú závažné autoimunitné či systémové ochorenie, majú poruchy imunity a plánujú tehotenstvo. Imunologické príčiny porúch plodnosti sú rozmanité, od nediagnostikovaných porúch imunity, neraz vrodených po najrozličnejšie chronické stavy, ktoré bránia otehotneniu a vynoseniu bábätka. Niekedy sú príčiny závažné, inokedy ide o komplex viacerých menších nerovnováh v organizme. V tomto odbore nie sú reprodukční imunológovia králi – sme len sparingpartnermi iných odborností: gynekológov, urológov, hematológov, endokrinológov, genetikov, výživových poradcov. Niekedy je to ako skladanie veľkých puzzle, nie stále sa nám obraz podarí vyskladať, mnohokrát nám ešte nejaké diely do mozaiky chýbajú. Avšak ten pocit, keď sa dlhoročnému neplodnému páru podarí otehotnieť, či keď žena po siedmich potratoch porodí zdravé dieťa, je nezaplatiteľný.

V úvode sme načrtli tému covidu, ktorý sa nás všetkých dotýka. Do akej miery vás pandémia ovplyvnila? Čo bolo a stále je z vášho pohľadu najnáročnejšie?

Netrpím spomienkovým optimizmom. Už prvá vlna bola náročná. Ambulantný



MUDr. Martin Lešťan

Lekár s dlhoročnou praxou v pediatrii, klinickej imunológii a alergológii, predseda občianskeho združenia **Alergoimun.**, odborný garant **Alergoimunologického centra v Prešove a Sabinove**, vedúci lekár akreditovaného pracoviska **Univerzity Komenského v Bratislave, Jesseniovej lekárskej fakulty** v Martine pre praktickú časť vzdelávania lekárov v odbore klinická imunológia a alergológia, člen pracovnej skupiny pre reprodukčnú imunológiu **ČSAKI**.



MUDr. Martin Lešťan (v strede) so svojím tímom z Alergoimunologického centra v Prešove a Sabinove.

sektor a naše centrum nevynímajúc patril akoby na okraj záujmu vlády. Nemali sme dostatok ochranných pracovných pomôcok pre našich zamestnancov, zabudlo sa na naše pravidelné testovanie, rýchlo sme sa museli učiť telemedicíne. Tu musím zo srdca poďakovať celému kolektívu. Jar 2020, ale aj jeseň 2020 a ťažký prelom rokov 2020/2021 zvládli skvelo. Našich pacientov sme neopustili. Naopak, posilnili sme naše rady a z cirkulácie sme stiahli našu najmladšiu pani doktorku. V každej ambulancii bol stále prítomný aspoň jeden lekár pre pacientov vyžadujúcich fyzické vyšetrenie, ostatní lekári poskytovali služby telemedicíny. Bolo a je to náročné obdobie, lekár potrebuje pacienta vidieť, doslova absorbovať pri vyšetrení jeho vôňu, skontrolovať stav slizníc, pozrieť sa mu do očí. Telemedicina je veľkým pokrokom a má nesmierne výhody, ale prítomnosť pacienta nevie úplne nahradiť. Najnáročnejšie pre mňa osobne bolo stretnúť sa s pacientmi, ktorým covid zobral blízkeho, vtedy som strácal slová. Nevie sa doteraz vyrovnat s príbehmi, keď sa v DSS nakazili a umierali osamelí ľudia, ich nemé výčitky tu budú ešte veľmi dlho. Bol som šokovaný, ako počas prvej vlny separovali aj naše repro pacientky po ich úspešnom pôrode od ich detí. Z môjho pohľadu je matka a dieťa jedna neoddeliteľná bytosť minimálne do roka dieťaťa a separácia musí mať pre matku a dieťa nenapraviteľné škody na ich psychike. Náročné je aj v tomto období sledovať povzdychy pracovníkov DSS, ktorí žiadali o očkovanie klientov a pracovníkov

proti COVID-19 už v januári a namiesto zaočkovania sa niekedy v marci zamorili infekciou. Toto sú moje nočné mory.

Ako ovplyvnila pandémia COVID-19 diagnostiku a liečbu u alergikov či astmatikov, ktorí patria k ohrozenej skupine? Museli ste pristúpiť k selekcii pacientov, ktorí nutne potrebovali vašu pomoc?

Tu musím s radosťou povedať, že prevažná väčšina našich chronikov a astmatikov napriek infekcii COVID-19 zvládala pod dobrou liečbou ochorenie dobre, možno aj lepšie ako iná populácia. Práve telemedicina, možnosť komunikovať so sestrami či s lekármi cez náš portál, či telefonické konzultácie, e-recepty nám pomohli byť pri týchto pacientoch aj počas tohto obdobia. Nezriedka som odchádzal z práce okolo 21.30 večer. Mám však zásadu – neodísť od žiadnej závažnej nezodpovedanej otázky pacienta bez jej vybavenia. Tento prístup má aj väčšina kolegov.

Prichádza peľová sezóna a s ňou aj predpokladám vyššia miera návštevnosti pacientov vo vašej ambulancii. Čo by ste odporučili všetkým, ktorí toto obdobie zvládajú veľmi ťažko?

Aby dodržiavali rady lekára. Pacient má poznať svoju alergiu, svoje spúšťače ťažkých reakcií. Protialergické opatrenia, pravidelná medikácia, režimové opatrenia. Mám rád pacientov s aktívnym prístupom k svojmu zdraviu. Nielen zjesť tabletku a aplikovať si sprej, ale aj prepláchnutie nosa, dychové

cvičenia, primeraná fyzická aktivita a snaha o radosť zo života. Psychika a psychické zdravie ovplyvňujú nás všetkých, našich pacientov nevynímajúc. Nuž a keď je ozaj zle, nájsť oporu vo svojom lekárovi.

Prezradte nám na záver – ak práve neliečite pacientov, ako trávite voľný čas?

Tu som sa zamyslel. Až sa hanbím povedať, že od januára do polovice marca som nemal ani jeden víkend bez práce. Vyvrcholilo to, keď som po nedeľnom 11-hodinovom očkovaní proti COVID-19 nastúpil od pondelka do klasického ambulantného kolotoča a na konci týždňa mi telo povedalo dosť. My lekári vieme, že organizmus znesie veľa, ale potom si vypýta pozornosť. Často je upozornenie organizmu dosť nepríjemné. Odvtedy sa snažím zvoľniť a opäť som zaradil do svojho voľného času cvičenie, jogu, aspoň občasné prechádzky v prírode s manželkou, na chalupu saunujem, po saune si niekedy doprajem pohárik či dva červeného vína. Nevie sa sám donútiť k optimálnejšiemu kardio tréningu, na ktorý som bol zvyknutý. Teším sa na postcovidovú éru plnú spinningu, cvičenia v telocvični a hlavne na cestovanie. Napriek troške horkosti, ktorú zo svojho rozhovoru pociťujem, som nesmierne vďačný za svoju rodinu, ktorá mi je celé toto obdobie veľkou oporou, za skvelých kolegov v práci. Ďakujem aj osudu a dobe, v ktorej žijem, že ma donútila pozrieť sa na svet cez inú optiku. Naučil som sa väčšej pokore a menšiemu strachu, viem si vážiť predtým také bežné každodennosti.

Gyncare oslavuje svoje 20. narodeniny

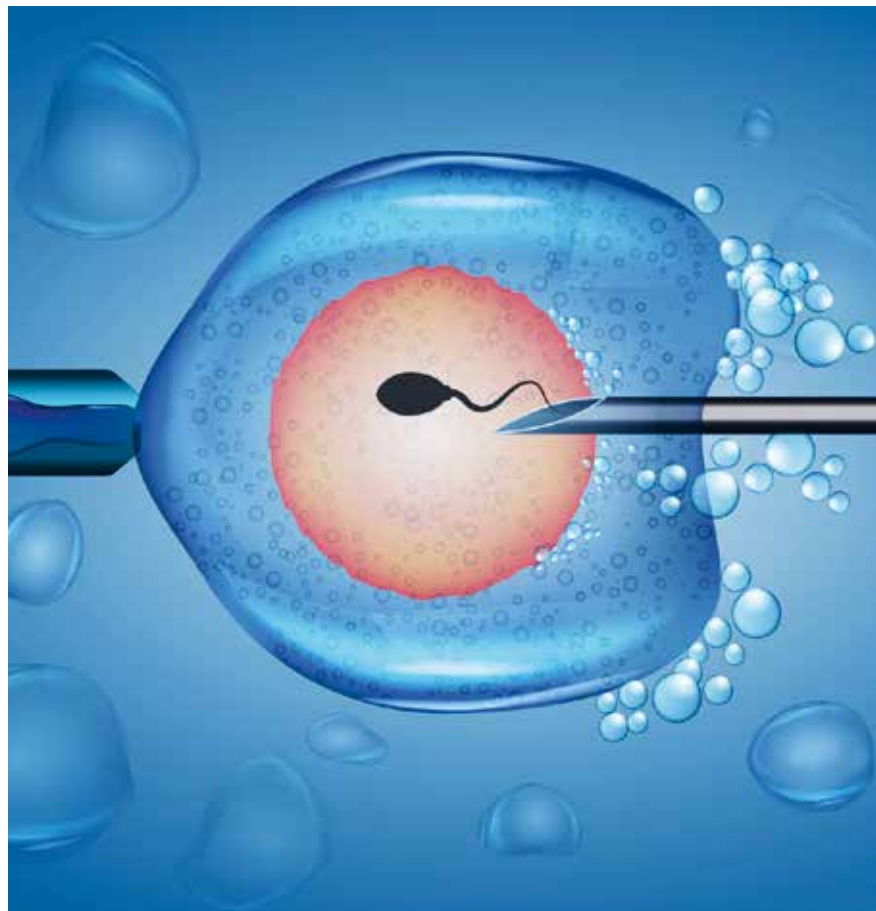
Prečítajte si zaujímavosti z jeho 20-ročnej úspešnej existencie.

Keď sa v júli 1978 narodila Louise Brownová – prvé narodené dieťa po in vitro fertilizácii na svete –, začala sa nová, lepšia éra asistovanej reprodukcie, ktorá čoskoro slávila jeden úspech za druhým. Priekopníci Patrick Steptoe a Robert Edwards tak zrazu dali reálnu šancu mať vlastné dieťa mnohým párom, ktoré dovtedy mohli o tom len snívať.

Samozrejme, malá Louise nebola prvým pokusom o bábätko po IVF. Dostupné zdroje uvádzajú, že predtým bolo viac ako 100 takýchto IVF cyklov neúspešných. Ak by sme to dali do naozaj veľmi zjednodušenej matematiky, tak od roku 1978, keď bola úspešnosť IVF 1 %, sme sa dostali k dnes reálnym takmer 60 %, ktoré väčšina kvalitných centier deklaruje. IVF sa tak stalo najúspešnejšou metódou liečby neplodnosti.

Začiatky asistovanej reprodukcie na Slovensku

O 10 rokov neskôr po Louise sa narodilo prvé dieťa po IVF v bývalom Československu – v Brne. Začiatkom 90. rokov sa začali budovať základy prvého Centra asistovanej reprodukcie na Slovensku, a to na II. gynekologicko-pôrodníckej klinike LF UPJŠ a FN LP na Moyzesovej ulici v Košiciach. V začiatkoch toto pracovisko veľmi úzko spolupracovalo s Univerzitou veterinárskeho lekárstva v Košiciach a jej Katedrou všeobecnej biológie, pretože v tom čase už bolo veľa skúseností s asistovanou reprodukciou u zvierat, a mnohé z nich boli veľmi dôležité pri zavádzaní asistovanej reprodukcie aj do klinickej praxe v humánnej medicíne. Klinická činnosť tohto pracoviska sa začala v roku 1994. V roku 1995 bola založená



Intracytoplazmatická injekcia spermie (ICSI).

kryobanka, a to vďaka spolupráci s odborníkmi z Veľkej Británie. Táto kryobanka na skladovanie spermií a embryí už v tom čase spĺňala európske kritériá. V roku 1995 bolo pracovisko uznané ako „celoštátne referenčné pracovisko asistovanej reprodukcie“. Ako prvé pracovisko na Slovensku tu začali používať mikromanipulačnú metódu intracytoplazmatickej injekcie spermie do oocyту (ICSI), čo umožnilo pomôcť neplodným párom aj v prípadoch ťažkej mužskej neplodnosti. Výsledkom bolo v roku 1995 narodenie prvého dieťaťa po ICSI na Slovensku, a to len necelé tri roky

po tom, čo sa po takejto forme oplodnenia oocyту narodilo prvé dieťa na svete.

Začiatkom 90. rokov sa začali budovať základy prvého Centra asistovanej reprodukcie na Slovensku, a to na II. gynekologicko-pôrodníckej klinike LF UPJŠ a FN LP na Moyzesovej ulici v Košiciach. Zakladateľom tohto centra asistovanej reprodukcie bol MUDr. Miroslav Herman, PhD., ktorý sa považuje za jedného zo zakladateľov asistovanej reprodukcie na Slovensku. A práve MUDr. Herman založil a otvoril v roku 2001 Centrum asistovanej

reprodukcie Gyncare v Košiciach, v ktorom dodnes aj pôsobí.

Gyncare bolo od začiatku jednotkou vo svojom odbore

Už v tom čase bolo Gyncare plne vybavené a ponúkalo všetky metódy, ktoré sa v tom čase v rámci asistovanej reprodukcie ponúkali vo svete. Medzi tieto metódy patrili klasická in vitro fertilizácia, priame oplodnenie vajíčka spermiou – intracytoplazmatická injekcia spermií ICSI, asistovaný hatching – narezanie obalu embrya pre jeho ľahšie uhniezdenie v maternici, predĺžená kultivácia embryí, chirurgický odber spermií, zmrazovanie embryí a spermií, intrauterinná inseminácia spermiami partnera alebo darcu.

V roku 2021 slávi Gyncare 20 rokov svojej existencie. Za tých 20 rokov však ani Gyncare, ani asistovaná reprodukcia nezaspali na vavrínoch. Hoci by sa mohlo zdať, že všetko dôležité bolo už v čase založenia centra vymyslené a odskúšané, nie je to tak. Asistovaná reprodukcia prešla za 20 rokov neskutočnú cestu a hoci už novinky nemajú také bombastické titulky, ako mala Louise Brownová, prinášajú párom stále vyššie a vyššie šance mať vlastné dieťa.

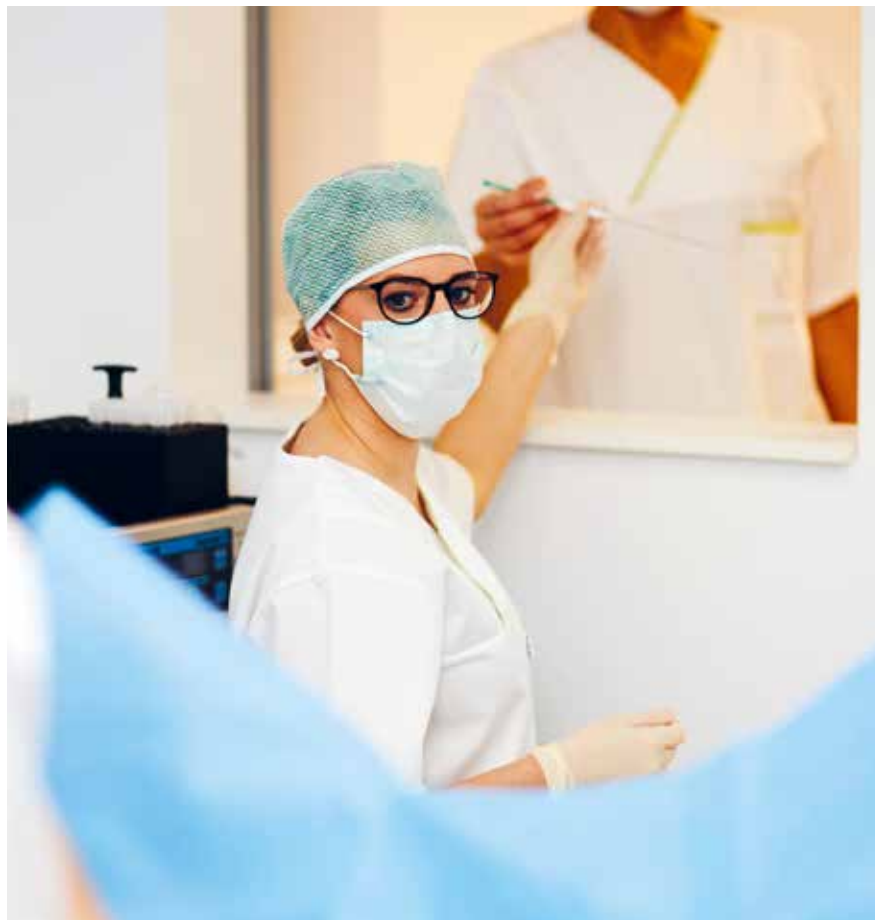
Čo môžeme považovať za najväčšie objavy na poli asistovanej reprodukcie za 20 rokov Gyncare?

Ultrazvuková diagnostika

Zvyšovanie kvality ultrazvukových prístrojov výrazne uľahčilo celý proces liečby v rámci in vitro fertilizácie. Vaginálny ultrazvuk (sonda zavádzaná pri vyšetrení do pošvy) umožnil presnejšie a jednoduchšie sledovanie vaječníkov počas hormonálnej stimulácie a odberu vajíčok cez pošvu. Nové ultrazvukové prístroje dokážu veľmi presne pomôcť stanoviť rezervu vaječníkov, prekrvenie maternice a jej sliznice, takmer samostatne vyhodnotiť reakciu vaječníkov na hormonálnu stimuláciu a celkovo veľmi výrazne uľahčiť liečbu.

Zjednodušená hormonálna stimulácia

Spočiatku bola hormonálna liečba v procese IVF liečby pre ženu komplikovaná a stresujúci proces. Na tomto poli došlo naozaj k závažnej zmene. Väčšina liekov sa dnes podáva vo forme podkožných injekcií,



Prenos embrya – embryo transfer.

čo je pre ženu podstatne jednoduchšie ako injekcie do svalov. Veľká časť liekov je už pripravená vo forme jednorazových injekcií alebo zásobníkových pier, čím odpadá stres z nesprávneho nariadenia liekov. Celá liečba je dnes už vysoko štandardizovaná, a tak zvyčajne stačia počas stimulácie vaječníkov 1 – 2 kontroly, pričom kedysi to boli aj tri vyšetrenia za týždeň. Zavedenie tzv. krátkého antagonistického protokolu u pomerne vysokého percenta pacientok znamená skrátenie hormonálnej liečby zo 4 – 5 týždňov na 8 – 10 dní. To je veľmi dôležité z hľadiska časových plánov aj všeobecného komfortu pacientky.

ICSI a selekcia spermií

Mikroinjekcia spermií znamená, že jednotlivé spermie sa injikujú do vajíčka pomocou špeciálneho upraveného mikroskopu. Táto technika otvorila nové možnosti vysokému percentu neplodných párov. Využíva sa vo väčšine prípadov mužskej neplodnosti, kde by len štandardné pridanie spermií viedlo k pomerne nízkej úspešnosti liečby, ale rovnako sa používa aj u žien vo vyššom

reprodukčnom veku, u žien s endometriózou, nevyšvetiteľnou neplodnosťou a pri zisku nízkeho počtu vajíčok. Tejto metóde sa však na druhej strane vyčíta, že sa ňou stráca prirodzený výber spermií a embryológ je tým človekom, ktorý rozhoduje o spermií použitej na oplodnenie. Preto sa počas posledných rokov do praxe zaviedlo množstvo selekčných metód, ktoré majú embryológom pomôcť vybrať optimálnu spermium, a párom tak pomôcť zvýšiť svoje šance na dieťa. Medzi tieto metódy patria ICSI preselektovanej spermií (PICSI), ICSI morfológicky optimálnej spermií (IMSI), a dnes asi najviac využívané proces magnetickej separácie spermií (MACS) a použitie mikrofluidných čipov (microfluid sperm sorting MSS). Je veľký predpoklad, že asistovaná reprodukcia sa bude smerom čo najlepšej selekcie spermií ešte chvíľu uberať a zlepšovať výsledky na tomto poli.

Prenos jedného embrya – single embryo transfer (SET)

Jasným dôkazom stúpajúcej úspešnosti IVF je dlhodobý pokles počtu prenásaných



Kultivačné médiá sú veľmi dôležité pre správny embryonálny vývoj.

embryí do maternice. Kým v začiatkoch Gyncare sme bežne prenášali do maternice 2 – 3 embryá, dnes je už takmer štandardom transfer jedného optimálneho embrya. Len veľmi zriedka do maternice prenášame dve embryá, a vždy by na to mal byť dôvod. Súhlasíme s tým napríklad pri opakovaní neúspešných transferoch, u pacientok vo vyššom veku, pri nie úplne optimálnom delení embryí a pod. Priemerný počet transferovaných embryí je však dlhodobo na čísle 1,2, čo znamená, že u absolútnej väčšiny pacientok transferujeme embryo jedno. Tým znižujeme riziko viacplodových tehotenstiev na minimum. Viacplodové tehotenstvá sa dnes už považujú za neúspech asistovanej reprodukcie. Pri transfere 2 embryí do maternice dochádza až v 25 % prípadoch k uhniezdeniu oboch embryí. Tehotenstvo s dvojčatami je oveľa rizikovejšie, je oveľa vyššie riziko predčasného pôrodu a tehotenských komplikácií, preto sa mu snažíme v maximálnej miere vyhýbať.

Kultivačné podmienky pre embryá

To, čo sa asi za 20 rokov zmenilo najviac, je práve to, čo je bežným očiam pacientov a verejnosti neviditeľné. A to sú kultivačné

podmienky pre embryá, ktoré sú veľmi dôležité pre proces oplodnenia a včasného delenia embryí po oplodnení, teda v čase, keď sa o nich starajú v laboratóriu naši embryológovia. V začiatkoch asistovanej reprodukcie museli embryológovia často pracovať „na kolene“. Dnes sú všetky tieto procesy štandardizované a riziko chyby je tak minimalizované.

Médiá sú špeciálne roztoky, v ktorých sa embryá kultivujú v laboratóriu. Sú obohatené množstvom látok, živín a rastových faktorov, ktoré sú veľmi dôležité pre včasný embryonálny vývoj. Dnes už centrá asistovanej reprodukcie nevyrábajú tieto médiá v domácej kuchyni, ale kupujú ich hotové od renomovaných firiem s certifikátom bezpečnosti. Kultivačné médium je veľmi dôležité pre embryonálny vývoj a patrí k najdôležitejším faktorom úspešnosti pracoviska. Pred 20 rokmi sme do maternice štandardne prenášali embryá na 2. alebo 3. deň po oplodnení. Laboratórne podmienky im už na ďalšie delenie nestačili. Dnešné médiá sú schopné zabezpečiť optimálne delenie embryí až do 6. dňa vývoja. Takáto predĺžená kultivácia embryí má výhodu najmä vtedy, ak máme

vyšší počet deliacich sa embryí. Veľká časť embryí sa totiž vo svojom delení zastaví práve medzi 3. a 4. dňom delenia, keď sa štartuje embryonálny genóm. Predĺžená kultivácia tak predchádza transferom embryí, ktoré by sa vo svojom delení spontánne zastavili a znižuje tak počet zbytočných embryo transferov.

Rovnako sa významne za 20 rokov existencie Gyncare zmenili aj inkubátory. Inkubátor je špeciálna komora, v ktorej sú podmienky (teplota, vlhkosť, tlak plynov) podobné ako v tele ženy. Kedysi sa používali veľké skriňové inkubátory, v ktorých boli uložené vo vlastných mištičkách embryá všetkých pacientov. Dnes už takmer štandardne používame komorové inkubátory, v ktorých má každý pár špeciálnu komoru pre svoje embryá. Výhodou je v tomto prípade to, že inkubátor sa otvára len vtedy, keď embryológ potrebuje skontrolovať delenie embryí daných pacientov. V inkubátore sú tak stabilnejšie podmienky a menšie výkyvy. Úplne najvyšším radom inkubátorov sú inkubátory s kamerou. Tá nám každých 20 – 30 minút urobí fotografiu každého jedného embrya a počítač tieto fotografie

zloží do videoslučky. Pre embryá z toho vyplývajú dve základné výhody. Jednak ich celý čas kultivácie nemusíme vôbec z inkubátora vyberať a jednak si vie embryológ spätne vyhodnotiť delenie každého jedného embrya a vybrať na transfer to najlepšie.

Skladovanie zmrazených embryí

Jedným z hlavných míľnikov asistovanej reprodukcie bol rozvoj mraziacich techník. Práve mrazenie prinieslo možnosti elektívnych transferov jedného embrya, odložených transferov pri riziku hyperstimulačného syndrómu, predimplantačnej genetickej diagnostiky, zachovania plodnosti u onkologických pacientov, ale napríklad aj social freezingu (mrazenia vajíčok u žien, ktoré odkladajú tehotenstvo z akýchkoľvek dôvodov). Dnes je úspešnosť transferov rozmrazených embryí rovnaká ako úspešnosť čerstvých transferov. U niektorých kategórií pacientov dokonca aj vyššia. Vo väčšine prípadov mrazíme bunky a embryá procesom rýchleho mrazenia – vitrifikácie.

Predimplantačná genetická diagnostika

Genetika všeobecne za posledných 20 rokov napredovala naozaj výrazne. A týka sa to aj genetiky v rámci IVF. U embryí pred ich prenosom do maternice sme schopní priamo vyšetriť nielen počet chromozómov, ale v podstate každé genetické ochorenie, ktoré sa v rodine pacientov vyskytuje. Vyšetrenie počtu chromozómov má svoj význam u pacientov s opakovaným zlyhaním uhniezdenia embryí v maternici, u pacientok vo vyššom veku, keď sú už tieto tzv. aneuploidie oveľa častejšie, ale napríklad aj u mladých pacientok pri opakovaných spontánných potratoch. Po špecifických problémoch (translokácie, mutácie) zase pátrame u tých pacientov, u ktorých sa daný genetický problém potvrdil u jedného z rodičov.

Je niečo, čo sa za 20 rokov zhoršilo?

Aby sme neboli len takí pozitívni, tak bohužiaľ, áno. Počas uplynulých 20 rokov sa výrazne zhoršilo vekové zloženie pacientok centier reprodukčnej medicíny – teda aj Gyncare. Kým pacientky po 40. roku veku boli kedysi vysoko zriedkavé, dnes tvoria viac ako 25 % pacientok nášho pracoviska. Nie sú zriedkavosťou ani pacientky okolo 50. roku veku. Asistovaná reprodukcia však nie je liekom na vek.



Mrazenie zárodočných buniek.

Kým do 40. roku života ženy je úspešnosť asistovanej reprodukcie pomerne vysoká, po štyridsiatke už veľmi rýchlo klesá. V tomto veku je úspešnosť liečby s vlastnými vajíčkami niekde okolo 15 %. Po 43. roku života sme niekde na hranici 7 % a po 45. roku života ženy sa úspešné tehotenstvá po IVF celosvetovo opisujú naozaj len vo forme kazuistik. Tento trend vedie k tomu, že v posledných rokoch priemerná úspešnosť IVF stagnuje, dokonca aj trochu klesá. Vo vyšších vekových kategóriách pacientov sme preto často odkázaní na použitie darcovských vajíčok a percento cyklov s darovanými vajíčkami nám stále narastá.

Práve preto odborníci na reprodukčné zdravie v posledných rokoch opakovane pripomínajú, že ak žena nemá podmienky na to, aby mala deti v optimálnom veku, mala by myslieť na možnosť úschovy vlastných vajíčok pre budúce použitie – tzv. social freezing.

Možnosti asistovanej reprodukcie sú v súčasnosti naozaj veľké. Centrum Gyncare je hrdé na to, že vieme pomôcť mať vlastné dieťa viac ako 90 % všetkých neplodných párov, ktoré k nám so svojím problémom prídu. A aj keď táto cesta nie je vždy ani ľahká, ani krátka, náš spoločný cieľ – zdravé bábätko – za to stojí.

Práca na imunológii je trpezlivá, precízna a každý deň iná

RNDr. Marcela Popovňáková pracuje v Centrálnom laboratóriu Medirex v Košiciach, kde odborne dohliada na chod imunologického laboratória. V rozhovore sme zisťovali, ako jej imunológia prirástla k srdcu a bez čoho si nevie prácu predstaviť. Priblížila tiež, čím sa zaoberajú na imunologickom pracovisku v Košiciach a do akej miery je nevyhnutná spolupráca s lekármi.

Imunológii sa venujete už viac ako 20 rokov. Prezradte nám, čím vám tento odbor učaroval?

Práca v imunologickom laboratóriu si vyžaduje veľkú trpezlivosť a zodpovednosť. Každý deň však prináša niečo nové, prekvapujúce a zaujímavé, čo ma nesmierne obohacuje a motivuje k lepšiemu výkonu. Možnosť vzdelávať sa a získavať praktické skúsenosti v tejto oblasti majú pre mňa neoceniteľný význam. Za každou skúmvkou sa totiž skrýva reálny človek, ktorému výsledky vyšetrenia môžu zmeniť život. Bude to znieť ako fráza, ale moja práca je zároveň aj mojím koníčkom.

Laboratóriá Medirex poskytujú komplexnú laboratórnu diagnostiku. Priblížte nám, čím všetkým sa zaoberáte v Centrálnom laboratóriu v Košiciach na oddelení klinickej imunológie a alergológie?

Na oddelení klinickej imunológie a alergológie sledujeme poruchy imunitného systému na úrovni špecifickej a nešpecifickej imunity, sledujeme imunofenotypové znaky buniek a ich patologické odchýlky, imunodeficientné stavy pacientov. Veľkú skupinu vyšetrení tvoria diagnostika autoimunitných ochorení, diagnostika antifosfolipidového syndrómu, porúch na úrovni non IgE potravinových reakcií, celiakie, stanovenie alergén špecifických IgE protilátok u pacientov s alergiami. Taktiež sa venujeme aj diagnostike porúch v rámci reprodukčnej imunológie. Práca na imunológii je trpezlivá a zodpovedná kombináciou manuálnych metód a prístrojovej

techniky. Neustále sledujeme nové trendy a zavádzame ich do praxe. Skĺznuť do rutiny a stereotypu nehrozí, keďže stále je potrebné vzdelávať sa.

Technologické vybavenie je už dnes pre laboratórium nevyhnutnosťou. S akými prístrojmi pracujete na vašom oddelení a v čom vidíte ich hlavné prínosy? Dá sa predpokladať, že v budúcnosti nahradia prístroje prácu ľudí?

Na úseku prietokovej cytometrie sú to hlavne prietokové cytometre. Vybavení sme ELISA analyzátormi, analyzátormi

na prípravu vzoriek na vyšetrenie autoprotilátok, nechýbajú fluorescenčný mikroskop, nefelometer, analyzátory na stanovenie alergén špecifických IgE protilátok. Všetko sú to najmodernejšie typy analyzátorov, ktoré sa bez práce s ľuďmi nezaobídu. Potrebujú pravidelnú údržbu, personál ich naplní potrebnými reagentami. Prístroje vyžadujú nastavenie podľa aktuálnych potrieb, a to samy nezvládnu. Práca v imunologickom laboratóriu si vyžaduje stálu prítomnosť personálu pri analyzátoroch a sledovanie, či svoju úlohu vykonávajú správne a v prípade potreby vieme hneď zasiahnuť. Uľahčujú nám prácu



v laboratóriu pri spracovaní veľkého počtu vzoriek a bez takéhoto vybavenia si už prácu v laboratóriu neviem ani predstaviť. Keďže pracujú nonstop, niekedy si zaslužia pohladenie a pochvalu. Takže nie, nemyslím si, že by v budúcnosti prácu ľudí nahradili.

Keď sme pri ľuďoch, ako sa vám spolupracuje s kolegami na oddelení? Utkvel vám v pamäti zaujímavý prípad z praxe, na ktorom ste spoločne pracovali?

Som veľmi rada, že máme na oddelení skvelý tím ľudí. Pracujú so zameraním, s ochotou a trpezlivosťou a všetkých nás to nesmierne baví. Samozrejme, denne spolupracujeme aj s kolegami z iných odborov, ako sú biochémia, hematológia, genetika, sérológia, patológia. Bez toho to nejde a často spolupracujeme, či už pri vyhľadávaní výsledkov, konzultácii, doordínovaní vyšetrení, alebo vyhľadávaní vzoriek. Je fascinujúce sledovať, ako sa postupne uzatvárajú výsledky vyšetrení pacienta z jednotlivých odborov.

Z mojej praxe si pamätám prípad, keď sme spolu s kolegami z biochémie pomohli odhaliť onkologický proces v organizme pacienta na základe pozitívity onkoneurónálnych protilátok. Lekári tak cielene pátrali po odhalení nádoru a včas začali liečbu.

V súčasnosti existuje diapazón ochorení súvisiacich s poruchami imunity, alergiami či reprodukčnými problémami. Ktoré z palety poskytovaných vyšetrení v tomto období najčastejšie vyšetrujete?

V tomto období najčastejšie vyšetrujeme pacientov s poruchami autoimunity v oblasti reumatológie, gastroenterológie, neurológie. Prvotný fluorescenčný obraz ďalej rozdeľujeme na drobné špecifické antigény zodpovedné za prebiehajúci autoimunitný proces. Pribúda párov s poruchami reprodukcie, onkohematologických pacientov, ale aj pacientov s alergiami a potravinovými intoleranciami. Je to pravdepodobne daň za životný štýl, stravovacie návyky.

Aký je priemerný počet vzoriek, ktoré denne vyšetrite na vašom oddelení?

Denne vyšetříme približne 350 – 400 vzoriek. Je to, samozrejme, individuálne. Každý deň je iný. Za každou skúmkou vidíme pacienta a kompletizácia jedného výsledku sa skladá z mozaiky viacerých

testov, ktoré sa postupne analyzujú. Možno sa to číslo môže zdať niekomu nízke, ale sú za tým ďalšie testy, trpezlivosť a precízna práca.

Z rozhovoru s MUDr. Lešťanom sme sa dozvedeli o nevyhnutnosti dodržania trojuholníka lekár – pacient – laboratórium. Ako v praxi vyzerá vaša spolupráca s lekárom?

Denne komunikujem s našimi lekármi, či už pri doordínovaní vyšetrení, konzultácii, alebo klinickej interpretácii. Informujem lekárov o novinkách, ktoré momentálne zavádzame. Pri patologických výsledkoch ihneď informujem lekárov. S niektorými lekármi veľmi intenzívne participujem aj na štúdiách a projektoch. Denne prijímame podnety z praxe aj pri zavádzaní nových vyšetrení. Veľmi úzko spolupracujem v rámci reprodukčnej imunológie s našimi reprodukčnými imunológmi pri konzultácii výsledkov vyšetrení.

Jednou z oblastí, ktorým sa venujete, je reprodukčná imunológia. Zameriavate sa na komplexnú diagnostiku imunologických porúch plodnosti u žien aj u mužov. Prosím, opíšte nám, čo najčastejšie skúmate.

V súčasnosti zaznamenávame celosvetový nárast párov s poruchami plodnosti. Hľadáme príčinu týchto problémov na úrovni porúch imunitného systému. Tých oblastí je niekoľko. Jednou z nich môžu byť prebiehajúci autoimunitný proces, neliečená celiakia, tvorba antifosfolipidových protilátok. Poruchy identifikujeme na strane muža a ženy. Skúmame, akým smerom sa uberá typ imunitnej odpovede u ženy na základe tvorby intracelulárnych cytokínov. Bližšie rozoberáme kvalitu ejakulátu.

Koncentrácia zohráva vo vašej práci významnú úlohu. Čo vám pomáha pri uvoľnení mysle? Ako relaxujete?

Práca na imunológii je trpezlivá, precízna a každý deň iná, vyžaduje plné sústredenie. Koncentráciu hľadám a nachádzam v prírode, na celoročnej turistike, pri športe – bicyklovaní, lyžovaní, plávaní. Neodmysliteľnou súčasťou môjho relaxu je hudba, ale aj stretnutie s príjemnými a pozitívnymi ľuďmi.



RNDr. Marcela Popovňáková

nastúpila po ukončení štúdia na Prírodovedeckej fakulte UPJŠ v Košiciach na Klinikum UNLP Košice, kde sa v imunologickom laboratóriu venovala diagnostike liekových alergií a bulózných dermatóz. Neskôr absolvovala špecializáciu na Slovenskej postgraduálnej akadémii v Bratislave v odbore vyšetrovacie laboratórne metódy v imunológii a naďalej sa venovala práci v imunologickom laboratóriu a tiež na oddelení klinickej biochémie UNLP v Košiciach. V roku 2006 nastúpila do LABMED-u (terajšieho Medirexu), kde s kolegami vybudovali imunoalergologické laboratórium. V súčasnosti pôsobí ako manažérka klinickej imunológie a alergológie v Medirexe pre východné Slovensko.

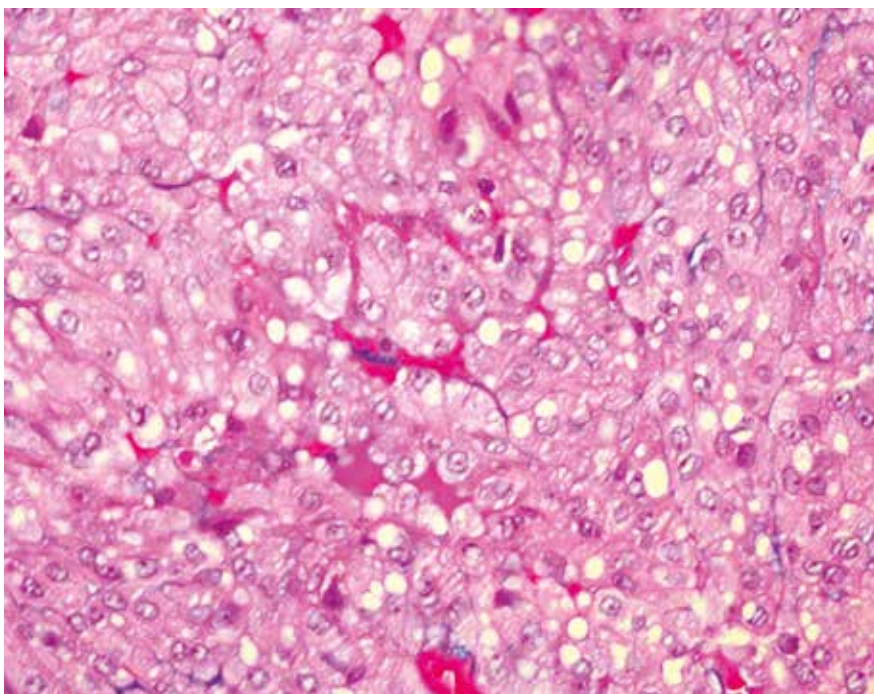
Sekrečný karcinóm malej slinnej žliazky tvrdého podnebia ústnej dutiny – case report

OPIS PRÍPADU

36-ročný pacient asi 6 mesiacov pozoroval postupný rast útvaru tvrdého podnebia. Na dentoalveolárnej chirurgii útvar extirpovaný in toto.

VYPRACOVAL

MUDr. Peter Bohuš
Medicyt, s. r. o.



Špeciálne farbenie Alcian blue/PAS.

Úvod

Podľa WHO (SZO) klasifikácie nádorov hlavy a krku je sekrečný karcinóm (secretory carcinoma) stručne charakterizovaný ako karcinóm slinných žliaz všeobecne s nízkym stupňom malignity, ktorý morfológicky pripomína sekrečný karcinóm prsníka (mammary secretory carcinoma) a je charakterizovaný fúziou génov ETV6-NTRK3. Ako synonymum sa často používa výraz mammary analogue secretory carcinoma (MASC).

Makroskopický opis

Na bioptické vyšetrenie zaslaná bledohnedá slizničná vyvýšenina s priemerom cca 5 mm.

Mikroskopický opis

Zachytený pomerne expanzívny novotvar tvorený mierne atypickými, neostro ohraničenými polygonálnymi bunkami s granulárnou eozinofilnou a vakuolizovanou cytoplazmou, s oválnymi a okrúhlymi jadrami miestami s jadierkami. Sú prítomné len celkom ojedinelé mitózy s absenciou atypických foriem. Nádorové bunky rastú solidne a mikrocysticky. Nie sú prítomné nekrózy, nie je výraznejšia nádorová dezmozplázia.

V špeciálnom farbení Alcianová modrá/PAS neidentifikujeme zymogénne granuly, zachytené sú nápadnejšie extracelulárne i intracelulárne sekrécie vykazujúce pozitívnu reakciu.

Imunohistochemické vyšetrenie:

Nádorové bunky vykazovali výraznú pozitívnu expresiu s protilátkami SOX10, CK7, S100, CEA a vimentin

Fokálna pozitívna expresia:

GATA3

Slabá ojedinelá pozitívna expresia:

GCDFP, CK14, DOG1

Proliferačný index Ki 67:

cca 5 – 10 %

Bez expresie:

p63

Prípado sme predbežne uzavreli ako sekrečný karcinóm (MASC – mammary analogue secretory carcinoma), pričom v diferenciálnej diagnostike sme zvažovali aj acinic cell carcinoma a onkocytický tumor.

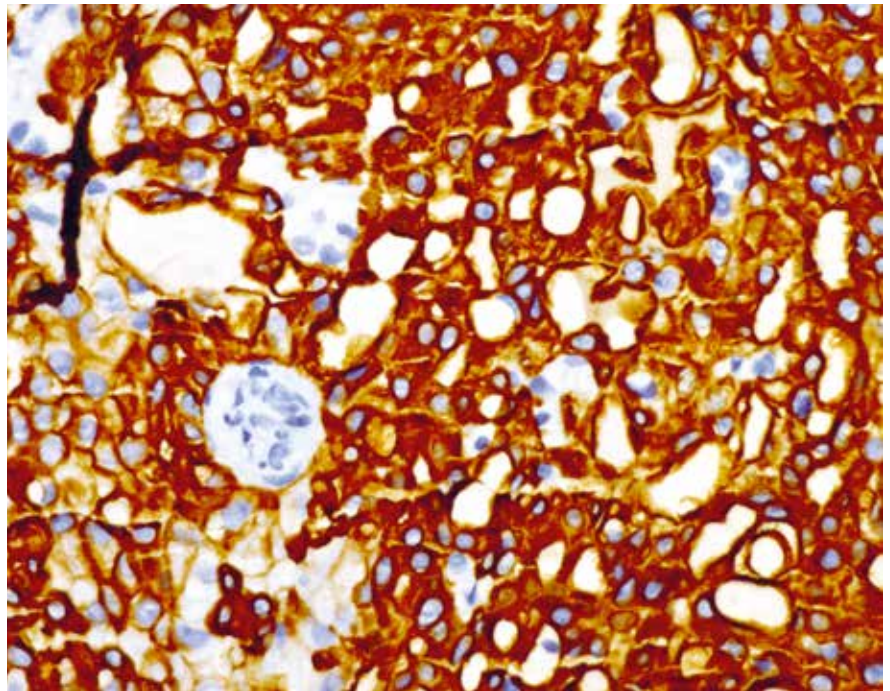
Následne sme materiál zaslali na konzultatívne vyšetrenie prof. MUDr. A. Skálovej, CSc., Bioptická laboratoř, s.r.o., Plzeň. Z konzultatívneho pracoviska potvrdili diagnózu sekrečný karcinóm malej slinnej žľazky podnebia ústnej dutiny. Pri diagnostike v laboratóriu patológie využili aj metódu fluorescenčnej in situ hybridizácie (FISH), ktorou detekovali zlom génu ETV6.

Záver

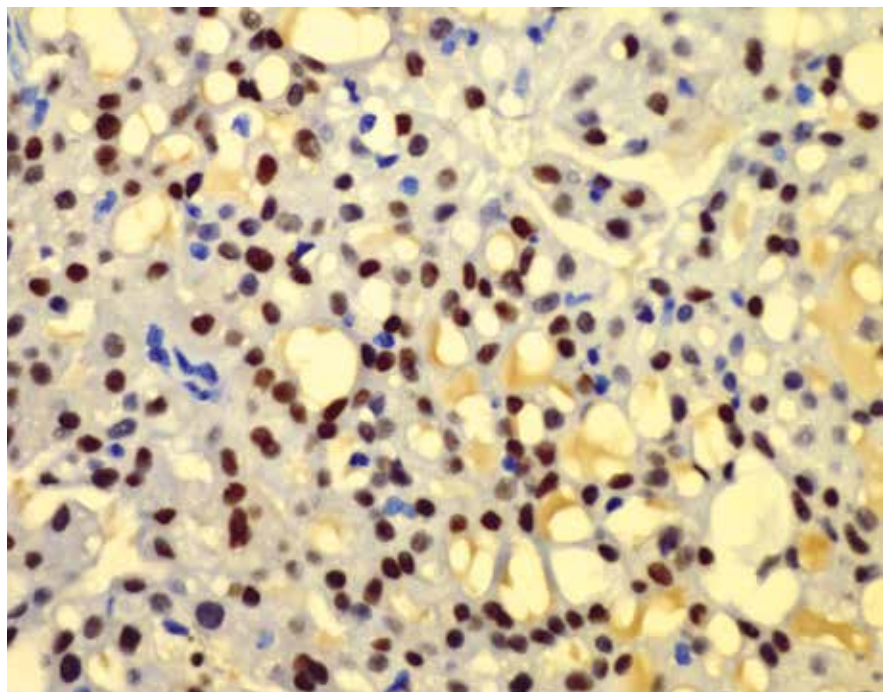
Sekrečný karcinóm malej slinnej žľazky tvrdého podnebia ústnej dutiny (M-8502/3)

Diskusia

Sekrečný (sekretorický) karcinóm patrí medzi vzácne karcinómy slinných žliaz. Prvýkrát bol opísaný v roku 2010 ako MASC (mammary analogue secretory carcinoma), pričom sekrečný karcinóm ako taký bol prvýkrát opísaný v roku 2008 ako nový druh karcinómu prsníka. Sekrečný karcinóm slinných žliaz bol do WHO klasifikácie tumorov zaradený v 4. edícii z roku 2017 ako „secretory carcinoma“.



Imunohistochemické farbenie CK7 – pozitívna expresia.



Imunohistochemické farbenie GATA3.

Okrem prsníka a slinných žliaz bol sekrečný karcinóm veľmi opísaný aj v iných lokalitách – horné dýchacie cesty, štítna žľaza, koža.

Sekrečný karcinóm slinných žliaz bol v minulosti diagnostikovaný najčastejšie ako karcinóm z acinárných buniek (acinic

cell carcinoma), najmä ako tzv. zymogen poor variant, ďalej ako mukoeptidermoidný karcinóm s nízkym stupňom malignity (low-grade mucoepidermoid carcinoma) a ako bližšie nešpecifikovaný adenokarcinóm (adenocarcinoma NOS). Najčastejšie sa vyskytuje v príušnej žľaze

(70 %), ďalej na perách, tvrdom podnebí a v podsánkovej žľaze. V diferenciálnej diagnostickej sekréčného karcinómu slinných žliaz do úvahy prichádza vzhľadom na výraznú morfológickú podobnosť karcinóm z acinárných buniek, kde sa na úrovni svetelnej mikroskopie opierame okrem iného o prítomnosť/neprotomnosť bazofilných PAS+ zymogénnych intracytoplazmatických granúl a na mierne odlišný imunohistochemický profil (najmä: S100, mammoglobín, vimentín, DOG1). Pri sekréčnom karcinóme je (oproti karcinómu z acinárných buniek) častejší výskyt u mužov a častejšia extraparotická lokalita. V súčasnej biopтической diagnostike je zlatým štandardom aj potvrdenie špecifickej cytogenetickej charakteristiky t(12; 15) (q13;q25): ETV6-NTRK3 translokácia s fúziou génov ETV6-NTRK3, demonštrovaná buď vyšetrením FISH, alebo PCR. Fúzia génov ETV6-NTRK3 nebola opísaná pri inom karcinóme slinnej žľazy. Recentne boli veľmi vzácné opísané aj iné fúzie partneri ETV6.

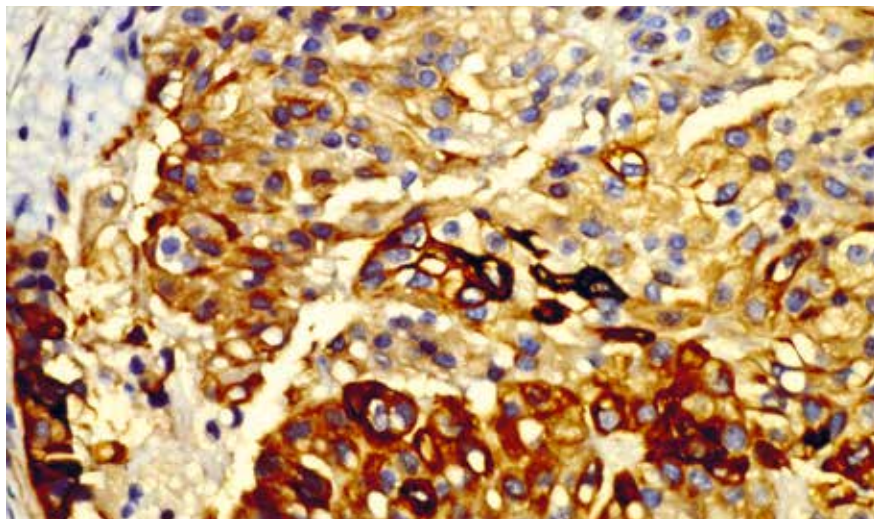
Dôležitosť molekulovo-biologického vyšetrenia je umocnená možnosťou cieľenej liečby NTRK inhibítormi (larotrectinib, entrectinib).

Do roku 2019 bolo opísaných 63 prípadov sekréčného karcinómu malých slinných žliazok.

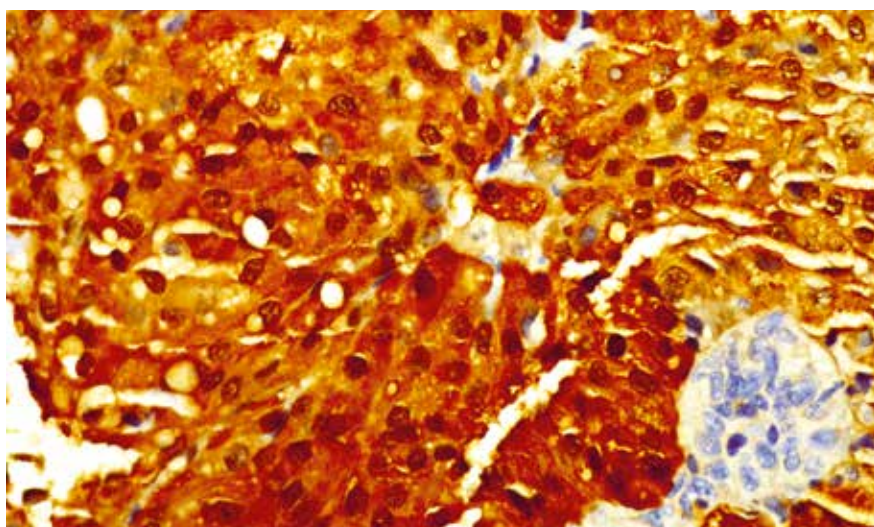
Zhrnutie

Sekrečný karcinóm slinných žliaz je vzácny primárny novotvar slinných žliaz. Najčastejšie bol (a stále je) nesprávne diagnostikovaný ako karcinóm z acinárných buniek.

Vyžaduje charakteristický cytogenetický profil s následnou fúziou génov, čo je nielen diagnostickým, ale aj prípadným prediktívnym, resp. terapeutickým znakom. Tento fakt zdôrazňuje skutočnosť, že v modernej dobe patria molekulovo-biologické vyšetrenia vykonávané z formolom fixovaného tkaniva zaliateho do parafrínových blokov do gescie laboratória patológie.



Imunohistochemické farbenie CK14.



Imunohistochemické farbenie S100 – kľúčové v tomto prípade.

Literatúra

1. WHO Classification of Head and Neck Tumours, 4th edition 2017.
2. WHO Classification of Tumours – Breast Tumours, 5th edition 2018.
3. Am J Surg Pathol 2010 May 34(5):599-608 mammary analogue secretory carcinoma of salivary glands, containing the ETV6-NTRK3 fusion gene: a hitherto undescribed salivary gland tumor entity (Skálová A, Vanecek T, Sima R, Laco J, Weinreb I, Perez-Ordóñez B, Starek I, Geierova M, Simpson RH, Passador-Santos F, Ryska A, Leivo I, Kinkor Z, Michal M.).
4. Case Rep Pathol. 2019; 2019: 2074504. Published online 2019 Mar 27. doi: 10.1155/2019/2074504 Secretory Carcinoma of Minor Salivary Gland in Buccal Mucosa: A Case Report and Review of the Literature (Durga Paudel, 1 Michiko Nishimura, 1 Bhoj Raj Adhikari, 1 Daichi Hiraki, 1 Aya Onishi, 1 Tetsuro Morikawa, 1 Puja Neopane, 1 Sarita Giri, 2 Koki Yoshida, 1 Jun Sato, 1 Masayuki Ono, 3 Yoshitaka Kamino, 3 Hiroki Nagayasu, 4 and Yoshihiro Abikoko).
5. Mod Pathol 2014 Jan;27(1):30-7. doi: 10.1038/modpathol.2013.84. Epub 2013 Jun 28 Searching for mammary analogue [corrected] secretory carcinoma of salivary gland among its mimics Andre Pinto 1, Vania Nosé 2, Claudia Rojas 1, Yao-Shan Fan 1, Carmen Gomez-Fernandez 1.

Peptest

KLINICKÝ VÝZNAM

Refluxná choroba je spätný tok žalúdočných kyselín cez zvierač v hornej časti žalúdka do pažeráka, často aj do dýchacích ciest, kde následne spôsobuje celý rad príznakov. Reflux je civilizačná choroba, medzi príčiny jeho vzniku sa zaraďujú zlé stravovacie návyky, alkohol, užívanie niektorých liekov proti bolesti, stres a životný štýl všeobecne.

Gastroezofageálny reflux (GERD) je známy tým, že spôsobuje pálenie záhy a regurgitáciu. O laryngofaryngeálnom refluxe (LPR) hovoríme vtedy, keď obsah žalúdka zateká do hltana a hrtana a poškodzuje dýchacie cesty. Medzi príznaky LPR patria bolesti v krku, chronický kašeľ, zmeny hlasu, chrapot, astma a bolesti uší.

Reflux môže byť nebezpečný, lebo keď nedôjde k včasnej diagnóze a liečbe, môže dôjsť k poškodeniu pažeráka. V niektorých prípadoch je reflux pôvodcom rakoviny hrtana.

Peptest je nový, presný a neinvazívny test slín na dôkaz refluxu. Test je založený na meraní koncentrácie enzýmu – pepsínu v slinách. Pepsín v žalúdku štiepi bielkoviny a keď sa nachádza mimo žalúdka, tak človek trpí refluxom. Meraním presnej koncentrácie pepsínu v slinách vieme stanoviť závažnosť refluxu a sledovať úspešnosť liečby.

INDIKÁCIA:

- Gastroezofageálny reflux (GERD).
- Laryngofaryngeálny reflux (LPR).

INDIKAČNÉ OBMEDZENIA:

Bez indikačných obmedzení, vyšetrenie len v samoplacovskom režime, cena 45 €.

PREDANALYTICKÉ INFORMÁCIE:

Odberová skúmavka na spútum s kyselinou citrónovou, odber nalačno alebo do 15 minút od príznakov refluxu, dopraviť do laboratória (oddelenie klinickej imunológie) pri 2 – 8 °C v deň odberu štandardným zvozom.

POSTUP ODBERU:

1. 48 hodín pred odberom vzorky nekonzumovať alkalickú vodu, antacidy a lieky s obsahom alginátov (napr. Gaviscon).
2. 30 minút pred odberom vzorky nekonzumovať sytené nápoje, nápoje s obsahom kofeínu a nefajčiť.
3. Odkášlite si a naplňte odberovú skúmavku odkášanými slinami/spútum. U detí sliny zbierajte pomocou Pasteurovej pipety z ústnej dutiny.
4. Postup opakujte, kým skúmavku nenaplníte po rysku (1 ml). Treba prísne dodržať pomer sliny/kyselina citrónová!
5. Odberovú skúmavku dôkladne pretrepte.
6. Vyplňte žiadanú IMZ alebo IMR a materiál označte čiarovým kódom.

7. Materiál treba dopraviť do laboratória (oddelenie klinickej imunológie) pri 2 – 8 °C v deň odberu štandardným zvozom.

MATERIÁL:

Sliny, spútum

INTERFERENCIA:

–

NÁZOV VYŠETRENIA:

Peptest

SKRATKA A SYNONYMUM:

Peptest

JEDNOTKA:

ng/ml

DOSTUPNOSŤ VYŠETRENIA:

Denne, výsledky do 1 týždňa
Centrálné laboratórium Bratislava

PRINCÍP STANOVENIA:

In vitro rýchlostest s obsahom 2 monoklonových protilátok pepsínu

REFERENČNÉ HODNOTY:

0 ng/ml – negatívny výsledok

16 ng/ml – minimálna hladina pepsínu – odporúčame zmenu životosprávy a test opakovať o 12 mesiacov

75 ng/ml – nízka hladina pepsínu – odporúčame zmenu životosprávy a test opakovať o 6 mesiacov

125 ng/ml – stredná hladina pepsínu – odporúčame liečiť symptómy a test opakovať o 3 mesiace

> 200 ng/ml – vysoká hladina pepsínu – prítomná patologická forma refluxu, pacient vyžaduje liečbu a monitoring

VYPRACOVALI:

Medirex, a.s.: **Mgr. Kinga Szabóová**, manažér klinickej imunológie a alergológie Medirex, a.s., pre západné Slovensko

Medirex, a.s.: **RNDr. Marcela Popovňáková**, manažér klinickej imunológie a alergológie Medirex, a.s., pre východné Slovensko

KONTAKT:

+ 421 908 297 713, kinga.szaboova@medirex.sk
+ 421 918 824 811, marcela.popovnakova@medirex.sk

Peptest

Literatúra:

1. Hayat JO, Gabieta-Somnez S, Yazaki E, Kang, et al (2014). Pepsin in saliva for the diagnosis of gastro-oesophageal reflux disease. *Gut* (doi:10.1136/gutjnl-2014-307049).
2. Yuksel ES, Hong S-KS, Strugala V, et al (2012). Rapid salivary pepsin assay: blinded assessment of test performance in GERD. *Laryngoscope*. **122** (6): 1312–1316.
3. Strugala V, McGlashan JA, Watson MG, et al (2007). Evaluation of a non-invasive pepsin dipstick test for the diagnosis of extra-oesophageal reflux – results of a pilot study. *Gastroenterology*. **132** (4 (Suppl 2)): A99–A100.
4. Bardhan KD, Strugala V, Dettmar PW (2012). Review article. Reflux revisited: advancing the role of pepsin. *Int J Otolaryngol* (doi:10.1155/2012/646901).
5. Bredenoord AJ, Pandolfino JE, Smout AJPM (2013). Gastro-oesophageal reflux disease. *The Lancet*. **381** (9881): 1933–1942.
6. Nice G (2004). Dyspepsia: managing dyspepsia in adults in primary care. *CG17*.
7. Watson MG (2011). Review article: laryngopharyngeal reflux – the ear, nose and throat patient. *Aliment Pharmacol Ther*. **33** (Suppl 1): 53–57.
8. Altman KW, Prufer N, Vaezi MF (2011). A review of clinical practice guidelines for reflux disease: toward creating a clinical protocol for the otolaryngologist. *Laryngoscope*. **121** (4): 717–723.
9. Koufman JA (1991). The otolaryngologic manifestations of gastroesophageal reflux disease (GERD): a clinical investigation of 225 patients using ambulatory 24-hour pH monitoring and an experimental investigation of the role of acid and pepsin in the development of laryngeal injury. *Laryngoscope*. **101** (4 Pt 2 Suppl 53): 1–78.
10. Ludemann JP, Manoukian J, Shaw K, et al (1998). Effects of simulated gastroesophageal reflux on the untraumatized rabbit larynx. *J Otolaryngol*. **27** (3): 127–131.
11. Karkos PD, Wilson JA (2006). Empiric treatment of laryngopharyngeal reflux with proton pump inhibitors: a systematic review. *Laryngoscope*. **116**: 144–148.
12. McGlashan JA, Johnstone LM, Strugala V, Dettmar PW (2009). The value of a liquid alginate suspension (Gaviscon Advance) in the management of laryngo-pharyngeal reflux. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. **266** (2): 243–251.
13. Strugala V, Dettmar PW (2010). Alginate in the treatment of extra-oesophageal reflux. In *Effects, Diagnosis and Management of Extra-Esophageal Reflux*. Johnson, N. & R. J. Toohill, Eds.: 145–156. Nova Science Publishers Inc. New York.

SARS-CoV-2 – COVID-19 protilátky IgA, IgM, IgG

KLINICKÝ VÝZNAM

Koronavírus SARS-CoV-2 spôsobuje ochorenie COVID-19. Infekcia týmto vírusom sa prejavuje od bezpríznakového priebehu cez mierne symptómy, horúčku, kašeľ, dýchacie ťažkosti, únavu, kožné prejavy až po respiračné zlyhanie s následkom smrti. Vysoko rizikovými skupinami na ťažší priebeh ochorenia sú seniori a ľudia s vážnymi základnými ochoreniami, ako sú chronické pľúcne ochorenia, ochorenia srdcovocievneho systému, obličiek, pečene, cukrovka, obezita a imunosuprimovaní pacienti. Dôkaz protilátok sa neodporúča používať na stanovenie aktívnej infekcie. Tvorba protilátok trvá typicky od 1 do 3 týždňov od infekcie vírusom SARS-CoV-2. U niektorých jedincov môže byť tvorba protilátok časovo dlhšia ako v typických prípadoch. Nie je známa protektívna hladina protilátok pred reinfekciou. Klinický význam stanovenia spočíva skôr v dodatočnom dohľadaní jedincov s asymptomatickým, prípadne atypickým priebehom ochorenia, alebo kontroly prítomnosti neutralizačných protilátok.

K dispozícii sú dva typy testov:

1. ELISA (enzýmová imunoanalýza) – deteguje prítomnosť protilátok proti nukleokapsidovému N proteínu, ktorý sa nachádza pod obalom vírusu. Jeho prítomnosť sa vyskytuje iba u ľudí po prekonaní infekcie SARS-CoV-2, prípadne u pacientov očkovaných celoviriónovou vakcínou (oslabený vírus).
2. CLIA (chemiluminiscencia) – deteguje prítomnosť protilátok proti S1 a S2 proteínu, ktorý sa nachádza na povrchu vírusu. Vytvárajú sa ako po prekonaní ochorenia, tak aj po očkovaní mRNA, prípadne inými vakcínami. Protilátky proti S1 a S2 proteínom sú neutralizačné a poskytujú ochranu pred reinfekciou. Nie je však známe, aká minimálna hladina musí byť prítomná, ani ako dlho bude človek chránený pred infekciou, resp. reinfekciou.

PREDANALYTICKÉ INFORMÁCIE

Odber plnej krvi do štandardnej gélovej biochemickej skúmavky bez protizrážanlivého prostriedku cca 3 – 5 ml (krv sa musí zraziť). Transport vzorky pri teplote 2 °C až 8 °C do 5 dní. Pri dlhšom skladovaní treba vzorky skladovať pri -20 °C a menej.

Interferencie:

ELISA metodika: uvedené koncentrácie vybraných analytov spôsobili zmenu menej ako 15 % v intenzite signálu:

Analyt	Testovaná koncentrácia
Albumín	60 mg/ml
Bilirubín konjugovaný	0,4 mg/ml
Bilirubín nekonjugovaný	0,4 mg/ml
Cholesterol	4 mg/ml
Hemoglobín	10 mg/ml
Triglyceridy	15 mg/ml

CLIA metodika: testovaná koncentrácia vybraných analytov neprekázala v teste žiadnu interferenciu:

Analyt	Testovaná koncentrácia
Biotín	3 500 ng/ml
Triglyceridy	30 mg/ml
Hemoglobín	10 mg/ml
Nekonjugovaný bilirubín	0,40 mg/ml
Konjugovaný bilirubín	0,40 mg/ml
Celkový cholesterol	4 mg/ml
Paracetamol	500 mg/ml
Ibuprofen	500 mg/ml

Referenčné rozpätie ELISA:

(enzýmová imunoanalýza) pre kvalitatívne IgM, IgA a IgG protilátok proti nukleoproteínu SARS-CoV-2

negatívny výsledok IgA, IgM, IgG hodnoty < 9 NTU

pozitívny výsledok IgA, IgM, IgG hodnoty > 11 NTU

hraničný výsledok IgA, IgM, IgG hodnoty 9 – 11 NTU

Referenčné rozpätie CLIA:

(chemiluminiscencia) pre kvantitatívne stanovenie IgG protilátok S1 a S2 proteínu SARS-CoV-2

negatívny výsledok IgG hodnoty < 12 AU/ml

pozitívny výsledok IgG hodnoty ≥ 15 AU/ml

hraničný výsledok IgG hodnoty 12 – 15 AU/ml

Referenčné rozpätie aj rozsah merania sa môže meniť pri aktualizácii na vyššiu generáciu testu.

Vypracovala:

Medirex, a.s.: **MUDr. Emília Miková**

emilia.mikova@medirex.sk

Kontakt:

Klientske centrum 0800 00 30 30

Bratislava 5. 2. 2021

Literatúra

1. www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/need-extra-precautions/people-at-higher-risk.html
2. www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/serology-testing.html
3. Príbalový leták: NovaTec Immunodiagnostica GmbH; Novalisa® SARS-CoV-2 (COVID-19) IgG ELISA.
4. Príbalový leták: NovaTec Immunodiagnostica GmbH; Novalisa® SARS-CoV-2 (COVID-19) IgM ELISA.
5. Príbalový leták: NovaTec Immunodiagnostica GmbH; Novalisa® SARS-CoV-2 (COVID-19) IgA ELISA.
6. Príbalový leták: DiaSorin S.p.A.; LIAISON® SARS-CoV-2 S1/S2 IgG.

Chronická lymfocytová leukémia

VYPRACOVALA

Mgr. Veronika Lendacká
oddelenie genetiky Medirex, a.s.

Definícia

Podľa Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) je chronická leukocytozá leukémia (CLL) klonálne ochorenie lymfocytov, ktoré vzniká nádorovou transformáciou a proliferáciou B-buniek, tzv. malých B-lymfocytov. Pri CLL sú nádorové bunky prítomné v periférnej krvi (PK) v množstve $> 5 \times 10^9/l$, infiltrujú kostnú dreň (KD) a lymfatické uzliny.

Epidemiológia

CLL je najčastejšie sa vyskytujúcim typom leukémie u dospelých v Európe a v Severnej Amerike. Ochorenie len zriedka postihuje ľudí mladších ako 50 rokov, najčastejšie je diagnostikované u pacientov vo veku nad 65 rokov života, pričom častejšie sa vyskytuje u mužov ako u žien. Klinický priebeh CLL je extrémne variabilný od indolentnej až po veľmi agresívnu formu, preto aj medián prežívania pacientov s týmto ochorením varíruje od 18 mesiacov do viac ako 10 rokov. Ochorenie prebieha roky bez príznakov a často je diagnostikované náhodne pri preventívnych prehliadkach, keďže takmer polovica pacientov je asymptomatická. (11, 7)

Diagnostika

Najdôležitejšie na stanovenie diagnózy je morfológické vyšetrenie PK pomocou prietokovej cytometrie. Typickým nálezom u pacientov s CLL je prítomnosť viac ako $5 \times 10^9/l$ klonálnych B-lymfocytov s charakteristickým fenotypom – expresia povrchových antigénov CD5+, CD19+, CD20+, CD23+ a nízka expresia znaku CD79b a FMC7. (6) Keďže CLL patrí k ochoreniam s veľmi variabilným klinickým priebehom, je poznanie prognostických

faktorov veľmi dôležité z hľadiska výberu vhodnej liečebnej stratégie. Štandardne sa používajú dva celosvetovo akceptované metódy staigingu, a to systém podľa Raia (tab. 1) a systém podľa Bineta (tab. 2). Medzi ďalšie „tradičné“ prognostické faktory patria zdvojovací čas lymfocytov a infiltrácia KD, ktoré nám určujú, do akej miery je ochorenie u pacienta rozvinuté, ale neumožňujú predpovedať priebeh u pacientov v raných štádiách CLL. Rýchly rozvoj molekulovej biológie a genetiky však priniesol nové prognostické markery – chromozómové aberácie, mutačný stav génu pre variabilnú časť ťažkého reťazca imunoglobulínu (*IGHV*), expresia znaku CD38 a kinázy ZAP-70 (zeta asociovaný proteín) (tab. 3), ktorých poznanie výrazne ovplyvňuje prognózu pacienta a ďalší terapeutický postup. (4, 14, 5)

Mutačný stav génov pre *IGHV*

Výrazným posunom pri stanovení prognózy pacientov s CLL bolo zistenie, že asi u polovice pacientov je prítomná somatická hypermutácia vo variabilnej oblasti génu pre *IGHV*. Ak je rozdiel v nukleotidovej sekvencii $> 2\%$ oproti zárodočnej línii, ide o mutovaný stav *IGHV* génu (*M-IGHV*) oproti nemutovanému stavu (*UM-IGHV*), pri ktorom je homológia so zárodočnou líniou väčšia alebo sa rovná 98 %. Pacienti s mutovanou formou majú priaznivejšiu prognózu ochorenia s mediánom prežitia 25 rokov oproti 8 rokom pri nemutovanej forme, pri ktorej dochádza k rýchlej progresii s rozvojom cytogeneticky nepriaznivých markerov. Analýza *IGHV* segmentov preukázala prednostný výskyt špecifických VH segmentov v závislosti od mutačného statusu. Pri mutovanej forme sa prednostne vyskytuje segment VH1-69 *IGH* génu na rozdiel od prípadov s pozitívnym mutačným

statusom, kde sa vyskytuje segment VH3-21, ktorý má zlú prognózu. Avšak prítomnosť segmentu VH3-21 je asociovaná so zlou prognózou ochorenia nezávisle od výsledku mutačného statusu. Keďže zostáva mutačný status počas ochorenia stabilný, patrí k najčastejšie využívaným prognostickým markerom. (8, 2, 5)

Chromozómové zmeny

Typický genóm CLL zahŕňa viac ako 2 000 molekulových lézií. Len niekoľko mutácií sa objavuje u pacientov s frekvenciou viac ako 5 %. Približne 80 % pacientov s CLL má však aspoň jednu zo štyroch najznámejších chromozómových zmien – deléciu 13q14, deléciu 11q23, deléciu 17p13 a trizómiu 12, na základe ktorých je možné pacientov rozdeliť do prognostických skupín a zvoliť individuálny terapeutický prístup. (9)

Delécia 13q14 (obr. 1) je najčastejšie sa vyskytujúca chromozómová aberácia, ktorá sa spája s priaznivou prognózou. Priaznivý charakter delécie sa stráca v prítomnosti ďalšej chromozómovej aberácie. Vo väčšine prípadov ide o monoalelickú deléciu, no môže dôjsť aj k delécii na oboch alelách alebo sú prítomné obe formy súčasne. Oblasť 13q14 bola intenzívne skúmaná, ale zatiaľ sa nepodarilo jednoznačne dokázať prítomnosť určitého génu s tumorsupresorovým účinkom s úlohou v patogenéze CLL. Sú známe iba kandidátne gény. Predpokladalo sa, že ide o gén RB1 (retinoblastom gen1), ale výskum ukazuje, že tento gén sa nachádza mimo minimálnej deletovanej oblasti a pozornosť sa tak obracia na malé nekódujúce micro-RNA – miR-15a (gén *MIR15A*) a miR-16-1 (gén *MIR161*), ktoré v normálnych bunkách inhibujú expresiu kľúčových regulátorov apoptózy a bunkového cyklu. Ak dôjde k delécii tejto oblasti, tento inhibičný efekt sa naruší, a preto majú

tumorózne B-bunky výhodu v prežívaní na úkor normálnych buniek, čo vedie k vývoju CLL. Onkoproteín Bcl2 (B-cell lymphoma 2) je cieľom posttranskripčnej represie tumorsupresorov miR-15a a miR-16-1. Ak dôjde k delícii génov *MIR15A* a *MIR161*, je proteín *Bcl2* exprimovaný vo veľmi vysokej hladine a vyvážuje veľké množstvo aktivátorov apoptózy, čím udržiava prežívanie nádorových buniek. Ak je *BCL2* gén blokovaný, dôjde k vytesneniu aktivátorov apoptózy z molekuly *BCL2* a k spusteniu apoptickej kaskády. (12)

Z historického hľadiska bola prvou objavenou chromozómovou zmenou **trizómia chromozómu 12**. Je to najčastejšia numerická zmena, pri ktorej sa amplifikuje genetický materiál. Môže dochádzať k duplikácii celého chromozómu alebo

len k zmožneniu segmentu medzi 12q13 a 12q21.2. Analýza chromozómu 12 preukázala, že minimálny získaný región je lokalizovaný v oblasti 12q13-q15, kde sú prítomné gény *CDK2* (cyclin-dependent kinase 2), *CDK4* (cyclin-dependent kinase 4), *STAT6* (signal transducer and activator of transcription 6), *APAF-1* (apoptotic peptidase activating factor 1) a *MDM-2* (Mdm2 p53 binding protein homolog). Tieto gény sú zapojené do kontroly bunkového cyklu a apoptózy, ale ich úloha v patogenéze CLL nebola preukázaná. Táto chromozómová aberácia je asociovaná s intermediárnou prognózou ochorenia. Vyskytuje sa v 15 % – 20 % prípadov a z toho v 60 % ako izolovaná aberácia. Trizómia 12 je silno asociovaná s atypickou morfológiou a imunofenotypom lymfocytov a pacienti

s touto aberáciou majú častejšie mutované gény pre *IGHV*. (9)

K prognosticky nepriaznivým chromozómovým aberáciám patrí **delécia 11q22** (obr. 1), ktorá je pozorovaná u 10 – 20 % pacientov. V oblasti 11q22-23 sa nachádza niekoľko kandidátnych génov, ako napríklad *FDX* (ferredoxin 1), *MLL* (mixed lineage leukemias), *RDX* (radixin), no pri CLL je najčastejšie opisovaný gén *ATM* (ataxia teleangiectasia mutated). Jeho funkciou je pri poškodení DNA fosforylovať proteín p53, ktorý následne indukuje v bunkách apoptózu. Poškodená funkcia vedie k deregulácii bunkového cyklu a akumulácii malígnych B-buniek, ktoré sú náchylnejšie na vznik prídavných genetických aberácií. Delécia 11q22 sa spája s horšou prognózou a agresívnejším priebehom ochorenia, a to hlavne u mladších pacientov. (10, 9)

Delécia 17p13 je asociovaná s veľmi agresívnym priebehom ochorenia a rezistenciou na terapiu, pretože naruša expresiu génu *TP53* (tumor protein p53), ktorý je lokalizovaný v tejto oblasti. Tumorsupresorový gén *TP53* kóduje proteín p53, ktorý má významnú funkciu v rámci bunkovej regulácie. Jeho vysoká hladina spôsobuje zastavenie bunkového cyklu alebo apoptózu, čím zamedzuje nahromadeniu mutácií a ich prenosu do dcérskych buniek. Bunky, ktorým proteín p53 chýba, sú menej stabilné a sú náchylné na tvorbu nádorov. V zdravých bunkách je jeho hladina veľmi nízka. K akumulácii dochádza pri genotoxickom strese, keď stresové signály iniciujú posttranslačné modifikácie p53, ktoré vedú k jeho aktivácii. Proteín p53 je dôležitým transkripčným faktorom, ktorý aktivuje gén kódujúci p21 proteín. Aktivácia p21 vedie k zastaveniu bunkového cyklu v G1 fáze, inhibuje *CDK2/cyklin E* a zamedzuje aktiváciu *E2F-1*, ktorý podporuje transkripciu génov potrebných pre prechod z G1 do S fázy. Medzi cieľové gény pre p53 patrí aj *MDM2* (murine double minute 2). Proteín *mdm2* tvorí komplex s p53 a spätne inhibuje jeho transkripčnú aktivitu. *Mdm 2* pôsobí ako negatívny regulátor a funguje ako ubikvitín 3 ligáza, podieľa sa na degradácii p53, zaisťuje jeho nízku hladinu v zdravých bunkách a zároveň reguluje sám seba. V čase stanovenia diagnózy je dôležité sledovať nielen deléciu génu *TP53*, ale aj jeho mutačný status (nemusia sa vyskytovať súčasne), keďže to umožňuje zaradiť pacienta do „ultra high-risk“ CLL skupiny a zaujať správny liečebný postoj. Mutačný status by mal byť vyšetrený ešte pred

Tab. 1: Klasifikácia podľa Raia

Štádium	Kritérium	Medián prežívania rr.	Riziko
0	lymfocytóza v PK a KD viac ako 30 %	viac ako 10 r.	nízke
I.	lymfocytóza + lymfadenopatia (LAP)	8 r.	stredné
II.	lymfocytóza + splenomegália alebo hepatomegália + LAP	5 – 7 r.	stredné
III.	lymfocytóza + anémia + LAP (Hb menej ako 110 g/l)	2 – 4 r.	vysoké
IV.	lymfocytóza + trombocytopenia + LAP (Tr menej ako 100 g/l)	menej ako 2 r.	vysoké

Tab. 2: Klasifikácia podľa Bineta

Štádium	Kritérium lymfocytóza +:	Medián prežívania rr.	Riziko
A	lymfocytóza + postihnutie ≤ 2 oblasti uzlín* (Hb, Tr ≥ 100)	12 r.	nízke
B	lymfocytóza + postihnutie ≥ 3 oblastí uzlín* (Hb, Tr ≥ 100)	5 – 7 r.	stredné
C	lymfocytóza + anémia** (Hb < 100 g/l) a/alebo trombocytopenia (Tr < 100 × 10 ⁹ /l)	2 – 4 r.	vysoké

Oblasti podľa Bineta:

- I. oblasť: hlava, krk, tzv. Waldayerov okruh
- II. oblasť: axily
- III. oblasť: inguiny
- IV. oblasť: palpovateľná slezina
- V. oblasť: palpovateľná pečeň

Tab. 3: Prognostické ukazovatele pri diagnóze B-CLL

Prognóza	
Horšia	Lepšia
Nemutovaný <i>IGHV</i> gén	Mutovaný <i>IGHV</i> gén
ZAP 70+	ZAP 70-
CD38+ (> 30 % expresia)	CD38-
11q23	13q14, trizómia (12)
17p13 delécia (p53)	Normálny karyotyp
Difúzna infiltrácia KD	Intersticiálna a nodálna infiltrácia KD

začatím terapie a v prípade prítomnosti mutácie je ho nutné sledovať počas liečby. (1, 10, 12)

Ďalšie chromozómové zmeny

Medzi ďalšie chromozómové zmeny, ktoré sa vyskytujú u pacientov s CLL, patria delécia 6q, translokácie v oblasti 14q32, trizómia 3q alebo trizómia 8q. Tieto chromozómové zmeny tvoria len malú časť nálezov u pacientov a ich význam nie je presne objasnený. (3)

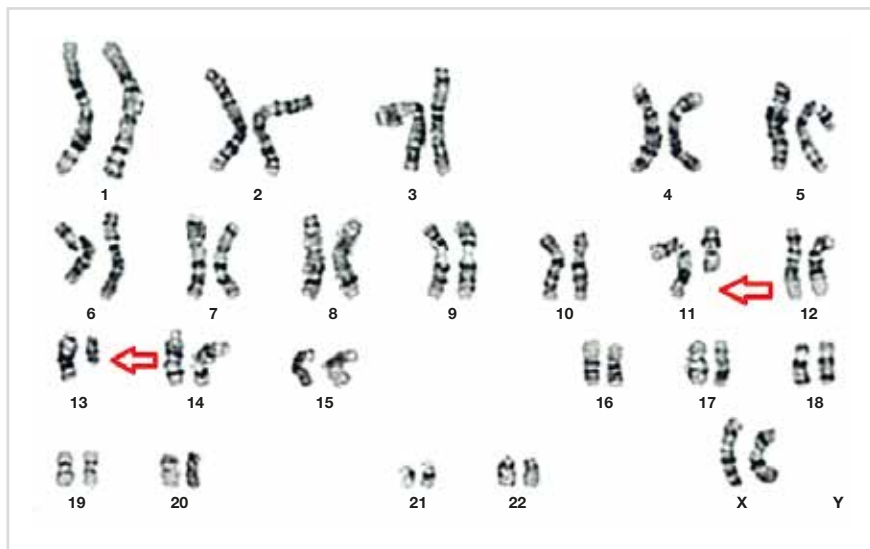
Metódy detekcie chromozómových aberácií u pacientov s CLL

Klasické cytogenetické vyšetrenie

Základnou vyšetrovacou metódou na odhalenie cytogenetických aberácií u pacientov s CLL je analýza karyotypu. Ide o kultivačnú metódu, ktorej cieľom je získať lymfocyty v mitotickej fáze bunkového cyklu, keď sú chromozómy špiralizované a je ich možné usporiadať do podoby karyotypu na základe veľkosti, umiestnenia centroméry a pruhov vzniknutých farbením. Materiálom pre klasické cytogenetické vyšetrenie CLL je KD, ktorá sa odoberá do skúmavky s heparínom, ktorý zabraňuje jej zrážaniu. Získaný materiál sa kultivuje v kultivačnom médiu v termostate pri 37 °C po dobu 24 hodín, následne sa bunkové delenie zastaví pridaním kolchicínu v štádiu metafázy. Po pridaní hypotonického roztoku KCl dôjde k napučaniu buniek a chromozómy sú usporiadané v ekvatoriálnej rovine. Bunky sa fixujú zmesou metanolu a kyseliny octovej a po poslednej fixácii sa sediment buniek nariadi fixačným roztokom na priehľadnú suspenziu. Suspenzia sa kvapká na odmastené podložné sklá, ktoré sú vystavené pôsobeniu trypsínu. Na záver sú preparáty zafarbené farbivom (C-band). Pripravený preparát sa hodnotí v svetelnom mikroskope, štandardne sa vyhodnocuje 20 mitóz a nájdené chromozómové zmeny sú popisované podľa medzinárodného systému cytogenetickej nomenklatúry (ISCN). Nevýhodou tohto vyšetrenia je, že nedokáže zachytiť submikroskopické zmeny pod detekčným limitom metódy, a preto je vhodné doplniť aj ďalšie molekulárno-cytogenetické vyšetrenia.

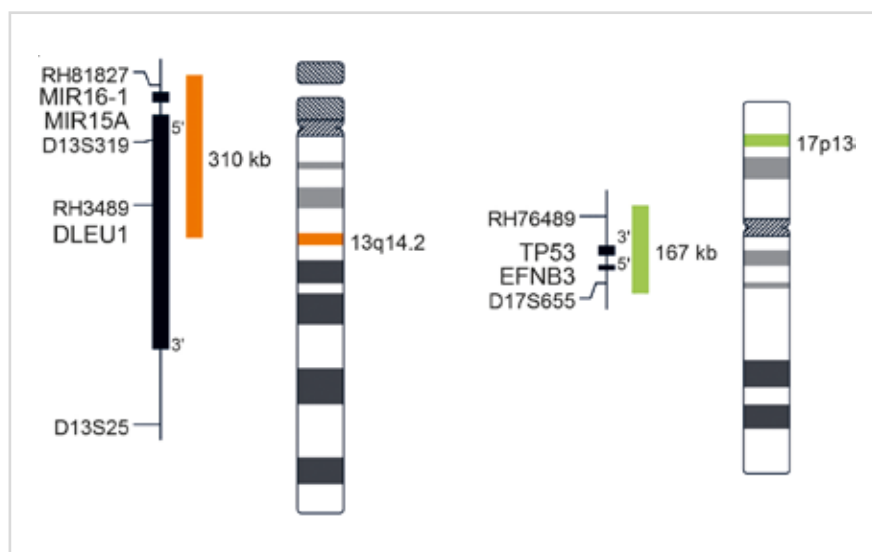
Fluorescenčná *in situ* hybridizácia (FISH)

Metóda FISH priniesla obrovský prínos v diagnostike pacientov s CLL, keďže umožňuje pozorovať genetické zmeny v bunkách



Obr. 1: Karyotyp pacienta s CLL. 46, XX, del(11)(q21), del(13)(q14).

Prevzaté z: <https://images.app.goo.gl/c6rpnaD9dfioFZGVT9>



Obr. 2: Chromozómová mapa – sonda XL DLEU/TP53; červený signál – oblasť 13q14, zelený signál oblasť 17p13.

Prevzaté z: <https://metasystems-probes.com/en/probes/xl/d-5067-100-og/>

aj v interfáze. Výhodou je, že nezávisí od získania mitóz ako klasické cytogenetické vyšetrenie. Princíp metódy spočíva v hybridizácii fluorescenčne značenej DNA sondy ku komplementárnemu úseku DNA na niektorom z chromozómov pacienta. Pomocou špecifickej sondy je možné overiť prítomnosť očakávanej chromozómovej abnormality u pacienta s CLL. Materiálom pre FISH analýzu je PK alebo KD, z ktorých sa spracovaním zhotoví bunková suspenzia, ktorej nakvapkaním sa pripraví preparát. Štandardne sa hodnotí 200 interfáznych

jadier a výsledok sa interpretuje ako percento jadier, ktoré obsahujú viac ako dve kópie určitého cieľového lokusu, respektíve ako percento buniek vykazujúcich stratu, prípadne nadbytok v určitej oblasti chromozómu. Na vyšetrenie pacientov s CLL pomocou FISH sa zvyčajne využíva panel sond, ktorými je možné odhaliť najčastejšie sa vyskytujúce prognosticky významné chromozomálne zmeny del(13q) (obr. 2, 3), trizómiu 12, del(11q) a del(17p). Taktiež je možné sledovať prestavby génu *IGH* na 14. chromozóme a vznik fúzných génov.

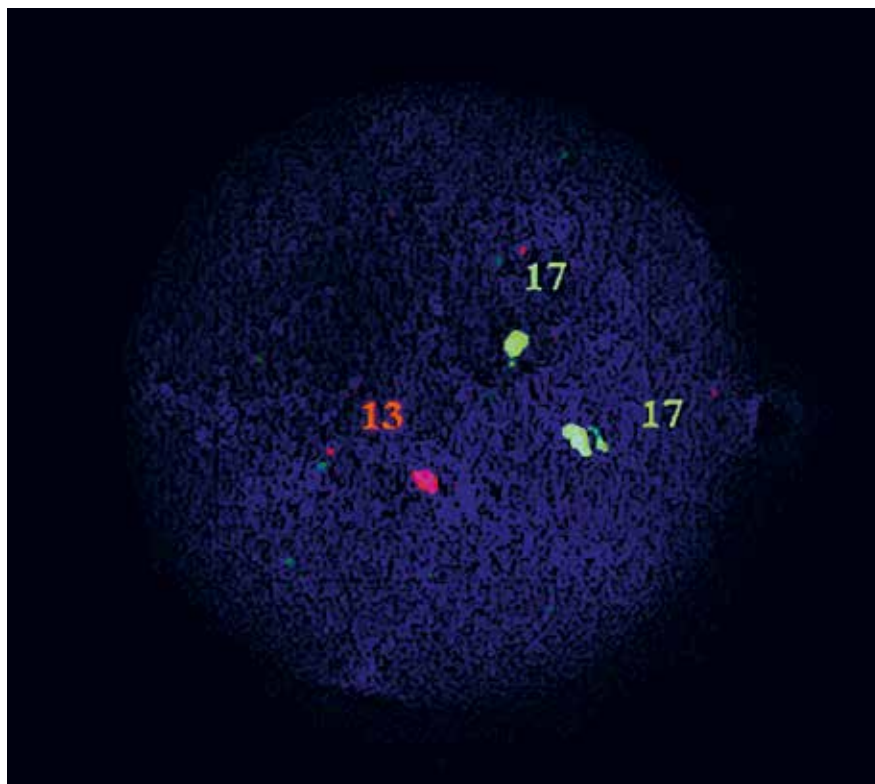
Najčastejšie ide o reciprokú translokáciu s časťou dlhého ramienka chromozómu 18, kde sa nachádza gén BCL2 alebo translokáciu s dlhým ramienkom chromozómu 11 (gén *CCND1/MYE0V*). Výhodou tejto metódy je, že dokáže zaznamenať aj chromozómové aberácie, ktoré nie sú pomocou klasického cytogenetického vyšetrenia detekovateľné.

Liečba

V súčasnosti patrí CLL k nevyliciteľným ochoreniam, no vďaka včasnej diagnostike a liečbe je možné docíliť dlhotrvajúcu kompletnú remisiu a zaistiť tak pacientovi dobrú kvalitu života. Len čo sa dosiahne stav remisie, liečba sa preruší a pacient následne podstupuje kontroly, aby bolo možné zachytiť včas návrat ochorenia a obnoviť liečbu. Pre výber liečebnej stratégie sú rozhodujúce vek a výkonnostný stav pacienta, komorbidita, rizikové faktory, ako aj odpoveď na predchádzajúcu terapiu. Vo všeobecnosti sú pacienti s nízkym rizikom (Rai 0 a Binet A) bez liečby, uplatňuje sa u nich stratégia „watch and wait“, liečbu väčšinou naordinguje lekár až v prípade tretieho alebo štvrtého stupňa Rai, resp. stupňa „C“ Binetovej stupnice. U mladších pacientov s nepriaznivou prognózou je možné podstúpiť transplantáciu KD, ktorá má potenciál kompletne odstrániť malígne bunky, ale je spojená s vysokou úmrtnosťou. Práve rozvoj poznatkov z oblasti genetiky a molekulovej biológie zabezpečujú pacientovi terapiu „šitú na mieru“. Príkladom je poškodenie génu *TP53*, mutáciu a/alebo deléciu, ktoré spôsobuje rezistenciu pacienta na chemoimunoterapiu a pri liečbe je nutné využiť inhibítory BCR signálnej dráhy. (13, 11, 5)

Záver

Vzhľadom na značnú heterogenitu klinického priebehu CLL je poznanie prognostických markerov nevyhnutnou súčasťou pri zvolení vhodnej liečebnej stratégie u pacientov s týmto ochorením. Zavedenie molekulovogenetických parametrov, ako je mutačný stav IGHV alebo chromozómových aberácií do klinickej praxe umožnilo zefektívniť terapiu a predĺžiť prežívanie pacientov s CLL. Vzhľadom na pribúdajúce poznatky o patogenéze tohto ochorenia a vývoj sofistikovanejších detekčných prístupov je možné očakávať, že pribudnú aj nové prognostické markery, ktoré zlepšia kvalitu života pacientov.



Obr. 3: Sonda XL DLEU/TP53. FISH analýza – *del(13)(q14)*; červený signál – oblasť 13q14, zelený signál oblasť 17p13.

Literatúra

1. Copáková L, Piačková L, Leitnerová M. 2014. Význam delécie a mutácie génu TP53 a ďalších prognostických markerov u pacientov s CLL. *Onkológia*. roč. 9(2):100–103.
2. Crombie J, Davids MS. 2017. IGHV mutational status testing in chronic lymphocytic leukemia. *American journal of hematology*, 92.12: 1393–1397.
3. Demitrovičová L, Mikušová E. 2008. Chronická lymfocytová leukémia – biológia, klinický obraz a prognóza. *Onkológia*. roč. 3(5): 316–319.
4. Demitrovičová L, Mikušová E. 2014. Patogenéza chronickej lymfocytovej leukémie. *Onkológia*. roč. 9(2): 94–99.
5. Demitrovičová L. 2018. Prognostické faktory pri chronickej lymfocytovej leukémii. *Onkológia*; roč.13(4):278–282.
6. Elbertová A. 2015. Využitie prietokovej cytometrie pri stanovení prognostických markerov CD38 a ZAP-70 u pacientov s B-CLL. *NewsLab*. roč. 2(1): 39–41.
7. Hrubíško M. 2014. Chronická lymfocytová leukémia – úvod. *Onkológia*. roč. 9(1): 29–33.
8. Kipps TJ, et al. 2017. Chronic lymphocytic leukaemia. *Nature reviews Disease primers*, 3.1: 1–22.
9. Navrálková V. a kol. 2015. Molekulární prognostické markery chronické lymfocytární leukémie a jejich klinický význam. *Klinická onkologie, Praha: Česká lékařská společnost J.E. Purkyně*, roč. 28, Suppl 3, s. "3S6"-"3S15". ISSN 0862-495X. doi:10.14735/amko20153S6.
10. Puiggros A, Blanco G, Espinet B. 2014. Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: where we are and where we go. *BioMed Research International*.
11. Štecová N. 2012. Chronická lymfocytová leukémia – komplexne a aktuálne. *Lekárske listy*.
12. Tomková E. 2017. Molekulová analýza prognosticky významných markerov chronickej lymfocytovej leukémie. *NewsLab*. roč. 8(1): 38–43.
13. Tóthová E. 2008. Chronická lymfocytová leukémia. *Solen*. roč.5 (12):520–522.
14. Válek L, Chudej J, Sokol J. 2014. Laboratórna diagnostika CLL: cytológia, prietoková cytometria. *Onkológia*. roč. 9(3): 166–172.

Genetická diagnostika chronickej myeloidnej leukémie

VYPRACOVALA

Mgr. Andrea Obušeková
oddelenie genetiky Medirex, a.s.

CML je klonálne myeloprolifertívne nádorové ochorenie, ktoré vzniká neoplastickou transformáciou jedinej progenitorovej pluripotentnej hemopoetickej kmeňovej bunky s diferenciáciou prevažne do myeloidného radu. Je charakterizovaná prítomnosťou klonálnej expanzie kmeňovej bunky s reciprokom translokáciou medzi dlhými ramenami chromozómov 9 a 22, t(9;22)(q34;q11), označovanej ako Philadelphia chromozóm. (2)

História

Chronická myelocytová leukémia (CML) je prvým onkohematologickým ochorením, pri ktorom sa podarilo preukázať, že jeho príčinou je genetická chromozómalná abnormalita – Philadelphia chromozóm (Ph). Ph chromozóm ako prví opísali cyto-genetici Peter Nowel a David Hungerford v roku 1960 vo Philadelphii. V roku 1973 Janet Rowleyová pomocou pruhovacej techniky farbenia chromozómov určila, že tento chromozóm je výsledkom reciprokej translokácie (výmeny časti nehomologických chromozómov bez straty genetického materiálu) medzi chromozómami 9 a 22. V roku 1983 bolo objasnené, že do translokácie je zapojený protoonkogén ABL, normálne lokalizovaný na chromozóme 9 (Heisterkamp, 1983). Partnerský gén, ktorý vstupuje do translokácie na chromozóme

22, bol určený neskôr (Groffen, 1984) a bol označený ako *BCR* (1)

Patofyziológia

CML je charakterizovaná prítomnosťou chromozómalnej aberácie, ktorá je výsledkom reciprokej translokácie medzi dlhými ramenami chromozómov 9 a 22, t(9;22)(q34;q11) (obr.1) označovanej ako Philadelphia chromozóm (Ph). Ph chromozóm je teda skrátený chromozóm 22 vznikajúci danou translokáciou. Ph je identifikovateľný až u 90 % pacientov a asi 5 % pacientov má prítomný iba *BCR/ABL* fúzny gén, ktorý spôsobuje identické ochorenie. Opisované sú aj prípady s CML fenotypom bez nález Ph chromozómu a aj bez nález *BCR/ABL* fúzneho génu. Doposiaľ však nebola opísaná etiológia takýchto prípadov. (3) Protoonkogén ABL kódujúci tyrozinkinázu leží na chromozóme 9. V dôsledku translokácie je tento protoonkogén fúzovaný s génom *BCR* lokalizovanom na chromozóme 22. Fúziou týchto génov vzniká patologický fúzny gén *BCR/ABL*, ktorý konštitutívne kóduje produkciu vysoko aktívneho proteínu *BCR/ABL* so silnou tyrozinkináзовou aktivitou (TK). TK je aktivátorom množstva proteínov zapojených do signálnych dráh podieľajúcich sa na kontrole bunkového cyklu. V patologickom stave tento proteín

nevyžaduje aktiváciu ďalšími proteínmi a sám neregulovateľne aktivuje kaskádu ďalších proteínov, v dôsledku čoho dochádza k nekontrolovateľnému deleniu buniek, inhibícii opráv DNA a celkovej nestabilite genómu. (4)

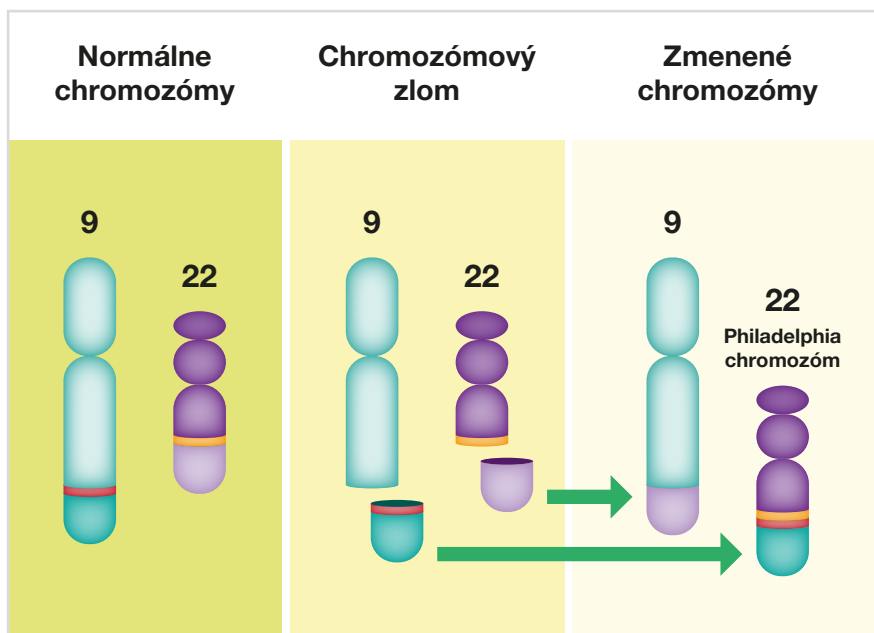
Rizikové faktory vzniku CML

Medzi rizikové faktory rozvoja CML patria vek, pohlavie a predchádzajúce ožiarenie, napríklad pri liečbe predošlých onkologických ochorení. Frekvencia výskytu CML rastie vo vyšších vekových skupinách. Vekový priemer pacientov s CML sa pohybuje okolo 60 – 65 rokov života, u detí sa takmer nevyskytuje. O niečo častejšie sa ochorenie vyskytuje u mužov ako u žien, a to v pomere približne 1,3 : 1.

Výskyt CML v rodine sa nepovažuje za rizikový faktor. Chromozómové mutácie vedúce k rozvoju tohto ochorenia sa neprenášajú z rodičov na potomkov, ale považujú sa za tzv. získané mutácie nadobudnuté počas života.

Fázy CML

Prirodzený priebeh CML je charakterizovaný tromi fázami s variabilnou dĺžkou



Obr. 1: Schematické znázornenie $t(9;22)$, vznik Ph chromozómu (2).

trvania. V prvej iniciálnej fáze je diagnostikovaná väčšina pacientov. Začiatok ochorenia je často sprevádzaný celkovými nešpecifickými príznakmi a až 30 % pacientov je úplne bez fyzických ťažkostí, CML je im diagnostikovaná náhodne pri vyšetrení krvného obrazu. Medzi počiatočné príznaky pacienti udávajú zvýšenú únavu, stratu hmotnosti, nechutenstvo a trávacie ťažkosti súvisiace s nástupom splenomegálie a hepatomegálie, krvácajúcich až trombotických stavov. V prvej chronickej fáze sa nachádza až 95 % pacientov. S postupnou progresiou CML sa zhoršujú aj symptómy. V akcelerovanej fáze výrazná splenomegália spôsobuje tlakom na okolité orgány ťažkosti a bolesti v oblasti brušnej dutiny, objavujú sa zvýšená teplota neinfekčného pôvodu, bolesti kĺbov a kostí. Pri CML sa môže prejavovať aj extramedulárne postihnutie ktoréhokoľvek iného orgánu. Tieto prejavy sa však už spájajú s prechodom do poslednej blastickéj fázy CML, ktorá svojím priebehom pripomína akútnu leukémiu. (5, 6)

Genetická diagnostika CML

Genetika zohráva v diagnostike onkohematologických ochorení veľmi dôležitú úlohu, miestami až nevyhnutnú. Kým niektoré hematologické ochorenia nemajú prítomné špecifické genetické aberácie, pri vybraných

onkohematologických diagnózach je genetická diagnostika kľúčová, a to od stanovenia samotnej diagnózy cez určenie prognózy až po sledovanie odpovede na poskytnutú liečbu.

V iniciálnej fáze ochorenia je dôležité vyšetriť viaceré biologické materiály, ako

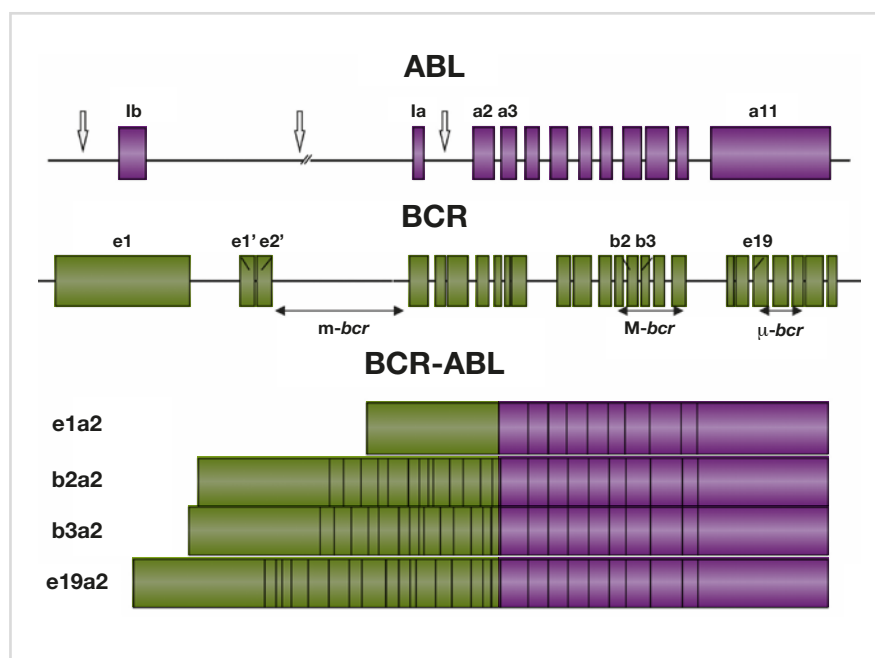
sú kostná dreň a periférna krv. Pojmom genetické vyšetrenie rozumieme použitie rôznych typov molekulárno-genetických metód na potvrdenie danej diagnózy. Na našom oddelení sa vstupné vyšetrenie realizuje kombináciou troch vyšetrovacích metód:

- metódou molekulovej analýzy,
- metódou klasickej cytogenetiky,
- metódou FISH analýzy.

Metóda molekulovej analýzy

Molekulárna diagnostika CML je založená na potvrdení existencie výsledku reciprokej translokácie medzi chromozómami 9 a 22, teda na potvrdení prítomnosti fúzneho génu *BCR/ABL* u pacientov s CML. Kvantitatívne sledovanie tohto génu umožňuje sledovať odpoveď pacienta na poskytnutú liečbu, teda sledovať tzv. minimálnu reziduálnu chorobu.

Fúzny gén *BCR/ABL* je detegovaný pomocou Real time polymerázovej reťazovej reakcie (RT-PCR), ktorá je dostatočne presná a citlivá. Ide o najsenzitívnejšiu genetickú metódu, ktorej citlivosť varíruje podľa množstva a kvality vzorky a podľa účinnosti reverznej transkripcie a odhaduje sa na 10^{-4} až 10^{-5} . Pre túto metodiku sú východiskovým materiálom leukocyty periférnej krvi alebo kostnej drene,



Obr. 2: Miesta zlomov *BCR/ABL* génov (10).

z ktorých je v prvom kroku izolovaná RNA. RNA je pomocou reverznej transkripcie prepísaná do molekuly komplementárnej cDNA a tá následne slúži ako templát do PCR. Táto metóda umožňuje určiť presné miesto zlomu fúzných génov *BCR* a *ABL*. Najčastejšie miesta zlomu produktu *BCR/ABL* sú v oblasti *BCR3/ABL2*. Menej častý je variant *BCR2/ABL2*. Veľmi zriedkavo sa môžu objaviť variant *BCR3/ABL3* a variant *BCR2/ABL3* (obr. 2).

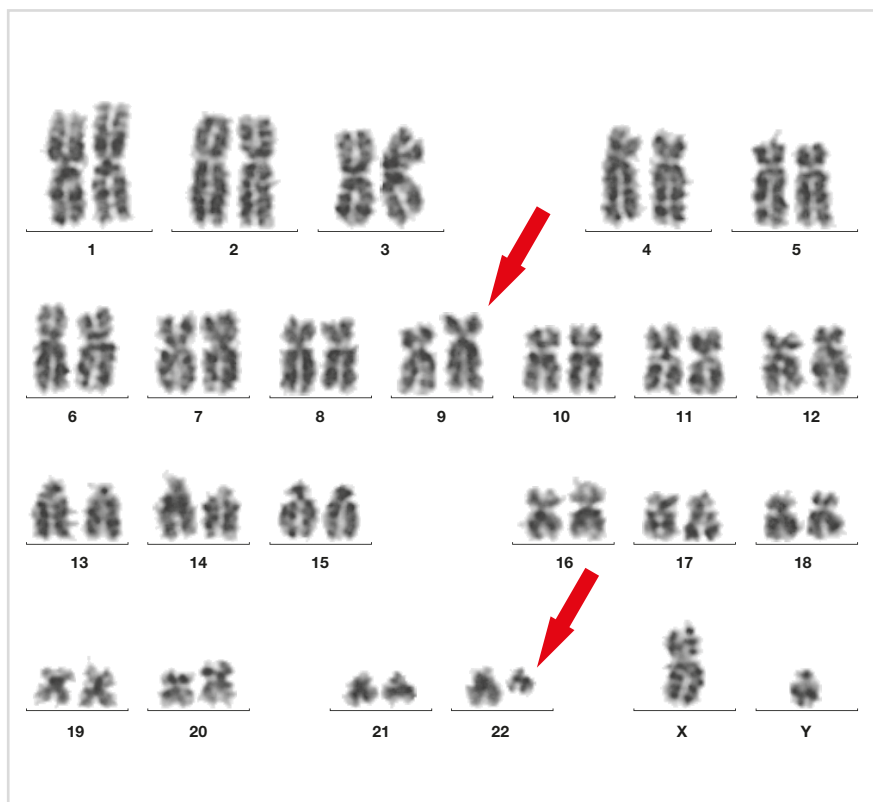
Metóda klasickej cytogenetiky

Metóda klasickej cytogenetiky je zameraná na detekciu prítomnosti Ph chromozómu (obr. 3), prípadne iných prídavných chromozómových aberácií v karyotype.

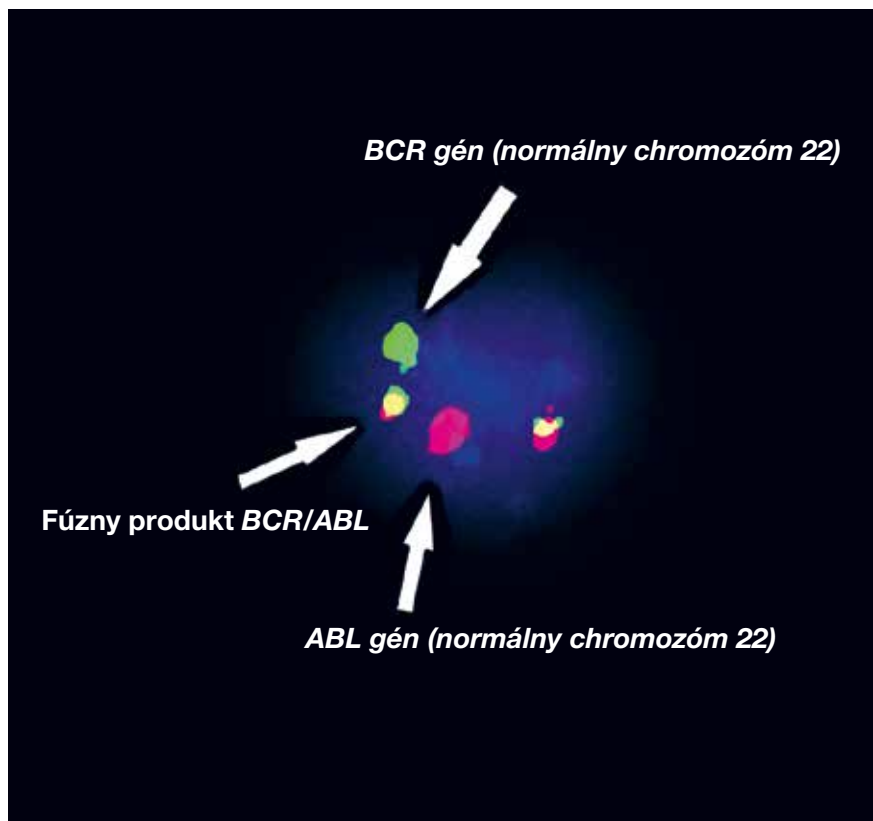
Hematopoetické bunky kostnej drene sú kultivované *in vitro* a následne ich delenie pozastavené v metafáze bunkového delenia, keď sú chromozómy najlepšie viditeľné. Bunková suspenzia je spracovaná a nanesená na sklíčka, kde sa farbí špeciálnym G-pruhovaním, ktoré vytvorí na chromozómoch svetlé a tmavé pruhy. Pre každý chromozóm špecifické pruhovanie umožňuje presne zostavenie karyotypu. Pre správnu interpretáciu výsledku hodnotíme vo svetelnom mikroskope 20 metafáz. U niektorých pacientov sa okrem nálezu Ph chromozómu môžu vyskytovať aj prídavné chromozómové aberácie, ktoré považujeme za marker ochorenia a ich prítomnosť v karyotype predstavuje progresiu ochorenia a zhoršovanie prognózy. Môžu poukazovať na prechod ochorenia do akcelerovanej či blastické fázy. Najčastejšie pozorujeme trizómiu chromozómu 8(+8), duplikáciu Ph(+Ph), trizómiu 19(+19), prítomnosť izochromozómu 17(i17), stratu chromozómu Y u mužov. Cytogenetické vyšetrenie je potrebné na potvrdenie diagnózy CML, ako aj na monitorovanie cytogenetickej remisie ochorenia.

Metóda FISH (fluorescenčná in situ hybridizácia) analýzy

Fluorescenčná in situ hybridizácia umožňuje confirmáciu pozitívneho výsledku cytogenetického a molekulového vyšetrenia. Patrí medzi genetické metódy, ktoré umožňujú detekciu aj submikroskopických zmien chromozómov, napríklad kryptickej translokácie. Metóda



Obr. 3: Karyotyp znázorňujúci $t(9;22)(q34;q11)$.



Obr. 4: FISH analýza pomocou *BCR/ABL* sondy.

je založená na používaní fluorescenčne značených sond, ktoré sa komplementárne viažu k špecifickému úseku DNA (*obr. 4*). Výsledkom tejto metódy je určenie percentuálneho zastúpenia patologického klonu v sledovanej populácii interfáznych jadier. Hodnotenie FISH sa robí vo fluorescenčnom mikroskope, hodnotí sa 200 interfázových jadier. Vstupným materiálom pre túto metódu je periférna krv alebo kostná dreň. Senzitivita metódy je 10^{-2} a za pozitívny výsledok sa považuje prítomnosť aj jediného jadra pozitívneho na t(9;22). (7, 8)

Liečba CML

Liečba pacienta s CML je cieľená individuálne podľa fázy ochorenia, v ktorej sa nachádza pri stanovení diagnózy. Na rozdiel od solídnych nádorov, pri liečbe CML nehrajú hlavnú úlohu chirurgické zákroky ani rádioterapia, keďže patologická chromozomálna translokácia t(9;22)(q34;q11) sa podieľa na vzniku onkogénu *BCR/ABL*, ktorý kóduje konštitutívne vysoko aktívnu *BCR-ABL*

tyrozínkinázu (*BCR-ABL* TK) zapojenú do množstva signálnych dráh bunkového cyklu. Objasnenie molekulárnej podstaty CML viedlo k vývoju molekulárne cieľných liečiv – inhibítorov tyrozínkináz (TKI), ktoré predstavujú molekuly schopné svojou väzbou inhibovať enzýmovú aktivitu *BCR-ABL* TK. Liečba pomocou TKI významne zlepšila prognózu pacientov s CML. Imatinib je prvým syntetizovaným TKI (1992), ktorý bol uvedený do klinickej praxe. Imatinib, tyrozínkinázový inhibítor prvej generácie, sa stal základnou terapeutickou modalitou CML a dosahuje celkovo 8-ročné prežívanie takmer u 90 % pacientov. U pacientov so zlyhaním odpovede na liečbu imatinibom by sa mala liečba zmeniť na inhibitory tyrozínkináz druhej generácie, ako sú dasatinib, nilotinib alebo bosutinib. (9)

Po začatí liečby pacientov s CML by sa mala sledovať ich odpoveď na liečbu. Hodnotenie odpovede na liečbu je dôležité na posúdenie, či bola dosiahnutá adekvátna odpoveď, alebo je nutné prejsť na užívanie vyšších dávok liekov, prípadne na zmenu liečby. Keďže liečba je dlhodobá a relaps sa u väčšiny pacientov objavuje pri

pozastavení liečby, je dôležité dôkladne sledovať celý priebeh ochorenia. Sledovanie pokračuje aj po dosiahnutí optimálnej odpovede, aby sa odhalil a liečil možný návrat ochorenia. Hodnotenie odpovede pacienta na liečbu je založené na sledovaní odpovedí v troch sledovaných znakoch. Sledujú sa hematologická, cytogenetická a aj molekulová odpoveď.

Alogénna transplantácia kostnej drene je jediným uznávaným spôsobom kuratívnej liečby pre ktorúkoľvek fázu ochorenia.

Význam genetiky má v diagnostike a monitoringu onkohematologických ochorení svoje pevné miesto. Genetické vyšetrenia sa stali neodmysliteľnou súčasťou algoritmu diagnostiky onkologických ochorení a ich význam neustále vzrastá. Kombinácie výsledkov vybraných genetických metód sú úzko asociované s možnosťou stanovenia prognózy ochorenia a sledovaní odpovede na liečbu podľa prítomnosti špecifických chromozomálnych aberácií. Umožňuje lekárovi optimálne personalizovať liečbu CML pacienta, ako aj zlepšovať kvalitu jeho života.

Literatúra

1. Demitrovičová L, Copáková L, Mikušková E, Leitnerová M. Diagnostika chronickej myelocytovnej leukémie. *Onkológia*, 7(2), 110–114, 2012.
2. Sninská Z, Hatalová A, Bátorová A, Mistrík M. Klinika hematológie a transfúziológie LF UK, SZU a UNB, Bratislava. *Via practica* 214; 11(3-4), 112–117.
3. Rohoň P, Žáčková D. (2008). Chronická myelocytová leukémia – od molekulovej patogenézy k cielej liečbe. *Onkologie*, 2(3), 150–155.
4. Divoká M, Krupková L, Mojzíkova R, et al. (2013). Úloha molekulárne-genetické laboratoře v monitorování léčebné odpovědi a rezistence na inhibitory Bcr/Abl kinázy u nemocných s chronickou myeloidní leukémií. *FONS*. 23. 9–15.
5. Greer J, Foerster J, Rodgers G, et al. *Wintrobe's Clinical Hematology*, Lippincot Williams and Wilkins, 12th edition 2009: 2006–2030.
6. De Vita VT, Hellman S, et al. *Principles and Practice of Oncology*, Lippincot, Williams and Wilkins, 8th edition 2008: 2267–2278.
7. Kantarjian H, Schiffer C, et al. Monitoring the response and course of chronic myeloid leukemia in the modern era of BCR – ABL tyrosine kinase inhibitors: practical advice on the use and interpretation of monitoring methods. *Blood* 2008; 111, 4: 1774–1780.
8. Testoni N, Luatti S, et al. A prospective study in Ph+ chronic myeloid leukemia (CML) patients showing that interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) is as effective as conventional cytogenetics for definition of cytogenetic response. Correlation with molecular response. *Blood* 2006; 108 suppl.1. Abstract 4779.
9. Divoká M, Krupková L, Mojzíkova R, et al. (2013). Úloha molekulárne-genetické laboratoře v monitorování léčebné odpovědi a rezistence na inhibitory Bcr/Abl kinázy u nemocných s chronickou myeloidní leukémií. *FONS*. 23. 9–15.
10. Melo JV. The discovery of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* 1996; 88:2375–2384.

Prehľad vakcín proti ochoreniu COVID-19

Jediné systematické a efektívne riešenie v spojení s protiepidemickými opatreniami je vakcinácia proti COVID-19. Pri zaočikovaní minimálne 65 % populácie sa predpokladá zastavenie šírenia tohto vysoko nákazlivého respiračného ochorenia so systémovými prejavmi. Ochrana proti SARS-CoV-2 na základe klinických skúseností zabezpečuje humorálnu aj celulórnú imunitu. Nie je však zodpovedaná otázka, ako dlho trvá po prekonaní ochorenia COVID-19 imunitná ochrana pred reinfekciou. U časti pacientov s miernym priebehom nedochádza k vytvoreniu dostatočného množstva protilátok po infekcii. Z toho dôvodu je kľúčové budovanie imunitnej ochrany jednotlivca, ale aj celej spoločnosti. Je dôležité využiť vakcínu ako nástroj prevencie a zastavenia šírenia ochorenia v populácii. Očkovanie predstavuje osobnú ochranu jednotlivca, ktorý je očkovaný. Súčasne zabezpečuje aj kolektívnu ochranu spoločnosti.

Vďaka spoločnému úsiliu veľkého množstva výskumných tímov sveta sa prakticky za 65 dní po objavení koronavírusu SARS-CoV-2 podarilo izolovať antigénne súčasti vírusu, ktoré sú potrebné na vývoj a prípravu očkovej látky.

Typológia vakcín – základné rozdelenie

V súčasnosti sú vo vývoji viaceré druhy vakcín proti ochoreniu COVID-19 založené na rôznych princípoch tvorby ochrannej postvakcinačnej imunitnej odpovede. Rozoznávame 4 základné typy:

- **Vakcíny na báze nukleových kyselín – mRNA a DNA vakcíny**, ktoré sa do bunky dostávajú pomocou lipidových nanočastíc (mRNA), prípadne špeciálnymi elektroporačnými aplikátormi (DNA vakcíny). Indukujú humorálnu aj celulórnú imunitu.
- **Vakcíny s využitím nereplikujúcich sa adenovírusových nosičov**, ktorých

genóm je nekompletný a obsahuje DNA kódujúcu povrchové znaky SARS-CoV-2, najmä S (spike) proteín. Indukujú humorálnu aj celulórnú imunitu.

- **Inaktivované vakcíny** – indukujú najmä humorálnu imunitnú odpoveď, potrebné booster dávky.
- **Rekombinantné proteínové vakcíny** – zvyčajne indukujú iba humorálnu imunitnú odpoveď, v závislosti od použitého adjuvantného systému je možná stimulácia bunkovej imunity.

mRNA vakcíny

Princípom je molekula mRNA (mediátorová, messenger RNA) v lipozomálnom obale, ktorý umožní prechod mRNA do cytoplazmy buniek v mieste aplikácie (svalové a dendritové bunky). Na ribozómoch bunky sa mRNA prepíše do bielkoviny S (spike) proteínu, ktorý je následne produkovaný a transportovaný do regionálnych lymfatických uzlín. S-proteín má zásadné postavenie pri prirodzenej infekcii a pri indukcii vírus-neutralizačnej imunitnej odpovede. Imunitná odpoveď po aplikácii mRNA vakcín je komplexná a pozostáva tak z tvorby špecifických protilátok, rozvoja špecifickej bunkovej imunity a zo špecifického cytokínového spektra (tvorba interferónov). Aktivácia špecifickej celulórne imunity – cytotoxických a pomocných T-lymfocytov je nevyhnutná na tvorbu vysokošpecifických neutralizujúcich protilátok B-lymfocytmi. Následne mRNA degraduje a v žiadnom prípade neprechádza do jadra bunky a ani sa neintegruje do jadrovej DNA.

mRNA vakcína BNT162b1 30 ug (Pfizer/BioNTech), Comirnaty

Na Slovensku bola 26. 12. 2020 ako prvá použitá vakcína od spoločnosti Pfizer/BioNTech. Ide o inovatívny koncept vakcín. Aj táto vakcína vznikla na platforme predchádzajúcich experimentálnych vakcín

VYPRACOVALA

MUDr. Renáta Lenártová, PhD.
Medirex, a.s.

proti ochoreniam ako ebola, chrípka, besnota, Zika vírus. Na základe dát analýzy predloženej v schvalovacom procese bola dokázaná 95 % účinnosť vakcíny proti symptómom COVID-19.

mRNA-1273 100 ug (Moderna)

Vakcína schválená týždeň po predchádzajúcej vakcíne. Vakcína má 94,1 % účinnosť. U osôb nad 65 rokov bola zistená efektivita 86,4 %. Účinnosť prevencie ťažkých prípadov (sekundárne sledovaný ukazovateľ) bola 100 %.

CVnCoV 12 ug (CureVac)

Európska agentúra pre liečivá (EMA) začala 12. 2. 2021 tzv. rolling-review proces pre mRNA vakcínu od firmy CureVac. Táto vakcína obsahuje najnižšie množstvo mRNA a nevyužíva modifikované nukleotidy. Očakáva sa mierne odlišné spektrum imunologickej odpovede s dôrazom na tvorbu interferónov a cytotoxickéj odpovede. Potvrdzujú to dáta z prvých fáz štúdie, kde očkované osoby tvorili protilátky na úrovni pacientov po prekonanom COVID-19.

Adenovírusové vektorové transgénové vakcíny

Technológia adenovírusových vektorových vakcín je už desaťročia testovaná v prevencii rôznych infekčných ochorení – chrípky, malárie, HIV, TBC, Zika vírusu či eboly.



Podstatou vakcín je replikačne defektný adenovírus, do ktorého genómovej DNA bola prenesená a integrovaná informácia o štruktúre S-proteínu SARS-CoV-2. Genóm vírusu bol modifikovaný tak, aby sa nemohol množiť a integrovať do ľudskej DNA. Po aplikácii vakcíny sa adenovírus dostáva intracelulárne a dopraví svoj genóm až do jadra bunky. Uvedený transgén sa neintegruje do DNA človeka a zostáva epichromozomálne lokalizovaný. V procese transkripcie vzniká v jadre z adenovírusovej DNA molekula mRNA, ktorá prechádza do cytoplazmy, resp. endoplazmatického retikula a vytvára komplex s ribozómami. V procese translácie sa stáva predlohou pre proteín S, ktorý sa po syntéze dostáva na povrch bunky, resp. je drénovaný do regionálnych lymfatických uzlín, kde indukuje bunkovú a humorálnu imunitnú odpoveď.

Vakcína AstraZeneca/Oxford

Vakcína je skonštruovaná na šimpanzom adenovíruse, ktorý obsahuje DNA s dĺžkou 6 214 báz kódujúcu proteín S a iné regulačné oblasti. Z posthoc analýzy vyplýva, že predĺženie intervalu 2. podania nad 9 až 12 týždňov má pozitívny vplyv na koncentráciu protilátok v porovnaní s podaním do 6. týždňa. Máme už dostupné dáta o účinnosti vakcíny v reálnej praxi, pričom v Anglicku sa potvrdila účinnosť vakcíny 60 – 75 % na symptomatický COVID-19 u osôb nad 70 rokov.

Vakcína Janssen/Johnson & Johnson

EMA začala 16. 2. 2021 posudzovať podmienené schválenie vakcíny Ad26.CoV2.S, ktorú podrobujú od 1. 12. 2020 tzv. rolling-review procesu. Schválená na používanie v EÚ bola 17. 3. 2021. Efektivita proti závažnému COVID-19 po 28. dni bola 85 %. Bola odporučená na použitie aj v krajinách, kde kolujú nebezpečné mutácie koronavírusu SARS-CoV-2.

Vakcína Sputnik V (Gamaleya NRCEM)

Dňa 4. 3. 2021 začala EMA posudzovať tzv. rolling-review proces vakcíny Sputnik V, pričom Slovensko priviezlo mimoriadne vakcínu 1. 3. 2021. Ide o dvoj dávkovú vakcínu, ktorá s odstupom 21 dní kombinuje rôzne adenovírusové nosiče. Pri prvom

podaní sa aplikuje vakcína s obsahom rAd26 a pri druhom rAd5. Výsledky predbežnej analýzy tretej fázy klinického skúšania na 21 977 osobách boli publikované v časopise The Lancet. Účinnosť v prevencii RT-PCR potvrdeného symptomatického COVID-19 po 21. dni od 1. dávky vakcíny bola 91,6 %. Účinok na závažný COVID-19 bol predbežne 100 %.

Kontraindikácie a indikácie použitia vakcín

Vzhľadom na fakt, že ide o neživé vakcíny, reálnych kontraindikácií je relatívne málo. Medzi základné patria:

- akútne prebiehajúce febrilné infekčné ochorenie – odklad 2 týždne po konci príznakov,
- nestabilné a nekompensované chronické zápalové ochorenie,
- nestabilné a nekontrolované demyelinizačné ochorenie,
- pacienti s anamnézou ťažkých anafylaktických reakcií po očkovaní alebo po iných alergénoch.

Zdravotníci predstavujú dôležitú skupinu vysokorizikových jedincov plne indikovaných na vakcináciu.

Medzi najočakávanejšie udalosti tohto obdobia bezpochyby patrí príchod vakcín proti ochoreniu COVID-19. Nové vakcíny sú odrazom vývoja a výskumu v oblasti vakcinológie počas niekoľkých desaťročí. Aj na základe predchádzajúcich mesiacov je zrejme, že iná možnosť ukončenia pandémie ako vakcinácia v súčasnosti neexistuje.

Literatúra

1. Jeseňák M, Košťuriak R, Petrisková J. Základné informácie v súvislosti so začatím očkovania proti ochoreniu COVID-19 (Info-Letter 1).
2. Harrison EA, et al. Vaccine confidence in the time of COVID-19. Eur J Epidemiol 2020;35:325–330.
3. <http://www.vakcinace.eu/doporuceni-a-stanoviska>
4. Portál ŠÚKL.
5. Národná stratégia očkovania proti ochoreniu COVID-19 v podmienkach SR.
6. Jeayathan M, et al. Immunological considerations for COVID-19 vaccine strategies. Nat Rev Immunol 2020; 20: 615–632.

Očkovanie očami

MUDr. Emílie Dulinovej z oddelenia klinickej biochémie z Centrálného laboratória v Košiciach

Naše telo môže získať imunitu dvoma spôsobmi. Buď tak, že ochorie, alebo po očkovaní. Ak však ochorieme na covid, hrozia nám veľmi vážne komplikácie – 40 % ľudí zvládne covid s ľahkým až stredne ťažkým priebehom, 15 % má závažný zápal pľúc a 5 % má život ohrozujúce komplikácie so syndrómom akútnej respiračnej tiesne, dochádza u nich k multiorgánovému zlyhaniu a až k smrti.

Problém je, že nikto nemá istotu, že keď ochorie, bude patriť do tej prvej najľahšej skupiny. Nemôžeme si vybrať, ale máme možnosť vybrať si očkovanie ako tú príjemnejšiu cestu k získaniu imunity. Dnešné vakcíny prešli masívnymi klinickými skúškami a dlhodobé vedľajšie účinky nie sú prakticky reálne, na rozdiel od dlhodobých následkov ochorenia COVID-19.

Imunológia a vakcinácia sú tu už veľmi dlho. Masívne očkovanie má u nás 70-ročnú históriu a odborníci majú veľké skúsenosti v tejto oblasti. Nie je preto dôvod na obavy. Skôr vidím dlhodobé následky u ľudí, ktorí prekonali COVID-19 so závažnejším priebehom. Toto ochorenie je tu už rok a my sledujeme rastúci počet ľudí s postcovidovým syndrómom, ktorý mnohým bráni zaradiť sa späť do normálneho života.

Moje očkovanie sa realizovalo v čase, keď bola na Slovensku k dispozícii vakcína od spoločností Pfizer a BioNTech a keď prebiehalo očkovanie zdravotníkov prichádzajúcich do priameho styku s covid pozitívnymi. Klinické skúšky vakcín Comirnaty sa robili na oveľa väčšom počte dobrovoľníkov, než bolo doteraz bežné pri iných vakcínach. To znamená, že mnoho z toho je v našej psychike. Som zaočkovaná už aj druhou dávkou proti covidu. Po prvej dávke som cítila iba bolesť v mieste vpichu, druhý raz ani to nie. Ale to ja ani nepovažujem za vedľajší nežiaduci účinok.



Je to skôr očakávaná reakcia ako bolesť hlavy, svalov, zvýšená teplota, únava.

Táto vakcína je úplne nového typu, aký doposiaľ nikdy v histórii ľudskej medicíny nebol použitý na ľuďoch. Aj vírus SARS-CoV-2 je nový, doteraz sa u ľudí nevyskytol. Očkovanie vo všeobecnosti nevedie k spusteniu autoimunitného ochorenia ani k zhoršeniu priebehu už existujúcej choroby. Iba u konkrétnej skupiny jedincov s genetickou predispozíciou sa môže teoreticky podieľať na komplikovaných a komplexných mechanizmoch ochorenia.

Ochota dať sa zaočkovať súvisí s pocitom ohrozenia epidémiou koronavírusu. Vidím, že ľudia si uvedomujú opätovný nárast šírenia koronavírusu a chápu jeho dôsledky. Spolu s antibiotikami sa vakcíny považujú za jeden z najväčších výdobytkov medicíny. „Najrizikovejšia je tá vakcína, ktorá sa nepodala.“ Nie všetci sme odborníkmi na imunológiu, preto sa aj mnohí pozerajú na očkovanie očami laickej verejnosti a boja sa ho. Treba sa spoľahnúť na odporúčania odborníkov v tejto oblasti. Používam ešte respirátor, rešpektujem pravidlá, ktoré u nás platia a zároveň je to ohľaduplné voči ostatným ľuďom.

Po prvej dávke očkovania vzniká len čiastočná imunita a človek môže ešte ochorieť. Preto je respirátor dôležitý. Po druhej dávke vzniká želaná imunita po 14 dňoch, dovtedy sa tiež treba chrániť respirátorom.

Ľudia čakajú, že vakcína je niečo ako štít, ktorý vírus dnu vôbec nepustí. Ak ste však už zaočkovaní a vírus vdýchnete, vaše telo si okamžite spomenie, že s jeho bielkovinou už v kontakte bolo a spustí sa imunitná reakcia. Vďaka nej sa vírus nestihne začať množiť a ochorenie u vás neprepukne.

V prípade mutácií vírusu nie je očkovanie zbytočné. Vždy platí skrížená imunitná reakcia. Ak by aj človek ochorel, priebeh ochorenia bude mať ľahší, než keby nebol zaočkovaný vôbec.

Dôležitejšie je uvedomiť si, že mladý človek môže nakaziť svojich rodičov, starých rodičov a tam sa už môže ochorenie skončiť veľmi zle. Preto je dôležité, aby sa dali zaočkovať aj mladí.



COVID-19: Dobrovoľné alebo povinné očkovanie?

VYPRACOVAL

Mgr. Dominik Slezák
Medirex Servis, s. r. o.

Pandémia nastolila v našej spoločnosti množstvo nových otázok. Očkovanie je pravdepodobne jednou z najrozporupnejších zo všetkých. Táto bezprecedentná doba rozpútala celospoločenské diskusie o tom, či by očkovanie proti ochoreniu COVID-19 malo byť povinné, či by sa formou motivácie malo umožniť zaočkovaným požívať dopredu určené výhody, alebo či by očkovanie malo byť založené výlučne na princípe dobrovoľnosti a spoločenskej zodpovednosti jednotlivcov. Faktom je, že veľká časť z nás s cieľom ochrany seba a svojich blízkych, z pocitu zodpovednosti, z povahy svojho zamestnania či z túžby po normálnom živote podstúpi očkovanie proti ochoreniu COVID-19 dobrovoľne a čo najskôr bude môcť. Čo však tí, ktorí očkovanie odmietajú? Ako je to v podmienkach SR s povinným očkovaním a môže sa očkovanie proti ochoreniu COVID-19 stať povinným?

Predovšetkým treba uviesť, že Slovenská republika je jednou z viacerých európskych krajín, ktorých legislatíva *inštitút povinného očkovania* už dávno pozná. Právnym základom povinného očkovania osôb u nás je § 51 ods. 1 písm. d) zákona č. 355/2007 Z. z. o ochrane, podpore a rozvoji verejného zdravia (ďalej len **Zákon o VZ**), pričom podrobnosti a rozsah povinného očkovania stanovuje vyhláška Ministerstva zdravotníctva SR č. 585/2008 Z. z., ktorou

sa ustanovujú podrobnosti o prevencii a kontrole prenosných ochorení (ďalej len **Vyhláška MZ SR**). Súlad povinného očkovania s Ústavou SR uznal aj Ústavný súd SR, keď vo svojom náleze z roku 2013 konštatoval, že povinné očkovanie je v plnej právomoci štátu v oblasti verejného zdravotníctva.¹ Podrobiť sa povinnému očkovaniu pod hrozbou sankcie je povinná každá osoba po dosiahnutí istého veku alebo vykonávajúca istú profesiu okrem osoby, ktorá preukáže závažnú zdravotnú alebo inú lekárske zdôvodnenú výnimku z povinného očkovania, inými slovami tzv. *kontraindikáciu*.² Súbor povinných očkovaní podľa prílohy č. 2 a prílohy č. 2a Vyhlášky MZ SR zahŕňa očkovania proti *záškrtu, osýpkam, mumpsu, ružienke, tetanu, čiernemu kašľu, vírusovému zápalu pečene typu B, hemofilovým invazívnym nákazám, detskej obrne a pneumokokovým invazívnym ochoreniam*. Ochorenie COVID-19 sa teda v tomto zozname zatiaľ nenachádza a očkovanie proti tomuto ochoreniu je teda očkovaním dobrovoľným. Schválne uvádzame zatiaľ, pretože nie je vylúčené, že sa tento prístup v budúcnosti vzhľadom na vysokú nákazlivosť a smrtnosť ochorenia COVID-19 a jeho schopnosť rýchlo a často mutovať bude prehodnocovať.

Článok 8 ods. 1 Dohovoru o ochrane ľudských práv a základných slobôd (ďalej len **Dohovor o ochrane ĽP**) každému garantuje právo na ochranu súkromného života, súčasťou ktorého je aj fyzická integrita a sloboda dávať súhlas na zásahy do nej. Taktiež článok 5 Dohovoru o ľudských právach a biomedicíne (ďalej len **Dohovor o biomedicíne**) stanovuje, že zásah v oblasti zdravia možno vykonať len so súhlasom dotknutej osoby. Koniec koncov, na koncepte tzv. *informovaného*

súhlasu je postavené celé naše zdravotníctvo.³ *Diagnóza nie je viac než právo a lekár nie je viac než pacient*. Napriek tomu vo viacerých svetových rozvinutých krajinách vrátane Slovenska existuje inštitút povinného očkovania. Môže sa zdať, že ide o protichodné právne princípy alebo dokonca o nesúlad či protirečenie si právnej úpravy, no nie je to tak. Skôr, než s právom na ochranu súkromia jednotlivca totiž treba povinné očkovanie spájať s *právom na osobnú bezpečnosť všetkých ostatných* v zmysle článku 5 Dohovoru o ochrane ĽP. Existujú totiž prípady, keď má verejný záujem spoločnosti prednosť pred individuálnym záujmom jednotlivca. V mnohých krajinách ako Francúzsko, Česká republika, Poľsko, Slovenská republika alebo Taliansko sa preto prijal úzus, podľa ktorého je takýto prípadom napríklad hrozba rýchlo sa šíriacich a nákazlivých ochorení, a preto sa v nich zaviedlo povinné očkovanie celej populácie.

V súvislosti s ľudskoprávnou konformitou povinného očkovania vykonal český ústavný súd vo svojom náleze z roku 2014 test obmedzenia základného práva jednotlivca na nedotknuteľnosť, v ktorom konštatoval, že napriek tomu, že povinné očkovanie je značným zásahom do súkromia a fyzickej integrity človeka, ide o *nevyhnutné zákonné opatrenie, ktoré sleduje legitímny cieľ nedosiahnuteľný iným spôsobom, ktorým je minimalizácia šírenia infekčných ochorení v záujme ochrany verejného zdravia obyvateľov štátu*.⁴ O argumente v prospech uvedeného svedčí aj článok 8 ods. 2 Dohovoru o ochrane ĽP, ktorý stanovuje ako jednu z výnimiek z práva na súkromie osoby práve *ochranu zdravia spoločnosti a verejnú bezpečnosť*, alebo tiež článok 26 už spomínaného Dohovoru o biomedicíne,

1 Nález Ústavného súdu SR, PL. ÚS 10/2013.

2 Rozhodnutie Krajského súdu v Prešove, sp. zn. 3S/6/2015 z 29. februára 2016.

3 § 6 a nasl. zákona č. 576/2004 Z. z. o zdravotnej starostlivosti, službách súvisiacich s poskytovaním zdravotnej starostlivosti a o zmene a doplnení niektorých zákonov v znení neskorších predpisov.

4 Nález Ústavního soudu ČR, PL. ÚS 19/14.

ktorý hovorí o tom, že výkon práv môže podliehať obmedzeniam potrebným v záujme verejnej bezpečnosti a ochrany verejného zdravia za predpokladu, že sú uložené zákonom. Štatistickým dôkazom o efektívnosti a opodstatnenosti povinného očkovania je pokles alebo úplná eliminácia niektorých infekčných ochorení v našich podmienkach, ako napríklad osýpky (s povinným očkovaním sa začalo v roku 1969 a od počiatku 90. rokov už ochorenie prakticky neexistuje) alebo detská obrna (povinné očkovanie od roku 1957, od roku 1961 sa ochorenie u nás nevyskytuje). Z uvedeného je zrejmé, že v prípade, ak by došlo ku konsenzu o zavedení povinného očkovania proti ochoreniu COVID-19, právne predpoklady na takéto rozhodnutie by pravdepodobne boli naplnené a takéto rozhodnutie by bolo v súlade s právnym poriadkom.

Je však nutné zaoberať sa aj tzv. *princípom proporcionality* – teda, či je celospoločenský prínos, ktorý poskytuje povinné očkovanie, vyšší, než ujma jednotlivca, ktorá je mu spôsobená porušením jeho práva nedať sa očkovať. Očkovanie, ktorého právnym základom je Zákon o VZ, je pritom zďaleka najúčinnnejším nástrojom proti šíreniu nákazlivých ľudských chorôb, akými je práve koronavírus SARS-CoV-2. Vzhľadom na schopnosť koronavírusu ochromiť hospodárstvo krajiny, paralyzovať akýkoľvek spoločenský život a páchať bezprecedentné hospodárske škody je celospoločenský prínos, ktorý by prinieslo jeho potlačenie, nesporne obrovský. Preto ustanovenie celoplošného povinného očkovania za podmienky existencie maximálne účinnej, bezpečnej a dostupnej vakcinačnej látky pre všetkých by bolo v plnom súlade s právnym poriadkom Slovenskej republiky, medzinárodnými dohodami, právnou doktrínou aj s uvedeným princípom proporcionality.

Situácia je zložitejšia vo vzťahu k prípadným sankciám za porušenie povinnosti podrobiť sa povinnému očkovaniu. V zásade jedinou sankciou, ktorú má štát v takejto situácii k dispozícii, je pokuta podľa § 56 ods. 3 vo výške 331 €. Teoreticky ešte prichádza do úvahy naplnenie skutkovej podstaty trestného činu *šírenia nebezpečnej nákazlivej ľudskej choroby* podľa § 163 zákona č. 300/2005 Z. z. Trestný zákon, ale pre jej naplnenie by daná osoba naozaj musela dané ochorenie mať a prenášať. Okrem toho je vždy potrebné brať ohľad na základné ľudské práva a slobody, ktoré

nemožno za žiadnych okolností ľuďom odoprieť. Na jednej strane teda existuje povinnosť podrobiť sa povinnému očkovaniu pre každú fyzickú osobu v zmysle Vyhlášky MZ SR, avšak na druhej strane diapazón nástrojov a systém sankcií, ktorými štát disponuje pri vynucovaní tejto povinnosti, je nepomerne slabší a limitovaný ústavou garantovanými slobodami každej fyzickej osoby.

V súvislosti s povinnosťou, resp. dobrovoľnosťou očkovania sa momentálne otvára ďalšia problematická otázka – je legislatívne a morálne prijateľné, aby očkovaní ľudia mohli užívať výhody oproti neočkovaným ľuďom? O scenári, ktorý by ešte pred dvoma rokmi znel ako z románu 1984 od G. Orwella, sa hovorí stále častejšie a je celkom možné, že spoločný konsenzus bude prijatý na celoeurópskej úrovni. Ako bolo uvedené, očkovanie proti ochoreniu COVID-19 je momentálne dobrovoľné. To okrem iného znamená, že samotné očkovanie ani výber značky vakcinačnej látky nie sú právne nárokovateľné. Je teda možné z dlhodobého hľadiska mimo všetkých núdzových stavov a mimoriadnych situácií nezaočkovaným osobám zakazovať účasť na hromadných podujatiach, používať MHD, navštevovať parky či chodiť do školy? V takejto situácii treba brať do úvahy aj princíp nediskriminácie. Teória verejných statkov hovorí, že sú pre všetkých a z ich užívania nemožno vylúčiť nikoho. Dobrovoľnosť očkovania proti ochoreniu COVID-19 v súčasnosti zapríčiňuje, že by bolo veľmi náročné odôvodniť, prečo v dôsledku neuplatnenia si práva dať sa očkovať má byť takáto osoba de facto sankcionovaná. Z podstaty takéhoto opatrenia ide o diskrimináciu. Inak povedané, ukladanie sankcie za nesplnenie niečoho, čo nie je povinné, je len ťažko odôvodniteľné a ospravedlňiteľné. To isté platí pre podmieňovanie prístupu k verejným statkom splnením dobrovoľnej možnosti (oprávnenia). Istá forma obmedzení, ktorá by bola v súlade s princípom proporcionality, prichádza do úvahy, avšak určite nie skôr, než bude široko dostupná bezpečná vakcinačná látka pre kohokoľvek, kto sa bude chcieť dať zaočkovať. Už dnes vieme, že napríklad zamestnávateľ nesmie nútiť svojho zamestnanca, aby podstúpil očkovanie v prípade, že to charakter jeho práce alebo Vyhláška MZ SR explicitne nevyžadujú. Prečo a na základe čoho by teda takáto osoba mala byť znevýhodnená v inej situácii? Kým takýto postup by možno bol v súlade s princípom proporcionality, veľmi ťažko by bol obhájitelný jeho súlad

s princípom nediskriminácie. Ľudské práva a slobody, medzi ktoré rozhodne patria sloboda pohybu alebo právo na vzdelanie, možno obmedziť len na základe zákona, s jasným a zreteľným účelom a len so zreteľom na princípy proporcionality a nediskriminácie. Situácia je mierne odlišná v prípade súkromných prevádzok a služieb. V zásade možno konštatovať, že obmedzenie poskytovania služieb a zákaz prístupu k službám pre nezaočkované osoby na účely ochrany vlastného zdravia, zdravia svojich zamestnancov či iných klientov je zo strany podnikateľov v poriadku. Uvedené, samozrejme, platí s poukazom na rešpektovanie vyššie uvedených princípov.

Na záver konštatujeme, že problematika povinného očkovania a jeho ľudskoprávna konformita sa vyznačuje komplexnosťou a že takmer žiaden právny názor nie je definitívny a nemenný. Spoločnosť sa aj vďaka pandémie vyvíja a to, čo platilo pred rokom, už dnes platí nemusí a to, čo platí v jednej rovine, nemusí platiť v rovine druhej. V podmienkach Slovenskej republiky však nie je inštitút povinného očkovania ničím novým. Jeho efektívnosť a súlad s právnym poriadkom, medzinárodnými dohodami a právnou doktrínou boli viackrát preukázané. Právny rámec a dôvody na zavedenie povinného očkovania v súvislosti s pandemiou koronavírusu SARS-CoV-2 sú dané, hoci štát sa v súčasnosti rozhodol ísť cestou dobrovoľného očkovania. Je jasné, že sa tohto prístupu bude chcieť držať čo najdlhšie vzhľadom na vlnu nevoľe, ktorú by spôsobilo ustanovenie povinného očkovania. Problémom však naďalej ostáva, ako za takto stanovených podmienok zabezpečiť, aby sa dalo zaočkovať dostatočné množstvo ľudí. Situácia je odlišná v prípade zvyhodňovania zaočkovaných ľudí na úkor nezaočkovaných. Ako sme uviedli, za súčasných podmienok nie je pri dobrovoľnosti očkovania žiaduce, aby ľudia, ktorí sa slobodne rozhodnú nezaočkovať sa (či už zo strachu z nedostatkov klinických skúšaní vakcín, alebo z iných dôvodov), boli za takéto rozhodnutie sankcionovaní tým, že im bude odopretý prístup k bežným verejným statkom ako hromadná doprava, vysoké školy alebo verejné priestranstvá. Inými slovami, štát v takomto prípade nemá k dispozícii dostatočné nástroje, ako zabezpečiť potrebnú mieru zaočkovanosti populácie a musí sa spoliehať na ochotu svojich obyvateľov. Verme teda, že aj pri takto nastavených podmienkach a limitoch čoskoro budeme môcť náš súboj s pandemiou považovať za vyhraný.

Ako si vynahradiť wellness v domácom prostredí

Donedávna sme boli odkázaní len na domácu wellness starostlivosť, čo nás inšpirovalo k tvorbe tohto článku. Prinášame vám v ňom tipy wellness manažérky Hotela Lomnica Tamary Saxovej, ako svoj organizmus zbaviť napätia a dopriať mu hĺbkovú regeneráciu. Pre milovníkov profesionálnej starostlivosti však dávame do pozornosti, že v súčasnosti si už môžete vychutnať pôžitok z profesionálnych wellness procedúr a ošetrovať priamo v Hoteli Lomnica.

Navodte si pokojnú atmosféru na relaxáciu

Kúzeľa kúpeľa nespočíva len v ponorení sa do vane s horúcou vodou. Aj keď si to neuvedomujeme, organizmus citlivo reaguje na priestor, ktorý nás obklopuje, a preto si urobte čas na premenu vašej kúpeľne na oázu pokoja. Pre navodenie uvoľňujúcej atmosféry je potrebné z nej odstrániť všetky rušivé elementy. Stlmiť svetlo a doplniť ho sviečkami, aby ste ulavili aj unaveným očiam. Priestorom nechajte znieť obľúbenú hudbu, pozor však na jej hlasitosť, v pokoji ju budete vnímať oveľa intenzívnejšie a jasnejšie.

Pripravte si uvoľňujúci kúpeľ

Pri naplňaní vane uprednostnite teplejšiu vodu, aby vám počas kúpeľa príliš nevychladla a neobrala vás o komplexný relaxačný zážitok. Hrejivý kúpeľ je ideálne obohatiť o doplnky, ktoré mu dodajú liečivý účinok. „Stačí, keď sa pohráte s alchýmiou toho, čo nájdete doma. Najdôležitejšou prísadou je soľ. Funguje ako špongia, ktorá do seba vtiahne toxíny a negatívnu energiu. Použiť môžete aj sódu bikarbónu, suché kvety levandule, nechtíka lekárskeho, harmančeka alebo kvapky esenciálneho oleja, ako napríklad borovicu, bergamot či eukalyptus. Fantázii sa medze nekladú,“ poznamenáva Tamara Saxová.

Aby ste sa zbytočne nepripravili o ich vzácne benefity, pamätajte na správne načasovanie. „Pri aplikácii doplnkov do kúpeľa je vhodné byť už ponorený vo vode a predísť tak ich rozpúšťaniu počas naplňovania vane. V tejto fáze sa totiž do priestoru uvoľňujú vonné zložky, ktoré inhaláciou blahodarné pôsobia na telo a myseľ.“

Stačí už len zatvoriť oči a odpojiť sa od okolitého sveta. Na utíšenie myšlienok vám



pomôže pohár kvalitného vína. Jeho výber nepodlieha žiadnym špeciálnym odporúčaniam, ideálne je vybrať si podľa vlastných chutí. Ak však potrebujete s výberom poradiť, obráťte sa na e-shop s vínom www.eshop.selavi.sk, kde nájdete odborne selektovaný someliérsky výber slovenských a zahraničných vín.

V kúpeľi odporúčame zotrvať minimálne 20 minút pre dôkladnú absorpciu esencií, ale prvoradé je naslúchať svojmu telu, koľko zvládne.

Domáca masáž na dokonalé uvoľnenie svalstva

Kúpeľ je ideálnym spôsobom, ako prehriať svalstvo a pripraviť ho na následnú masáž. Nemusíte sa obávať, základné tahy hravo zvládnete aj doma so svojou polovičkou.

„Začnite nanášaním oleja, ktorý je určený na pokožku tela, najlepšie panenským s prídavkom esenciálnych olejov. Aj v našom Wellness Valéria v Hoteli Lomnica preferujeme výlučne kozmetiku založenú

čisto na prírodnej sile slovenských bylín. Odporúčam siahnuť po levanduli, rozmaríne či medovke, ktoré zvýraznia uvoľňujúce účinky masáže,“ radí T. Saxová.

Na uvoľnenie svalstva vám postačia príjemné „hladkacie“ hmaty. Zložité masérské techniky nechajte radšej na profesionálov.

„Všetky hmaty by mali smerovať zdola nahor, teda od nôh k hlave. Snažte sa pozitívne myslieť a silou mysle vplývať na oblasť, ktorej sa práve venujete. Na dosiahnutie celkovej úľavy tela premasírujte aj chodidlá a dlane.“

Vyhňte sa pritom menej chráneným a tým citlivejším miestam, ako sú oblasť obličiek, kolenná a laktová jamka.

Nezabúdajte na dostatočný pitný režim na odplavenie toxínov, ktoré ste vďaka relaxu uvoľnili. Ku kompletnej hĺbkovej regenerácii tela a duše vám zostáva už len jediný – dlhý a kvalitný spánok.

Časopis laboratórnej medicíny **labMED**
Vydáva **MEDIREX GROUP ACADEMY** n. o.

REDAKCIA:
MEDIREX GROUP ACADEMY

KONTAKT:
redakcia@medirexgroup.sk, +421 2 20 82 91 26

REDAKČNÁ RADA:
MUDr. Katarína Schenková
MUDr. Jana Bednárová
RNDr. Renata Lukačková, PhD.
RNDr. Ľubica Majerová, PhD.
RNDr. Elena Tibenská, PhD.
RNDr. Renáta Lenártová, PhD.
RNDr. Marcela Popovňáková
MUDr. Peter Bohuš
RNDr. Miroslava Póczová, PhD.
prof. RNDr. František Ondriska, PhD.
MVDr. Juraj Kulčár, MBA
Ing. Daniel Rušin
Ing. Natália Čierniková
JUDr. Karolína Abou Rjeili
Mgr. Dominika Ištocy Litvinová
Ing. Jozef Gavlas, MSc.
Mgr. Mária Kičinková
MUDr. Pavol Janega, PhD.

REDAKČNÉ SPRACOVANIE:
Mgr. Miroslava Lipovská

WEB:
www.medirexgroupacademy.sk

Vychádza ako občasník, ISSN 1339-7192.

DIZAJN A PRODUKCIA: MAYER/McCANN-ERICKSON, s.r.o.
Redakcia nezodpovedá za obsah doručenej inzercie.

