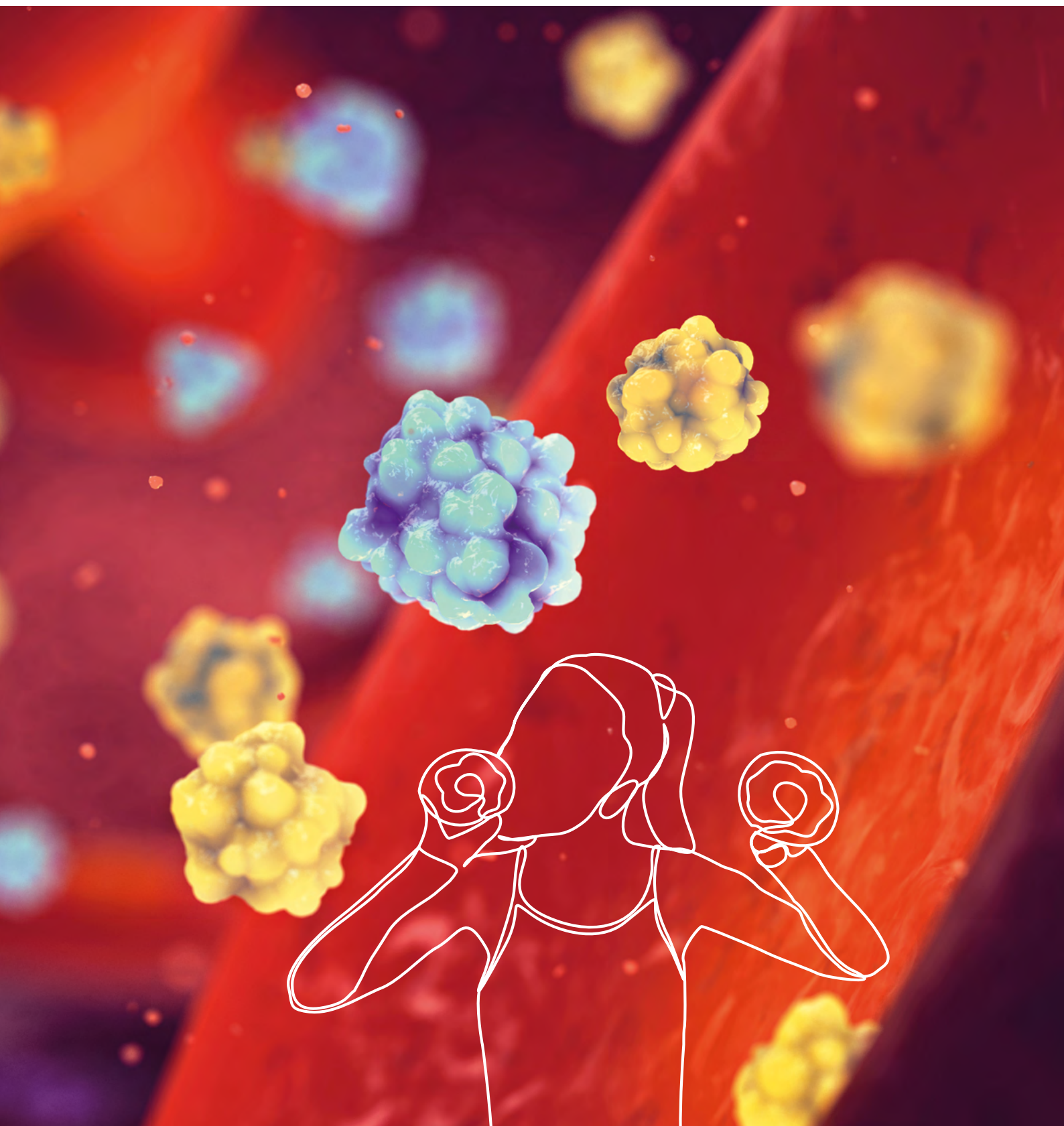


# LABOR AKTUELL

ročník 24 | číslo 3-4 | rok 2020

Časopis pro klienty Roche Diagnostics v České a Slovenské republice



Vážení čtenáři,

zákeřný vir se bohužel stále staví mezi nás, naše rodiče, prarodiče a ohrožené skupiny. Je mezi námi hodně těch, kteří COVID-19 prodělali, dokonce i vícekrát. Někteří téměř bez příznaků, jiní s většími či menšími komplikacemi. Další, často přestože to nikdo nečekal a měli život ještě před sebou, již nejsou mezi námi. Upřímnou soustrast všem, kdo je zasažen ztrátou.

Také se jako já ptáte, jak je to možné? Vyrostla jsem v době studené války, nejzávažnější hrozbou posledních let byly teroristické útoky. Představa, že svět včetně naší malé bezpečné kotliny zasáhla epidemie, se zdála vyčichlým sci-fi tématem. Uspání dlouhodobou stabilitou jsme nyní celosvětovou pohromou vykojení. Onemocnění není stále prozkoumané, informace se skládají do obrazu velice postupně jako náročná mozaika. Mezi mnohými střípky doporučuji zajímavý článek MUDr. Vladimíra Malce, Ph.D. (Onkologická klinika SZU, Nemocnica L. Pasteura, Bánská Bystrica), který rozvíjí hypotézu o genetické predispozici k závažnému průběhu onemocnění v populaci italské Lombardie a ve Španělsku.

Diabetici patří do ohrožené COVID-19 skupiny, a to zejména v případě, že jejich cukrovka není zcela pod kontrolou. Sledování a úprava léčby diabetiků jsou proto důležitější než kdy jindy. Pokud dojde k pozdržení adekvátní terapie kvůli odložení či vynechání pravidelných kontrol u lékaře (což je

v „době covidové“ nasnadě), může to pacienta dramaticky poškodit. Právě zde je místo pro jedinečný a nenahraditelný marker – HbA<sub>1c</sub>. Lze ještě něco dodat ke stanovení glykovaného hemoglobinu? Ano! Toto číslo časopisu je věnováno klinické hodnotě stanovení HbA<sub>1c</sub> a rovněž přehledu dostupných metod a zkušeností s nimi.

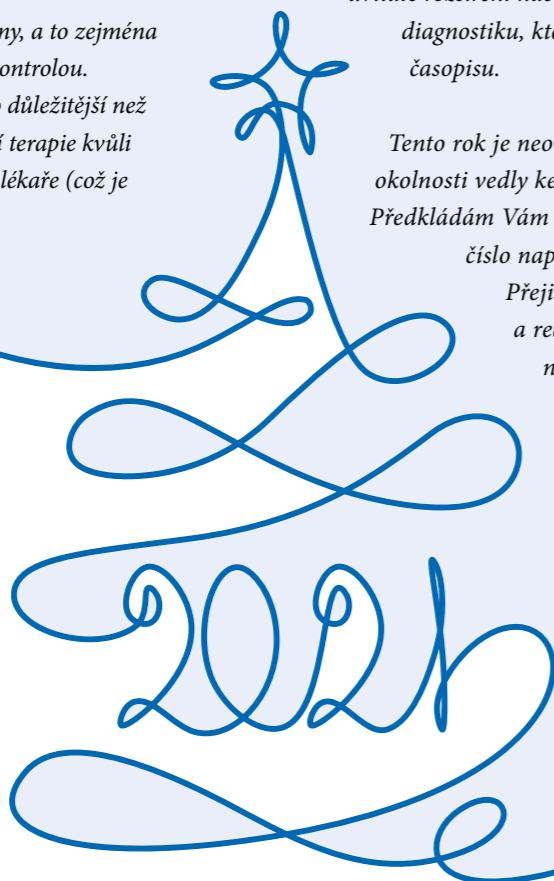
V době pandemie narůstá i počet a závažnost kardiovaskulárních onemocnění. To je celkem pochopitelné. Dovedu si představit, že poctivý kardiak je poslušný nařízení vlády, nikam nechodí a už vůbec ne po zdravotních procházkách! K lékaři na kontrolu raději také ne – „ještě bych tam něco chytil!“. Jak dlouho to ale takto vydrží? Velice mne proto nadchl článek MUDr. A. Nováka o jeho zkušenostech s NT-pro BNP, spatřuje totiž určitou analogii mezi vyšetřením NT-pro BNP a HbA<sub>1c</sub>. Své poznatky ilustruje na kazuistikách přímo ze života.

Máme zimu. Každý, kdo kýchne či zakašle, je hned suspektní, a i když výskyt respiračních onemocnění a chřipky není asi na úrovni předchozích let, je každé zvýšení teploty zkoumáno pod drobnohledem. A protože klinické znaky jsou u COVID-19 velice podobné jako u chřipky, určitě uvítáte rozšíření nabídky Roche testů o diferenciální diagnostiku, které rovněž zmiňujeme v našem časopisu.

Tento rok je neobvyklý i pro Labor Aktuell – okolnosti vedly ke spojení vydání čísla 3 a 4. Předkládám Vám tímto poslední letošní (dvoj) číslo naplněné aktualitami k prasknutí. Přeji Vám nejenom za sebe a redakci časopisu, ale i za celou naši společnost hodně chuti do života, nadšení, radosti a hodně pohody se svými blízkými – byť nyní i jen po telefonu. A to nejen po čas svátků, ale i v nadcházejícím roce 2021!

Kateřina Málková  
šéfredaktorka časopisu

Děkujeme za přízeň  
v tomto roce  
a do nového roku  
přejeme především  
hodně zdraví Vám  
i Vaším blízkým!



**KLINICKÁ HODNOTA DIAGNOSTIKY**



Sepse a personalizovaná medicína  
doc. MUDr. Miroslav Průcha, Ph.D.

4



Je jedno „ECHO“ lepší než 1 000 vyšetření NT-proBNP?  
MUDr. Antonín Novák

7



Komplexní management preeklampsie  
doc. MUDr. Tomáš Binder, CSc.

12



Aktivity také s aktivním vitaminem B12  
RNDr. Pavel Škrabálek, RNDr. Jana Hradiská, Ph.D.

16



HbA<sub>1c</sub> 2020  
prof. Oliver Rácz, M.D., Ph.D.

23



Přehled metod a principů stanovení HbA<sub>1c</sub>  
redakční příspěvek

27



Co by měl diabetický pacient vědět o glykovaném hemoglobinu  
MUDr. Monika Kamarytová

32

**ZKUŠENOSTI Z LABORATOŘÍ**



Praktické zkušenosti so stanovením HbA<sub>1c</sub> so súpravou A<sub>1c</sub>-3 na cobas c 501  
RNDr. Katarína Lepejová

35



Porovnání výsledků metod HbA<sub>1c</sub> na analyzátoch D-10 (Bio-Rad) a cobas® 8000 c 502 (Roche)  
Mgr. Ondřej Wiewiorka

37



Využitie cobas® Liat® System v diagnostike chřipky  
RNDr. Ján Predný

40



Testování chřipky A/B pomocí systémů cobas® Liat® (Lab In A Tube)  
Mgr. Eva Haburová, Ing. Kristýna Válková

44



Zkušenosti s různými metodami stanovení protilátek proti SARS-CoV-2 v oddělení společných laboratoří Nemocnice Havlíčkův Brod v dubnu až květnu 2020  
MVDr. Václav Fejt

46



Stanovení celkových anti-SARS-CoV-2 protilátek automatizovanou ECLIA: interindividuální variabilita, korelace s virus neutralizačním testem, implikace pro selekci potenciálních dárců rekonvalescentní plazmy  
prim. doc. RNDr. Lenka Zdražilová Dubská, Ph.D.

51

**INOVACE KOLEM NÁS**



Tiskové zprávy: RT-PCR testy společnosti Roche pro testování koronaviru

55

**PŘEDSTAVUJEME...**



Strategické konzultace  
Ing. Vladimír Kozák

57



Novinky na portálu DiaLog  
Ing. Mgr. Barbora Motlová

59

**NOVINKY NA MOJEMEDICINA.CZ**



Karcinom prsu, idiopatické střevní záněty a karcinom jater. Jak je odhalit a vyrovnat se s nimi?  
Mgr. Veronika Bačová

61

**Z KUCHYNĚ ROCHE**



Kyneme... zdravěji trochu jinak  
Ing. Kateřina Málková

63



## Sepse a personalizovaná medicína

doc. MUDr. MIROSLAV PRŮCHA, Ph.D.

Oddělení klinické biochemie, hematologie a imunologie, Nemocnice Na Homolce, Praha

### Jak dále v diagnostice sepse?

V uplynulých letech byla publikována celá řada originálních prací a přehledových review o biomarkerech sepse.<sup>1,2</sup> Závěr je jednoznačný – v současnosti nemáme dostatečně senzitivní a specifický parametr pro infekční zánět. Přitom ale transkriptomické studie prokázaly, že genová exprese u infekčního a neinfekčního zánětu je rozdílná.<sup>3,4</sup> V čem je tedy problém? Je to aktuální dostupnost parametrů, které jsme schopni měřit v plazmě nebo séru a které by měly být specifické jen pro infekční zánět. Tato dostupnost je mimo jiné určena technologiemi, které při stanovení těchto biomarkerů používáme.

Jaká je současná situace v diagnostice sepse? Při diagnostice sepse uplatňujeme dva přístupy, které se navzájem doplňují. Ten první provádí detekci biomarkerů spojených se zánětlivou reakcí organismu na infekci, ten druhý přímou diagnostiku infekčního agens. V obou případech

narážíme na řadu problémů. V prvním případě nemáme dosud k dispozici parametr, který by byl specifický pro infekční etiologii. Sepse je definována jako nepřiměřená imunitní reakce na infekci. Co by tedy měly ukazovat biomarkery sepse? Měly by definovat nebo interpretovat tuto nepřiměřenou imunitní reakci. Jaká je realita, resp. naše současné možnosti? Jsme schopni zjistit a měřit zánětlivou aktivitu organismu, kde nejvíce používanými a měřeními markery sepse v klinické praxi jsou prokalcitonin a C-reaktivní protein.<sup>5,6</sup> Pomocí těchto parametrů stanovujeme a měříme intenzitu zánětlivé odpovědi, která ale není specifická jen pro infekční etiologii. Celá řada neinfekčních onemocnění je spojena s elevací těchto biomarkerů. Autoimunitní, kardiologická onemocnění, ale i iatrogenní působení, jako jsou operační zákroky nebo imunoterapie, jsou asociovaná se zvýšením těchto parametrů.<sup>7,8,9</sup> Stanovení prokalcitoninu a C-reaktivního proteinu patří dnes ke zlatému standardu v diagnostice sepse, ale u žádného z nich není senzitivita a specifita dostatečná. Stále se pohybuje mezi 70 a 85 %, což znamená, že každý pátý vzorek je falešně pozitivní nebo falešně negativní. Z dalších užitečných parametrů je to

stanovení IL-6. Interleukin-6 představuje jeden z nejdůležitějších prozánětlivých cytokinů se širokou škálou účinků jak za fyziologických, tak patologických podmínek.<sup>10</sup> V diagnostice kriticky nemocných jej využíváme pro rozlišení infekční a neinfekční etiologie syndromu systémové zánětlivé odpovědi, nebo pro měření intenzity prozánětlivé aktivity a k predikci klinického výsledku.<sup>11,12</sup> Možnost jeho měření ve statimovém režimu je důležitým předpokladem jeho širokého použití v klinické praxi.

Druhým nedílným přístupem je diagnostika infekčního agens pomocí mikrobiologických klasických kulturačních nebo molekulárně biologických metod. Přestože indikace antibiotické terapie během první hodiny onemocnění již není absolutně spojována s klinickým průběhem a mortalitou onemocnění, včasné nasazení antibiotik stále zůstává prioritou.<sup>13</sup> V případě přímého průkazu infekčního agens nám současné mikrobiologické vyšetřovací metody podstatným způsobem zkrátily čas nezbytný k diagnostice, ale stále ne v dostatečné míře. A jsou zde další limity – detekce anaerobních bakterií, špatně kultivovatelných infekčních agens aj. Metody molekulární biologie dokážou ve velmi krátkém časovém intervalu zjistit přítomnost infekčních agens, ale jsou zde jiná omezení, např. nemožnost stanovení citlivosti na antibiotika.

### Dostupnost a senzitivita metod

U sepse stále platí a bude platit, že rychlost její diagnostiky hraje zásadní roli pro klinický výsledek. Vyšetřování biomarkerů sepse musí být dostupné 24 hodin denně ve statimovém režimu. Pokud se podíváme na technologie, které v současnosti využíváme pro jejich detekci, jedná se o turbidimetrii nebo nefelometrii, popřípadě imunostanovení. Můžeme konstatovat, že za posledních 20 let nebyl objeven žádný nový parametr, jehož stanovení by přineslo zásadní pokrok při diagnostice sepse.

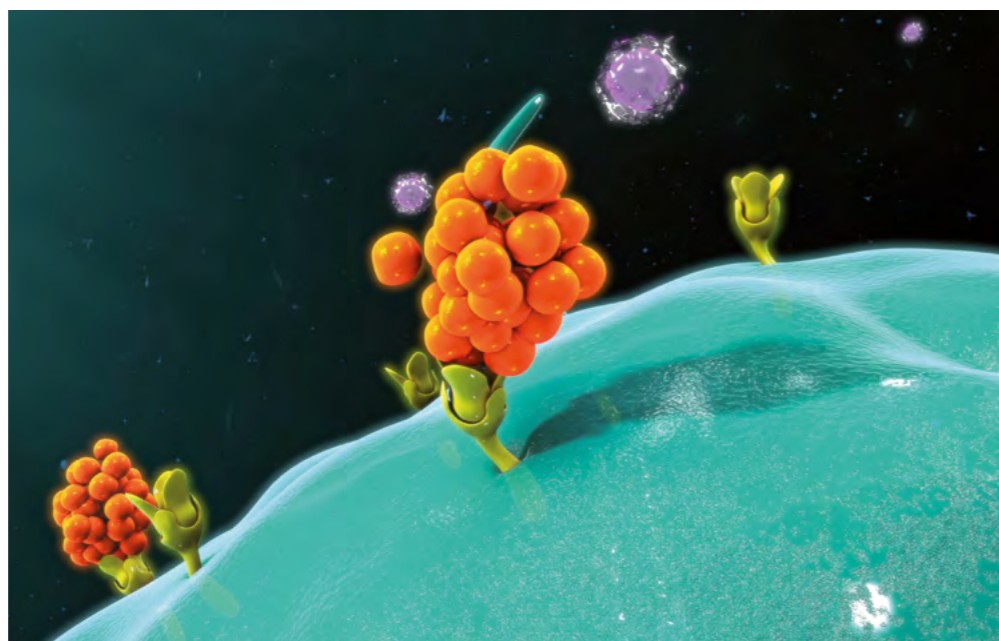
Nové možnosti nám ale nabízí využití metod molekulární biologie – konkrétně proteomiky, se stanovením parametrů, které nejsou detekovatelné aktuálně používanými metodami. Tyto nově nalezené markery můžeme měřit metodou hmotnostní spektrometrie, s relativně nízkými provozními náklady. Příkladem může být stanovení kyseliny arachidonové.<sup>14</sup>

### Nevyužívání imunologických parametrů při diagnostice sepse

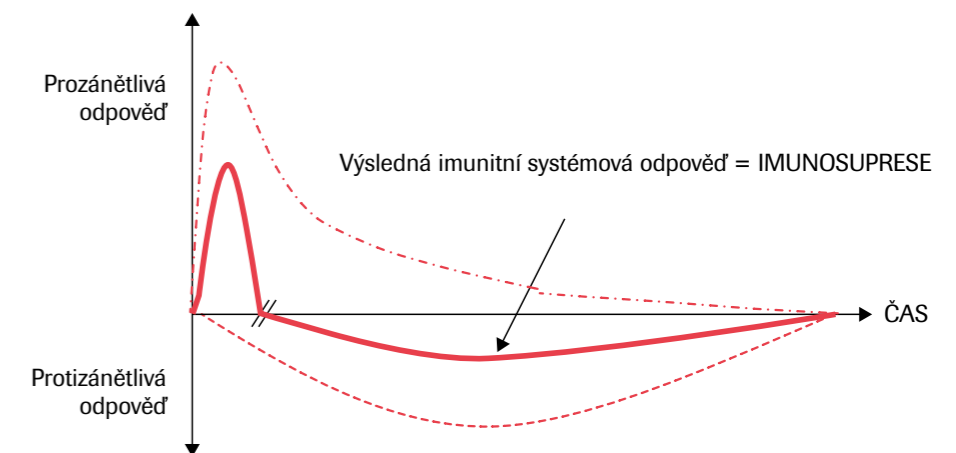
Je to paradox. Ačkoli je sepsa definována jako nepřiměřená reakce imunitního systému na infekci, využití imunologických parametrů v klinické praxi je minimální. Přitom studie opakovaně prokázaly, že tyto parametry jsou důležité a užitečné jednak při stanovení diagnózy sepse, jednak pro prognózu pacienta.<sup>15</sup> Dysfunkci imunitní odpovědi u sepse vidíme v čase, a to jak v humorální (protilátkové), tak buňkami zprostředkované imunitě.<sup>16,17</sup> Výsledným funkčním stavem je imunoprese (obr. 1). Laboratorní nálezy

U těchto pacientů můžeme navíc využít cílenou substituční terapii intravenózními imunoglobuliny.<sup>18,19</sup> Stanovení koncentrace imunoglobulinů v séru je velmi jednoduché a dostupné s obdržením výsledku v řádu desítek minut od odběru. Expresce CD64 na neutrofilech je velmi užitečným a specifickým parametrem pro stanovení diagnózy sepse,<sup>20,21</sup> s využitím technologie průtokové cytometrie. Stanovení exprese HLA-DR na monocytech je parametrem tzv. imunoparalýzy a jeho význam pro prognózu pacienta byl opakovaně prokázán.<sup>22,23</sup> Také zde můžeme v některých případech použít podpůrnou imunomodulační terapii.<sup>24,25</sup> Limitem je používaná technologie průtokové cytometrie, která není dostupná pod dobu 24 hodin.

Úspěšná a včasná diagnostika sepse má své konsekvence i v terapeutické části. Kromě již zmiňovaného příznivého vlivu včasného nasazení antibiotické terapie máme sice omezené, ale přece jen určité možnosti ovlivňující dysfunkci imunitního systému.<sup>26,27</sup> Uplynulých 30 let



▲ Makrofág uvolňující cytokiny



▲ Obr. č. 1: Dynamika systémové zánětlivé odpovědi s výslednou imunopresí

mohou být velmi různorodé. U části pacientů dochází k významně zvýšené protilátkové odpovědi v důsledku infekce, kde koncentrace imunoglobulinů v séru je vysoká. Naproti tomu u nezanedbatelného počtu pacientů detekujeme hypogamaglobulinemii, která je prediktivním faktorem nepříznivého klinického výsledku.

sice vedlo k určité deziluzi stran imunomodulační terapie sepse, ale právě nové možnosti „omicsových“ technologií mají potenciál stratifikovat pacienty se sepsí podle jejich individuálně nastavených parametrů imunitní odpovědi k infekci, což povede k úspěšné imunomodulační terapii.<sup>28</sup>

**Souhrn**

Zlepšení diagnostiky sepse nám přinese  
i) využití proteomiky k detekci nových parametrů, které nejsme schopni měřit

aktuálně používanými technologiemi,  
ii) využití hmotnostní spektrometrie k jejich kvantitativnímu stanovení. Důsledkem včasné a spolehlivé diagnostiky sepse bude racionální použití

imunomodulační terapie. Rovněž v této oblasti je nezbytným předpokladem využití „omicových“ technologií a aplikace personalizované medicíny.

**doc. MUDr. Miroslav Průcha, Ph.D.**

Oddělení klinické biochemie, hematologie a imunologie, Nemocnice Na Homolce, Praha  
Kontakt: miroslav.prucha@homolka.cz

Pracuje jako klinický imunolog na Oddělení klinické biochemie, hematologie a imunologie v Nemocnici Na Homolce. „Sepse se mi stala osudem...“ Prakticky celou svou profesionální kariéru se věnuje problematice sepse – její diagnostice a imunomodulační terapii. Spolupracoval a spolupracuje s klinikami anesteziologie a intenzivní péče v České republice, v Německu, na Slovensku. Kromě toho se věnuje pacientům s vrozenými a získanými imunodeficity, vaskulitidami velkých cév, autoimunitními onemocněními – např. IgG4 asociovanými chorobami.

**LITERATURA**

1. Prucha M, Bellingan G, Zazula R. Sepsis biomarkers. *Clin Chim Acta*. 2015; 440: 97-103.
2. Liu Y, Hou JH, Li Q, Chen KJ, Wang SN, Wang JM. Biomarkers for diagnosis of sepsis in patients with systemic inflammatory response syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Springerplus*. 2016; 5(1): 2091. Published 2016 Dec 12. doi:10.1186/s40064-016-3591-5.
3. Zimmerman JJ et al. Diagnostic Accuracy of a Host Gene Expression Signature That Discriminates Clinical Severe Sepsis Syndrome and Infection-Negative Systemic Inflammation Among Critically Ill Children. *Crit Care Med* 2017; 45.4: e418-e425.
4. Mc Hugh L. et al. A Molecular Host Response Assay to Discriminate Between Sepsis and Infection-Negative Systemic Inflammation in Critically Ill Patients: Discovery and Validation in Independent Cohorts. *Plos Med* 2015; 12.12: e1001916.
5. Gluck E. et al. Real-world use of procalcitonin and other biomarkers among sepsis hospitalizations in the United States: A retrospective, observational study. *PLoS One* 2018; 13.10: e0205924.
6. Meissner M. Update on Procalcitonin Measurements. *Ann Lab Med*. 2014; 34(4): 263-273.
7. Molter GP et al. Procalcitonin plasma concentrations and systemic inflammatory response following different types of surgery. *Anaesthesist* 2003; 52: 210-217.
8. Buhaescu I, et al. Serum Procalcitonin in Systemic Autoimmune Diseases-Where Are We Now? *Seminar Arthritis Rheum* 2010; 40: 176-183.
9. Zazula R, Prucha M, Tyll T, Kieslichova E. Induction of procalcitonin in liver transplant patients treated with anti-thymocyte globulin. *Crit Care*. 2007; 11(6): R131.
10. Fuster JJ, Walsh K. The Good, the Bad, and the Ugly of interleukin-6 signaling. *EMBO J*. 2014; 33(13): 1425-1427.
11. Song J, Park DW, Moon S, Cho HJ, Park JH, Seok H, Choi WS. Diagnostic and prognostic value of interleukin-6, pentraxin 3, and procalcitonin levels among sepsis and septic shock patients: a prospective controlled study according to the Sepsis-3 definitions. *BMC Infect Dis*. 2019; 19(1): 968.
12. Huang L, Zhao X, Qi Y, Li H, Ye G, Liu Y, Zhang Y, Gou J. Sepsis-associated severe interleukin-6 storm in critical coronavirus disease 2019. *Cell Mol Immunol*. 2020; 17(10): 1092-1094.
13. Vincent X Liu, Vikram Fielding-Singh, John D Greene, Jennifer M Baker, Theodore J Washyna, Jay Bhattacharya, Gabriel J Escobar The Timing of Early Antibiotics and Hospital Mortality in Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2017; 196(7): 856-863.
14. Kauppi AM, et al. Metabolites in blood for prediction of bacteremic sepsis in the emergency room. *PLoS One* 11(2016) e0147670.
15. Venet F, Lukaszewicz AC, Payen D, Hotchkiss R, Monneret G. Monitoring the immune response in sepsis: a rational approach to administration of immunoadjuvant therapies. *Curr Opin Immunol*. 2013; 25(4): 477-483.
16. Delano MJ, Ward PA. Sepsis-induced immune dysfunction: can immune therapies reduce mortality?. *J Clin Invest*. 2016; 126(1): 23-31.
17. Gotts JE, Matthay MA. Sepsis: pathophysiology and clinical management. *BMJ*. 2016;353:i1585. Published 2016 May 23.
18. Bermejo-Martin MF et al. Immunoglobulins IgG1, IgM and IgA: a synergistic team influencing survival in sepsis. *Journal Internal Medicine* 2014; 276.4, 404-412.
19. Prucha M, Zazula R, Herold I, Dostal M, Hyanek T, Bellingan G. Presence of hypogammaglobulinemia in patients with severe sepsis, septic shock, and SIRS is associated with increased mortality. *J Infect*. 2014; 68(3): 297-299.
20. Dai J, Jiang W, Min Z, et al. Neutrophil CD64 as a diagnostic marker for neonatal sepsis: Meta-analysis. *Adv Clin Exp Med*. 2017; 26(2): 327-332.
21. Larsen FF, Petersen JA. Novel biomarkers for sepsis: A narrative review. *Eur J Intern Med*. 2017; 45: 46-50.
22. Monneret G, Lepape A, Voirin N, et al. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med*. 2006; 32(8): 1175-1183.
23. Boeddha NP, Kerklaan D, Dunbar A, et al. HLA-DR Expression on Monocyte Subsets in Critically Ill Children. *Pediatr Infect Dis J*. 2018; 37(10): 1034-1040.
24. Nalos M, Santner-Nanan B, Parnell G, Tang B, McLean AS, Nanan R. Immune effects of interferon gamma in persistent staphylococcal sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012; 185(1): 110-112.
25. Payen D, Faivre V, Miatello J, et al. Multicentric experience with interferon gamma therapy in sepsis induced immunosuppression. A case series. *BMC Infect Dis*. 2019; 19(1): 931. Published 2019 Nov 5.
26. Peters van Ton AM, Kox M, Abdo WF, Pickkers P. Precision Immunotherapy for Sepsis. *Front Immunol*. 2018; 9: 1926.
27. Steinhagen F, Schmidt SV, Schewe JC, Peukert K, Klinman DM, Bode C. Immunotherapy in sepsis - brake or accelerate?. *Pharmacol Ther*. 2020; 208: 107476.
28. Prucha M, Zazula R, Russwurm S. Immunotherapy of Sepsis: Blind Alley or Call for Personalized Assessment?. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2017; 65(1): 37-49.



Současné možnosti léčby srdečního selhání, ať už farmakologické (sacubitril/valsartan, glifloziny, ivabradin a další), nebo přístrojové (biventrikulární stimulace, defibrilátor, srdeční podpory – HeartMate III), dokážou významně zlepšit prognózu pacienta. Praktik, internista a kardiolog i další lékaři potřebují ohodnotit funkční stav pacienta se srdečním selháním jednoduchým biochemickým parametrem, dostupným eventuálně i pro okamžitou „bedside“ diagnostiku – podobně jako nefrolog má k dispozici hodnotu kreatininu. Biochemický marker, který by jak lékařovu, tak i pacientovu snahu o optimalizaci léčebného postupu jednoduše číselně ohodnotil, „oznámkoval jako ve škole“. Motivace je nezbytná. Jeden takový zavedený laboratorní marker tu dávno máme: NT-proBNP. Nabízí se tedy otázka, jaké by mělo být jeho postavení vůči vedoucí zobrazovací modalitě v kardiologii, jakou je echokardiografie. Je jedno „ECHO“ lepší než 1 000 laboratorních vyšetření NT-proBNP?

## Je jedno „ECHO“ lepší než 1 000 vyšetření NT-proBNP?

**MUDr. ANTONÍN NOVÁK**

Klinika EUC Ústí nad Labem, interní oddělení Děčín, Česká Lípa, Rumburk, Kardiologická klinika Masarykovy nemocnice, Krajská zdravotní, a.s., Ústí nad Labem

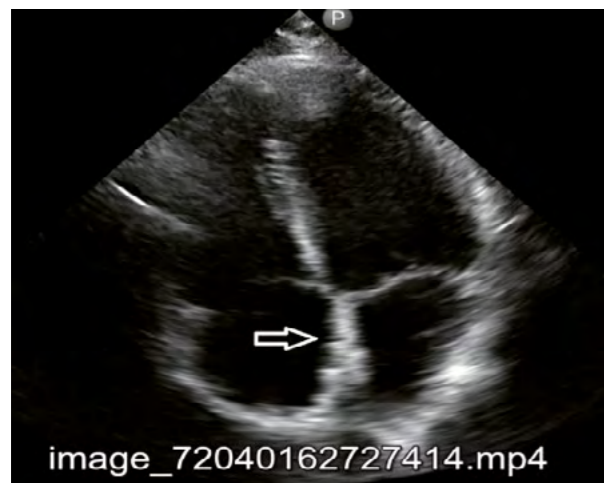
deseti příkladech poukazují na tzv. one touch vteřinovou diagnostiku doslova pouhým přiložením sondy na oblast srdce. Na obrázcích jsou tzv. čtyřdutinové transthorakální projekce z oblasti srdečního hrotu, jen obr. č. 9 je echokardiografická projekce na oblouk aorty z jugula.

**Vlastní sdělení**

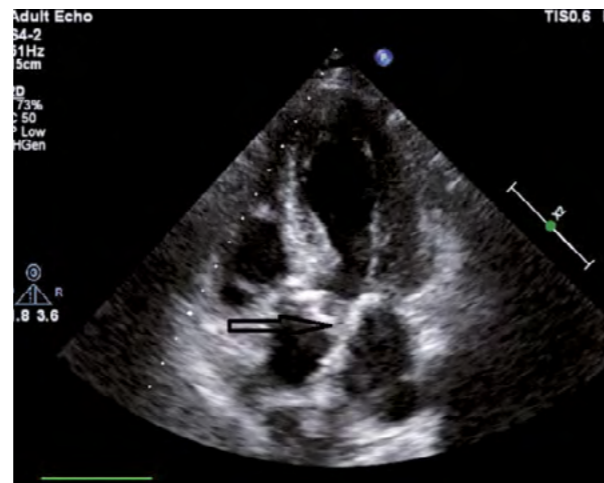
Echokardiografie je unikátní nezatěžující vyšetřovací metoda, v naší republice rychle zavedená od roku 1984 i do oblastních nemocnic. Díky pokroku techniky dnešní přístroje umožňují morfologické vyšetření srdce přímo u lůžka pacienta, a to dokonce sondou připojenou na laptop nebo mobil (obr. č. 1). Získané údaje jsou již z transthorakálního vyšetření v drtivé většině přesné a správně určují směr léčby. Na následujících

**Obr. č. 1:** 74letý pacient, není schopen interpretovat před lety provedený zákrok na síňovém septu. V tomto případě vyšetření ultrazvukovou sondou s přenosem do mobilu, vidíme dobře provedený uzávěr defektu septa siní okluderem.  
**Obr. č. 2:** hrubý systolický šelest 83leté ženy se po přiložení ultrazvukové sondy „promění“ v těžkou aortální stenózu.  
**Obr. č. 3:** 65letá žena s náhlou dušností, u ní mitrální insuficienci nejen vidíme, ale určíme i příčinu – utrženou šlašinku

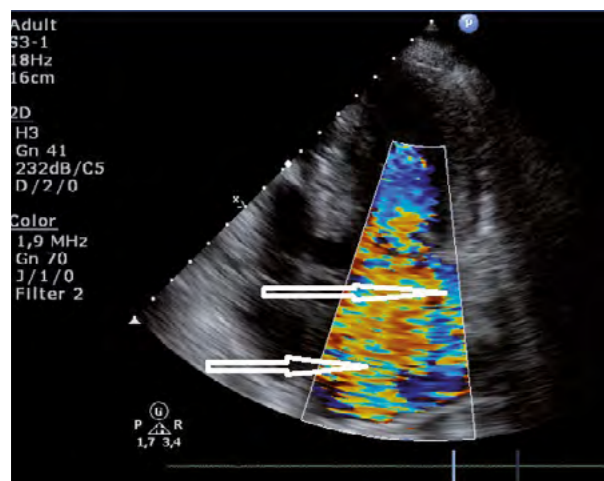




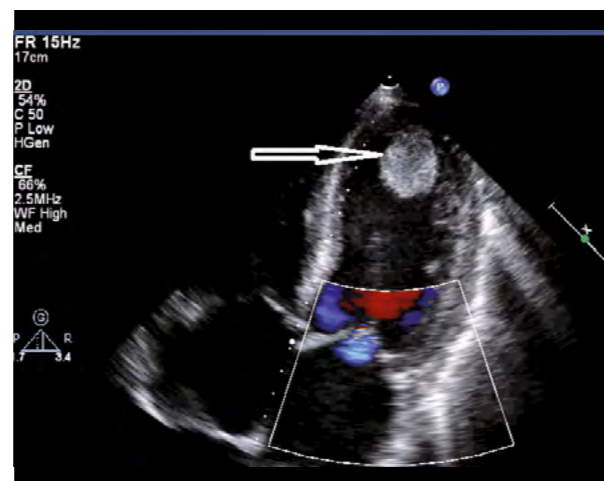
▲ Obr. č. 1: Vyšetření UZ kapesní sondou Lumify, NT-proBNP 265 pg/ml; šipka – **septální okluder**



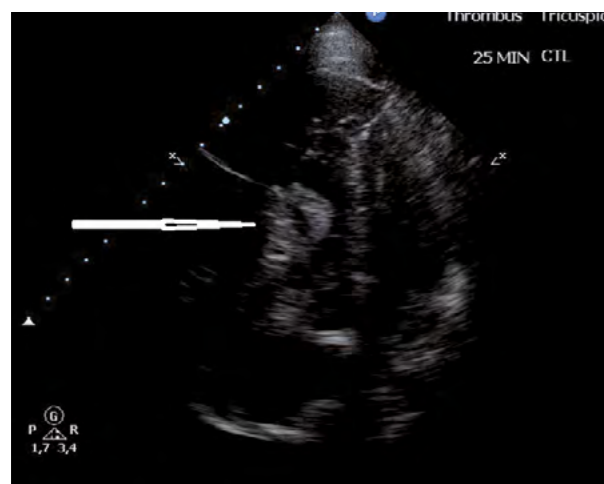
▲ Obr. č. 2: Žena 83 let, dušnost III. stupně; šipka – **aortální stenóza**, NT-pro BNP 1 445 pg/ml



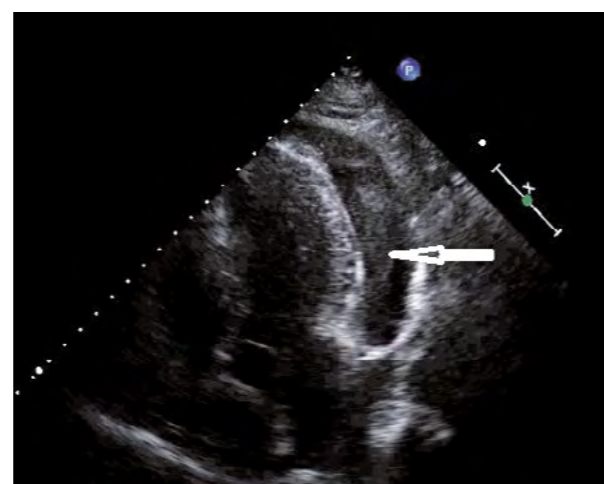
▲ Obr. č. 3: Žena 65 let, **ruptura šlašinky cípu mitrální chlopně**, masivní mitrální insuficience, NT-proBNP 2 568 pg/ml



▲ Obr. č. 4: Muž diabetik 72 let, **dušnost III. stupně, přední infarkt myokardu**, NT-proBNP 865 pg/ml, šipka – **trombus v aneurysmatu hrotu levé komory**



▲ Obr. č. 5: Žena 74 let, **náhlá dušnost**, NT-proBNP 850 pg/ml, **masivní plicní embolie**, šipka – **v dilatované PK zachycený na trikuspidální chlopní hadovitý trombus**



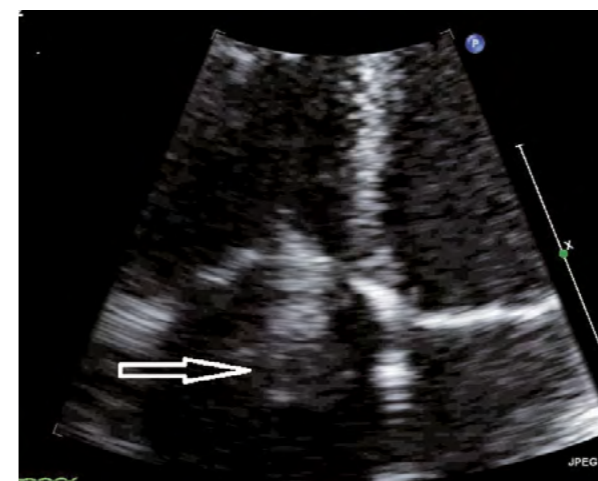
▲ Obr. č. 6: Muž 66 let, šipka – **hemoperikard, tamponáda – útlak pravé komory**, NT-proBNP nevyšetřováno

aparátu mitrální chlopně s masivní mitrální insuficiencí. **Obr. č. 4:** u diabetika, zde asymptomatického, ale s nečekanou změnou obrazu EKG při plánované kontrole, vidíme jasnou poruchu kinetiky přední stěny a jako „bonus“ i hyperechogenní trombus. **Obr. č. 5:** u pacienta týden po zlomenině kotníku s náhlou dušností ihned vidíme, jak těžce dilatovaná a chabě kontraktilní pravá komora doslova válcuje a utlačuje levou komoru z důvodu masivní plicní embolie, a máme i štěstí a vidíme vlající trombus v pravé síni. **Obr. č. 6:** na pohotovosti mladý muž se subakutním infarktem myokardu, hrudník už ani moc nebolí, pacient je ale

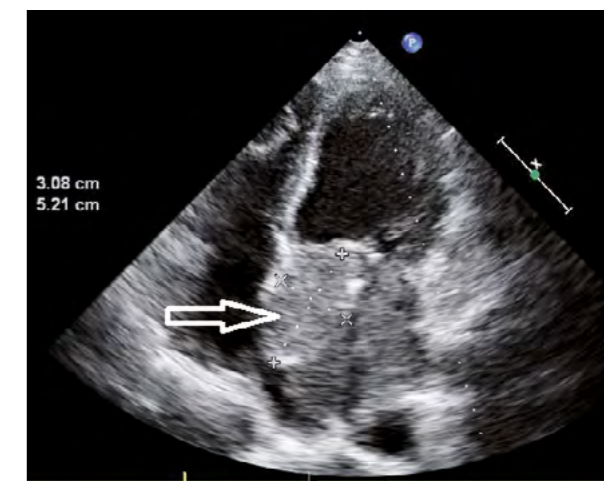
celkově nespívá, přiložíme sondu a vidíme hemoperikard s utlačenou pravou komorou, tzn. srdeční tamponádu. **Obr. č. 7:** další pacient, mladý toxikoman, kašle a má teploty, stačí vteřinové zacílení na trikuspidální chlopně a vidíme velkou mobilní vlající vegetaci. **Obr. č. 8:** konzilium na neurologii, vyšetření u nemocné zdravotní sestry, proběhlá TIA, bez kardiiovaskulárních rizik, přiložíme sondu a vidíme velký myxom levé síně. **Obr. č. 9:** paní ve středním věku, jasný muzikální šelest, zde potřebujeme více minut a „ulovíme“ otevřenou Botallovu dučeť s levo-pravým zkratem. **Obr. č. 10:** echokardiogram muže 72 let, s dušností

II. stupně, zde na echokardiogramu vidíme defekt septa síní a dilataci pravostranných oddílů.

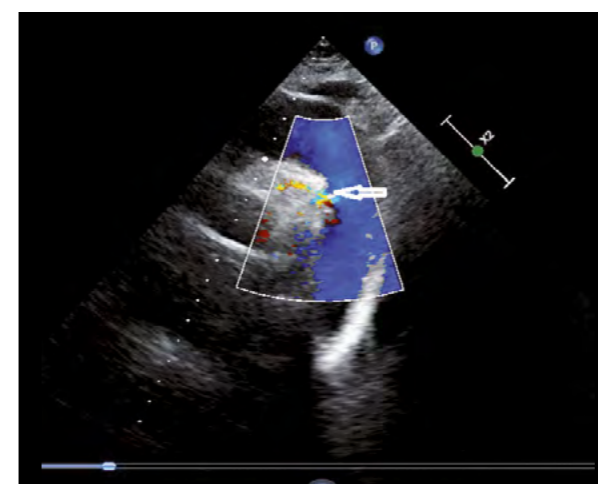
Anamnéza bývá provedena mnohdy s různou mírou pečlivosti, pak následuje fyzikální vyšetření (průměrný věk lékaře u nás je necelých 60 let, slyší ještě dobře?), a jak bylo ukázáno výše, poté rozhodne definitivně o diagnóze transthorakální echokardiografie. I tato metoda nechává prostor pro další typy vyšetření, zejména CT hrudníku u akutních stavů nebo angiografie. Jak tedy naložíme s laboratorním vyšetřením v kontextu s diagnostickými možnostmi echokardiografie?



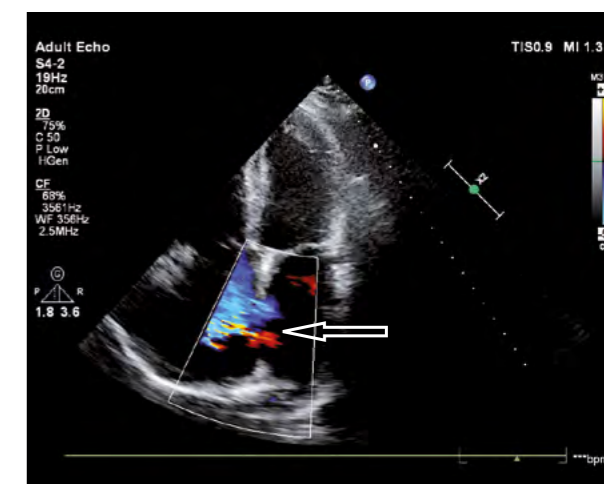
▲ Obr. č. 7: Muž 25 let, **toxikoman**, šipka – **velká vegetace na trikuspidální chlopní**



▲ Obr. č. 8: Žena 56 let, šipka – **velký myxom v levé síni**, NT-proBNP neodebráno



▲ Obr. č. 9: Žena 63 let, **dušnost II. stupně**, projekce z jugula – **oblouk aorty, zkrat levo-pravý tok Botallovu dučeť z aorty descendenti do plicnice**



▲ Obr. č. 10: Muž 72 let, **defekt septa síní s dilatací pravostranných oddílů**, **dušnost II. stupně**, NT-pro BNP 1 745 pg/ml

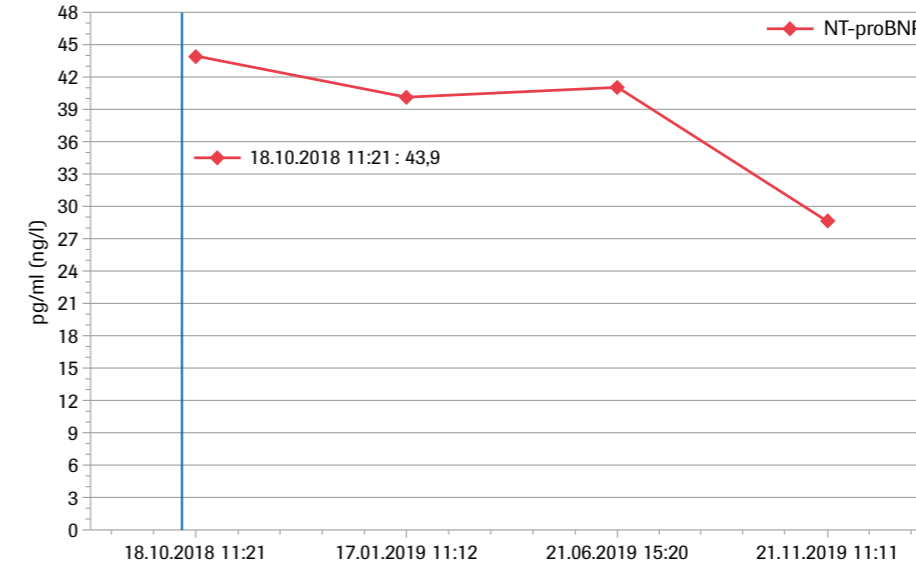


Na pohotovosti k laboratornímu odběru mnohdy přistoupíme jaksi „sportovně“ a ordinujeme praxi prověřený laboratorní hatrick: **troponin, D-dimery, NT-proBNP!** Ne vždy je echokardiografista po ruce, ne vždy je blízko CT vyšetření. S **troponiny** už to umíme, jde o marker strukturálního postižení, mají svou jasnou cut-off hodnotu, podobně jako **D-dimery**, které mají dokonce cut-off hodnotu adjustovanou na věk (věk + 10 mg/ml). Potíž může být právě s **NT-proBNP**. Jak tedy na interpretaci výsledku této laboratorní metody, nejmladší z rodiny „akutních kardiovaskulárních markerů“? Normální hodnota

skromného echokardiografisty tehdy bylo šťastné. Ale asi po dekádě let jsem názor zcela změnil, jako apoštol obrácený na víru. Dnes jsem zastáncem rutinních odběrů tohoto cenného laboratorního parametru! Dnes mi jeden nebo občasný odběr NT-proBNP rozhodně nestačí, a to mám echokardiografii kdykoli k dispozici, včetně malého bedside přístroje. Počtu 1 000 odběrů NT-proBNP skutečně dosáhnou u svých pacientů v průměru asi za 2–3 měsíce ambulantní práce.

Paradoxně ale někdy jedno NT-proBNP bohatě stačí k vyřešení klinického problému. **Praktickému lékaři**, který řeší

praktický lékař na základě své zkušenosti a frekvence pacientů s kardiovaskulárním onemocněním může spočítat, kolikrát týdně řeší a bude řešit pacienta s možnými příznaky srdečního selhání, a tím i zkalkulovat, kolik takových vyšetření provede týdně. Ale pozor, s „jídlem“ roste chuť a parametr si může lékař-praktik oblíbit, bude se mu hodit u některých hypertoniků, jistě u diabetiků, starších pacientů, možná i některých sportovců. V praxi **internisty** nebo **kardiologa** ale už jeden nebo občasný odběr NT-proBNP nestačí, obvykle dispenzarizuje již víceméně moribundního pacienta (pacient v posledním stadiu života) a NT-proBNP je pak laboratorním nástrojem na počátku diagnostickým a následně prognostickým. Dle výsledku hodnoty NT-proBNP řídíme léčbu! S jasným, možná obtížným, ale o to více chtěným cílem dosáhnout co nejnižší hodnoty NT-proBNP. Někdy u části pacientů přijde bohužel období fibrilace síní, kdy hodnota NT-proBNP minimálně 5–10x naroste. Ale i zde, například zklidněním srdeční frekvence fibrilace síní, takovým navýšením betablokátoru (kterého bychom se dříve obávali) dosáhneme nečekaného poklesu NT-proBNP a pacient doslova rozkvetne. Dostatečný pokles NT-proBNP svědčí o tom, že naše racionální kombinační léčba srdečního selhání byla adekvátní. Tolik se přece stále diskutuje, že nedosahujeme cílových dávek léků, které mají jasný pozitivní dopad na prognózu pacientů (sacubitril/valsartan, ACE inhibitory, betablokátor, ivabradin, glifloziny a další). Snaha léčit dle dynamiky NT-proBNP vede právě k tlaku jak na pacienta, tak i na lékaře optimalizovat dávky všech správně indikovaných léků u pacienta se srdečním selháním! To mohu potvrdit z vlastní zkušenosti práce s pacienty se srdečním selháním. Těmto pacientům můžeme v posledních letech nabídnout velmi komplexní farmakologickou léčbu, která cíleně míří na mozaiku patofyziologických faktorů srdečního selhání. Optimální dávku diuretika, tolerovanou dávku betablokátoru doplněnou eventuálně



▲ Obr. č. 11: Trvalá normalizace hodnot NT-proBNP u 51letého pacienta s dilatovanou kardiomyopatií při komplexní farmakologické léčbě srdečního selhání, včetně užívání terapie sacubitril/valsartan

o ivabradin, blokátory angiotenzinového receptoru v kombinaci s blokátory neprilysinu a blokátory aldosteronu. Při známkách dyssynchronie levé komory biventrikulární stimulaci a při významné mitrální insuficienci tzv. mitraclap. Takto náročnou farmakologicky i instrumentálně vedenou léčbu dnes s výhodou velmi jednoduše vyhodnotíme dynamikou hodnot NT-proBNP. Na obrázku 11 můžete na grafu vidět pokles NT-proBNP u 51letého pacienta s dilatovanou kardiomyopatií a s dysfunkcí levé komory o ejekční frakci pod 35 % po přidání

sacubitrilu/valsartanu místo ACE inhibitoru do kombinované farmakologické léčby srdečního selhání. Uvedeného mladšího pacienta je možno považovat za vyléčeného ze srdečního selhání, jistě ale s nutností pokračování zavedené farmakoterapie. S výhodou může příznivá dynamika NT-proBNP směřem k normalizaci sloužit i jako podklad pro zdůvodňování nákladovosti léčby plátcům zdravotní péče. V diabetologii vidíme zřetelně praxi ověřený požadavek na pokles glykosylovaného hemoglobinu po nasazení moderních, dražších antidiabetik.

## Závěr

Tedy jedno NT-proBNP mnohdy stačí. U stabilního ambulantního kardiaka 1–2x ročně. U kardiaka v nemocnici také minimálně dvakrát, jistě i při propuštění. S čísly se dobře pracuje. Není-li dosaženo žádoucího poklesu NT-proBNP, musíme se pečlivě vrátit na ta místa v léčbě kardiaka, kde lze ještě pomoci! Pokud již nelze, můžeme a musíme pacientům nabídnout další možnosti léčby včetně nové generace umělých srdcí – HeartMate III. Poslední studie s nimi jasně prokázaly dobré výsledky a významnou redukcí komplikací. Cut-off hodnota Roche Elecsys® NT-proBNP (zde prosím pozor – cut-off hodnoty jiných výrobců se mohou významně lišit!) pro podezření na akutní srdeční selhání je 125 pg/ml a méně. Pro chronické srdeční selhání 450, 900 a 1 800 pg/ml dle věku pacienta. Z letité zkušenosti jsem neviděl u pacienta s kardiální dušností NYHA IV, to jsou ti pacienti, co si v noci sedají pro dušnost, nižší hodnotu než 1 400 pg/ml (nejnižší 1 475 pg/ml u 51letého pacienta). Vzhledem k tomu, že lékaři na dotaz po nočním kardiálním astmatu často zapominají, je NT-proBNP v praxi o to cennější. A opakovaná normalizace NT-proBNP svědčí dokonce o vyřešení ze srdečního selhání = „succes in failure“. Léčbu ale nevysazujeme!



NT-proBNP je 0–125 pg/ml, pak následuje určitý rozptyl normálních hodnot s přihlédnutím k věku, renálním funkcím, komorbiditám. *Není tedy lepší jedno dobře provedené „echo“, jak jsme ukázali v úvodu, než obrazně řečeno 1 000 laboratorních vyšetření NT-proBNP?*

Odpověděl bych jistě „ano“ před 15 lety, kdy NT-proBNP přicházelo do praxe a například i indikace k biventrikulární kardiostimulaci u pacienta se srdeční slabostí jsme hodnotili na základě několika, mnohdy až technicky složitých echokardiografických parametrů pro dyssynchronii levé komory. V této době jsem na jednom kongresu ve Švýcarsku s nadšením vyslechl přednášku „Jedno „echo“ je lepší než 1 000 NT-proBNP“. Moje ego

pacienta s dušností, zcela normální hladina NT-proBNP dá jasnou odpověď, že pacient netrpí kardiální dušností. I praktik může ale po čase vycítit, že i v normálním rozmezí NT-proBNP 0–125 pg/ml hodnota třeba 24 pg/ml svědčí o velmi dobré kondici léčeného hypertonika než hodnota 142 pg/ml jiného pacienta. Jeden můj kolega, vytižený chirurg, má na tlakovém holteru lehce nadhraniční průměrný systolický tlak a NT-proBNP 234 pg/ml. Selhává kardiálně? Slouží osm služeb měsíčně, je přetížený, neklíčí u něj již diastolická dysfunkce? Na základě tohoto výsledku jsem léčbu hypertenze rozšířil do fixní kombinace. Tedy i v ambulanci primární péče může být NT-proBNP skvělým jednoduchým laboratorním pomocníkem. Dokonce si



### MUDr. Antonín Novák

Klinika EUC Ústí nad Labem, interní oddělení Děčín, Česká Lípa, Rumburk, Kardiologická klinika Masarykovy nemocnice, Krajská zdravotní, a.s., Ústí nad Labem  
Kontakt: novak59@kzcr.eu

Narodil se v září r. 1960 v Ústí nad Labem. V roce 1985 absolvoval I. lékařskou fakultu VFN. První atestaci z vnitřního lékařství získal r. 1988, druhou atestaci r. 1993 a v r. 1997 atestaci z kardiologie. Téhož roku obdržel funkční licenci pro jícnovou echokardiografii. V letech 1986–2003 pracoval jako sekundární lékař I. interní kliniky ILF v Ústí nad Labem, mezi lety 2003–2012 byl zástupcem primáře Kardiologické kliniky Masarykovy nemocnice v Ústí nad Labem; oddělení neinvazivní kardiologie. V období 2013–2016 zastával funkci primáře Interního oddělení v Nemocnici Děčín. Od roku 2017 až doposud pracuje v Kardiologické ambulanci EUC Kliniky Ústí nad Labem, přičemž zároveň slouží na JIP v Děčíně, Rumburku či České Lípě. Zajímá se především o jícnovou echokardiografii, kontrastní echokardiografii, ambulanci srdeční slabosti a echokardiografii z pohledu záchranné služby. Je investigátorem studií Finesse, Remedy, Recover I-II, Resonate, Relax-AHF. Ovládá ruštinu, němčinu, angličtinu i španělštinu, a tak přednáší nejen na tuzemských, ale i zahraničních kongresech. Je ženatý a má tři děti.

### LITERATURA

- 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. Ponikowski, P. et al., *European Heart Journal*, Volume 37, Issue 27, 14 July 2016, Pages 2129–2200, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw128>.
- The Echo Manual 4th Edition*, by Jae K. Oh MD (Author), Garvan C. Kane MD PhD (Author), Published: Wolters Kluwer, ISBN-10: 1496312198.



Článek popisuje poslední poznatky etiopatogeneze formování placenty a zásadní úlohu vzájemného vztahu angiopoetinu a angiostatinu. Průkazné nízké koncentrace angiopoetinu PlGF spolu s patologickými průtoky v uterinních arteriích na konci I. trimestru selektují skupinu těhotných žen s vyšším rizikem pozdějšího vzniku preeklampsie. Pro časnou diagnózu subklinických stadií preeklampsie se osvědčilo využít stanovení poměru sFlt-1/PlGF. Rychle rostoucí hodnota se ukazuje být dostatečně validní pro včasné ukončení těhotenství a zabránění fatálních mateřských a fetálních komplikací.

## Komplexní management preeklampsie

doc. MUDr. TOMÁŠ BINDER, CSc.

Gynekologicko-porodnická klinika UJEP a Masarykovy nemocnice, Ústí nad Labem

### Úvod

Preeklampsie je pro těhotenství specifické onemocnění. Je definována jako těhotenstvím podmíněná hypertenze s proteinurií. Jedná se o vaskulopatii vznikající na podkladě abnormálního vývoje placenty. Klinicky se zpravidla projevuje až po 20. týdnu gravidity. V důsledku abnormální cévní reakce vede k různě významnému multiorgánovému postižení.

Podle závažnosti rozlišujeme lehkou a těžkou formu preeklampsie a podle doby vzniku rozlišujeme časnou formu preeklampsie, která se manifestuje před 34. gestačním týdnem, a pozdní formu preeklampsie, která se manifestuje po 34. gestačním týdnu. Pozdní forma má z hlediska perinatologických výsledků lepší prognózu. Incidence u těhotných se pohybuje mezi 4 a 8 %. Rizikové skupiny jsou uvedeny v **tabulce č. 1**.<sup>7</sup>

### Etiopatogeneze preeklampsie

Etiopatogeneze preeklampsie není doposud uspokojivě objasněna. Shoda panuje v tom, že primární příčina je uložena v placentě a že porucha je založena mnohem dříve, než dojde k manifestaci

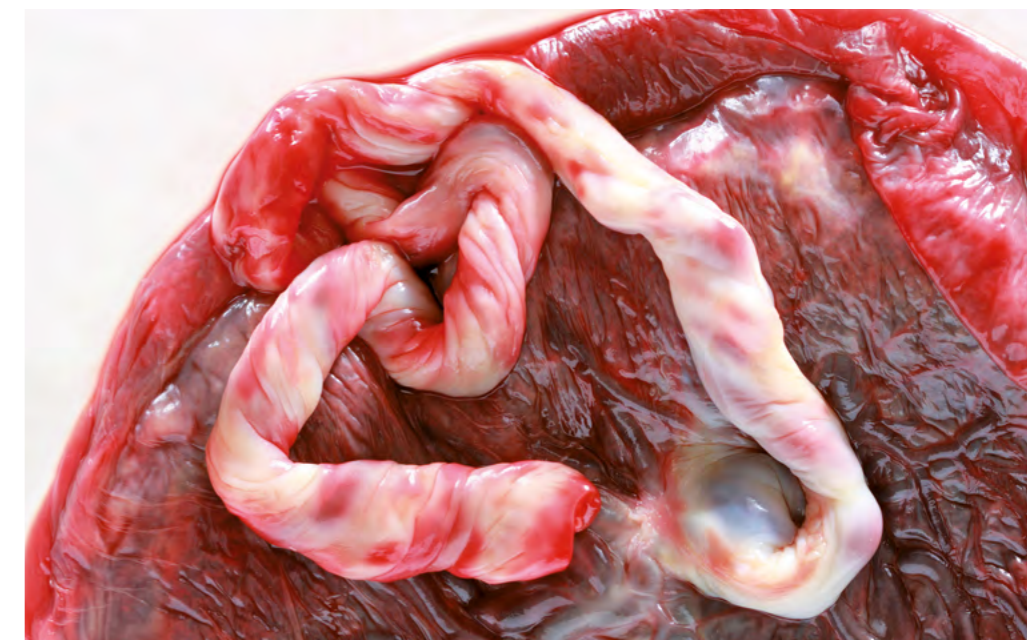
prvních příznaků. Preeklampsie vzniká na základě nepřiměřené nebo patologické mateřské odpovědi na placentaci. Svou roli zde hrají fetální antigeny a imunitní mateřská odpověď. Tyto „zánětlivé signály“ vedou k lokální ischemii, kdy následná reperfuze vede k oxidačnímu stresu a vaskulárnímu poškození. Nelze tak od sebe oddělovat dvě nejuzávanější teorie vzniku preeklampsie – vaskulární a imunologickou, protože se úzce propojují. Pro omezený prostor nelze zabíhat zcela do podrobností. Uvádíme jen zásadní procesy důležité pro vývoj placenty.

Pro plynulý růst plodu a jeho dobrý stav je nezbytný koordinovaný vývoj stromu fetálního klku. Již před viabilitou

První těhotenství (krátká anamnéza nechráněného styku)
Předchozí preeklampsie
≥ 10 let od posledního porodu
Věkové extrémy těhotné
Body mass index (BMI) ≥ 30
Pozitivní rodinná anamnéza preeklampsie (matka, sestra)
Zachycená hodnota diastolického tlaku ≥ 90 mm Hg ze dvou nezávislých měření
Zachycená proteinurie (orientačně na + nebo ≥ 300 mg/24 hodin)
Vícečetné těhotenství
Gravidita po některé z metod asistované reprodukce
Preexistující hypertenze
Preexistující onemocnění ledvin
Preexistující diabetes
Přítomnost antifosfolipidových protilátek

▲ Tab. č. 1: Rizikové faktory preeklampsie. Zdroj: archiv autora

plodu dochází k rozvětvené angiogenezi, v placentě se vytvoří 10–16 generací kmenových klků. Jakmile se objeví vitální známky, vývoj placenty pokročí k vytvoření velkého počtu terminálních klků schopných výměny plynů. Pro tento proces je nezbytná dostatečná trofoblastická invaze, která je dokončena mezi 12. a 14. gestačním týdnem. Hlavním obdobím pro posouzení kvality placentární implantace je 20.–24. gestační týden, protože je trofoblastem dokončena transformace myometrálních spirálních arterií v nízkorezistentní cévy s vysokým průtokem. Tím je zajištěn adekvátní průtok krve v intervillózních prostorách, kde se odehrává fetomaternální výměna. Tento proces je víceúrovňově regulován a svoji roli v něm hrají NK buňky (natural killer cells), které ovlivňují nejen trofoblastickou invazi, ale i vaskulární změny v placentě svou schopností produkovat cytokiny, které se uplatňují v angiogenezi a ovlivňují vaskulární stabilitu. Patří k nim vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor, VEGF), placentární růstový faktor (placenta growth factor, PlGF) a angiopoetin 2. Tyto angiopoetiny hrají zásadní roli v procesu angiogeneze. Proti tomu působí angiostatin – solubilní fms-like tyrosinkináza 1 (soluble fms-like tyrosine kinase 1, sFlt-1), jejíž gen kóduje receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor 1 (vascular endothelial growth factor receptor 1, VEGFR-1), protein, který reguluje proliferaci a diferenciaci buněk. V průběhu fyziologické gravidity dochází k přiměřené interakci mezi endovaskulárním trofoblastem a deciduálními leukocyty a zejména přirozenými zabíječi (NK buňkami), která následně vyvolá uvolnění VEGF a PlGF. Za přítomnosti zvýšeného zánětlivého stresu, a to i v průběhu fyziologické gravidity, jsou zvýšené koncentrace volného VEGF důležité pro zachování klidového stavu endotelu. Placentou vytvářený sFlt-1 je antagonistou proangiogenních molekul VEGF a PlGF a jeho hodnoty jsou zvýšeny u preeklampsie. Placentární růstový



▲ Obr. č. 1: Čerstvě porozená placenta s pupečnickem

faktor je esenciální faktor placentárního vaskulárního vývoje, proliferace a vaskulární permeability a přežívání endoteliálních buněk. Zvýšená koncentrace cirkulujícího sFlt-1, proteinu z vaskulárního endotelu placenty, je spojena se sníženými cirkulujícími koncentracemi volného VEGF a PlGF, což vede k endoteliálnímu poškození. Míra zvýšení sFlt-1 koreluje se závažností preeklampsie. To je v souladu s hypotézou, že narušení rovnováhy VEGF (PlGF) a sFlt-1 je jednou z definitivních patofyziologických cest vzniku tohoto onemocnění. U gravidit, u kterých následně došlo k rozvoji preeklampsie a růstové restrikci plodu (fetal growth restriction, FGR), byly v prvním trimestru prokázány snížené koncentrace PlGF a naměřeny snížené hodnoty dopplerovského měření průtoku v uterinních arteriích (průkaz noče). Hodnoty sFlt-1 se v této fázi těhotenství neliší od normy. Tyto nálezy potvrzují zásadní roli deciduálních angiogenních růstových faktorů, zejména placentárního růstového faktoru, pro fyziologický vývoj placenty. V průběhu fyziologické gravidity jsou hodnoty sFlt-1 do 29.–33. gestačního týdne stabilní a pak stále rostou až do porodu. Koncentrace PlGF rostou převážně do konce prvního trimestru,

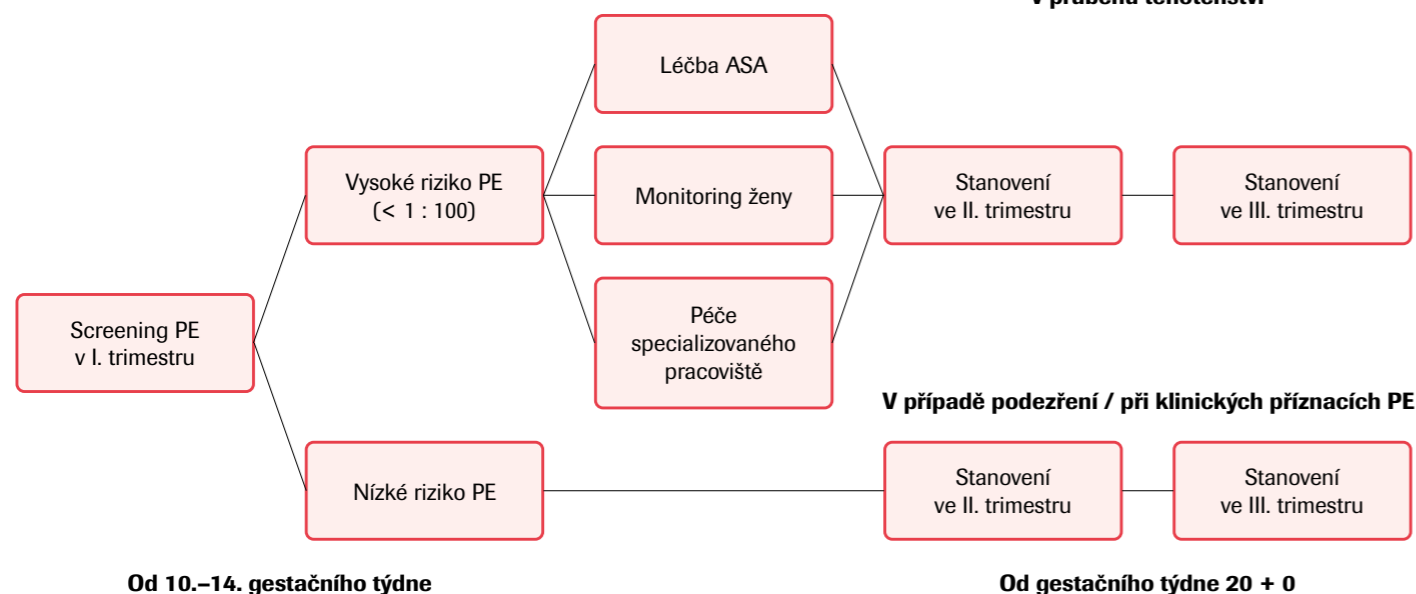
vrcholu dosahují kolem 29. gestačního týdne a pak postupně klesají. Zvyšující se poměr sFlt-1/PlGF po 20. týdnu gestace je známkou narušené rovnováhy a slouží k časné diagnostice preklinických stadií časné formy preeklampsie. K diagnostice pozdní formy preeklampsie vzniklé po 34. gestačním týdnu není stanovení poměru sFlt-1/PlGF pro diagnózu již tak průkazné. Ačkoliv příčiny placentární dysfunkce nejsou plně odhaleny, všeobecně je akceptováno, že stavy spojené s placentární dysfunkcí jsou charakterizovány mělkou trofoblastickou invazí a nedostatečnou remodelací mateřských spirálních arterií v I. a II. trimestru těhotenství. To způsobuje nedostatečnou placentární perfuzi v druhé polovině těhotenství. Endoteliální dysfunkce je výrazem excesivní mateřské zánětlivé odpovědi na těhotenství.<sup>7</sup>

### Predikce preeklampsie

Screening preeklampsie v pravém smyslu jeho významu neexistuje, ale pokud bychom na konci I. trimestru u všech těhotných stanovovali střední arteriální tlak (mean arterial pressure, MAP), hodnotu PlGF, případně doplněnou



## Hodnoty PIGF jako součást FMF algoritmu



Od 10.–14. gestačního týdne

Od gestačního týdne 20 + 0

▲ Obr. č. 2: Komplexní management preeklampsie. ASA – kyselina acetylsalicylová, acetylsalicylic acid; FMF – Fetal Medicine Foundation; PE – preeklampsie; PIGF – placentární růstový faktor, placenta; growth factor; sFlt-1 – solubilní fms-like tyrosinkináza 1, soluble fms-like tyrosine kinase. Zdroj: archiv autora

o hodnotu plazmatického specifického těhotenského proteinu A (pregnancy associated plasma protein A, PAPP-A) v krvi matky, a vyšetření doplnili o flowmetrii uterinních arterií, selektovali bychom skupinu žen se zvýšeným rizikem vzniku preeklampsie v pozdějších stádiích těhotenství a cíleně bychom na ně směřovali prenatální péči. Každý abnormální výsledek z uvedených vyšetření ukazuje

na zvýšená těhotenská rizika, ale riziko pro preeklampsii není specifické. Integrací všech vyšetření se specifická výrazně zvyšuje, ale i tak to neznamená, že žena s pozitivním výsledkem „I. trimestrálního screeningu“ preeklampsii onemocní. Od ideálu testování všech těhotných máme daleko, ale měli bychom se zaměřit alespoň na těhotné ženy uvedené v tabulce 1 v úvodu článku. Studie ASPRE z roku 2017

prokázala validitu tohoto vyšetření. Pozitivním pacientkám byla v této studii od 11. do 36. gestačního týdne preventivně podávána kyselina acetylsalicylová v dávce 150 mg/den a došlo ke snížení rizika vzniku preeklampsie před 37. gestačním týdnem o 62 %.<sup>1,2,5</sup>

### Časná diagnostika preeklampsie

V současné době je v České republice doporučena depistáž preeklampsie pouze měřením krevního tlaku a orientačním vyšetřením moči na přítomnost bílkoviny při každé návštěvě v prenatální poradně. Studie PROGNOSIS z roku 2016 ukázala na význam stanovení poměru sFlt-1/PIGF v časně diagnostice preklinických stádií preeklampsie ve II. a III. trimestru těhotenství. Test je doporučeno provádět u všech žen se zvýšeným rizikem preeklampsie, tedy i nezávisle na výsledku testu v I. trimestru. Rychle se zvyšující hodnota poměru sFlt-1/PIGF signalizuje rozvíjející se preeklampsii. Komplexní management ukazuje obr. č. 2.



### Vyhodnocení a doporučený postup

Vyhodnocení a další doporučený postup jsou vždy dány výrobcem testovacích kitů. Výsledky testu je vždy nutné posuzovat komplexně s výsledky ostatních vyšetření, jako ultrazvukového a dopplerovského vyšetření, s výsledky klasických laboratorních vyšetření při preeklampsii a klinickým stavem těhotné v kontextu s gestačním stářím plodu. Je to významné z hlediska optimální doby ukončení těhotenství.<sup>3,4,6</sup>

### Závěr

Stanovení MAP, dopplerovské vyšetření uterinních arterií a stanovení hodnoty PIGF (PAPP-A) v I. trimestru se zdá být užitečnou metodou selekce žen s potencionálním rizikem vzniku preeklampsie. Stanovení poměru sFlt/PIGF ve II. a III. trimestru je nový užitečný test sloužící k časnému odhalení subklinických stádií preeklampsie.



Přínosem metod je možnost predikce preeklampsie, stratifikace a optimalizace poskytované péče, což může přispět ke zlepšení prenatálních výsledků a odvrácení fatálních komplikací jak u matky, tak u plodu.

Nezávislý odborný článek publikovaný v časopise *Gynekologie a porodnictví* 2020; 4(2): 1-3 díky finanční podpoře společnosti Roche s.r.o., Diagnostics Division.



#### doc. MUDr. Tomáš Binder, CSc.

Přednosta kliniky, Gynekologicko-porodnická klinika UJEP a Masarykovy nemocnice, Ústí nad Labem  
Kontakt: tomas.binder@kzcr.eu

### LITERATURA

1. Bujold, E, Roberge S, Lacasse Y, et al. Prevention of preeclampsia and intrauterine growth restriction with aspirin started in early pregnancy: A meta-analysis. *Obstet Gynecol* 2010;116:402–414.
2. Henderson JT, Whitlock EP, O'Connor E, et al. Low-dose aspirin for prevention of morbidity and mortality from preeclampsia: A systematic evidence review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2014;160:695–703.
3. Herraiz I, Llorba E, Verlohren S, Galindo A; Spanish Group for the Study of Angiogenic Markers in Preeclampsia. Update on the Diagnosis and Prognosis of Preeclampsia with the Aid of the sFlt-1/ PIGF Ratio in Singleton Pregnancies. *Fetal Diagn Ther* 2018;43:81–89.
4. Zeisler H, Llorba E, Chantraine F, et al. Predictive Value of the sFlt-1:PIGF Ratio in Women with Suspected Preeclampsia. *N Engl J Med* 2016;374:13–22.
5. Rolnik DL, Wright D, Poon LCY, et al. ASPRE trial: performance of screening for preterm pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2017;50:492–495.
6. Poon LCY, et al. Screening and prevention of preeclampsia. *Maternal Fetal Med* 2019;1:25–30.
7. Phipps E, Prasanna D, Brima W, Jim B. Preeclampsia: updates in pathogenesis, definitions, and guidelines. *Clin J Am Soc Nephrol* 2016;11:1102–1113.



Na úvod si můžeme položit dvě otázky: Proč je nabízeno laboratorním stanovení celkového vitamínu B12 i tzv. aktivní formy? Co je tak zajímavého na vitamínu B12, že se dostaly na trh relativně krátce po sobě komerční soupravy stanovující obě formy analytu na automatických analyzátořech?

## Aktivity také s aktivním vitamínem B12

RNDr. PAVEL ŠKRABÁLEK,<sup>1</sup> RNDr. JANA HRADISKÁ, Ph.D.<sup>2</sup>

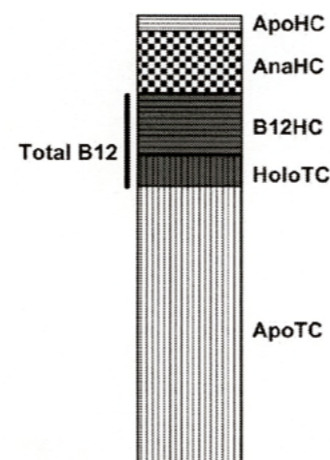
<sup>1</sup> Oddělení klinické biochemie a hematologie Turnov, Krajská nemocnice Liberec, a.s.

<sup>2</sup> Oddělení klinické biochemie, Krajská nemocnice Liberec, a.s.

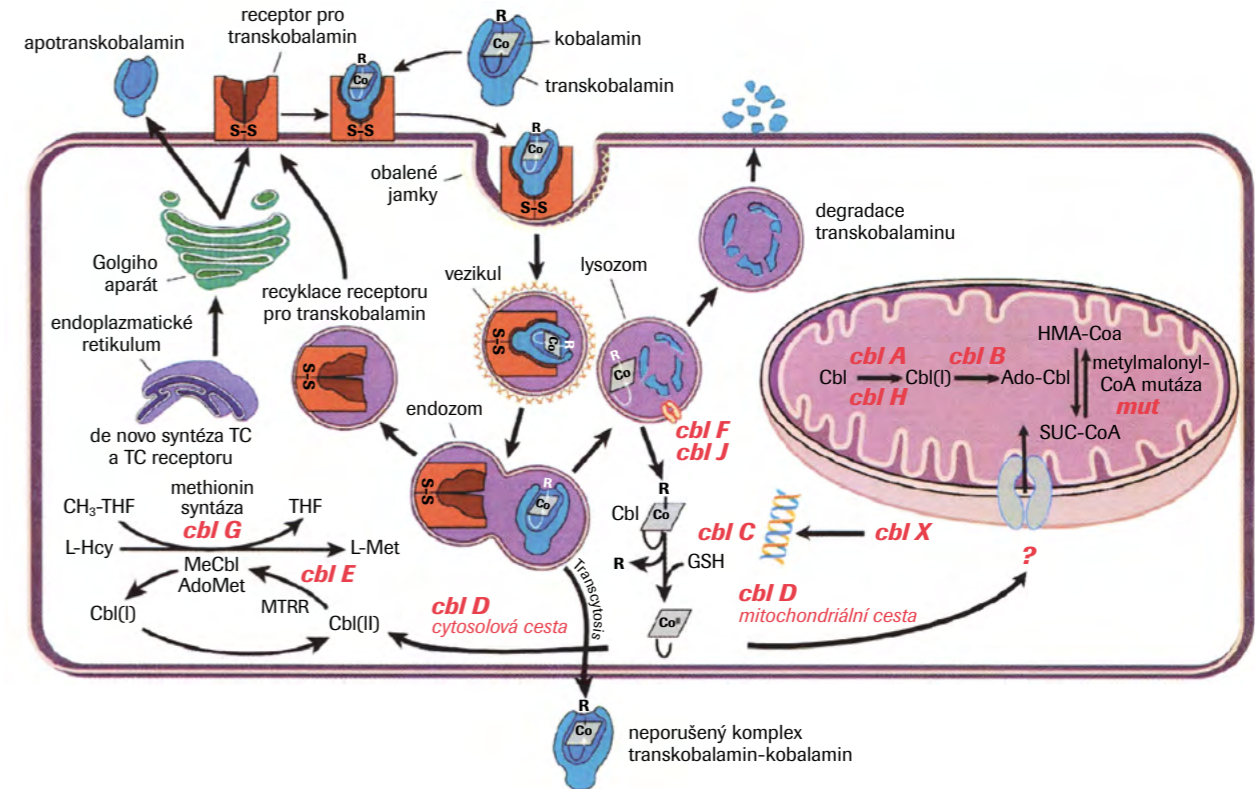
Na tyto otázky víceméně odpovídá P. H. Golding<sup>1</sup>, kterého ale spíše zaujal tzv. Herbertův model<sup>2</sup>. Tento model popisuje biochemický a hematologický sled událostí, jejichž následkem je negativní bilance vitamínu B12. Nevědomky tím položil i základ pro komercializaci holotranskobalaminu (aktivní B12).

Pokusme se s pomocí literárních zdrojů představit analyt, o kterém mluvíme. U zdravého člověka žaludeční kyseliny odštěpí B12 od bílkovin, haptokorin (HC) a transkobalamin (holoTC).<sup>20</sup> Odkud se berou nosiče B12, není příliš jasné. HoloHC putuje do jater, kde je vitamin oddělen a uskladněn. HoloTC přechází do oběhu a je distribuován k buňkám, které jej potřebují. Nyní je nutné ještě přidat regulační principy. Při vzniku potřeby B12 pravděpodobně synergicky působí dva „dveřníci“ pro vitamin B12. Jednak se zvyšuje produkce IF a současně se zvyšuje uvolňování holoHC do žluči z jater, takže

► Obr. č. 1: **Vitamin B12 a jeho vazebné proteiny v plazmě**<sup>14</sup>. Kobalamin (vitamin B12) a jeho vazebné proteiny v lidské plazmě. Obrázek ukazuje vztah mezi celkovou koncentrací proteinů vázajících vitamin B12 v plazmě a distribuci vitamínu B12 a jeho analogy mezi proteiny. Použité jsou průměrné koncentrace následujícím způsobem – celkový transkobalamin: 1 000 pmol/l [holotranskobalamin (HoloTC): 100 pmol/l; apotranskobalamin (ApoTC): 900 pmol/l]; celkový haptokorin: 450 pmol/l [vitamin B12 vázaný na haptokorin (B12HC): 200 pmol/l; analogy vitamínu B12 vázané na haptokorin (AnaHC): 200 pmol/l; apohaptokorin (ApoHC): 50 pmol/l]; celkový vitamin B12: 300 pmol/l



nosič haptokorin degradován enzymy vylučovanými pankreatem, aby přestoupil na vnitřní faktor, který je vůči proteolytickým enzymům odolný.<sup>20</sup> V terminálním ileu cesta končí, IF je absorbován endocytózou. Zprostředkována je komplexem cubam. Komplex se skládá ze dvou spolupracujících molekul: cubilinu, vázajícího vnitřní faktor, a molekuly označované jako amnionless (AMN), která obstarává ukotvení v membráně a zajišťuje endocytické schopnosti. Uvnitř enterocyty je vnitřní faktor degradován proteázami lysozomu. Uvolněný B12 uniká pravděpodobně s pomocí proteinu LMBD1 membránou lysozomu do cytoplazmy. Na opačném konci enterocyty, pravděpodobně s pomocí transportérového proteinu MRP1, proniká volný B12 do portální žíly, kde se následně váže na haptokorin (holoHC) a transkobalamin (holoTC).<sup>20</sup> Odkud se berou nosiče B12, není příliš jasné. HoloHC putuje do jater, kde je vitamin oddělen a uskladněn. HoloTC přechází do oběhu a je distribuován k buňkám, které jej potřebují. Nyní je nutné ještě přidat regulační principy. Při vzniku potřeby B12 pravděpodobně synergicky působí dva „dveřníci“ pro vitamin B12. Jednak se zvyšuje produkce IF a současně se zvyšuje uvolňování holoHC do žluči z jater, takže



▲ Obr. č. 2: **Zpracování vitamínu B12 z potravy v buňce**.<sup>7</sup> Buňky přijímají holoTC pomocí TC endocytózu zprostředkovanou TC-receptorem (TCR). V lysozomu je kobalamin (Cbl) uvolněn a apotranskobalamin je degradován, zatímco TCR je recyklován a vystaven zpět na buněčný povrch. Cbl opouští lysozom prostřednictvím transportéru scblF/cblJ. V cytosolu podléhá Cbl zpracování enzymem cblC, který katalyzuje odstranění axiálního ligandu (R) a redukci kobaltu. Osud nově zpracovaného B12 je dán interakcemi cblC-cblD, které jej nasměrují k cytosolické methioninesyntáze (MS, cblG) nebo mitochondriální metylmalonyl-CoA mutáze (MCM, mut). Nutriční a funkční nedostatek B12 tak vede k inaktivaci závislých enzymů MS a MCM a zvýšení tHcy a MMA.

se dostává do dvanáctníku a podstupuje znovu proces vstřebávání.<sup>3,4,5,6</sup>

Nutno ještě podotknout, že holoTC představuje menšinu cirkulujícího B12, a TC je saturován asi jen z 10 %. Haptokorin je nosičem i neaktivních forem vitamínu B12. Hladiny transportních proteinů nemají diurnální výkyvy a nekolísají ani při stravě bohaté na B12. Nejsou výraznější rozdíly mezi pohlavími. V těhotenství je popisován pokles hladiny B12 v posledním trimestru, ale nikoliv k hranici deficitu.

Hladina nosiče transkobalaminu se nemění ani při deficitu vitamínu. Naopak k poklesu může dojít při zvýšeném příjmu B12. Vyplývá to pravděpodobně z faktu, že buněčný receptor, pomocí kterého vstupuje do cílové buňky, má vyšší afinitu k holoTC a s jeho zvýšeným vstupem do buněk dojde k přechodnému

snížení v krvi, než se ustanoví nová rovnováha mezi apoTC a holoTC.

Když víte kudy a kam, je vhodná chvíle říci i proč. Vitamin B12, respektive dvě jeho formy, a to metylkobalamin a adenosylkobalamin, se jako kofaktor zásadním způsobem podílí na dvou metabolických procesech:

1. Metabolismus homocysteinu, metylkobalamin. Homocystein může být metabolizován transsulfurační cestou na cystein (enzymem cystationová β-syntáza – CBS), tato reakce je závislá na vitamínu B6. Druhou cestou je přenos metylové skupiny z homocysteinu (Hcy) na methionin za působení enzymu methioninsyntázy (MS). Kofaktorem methioninsyntázy je právě metylkobalamin. Pro úspěšný průběh této reakce jsou rovněž důležité esenciální foláty a enzym MTHFR. Z výše zmíněného vyplývá, že kromě nutričního

nedostatku vitamínu B12 hladinu Hcy v plazmě významně ovlivňuje snížená funkce CBS a MTHFR, ale hlavně i nedostatečný přísun folátu. Je nutno doplnit, že další enzymy metabolických drah, které mají vliv na hladinu Hcy (cystathioninová β-syntáza a S-adenosylhomocysteinhydroláza – SAHH), jsou nezávislé na hladinách vitamínu B12.

2. Metabolismus metylmalonové kyseliny (MMA), adenosylkobalamin. MMA je produkován během katabolismu mastných kyselin a aminokyselin s lichým počtem uhlíků v mitochondriích. Propionyl-CoA je prekurzor MMA v reakci katalyzované propionyl-CoA karboxylázou (PCC). Vrozené vady enzymu PCC vedou k propionikacidemii. Podobně mutace metylmalonyl-CoA mutázy (MCM) závislé na AdoCbl vedou k hromadění MMA-CoA a inhibici PCC, která



se projevuje jak zvýšením propionyl-CoA, tak i kyseliny propionové v cirkulaci. Výživový či funkční deficit vitamínu B12 má za následek inaktivaci MCM a zvýšení substrátu MM-CoA, který vstupuje do oběhu jako MMA.<sup>7</sup>

Nyní, když jsme si snad dostatečně vysvětlili, jakých metabolických reakcí se vitamin B12 účastní, je nám jasný i význam a důvody jeho stanovení:

- neurologické poruchy (tvorba myelinu);
- hromadění Hcy a MMA;
- megaloblastická anémie (syntéza DNA), hypersegmentace lymfocytů;
- hladina B12 ovlivněná léky obsahujícími inhibitory protonové pumpy, metformin;
- součást diagnostiky poruch vstřebávání;
- prevence Alzheimerova.

Při bližším průzkumu vyšetření nabízených v laboratořích napříč republikou zjistíme, že většina nabízí stanovení jak celkového B12, tak jeho aktivní formy s dovětkem, že aktivní forma je preferovaná jakožto specifičtější a rychlejší ukazatel deficitu vitamínu B12. Najdou se i „progresivní“ laboratoře, které již stanovení celkového B12 nahradily výhradně stanovením holoTC. Avšak ani holoTC není tak dokonalým testem, jak by se mohlo na první pohled zdát. Pojďme si shrnout problematické aspekty stanovení aktivního vitamínu B12:

1) **Poločas trvání**

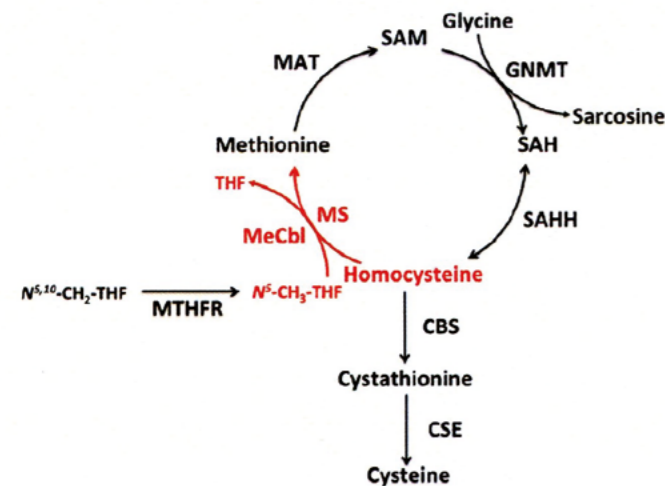
Různé zdroje uvádějí, že holoTC má poločas: 2 dny<sup>15</sup>, 18 hodin<sup>16</sup>, <2 hodiny<sup>17</sup>, 60–90 minut<sup>18</sup>, 6 minut<sup>19</sup>. Takže tu máme první problém, který vlastně sledujeme, když budeme měřit aktivní

formu. Není to jen kratičkový výřez v časové ose, kdy se hladina rychle mění podle potřeby v cílových tkáních? Nebo jde o dlouhodobě stabilní hladinu s rychlou obrátkou?

2) **Citlivost k absorpci**

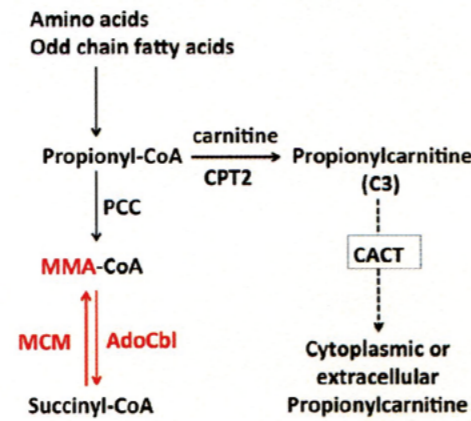
S prvním bodem je úzce spjata také často diskutovaná citlivost holoTC k absorpci vitamínu B12. Názory autorů na tento problém se různí, jak výstižně shrnul ve své práci Golding<sup>1</sup>. A opět zde vyvstává otázka, jestliže se hladina holoTC po podání vitamínu B12 zvedne, ukazuje nám jeho koncentrace opravdu dlouhodobý status, anebo jen hladinu po nedávné absorpci? Jak může být holotranskobalamin považován současně za marker časné deficiencie vitamínu B12 a zároveň za marker jeho absorpce?

A **Homocysteine metabolism**



- MAT = methionine adenosyltransferase**
- GNMT = glycine N-methyltransferase**
- SAH = S-adenosylhomocysteine hydrolase**
- SAHH = S-adenosylhomocysteine hydrolase**
- CBS = cystathionine β-synthase**
- MTHFR = methylenetetrahydrofolate reductase**
- PCC = propionyl-CoA carboxylase**
- CPT2 = carnitine palmitoyl transferase II**
- CACT = carnitine-acylcarnitine translocase**
- MS = methionine synthase**
- MCM = methylmalonyl-CoA mutase**
- MeCbl = methylcobalamin**
- AdoCbl = adenosylcobalamin**

B **Methylmalonic acid metabolism**



▲ Obr. č. 3: **Metabolismus homocysteinu a kyseliny metylmalonové.**<sup>7</sup> Homocystein je vedlejším metabolitem na průsečíku remetylace nebo transulfurační cesty. Homeostáza Hcy se tedy opírá o tři různé biochemické reakce [MS, cystathionin β-syntáza (CBS) a S-adenosylhomocystein hydrolázu (SAHH)], z nichž dvě (CBS a SAHH) jsou nezávislé na vitamínu B12. Kromě nutričního nedostatku vitamínu B12 ke zvýšení hladiny Hcy v plazmě může dojít sníženou funkcí CBS a MTHFR, jakož i nutričním nedostatkem folátů. (B) MMA je produkována během katabolismu mastných kyselin a aminokyselin s lichým počtem uhlíků v řetězci v mitochondriích. Propionyl-CoA je prekurzor MMA v reakci katalyzované propionyl-CoA karboxylázou (PCC). Vrozené vady PCC vedou k propionové acidémii. Podobně mutace v MCM závislé na AdoCbl vedou k hromadění MMA-CoA a inhibici PCC, což se projevuje jako zvýšení koncentrace propionyl-CoA, a k průniku kyseliny propionové do oběhu. Propionylkarnitin je první test při novorozeneckém screeningu.

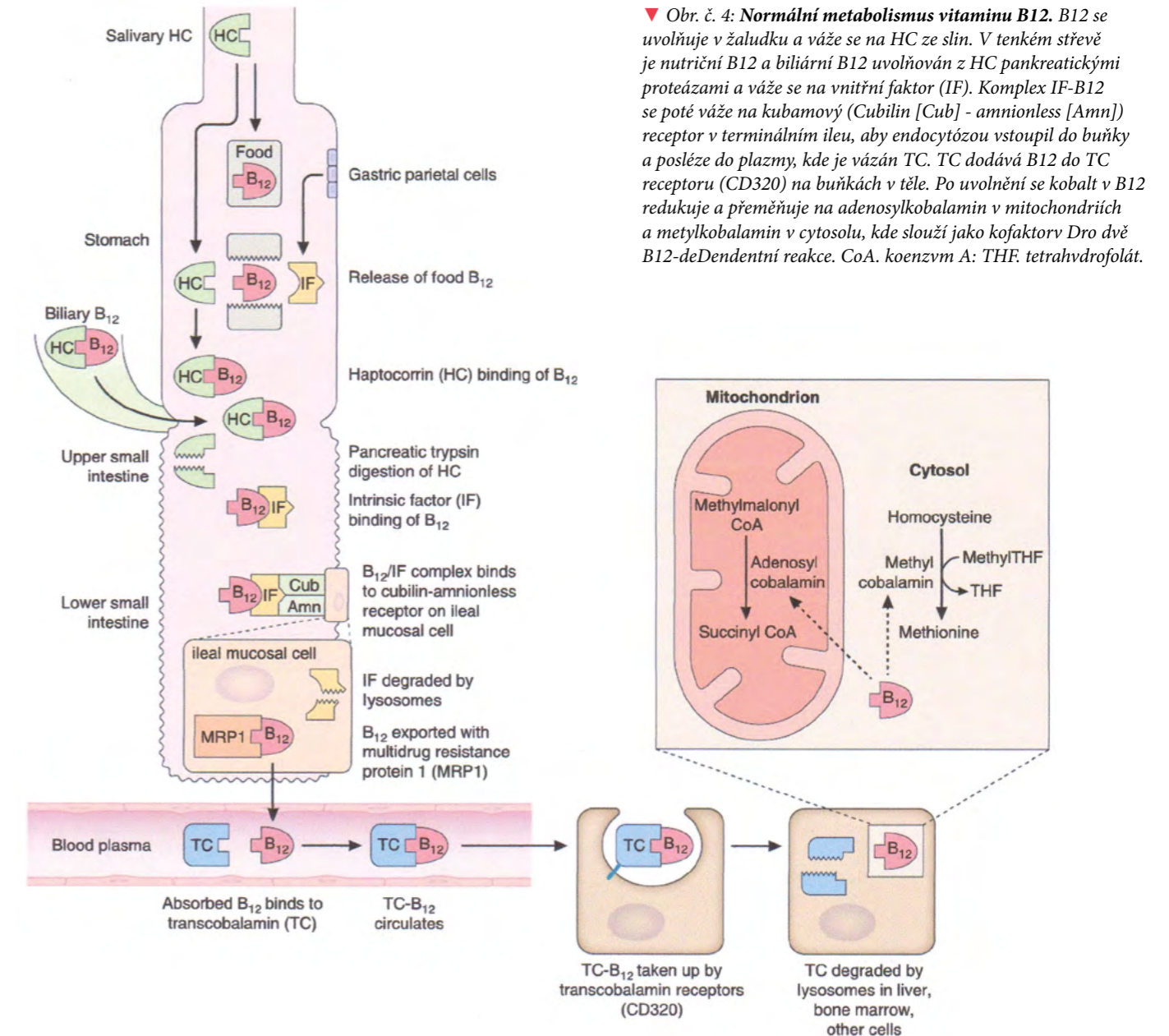


3) **Homeostáza holoTC**

Většina publikací i výrobci se při propagaci holoTC opírá o výsledky dr. Herberta, který pokládá holoTC za první metabolit reagující na deficienci, nebo chceme-li sníženou absorpci, vitamínu B12.<sup>8</sup> Tato hypotéza však má opět několik úskalí. U zdravého jedince, který nemá porušenu absorpci vitamínu B12, ale pouze jeho deficit v potravě, trvá několik desítek let, než se vyvine deficit z důvodu existence enterohepatálního oběhu. Každý jedinec má ve svém těle zásobu přibližně 2–3 mg vitamínu B12, přičemž většina je lokalizována v játrech. Odtud je

každý den přibližně 1,4 µg secernováno žlučí zpět do střeva, kde je opět B12 zpracován stejným způsobem jako vitamin z potravy. Reabsorpce tohoto „zásobního“ B12 je přibližně 50%.<sup>9,10</sup> Tento fakt ve své publikaci připouští i Herbert. Je ovšem jasné, že v tomto případě k poklesu holotranskobalaminu nedojde, i když fakticky již nastal jeho deficit. Herbertova hypotéza holoTC jakožto prvního markeru deficitu B12 je tak platná pouze v případě, že dojde k náhlé změně vstřebávání vitamínu B12. To může být způsobeno např. přerušením tvorby IF, žluči či při odnětí části duodena či ilea,

kdy recyklovaný B12 nedokáže být zpracován stejně jako ten z potravy. Nicméně při výše zmíněných stavech (např. při resekci žaludku) si jsou lékaři vědomi nebezpečí nedostatku B12 a pacienta suplementují lékovou formou vitamínu B12. Tyto syntetické formy vitamínu B12 nejsou vázány na bílkoviny, jako je tomu v potravě, a nepotřebují tudíž ke svému úspěšnému vstřebání IF ani ostatní faktory. Navíc velké množství podávaného B12 nepotřebuje ke svému průchodu přes střevní sliznici receptory, ale prochází volně pasivní difuzí.<sup>9</sup> Takže i v těchto případech, pokud je pacient správně



▼ Obr. č. 4: **Normální metabolismus vitamínu B12.** B12 se uvolňuje v žaludku a váže se na HC ze slin. V tenkém střevě je nutriční B12 a biliární B12 uvolňován z HC pankreatickými proteázami a váže se na vnitřní faktor (IF). Komplex IF-B12 se poté váže na kubamový (Cubilin [Cub] - amnionless [Amn]) receptor v terminálním ileu, aby endocytózou vstoupil do buňky a posléze do plazmy, kde je vázán TC. TC dodává B12 do TC receptoru (CD320) na buňkách v těle. Po uvolnění se kobalt v B12 redukuje a přeměňuje na adenosylkobalamin v mitochondriích a metylkobalamin v cytosolu, kde slouží jako kofaktor v dvě B12-dependentní reakce. CoA. koenzym A: THF. tetrahydrofolát.

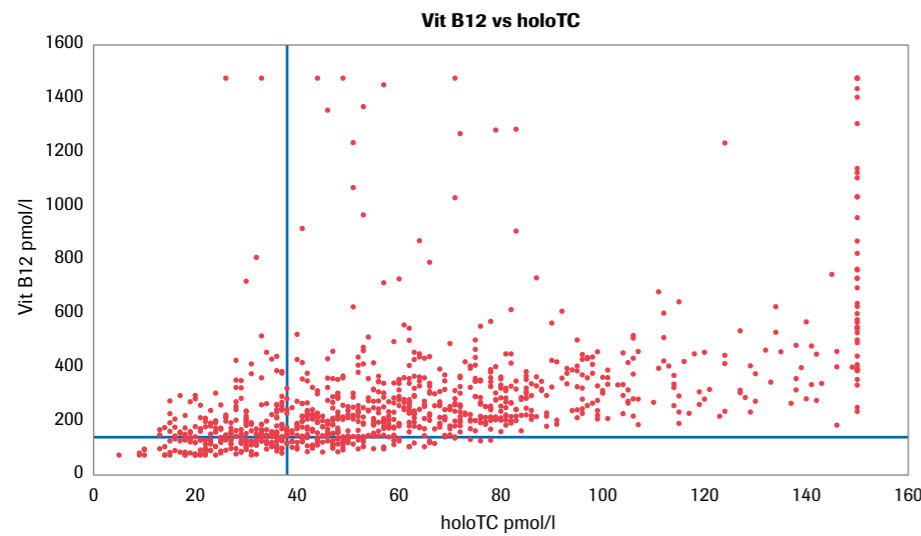


suplementován, nedochází k deficitu vitamínu B12 ani jeho aktivní formy.

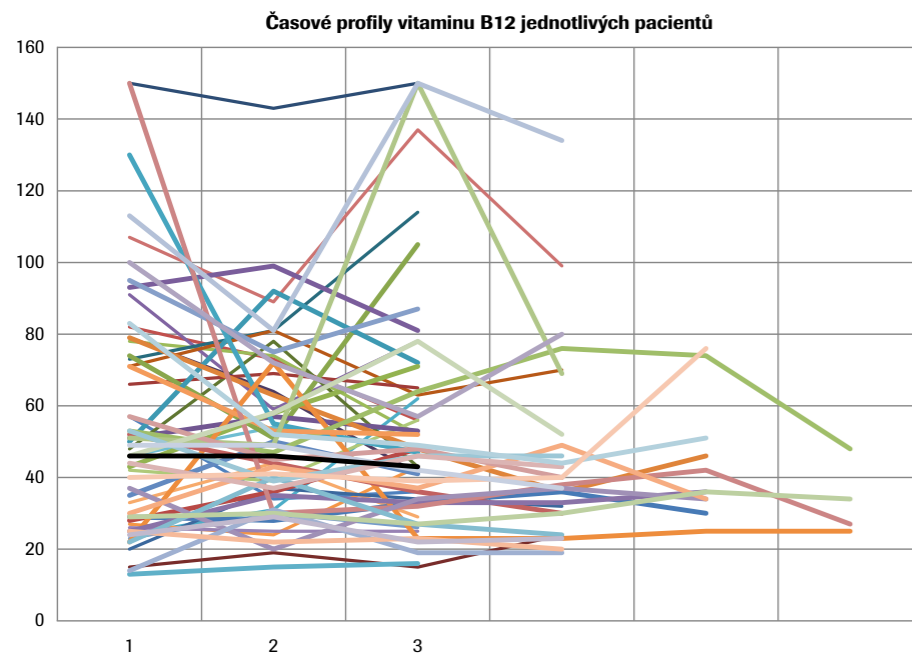
4) **Nejednotný cut-off**

Stanovení holotranskobalamínu je často doporučováno především v tzv. šedé zóně celkového vitamínu B12, která je udávána v rozsahu 150–300 pmol/l, a kdy se předpokládá, že stanovení holoTC je přesnější a diagnosticky cennější.<sup>11</sup> Avšak

i u stanovení aktivního B12 je nejednotnost v referenčních mezích a především pak ve spodní hranici, odkdy jsou výsledky stanovení holoTC považovány za patologické. Tato cut-off hodnota se v českých laboratořích pohybuje od 19 do 38 pmol/l, v zahraničních publikacích se často uvádí jako mezní hodnota až 50 pmol/l.<sup>1</sup> Tyto rozdílné meze jsou částečně dány tím,



▲ Graf č. 1: Vztah celkového vitamínu B12 a holotranskobalamínu – průsečík znázorňuje cut-off hodnoty holotranskobalamínu (38 pmol/l) a vitamínu B12 (141 pmol/l) používané v naší laboratoři



▲ Graf č. 2: Časový profil hladin vitamínu B12 – jednotlivé linie ukazují na vývoj hladin vitamínu B12 u jednotlivých pacientů v časových intervalech 1, 2 a 3; černá tučná linka představuje obecný trend daný mediánem hodnot

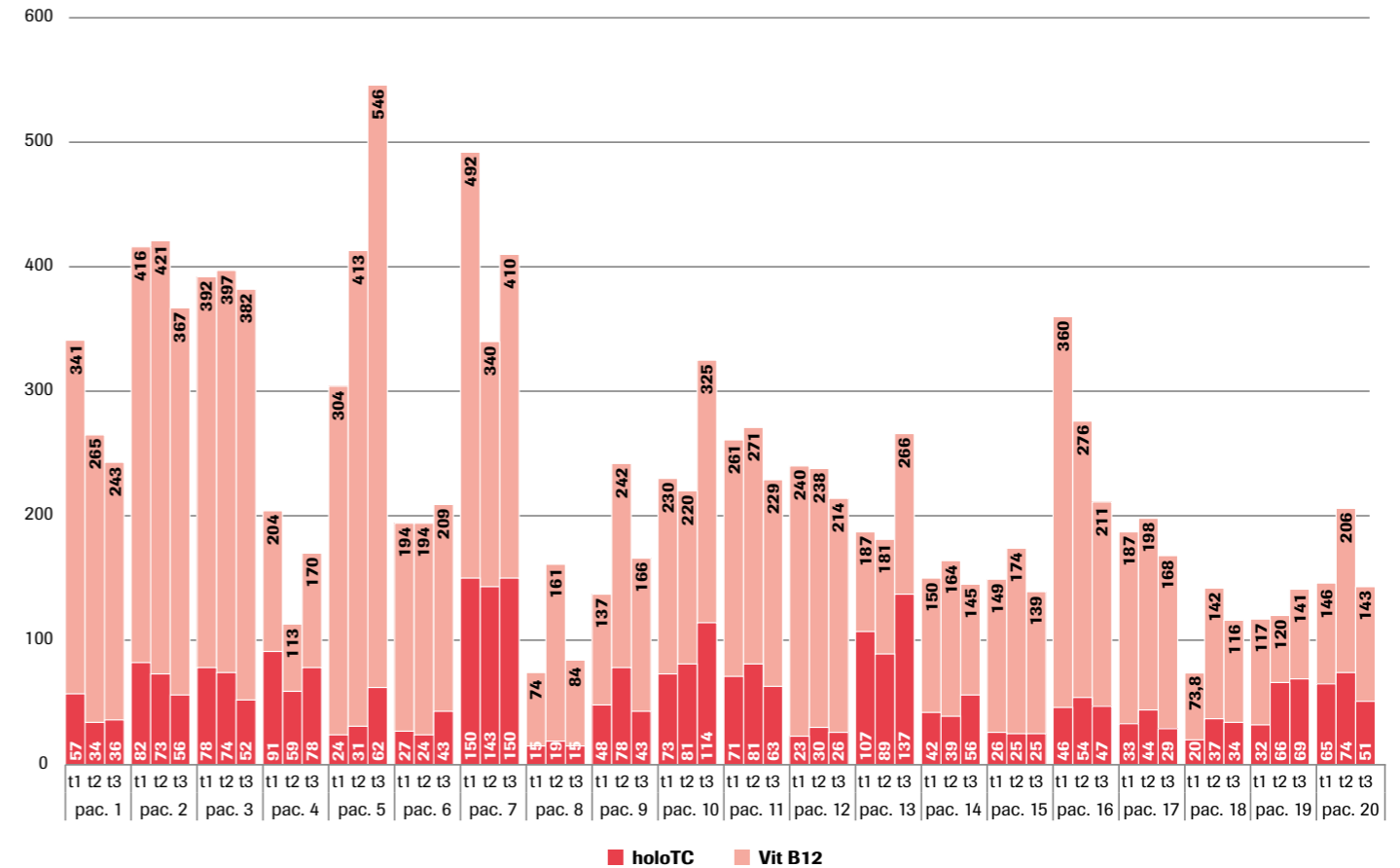
že hodnoty holoTC se liší, stejně jako jiné imunochemické metody, v závislosti na použitém testovacím systému. Avšak jak ukázal Devalia, interpretace získaných výsledků se liší nejen mezi výrobci, ale i v rámci jedné skupiny, kdy je dosaženo stejné hodnoty.<sup>12</sup> Takže se zdá, že i holoTC má stejnou šedou zónu jako celkový vitamin B12, kdy je interpretace získaných výsledků velmi nejednotná. V zahraniční literatuře se v případě výsledků v rozmezí 25–50 pmol/l doporučuje stanovení některého z dalších markerů, jako je celkový B12, homocystein či metylmalonát.<sup>13</sup> Nevytrácí se však tímto výhodou stanovení holoTC?

5) **Problematika principu stanovení**

Soupravy používají ke stanovení B12 značený vnitřní faktor. Přirozené protilátky proti vnitřnímu faktoru, vyskytující se při perniciózní anémii, mohou způsobit falešně zvýšené hodnoty B12. Je nanejvýš vhodné si ověřit, zda použitá souprava je vůči tomuto efektu odolná.

**Výsledky pozorování:**

1. Vyhodnotili jsme soubor 651 pacientů hematologické poradny s mediánem věku 68 let (14–98) indikovaných ke stanovení vitamínu B12 na základě klinického vyšetření. Na základě regrese a grafického znázornění vztahu mezi B12 a holoTC nelze jednoznačně říci, že by stanovení aktivní formy, či spíše biologicky dostupné formy vitamínu B12 přinášelo výrazný profit oproti stanovení celkového B12 (graf č. 1). Jedná se spíše o psychické uspokojení, že stanovují akční metabolit místo analytu, který vypovídá spíše o celkových zásobách vitamínu. Když se to budeme snažit vyjádřit přesněji, musíme konstatovat, že 40 % vzorků mělo holoTC nad kritickou hladinou, kdy by podle VB12 (zásoba) poukazovala na deficit. Při pohledu na druhou stranu grafu najdeme 18 % vzorků,



▲ Graf č. 3: Srovnání hladin celkového vitamínu B12 a holotranskobalamínu u vybraných pacientů – hodnoty vitamínu B12 a holoTC (pmol/l) byly stanoveny ve třech časových intervalech

1. kdy holoTC signalizuje depleci, i když je celkový VB12 v normě. Naprostým extrémem je poměr 26, resp. 33 mg/l holoTC vůči hodnotě VB12 vyšší, než je horní hranice rozsahu měření.
2. Literatura uvádí, že nedostatek vitamínu je provázen klinickými příznaky. Mezi ně patří i střední objem erytrocytů. Porovnáním obou skupin vzorků rozdělených podle hladiny VB12 zjistíme, že nedostatkem trpící skupina má medián 93,3 (62,7–122) a zásob si užívající skupina má medián 92 (58,4–141) fl. Stejný obraz poskytuje i varianta s holoTC, kdy pacienti s deficitem měli medián MCV 92,5 a bez deficitu 92,1 fl. V obou případech statisticky nevýznamný rozdíl.
3. Porovnání s hodnotami Hcy nebylo provedeno kvůli nízkému počtu výsledků v rámci vybraného souboru. Stranou také zůstaly hodnoty ferritinu, receptoru, protože víceprvková

4. analýza zohledňující nedostatek železa a MCV by asi nic nepřinesla.
4. Dále lze porovnat individuálnost hodnot v tom smyslu, že ve skupině jsou pacienti, u nichž lze sledovat vývoj v čase, a zde by bylo možno najít nějaké odpovědi (graf č. 2 a 3). Bohužel intervaly mezi jednotlivými odběry nejsou jednotné, ale liší se pacient od pacienta. Dle lékařů hematologické poradny dostávají pacienti indikovaní k odběru pro stanovení B12 intramuskulárně dávku 1 000 mg B12, která je opakována s každou návštěvou ordinace. Lze pozorovat, že pacienti si vytvoří jakousi individuální hladinu vitamínu, která se u většiny z nich časem příliš nemění. Rovněž lze pozorovat jistou korelaci mezi celkovou hodnotou B12 a holoTC. Konkrétně Spearmanův korelační koeficient mezi vitamínem B12 a holoTC dosahuje

hodnoty 0,6234 na hladině významnosti  $P < 0,0001$ .

Jedna zásadní odpověď je však jasná. Herbertův model, či spíše přístup k problematice, je z praktického hlediska poněkud nelogický.

Běžně se nehledá deficit vitamínu B12 a s ním spojená anémie, pro kterou jsme ani nezjistili její procentuální zastoupení v celkovém počtu anémií. Hledají se především pomocí logického pavouka důvody anémie. V něm je anémie z nedostatku vitamínu B12 jednou z mnoha příčin. Budeme-li se držet tohoto přístupu, pak stanovení obou variant B12 se stane přínosným.

Ne vždy je nedostatek B12 primární příčinou, nýbrž jen průvodním projevem, a společně s údaji z osobní anamnézy mohou současně stanovené hodnoty



celkového a aktívneho B12 výrazne prispieť k odhaleniu príčin anémie.

Nicméně jsou tu i jiná zajímavá místa, na která by se nemělo zapomínat, mezi ně patří stanovení VB12 u pacientů požívajících

metformin či inhibitory protonové pumpy a celá oblast neurologie. Naléhavost stanovení pak roste s pribývajícím vekom pacientů.

**Rádi bychom podĎkovali MUDr. Adriane Heindorfer a MUDr. Lence Walterové**

**z oddĎlení klinické hematologie za podporu a pomoc s výběrem pacientů a odborné konzultace. Paní Ing. Heleně Švěbišové za možnost použití přesně a správně pracujícího analyzátoru COBAS INTEGRA® 800.**



### RNDr. Pavel Škrabálek

OddĎlení klinické biochemie a hematologie Turnov, Krajská nemocnice Liberec, a.s., 28. řijna 1000, Turnov  
Kontakt: pavel.skrabalek@nemlib.cz

Absolvent Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně. V roce 1988 byl přijat do kolektivu příjemných lidí na oddĎlení klinické biochemie v Liberci, vedené MUDr. Lubomírem Dlouhým, a stal se na dlouhá léta jeho součástí. V současnosti působí v laboratoři Krajské nemocnice v Turnově.

### RNDr. Jana Hradiská, Ph.D.

OddĎlení klinické biochemie, Krajská nemocnice Liberec, a.s., Husova 357/10, Liberec  
Kontakt: jana.hradiska@nemlib.cz

Absolvovala magisterské studium v oboru klinická biologie a následně postgraduální studium infekčního lékařství na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity. Od roku 2018 pracuje na oddĎlení klinické biochemie Krajské nemocnice Liberec. Aktuálně si užívá mateřské dovolené s dcerkou.



## LITERATURA

1. Paul Henry Golding\*. Holotranscobalamin (HoloTC, Active-B12) and Herbert's model for the development of vitamin B12 deficiency: a review and alternative hypothesis. *SpringerPlus* (2016) 5: 668.
2. Herbert V (1987). The 1986 Herman award lecture. Nutrition science as a continually unfolding story: the folate and vitamin B-12 paradigm. *Am J Clin Nutr* 46(3): 387-402.
3. Loikas S (2007). Vitamin B12 deficiency in the aged: laboratory diagnosis, prevalence and clinical profile, Thesis. University of Turku. <https://www.doria.fi/bitstream/handle/10024/29134/D775.pdf?sequence=1>. Accessed 21 March 2016.
4. Seetharam B, Yammani RR (2003). Cobalamin transport proteins and their cell surface receptors. *Expert Rev Mol Med* 5(18): 1-18.
5. Andrĕs E, Loukili NH, Noel E, Kaltenbach G, Abdelgheni MB, Perrin AE, Noblet-Dick M, Maloisel F, Schlienger JL, Blicklĕ JF (2004). Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. *CMAJ* 171(3): 251-259.
6. Quadros EV (2010) Advances in the understanding of cobalamin assimilation and metabolism. *Br J Haematol* 148(2): 195-204.
7. Hannibal L, Lysne V, Björke-Monsen A-L, Behringer S, Grünert SC, Spiekerkoetter U, Jacobsen D, Wand Blom HJ(2016). Biomarkers and algorithms for the diagnosis of vitamin B12 deficiency. *Front. Mol. Biosci.* 3: 27.
8. Herbert V (1994). Staging vitamin B12 (cobalamin) status in vegetarians. *Am J Clin* 59: 1213S-1222S.
9. Shane B (2008). Folate and vit B 12 metabolism: Overview and interaction with riboflavin, vitamin B6, and polymorphism. *Food and NutriBullet* 29: S5-S16.
10. Institute of Medicine. 1998. Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. Washington, DC: The National Academies Press.
11. Hyánek J, Hájek Z, Dubská L, Pejznochová H, Vaingátová S, Matoška V, Hejtmánková J, Křížová M, Vondráčková D, Pehal F, Hoffman R, Matoušková, Hyánek T, Martiníková V, Privarová J (2011). Praktický diagnostický benefit z rutinního stanovení holotranscobalaminu u pacientů metabolické ambulance. *Klinická biochemie a metabolismus*, roč. 19, č. 1, s. 15-22. ISSN: 1210-7921.
12. Devalia V, Mackenzie F (2019). Laboratory performance of serum holotranscobalamin assay in the United Kingdom (UK) as assessed by the UK national external quality assessment scheme for haematinics. *Blood* 134 (supplement 1): 5793.
13. Lloyd-Wright Z, Hvas AM, Møller J, Sanders TA, Nexø E (2003). Holotranscobalamin as an indicator of dietary vitamin B12 deficiency. *ClinChem.*; 49(12): 2076-8.
14. Nexø E, Hoffmann-Lücke E (2011). Holotranscobalamin, a marker of vitamin B-12 status: analytical aspects and clinical utility. *The American journal of clinical nutrition*, 94(1), 359S-365S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.111.013458>
15. *Bulletin St. Paul's Hospital and Mount St. Joseph's Hospital.*
16. *Am J Clin Nutr*2007; 85: 1057-61. S odkazem na Hom BL, Olesen HA. Plasma clearance of 57 cobalt-labelled vitamin B12 bound in vitro and in vivo to transcobalamin I and II. *Scand J ClinLabInvest* 1969; 23: 201-11.
17. *Handbook of Vitamins*, Janos Zempleni, John W Suttie, Jesse F Gregory III, Patrick J Stover.
18. *The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health*, Gerald F Combs, Jr., James P.
19. *Biochemical, Physiological, and Molecular Aspects of Human Nutrition*, Martha H Stipanuk, Marie A Caudill.
20. Nielsen, MJ et al. Vitamin B12 transport from food to the body's cells - a sophisticated, multistep pathway *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 345-354 (2012).

## HbA<sub>1c</sub> 2020

prof. OLIVER RÁCZ, M.D., Ph.D.

Ústav patologickej fyziológie, Lekárska fakulta, UPJŠ. Cumulus s.r.o. biochemické laboratórium

### Veľmi krátky pohľad do histórie – glykácia a „serendipity“

Keď Samuel Rahbar (1929-2012), v Teheráne v roku 1969 zbadal niečo nezvyčajné v elektroforetickom obraze hemoglobínu u diabetikov, netušil, že je iniciátorom jedného z najväčších objavov v laboratórnej medicíne a v diabetológii.<sup>1,2</sup> Na rozdiel od dvoch predošlých opisov podobného nálezu (jeden bol publikovaný v japončine, autori druhého považovali zmenený hemoglobín za účinok tolbutamidu) mal to šťastie, že

vďaka dobrým kontaktom medzi Iránom a USA bol vyslaný na študijný pobyt do Albert Einstein College of Medicine v New Yorku\*, kde už vedeli, že existujú malé frakcie hemoglobínu. Princíp „serendipity“ v jeho prípade fungoval\*\*. Dať dokopy to, že tieto malé frakcie sú postsynteticky zmenené deriváty HbA, že glukóza sa neenzýmovo viaže na aminokupiny bielkovín a to, že diabetici majú hyperglykémiu, bola už rutinná práca a prvý dlhodobý retrospektívny ukazovateľ glykemickej kompenzácie chorých s diabetes mellitus bol na svete. Od objavu nezvyčajného hemoglobínu uplynulo o niečo viac ako 50 rokov a dnes by každý chorý s diabetes mellitus (je ich viac ako 500 miliónov na celom svete) by mal mať tento ukazovateľ stanovený v pravidelných intervaloch.<sup>3</sup>



**Hemoglobín má viac voľných aminokupín, na ktoré sa viažu rôzne endogénne aldehydy (nielen glukóza) a ketóny.**

Je to pravda, ale HbA<sub>1c</sub> je práve tá frakcia, ktorá obsahuje viazanú glukózu na terminálnu aminokupinu beta reťazca hemoglobínu. Iné látky viazané na hemoglobín a väzba glukózy na iné miesta hemoglobínu nemajú žiadny praktický význam pri hodnotení glykemickej kompenzácie chorých s diabetes mellitus.



**Je tá reakcia úplne ireverzibilná?**

Prvý krok väzby glukózy na hemoglobín je reverzibilný, druhý krok nie. Diskutuje sa o enzýme, ktorý odstraňuje viazanú glukózu z hemoglobínu. Deglykácia HbA<sub>1c</sub> (ak vôbec existuje) nemá zatiaľ praktický význam pri hodnotení glykemickej kompenzácie chorých s diabetes mellitus.



**A čo, ak vyšetrený má v krvi iné hemoglobíny (HbF, HbS a iné)?**

Fetálny hemoglobín nemá beta reťazec, HbA<sub>1c</sub> z HbF nevzniká. Hemoglobíny pri hemoglobinopatiách a talasémiách môžu viazať glukózu, ale nie tak, ako HbA. U klinicky manifestných chorých je aj znížená životnosť erytrocytov. Chromatografické metódy odkrývajú problém, ale výsledok ani tak nie je použiteľný pre monitorovanie glykemickej kompenzácie. Pre prax je dôležité, že falošný výsledok merania sa však vyskytuje aj u zdravých heterozygotoch.



**A čo je v prípade skráteného prežívania červených krviniek?**

Pri hemolytických anémiách so skráteným prežívaním erytrocytov je porušený druhý axióm. Podľa niektorých údajov je to podobne aj pri sideropenickej (mikrocytovej) anémii. Pre prax platí, že pri koncentrácii hemoglobínu pod 100 g·L<sup>-1</sup> je potrebné výsledok HbA<sub>1c</sub> hodnotiť opatrne.



**Glykémie posledné 4 mesiace?**

Nie, pretože kinetika glykácie je zložitá a hladina HbA<sub>1c</sub> lepšie odráža hyperglykémiu, ktoré boli 8-12 týždňov pred meraním, ako tie, ktoré boli dávnejšie.

▲ Tab. č. 1: Provokatívne otázky čertíkov a odpovede na ich otázky



**Všetko je jasné (až na niekoľko detailov)**

Dogmatické axiómy glykácie hemoglobínu boli známe už na konci 70. rokov minulého storočia:<sup>4</sup>

1. Glukóza sa neenzýmovo a ireverzibilne viaže na terminálnu aminoskupinu beta reťazca ľudského hemoglobínu. Adukt je malá frakcia HbA<sub>1c</sub>.
2. Životnosť červených krviniek človeka je 120 dní.
3. Z toho vyplýva, že koncentrácia HbA<sub>1c</sub> je integrovaným retrospektívnym ukazovateľom glykemickej kompenzácie chorých s diabetes mellitus za posledné 4 mesiace.

Čerti sa vždy skrývajú v detailoch a ne-majú radi dogmatické axiómy. Ich provokatívne otázky a odpovede sú zhrnuté v tabuľke 1. Písali sme o nich v Labor Aktuell už predtým,<sup>5-8</sup> a preto ich na tomto mieste opakujeme len stručne.

**Všetko je jasné, ale vieme to merať?**

Prvé dve desaťročia po objave glykácie hemoglobínu boli v znamení veľkého entuziazmu biochemikov a diabetológov. Určité vytriezvenie prišlo až v roku 1993, keď po ukončení štúdia DCCT bol publikovaný článok a nejednotnosti v metodikách a o potrebe harmonizácie výsledkov dosiahnutých rôznymi metódami.<sup>9</sup> Následne boli realizované národné štandardizačné systémy v USA, Švédsku a Japonsku. Bodku za neistotou a chýbaním nadväznosti za primárny analyt dala pracovná skupina IFCC v roku 2004.<sup>10</sup> Problémom bola definícia primárneho analytu, pretože „glykovaný hemoglobín“ nie je jednoznačne definovaná látka a „HbA<sub>1c</sub>“ je chromatografická frakcia hemoglobínu A, ktorá okrem formy s glukózou viazanou na terminálnu aminoskupinu beta reťazca môže obsahovať aj iné prímеси. Za primárny analyt bol deklarovaný terminálny hexapeptid hemoglobínu A s viazanou

**SEPARAČNÉ METÓDY**

**HPLC A KAPILÁRNA ELEKTROFORÉZA**  
Tieto metódy delia frakcie hemoglobínu podľa ich náboja a rozmeru. Technologické detaily jednotlivých metód sa líšia, ale všetky sú nadviazané na primárny IFCC analyt.

**BORONÁTOVÁ AFINITNÁ CHROMATOGRÁFIA**  
Metódy sú založené na princípe väzby cis-diolových skupín (v molekulách glukózy) na nosič a v následnej elúcii frakcií hemoglobínu. Napriek odlišnému princípu by certifikované metódy viazané na primárny analyt mali poskytnúť také isté výsledky ako HPLC a kapilárna elektroforéza.

**Výhoda separačných metód je to, že „majú oči – vidia“ HbA<sub>1c</sub>.**

**IMUNOCHEMICKÉ METÓDY**

Protilátky proti terminálnemu hexapeptidu sa viažu s HbA<sub>1c</sub> a koncentrácia HbA<sub>1c</sub> sa stanovuje pomocou turbidimetrie.

**Imunochemické metódy sú slepé, ale MAJÚ DOBRÝ HMAT**

**ENZÝMOVÁ – NOVÁ METÓDA**

Hemoglobín vo vzorke je proteolytický, natrávený na aminokyseliny. HbA<sub>1c</sub> má na terminálny valín naviazanú glukózu, ktorá reaguje s fruktozylvalínoxidázou (FVO) za vzniku peroxidu vodíka, čo sa stanovuje štandardnou peroxidázovou chromogénovou metódou.

**Počet konkrétnych metód je vysoký, ale všetky sú aplikované na bežné laboratórne analyzátory a dodané výrobcami „na kľúč“.**

▲ Tab. č. 2: Prehľad metód na stanovenie HbA<sub>1c</sub><sup>11</sup>

glukózou. Dnes všetky metódy používané v praxi sú nadviazané na primárny analyt a preto by mali dávať také isté výsledky. Prehľad metód, ktoré sa v súčasnosti používajú, je v tabuľke 2.

Diabetológovia (hlavne tí mladší) si postupne zvykli na nové jednotky – namiesto % HbA<sub>1c</sub> mmol<sub>(glykovaného hexapeptidu)</sub> na mol<sub>(hemoglobínu)</sub> zjednodušene mmol·mol<sup>-1</sup>. Harmonizácia a plná nadväznosť však neznamenajú bezchybné výsledky, pretože presnosť a správnosť výsledkov nie je zaručená harmonizáciou IFCC.

Po ukončení IFCC štandardizácie tá istá pracovná skupina začala pracovať na celoeurópskom jednotnom hodnotení kvality kontroly meraní HbA<sub>1c</sub>. Na poslednom publikovanom hodnotení z roku 2018

sa zúčastnilo 17 krajín, 2166 laboratórií a 24 výrobcov. V roku 2019 sa tento počet zvýšil na 25 krajín a 4000 laboratórií. Výsledky boli prezentované a publikované vo forme, ktorá je zrozumiteľná aj pre odborníkov so základnými vedomosťami zo štatistiky. Hlavný výsledok projektu bol zhrnutý do jediného bodu: Celková chyba meraní bola v blízkosti 5 mmol·mol<sup>-1</sup>, čo je pre monitoring glykemickej kompenzácie chorých dostatočná (hoci nie ideálna) presnosť. Na dosiahnutie „bronzovej medaily“<sup>\*\*\*</sup> by tá chyba nemala byť vyššia ako 3,3 mmol·mol<sup>-1</sup>. Autori projektu konštatovali, že v uplynulom období došlo k zlepšeniu presnosti a správnosti metód väčšiny výrobcov na meranie HbA<sub>1c</sub>.<sup>12</sup> Druhá, veľmi dôležitá dimenzia zlepšenia je pravidelná externá kontrola kvality v jednotlivých krajinách.

\* Vtedy bol v Iráne pri moci Mohammad Reza Pahlavi, ktorý mal dobré kontakty so západnými krajinami a USA.  
\*\* Výraz pochádza z Perzie (dnes Irán – aká náhoda?). Ide o bájku o troch princoch Serendipiu, ktorí mali schopnosť objaviť dôležité veci tam, kde sa to vôbec nečakalo.  
\*\*\* Na striebro by bola potrebná chyba do 2 % a na zlato 1 %, ale od toho sme zatiaľ ďaleko.  
\*\*\*\* Pri študovaní odbornej literatúry (až na niektoré výnimky) má čitateľ pocit, že počuje pána cisára Franza Josefa, ktorý pri návšteve rôznych častí Monarchie vždy vyhlásil, že „všetko je veľmi pekné, všetko je veľmi dobré, so všetkým som veľmi spokojný“.

**Dnes to už vieme merať, výsledky sú presné a správne, ale to nestačí.**

Na základe výsledkov EurA1c môžeme s kľudným svedomím prehlásiť, že na dodané hodnoty z akreditovaných laboratórií sa dá spoľahnúť. Nemali by sme však zabudnúť, že HbA<sub>1c</sub> je dôležitý nie pre diabetológov, ale predovšetkým pre chorých s diabetes mellitus. To znamená, že rozhodujúca je spoločná snaha diabetológa a chorého dosiahnuť dlhodobu dobrú glykemicкую kompenzáciu, čo je základný predpoklad prevencie komplikácií diabetes mellitus. Ak sledujeme vývoj nových liekov a technológií, je jasné, že tento cieľ by sa dal dosiahnuť u každého chorého. Realita je žiaľ iná\*\*\*\*. Glykemicкая a celková metabolická kompenzácia veľkého počtu chorých s diabetes mellitus nie je dobrá, čo má za následok vysokú incidenciu a prevalenciu chronických komplikácií choroby. Príkladom nesprávnej interpretácie pokroku v medicíne je často opakovaná veta z publikácií a iných materiálov, že „daný liek znižuje HbA<sub>1c</sub> o určité percentá“. Toto tvrdenie je zmačtočné z viacerých dôvodov:

- Je veľký rozdiel, či sa znižuje HbA<sub>1c</sub> u zle alebo dobre kompenzovaného chorého.
- Podľa starých jednotiek nevieme, či zníženie o 5 % je zníženie z 13 % na 8 % alebo z 13,0 % na 12,75 %. Pri nových jednotkách tento problém nie je (zníženie z 65 mmol·mol<sup>-1</sup> o 5 % je 3,25 mmol·mol<sup>-1</sup>, t.j. na 61,75 mmol·mol<sup>-1</sup>).
- Hlavným problémom nie sú tieto matematické záležitosti, ale to, že **žiadny nový liek a žiadna nová technológia neznižuje HbA<sub>1c</sub>**. Zníženie HbA<sub>1c</sub> sa dá dosiahnuť len kreatívnou interpretáciou výsledkov vyšetrení, adekvátnou aplikáciou nových liekov a technológií, edukáciou, komunikáciou a hlavne spoluprácou lekára a chorého.

Rozpor medzi optimistickými výsledkami rôznych štúdií a skutočnosťou je



možné riešiť pomocou nového prístupu na základe koncepcie „RWE“ (real-word evidence, evidencie reálneho sveta), pomocou ktorej sa skúmajú konkrétne účinky rôznych intervencií na bežné klinické východiská.<sup>13</sup>

**Dostali sme výsledok HbA<sub>1c</sub> z laboratória, čo s tým?**

Základný prístup je veľmi jednoduchý. Prvým krokom je, či výsledok vyšetrenia je v súlade s ostatnými ukazovateľmi glykemickej kompenzácie. Stále platí pravidlo, ktoré sme vyslovili už pred mnohými rokmi:

- Ak je hodnota HbA<sub>1c</sub> chorého s diabetes mellitus blízko norme, jeho glykemicкая kompenzácia je pravdepodobne dobrá, ale nedajú sa vylúčiť nepríjemné hypoglykemicke epizódy. (Kontrolovať podľa glykémii a rozhovoru s chorým!).
- Ak je hodnota HbA<sub>1c</sub> chorého veľmi vysoká, je určite nedostatočne kompenzovaný, ale HbA<sub>1c</sub> nedáva informáciu o tom, čo je podstata problému. (Kontrolovať podľa glykémii a rozhovoru s chorým!).
- Hodnoty HbA<sub>1c</sub> v strednom pásme neposkytujú dostatočnú informáciu o jeho glykemickej kompenzácii. (Kontrolovať podľa glykémii a rozhovoru s chorým!).

Uvedené tri pravidlá sú platné aj v dobe stále širšieho používania kontinuálneho merania glykémie a „flash monitoringu“, ale dajú sa lepšie definovať. Boli zavedené nové pojmy, z ktorých je najdôležitejší „TIR – time in range“, t.j. časové obdobie, kedy chorý mal glykémie medzi 3,9 a 10,0 mmol·mol<sup>-1</sup> a mal by byť 70 % z celkového času sledovania. Hyperglykemicke epizódy alebo „TAR – time above range“ sa delia na prvý a druhý stupeň (od 10 do 14 a nad 14 mmol·mol<sup>-1</sup> a mali by trvať menej ako 30 % času) a hypoglykémie, „TBR – time below range“ menej ako 5 % času. Tieto kritériá nie sú príliš prísne a dajú sa dosiahnuť u každého chorého s diabetes mellitus. Pre určité skupiny ľudí (mladí ľudia s prvým typom diabetu a tehotné diabetičky) je možné vytýčiť prísnejšie ciele a pre starších diabetikov s rôznymi inými chorobami asi bude potrebné uspokojiť sa s menším podielom TIR. Otázne je hodnotenie hypoglykémii celkovým časom – lepšie by bolo udávanie ich frekvencie ako čas. Je možné diskutovať o tom, či horná hranica glykémie 10 mmol·L<sup>-1</sup> pre „in range“ stačí na prevenciu chronických komplikácií. Systém TIR-TAR-TBR neberie do úvahy ani rýchle výkyvy glykémii, čo je pravdepodobne dôležitým faktorom rozvoja komplikácií.<sup>14</sup> Isté je to, že na základe metaanalýz zvýšenie TIR z 50 na 60 % času znižuje hladinu HbA<sub>1c</sub> o 9 mmol·mol<sup>-1</sup>.<sup>15</sup> Náš návrh je zhrnutý v tabuľke 3, ale platí,

<b>„Time in range“ 70 a viac %; „Time above range“ menej ako 30 %.</b>
<b>Frekvencia a závažnosť hypoglykémii – čo najmenej a ak predsa, nie závažné.</b>
<b>Hodnoty HbA<sub>1c</sub> stanovených spoľahlivou metódou v pravidelných intervaloch. Ideálne do 43 mmol·mol<sup>-1</sup>, uspokojivo do 58 mmol·mol<sup>-1</sup>, neuspokojivo 59–75 mmol·mol<sup>-1</sup> a veľmi zle nad 75 mmol·mol<sup>-1</sup></b>
<i>Poznámky: U chorých bez CGMS je možné vychádzať z výsledkov správne robeného domáceho monitorovania. Odporúčame aj sledovať dlhodobý trend zmien HbA<sub>1c</sub>. Odporúčame sledovať aj variabilitu glykémii. Nezabudnúť, že chorý s diabetes mellitus nie je len „glykémia“ – sledovať zmeny hmotnosti, lipidy, elektrolyty, obličkové funkcie a i.</i>

▲ Tab. č. 3: Trojka komplexného hodnotenia glykemickej kompenzácie v ére kontinuálneho merania glykémie



že ku každému chorému je potrebné pristúpiť individuálne (personalizovaná medicína).

Uvedené tri ukazovatele je možné chápať aj ako novú formu známej „Joslinovej trojky“. Ak sú všetky tri „kone“ monitorovania kompenzácie stanovené správne a hodnotené ako jeden celok, sú dané predpoklady účinnej a správnej liečby každého chorého s diabetes mellitus.

### Je rozdiel medzi glykémiami a HbA<sub>1c</sub> – čo treba robiť?

Prvým krokom pri diskrepancii medzi hodnotou HbA<sub>1c</sub> a glykémiami je zistiť, či:

- je tento problém jednorazový alebo sa opakuje a či

b. je HbA<sub>1c</sub> vyšší alebo nižší, ako by sa dalo očakávať podľa glykémii

Ak rozdiel nie je konzistentný a nie sú prítomné rušivé faktory, ktoré menia kinetiku glykácie (skrátaná doba života krviniek, hemoglobínopatie aj v heterozygotickej forme a i.), je potrebné veriť hodnote HbA<sub>1c</sub>. Zvlášť záľudná je situácia, ak sú glykémie relatívne dobré a HbA<sub>1c</sub> vysoká, na čo sme už upozornili pred 30 rokmi.<sup>4</sup> Títo ľudia sú ohrození rýchlym vývojom chronických komplikácií. Ak je diskrepancia konzistentná, je potrebné konzultovať s odborníkmi a starostlivo pátrať po rušivých faktoroch. Pri meraní HbA<sub>1c</sub> imunochemickými metódami odporúčame urobiť HPLC alebo kapilárnu elektroforézu, a analyzovať jednotlivé frakcie hemoglobínu.

Vo väčšine prípadov sa diskrepancie medzi HbA<sub>1c</sub> a glykémiami dajú objasniť a vyriešiť komunikáciou medzi diabetológmi a odborníkmi z biochemických laboratórií. V odbornej literatúre sa v poslednej dobe objavili práce, ktoré sa snažia tieto problémy riešiť vedecky. Ide o pojmy Haemoglobin Glycation Index (HGI, index glykácie hemoglobínu) a Glycation Gap (Ggap, glykačná medzera).<sup>16,17</sup> V prvom prípade ide o výpočet pomeru medzi očakávanou glykémiou počítanou z HbA<sub>1c</sub> (Estimated Average Glucose EAG) a priemerom z glykémii za určité obdobie, v druhom o ich rozdiel. Budúcnosť ukáže, či tieto ukazovatele majú skutočný význam pri hodnotení glykemickej kompenzácie a prognózy rozvoja chronických komplikácií diabetes mellitus, alebo nie.



#### prof. Oliver Rácz, M.D., Ph.D.

Ústav patologickej fyziológie, Lekárska fakulta, UPJŠ. Cumulus s.r.o. biochemické laboratórium  
Kontakt: olliracz@gmail.com

Výskum v oblasti diabetes mellitus a antioxidačnej ochrany organizmu. Výskum moderných ukazovateľov lipidového metabolizmu, zrážania krvi a iných parametrov klinickej biochémie. Monografia: „Glykohemoglobín a glykované bielkoviny pri diabetes mellitus“ (1989 – ocenená cenou Slov. literárneho fondu). 16 kapitol v 7 iných monografiách, z ktorých dve boli ocenené. 2 kapitoly v medzinárodných monografiách, Vedecké práce v zahraničných časopisoch, zborníkoch 67. Vedecké práce domácich časopisoch a zborníkoch 127. Citácie: viac ako 650. Člen redakčnej rady eJIFCC (electronic Journal of Internal Federation of Clinical Chemistry). Člen medzinárodného poradného zboru časopisu Diabetologia Hungarica a Orvosi Hetilap (Maďarsko). Výkonný redaktor Laboratórna diagnostika.

### LITERATÚRA

- Rahbar S. An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics. *Clin Chim Acta* 1968; 22, 296-298.
- Lippi G. The irreplaceable value of laboratory diagnostics: four recent tests that have revolutionized clinical practice. *eJIFCC* 2019; 30: 7-13.
- Rácz O, Kuzmová D. Laboratórne vyšetrenia v diabetológii. In: Klimeš I. et al (Eds) *Všeobecná a klinická endokrinológia. SAP Bratislava, 2004, kap. 12.3; 577 – 586.*
- Rácz O, Vicha T, Pačín J. Glykohemoglobín, glykácia bielkovín, a diabetes mellitus. *Osveta Martin*, 1989, 243 s.
- Rácz O, Balla J, Kuzmová D, Lepejová K, Dombrovský P: HbA<sub>1c</sub> – ak áno, tak ako? *Labor aktuell* 2008, č. 2, 16-19.
- Rácz O, Kuzmová D, Dombrovský P: HbA<sub>1c</sub> – otvorené otázky a pochybnosti. *Labor aktuell* 2008, č. 3, 9 –11.
- Rácz O, Kuzmová D, Lepejová K, Dombrovský P. HbA<sub>1c</sub> - nekonečný príbeh? Prvá kapitola. *Labor Aktuell* 2012; 17/1:24-29.
- Rácz O, Dombrovský P. HbA<sub>1c</sub> - nekonečný príbeh? Druhá kapitola. *Labor Aktuell* 2012; 17/2: 18-21.
- Santiago JV. Lessons from the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes* 1993; 42: 1549-1554.
- Weykamp, C a spol. The IFCC reference measurement system for HbA<sub>1c</sub>: A 6-year progress report. *Clin Chem* 2008; 54: 240-248.
- Gupta S, Jain U, Chauhan N. Laboratory diagnosis of HbA<sub>1c</sub>: A review. *J Nanomed Res* 2017; 5: 1-10.
- The EurA1c Trial Group. EurA1c: The European HbA<sub>1c</sub> Trial to Investigate the Performance of HbA<sub>1c</sub> Assays in 2166 Laboratories across 17 Countries and 24 Manufacturers by Use of the IFCC Model for Quality Targets. *Clin Chem* 2018; 64: 1183-1192.
- Gokhale M, Stürmer T, Buse JB. Real-world evidence: the devil is in the detail. *Diabetologia* 2020 online.
- McCarter RJ, Gomez R et al. Biological variation in HbA<sub>1c</sub> predicts risk of retinopathy in type 1 diabetes *Diabetes Care* 2004; 27: 1259-1264.
- Ađvani A. Positioning time in range in diabetes management. *Diabetologia* 2020; 63, 242-252.
- Soros AA et al. Hemoglobin glycation index: a robust measure of hemoglobin A1c in pediatric type 1 diabetes patients. *Pediatric Diabetes* 2010; 11: 455-461.
- Rodriguez-Segade S et al. Estimation of the glycation gap in diabetic patients with stable glycemic control. *Diabetes Care* 2012; 35: 2447-2450.



## Přehled metod a principů stanovení HbA<sub>1c</sub> (redakční příspěvek)



Tento příspěvek poskytuje stručný přehled různých metod měření HbA<sub>1c</sub>. Obecně existují dvě hlavní kategorie metod. První zahrnuje metody, které jsou založeny na rozdílu v náboji molekul, jako jsou kationtoměničová vysoce účinná kapalinová chromatografie (CE-HPLC) a kapilární elektroforéza. Druhá kategorie se skládá z metod založených na strukturálních rozdílech, jako jsou afinitní vysokoúčinná kapalinová chromatografie (afinitní-HPLC) a imunochemické testy. Jedním ze základních rozdílů mezi typy je, že u metod založených na rozdílech nábojů je nutné kvůli správnému výpočtu HbA<sub>1c</sub> vyloučit všechny nefyziologické formy, zatímco u metod založených na strukturálních rozdílech tomu tak není. K tomu musí být metody jako CE-HPLC schopny identifikovat všechny přítomné varianty Hb a jejich glykované formy, což může být problematické vzhledem k tomu, že všechny molekuly se stejným elektrickým nábojem budou eluovány ve stejném retenčním čase.<sup>1</sup> To může ovlivnit specifitu testu a právě tento potenciální nedostatek specifity brání přijetí CE-HPLC jako referenční metody pro systém IFCC a podnítl vývoj alternativních metod.<sup>2</sup>

### Přehled principů stanovení HbA<sub>1c</sub>

HbA <sub>1c</sub> metody	
Rozdílný náboj	Strukturální rozdíly
<p>pozitivní náboj      negativní náboj</p>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Vysoce výkonná kapalinová chromatografie na katexu (CE-HPLC)</li> <li>Kapilární elektroforéza (CE)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Imunochemické testy</li> <li>Afinitní HPLC</li> <li>Enzymatické testy</li> <li>Latexové testy</li> </ul>

### Referenční metoda

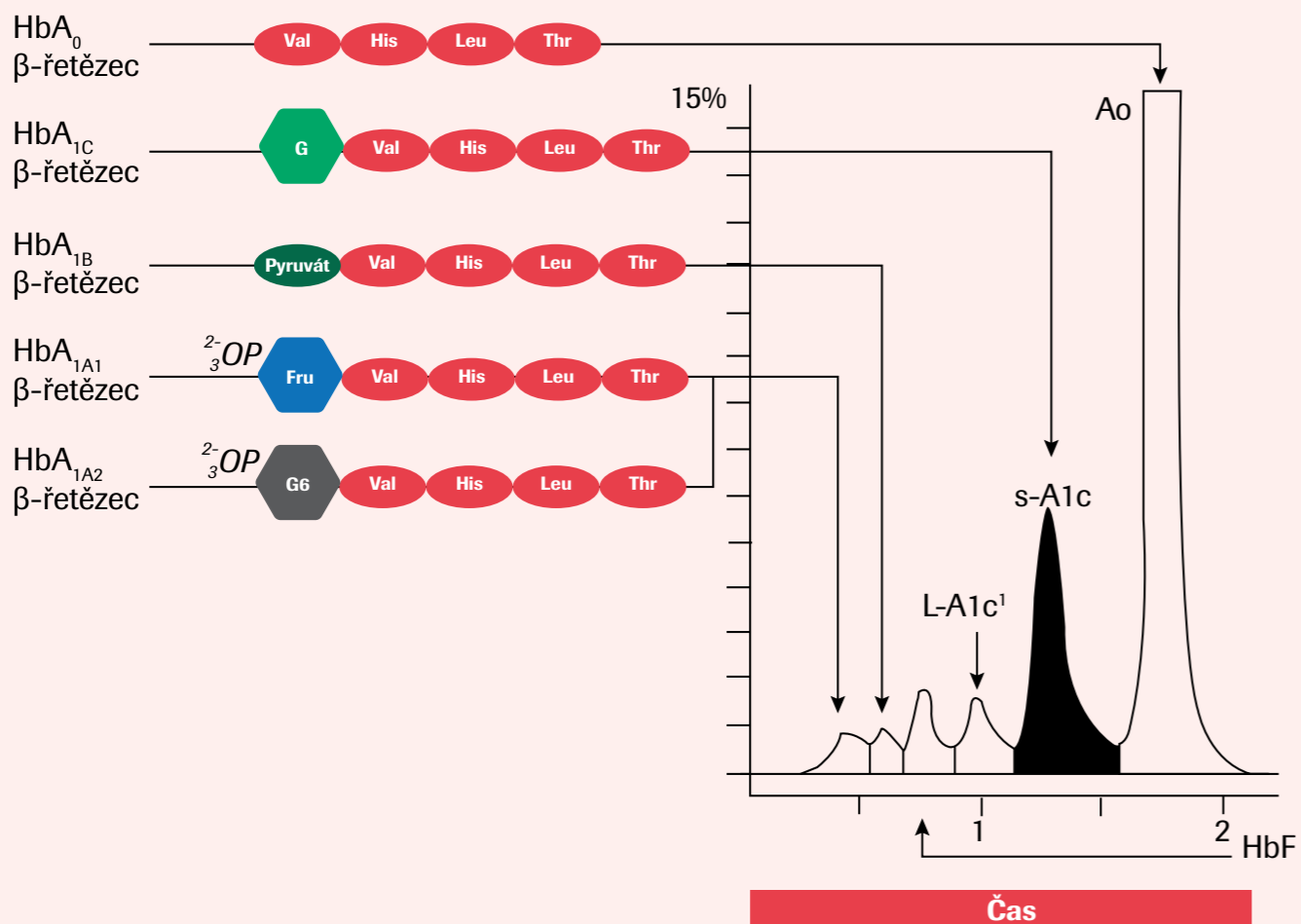
Pracovní skupina IFCC pro standardizaci HbA<sub>1c</sub> se chopila vývoje referenční metody, která do té doby chyběla. Ta v prvním kroku štěpí hemoglobin na peptidy pomocí enzymu endoproteinázy Glu-C a ve druhém kroku se oddělené neglykované N-terminální hexapeptidy získaného řetězce rozdělí a kvantifikují pomocí HPLC a elektrosprejové ionizační hmotnostní spektrometrie nebo dvourozměrným postupem, využívajícím HPLC a kapilární elektroforézu s UV detekcí [nejdříve provede HPLC (1. separační krok), dále separaci jednotlivých eluátů pomocí kapilární elektroforézy (CE, 2. krok separace), následovanou spektrofotometrickou detekcí při 214 nm, tj. kombinace HPLC-CE]. Oba principy poskytují shodné výsledky. HbA<sub>1c</sub> se měří jako poměr mezi glykovanými a neglykovanými hexapeptidy. Používají se kalibrátory sestávající ze směsi vysoce purifikovaného HbA<sub>1c</sub> a HbA<sub>0</sub>. Analytické parametry referenční metody byly hodnoceny mezinárodní sítí referenčních laboratoří, zahrnující laboratoře z Evropy, Japonska a USA. Interkomparační studie sítě ukázaly vynikající výsledky s intralaboratorními CV v rozmezí 0,5 až 2 % a mezilaboratorními CV 1,4 až 2,3 %. Možné interference byly pečlivě prozkoumány. Kvůli vyšší specifitě referenční metody jsou výsledky nižší než ty, které jsou generovány většinou současných komerčních metod, včetně nejčastěji používaných imunochemických a HPLC metod. Popsaná referenční metoda byla schválena členskými společnostmi Mezinárodní federace klinické chemie a laboratorní medicíny a položila základ pro budoucí jednotné standardizace rutinních testů HbA<sub>1c</sub> po celém světě.<sup>3</sup>

### Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza je metoda založená na náboji, která byla nedávno přizpůsobena testování HbA<sub>1c</sub>. Hemoglobinové frakce se separují v křemíkových kapilárách při vysokém napětí na základě jejich elektroforetické pohyblivosti a elektroosmotického toku.<sup>4</sup> Frakce hemoglobinu se detekují spektrofotometricky.

### CE-HPLC

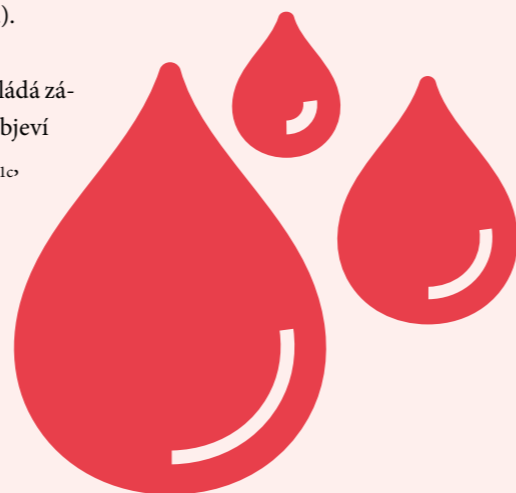
Fyziologické Hb varianty v HPLC na katexu. Čím kladněji je molekula nabitá, tím delší je retenční čas.



Stanovení HbA<sub>1c</sub> iontoměničovou chromatografií je založeno na separaci elektrickým nábojem. Za fyziologických podmínek je volná aminokyselina v terminální valinu β-řetězce kladně nabitá. Tento kladný náboj je ztracen v důsledku glykace, ale také v důsledku dalších úprav. Metody založené na elektrickém náboji (iontoměničová chromatografie a kapilární elektroforéza) proto mohou potenciálně podléhat interferenci dalších modifikací (např. karbamylace, acetylace, varianty atd.).

Chromatografie na katexu zpožďuje kladně nabitě kationty, protože stacionární fáze předkládá záporně nabitou funkční skupinu. Všechny látky se stejným nebo podobným nábojem se objeví pod stejným vrcholem, což znamená, že varianty hemoglobinu, které migrují buď s HbA<sub>1c</sub> nebo HbA<sub>0</sub>, mohou způsobit podhodnocení nebo nadhodnocení HbA<sub>1c</sub>.<sup>5</sup> Schopnost detekovat – „vidět“ – varianty u HPLC není spolehlivá, protože mnoho látek migruje se stejným elučním vrcholem.<sup>6</sup>

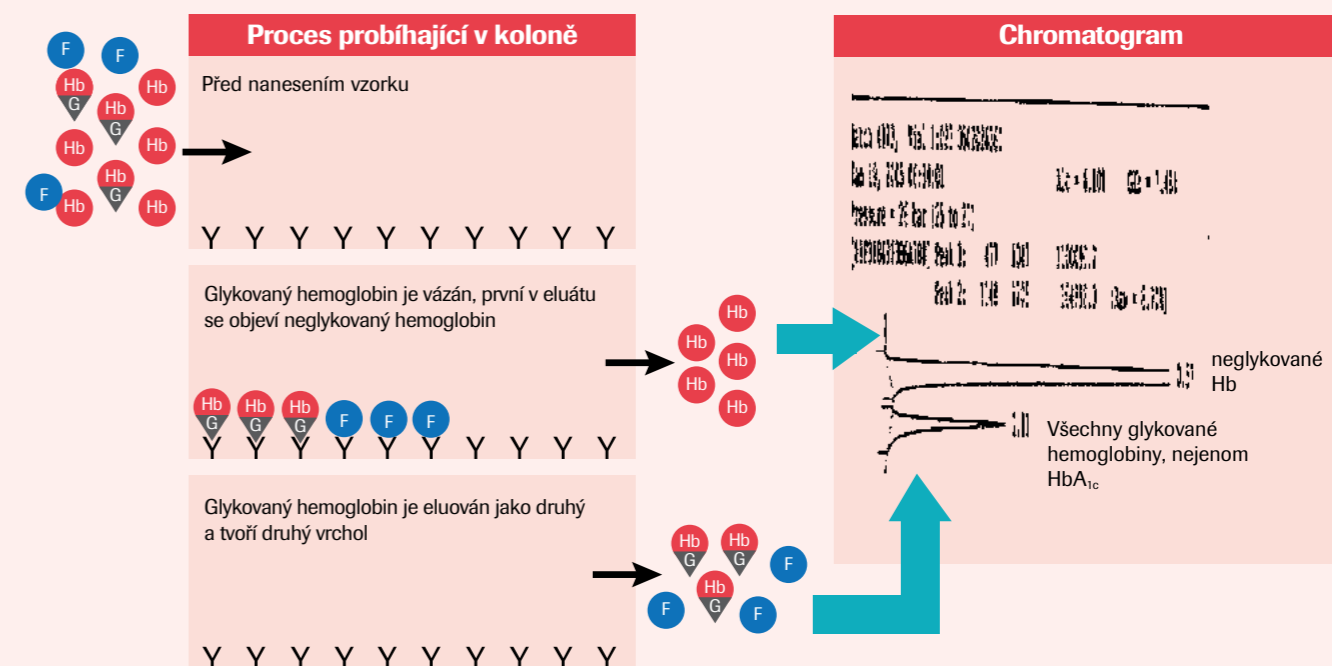
Obrázek ukazuje retenční čas pro různé fyziologické varianty Hb, čím pozitivnější je molekula, tím déle zůstává ve sloupci.



### Afinitní HPLC

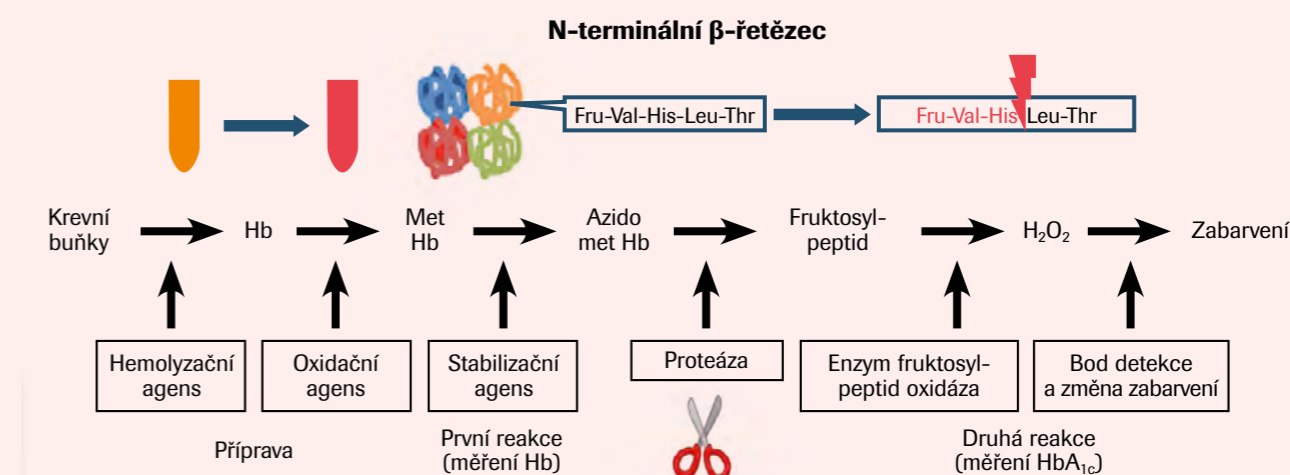
Afinitní chromatografie odděluje molekuly na základě jejich chemické struktury. Pro měření glykovaného hemoglobinu se používají komerčně dostupné afinitní kolony, které obsahují imobilizovanou kyselinu fenyloboritou.<sup>7</sup> Kyselina boritá reaguje s cis-diolovými skupinami v sacharidových zbytcích GHb (viz obrázek), které zahrnují skupiny ε-aminolysinu.

Afinitní HPLC detekuje celkový glykovaný hemoglobin, ze kterého se HbA<sub>1c</sub> vypočítává.<sup>7</sup>



### Enzymatické

Enzymatické metody jsou založeny na enzymatické kvantifikaci fruktosyldipeptidů pomocí fruktosylpeptidoxidázy. Plná krev je hemolyzována a hemoglobin je přeměněn na methemoglobin. Proteináza uvolňuje N-koncové fruktosyldipeptidy z β-řetězce. Methemoglobin je spektrofotometricky kvantifikován pro výpočet celkového hemoglobinu. Fruktosylpeptidoxidáza odštěpí fruktosyldipeptidy, které vedou k produkci peroxidu vodíku. Peroxid vodíku v kombinaci se substrátem a peroxidázou vytváří specifickou barvu, která je kvantifikována spektrofotometricky a je úměrná koncentraci HbA<sub>1c</sub>.<sup>8</sup>





### Jak je stanoven HbA<sub>1c</sub> testy na bázi latexových částic?

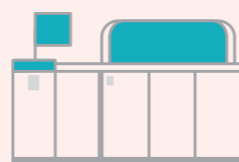
Testy na základě latexových částic lze provádět na velkých automatizovaných systémech nebo na zařízeních POC (Point-of-Care). U zařízení POC je možné použít jak kapilární krev z odběru z prstu, tak venózní krev, nanesenou přímo do reakční komory.

### Jak se stanoví HbA<sub>1c</sub> imunochemickými metodami?

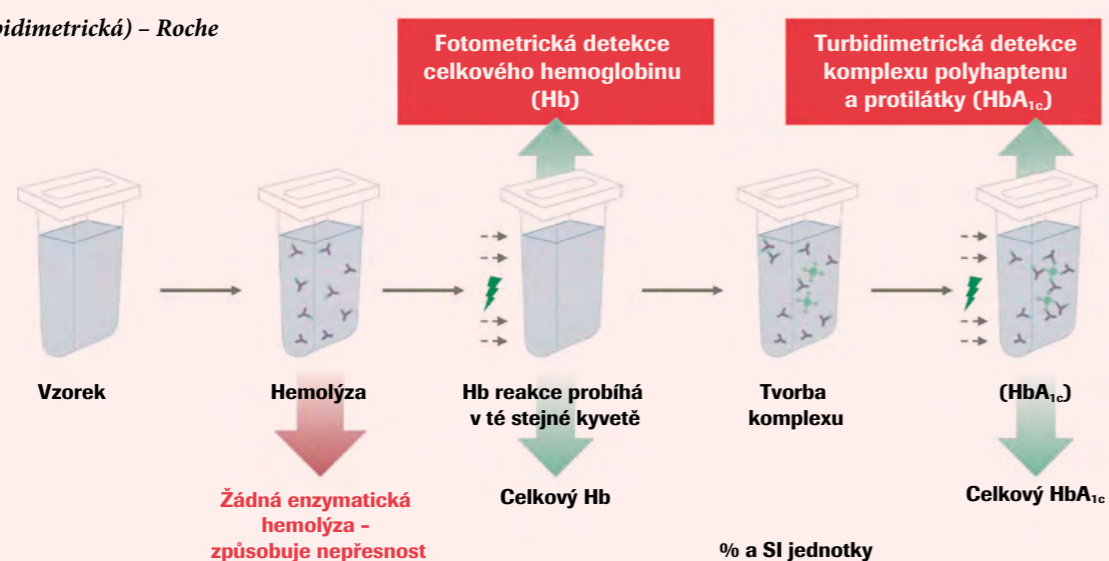
Imunochemické metody umožňují specifické a automatické stanovení HbA<sub>1c</sub> na rutinních analyzátoch klinické chemie a POC zařízeních. Používají protilátky, které jsou namířeny proti aminoterminální peptidové sekvenci β-řetězce s jeho glykovanou valinovou skupinou. IFCC definuje HbA<sub>1c</sub> jako βN1-deoxyfruktosyl hemoglobin.<sup>9</sup> Existuje řada komerčních imunotestů. Všechny jsou navrženy pro specifické stanovení HbA<sub>1c</sub>, ale mohou se lišit v počtu aminokyselin, které protilátka rozpoznává (obvykle 4–10 aminokyselin).

### Roche gen. 3

Stanovení Tina-quant Hemoglobin A1c Gen. 3 je založeno na turbidimetrické inhibiční imunoanalýze (TINIA) pro hemolyzovanou plnou krev. GHb (HbA<sub>1c</sub>) ve vzorku pacienta reaguje s anti-HbA<sub>1c</sub> protilátkou za vzniku rozpustných komplexů antigen-protilátka. Protože místo pro vazbu specifické protilátky (epitop) je na molekule HbA<sub>1c</sub> přítomno pouze jednou, nedochází k tvorbě nerozpustných komplexů. Polyhapteny (více epitopů) přidané v dalším stupni reagují s přebytečnými anti-HbA<sub>1c</sub> protilátkami za vzniku nerozpustného komplexu protilátka-polyhaptenu, který lze stanovit turbidimetricky. Uvolněný hemoglobin v hemolyzovaném vzorku se stanoví spektrofotometricky.<sup>10</sup> Metodu lze použít na analyzátoch COBAS INTEGRA 400 plus, **cobas c 111**, **cobas c 311**, **cobas c 501**, **cobas c 502**. Systémy **cobas c 501/502** disponují speciální sušicí stanicí pro vzorkovou jehlu zajišťující bezpečné pipetování plné krve v rámci stanovení HbA<sub>1c</sub>. U analyzátorů **cobas c 513** (speciální pro stanovení pouze HbA<sub>1c</sub> s kapacitou 400 vzorků/hod.) a **cobas c 503** je přítomná **speciální vzorková jehla pro plnou krev**.



### Imunoanalýza (turbidimetrická) – Roche



### LITERATURA

1. NGSP. HbA<sub>1c</sub> methods. Updated July 2013. Available at: <http://www.ngsp.org/interf.asp> (accessed October 2013).
2. Rohlfing, C.L., et al. Am J Clin Pathol 129, 811-814.
3. Jeppsson, J-O. et al. Clin Chem Lab Med 2002; 40(1):78-89.
4. <http://www.sebia.com/en-EN/produits/capillary-hb-a1c> Accessed October 24, 2017.
5. Bry L. Clinical Chemistry 2001;47:153-163.
6. Szuberski J, Oliveira J, Hoyer J. International Journal of Laboratory Hematology 2013;34:594-604.
7. <http://www.trinitybiotech.com/haemoglobins/boronate-affinity-chromatography>. Accessed October 20, 2017.
8. Jaisson S, Desmons A, Renard B, et al. Clinica Chimica Acta 2014; 434:48-52.
9. Topic E. Biochimica Medica 2014; 24(Suppl 1):S1-S78.
10. Roche Diagnostics Method Sheet/Package Insert (English).

### Pokrokové přístrojové vybavení ROCHE: stanovení HbA<sub>1c</sub> – laboratorní i POCT

#### cobas c 503

Vynikající výkon a snadné ovládání. Nová analytická jednotka **cobas c 503** nabízí vše, co potřebujete pro vytvoření nových standardů v oblasti spolehlivosti, údržby a efektivity.

- >200 aplikací klinické chemie včetně HbA<sub>1c</sub> měření z plné krve či hemolyzátu a pipetování speciální vzorkovou jehlou
- Fotometrická technologie s kapacitou až 1000 testů za hodinu
- SonicWash, stanovení sérových indexů, detekce sraženin
- Bezkontaktní ultrazvukové míchání
- 60 pozic pro reagentie **cobas c pack green** s automatizovanou správou, tj. načítání a automatické vykládání kazet s čidly během provozu a pohotovostního režimu



#### cobas b 101

**cobas b 101** je diagnostický systém in vitro navrženy ke kvantitativnímu stanovení % HbA<sub>1c</sub> (DCCT / NGSP) a mmol/mol HbA<sub>1c</sub> (IFCC) v lidské kapilární a venózní plné krvi fotometrickým měřením. Odhadovaná průměrná hladina glukózy je vypočítána systémem **cobas b 101**. Systém je určen pro profesionální použití v prostředí klinické laboratoře nebo v místě péče o pacienta.







Na začátek jeden příběh...

Pan František prožíval klidná léta svého důchodu na venkovské chalupě společně se svojí ženou. Před 4 lety mu sice diagnostikovali cukrovku, kvůli které musel pravidelně dojíždět ke svému praktickému lékaři na kontroly, ale to mu nevadilo. Dodržoval předepsanou dietu a diabetickou léčbu a až na občasné pobolívání a brnění nohou se cítil velmi dobře. Výsledky pravidelných měření glykemie nalačno byly vždy uspokojivé a neukazovaly žádné výkyvy nebo zvýšené hladiny krevního cukru. Jeho manželka, bývalá zdravotní sestra, však věděla, že diabetes není dobré podceňovat a že brnění končetin může souviset právě s touto nemocí. Proto požádala známého diabetologa, aby provedl manželovi doplňková vyšetření pro potvrzení, že jeho zdravotní stav je – i přes přítomnost diabetu – uspokojivý.

## Co by měl diabetický pacient vědět o glykovaném hemoglobinu

MUDr. MONIKA KAMARYTOVÁ

ROCHE s.r.o., Diagnostics Division

Výsledky však ukázaly něco zcela jiného: „Měření nám potvrdila, že nemáte dobře kompenzovanou cukrovku. Již minimálně 1,5 roku jste měl být léčen zcela jinak. Zjistili jsme u vás tzv. diabetickou neuropatii dolních končetin, což je jedna z mnoha komplikací diabetu.“ Pan Alois odcházal od lékaře šokován. Jak je to možné? Vždyť hodnoty glykemie nalačno měl vždy dobré!

### Glykemie nestačí

Všichni pacienti s diabetem vědí, že měření **glykemie** (stanovení hladiny krevního cukru) patří mezi základní laboratorní vyšetření u každého diabetika. Hodnoty glykemie jsou rozhodující jak pro stanovení diagnózy diabetu, tak pro určení vhodného léčebného postupu. Současně umožňují lékaři průběžně sledovat aktuální stav pacienta a monitorovat diabetickou léčbu. Nicméně glykemie vždy odráží stav organismu pouze v daný okamžik odběru krve a nepodává souhrnnou informaci o tom, co se v těle pacienta odehrálo nebo odehrává během posledních měsíců léčby.

Existuje však laboratorní vyšetření, které dokáže velmi dobře zachytit a ukázat, jak

tělo v uplynulých 2–3 měsících se svými cukry hospodařilo. A tím je vyšetření tzv. **glykovaného hemoglobinu**.

### Co je glykovaný hemoglobin?

Začneme u látky, která je zcela nezbytná pro náš život a pro naše dýchání. Je to hemoglobin. **Hemoglobin** je červené krevní barvivo přítomné v červených krvinkách. Způsobuje typicky červené zabarvení krve a díky němu přenášejí naše krvinky kyslík po celém těle. Po chemické stránce se jedná o bílkovinu.

**Podrobné výsledky mezilaboratorních studií externího hodnocení kvality stanovení HbA<sub>1c</sub> v evropských laboratořích<sup>5</sup> a výsledky programu CAP-NGSP<sup>4</sup> v letech 2017 až 2018 ukazují u standardizovaných rutinních metod měření, založených na principech iontové a afinitní HPLC, na kapilární elektroforéze, na enzymové barevné reakci a na imunoanalytických postupech schopnost dosažení požadavků IFCC na analytickou kvalitu měření, a sice mezilehlé preciznosti CV < 3 % a bias < 2,0 mmol/mol. Pravidelné EHK cykly glykovaného hemoglobinu společnosti SEKK demonstrují rovněž vysokou celkovou úspěšnost účastníků (> 95%), a to jak pro HPLC metody, tak pro imunochemické metody (www.sekk.cz).**

**Vysvětlivky:** CAP: College of American Pathologists. NGSP: National Glycohemoglobin Standardisation Program. HPLC: High Performance Liquid Chromatography, vysokotlaká kapalinová chromatografie. CV: Coefficient of Variation, variační koeficient. EHK: Externí hodnocení kvality. SEKK: Středisko pro externí kontrolu kvality

Červené krvinky plují krví a dostávají se při tom vždy do kontaktu s krevním cukrem (glukózou). Část tohoto cukru se váže na hemoglobin a zůstává s ním uvnitř krvinek trvale spojená. Obecně se děj, kdy se glukóza váže na bílkovinu, nazývá **glykace** a takto „oslažené bílkoviny“ se nazývají glykované bílkoviny. V případě hemoglobinu vede vazba glukózy ke vzniku **glykovaného hemoglobinu**.

I člověk bez diabetu má část svého hemoglobinu vždy glykovanou.

### Proč je glykovaný hemoglobin výjimečný?

Z několika důvodů:

1. Glukóza se váže na hemoglobin vždy úměrně své koncentraci v krvi (tedy čím vyšší jsou hladiny glukózy v krvi, tím více se jí naváže na molekulu hemoglobinu, a naopak).
2. Pokud se zvýšené hladiny glykemie objevují často, stále více glukózy se navazuje na hemoglobin a hodnoty glykovaného hemoglobinu tak stoupají.
3. Vytvořená vazba glukózy na hemoglobin je nevratná, trvá po celou dobu života červených krvinek. Tedy až do doby, než dojde, spolu s hemoglobinem, k jejich přirozenému

## SYMPTOMY DIABETU

### HYPOGLYKÉMIE



Hlad



Podrážděnost



Bledost



Poruchy koordinace  
pohybů



Pocení



Ospalost

### HYPERGLYKÉMIE



Žízeň



Únava



Časté močení



Rozmazané vidění



Bolest hlavy



Sucho v ústech



- rozpadnutí (doba života červených krvinek je cca 120 dní).
- Změřením glykovaného hemoglobinu tak lze získat zpětné informace o tom, jaké byly hodnoty glykemie za posledních 6 týdnů, což je doba poločas rozpadu hemoglobinu.

### Význam a důležitost glykovaného hemoglobinu

Všechny bílkoviny (proteiny) v lidském těle (nejen hemoglobin!) mají schopnost vázat na sebe molekuly glukózy. A to i proteiny, které tvoří stěny cév, včetně těch nejméně živých vlásečnic.

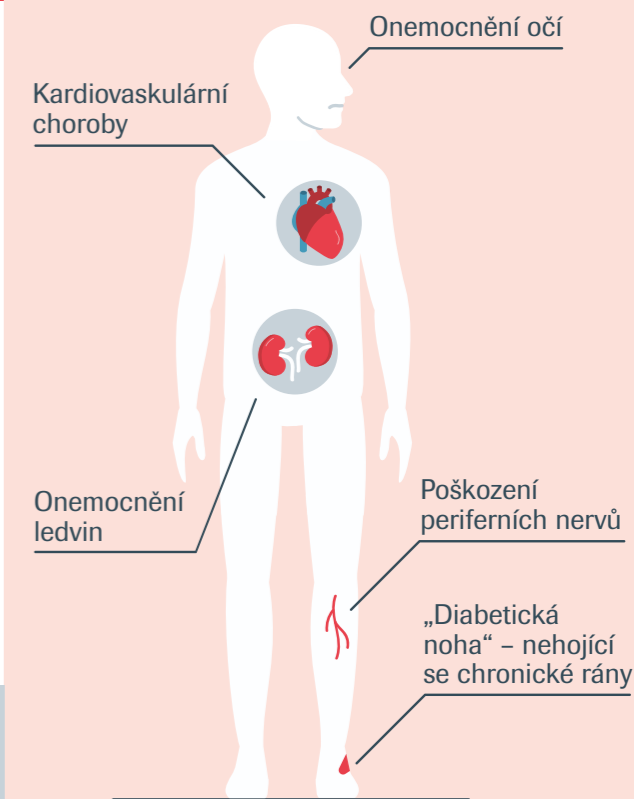
Pokud je hladina glukózy opakovaně zvýšená a léčbou nedostatečně kompenzovaná, proteiny v cévních stěnách se působením glukózy postupně naruší a přestanou plnit svoji funkci.

Výsledkem je pozvolné a zpočátku nenápadné poškození cév u řady důležitých orgánů, jako jsou např. ledviny, oční sítnice, mozek nebo dolní končetiny. Tímto způsobem dochází k tzv. pozdním komplikacím diabetu.

Je důležité vědět, jakou úlohu má glykovaný hemoglobin v těle každého diabetika: **Glykovaný hemoglobin slouží jako velmi přesný ukazatel stavu všech ostatních bílkovin (proteinů) v těle. Jeho hodnoty předpovídají možný vznik chronických komplikací diabetu.** Lékařům i pacientům současně dává možnost cíleně sledovat vývoj diabetu a správnost jeho léčby.

**Glykovaný hemoglobin vyjadřuje míru rizika rozvoje komplikací u cukrovky. Proto je velmi přesným ukazatelem správné léčby a dlouhodobé kompenzace diabetu (DM).**

## NÁSLEDKY DIABETU



### Jak se glykovaný hemoglobin měří?<sup>1,3</sup>

Lékaři označují glykovaný hemoglobin odbornou zkratkou **HbA<sub>1c</sub>**. K jeho vyšetření stačí kapka krve z prstu pacienta. Na rozdíl od jiných běžných vyšetření nemusí být pacient nalačno. Jeho hodnoty nelze ošálit přechodnou dietou nebo delším hladověním před odběrem. Glykovaný hemoglobin má totiž výbornou paměť a odráží hodnoty krevního cukru po celé období 4–6 týdnů před provedením vyšetření.

Hodnoty HbA<sub>1c</sub> se původně dle standardů IFCC (Mezinárodní federace klinické chemie a laboratorní medicíny) vyjadřovaly v procentech (%) – jako množství glykovaného hemoglobinu z celkového množství hemoglobinu v krvi. Např. hodnota HbA<sub>1c</sub> = 10 % znamenala, že 10 molekul ze 100 molekul hemoglobinu bylo glykováno (propojeno s glukózou).

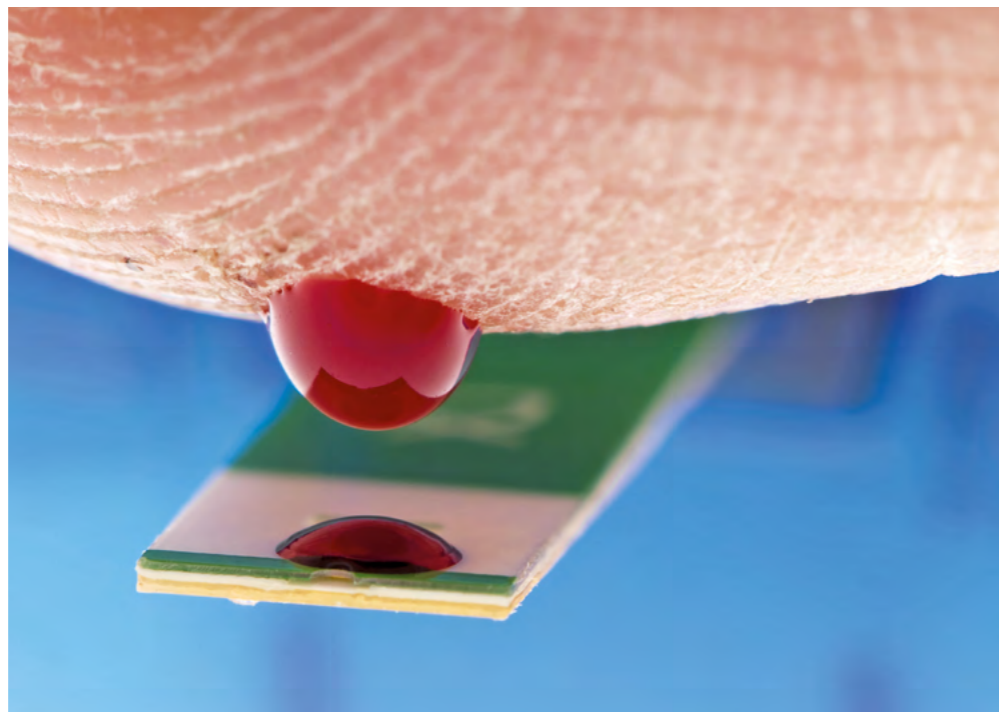


Od roku 2012 se v České republice používají jednotky mmol/mol, přičemž přepočet je velmi jednoduchý (opět dle standardů IFCC) – hodnota v mmol/mol je vždy desetinásobkem původních hodnot. Příklad:  $HbA_{1c} = 50 \text{ mmol/mol}$  (původně 5 %).

U **zdravého člověka** mají být hodnoty  $HbA_{1c}$  mezi **28–40 mmol/mol**.

U **diabetického pacienta** se rozlišují **3 hladiny  $HbA_{1c}$** , které vyjadřují stupeň kompenzace cukrovky:

1. **hodnota do 43 mmol/mol** – výborná kompenzace diabetu
2. **hodnota 43–53 mmol/mol** – uspokojivá kompenzace diabetu
3. **hodnota nad 53 mmol/mol** – nespokojivá kompenzace diabetu.



**Jak často se má  $HbA_{1c}$  měřit?<sup>1,2</sup>**

**Pacienti s DM léčení dietou:** 1x ročně.

**Pacienti s DM léčení diabetickými léky ve formě tablet:** 1x ročně (pokud jsou dobře kompenzováni); 2x ročně (pokud jsou špatně kompenzováni).

**Pacienti s DM léčení inzulínem:** 2–4x ročně (pokud jsou dobře kompenzováni); 4x ročně (pokud jsou špatně kompenzováni).

**Těhotné pacientky s DM:** 1x měsíčně.

V případě gestačního diabetu mellitu (těhotenská cukrovka, která po graviditě

odezní) je  $HbA_{1c}$  méně spolehlivým ukazatelem kompenzace cukrovky. Zejména při anémii z nedostatku železa, která je v těhotenství častá, mohou být hodnoty glykovaného hemoglobinu falešně vyšší. Zvýšený  $HbA_{1c}$  však může odhalit nedodržování léčebného režimu v situaci, kdy kontrolní hodnoty glykemie vycházejí v normě.



**MUDr. Monika Kamarytová**

ROCHE s.r.o., Diagnostics Division  
Kontakt: monika.kamarytova@roche.com

V diagnostické divizi společnosti Roche působí jako Medical and Scientific Affairs Manager. V současné době mezi její nejoblíbenější koníčky patří ticho, hory, malování a hra „Two Dots“.

**LITERATURA**

1. Doporučený postup péče o diabetes mellitus 2. typu. Česká diabetologická společnost ČLS JEP 2020.
2. Gestační diabetes mellitus. Doporučený postup screeningu, gynekologické, perinatologické, diabetologické a neonatologické péče 2017. Konsenzuální stanovisko České gynekologické a porodnické společnosti, České diabetologické společnosti a České neonatologické společnosti ČLS JEP.
3. Mosca et al.: Global standardization of  $HbA_{1c}$  measurement: the position of the IFCC Working Group. *Clin Chem Lab Med* 2007;45(8): 1077–1080.
4. Doporučení NGSP. Dostupné na: <http://www.ngsp.org>
5. EurA1c: The European  $HbA_{1c}$  Trial to investigate the performance of  $HbA_{1c}$  assays in 2166 laboratories across 17 countries and 24 manufacturers by use of the IFCC model for quality targets. *Clin Chem* 2018, 64/8:1183–1192.

**Praktické zkušenosti so stanovením  $HbA_{1c}$  so súpravou  $A_{1c}$ -3 na cobas c 501**

**RNDr. KATARÍNA LEPEJOVÁ**

*Oddelenie klinickej biochémie, hematológie a imunológie, Cumulus s.r.o., Košice*

Stanovenie  $HbA_{1c}$  je neoddeliteľnou súčasťou monitorovania stavu diabetikov. Je známe, že riziko diabetických komplikácií, ako sú diabetická nefropatia a retinopatia, sa zvyšuje s nedostatočnou metabolickou kontrolou.  $HbA_{1c}$  predpovedá vývoj diabetických komplikácií u pacientov s diabetom. [metodický list Roche ku  $A_{1c}$ -3]

Práve preto je nesmierne dôležitá kvalita poskytovaných testov, aby sledovanie kompenzácie diabetu bolo spoľahlivé.

Keď naše laboratórium Cumulus s.r.o., Košice prechádzalo v roku 2016 z analyzátora COBAS INTEGRA 800 na analytický systém cobas® 6000 (2 x c501), mali sme najväčšie obavy, či bude zachovaná kontinuita a kvalita vyšetrení  $HbA_{1c}$ . Ako sa však ukázalo, s používaním 3. generácie Tina-quant Hemoglobín  $A_{1c}$  (stanovenie  $HbA_{1c}$  založené na turbidimetrickej inhibícii TINIA v hemolyzovanej plnej krvi) sme získali jednu s najstabilnejších a najspoľahlivejších metód na cobas® 6000.

Na našom pracovisku využívame obidve aplikácie – z hemolyzátu (manuálna príprava hemolyzátu), aj z plnej krvi (automatické priame stanovenie – hemolyzát

si pripraví analyzátor sám) z tej istej kazety. Obe aplikácie sú štandardizované podľa IFCC prepočítané aj na DCCT/NGSP.

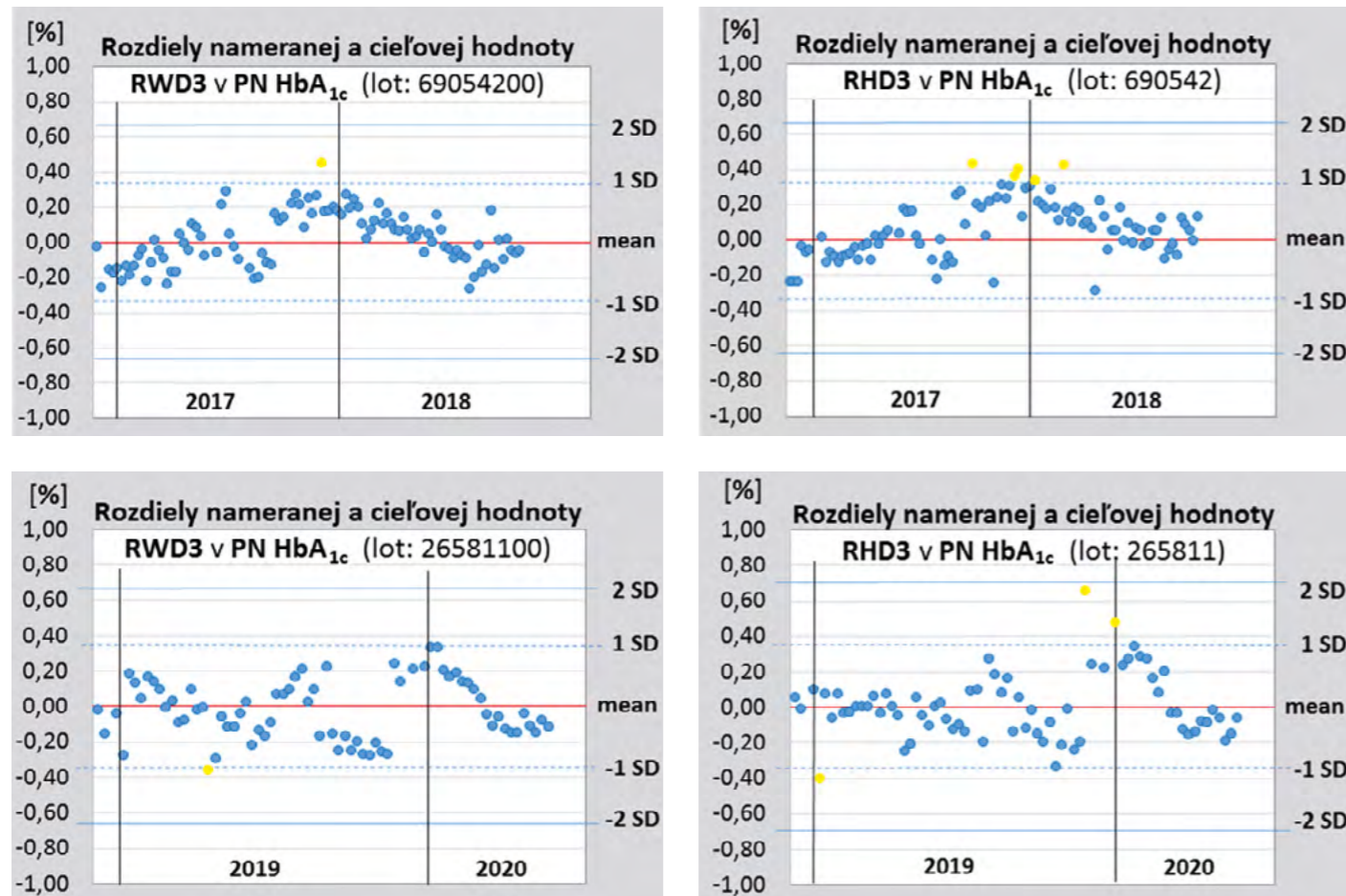
Medzi najväčšie výhody tohto postupu patrí možnosť stanoviť  $HbA_{1c}$  nielen z venóznej krvi, ale aj u pacientov, ktorí prídu iba na kapilárny odber. Dokážeme spracovať aj veľmi malé množstvo žilnej krvi, ktoré nestačí na automatické priame stanovenie z plnej krvi a ručnou prípravou hemolyzátu zachránime vzorku, takže odber sa nemusí opakovať.

Napriek tomu, že pri metóde z hemolyzátu potrebujeme ručne napipetovať len 5  $\mu$ l vzorky, je jej spoľahlivosť porovnateľná s aplikáciou z plnej krvi.

Aplikáciu z plnej krvi (RWD3) sme začali používať 12. 10. 2016 a z hemolyzátu (RHD3) 14. 11. 2016. Zistili sme, že obe metódy sú nesmierne robustné hlavne z hľadiska stability kalibrácií, ktoré podľa našich skúseností presahujú odporúčania výrobcu. Za uplynulé 4 roky sme

Aplikácia Lot PreciControl $HbA_{1c}$ norm (PN $HbA_{1c}$ )	RHD3 690542	RWD3 69054200	RHD3 265811	RWD3 26581100
Cieľová hodnota [%]	5,24	5,28	5,60	5,70
SD	0,31	0,32	0,34	0,34
<b>Namerané hodnoty</b>				
Priemer [%]	5,30	5,29	5,60	5,68
SD	0,16	0,15	0,18	0,17
Počet meraní	94	97	71	71
Maximum	5,67	5,72	6,25	6,03
Minimum	4,95	5,01	5,19	5,33
Bias [%]	1,1	0,2	0,0	-0,4
CV [%]	3,03	2,84	3,24	2,95

▲ Tab. č. 1



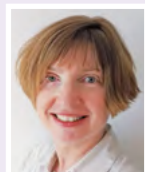
▲ Obr. 1: Žlté body zobrazujú prekročenie  $\pm 1$  sd (limit pre naše laboratórium je  $\pm 2$  sd). Nad, resp. pod hranicou 2 sd sa nenachádza ani jedno meranie kontrolného materiálu

ani raz neboli nútení na základe priebežných kontrol kvality k nadbytočnej rekalibrácii. Metóda tak ušetrí materiál aj starosti.

Priebeh výsledkov sledovania internej kontroly kvality na týždennej báze ukazuje na veľkú stabilitu naprieč rôznymi šaržami kaziet.

Vzhľadom na požiadavky diabetológov vydávame výsledky v duálnom vyjadrení – t. j. v mmol/mol (podľa IFCC) aj v % (podľa DCCT/NGSP). Od spustenia 12. 10. 2016 ku dňu 31. 5. 2020 sme vyšetřili 12 687 testov v aplikácii z plnej krvi (RWD3) a od 14. 11. 2016 ku dňu 31. 5. 2020 sme vykonali 11 233 meraní aplikáciou z hemolyzátu (RHD3).

Z kedysi komplikovaného a svojou prácnosťou priam odstrašujúceho spôsobu stanovenia glykovaného hemoglobínu sme sa postupne dopracovali ku využívaniu stabilnej, spoľahlivej a komfortnej metódy merania HbA<sub>1c</sub> v dvoch aplikáciách.



**RNDr. Katarína Lepejová**

Oddelenie klinickej biochémie, hematológie a imunológie, Cumulus s.r.o., Košice  
 Kontakt: lepejova.katarina@gmail.com  
 Pracuje ako špecialistka pre vyšetřovacie metódy v klinickej biochémii, Cumulus, s.r.o., Košice. Má viac ako 130 pôvodných vedeckých a odborných prác v domácich a zahraničných periodikách a zborníkoch. Od roku 2007 je členkou výboru Slovenskej spoločnosti klinickej biochémie (SSKB). Hobby: literatúra, hudba – zakladajúca členka speváckeho zboru Collegium Technicum, film, móda – návrhy a realizácia odevov, cestovanie, plávanie, lyžovanie, tanec. Krédo: „Keď môžeš, pomôž a nerob iným to, čo nechceš, aby iní robili tebe.“

Glykovaný hemoglobín (HbA<sub>1c</sub>) je rutinne využívaný parametr pro sledování kompenzace glykemie u pacientů s diagnózou diabetes mellitus.<sup>1</sup> V řadě zemí je také využíván jako diagnostický marker pro toto onemocnění.<sup>2</sup> Efektivní využití HbA<sub>1c</sub> je ovšem limitováno jeho analytickou nejistotou<sup>3</sup> a omezeními vyplývajícími z přítomnosti abnormální formy hemoglobinu, intravaskulární hemolýzy, ztráty krve a dalších stavů. Na přesnost vyšetřování HbA<sub>1c</sub> jsou tudíž kladeny poměrně vysoké nároky.<sup>4</sup> Proto je velmi žádoucí vývoj metodiky stanovení a snižování analytické nejistoty tohoto markeru.

## Porovnání výsledků metod HbA<sub>1c</sub> na analyzátořech D-10 (Bio-Rad) a cobas® 8000 c 502 (Roche)

Mgr. ONDŘEJ WIEWIORKA  
 Oddělení klinické biochemie FN Brno, Brno

HbA<sub>1c</sub> je měřen celou škálou analytických principů. V ČR je dominantní především iontoměničová HPLC, ale objevují se i afinitní chromatografie, imunoanalytické metody, enzymatické metody, kapilární elektroforéza a suchá chemie.<sup>5</sup>

V této studii jsme se zabývali porovnáním rutinní iontoměničové HPLC metody na analyzátořu D-10 (Bio-Rad) s inhibiční imunoanalytickou metodou na analyzátořu cobas® 8000 modulu c 502 (Roche).

### Materiály a metody

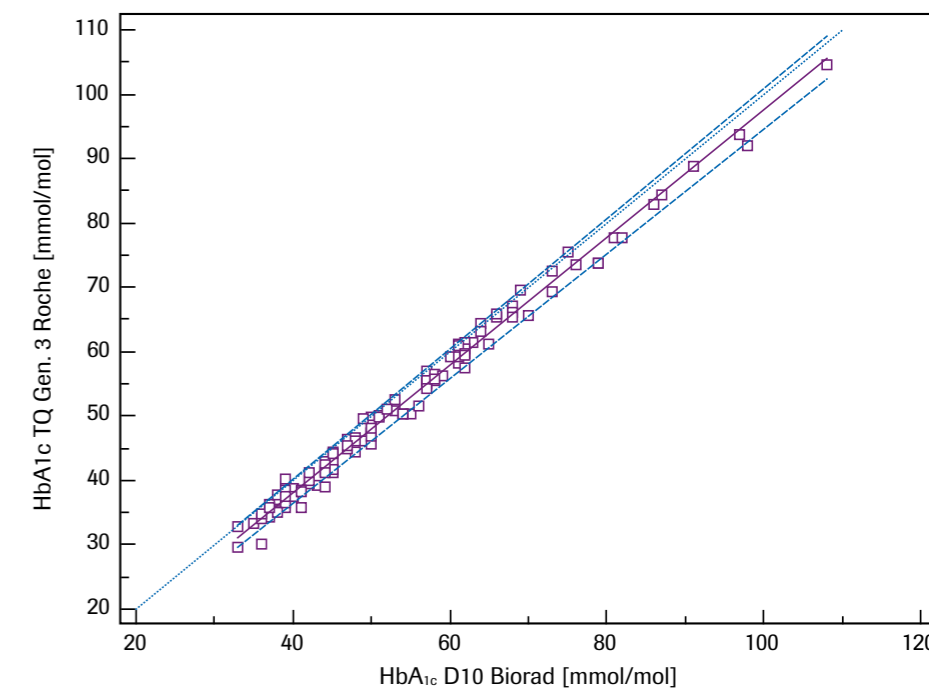
Sběr vzorků pacientů pro studii probíhal na pracovišti Fakultní nemocnice Brno od 14. 5. 2020 do 5. 6. 2020. Do porovnání bylo zahrnuto 112 vzorků pacientů, které byly v uvedeném období rutinním způsobem vyšetřeny pro hodnotu HbA<sub>1c</sub> na analyzátořu D-10 (Bio-Rad) pomocí reagenčního setu D-10 Dual Program Reorder Pack. Další faktory jako věk, diagnóza, pohlaví a podobně nebyly zohledněny. Materiály byly po rutinním vyšetřování uloženy v lednici při 4–8 °C (stabilita parametru HbA<sub>1c</sub> je alespoň 7 dní při této teplotě).<sup>6</sup> Po ukončení rutinního

a analyzovány na cobas® 8000 c 502 metodou HbA<sub>1c</sub> TQ Gen. 3 (Roche).

S každou sérií vzorků proběhlo měření dedikované kontroly kvality na každém z analyzátořů (viz tabulka 1).

Ke spolehlivému určení hodnoty bias a posouzení stability reagencií metody HbA<sub>1c</sub> TQ Gen. 3 na palubě přístroje byly použity referenční lyofilizované materiály vzorků A i B cyklu KD2/20 fy SEKK. Cílové hodnoty a jejich rozšířené nejistoty byly 38,2 (U<sub>AV</sub> = 0,6) a 70,1 (U<sub>AV</sub> = 1,1) mmol/mol. Každý z materiálů byl měřen v pěti opakováních na analyzátořu cobas® 8000 modulu c 502 v den 1 a poté ve čtyřech opakováních v den 11 (viz tabulka 2). Stabilita resuspendovaných materiálů byla zajištěna jejich zamrazením v den 1 na -20 °C.

provozu byly vzorky v odpoledních hodinách roztřepáním homogenizovány



▲ Obr. 1: Porovnání obou metod pomocí sériové analýzy pacientských vzorků

$y = -1,5189 + 0,9906 x$	
Úsek	<b>-1,5189</b>
95% interval spolehlivosti	<b>-2,5125 to -0,3150</b>
Směrnice	<b>0,9906</b>
95% interval spolehlivosti	<b>0,9700 to 1,0125</b>
Cusumův test linearity	<b>Bez statisticky významné odchylky linearity (P&gt;0,10)</b>

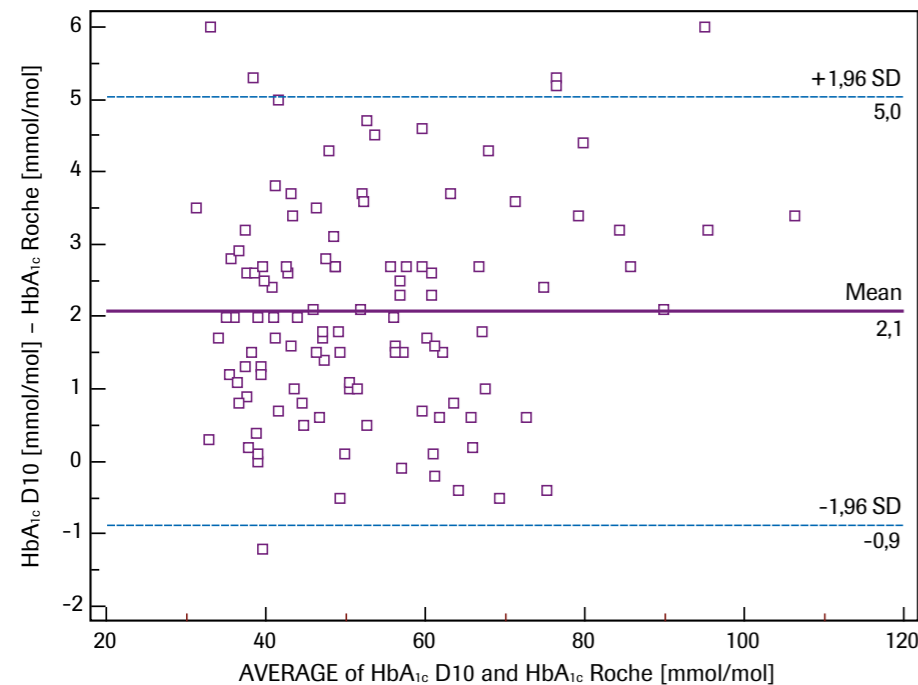
▲ Tab. 1: Rovnice regrese a její intervaly spolehlivosti

Ke statistickému vyhodnocení byl využit program MedCalc verze 9.3.2.0. Korelace byla vyhodnocena dle Passinga a Babloka (1983)<sup>7</sup> a korelační koeficient vypočten dle Pearsona. K hodnocení byly vždy použity hodnoty HbA<sub>1c</sub> definované dle IFCC [mmol/mol]. Přepočet jednotek IFCC a DCCT (NGSP) je možné provést dle následující rovnice:

$$DCCT(\%) = 0,0915 \cdot IFCC(\text{mmol/mol}) + 2,15$$

### Výsledky

Porovnání vzorků pacientů proběhlo celkem v 7 sériích po dobu 19 dní a zahrnuje 112 měření na každém z přístrojů,



▲ Obr. 2: Bland-Altmanův rozdílový graf s výsledky porovnání vzorků pacientů

Systém	cobas® 8000 c 502 (Roche)		D-10 (Bio-Rad)	
	PreciControl HBA <sub>1c</sub> Norm/Path		Diabetes Control (Bio-Rad)	
Kontrola	PreciControl HBA <sub>1c</sub> Norm/Path		Diabetes Control (Bio-Rad)	
Lot	412160	412161	33991	33992
Expirace	28. 2. 2021		30. 6. 2021	
<b>Cílová hodnota</b>	<b>40,6</b>	<b>98,2</b>	<b>35</b>	<b>84</b>
14. 5. 2020	41,8	90,4	36	86
20. 5. 2020	41,7	92,2	36	87
21. 5. 2020	40,8	93,3	36	90
25. 5. 2020	38,1	90,7	36	84
3. 6. 2020	39,0	89,1	35	83
4. 6. 2020	38,7	89,8	37	86
5. 6. 2020	39,1	90,5	37	88
Průměr	39,9	90,9	36,1	86,3
Bias	-0,7	-7,3	1,1	2,3
Bias%	-1,8	-7,5	3,3	2,7
SD	1,52	1,43	0,69	2,36
CV%	3,73	1,46	1,97	2,81

▲ Tab. 2: Výsledky měření interní kontroly kvality na každém z analyzátorů

viz obrázek 1. Rovnice lineární regrese včetně 95% intervalů spolehlivosti jsou zaznačeny v tabulce 1.

Hodnoty HbA<sub>1c</sub> vzorků pacientů se pohybují v rozmezí 33–108 mmol/mol pomocí iontoměničové HPLC metody na analyzátoru D-10 (Bio-Rad) a v rozmezí 29,5–104 mmol/mol pomocí metody HbA<sub>1c</sub> TQ Gen. 3 (Roche).

Výsledky, které analyzátor poskytoval po dobu studie, byly vždy v povoleném rozmezí definovaném každým z výrobců kontrolních materiálů, viz tabulka 2.

Cílové hodnoty referenčního materiálu, jednotlivé naměřené hodnoty i statistické vyhodnocení druhé části studie, shrnující bias a stabilitu reagenčního setu HbA<sub>1c</sub> TQ Gen. 3, jsou uvedeny v tabulce 3. Materiály KD2/20 (SEKK) byly rozpuštěny dle instrukcí pro uživatele Roche, tedy v 0,25 ml deionizované vody. Cílové hodnoty obou materiálů byly získány referenční laboratoří (European Reference

Referenční materiál	KD2/20 A	KD2/20 B
	[mmol/mol]	
<b>UAV</b>	38,2	70,1
<b>Den</b>	<b>HbA<sub>1c</sub> TQ Gen. 3</b>	
1	39,3	73,2
1	39,8	72,1
1	41,6	73,2
1	41,5	72,4
1	40,7	73,4
<b>Průměr den 1</b>	<b>40,6</b>	<b>72,9</b>
<b>CV% den 1</b>	<b>2,51</b>	<b>0,79</b>
<b>Bias% den 1</b>	<b>6,23</b>	<b>3,94</b>
11	39,9	71,9
11	40,4	72,3
11	40,1	72,5
11	38,9	74,2
<b>Průměr den 11</b>	<b>39,8</b>	<b>72,7</b>
<b>CV% den 11</b>	<b>1,63</b>	<b>1,39</b>
<b>Bias% den 11</b>	<b>4,25</b>	<b>3,74</b>

▲ Tab. 3: Výsledky hodnocení bias a stability reagenčního setu HbA<sub>1c</sub> TQ Gen. 3 (Roche) pomocí referenčních materiálů z fy SEKK

Laboratory for Glycohemoglobin), s metrologickou návazností na referenční metodu IFCC (Winterswijk, Nizozemsko).<sup>8</sup> Párový t-test ukázal shodu dat pro dny 1 a 11 u vzorků A i B.

### Diskuse

Porovnání výsledků HbA<sub>1c</sub> u pacientských vzorků ukazuje velmi dobrou shodu obou metod – statisticky nevýznamný rozdíl směrnice a mírný negativní bias reagenční soupravy Roche v průměru o 2,1 mmol/mol HbA<sub>1c</sub>. Pokud přihlídneme k průběžně měřeným interním kontrolám kvality, kdy analyzátor D-10 vykazuje mírný pozitivní bias oproti referenční hodnotě a analyzátor c 501 negativní, můžeme usoudit, že je tento bias tvořen parciálně oběma metodami.

Analýza referenčních materiálů naopak ukazuje mírný pozitivní bias reagenční soupravy Roche v den instalace setu do přístroje a jeho kalibrace i po deseti dnech. Tato nekonzistence s předchozí částí studie může být vysvětlena jinou povahou matrice obou materiálů. Zatímco soubor patientských vzorků tvoří nativní krev, referenční materiály dodávané

firmou SEKK jsou lyofilizáty. Problematika efektu matrice je v případě glykovaného hemoglobinu dosud hojně diskutována. V ČR se tento problém projevoval především u některých POCT analyzátorů HbA<sub>1c</sub>, což bylo od roku 2017 kompenzováno použitím materiálů nativní krve. Přesto, mírné odchylky u laboratorních přístrojů se u nás dosud neprojevovaly nejspíše i díky dostatečně široké maximální povolené odchylce při hodnocení EHK fy SEKK. Během několika posledních let ovšem došlo k zúžení tohoto intervalu z ±20 % na současných ±12 %. Další zúžení povoleného intervalu naráží na současné technické možnosti analýzy. Evropská srovnávací studie EURAAA1c, již se zúčastnila právě i ČR v roce 2019, ukazuje vyšší průměrný bias i CV% u lyofilizátů (bias = +1,1 mmol/mol HbA<sub>1c</sub>, CV = 6,2 % oproti analýze plné krve %) (bias = +0,4 mmol/mol HbA<sub>1c</sub>, CV = 4,6 %).<sup>9</sup>

Pro laboratoře s menším objemem vzorků k vyšetření HbA<sub>1c</sub> může být důležitá stabilita reagencií na palubě. Tabulka 3 ukazuje shodné výsledky měřené v den vložení reagenzie do přístroje a poté po 10 dnech. Výsledky ukazují statisticky nevýznamný rozdíl cílových hodnot (párový t-test) i variačních koeficientů

(párový F-test). Kvůli malému množství referenčního materiálu nebylo možné provést větší počet opakování, aniž bychom se vyhnuli míchání jednotlivých lahviček, ovšem sloučením obou skupin bychom získali bias +2,0 mmol/mol a CV 2,3 % pro vzorek A a bias +2,7 mmol/mol a CV 1,0 % pro vzorek B.

K nesporným výhodám řešení fy Roche patří využití stávajícího automatického fotometrického analyzátoru, takže není třeba zakupovat/pronajímat další přístroj a řešit související agendu – prostorové nároky, údržbu, zaškolení personálu, dokumentaci. Současná třetí generace reagenčních setů je dostupná pro přístroje **cobas b 101, c 501/502, c 513, c 311/111, Integra, c 503**.

### Závěr

V této práci jsme demonstrovali, že i tak rozdílné metody pro stanovení HbA<sub>1c</sub>, jakými jsou iontoměničová HPLC a inhibiční imunanalýza, mohou poskytovat dobrou korelaci. Požadavky na analytickou kvalitu metody HbA<sub>1c</sub> TQ Gen. 3 (Roche) vyhovují současným českým i mezinárodním požadavkům.



### Mgr. Ondřej Wiewiorka

Oddělení klinické biochemie FN Brno, Jihlavská 20, Brno, Katedra laboratorních metod, LF, Masarykova univerzita, Kamenice 735/5, Brno, supervizor EHK SEKK pro cykly KD (glykovaný hemoglobin) a GHP (glykovaný hemoglobin POCT), Za Pasáží 1609, Pardubice  
Kontakt: wiewiorka.ondrej@fnbrno.cz  
V roce 2012, ihned po ukončení studia na PřF MU v oboru biochemie, nastoupil na úsek rutinních metod OKB FN Brno. V rámci své práce se dále věnoval POCT, analýze močového sedimentu a lékovým interferencím. Od roku 2017 pracuje na úseku speciálních metod, kde se mimo jiné zabývá atomovou spektrometrií a chromatografickými metodami.

### LITERATURA

- Friedecký, B., Kratochvíla, J., Springer, D., Prázný, M. & Zima, T. Toto doporučení vydávají společně Česká společnost klinické biochemie ČLS JEP a Česká diabetologická společnost ČLS JEP. 12.
- Use of glycated haemoglobin (HbA<sub>1c</sub>) in the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 93, 299–309 (2011).
- Weykamp, C. & Siebelder, C. Evaluation of Performance of Laboratories and Manufacturers Within the Framework of the IFCC model for Quality Targets of HbA<sub>1c</sub>. *J. Diabetes Sci. Technol.* 12, 747–752 (2018).
- Weykamp, C. et al. Investigation of 2 Models to Set and Evaluate Quality Targets for HbA<sub>1c</sub>: Biological Variation and Sigma-Metrics. *Clin. Chem.* 61, 752–759 (2015).
- Weykamp, C. HbA<sub>1c</sub>: A Review of Analytical and Clinical Aspects. *Ann. Lab. Med.* 33, 393 (2013).
- Rohlfing, C. L., Hanson, S., Tennill, A. L. & Little, R. R. Effects of Whole Blood Storage on Hemoglobin A<sub>1c</sub> Measurements with Five Current Assay Methods. *Diabetes Technol. Ther.* 14, 271–275 (2012).
- Passing, H. & Bablok, W. A New Biometrical Procedure for Testing the Equality of Measurements from Two Different Analytical Methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in Clinical Chemistry, Part I. *Clin. Chem. Lab. Med.* 21, (1983).
- Jepsson, J.-O. et al. Approved IFCC Reference Method for the Measurement of HbA<sub>1c</sub> in Human Blood. *Clin. Chem. Lab. Med.* 40, (2002).
- Siebelder, C. & Weykamp, C. Report EurAAA1c 2019. 18.



Popri prebiehajúcej pandémie virózy COVID-19 s klinicky podobnými symptómami (akútne respiračné ochorenie) a čiastočne aj podobnými epidemiologickými charakteristikami (kvapôčkovo prenášaná infekcia, pôvodne antropozoonóza šíriaca sa ďalej interhumánnym prenosom) zostáva chrípka jednou z najväčších výziev v oblasti verejného zdravia na svete.

## Využitie cobas® Liat® System v diagnostike chrípky

J. PREDNÝ<sup>1</sup>, M. DUBINOVÁ<sup>1</sup>, M. STRAKA<sup>1</sup>, A. LONGAUEROVÁ<sup>1</sup>, A. KRAJČÍKOVÁ<sup>1</sup>, V. CUCAK<sup>2</sup>, M. NOVOTNÝ<sup>4</sup>, P. JARČUŠKA<sup>4</sup>, K. VLČKOVÁ<sup>3</sup>, A. LIPTÁKOVÁ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Mikrobiologický ústav, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského a Univerzitná nemocnica, Bratislava, SK; <sup>2</sup> Roche Slovensko s.r.o, Bratislava, SK; <sup>3</sup> I. Interná klinika, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského a Univerzitná nemocnica, Bratislava, SK; <sup>4</sup> Klinika infektológie a cestovnej medicíny, Lekárska fakulta Univerzity Pavla Jozefa Šafárika a Univerzitnej nemocnice L. Pasteura, Košice, SK

Tzv. „španielska chrípka“, spôsobená vírusom chrípky A (subtypom H1N1) zo začiatku 20. storočia s takmer 50 miliónmi odhadovaných obetí na ľudských životoch zostáva reálnym príkladom katastrofickej pandémie bez možnosti efektívnej intervencie zo strany ľudstva v tej dobe. Najväčšia mortalita v nej postihovala predovšetkým kohorty malých detí, ale aj seniorov (Taubenberger JK., 2006). Situácia s celosvetovým šírením pandemických kmeňov chrípky typu A sa opakovala aj v ďalších desaťročiach

(chrípka ázijská, hongkongska, ruská, vtáčia), naposledy v roku 2009 to bola pandémia tzv. „prasacej chrípky“ (takisto subtyp H1N1) (Fitzgerald DA., 2009). Podobne ako je to pri vážnom priebehu COVID-19, obeť infekcie pandemickými kmeňmi chrípky zomierajú najčastejšie na ťažký zápal pľúc sprevádzaný masívnou „cytokínovou búrkou“ ako pri sepe. Okrem globálneho šírenia pandemických kmeňov vírusu typu A, ktoré sa objavujú sporadicky a bez sezonality, prebiehajú každoročne sezónne epidémie chrípky vyvolávané vírusmi oboch typov A a B. Vznikajú v chladných mesiacoch roka a ohrozujú predovšetkým seniorov a osoby so zníženou imunitou, pokiaľ neboli včas zaočkované aktuálnou vakcínou. Aj toto ochorenie môže mať vážny priebeh. WHO odhaduje, že každý rok sa globálne objaví až 1 miliarda prípadov ochorenia vyvolaných vírusmi chrípky. Asi 5 miliónov z nich sú závažné prípady, ktoré vedú k 290 000 až 650 000 úmrtiam

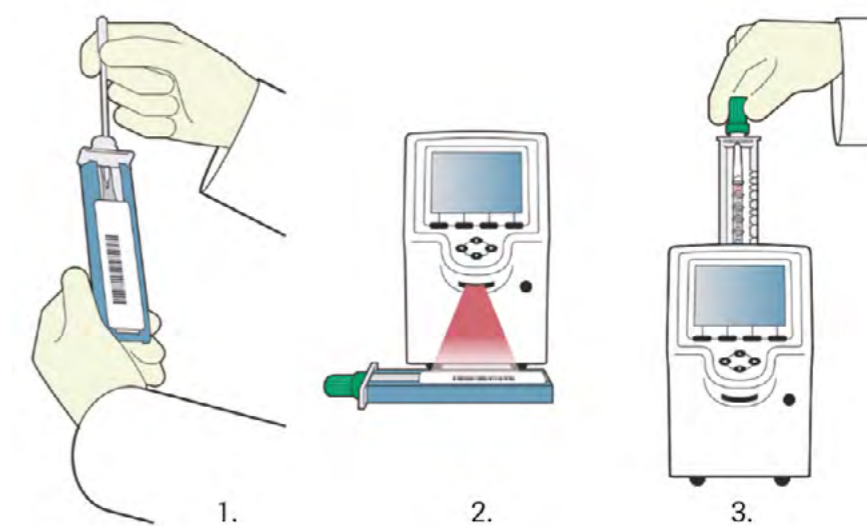


▲ Obr. č. 2: Odber nazofaryngeálneho výteru

súvisiacim s respiračným postihnutím v dôsledku ťažkého priebehu chrípky (WHO, 2019). Nová stratégia, ktorú vyvinula WHO pre chrípku, platí vo veľkej miere aj pre COVID-19. Má dva hlavné ciele:

1. Vybudovať silnejšie kapacity každej krajiny na sledovanie a manažment choroby, prevenciu, kontrolu a pripravenosť. Na dosiahnutie tohto cieľa žiada, aby každá krajina mala prispôbený chrípkový program, ktorý prispieva k národnej a globálnej pripravenosti a zdravotnej bezpečnosti.
2. Vyvinúť lepšie nástroje na prevenciu, odhaľovanie, kontrolu a liečbu chrípky, ako sú účinnejšie vakcíny, antivirotiká a liečbu, s cieľom ich sprístupnenia pre všetky krajiny.

V súlade s touto stratégiou a s potrebou rýchlej diferenciálnej diagnostiky pri akútnych respiračných ochoreniach (ARO) sme s podporou ROCHE a za aktívnej pomoci kolegov z I. internej kliniky LF UK v Univerzitnej nemocnici v Bratislave, rovnako aj Kliniky infektológie a cestovnej medicíny LF UPJŠ v Univerzitnej nemocnici L. Pasteura v Košiciach zaviedli „Point-of-Care testy“ (POCT alebo „bedside testy“) na rýchly molekulárno-genetický dôkaz RNA vírusov



▲ Obr. č. 3: Príprava vzorky na diagnostiku pomocou cobas® Liat® System. 1. naniesenie eluátu vzorky do súpravy, 2. identifikácia súpravy so vzorkou, 3. vloženie diagnostickej súpravy s nanesenou vzorkou do prístroja

chrípky A a B v individuálnych vzorkách. Tieto real time PCR (rt PCR) testy majú voči všetkým iným virologickým metódam (kultivácia, priamy dôkaz antigénu vo výteroch, sérológia) vysokú analytickú senzitivnosť a špecifickosť, a v spojení s expresnou analýzou ihneď po odbere biologického materiálu najvyššiu klinickú plauzibilitu.

### Metóda

Diagnostika v skúšobnom režime prebiehala od októbra 2019 do mája 2020, čiže v obvyklom období chrípkovej sezóny a počas pandémie COVID-19. Ako klinický materiál bol pri 89 pacientoch s podozrením na chrípku odoberatý nazofaryngeálny výter (obr. č. 2), ktorý bol vložený do univerzálneho transportného média a bezprostredne analyzovaný bez potreby transportu a skladovania. Pôvodcovia chrípky sú obalené RNA vírusy, ktoré sú všeobecne citlivé na vonkajšie faktory prostredia, preto bezprostredná analýza materiálu po odbere zvyšuje významne možnosť pozitívnej detekcie ich genetického materiálu. Detekcia vírusu chrípky vo vzorke prebiehala pomocou súprav cobas® Influenza A/B Assay na prístroji

cobas® Liat® System. Súpravy umožňujú dôkaz prítomnosti vírusu chrípky vo vzorke pomocou multiplex rt PCR prostredníctvom reverznej transkripcie vírusovej RNA do komplementárnej DNA a jej následnej amplifikácie s chemiluminiscenčnou detekciou produktu. Prístroj je malý, kompaktný, plnoautomatizovaný a umožňuje nenáročnú obsluhu (obr. č. 3) (identifikácia obslužného pracovníka a vzorky, naniesenie eluátu vzorky do súpravy, vloženie a identifikácia diagnostickej súpravy s nanesenou vzorkou do prístroja, stiahnutie alebo odoslanie výsledku do laboratórneho informačného systému), expresný proces analýzy (20 minút) a presný výsledok (obr. č. 4). Nie je určený na sériové vyšetrenia.

**Prístroj**



19 cm  
11,4 cm

Kompaktní a prenosný PCR system určený pro testování v místě péče o pacienta

**Diagnostickeá súprava**

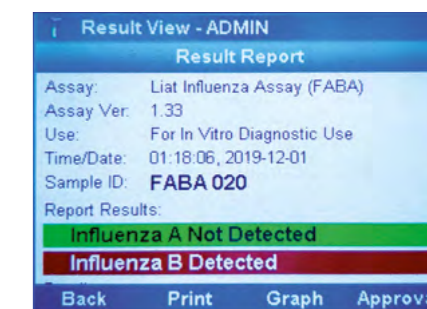


Flexibilní jednorázová zkumavka o velikosti tužky obsahující všechna analytická činidla – pouze se aplikuje vzorek

**Testy**

- Flu A
- Flu B
- Flu A, Flu B, RSV
- C. diff
- Strep A

▲ Obr. č. 1: cobas® Liat® System



▲ Obr. č. 4: Vyhodnotenie testu pomocou cobas® Liat® System (chrípka A nedetegovaná, chrípka B pozitívna)



### Súbor pacientov

Výšetrenie bolo indikované a vykonané na základe symptómov ARO pri vyšetrení v prijímacej ambulancii I. internej kliniky LF UK v Univerzitetnej nemocnici v Bratislave. Jednalo sa vo väčšine prípadov o osoby vo vyššom veku. Súbežne prebiehalo vyšetovanie pacientov s ARO na Klinike infektológie a cestovnej medicíny LF UPJŠ v Univerzitetnej nemocnici L. Pasteura v Košiciach.

### Výsledky

V UN v Bratislave bola chrípka typu A diagnostikovaná u 9 (13 %) pacientov, chrípka typu B u 7 (10 %). Zvyšných 53 (77 %) vzoriek bolo negatívnych. Väčšina testovaných boli muži, a to 42 (61 %). Z toho pozitívnych bolo 11 (6 - typ A, 5 typ B). Z 27 (39 %) testovaných žien bolo pozitívnych 5 (3 - typ A, 2 - typ B). Priemerný vek pacientov, u ktorých bola diagnostikovaná chrípka A/B, bol 60 rokov.

V UNLP v Košiciach bolo realizovaných 20 vyšetrení, u troch pacientov bola potvrdená chrípka (15 %), z toho chrípka typu A bola potvrdená u dvoch mužov (10 %) (78 a 48 rokov) a chrípka typu B

bola zachytená u jednej ženy (31 rokov). Výsledky boli potvrdené aj z NRC pre chrípku. Do NRC pre chrípku bol odoslaný celkovo materiál od 10 pacientov, pričom všetky výsledky korelovali s našimi výsledkami - 7 negatívnych, 2x chrípka A a 1x chrípka B.

3x sa nepodarilo analyzovať vzorku, avšak u jedného pacienta bolo použité iné transportné médium, ako je odporúčané. Podiel diagnostikovaných a potvrdených pacientov z oboch pracovísk je znázornený na obr. č. 5.

### Diskusia

POCT je definované ako klinické diagnostické testovanie na mieste starostlivosti alebo v jeho blízkosti - to znamená v čase a mieste bezprostrednej starostlivosti o pacienta (ambulancie, nemocničné oddelenia a pod.) (Liptáková A. et al., 2019). Rýchle POCT molekulárno-genetické (MG) testy založené na dôkaze špecifického úseku RNA vírusov chrípky, ako aj ich paralelné druhové odlišenie už do 20 minút po odobratí vzorky od pacienta predstavujú veľmi významný pokrok v klinickej virologickej diagnostike. POCT testovanie je ideálne pre triáž pacientov počas epidémie, za účelom začať prípadnú racionálnu liečbu takmer ihneď po prijatí a/alebo možnosť vykonať preventívne protiepidemické opatrenia bezprostredne po prvotnom vyšetrení pacienta podobne, ako sme tomu v týchto dňoch svedkami pri boji s pandémiou COVID-19. Navyše, v prípade dokázanej prítomnosti vírusu chrípky v odobratom klinickom materiáli pomocou MG POCT je možné odoslať rovnakú vzorku výteru nosa a/alebo hrdla na izoláciu vírusu v rámci racionálnej a komplexnej diagnostiky v laboratóriu Národného referenčného centra (NRC) pre chrípku tak, ako to odporúča WHO vo svojej

aktuálnej stratégii. Tieto následné komplexné vyšetrenia sú súčasťou plnenia epidemiologického sledovania za účelom typizácie sezónnych, resp. odlišenia prípadných pandemických kmeňov (izolácia vírusu na bunkových kultúrach, identifikácia vírusových izolátov hemaglutinačno-inhibičným testom, molekulárno-biologické metódy a pod.). Diagnostika v NRC je vykonávaná primárne v rámci sledovania, nie pre klinickú diagnostiku, a zahŕňa aj vyšetrenia z odberov iných vzoriek na komplementárne analýzy, napr. vyšetrenia krvi (séra) na prítomnosť špecifických protilátok (ELISA, komplet-fixačná reakcia) (ÚVZ SR, 2020). V tomto prípade sa v odobratej vzorke vyšetrujú protilátky proti viacerým respiračným patogénom vrátane chrípky. Pri chrípke ide však o viac-menej retrospektívne, ale nie klinické vyšetrenie, nakoľko ako pozitívny nález sa hodnotí len významný (signifikantný) nárast hladiny protilátok v druhej vzorke séra odobratej v odstupe niekoľko dní, resp. až do dvoch týždňov. Hladina protilátok stanovená iba v prvej vzorke teda nie je dôkazom aktuálne prebiehajúcej infekcie chrípky.

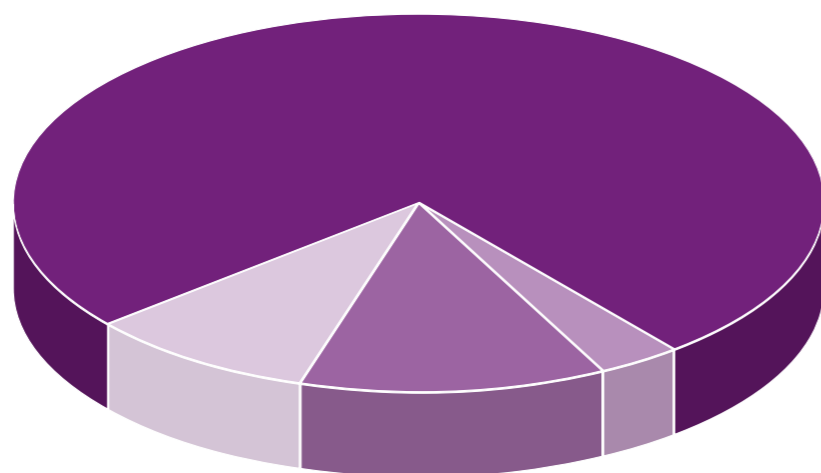
Bazálna hladina antivírusových protilátok stanovená v prvej vzorke môže byť len reziduálna po prekonaní predchádzajúcich infekcií chrípky, alebo po predchádzajúcich očkovaniach proti chrípke. Pre pacienta a rovnako aj lekára nepredstavuje bezprostredný prínos pri diagnostike a liečbe ARO, ani významný nárast hladiny špecifických protilátok. Vzhľadom na potrebu časového odstupe medzi oboma odbermi krvi a charakteristický priebeh chrípky ako akútneho ochorenia je výsledok pre klinické využitie k dispozícii oneskorene, na rozdiel od priameho rýchleho testu, akým je nami zvolené MG vyšetrenie vzorky z nosohltanu, resp. alternatívne dôkaz antigénu v ňom.

Hoci diagnostická senzitivnosť testovania v našom súbore 89 pacientov bola ovplyvnená nástupom pandémie COVID-19 (povinné nosenie rúška a iné protiepidemické opatrenia ovplyvnili zásadne aj šírenie vírusov chrípky a iných respiračných patogénov), adherenciou zdravotníckeho personálu k vyšetreniu (napr. rozdielny vzťah lekárov k využívaniu automatu na POCT) a súbor pacientov

bol relatívne malý, výsledky boli pozoruhodné - až 22 % analyzovaných vzoriek (celkovo 19) bolo pozitívnych. Zároveň zaujímavý bol aj vysoký podiel diagnostikovaných kmeňov vírusu chrípky B voči typu A (8/11). Pre porovnanie - pri izolátoch, ktoré diagnostikovali úrady verejného zdravotníctva v SR za chrípkovú sezónu 2018 - 2019, bol pomer 3/254.

### Záver

Zavedenie MG POCT diagnostiky vírusov chrípky A a B bolo jednoznačne veľkým prínosom v rámci klinickej diagnostiky ARO na oboch našich pracoviskách a bolo vďaka zvolenej platforme aj relatívne jednoduché, rýchle a spoľahlivé. Zároveň sa tým zabezpečilo naplnenie prijatej globálnej stratégie WHO u nás. Veľmi zaujímavá sa nám javí perspektívna možnosť paralelného vyšetovania vzoriek od pacientov s ARO na chrípku A/B a SARS-CoV 2 na nami odskúšanej platforme cobas® Liat® System v nasledujúcej chrípkovej sezóne 2020 - 2021 tak, ako to avizuje ROCHE.



▲ Obr. č. 5: Podiel diagnostikovaných pacientov s podozrením na chrípku z UN Bratislava a UNLP v Košiciach



### RNDr. Ján Predný

Mikrobiologický ústav, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského a Univerzitná nemocnica, Bratislava, SK  
 Kontakt: jan.predny@fmed.uniba.sk  
 VŠ pedagóg na Mikrobiologickom ústave LF UK a UN Bratislava. V minulosti viedol spoločnosť HPL (súkromné mikrobiologické laboratóriá), predtým aj zastúpenie zahraničnej spoločnosti v oblasti laboratórnej diagnostiky. V súkromí sa okrem rodiny a priateľov venuje svojim stredoázijským včiakom, domu, záhrade a koníčkum - náučnej literatúre, umeniu, histórii, architektúre a cestovateľstvu.

### LITERATÚRA

Fitzgerald, DA. (september 2009). „Human swine influenza A [H1N1]: practical advice for clinicians early in the pandemic“. *Paediatr Respir Rev.*, s. 154-58.  
 Liptáková, A. a kol. (2019). *Lekárska mikrobiológia*. Bratislava: Herba s. r. o.  
 Taubenberger, JK., M. D. (January 2006). „1918 Influenza: the mother of all pandemics“. *Emerging Infectious Diseases*, s. 15-22.  
 ÚVZ SR. (2020). *Výročná správa národných referenčných centier zriadených na báze ÚVZ SR a RÚVZ SR za rok 2019*.  
 WHO. (2019). <https://www.who.int/news-room/detail/11-03-2019-who-launches-new-global-influenza-strategy>.



Na oddělení lékařské mikrobiologie Slezské nemocnice v Opavě se věnujeme PCR (polymerase chain reaction) metodám již od roku 2008. Tyto metody jsou založeny na replikaci nukleových kyselin, při níž se vytvoří až několik milionů kopií vzorového fragmentu DNA či RNA. Během let se citlivost použitých metod a přístrojové možnosti postupně zdokonalují, a to i v naší laboratoři. Naše laboratoř prochází akreditací každé dva roky, jedná se o audit II, který provádí NASKL. Každý rok jsme účastníci externího hodnocení kvality všech metod, které jsou dostupné.

## Testování chřipky A/B pomocí systémů cobas® Liat® (Lab In A Tube)

Mgr. EVA HABUROVÁ, Ing. KRISTÝNA VÁLKOVÁ  
Oddělení lékařské mikrobiologie Slezské nemocnice v Opavě

Vyšetření virů Influenza A a B PCR metodou jsme zavedli začátkem roku 2019. Tuto metodu u nás provádíme strojovou izolací pomocí magnetických kuliček, následovanou zpětnou transkripcí a analýzou pomocí RT-PCR. Celý postup zabere v průměru 4 hodiny (odvíjí se od počtu vzorků).

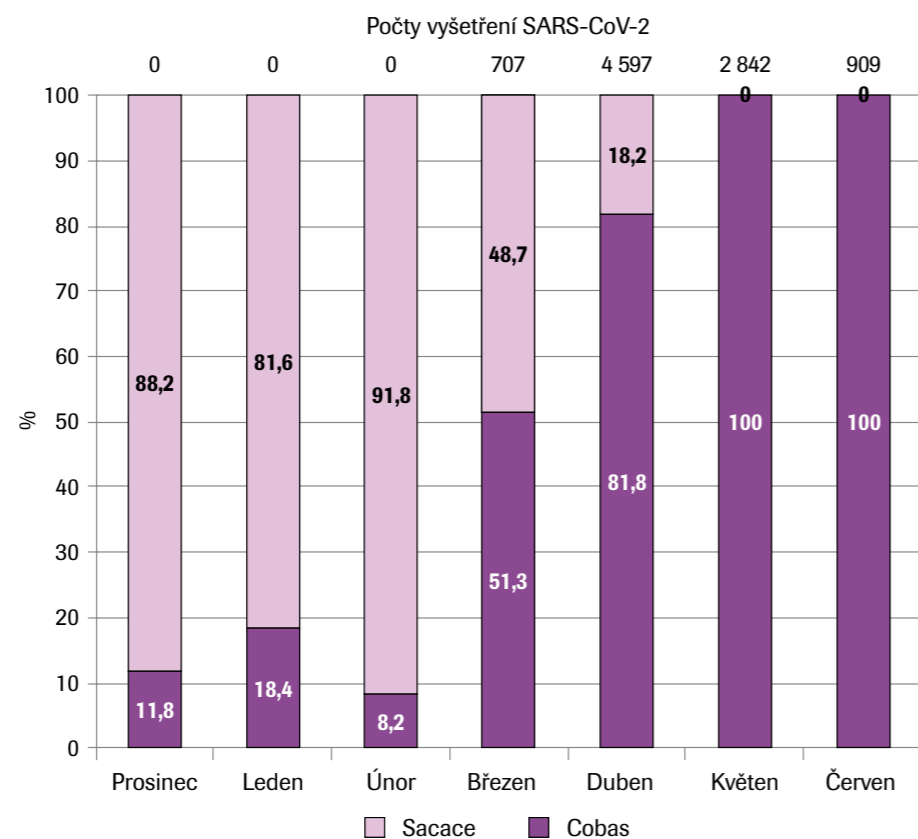
Koncem roku 2019 jsme dostali od firmy Roche nabídku na umístění přístroje cobas® Liat® do naší laboratoře. Jeho používání následně zkrátilo dobu vyšetření na zhruba 25 minut včetně přípravy. Zkrácení doby vyšetření je velkým přínosem v diagnostice a léčbě u pacientů zejména na stanicích ARO a JIP.

Manipulace s přístrojem je velice jednoduchá a intuitivní. Jedná se o uzavřený systém vyšetřování, což výrazně snižuje riziko kontaminace jak vzorku, tak i okolí. Před spuštěním analýzy se pouze napipetuje vhodný objem vzorku do reagenční kazety. Ostatní práci, včetně vyhodnocení a reportu výsledku, provede přístroj.

Do června 2020 jsme na přístroji cobas® Liat® provedli 124 analýz z celkového počtu 531 vzorků přijatých na oddělení. Na přístroji jsme detekovali 15 vzorků pozitivních, 106 vzorků negativních a 3 nevalidní. Tyto tři chybné analýzy

byly způsobeny nevhodným odběrem. Po nových odběrech byly už tyto vzorky negativní.

Na následujícím grafu je znázorněno procentuální zastoupení zpracovaných vzorků chřipky jednotlivými metodami v období od prosince 2019 do června 2020.



▲ Graf č. 1: Procentuální zastoupení zpracovaných vzorků chřipky jednotlivými metodami

Od března 2020 významně zasáhla do chodu laboratoře pandemie SARS-CoV-2. V tuto dobu jsme ocenili časovou nenáročnost přístroje cobas® Liat®, který nám i při velkém množství vzorků na SARS-CoV-2 umožnil zpracovávat také vzorky chřipky.

Hodnoty nad jednotlivými sloupci v grafu ukazují počet zpracovaných vzorků na SARS-CoV-2. Je patrné, že po propuknutí pandemie procento zpracovaných vzorků chřipky pomocí cobas® Liat® stouplalo, až dosáhlo hodnoty 100 % v posledních měsících.

Chřipka a SARS-CoV-2 mají obdobné příznaky a sezonní výskyt. Z těchto důvodů očekáváme na podzim vysoký nárůst požadavků na tato vyšetření.

Firma Roche přichází na trh s kombinací detekce obou těchto virů v jednom kitu, což napomůže rychlejší diagnostice.



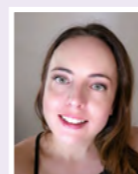
▲ Obr. č. 1: Naše laboratoř



▲ Obr. č. 2: Práce s kitem



▲ Obr. č. 3: Pozitivní vzorek / negativní vzorek / invalidní vzorek



### Mgr. Eva Haburová

Oddělení lékařské mikrobiologie Slezské nemocnice v Opavě  
Kontakt: eva.mitrengova@sнопava.cz  
Pracuje na oddělení lékařské mikrobiologie, kde je vedoucí úseku molekulární biologie zabývající se vyšetřováním původců virových a bakteriálních onemocnění metodou real-time PCR. Dříve pracovala na ZÚ se sídlem v Ostravě na oddělení fyziologie a psychologie práce. Mimo práci, která je jejím velkým koníčkem, ráda cestuje, lyžuje, pečce a schází se s přáteli.

### Ing. Kristýna Válková

Oddělení lékařské mikrobiologie Slezské nemocnice v Opavě  
Kontakt: kristyna.valkova@sнопava.cz  
Pracuje na oddělení lékařské mikrobiologie Slezské nemocnice v Opavě, kde se zabývá zejména vyšetřováním původců virových a bakteriálních onemocnění metodou real-time PCR. Dříve pracovala na Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze na oddělení molekulární biologie, kde se zabývala buněčným chimerismem pacientů po alogenní transplantaci kmenových buněk kostní dřeně a periferní krve. Ještě pod svým rodným jménem Pegová byla spoluautorkou několika článků a příspěvků na konferenci, jež se týkala vyšetřování buněčného chimerismu.





Na panelu pozitivních vzorků jsme testovali různé soupravy a popisujeme je hlavně z hlediska citlivosti a dále z pohledu hodnotícího vývoje odpovědi v čase. Nově máme zařazeno i testování prvních dvou dostupných automatických metod. Vedle toho jsme ověřili citlivost jedné soupravy chromatografické, za ideálních podmínek v laboratoři. Po diskusi nastiňujeme diagnostické schéma sérologických testů, které doplní přímý průkaz v dalším vývoji epidemie COVID-19. Práce obsahuje i souhrn nabízených sérologických metod.

## Zkušenosti s různými metodami stanovení protilátek proti SARS-CoV-2 v oddělení společných laboratoří Nemocnice Havlíčkův Brod v dubnu až květnu 2020

MVDr. VÁCLAV FEJT

Nemocnice Havlíčkův Brod, příspěvková organizace OKB

### Úvod

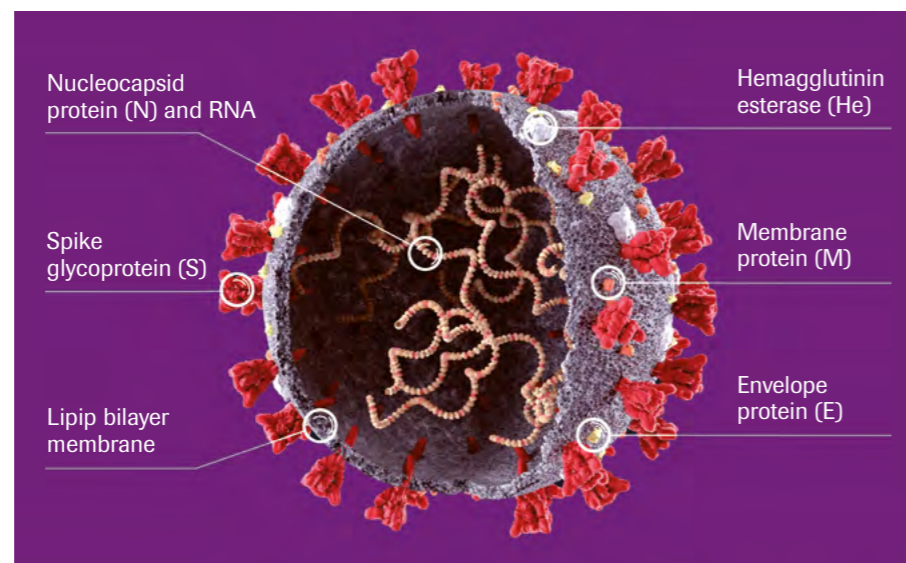
Základní metodou diagnostiky onemocnění COVID-19 je přímý průkaz virové RNA. Pro množství případů a vzniklých otázek vyvstává potřeba principiálně jiného vyšetření. Na počátku letošní epidemie jsme zkusmo objednali řadu souprav, které byly chvatně vyvíjeny a často k nim chyběly údaje o specifitě a citlivosti. Také v literatuře se píše<sup>1</sup>

o chybějícím dozoru FDA. Řada těchto objednávek nakonec nebyla realizována, naopak do zdravotnictví bylo „vrženo“ velké množství imunochromatografických rychlých testů. V této situaci se v naší spádové oblasti objevila dvě dobře popsaná ohniska a řada sporadických případů, čímž vznikl panel pozitivních vzorků, na kterém jsme přezkoušeli i soupravy, které se na trhu objevily později.

Studie je zaměřena na citlivost vzhledem k záchytu nových případů či celých ohnisek.

### Principiální základy sérologických testů

Antigenní skladba viru SARS-CoV-2 sestává z antigenu hrotového (spike – S), obálkového (envelope – E), matrixového (M) a nukleokapsidového (N).



▲ Struktura koronaviru

Zjišťované protilátky mohou být třídy IgG, IgA, IgM nebo celkové (total).

Metodicky jde o testy enzymatické (ELISA), chromatografické (rapid) a chemiluminiscenční (CMIA, CLIA).

### Použité soupravy

- Generic Assays **GA** COV-2 **IgG**, sendvičová ELISA, použitý antigen neuveden. Výrobce udává specifitu nad 95 %. Poznámka: U malého počtu „normální“ populace byly nalezeny protilátky proti nukleokapsidovému antigenu.
- Generic Assays **GA** COV-2 **IgM**, sendvičová ELISA, použitý antigen neuveden. Specifita nad 98 %, citlivost 98 %. Stejná poznámka jako u IgG.
- Generic Assays **GA** COV-2 **IgG plus**, sendvičová ELISA, profil protilátek proti antigenům S1, S2 a N. Ve studii nebylo testováno.
- **EDI** Novel Coronavirus COVID-19 **IgM** ELISA kit firmy Epitope Diagnostics, inc. ELISA capture, použitý antigen neuveden („rekombinantní“). Citlivost ani specifita nejsou uvedeny.
- **EDI** Novel Coronavirus COVID-19 **IgG** ELISA kit. Sendvičová ELISA, nukleokapsidový antigen. Uvedena citlivost i specifita 100 % na kohortách 30 a 54 vzorků.
- Anti-SARS-CoV-2 ELISA **IgA** a **IgG** firmy **Euroimmun**. Sendvičová ELISA, rekombinantní antigen S1. Specifita IgA na panelu 200 sér 92,5 %, na panelu zdravých dárců 10–12,7 % nespecifických reaktivit IgA, specifita IgG na panelu 200 sér 98,5 %. Citlivost kombinace IgG + IgA (9 vzorků) do 10 dnů od nástupu příznaků 66,7 %, nad 10 dnů 100 %.

- SARS-CoV-2 **IgG Architect** Abbott. CMIA, antigen neuveden. Citlivost i specifita v přibalové informaci rovněž chybí.
- **Elecsys** Anti-SARS-CoV-2 cobas® Roche, dvojantigenová ECLIA, rekombinantní nukleokapsidový antigen, stanovuje principiálně celkové protilátky. Udávaná specifita 99,81 % (5 272 vzorků), citlivost do týdne po prvním pozitivním PCR je 65,5 %, 7–13 dnů 88,1 % a nad 14 dnů 100 %.
- Souprava SARS-CoV-2 (COVID-19) IgG/IgA/IgM **Novalisa** (sendvičová ELISA, nukleokapsidový antigen) od Novatecu byla použita s dobrým výsledkem, ale před sestavením panelu, proto v přehledu není uvedena. Naopak soupravy SARS-CoV-2 IgG/IgA/IgM **Test Line** nám byly dodány až po vyčerpání panelu.
- 2019-nCoV Ab Test (colloidal gold) **IgG/IgM Innovita**, Qian an, China – chromatografický test. Antigen neuveden („rekombinantní“). Provedeno v laboratoři ze separovaného séra, hodnocení vždy třemi pracovníky, jako pozitivní označena jejich shoda, jinak uzavřeno jako sporné.

PCR bylo provedeno v laboratoři FN HK, údaj vztahujeme vždy k časově nejbližšímu odběru séra. Všechny testy byly provedeny podle postupů a podmínek stanovených výrobci.

### Panel sér

Bylo vybráno 43 vzorků. 17 vzorků bylo od mužů, 26 od žen, průměrný věk byl 75 let (23–93), což bylo dáno převážným zastoupením klientů domova pro seniory.

33 vzorků bylo od pacientů s dobře doloženou diagnózou (PCR + epidemiologická souvislost + klinika). Z toho 4 pacienti



měli těžký průběh s nutnou hospitalizací, 2 z nich zemřeli.

Bez příznaků, ale pozitivní PCR a epidemiologickou souvislost vykazovalo 5 pacientů (od nich v souboru 8 vzorků).

Jeden pacient, který vyhovoval epidemiologicky a klinicky, ovšem s negativním PCR, reagoval přítomností protilátek, ale nebyl dále přímými metodami testován.

Od 15 pacientů byly získány nejméně dva vzorky pro zachycení dynamiky.

Počátek infekce byl stanoven na den hospitalizace u těžkých pacientů, vzestup teploty u nehospitalizovaných pacientů a předpokládané datum nakažení s odhadem inkubační doby plynoucí z epidemiologie u bezpříznakových případů.

V informacích výrobců se opakuje hodnocení stavu do 7–14 dnů od počátku příznaků jako akutní skupina, která se zřetelně odlišuje od pozdějších vzorků. V našem souboru jsme viděli výrazně oddělenou skupinu do 11 dnů (12 vzorků, 0–11 dnů, průměr 7,2), kterou jsme označili jako akutní, později odebrané vzorky jsou ve skupině pozdní (31 vzorků, 15–57 dnů, průměr 33 dnů).





Výsledky

	Roche	Abbott	Euroimmun		Epitope		Generic As.		Innovita		PCR
	total	IgG	IgG	IgA	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	
<b>akutní</b>											
pozitivní	6	7	6	12	7	3	10	6	1	1	8
suma potvrzených	11	13	13	13	10	10	10	10	9	9	10
citlivost akutních	<b>55</b>	<b>54</b>	<b>46</b>	<b>92</b>	<b>70</b>	<b>30</b>	<b>100</b>	<b>60</b>	<b>11</b>	<b>11</b>	<b>80</b>
<b>pozdní</b>											
pozitivní	30	29	16	17	17	6	30	29	25	3	29
suma potvrzených	31	31	18	18	18	16	30	30	30	30	30
citlivost pozdních	<b>97</b>	<b>94</b>	<b>89</b>	<b>94</b>	<b>94</b>	<b>38</b>	<b>100</b>	<b>97</b>	<b>83</b>	<b>10</b>	<b>97</b>
<b>všechny</b>											
pozitivní	36	36	22	29	24	9	40	35	26	4	37
suma potvrzených	42	44	31	31	28	26	40	40	39	39	40
citlivost	<b>86</b>	<b>82</b>	<b>71</b>	<b>94</b>	<b>86</b>	<b>35</b>	<b>100</b>	<b>88</b>	<b>67</b>	<b>10</b>	<b>93</b>

Diskuse

Dynamika protilátek se liší jak podle imunoglobulinových tříd, tak podle užitého antigenu. Uváděný vrchol koncentrace protilátek IgM je v druhém týdnu po objevení příznaků, IgG protilátek ve třetím. O průběhu odpovědi IgA se zprávy liší, nicméně počátek produkce v prvním týdnu by se měl shodovat s IgM. Sledování dynamiky by mělo pomoci v prognóze.<sup>1</sup>

Naše nálezy se od literatury (zejména firemní) v něčem dosti liší. Citlivost

souprav je celkem srovnatelná a při doporučeném opakování odběru by neměla mít mnoho uniklých případů. Složitější je to při odhadu délky trvání infekce. IgM soupravy GA přetrvávalo značně, s vysokými titry i po padesáti dnech. Naproti tomu u akutních vzorků mělo menší citlivost než Epitope. Epitope IgM v čase dobře klesalo, bylo pozitivní nejdéle 21 dnů. Souprava IgA Euroimmun zachycovala pozitivitu velmi časně, prakticky zároveň s přímým průkazem, ale vzhledem k delšímu trvání odpovědi IgA (ve shodě s literaturou) nezobrazila zřetelně pokles u pozdních vzorků

a nepomohlo ani sledování semikvantitativní dynamiky.

Stanovení celkových protilátek metodou Elecsys Roche mělo dobrou citlivost a jeho dynamika odrážela velmi dobře postup odpovědi v čase – zde je výhodou větší rozsah měření ECLIA proti ELISE. Podobně provozně výhodný automatický test Abbott Architect byl dostupný pouze ve třídě IgG a výmluvné hodnocení by žádalo i některý z akutních markerů.

Zkoumané rapid-testy ukazují mizivou citlivost v akutní fázi. U pozdních sér mělo IgG s tolerancí použitelnou citlivost IgG, za předpokladu provedení ze séra. IgM reagovalo i v optimálních podmínkách provedení špatně.

Sloupec PCR odráží ve shodě s literaturou<sup>2</sup> fakt, že ani PCR není stoprocentně citlivé – zde hraje roli hlavně provedení odběru. Přetrvávání positivity PCR po klinické úzdavě přesahuje zaměření této práce.

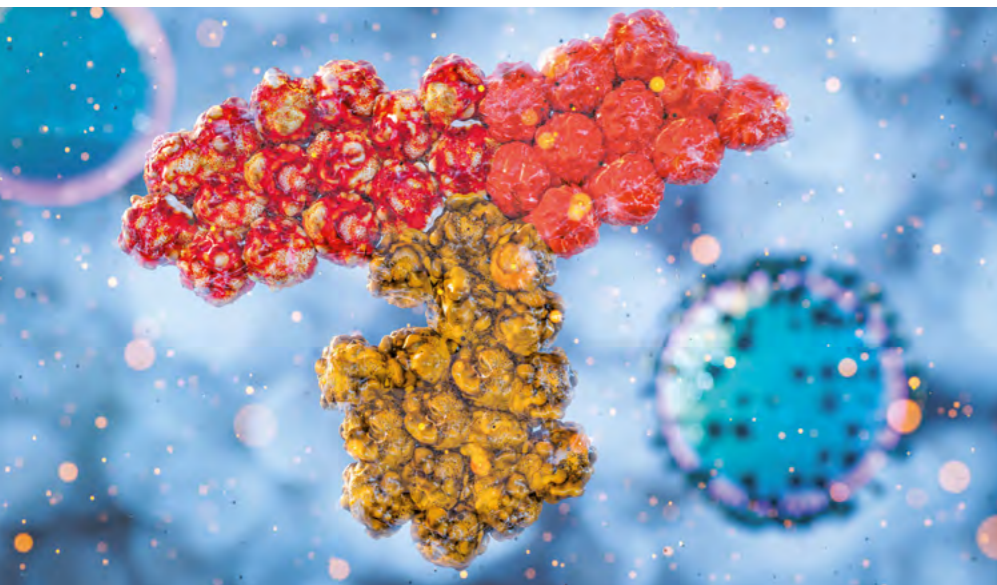
Pro úplnost sdělení mimo referovaná data: interpretovat izolované reaktivity IgA negativní v PCR, které jsme pozorovali my i jihočeská studie,<sup>2</sup> je poměrně

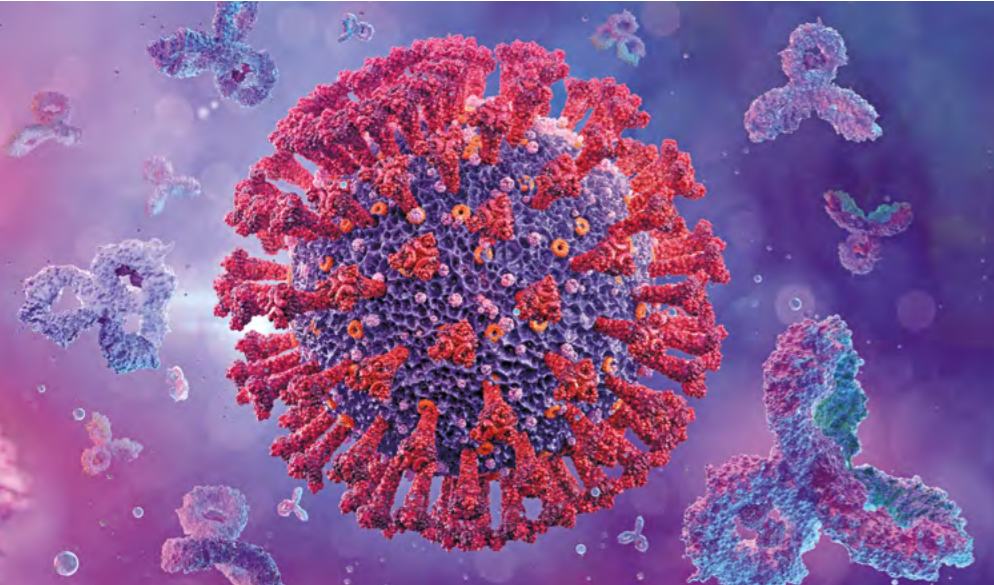


Ozn. pac.	Trvání (dny)	Roche	Abbott	Euroimmun		EPITOPE EDI		Generic Assays		Innovita		PCR
			IgG	IgG	IgA	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	
A	5	0,076	neg	hran	3,7	hran	neg	2,36	-neg	neg	neg	-neg
A	10	0,07	neg	1,3	4,2	nt	nt	1,22	-neg	neg	neg	-neg
B	5	1,72	neg	neg	1,3	neg	poz	1,40	-neg	neg	neg	?nt
B	7	4,03	4,41	neg	4,2	poz	poz	nt	nt	nt	nt	?nt
B	15	9,29	7,72	7,7	10,8	poz	poz	12,60	13,10	poz	neg	-neg
B	19	10,16	7,58	7,5	10,8	poz	poz	12,60	13,10	poz	neg	poz
C	3	0,41	neg	neg	1,7	nt	nt	2,31	-neg	neg	neg	poz
C	8	nt	7,51	3,3	8	poz	hran	nt	nt	nt	nt	?nt
C	16	45,4	8,35	6,1	10,8	poz	neg	12,60	3,29	poz	hran	?nt
C	22	56,5	8,92	6,2	9,7	poz	neg	12,60	2,89	poz	neg	poz
C	24	67,5	8,73	8,5	11,9	nt	nt	11,90	2,43	poz	neg	poz
D	8	nt	4,10	1,6	3,1	poz	neg	nt	nt	nt	nt	poz
E	0	0,74	neg	neg	neg	neg	neg	2,07	2,36	nt	nt	poz
E	11	7,59	7,46	9,1	10,2	nt	nt	11,90	6,05	neg	neg	poz
E	48	21,1	6,56	nt	nt	nt	nt	9,10	2,35	poz	neg	poz
F	3	13,38	7,81	5,1	11,8	poz	neg	12,6	12,5	hran	neg	poz
F	39	72,7	9,04	nt	nt	nt	nt	11,1	10,6	poz	neg	poz
G	10	23,2	8,62	3,7	1,2	poz	poz	12,6	13,1	poz	poz	poz
G	46	58,3	9,39	nt	nt	nt	nt	10,9	8,69	poz	neg	poz
H	15	12,1	8,33	1,9	7,8	poz	poz	nt	nt	nt	nt	poz
H	17	8,98	8,53	3,8	10,8	poz	poz	12,60	2,30	poz	hran	poz
H	19	7,64	8,71	nt	nt	nt	nt	12,60	2,30	poz	hran	poz
H	56	20,1	9,04	nt	nt	nt	nt	11,4	9,39	poz	neg	poz
CH	11	15,3	1,23 neg	neg	2,4	sl.poz	neg	8,38	3,54	neg	neg	poz
I	11	0,87	3,26	neg	1,8	poz	neg	12,6	5,73	neg	hran	poz
J	21	47,1	9,24	neg	7,4	poz	poz	12,1	13,1	poz	poz	poz
J	57	50	9,72	nt	nt	nt	nt	11,9	12,4	poz	poz	poz
K	19	28,7	7,24	5,4	11,6	poz	neg	12,1	11,2	poz	hran	poz
K	55	64	8,26	nt	nt	nt	nt	11,4	7,94	poz	neg	poz
L	20	72,8	8,88	1,5	5,8	poz	neg	10,9	3,52	poz	neg	poz
L	56	88,3	8,96	nt	nt	nt	nt	10,2	1,98	poz	neg	poz
M	20	56,4	4,29	9,2	12,5	poz	neg	12,6	12,6	poz	hran	poz
M	56	59,5	6,9	nt	nt	nt	nt	11,6	12,3	poz	neg	poz
N	21	28,7	7,06	4,9	2,1	poz	neg	4,12	3,44	neg	neg	poz
N	57	77,6	6,21	nt	nt	nt	nt	5,28	3,16	neg	neg	poz
O	20	16,3	1,79	7,8	6,5	poz	neg	12,6	8,12	poz	neg	poz
O	56	69,1	5,14	nt	nt	nt	nt	10,6	5,06	hran	neg	poz
P	20	1,27	5,08	9,1	10,2	poz	neg	5,86	3,43	poz	neg	poz
P	56	25	6,64	nt	nt	nt	nt	3,42	2,17	poz	neg	poz
R	20	41,5	7,85	3	11,6	poz	neg	10,9	5,06	poz	hran	poz
R	56	79,6	7,61	nt	nt	nt	nt	10,4	2,79	hran	hran	poz
S	20	4,55	8,27	4	5,9	poz	sl.poz	4,93	9,44	poz	hran	poz
T	21	6,54	1,14 neg	3,9	8,3	poz	Poz 1,55	11,9	12,2	poz	poz	poz
U	20	0,26	neg	neg	hran	hran	neg	1,5	-neg	neg	neg	poz

odlišení ohnisek

▲ Kromě metody Roche uvádíme index positivity. Innovita byla testována z odděleného séra, 3 hodnotitelé (pokud se neshodli, uvádíme hranici). Panel byl vytvořen ze vzorků v akutní fázi a doplněn dalšími vzorky stejných pacientů v odstupu.





těžké. Bude nutné sledování v delším čase, užití virus neutralizačního testu (VNT) a dalších postupů. Stejně nerozřešeným problémem je spolehlivé stanovení protektivity.

Ověření specifity jednotlivých testů bude vyžadovat větší soubor negativních vzorků.

### Praktické dopady

Laboratoře, které se sérologií CoV-2 zabývají, mají různý přístup. Jihočeská studie byla provedena na soupravách IgG/IgA firmy Euroimmun, obdobně

virologie ZÚ Ostrava má tyto soupravy jako základ a doplňuje je soupravou IgM Epitope (osobní sdělení), ovšem zásadní silnou zbraní této laboratoře je VNT, který rutinní laboratoř nemá. VNT pravděpodobně řeší i problém protektivity.

Zkušenosti s automatickými metodami jsme v dostupných zdrojích dosud našli.

Shrnutí našich praktických poznatků nám umožňuje sestavit kombinaci testů pro různé účely stanovení protilátek při onemocnění COVID-19 a případných kontaktech a suspekcích.

Jednotestové, dosti citlivé stanovení celkových protilátek doplňujeme při nalezené reaktivitě panelem IgG/IgA/IgM: nejcitlivější IgA pro záchyt akutních, IgM se zřetelným poklesem titru v čase (soupravy s přetrváváním IgM nebudou specifické). V rozhodování bude hrát roli i cena. Opakování testu s rekonvalescentními séry zvýší citlivost a zachytí i sérokonverzi.

### Závěr

Zkoušené soupravy ELISA i chemiluminiscenční vykazovaly v praxi použitelnou citlivost. Jedna ze souprav IgM vykazovala nižší citlivost v akutní fázi a naopak prodlouženou reaktivitu proti srovnatelnému testu konkurenčnímu. Rapid-testy byly málo citlivé v akutní fázi a později reagovaly prakticky jen v IgG.

### Konflikt

Pro dané sledování jsme vešli ve spolupráci se všemi dodavateli diagnostiky uvedenými v práci, kromě toho jsme zkoušeli soupravy Novatec a Test Line, z technických důvodů na jiných vzorcích. Firmám Vidia, Dynex a Test Line jsme poskytli pozitivní séra. Firmy Roche a Test Line daly ke zkoušení soupravy zdarma.

Kvalitativní rychlotesty na detekci protilátek proti novému typu koronaviru SARS-CoV-2 na principu laterální imunodifúze jsou postupně nahrazovány přesnějšími testy kvantitativní detekce protilátek pomocí automatické imunoanalýzy. Některé tyto testy detekují protilátky třídy IgM, IgG, příp. IgA. Nejspolehlivější pro průkaz prodělané infekce je detekce celkových protilátek proti danému epitopu nebo protilátek třídy IgG, jejichž produkce organismem po prodělané infekci SARS-CoV-2 je nejrobustnější, jelikož u některých jedinců nejsou anti-SARS-CoV-2 protilátky třídy IgM detekovány.<sup>1,2</sup>

## Stanovení celkových anti-SARS-CoV-2 protilátek automatizovanou ECLIA: interindividuální variabilita, korelace s virus neutralizačním testem, implikace pro selekci potenciálních dárců rekonvalescentní plazmy

prim. doc. RNDr. LENKA ZDRAŽILOVÁ DUBSKÁ, Ph.D.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Oddělení klinické mikrobiologie a imunologie, ÚLM, FN Brno, <sup>2</sup> Farmakologický ústav, LF MU

### Poděkování

Na pracích vedoucích k této publikaci dále spolupracovali: **Iveta Selingerová<sup>2,3</sup>, Dominika Okruhlicová<sup>2</sup>, Hana Kabičková<sup>4</sup>, Petr Pajer<sup>4</sup>, Hana Lejdarová<sup>5,6</sup>, Rita Pacasová<sup>5,6</sup>, Vladimír Šrámek<sup>7</sup>, Martin Helán<sup>7</sup>, Lenka Gescheidtová<sup>3</sup>, Dalibor Valík<sup>2,6</sup>**

<sup>2</sup> Farmakologický ústav, LF MU, <sup>3</sup> Oddělení laboratorní medicíny, Masarykův onkologický ústav, <sup>4</sup> Vojenský zdravotní ústav, <sup>5</sup> Transfuzní a tkáňové oddělení, FN Brno, <sup>6</sup> Katedra laboratorních metod, LF MU, <sup>7</sup> Anesteziologicko resuscitační klinika, LF a FN u sv. Anny

Nejvíce imunogenními antigeny nového typu koronaviru SARS-CoV-2 jsou protein N a protein S.<sup>3,4</sup> Nukleokapsidový protein N je jediný protein, který tvoří nukleokapsid virionu SARS-CoV-2. Je vysoce fosforylovaný, hydrofilní, což vede k vysoké afinitě k virové RNA, a také stojí za imunogenicitou proteinu N. Protein S (Spike) je transmembránový protein virionu SARS-CoV-2 zodpovědný za vnik virionu do buňky. Glykoprotein S se skládá ze dvou podjednotek. Podjednotka S1 s RBD (receptor-binding domain) interaguje s receptorem ACE2 na povrchu hostitelských buněk, S2 doména obsahuje transmembránovou část proteinu.

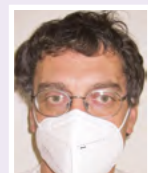
Protilátky proti nukleokapsidovému proteinu N je možné detekovat pomocí elektrochemiluminiscence (ECLIA)

na principu *double-antigen sandwich* imunoanalýzy testem Elecsys® Anti-SARS-CoV-2. Tento test je kvalitativní, hodnotí se v jednotkách poměru s cut-off COI, přičemž hodnoty 1,0 COI a vyšší jsou dle doporučení výrobce považovány za pozitivní. Protilátky proti proteinu S je možné detekovat pomocí elektrochemiluminiscence (ECLIA) na principu *double-antigen sandwich* imunoanalýzy testem Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 S. Tento test je kvantitativní, hodnotí se v jednotkách U/mL, přičemž hodnoty 0,8 U/mL a vyšší jsou dle doporučení výrobce považovány za reaktivní. Rozsah měření tohoto testu je 0,4–250 U/mL a vzorky s vysokou hladinou anti-S protilátek se ředí 1 : 10 univerzálním diluentem. Výsledky v pásmu nereaktivní jsou převážně s hladinou pod detekční limit 0,4 U/mL. Oba protilátkové

testy detekují celkové protilátky bez rozlišení třídy a jsou určeny pro detekci protilátek ze všech standardních typů klinických vzorků, tj. sérum, Li-heparin plazma, K2/K3-EDTA plazma, plazma z krve odebrané do citrátu sodného.

Měli jsme možnost analyzovat vzorky pacientů se závažným až kritickým průběhem a vzorky dospělých pacientů s mírným nebo bezpříznakovým průběhem. Všechny vyšetřované vzorky byly odebrány do K3-EDTA. Ačkoli je test Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 (anti-N) kvalitativní, poskytuje hodnoty přes dva řády COI (naše nejvyšší naměřená hodnota byla přes 140 COI). Pro účel této studie jsme proto výsledky anti-N protilátek hodnotili kvantitativně. Vztah mezi anti-N a anti-S protilátkami je patrný z obr. 1. Hodnoty nejsou nezávislé, ale silná lineární či jiná korelace mezi hodnotami není. Od hladiny celkových anti-N na úrovni přibližně 60 COI je variabilita párových hodnot anti-S značná, a to od koncentrace v pásmu nereaktivní po koncentraci přes 1 000 U/mL (viz obr. 1).

V časovém průběhu hladin anti-N protilátek, u kterých byl delší follow-up z důvodu dřívější dostupnosti testu, jsme pozorovali nástup a pak následně pokles hladin anti-N protilátek (viz obr. 2). Co se týče nástupu produkce protilátek anti-S, je zřejmý zásadní rozdíl v závislosti dynamiky produkce na tíži příznaků (viz obr. 2). U jedinců s mírným průběhem onemocnění je obecně nástup produkce protilátek anti-S pozvolnější než u pacientů s těžkým či kritickým průběhem COVID-19 (viz obr. 2). U některých jedinců nedosahuje hladina pásma reaktivní ani po 5 týdnech od první PCR pozitivivity SARS-CoV-2. Příklady jsou následující: žena, 47 let, mírný průběh onemocnění, pozitivita zjištěna na počátku října 2020. Metodou Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 S u ní byla 21 dní od zjištění nákazy detekována hladina protilátek 0,562 U/mL, 43 dní od zjištění nákazy již byla tato hodnota 8,35 U/mL. U ženy,



### MVDr. Václav Fejt

Oddělení společných laboratoří, vedoucí laboratoře imunologie a sérologie, Nemocnice Havlíčkův Brod, Husova 2624, Havlíčkův Brod

Kontakt: vaclav.fejt@onhb.cz

Absolvent oboru všeobecného veterinárního lékařství. Od roku 1993 pracuje v laboratořích Nemocnice Havlíčkův Brod, kde se zabývá metodami laboratorní imunologie a infekční sérologie. Sérologii viru SARS CoV-2 se soustředěně věnuje od března 2020.

### LITERATURA

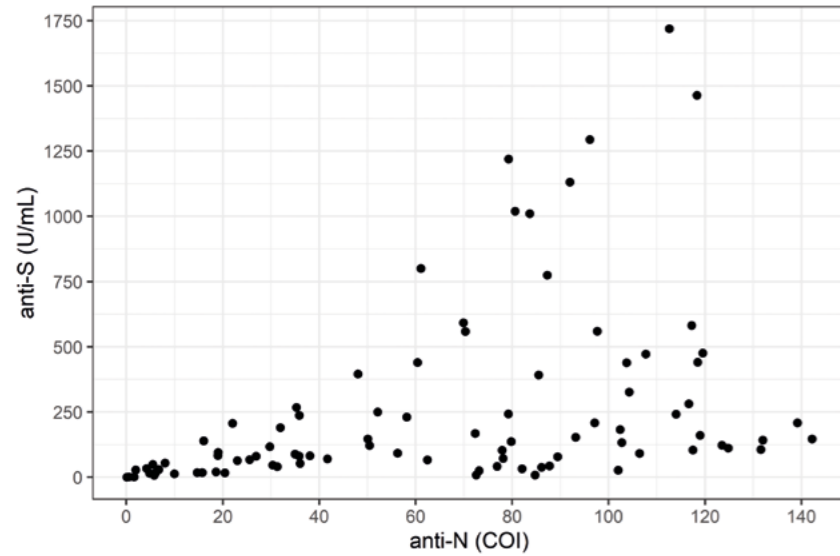
1. Baoqing Sun et al Kinetics of SARS-CoV-2 specific IgM and IgG responses in COVID-19 patients. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/22221751.2020.1762515>.
2. Kolektiv autorů: Srovnávací průřezová studie prevalence protilátek proti SARS-CoV-2 v okresech Strakonice a Písek v květnu 2020. [https://www.dropbox.com/s/a7egx9haj3nih5h/V%C3%BDstupy%20studie%20textova\\_%20podoba%20FINAL.pdf?fbclid=IwAR131F3c0UOaZNaY-m-9-UdY-67e8RCLp-MHZqlkeYofbQzAYHzMGXe7ggo](https://www.dropbox.com/s/a7egx9haj3nih5h/V%C3%BDstupy%20studie%20textova_%20podoba%20FINAL.pdf?fbclid=IwAR131F3c0UOaZNaY-m-9-UdY-67e8RCLp-MHZqlkeYofbQzAYHzMGXe7ggo).
3. Firemní materiály k použitým soupravám. Materiál vždy diskutujeme tam, kde o dané soupravě píšeme.



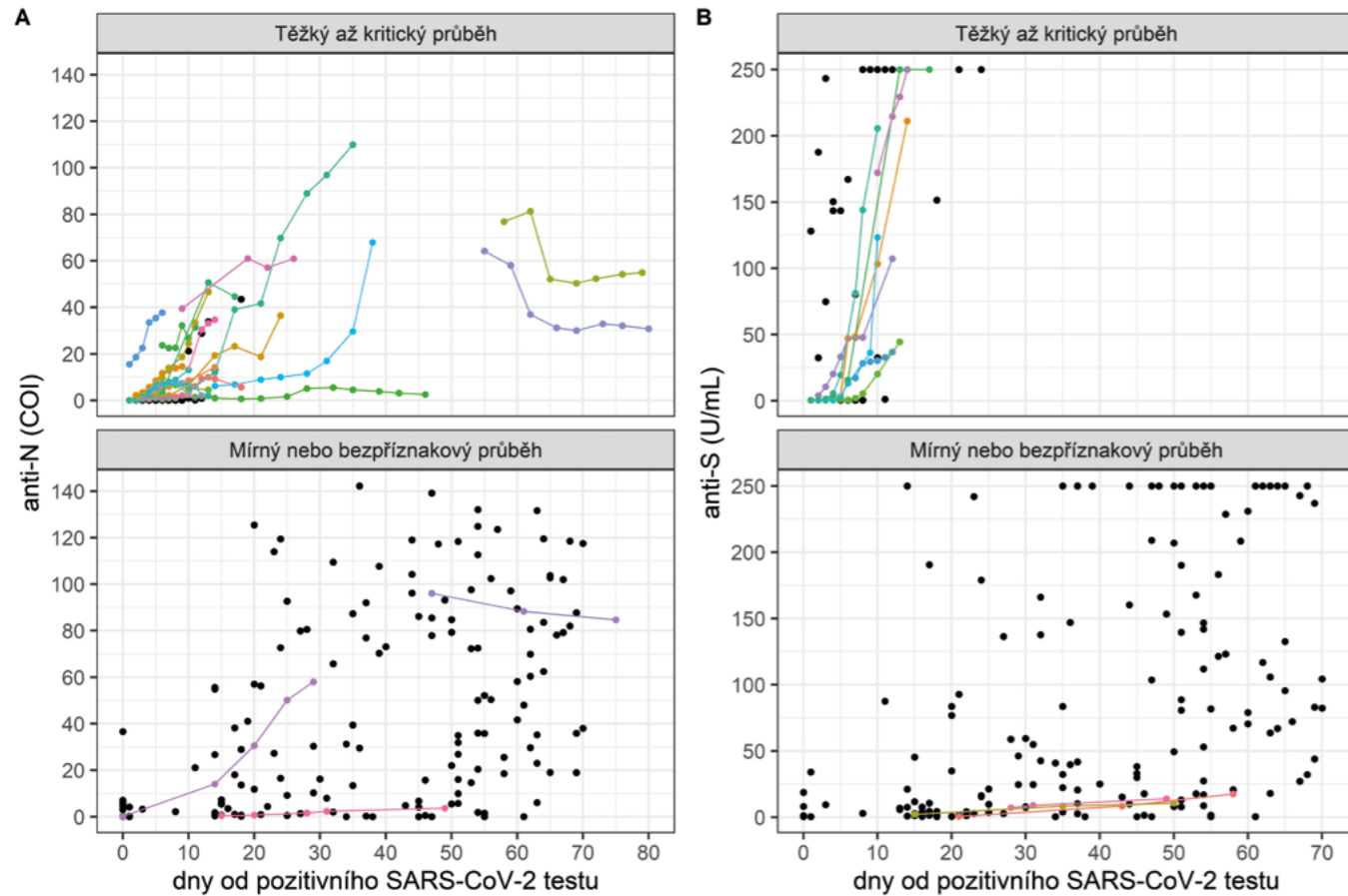
26 let, s velmi mírným průběhem, byla nákaza prokázána na konci října 2020. Dvacet jedna dní po tomto zjištění u ní

byla toutéž metodou stanovena hladina protilátek 0,576 U/mL, po dalších 15 dnech (35 dní od zjištění nákazy) byla

hladina anti-S protilátek 3,84 U/mL. Posledním příkladem je opět žena, 43 let, mírný průběh onemocnění, pozitivita na konci září 2020. Dvacet dní od zjištění nákazy byla hladina anti-N protilátek v pásmu nereaktivní 0,724 COI, anti-S protilátky v této době nebyly stanovovány. Za dalších 8 dní už anti-N protilátky překročily cut-off hodnotu reaktivity a dosáhly hladiny 1,66 COI, hladina anti-S protilátek byla v této době (28 dní od prokázané pozitivity) 7 U/mL. Podobných případů jsme zaznamenali více. Z našich zkušeností vyplynulo, že již hodnoty anti-SARS-CoV-2 S mezi detekčním limitem 0,4 U/mL a cut-off hodnotou pro reaktivitu, tj. 0,8 U/mL, mohou signalizovat počínající produkci protilátek proti S-proteinu. Na pracovišti Oddělení klinické mikrobiologie a imunologie ÚLM FN Brno reportujeme hodnoty nad 0,5 U/mL jako hraniční s interpretací dle



▲ Obr. 1: Závislost koncentrace protilátek proti SARS-CoV-2 Spike proteinu (osa y) na koncentraci protilátek proti SARS-CoV-2 nukleokapsidovému proteinu (osa x) stanovená na 97 pacientech po prodělané infekci COVID-19 s mírným nebo bezpříznakovým průběhem, 20–70 dní po prvním pozitivním SARS-CoV-2 testu



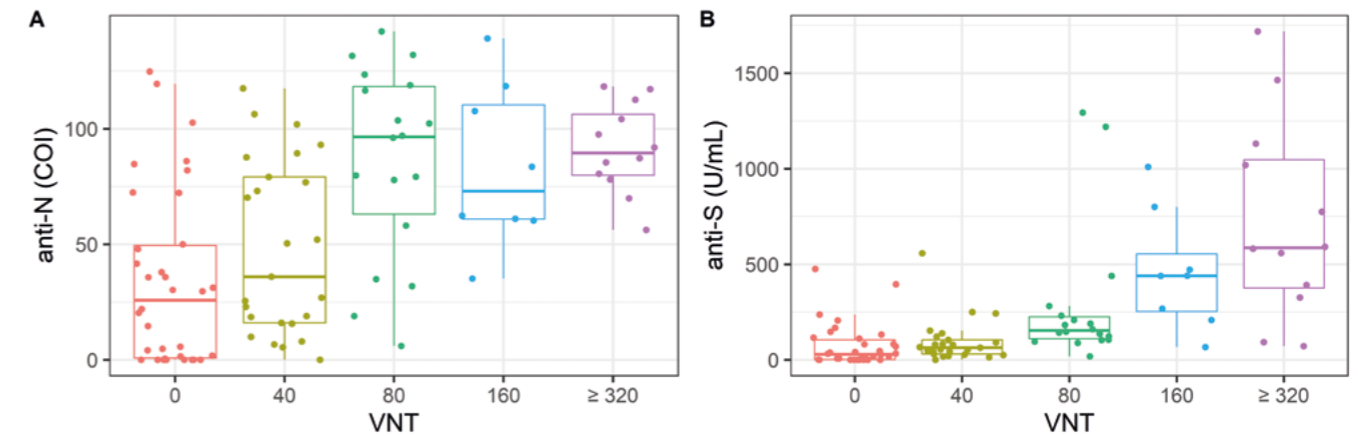
▲ Obr. 2: Koncentrace protilátek proti SARS-CoV-2 (A) nukleokapsidovému (anti-N) a (B) Spike (anti-S) proteinu v závislosti na počtu dnů po prvním pozitivním SARS-CoV-2 testu pro 30 pacientů s těžkým až kritickým průběhem infekce (188 vzorků, nahoře) a pro 162 pacientů s mírným nebo bezpříznakovým průběhem infekce (201 vzorků, dole); vybraní pacienti s opakovanými odběry jsou zvýrazněni barevně; zobrazené hodnoty koncentrace anti-S 250 U/mL znamenají koncentraci anti-S  $\geq 250$  U/mL

klinického kontextu a s doporučením provést vyšetření opakovaně s časovým odstupem 2–4 týdnů.

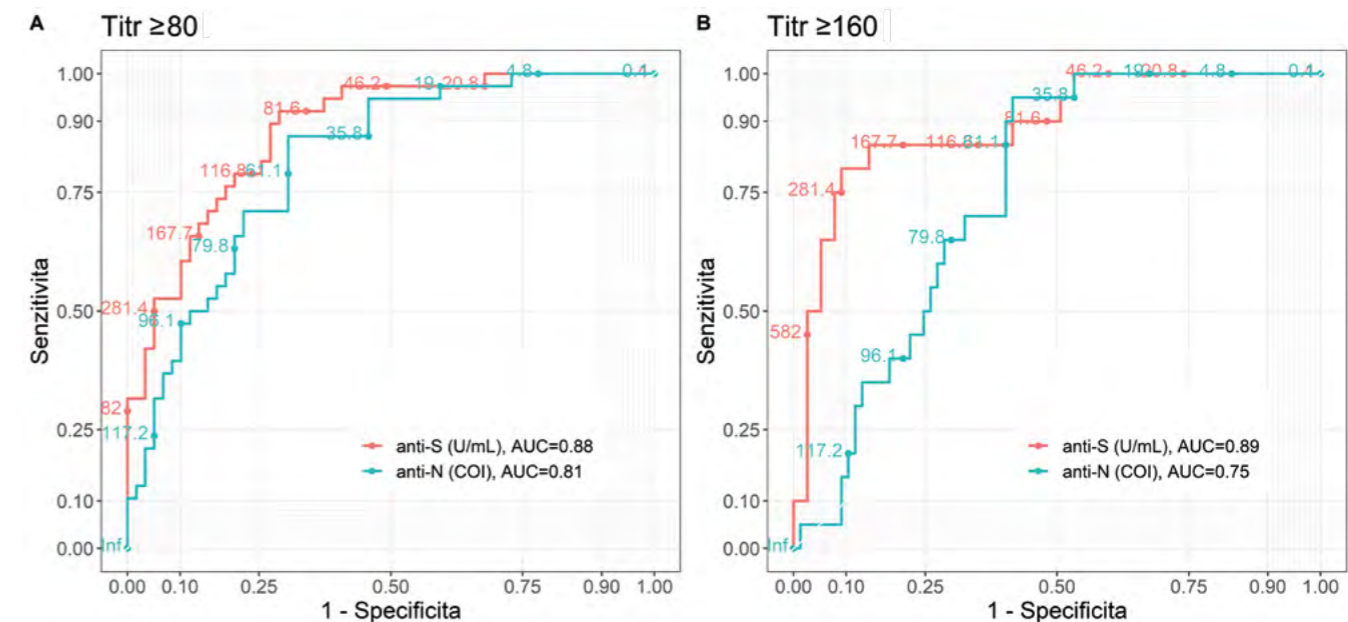
Těžiště významu kvantitativního stanovení anti-SARS-CoV-2 protilátek spočívá aktuálně v problematice rekonvalescentní plazmy, tj. hyperimunní krevní plazmy od rekonvalescentů infekce SARS-CoV-2. Podání anti-SARS-CoV-2 protilátek obsažených v plazmě vyléčených osob představuje způsob pasivní specifické imunizace s očekávatelnou léčebnou odpovědí.<sup>5</sup> Účinnost pasivní imunoterapie závisí na množství protilátek přítomných v podávané krevní

plazmě. Užití rekonvalescentní covidové plazmy v České republice upravuje doporučení **Doporučený postup pro použití rekonvalescentní plazmy v léčbě dospělých pacientů s COVID-19**.<sup>6</sup> Minimální množství anti-SARS-CoV-2 protilátek je aktuálně definované titrem protilátek stanoveným SARS-CoV-2 specifickým virus neutralizačním testem (VNT). Ve verzi 1 doporučení z 30/04/2020, vycházející z doporučení Evropské komise v té době aktuálního,<sup>7</sup> se za žádoucí a efektivní doporučuje titer 1 : 320 a více. Druhá verze doporučení EK z 30/11/2020<sup>8</sup> již jednoznačnou minimální hladinu virus neutralizačních protilátek nedoporučuje

vzhledem k doposud nedostatečné klinické evidenci. V doporučení je uveden s odkazem na dosavadní výsledky<sup>9,10</sup> a praxi ve Spojených státech titer minimálně 1 : 160, který bude dále ověřován v klinických hodnoceních. V doporučení EK<sup>8</sup> je navrženo vyšetřovat potencionální dárce rekonvalescentní plazmy pomocí kvantitativního testu na anti-SARS-CoV-2 protilátky s dobrou návazností na virus neutralizační test, jehož praktická proveditelnost je limitovaná s ohledem na délku testu a dostupnost omezenou pouze na pracoviště BSL3, která jsou nositelem povolení pro práci s nebezpečnými infekčními agens včetně SARS-CoV-2.



▲ Obr. 3: Koncentrace protilátek proti SARS-CoV-2 (A) nukleokapsidovému a (B) Spike proteinu u 97 vzorků rozdělených dle titru anti-SARS-CoV-2, stanoveného pomocí virus neutralizačního testu



▲ Obr. 4: ROC křivky využití anti-N a anti-S testu pro identifikaci vzorků s titrem anti-SARS-CoV-2 protilátek stanoveným VNT nejméně (A) 1 : 80 a (B) 1 : 160



Otázka výběru potenciálních dárců rekonvalescentní plazmy vyvstala i ve FN Brno ve chvíli, kdy se zahajovala výroba rekonvalescentní covidové plazmy na TTO. Měli jsme možnost provést zhodnocení vztahu hladiny titrů VNT stanovených v Centru biologické ochrany a hladiny anti-SARS-CoV-2 protilátek cílících na N nebo na S epitop na kohortě 97 jedinců, kteří prodělali COVID-19 a/nebo byli infikováni SARS-CoV-2 na jaře 2020 a jejichž vzorky byly získány na začátku léta 2020. SARS-CoV-2 specifický virus neutralizační test byl proveden následujícím způsobem: do jamek mikrotitračních destiček s buňkami VERO E6 byla přidána inkubovaná směs viru SARS-2-CoV s testovaným vzorkem ve dvojkovém ředění. Pokud jsou přítomné neutralizační protilátky, zabrání infikování buněk, a tím vzniku cytopatického efektu. Test je hodnocen mikroskopicky 4. den inkubace. U obou automatizovaných protilátkových testů jsme

pozorovali vztah mezi stanovenou úrovní a VNT titrem (viz obr. 3). Provedená ROC analýza cílící na titer minimálně 1 : 80 ukázala, že analytické parametry pro rozlišení vzorků s presumpčním titrem protilátek automatizovanou metodou jsou mírně vhodnější u anti-S testu s plochou pod křivkou AUC = 0,88, přičemž AUC pro anti-N metodu byla 0,81 (viz obr. 4A). Pokud cílíme na VNT titer 1 : 160, ROC analýza opět ukazuje, že anti-S protilátky jako marker SARS-CoV-2 neutralizačního potenciálu jsou vhodnější (s AUC = 0,89) oproti anti-N protilátkám (AUC = 0,75), viz obr. 4B. Pro výběr vzorků s titrem VNT minimálně 1 : 160 jsou cut-off hodnoty pro automatizované protilátkové testy následující: (i) při specifitě aspoň 85 % a maximální senzitivitě anti-S 209 U/ml a anti-N 104 COI a (ii) při specifitě aspoň 90 % a maximální senzitivitě anti-S je to 268 U/ml a anti-N 118 COI. Vztah mezi Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 (anti-N) protilátkami

a virus neutralizačními protilátkami byl popsán.<sup>11,12</sup> Možnost selekce dárců rekonvalescentní plazmy na základě kvantifikace anti-S protilátek byla popsána pro imunoanalytický systém Ortho VITROS.<sup>13</sup>

Z této prezentované ministudie vyplývá, že (i) Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 a Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 S testy zachycují anti-SARS-CoV-2 protilátky, které mají rozdílnou dynamiku u téhož jedince, (ii) produkce anti-S protilátek má vysokou interindividuální variabilitu a produkce těchto protilátek u jedinců s mírným či bezpříznakovým průběhem může být velmi pozvolná, (iii) oba testy korelují s virus neutralizačním potenciálem plazmy rekonvalescentů, přičemž u anti-S protilátek je korelace silnější a tento test může sloužit pro rychlou a praktickou preselekcii dárců SARS-CoV-2 rekonvalescentní plazmy.

Práce byla podpořena CZECRIN LM2018128.

Společnost Roche vyvíjí testy, aby podpořila naléhavou potřebu testování pacientů během vypuknutí pandemie, s cílem zabránit dalšímu šíření viru v rané fázi infekce.

## Tiskové zprávy: RT-PCR testy společnosti Roche pro testování koronaviru

„Poskytování kvalitních a velkoobjemových testů nám umožní efektivně reagovat na to, co Světová zdravotnická organizace charakterizovala jako pandemií. Je důležité rychle a spolehlivě zjistit, zda je pacient infikován SARS-CoV-2,“ řekl Thomas Schinecker, CEO Diagnostics Division, F. Hoffmann-La Roche Ltd.

Test na detekci SARS-CoV-2 umožní urychlené testování koronaviru a vyhovuje tak naléhavým medicínským potřebám.

Dne 13. března 2020 společnost Roche oznámila, že americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) vydal pro test **cobas® SARS-CoV-2** povolení pro použití v nouzi (EUA). Test je určen ke kvalitativní detekci viru SARS-CoV-2, který způsobuje



onemocnění COVID-19, ve vzorcích výtěrů z nosohltanu a orofaryngeálního výtěru od pacientů, kteří splňují klinická a/nebo epidemiologická kritéria pro testování COVID-19.

Dne 3. září 2020 společnost Roche obdržela povolení FDA pro použití v nouzi pro test **cobas® SARS-CoV-2 & Influenza A/B** k současné detekci a rozlišení mezi viry, které způsobují COVID-19, chřipku A a chřipku B u pacientů s podezřením na respirační virovou infekci v souladu

s COVID-19. Test CE-IVD je k dispozici také na trzích akceptujících značku CE.

Nemocnice a referenční laboratoře mohou testovat na plně automatizovaných systémech Roche **cobas® 6800** a **cobas® 8800**. Testování na velkoobjemovém **cobas® 6800/8800** významně zvýší dostupnou testovací kapacitu. Systémy **cobas® 6800/8800**, které se používají k provádění testu **cobas® SARS-CoV-2** a k testu **cobas® SARS-CoV-2 & Influenza A/B**, nabízejí provozní efektivitu a flexibilitu. Test lze spustit současně s dalšími testy poskytnutými společností Roche pro použití na systémech **cobas® 6800/8800**.

Systémy **cobas® 6800** a **cobas® 8800** jsou dostupné na celém světě.

„Certifikace CE značkou a udělení EUA FDA podporuje náš závazek poskytnout více pacientům snadnější přístup ke spolehlivé diagnostice, která je zásadní pro boj s tímto závažným onemocněním,“ řekl Thomas Schinecker, CEO Diagnostics Division, F. Hoffmann-La Roche Ltd.

Společnost Roche se zavázala poskytnout co nejvíce testů a jde na hranici výrobní kapacity.



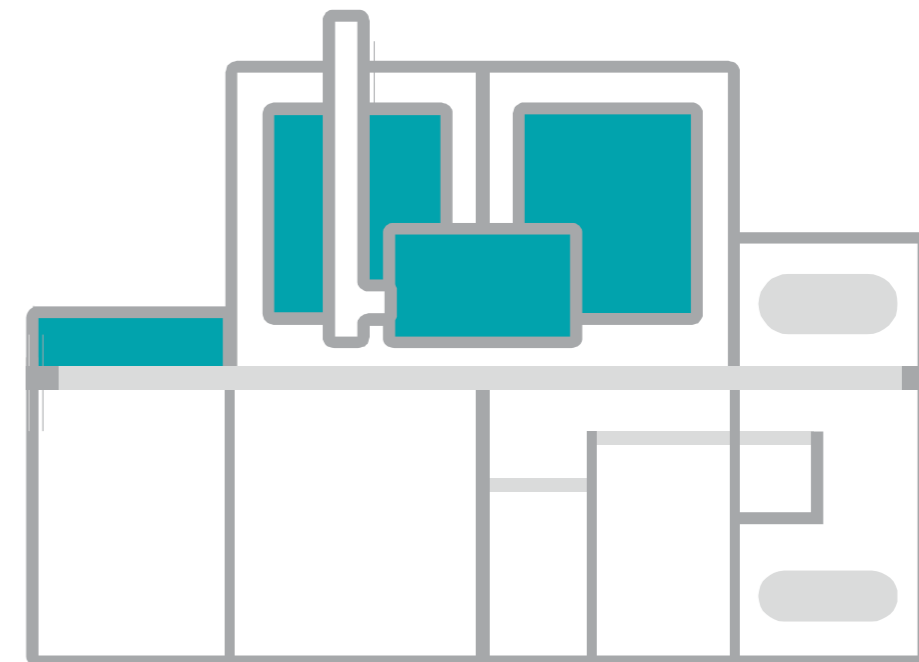
### prim. doc. RNDr. Lenka Zdražilová Dubská, Ph.D.

Oddělení klinické mikrobiologie a imunologie, ÚLM, FN Brno; Farmakologický ústav, LF MU  
Kontakt: lzd@mail.muni.cz

Narodila se 24. února 1978 v Novém Městě na Moravě. Roku 2005 absolvovala doktorský studijní program Buněčná a molekulární biologie na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně. V roce 2006 úspěšně složila specializační zkoušku v oboru Laboratorní metody v klinické hematologii a r. 2008 státní rigorózní zkoušku z mikrobiologie. Následujícího roku pak specializační zkoušku z lékařské imunologie a v tomtéž oboru se r. 2017 habilitovala na LF MU v Brně. Od roku 2004 do roku 2020 působila na Oddělení laboratorní medicíny v Masarykově onkologickém ústavu. Od roku 2012 je vedoucí kontrolky kvality v Advanced Cell Immunotherapy Unit Farmakologického ústavu LF MU. V roce 2020 se stala primářkou Oddělení klinické mikrobiologie a imunologie Fakultní nemocnice Brno.

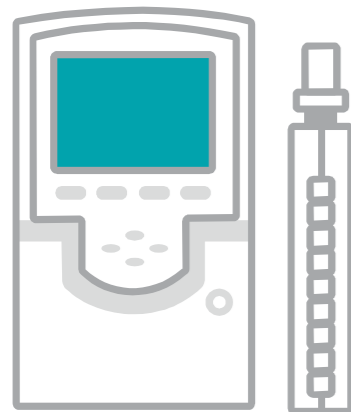
### LITERATURA

1. Fu Y, et al. *Ann Intern Med.* Published online December 8, 2020: M20-3337. doi:10.7326/M20-3337
2. Selingerova I, et al. *J Med Virol.* Published online November 2020: jmv.26612. doi:10.1002/jmv.26612
3. Zeng W, et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020; 527(3): 618-623. doi:10.1016/j.bbrc.2020.04.136
4. Samrat SK, Tharappel AM, Li Z, Li H. *Virus Res.* 2020; 288: 198141. doi:10.1016/j.virusres.2020.198141
5. Ranganathan S, Iyer RN. *Indian J Med Microbiol.* 2020; 38(3-4): 252-260. doi:10.4103/ijmm.IJMM\_20\_358
6. Česká společnost anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny, Společnost pro transfuzní lékařství, Společnost infekčního lékařství, Česká pneumologická a fizeologická společnost, Klinická skupina COVID MZ. Doporučený postup pro použití rekonvalescentní plazmy v léčbě dospělých pacientů s COVID-19. Verze 2. Published online 2020.
7. Brussels European Commission, Directorate-General for Health and Food Safety. *An EU programme of COVID-19 convalescent plasma collection and transfusion Guidance on collection, testing, processing, storage, distribution and monitored use. Version 2.* Published online 2020.
8. Brussels European Commission, Directorate-General for Health and Food Safety. *An EU programme of COVID-19 convalescent plasma collection and transfusion Guidance on collection, testing, processing, storage, distribution and monitored use. Version 3.* Published online 2020.
9. Chen L, Xiong J, Bao L, Shi Y. *Lancet Infect Dis.* 2020; 20(4): 398-400. doi:10.1016/S1473-3099(20)30141-9
10. Duan K, Liu B, Li C, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020; 117(17): 9490-9496. doi:10.1073/pnas.2004168117
11. Kohmer N, et al. *J Clin Virol.* 2020; 129: 104480. doi:10.1016/j.jcv.2020.104480
12. Mueller L, Ostermann PN, Walker A, et al. Published online June 14, 2020: 2020.06.11.20128686. doi:10.1101/2020.06.11.20128686
13. Luchsinger LL, Ransegnola BP, Jin DK, et al. *J Clin Microbiol.* 2020; 58(12). doi:10.1128/JCM.02005-20





Test cobas® SARS-CoV-2 & Influenza A/B na systému cobas® Liat®



- Jistota správné diagnózy**  
Přesná PCR laboratorní diagnostika provedená v místě péče o pacienta<sup>2</sup>
- Test na více virů s překrývajícími se příznaky**  
Jeden vzorek, jeden snadno proveditelný test s výsledkem pro chřipku A, chřipku B a RSV
- Maximální bezpečnost pro pacienty i poskytovatele zdravotní péče**  
Žádná křížová kontaminace a expozice patogenům během přípravy vzorku<sup>3</sup>

Mají Vaši pacienti chřipku nebo RSV?

Díky přesným a použitelným výsledkům můžete určit vhodnou léčbu – bez čekání na potvrzení.

Vzhledem k překrývání příznaků s COVID-19,<sup>1</sup> poskytují včasné výsledky testu cobas® Influenza A/B & RSV důležité informace, které pomohou vést klinická rozhodnutí v místě péče o pacienta. Test nevykazuje zkříženou reakci *in silico* s COVID-19 a díky uzavřenému systému můžete ochránit své zaměstnance před rizikem zbytečné expozice.

INFLUENZA A/B	RSV	COVID-19
Horečka*	Horečka	Horečka
Kašel	Kašel	Kašel
Bolest hlavy	Sípání	Obtížné dýchání
Bolesti svalů a těla		Bolesti**
Bolest krku		Bolest krku**
Rýma a ucpaný nos	Rýma a ucpaný nos	Rýma a ucpaný nos**
Únava		Únava
Pokles chuti k jídlu	Pokles chuti k jídlu	Ztráta chuti a čichu
Průjem / zvracení**		Průjem**

\* Nemocný chřipkou nemusí mít horečku, \*\* Méně časté příznaky

▲ Porovnání příznaků.<sup>1</sup> Poznámka: U některých lidí s koronavirem se nevyvíjejí žádné příznaky COVID-19

Dne 14. 9. 2020 udělil FDA povolení pro nouzové použití a rychlou detekci testu **cobas® SARS-CoV-2 & Influenza A/B** na systému **cobas® Liat®** od společnosti Roche. Test založený na RT-PCR je navržen tak, aby současně detekoval a rozlišoval SARS-CoV-2, chřipku A a chřipku B u nazofaryngeálních, nosních nebo nazálních výtěrů. Test probíhá na stolním systému **cobas® Liat®** společnosti Roche a poskytuje výsledky pro jednotlivé vzorky do 20 minut buď v místě akutní péče, nebo v klinické laboratoři – dle určení zdravotnického zařízení.



LITERATURA

- <https://www.cdc.gov/>
- Gibson J, Schechter-Perkins EM, Mitchell P, et al. Multi-center evaluation of the cobas® Liat® Influenza A/B & RSV assay for rapid point of care diagnosis. *J Clin Virol.* 2017 Oct; 95:5-9. doi:org/10.1016/j.jcv.2017.08.004.
- Phillips JE, McCune S, Fantz CR, Engstrom-Melnyk J, Osiecki JC. Assay Integrity of a PCR Influenza Point-of-Care Test Remains Following Artificial System Contamination. *J Appl Lab Med.* 2019 Nov;4(3):422-426. doi:10.1373/jalm.2018.028639.

Strategické konzultace

Ing. VLADIMÍR KOZÁK  
ROCHE s.r.o., Diagnostics Division

Často se setkáváme s dotazem, proč my, společnost Roche, začínáme s konzultačními službami. Pravdou je, že máme dlouholeté zkušenosti s návrhem laboratoří, jejich provozem (tzv. workflow), IT podporou a s dalšími technickými procesy. Nicméně časy se mění, vývoj jde neustále kupředu, stejně jako se zvyšují požadavky od vás, našich zákazníků. Na základě požadavků vedoucích laboratoří a managementu zdravotnických zařízení jsme zaznamenali poptávku po jiných, odlišných konzultačních službách. Službách, které jsou s laboratoří spojeny nepřímo, přes změny, které probíhají v nadřazeném podniku, organizaci, nemocnici nebo i celém zdravotním systému. Dostáváme se tedy k práci s lidmi, k zavádění a řízení změn, řešení problémů, vizím, plánování a k tomu nejdůležitějšímu – k budování kultury neustálého zlepšování. Všechny tyto oblasti spadají pod tzv. strategické konzultace.

procesů vyhodnocování a možných korekcí.

Konkrétně se jedná o podporu při přípravách plánů na další roky, řešení problémů v oblasti kvality, personálu a samozřejmě pacientů, tedy tam, kde se bavíme o růstu jak ekonomickém či technologickém, tak o růstu celé dotčené organizace.

Zaměřujeme se rovněž na zavádění nových léčebných postupů, odstraňování překážek při poskytování péče, s našimi klienty analyzujeme stávající postupy a procesy, společně definujeme, jaké změny je potřeba uskutečnit. Zde naše práce na rozdíl od jiných nekončí, my zůstáváme s klienty i během krušných chvil při vlastní implementaci změn a v případě potřeby i během následných

Zadání a dotazy, se kterými se setkáváme:

- Jak ušetřit náklady a zároveň zachovat kvalitu služeb a péče?
- Lze některé procesy zrychlit a o to více se věnovat rozvoji firmy, výzkumu?
- Odborný personál je na pokraji vyhoření, proč? A jak to napravit?
- Jak naplánovat činnost naší organizace, podniku, oddělení, když nejsme jednotní ani na úrovni vedení?
- Které projekty máme spustit, jak, kdy, a vyplatí se to?

Většina zdravotnických zařízení a laboratoří se snaží o zlepšení, bohužel tyto otázky jsou v praxi těžko řešitelné. Podniky

**250 odborných konzultantů**

- Certifikovaní lean konzultanti
- Zaměření na strategii a rozvoj
- Change management a partnerství
- Multifunkční týmy odborníků na: management zdravotnických zařízení, laboratoř, zdravotnictví, digitalizaci, IT, lékařské obory
- Analýza a zpracování dat ve zdravotnictví



V

**Vyplatí se změna?**

Vyhodnocení příležitostí ke změně.  
Odhad přínosů.



Č

**Čím si zajistíme podporu napříč organizací?**

Vytyčení směrů a nastavení cílů zlepšení.  
Seznámení všech zainteresovaných stran se strategií.



A

**Akční plán a jeho sestavení**

Vytvoření atmosféry změn a vylepšení.  
Návratnost investice jako základ.



S

**S lidmi se musí mluvit!**

Dejme plánům reálnou podobu.  
Plníme plán aneb věřit či měřit?



a zdravotnická zařízení, které úspěšné jsou, mají propracovaný systém řešení problémů, podporují spolupráci při jejich řešení, výstižně a srozumitelně zaznamenávají svá rozhodnutí, plány, výsledky a vše poté sdílejí napříč organizací.

**Z našich pozorování plyne, že nejčastějšími problémy, které naši partneři řeší, jsou:**

- Chybí srozumitelně definované cíle rozvoje, sdílené napříč organizací.
- Lidé a skupiny se zaměřují na vlastní cíle a zájmy.
- Metodika pro řešení problémů je nedostatečná.
- Neřeší se pravé příčiny, „záplatují“ se syndromy, dochází k návratu problému.
- Problémy řeší vedení, ostatní nejsou zapojeni.
- Schází motivace ke zlepšování.

- Na standardy a metodiky se nebere ohled.
- Tvořivé a úspěšné myšlení není podporováno.
- Úsilí vychází od několika jednotlivců, organizace jako celek se nemůže poučit.

Při hledání odpovědí na výše uvedené problémy je základem úzká spolupráce s klienty od počáteční analýzy současného stavu přes definici cílů, strategií, taktik až po vyhodnocování. Při konzultacích vedeme naše klienty formou strukturovaných diskusí, workshopů a školení k tomu, aby výsledkem byla týmová práce se zapojením zástupců všech zainteresovaných stran. Naši klienti jsou na velmi vysoké odborné úrovni a mají mnoholeté zkušenosti ve svém oboru. Naším úkolem jakožto strategických konzultantů je vytvořit takové podmínky, aby management týmy našly příslušná řešení a byly jednotné v tom, jak a čeho chtějí dosáhnout.

Jakmile je vaše strategie definována, jsme zde, abychom vytvořili plán změn a zapojili váš tým do přechodu na tyto změny. Nespolehneme se pouze na vybudování systému zlepšování, kde se můžeme zavázat, že investice do nás se vám vícenásobně vrátí. Podporujeme rovněž morálku a přístup, jež jsou nezbytné pro zachování dosažených změn a budoucích vylepšení.

**Co najdete v našem základním programu zlepšování?**

- Design strategií a vizí s důrazem na opravdová vylepšení.
- Tvorba, nastartování a udržení nových procesů a služeb.
- Plánování projektů založených na metodice „lean“.
- Změna a její zvládnutí – „change management“.
- Personální coaching a mentoring vedoucích pracovníků.

Používáme vyzkoušený a strukturovaný přístup k neustálému zlepšování, prověřený desítkami let zkušeností napříč odbornostmi a odvětvími. Náš model je snadno pochopitelný, rozšiřitelný a přizpůsobitelný požadavkům vaší organizace, a co více, je také dostatečně výkonný, aby dosáhl požadovaného návratu investic. Poskytujeme naše služby po celém světě.

Těšíme se na spolupráci s vámi!

**Ing. Vladimír Kozák**

ROCHE s.r.o., Diagnostics Division  
Kontakt: vladimir.kozak@roche.com

Pro Roche pracuje od roku 2019 na pozici strategický konzultant, je členem vedení diagnostické divize. Během své kariéry se zabýval vývojem softwaru pro zdravotnické prostředky, rozvojem obchodu a svěřených týmů. Od mládí se věnuje celé paletě sportů, zejména atletice a basketbalu, objevil krásu ruční práce se dřevem a vyrábí své první elektrické kytary.



Nový vylepšený DiaLog portál nabízí vysoce intuitivní a uživatelsky přívětivé prostředí. S nonstop přístupem k personalizovaným informacím a podpoře vám tento digitální pracovní prostor umožní optimalizovat chod laboratoře.

**Novinky na portálu DiaLog**

Ing. Mgr. BARBORA MOTLOVÁ

ROCHE s.r.o., Diagnostics Division

**Intuitivnější než kdykoli předtím**

Každý nový rys DiaLogu je navržený tak, aby naplňoval vaše potřeby a poskytl vám lepší uživatelské zkušenosti:

- Rychlejší, jednodušší navigace
- Jednoduché přepínání mezi e-sluzbami
- Uživatelsky přívětivé rozhraní
- Vylepšené mobilní prostředí

**Vše, co potřebujete, na jednom místě**

Kolekce e-sluzeb portálu DiaLog poskytuje výkonná řešení pro všechny vaše potřeby, od rutinních provozních a administrativních úkolů až po neočekávané výzvy. Získejte cenné obchodní postřehy, zaškolte zaměstnance, řešte problémy

**Nový vzhled portálu obsahuje čtyři klíčové upgrady usnadňující orientaci:****Lepší vzhled a pocit**

Nové záhlaví pro lepší orientaci

**Tlačítko „Další informace“**

Podrobný popis všech dostupných e-sluzeb

**Nová navigační ikona**

Intuitivní navigace a jednoduché přepínání mezi službami

**Přizpůsobitelné zobrazení**

Upravte si zobrazení e-sluzeb do seznamu nebo mřížky

s nástroji a jiné, a to díky řešení digitální podpory vše v jednom.

Další e-sluzby pro vás chystáme v průběhu příštího roku. Zároveň se můžete těšit na průběžné vylepšování uživatelského rozhraní pomocí nových funkcí, které vám umožní další personalizaci portálu.





### Rychlejší servisní podpora s portálem DiaLog

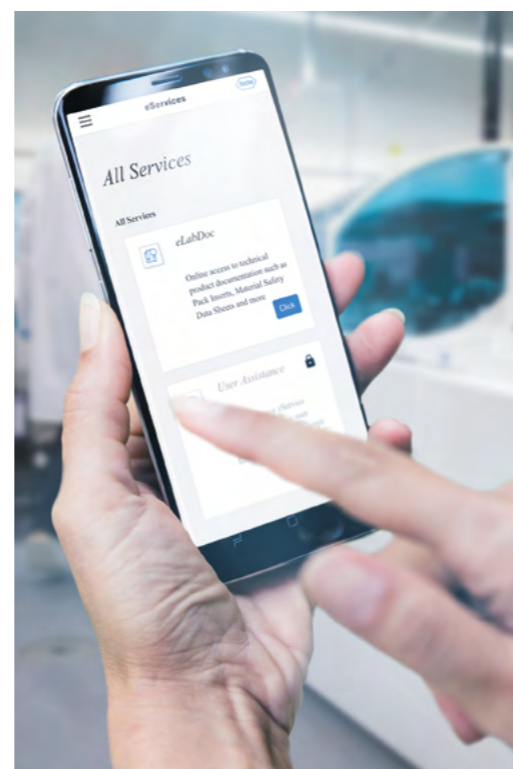
Jedna z hlavních služeb portálu DiaLog je **Požadavek podpory** – služba, která vám umožňuje kontaktovat specialisty Zákaznického centra. Díky ní můžete

Zákaznické centrum kontaktovat kdykoliv, a to i mimo jeho pracovní dobu. Požadavky můžete zadávat opravdu kdykoliv, specialisté Zákaznického centra je budou řešit v rámci pracovních hodin centra (každý všední den od 7:00 do 16:00). Požadavky vytvořené mimo pracovní dobu

jsou řešeny jako první následující pracovní den.

Hlavní výhodou využívání této služby je rychlejší přeměření vašeho požadavku na konkrétního specialistu, který se bude hned vaším problémem zabývat. Věříme, že díky tomu budeme schopni efektivněji spravovat a řešit vaše požadavky, což je pro vás i pro nás obzvláště důležité v současné náročné době.

**Roche DiaLog**



#### Nové e-sloužby

Kromě vylepšeného uživatelského prostředí DiaLog nabízí také dvě nové e-sloužby:



**Simulátor obsluhy přístroje** – simulátor nabízející přístup k velkému portfoliu přístrojů včetně různých softwarových a jazykových verzí. Pomůže vám osvojit si používání analyzátoru a jeho nejnovějšího softwaru. Díky této inovativní e-sloužbě minimalizujete čas tréninku na samotných analyzátořech a produktivita laboratoře tak zůstane využita na maximum.



**Labor Aktuell** – stránka s aktuálními i archivními články časopisu, možnost stáhnout si celý časopis a přihlásit se k jeho odběru.

#### Jak online Požadavek podpory pomáhá plynulosti provozu vaší laboratoře?



Požádejte o podporu kdykoli a na jakémkoli zařízení a využívejte flexibilní přístup k zákaznickému servisu. Není třeba telefon ani e-mail!



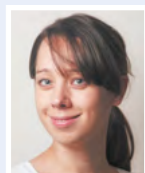
Online požadavky podpory jsou vyřizovány prioritně. Po zadání vašeho požadavku se vám ozve pracovník Zákaznického centra – a vy tak nebudete čekat na spojení.



Kdykoliv uvidíte aktuální stav všech svých požadavků.



Mějte přístup k historii všech zaznamenaných požadavků včetně souvisejících servisních aktivit a zpráv na jednom místě.



#### Ing. Mgr. Barbora Motlová

ROCHE s.r.o., Diagnostics Division  
Kontakt: barbora.motlova@roche.com

Od začátku roku 2018 pracuje na oddělení profesionálního servisu v Roche, kde má na starosti podporu servisních techniků a kontrolu dat v CRM. Kromě toho se věnuje správě uživatelů a obsahu portálu DiaLog a testuje jeho nové e-sloužby.

Říjen je měsíc, během kterého se patientské organizace, lékaři a odborné společnosti věnují osvětě o prevenci karcinomu prsu. I v Roche jsme podpořili během tzv. růžového října ženy nejen v prevenci, ale zveřejňujeme i inspirativní příběhy pro všechny, kdo touto těžkou nemocí procházejí. Představíme vám příběh armádní psycholožky Zuzky Nemčikové a také nový díl komiksu, který dětem vysvětluje, co je to rakovina prsu. Za pozornost stojí rovněž dvě nové terapeutické oblasti na portále MojeMedicina.cz: idiopatické střevní záněty a karcinom jater.

## Karcinom prsu, idiopatické střevní záněty a karcinom jater. Jak je odhalit a vyrovnat se s nimi?

Mgr. VERONIKA BAČOVÁ

ROCHE s.r.o., Pharma Division

*Závět se nepíše proto, abyste mohl umřít, ale proto, abyste mohl krásně žít. Příběh Zuzky*

„Rakovinu prsu jsem měla už třikrát. Já jsem nepředpokládala, že se rakovina vrátí. A druhé zjištění, že v těle je opět zhoubný a rychle rostoucí nádor, bylo pro mne

Zuzka Nemčiková působila jako armádní psycholožka a podílela se na přípravách vojáků na zahraniční operace. Věnuje se tématům v oblasti zvládání těžkých životních situací, práce se stresem, mezilidských vztahů a řešení životních ztrát. Napsala knihu o svém životním příběhu a vyrovnávání se s rakovinou. Kniha

Podívejte se na dvoudílný videopříběh této výjimečné ženy o vyrovnávání se s těžkou nemocí. Obě videa a mnoho dalších informací a příběhů žen s karcinomem prsu najdete na stránce [www.jetoo prsa.cz](http://www.jetoo prsa.cz).



asi největší ránu, jakou jsem kdy zažila. Vloni mi byly zjištěny metastázy v břišní dutině,“ popisuje Zuzka Nemčiková, která se opakovaně potýká s karcinomem prsu.

může pomoci všem, kdo se potýkají s těžkým osudem.

**Medikomiks pomáhá dítěti pochopit, že není jeho vina, že maminka onemocněla...**

„Co se děje s maminkou? Zlobí se na mě? Uklidil jsem si celý pokojík,“ láme si hlavu malý Lukáš. „Víš, maminka je teď víc unavená, protože je nemocná. S touhle nemocí, která se jmenuje rakovina, si tělo samo neporadí, a tak mamince pomůžou zkušení lékaři,“ vysvětluje mu tatínek.

Karcinomem prsu často trpí mámy, manželky nebo babičky. Nemoc se pak

V článku naleznete několik QR kódů, které vás zavedou přímo na danou stránku na portále MojeMedicina.cz. Stačí, když na svém chytrém telefonu otevřete aplikaci fotoaparát a zaměříte objektiv na QR kód. Aplikace kód přečte a otevře danou internetovou stránku.

týká celé jejich rodiny. A nejtěžší může být vysvětlit situaci malým dětem. Proto vznikl po kreslených příbězích o hemofilii a lymfomu ve spolupráci s lékaři,



pacienty a jejich rodinnými příslušníky nový díl Medikomiksu o karcinomu prsu. Všichni autoři do něj vložili své praktické zkušenosti a příběh odráží skutečné dění v české rodině.

Hlavními postavami příběhu jsou Lukášek, jeho rodiče a babička. Jeho mamince právě diagnostikovali rakovinu prsu. Medikomiks realisticky popisuje, čím prochází maminka, táta, a především malý Lukášek, který o nemoci neví vůbec nic. Superhrdinové Miki a Roni mu ukážou a vysvětlí, jak probíhá boj zlých nádorových buněk a těch hodných, které



▲ Zuzka Nemčiková



naše tělo ochraňují nejen před rakovinou. Příběh má šťastný konec. Dítěti i dospělým pomůže pochopit podstatu nemoci a dodá naději, že rakovinu lze porazit.

Prolistujte si  
Medikomiks online na  
[www.medikomiks.cz](http://www.medikomiks.cz)



### Pomáháme bourat tabu o idiopatických střevních zánětech

Tereze Nagyové v osmnácti letech lékaři diagnostikovali Crohnovu chorobu. Pár let nato jí odebrali celé tlusté střevo a vytvořili umělý vývod. Postupně začala otevřeně mluvit o životě se stomií. Odkrývá toto tabu a pomáhá mnoha lidem přijmout vlastní tělo a žít spokojenější život.

Crohova choroba patří spolu s ulcerózní kolitidou do skupiny idiopatických střevních zánětů. Jde o chronické autoimunitní nemoci, které postihují zažívací trakt. Pro mnoho pacientů je obtížné zvládat každodenní činnosti.

Podívejte se na příběh Terezy a seznamte se s těmito diagnózami. Pokud vás čeká vyšetření trávicího ústrojí, jistě oceníte podrobná videa, jak probíhá rektoskopie, kolonoskopie, kapslová endoskopie nebo gastrokopie. To vše naleznete na portále **MojeMedicina.cz**.



▲ Tereza Nagyová

K příznakům totiž patří vyčerpanost, křeče v břiše a časté průjemy (až 20krát denně). Tato onemocnění mají velmi negativní vliv na jejich soukromý i pracovní život.

### Jak odhalit včas hepatocelulární karcinom

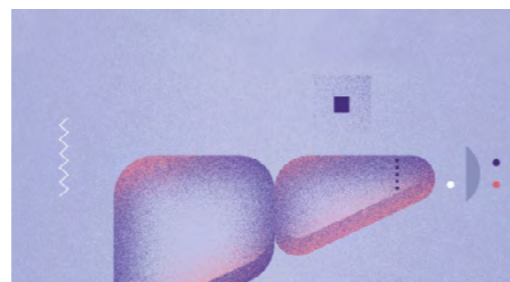
Hepatocelulární karcinom je zhoubné onemocnění jater, jehož výskyt každý rok stoupá. Ohroženi jsou lidé s chronickým onemocněním jater, zejména jaterní cirhózou a chronickou hepatitidou B a C. K příznakům patří bolest břicha, modřiny a krvácení, zvětšené břicho, nevysvětlitelná ztráta hmotnosti a žloutenka.

Hepatocelulární karcinom je možné zjistit pomocí vyšetřovacích a zobrazovacích

Pokud se chcete dozvědět více o této diagnóze, klikněte na [www.viditeskrz.cz](http://www.viditeskrz.cz).



metod, jakými jsou vyšetření nádorových markerů z krve, rentgenové vyšetření hrudníku, ultrazvukové sonografické vyšetření jater, CT vyšetření břicha, magnetická rezonance, angiografické vyšetření jater.



## Kyneme... zdravěji trochu jinak

Ing. KATEŘINA MÁLKOVÁ  
ROCHE s.r.o., Diagnostics Division

Letos jsem zcela propadla kvásku. Chvilí trvalo, než se mi povedlo vypěstovat si svůj vlastní žitný kvásek z fermentované ovocné

Kváskové celozrnné langošě  
[superkvasaci.cz](http://superkvasaci.cz)



vody. Byl pro mě velký zážitek, že zkvašené ovoce může posloužit nejenom jako starter kvásku, ale podobně jako droždí přímo k vývinu krásného kynutého pečiva. První chleba, který jsem pekla z této „voňavé“



si, si nesl vůni meruněk a byl to balon – po rozkrojení jako ementál, vláčný s obrovskými oky a bez droždového aroma. Od té doby jsem ztracená, pečení s kváskem je silně návykové. Jaký je vlastně rozdíl v pečení s droždím a s kváskem? Asi podobný,

Cookies ovsenno-kokosové s lievito madre  
[zuzana.dolinka.sk](http://zuzana.dolinka.sk)



jako když máte doma kočku, anebo celé hospodářství. Mikroflóra kvásků, kterých je navíc nemálo, je velice různá, ale vždy se jedná o symbiózu kvasinek a bakterií mléčného kvašení. Směsná kultura nejen navzájem podporuje svou komunitu, ale zlepšuje

vlastnosti pečiva, a co je také důležité, nám konzumentům přispívá ke kvalitní střevní mikroflóře. Ta má, jak se dnes již ví, dopad na téměř vše – dokonce i psychiku a chování. Kdybych to vzala velkou zkratkou, řekla bych, že jsem pod vlivem a sama se stávám svým kváskem. O kvásek se sice na rozdíl od sušeného droždí musíte starat, ale není to žádné drama – na procházky nemusí, jen krmit a krmit. Vedlejším produktem péče je další a další kvásek, ale toho se také

Kvasové vafle  
[maskrtnica.cz](http://maskrtnica.cz)



nemusíte obávat – receptů na všemožné pečivo od krekrů (úžasné) přes lívance až po rohlíky je na internetu obrovské množství, mouka nestojí svět, a to ani v kvalitě bio, a její hnětení (v mém případě většinou strojové) dost osvobozuje od stresu a tenze.



A tak se už vezu na vlně a postupně se zbavuji předsudků, například chleba dávám do pekáče a do studené – opravdu, není to chyba – studené trouby. Krásně dokyne! Považuji práci s kynutým těstem, které je skutečně živé a někdy i vrtošivé, za formu arteterapie, je to přiměřeně jednoduché a nesmírně uspokojivé. Moji bližní jsou



za domácí pečivo všeho druhu rádi. A považte, kvásků je více! V mé lednici se našlo zabydlela lievito madre, „kvásková

Kváskový trdelník  
[mykitchendiary.sk](http://mykitchendiary.sk)



máma“, což je zvláštní varianta s českým označením tuhý kvásek. Ten nemusíte krmit tolik jako žitnou nenasytu a chuť pečiva je o poznání jiná – nemá kyselost, která se u sladkého pečiva moc nehodí. A pokud se vám chce dobrodružství jen otestovat, pak si od místního pekaře zkuste kvásek koupit.

Lievito madre – kvásková máma  
[vune-chleba.cz](http://vune-chleba.cz)



Existuje i kvásková mapa, něco jako občanská kvásková výpomoc. A nyní k receptům. Jsou převzaté a jsou k nim mnohdy i krásné další příběhy autorů, o které vás nechci ochudit, proto sdílím rovnou odkazy na recepty a věřím, že naleznete i mnohou další inspiraci. Recepty to nejsou ledajaké,

Makové „Telky“ kváskové  
[pekarnomanie.cz](http://pekarnomanie.cz)



zvolila jsem tzv. prasárny, jídla, která máme zažitá jako nejhoršího zrna junk food. Ale nemusí to tak být. Přesvědčte se sami! Hodně zdraví do nového roku.



Mgr. Veronika Bačová

ROCHE s.r.o., Pharma Division

Kontakt: [veronika.bacova@roche.com](mailto:veronika.bacova@roche.com)

V Roche má na starosti vše, co se týká digitální komunikace směrem k veřejnosti. Především vytváření obsahu a správu webových stránek [mojemedicina.cz](http://mojemedicina.cz) a [roche.cz](http://roche.cz). Spravuje také Facebook a Twitter MojeMedicina a YouTube kanál společnosti. MojeMedicina.cz a sociální sítě podávají interaktivní a srozumitelnou formou informace o diagnózách, vyšetřeních a typech léčby. Roche tak pomáhá lidem lépe se připravit na vyšetření, porozumět své nemoci anebo se dozvědět o nových způsobech léčby.



Ing. Kateřina Málková

ROCHE s.r.o., Diagnostics Division

Kontakt: [katerina.malkova@roche.com](mailto:katerina.malkova@roche.com)

Pracuje v diagnostické divizi Roche od roku 2003 a věnuje se marketingové komunikaci. Od začátku roku 2018 je šéfredaktorkou časopisu Labor Aktuell. Velice ráda vaří a experimentuje v kuchyni.





Roche s.r.o., Diagnostics Division  
Na Valentince 3336/4, 150 00 Praha 5  
[www.roche-diagnostics.cz](http://www.roche-diagnostics.cz), [www.labor-aktuell.cz](http://www.labor-aktuell.cz)  
Redakce: [Czech.labor\\_aktuell@roche.com](mailto:Czech.labor_aktuell@roche.com)



Vychází čtvrtletně, uzávěrka tohoto čísla: 6. 12. 2020. Časopis je možné bezplatně objednat na adrese vydavatele či zasílání zrušit na webu časopisu: [www.labor-aktuell.cz](http://www.labor-aktuell.cz). Stanoviska a názory podepsaných příspěvků se nemusí shodovat se stanovisky a názory redakce a vydavatele.

Copyright © Roche 2020. Registrace MK ČR 7374, ISSN 1214-7672.

Foto na obálce: Molekuly glukózy a inzulínu v krvi, 3d obrázek, autor nobeastsofierce. Doplněno ilustrací ženy, která drží a jí sladké koblihy v detailním portrétu, autor Luckyrizki. Obojí Shutterstock.

MC-CZ-00336

