

Editoriál

Milé kolegyně a kolegovia,

keď som pred dvadsiatimi ôsmymi rokmi prišiel na prijímacie skúšky na vysokú školu, zažil som zaujímavú príhodu. Vošiel som do miestnosti a skúšajúci pedagóg sa ma pokojne a s úsmevom opýtal: „Kolega, máte strach?“. V zlomku sekundy som pochopil, že táto otázka nemá z môjho pohľadu prijateľnú odpoveď. Ak by som odpovedal, že strach mám, tak by som síce neklamal, ale precítil a priznal by som svoju vlastnú slabosť. To ľudia robia neradi. Mohol som odpovedať aj tak, že strach nemám a situácia by bola ešte horšia. Stačil totiž iba letný pohľad na premotivovaného chvejúceho sa mladíka, aby bolo jasné, že opak je pravdou. Už-už sa zdalo, že neodpoviem nič, no odrazu som odpovedal tak, ako mi našepkalo podvedomie: „Mám veľký pocit zodpovednosti“. Cítil som, že po tejto odpovedi bol úsmev docenta iný, pretože takú odpoveď asi nečakal ani on. Problém celej situácie totiž spočíval v predmete vety. Predmetom bolo slovo „strach“. Moje podvedomie sa však zameralo na sloveso, ktorým bolo v danej opytovacej vete slovko „máte“. A dať správnu odpoveď na správne pochopenú otázku už nebol problém.

Začína nový akademický rok 2018/2019. Do prvých ročníkov nastúpili študenti, ktorí taktiež prešli prijímacími skúškami alebo prijímacím konaním. Úlohou nás, pedagógov, je naučiť aj túto generáciu mladých ľudí nielen spracovávať informácie a dáta, ale predovšetkým správne klásť otázky a snažiť sa nájsť na otázky správne odpovede. V súčasnosti sú všetky štatistické výpočty vykonávané s pomocou počítačových procesorov alebo internetových on-line aplikácií. Je však oblasť, ktorú sa pravdepodobne v dohľadnej dobe nepodarí nahradiť počítačmi a umelou inteligenciou, a to je kritické myslenie. Ak sa ľudia naučia správne chápať zmysel a účel otázok, nájdu pomyselnú páku, ktorou dokážu pohnúť vesmírom.

Prajem všetkým študentom, kolegyniam a kolegom úspešný nový akademický rok 2018/2019.

RNDr. Vladimír Meluš, PhD., MPH

CANDIDA AURIS – CELOSVETOVÁ HROZBA PRE NEMOCNICE A JEJ PACIENTOV CANDIDA AURIS - A WORLDWIDE THREAT TO HOSPITALS AND PATIENTS

ŠTEFKOVIČOVÁ Mária^{1,2}, KAŠLÍKOVÁ Katarína¹, LITVOVÁ Slávka², MATIŠÁKOVÁ Iveta¹,
RECHTORÍK Filip¹, MELUŠ Vladimír¹, KOPILEC GARABAŠOVÁ Mária²

¹Fakulta zdravotníctva, Trenčianska univerzita Alexandra Dubčeka v Trenčíne, Trenčín

²Regionálny úrad verejného zdravotníctva so sídlom v Trenčíne, Trenčín

ABSTRAKT

Candida auris predstavuje pre pacientov v zdravotníckych zariadeniach v celej Európe vážnu hrozbu. K jej charakteristickým vlastnostiam patrí: významná multirezistencia voči antimykotikám, náročnosť laboratórnej diagnostiky a hlavne schopnosť vyvolávať ťažko-kontrolovateľné nozokomiálne epidémie klinicky významných infekcií ako sú fungémie. *C. auris* bola prvýkrát izolovaná v roku 2009 z ušného kanála 70-ročnej japonskej ženy v metropolitnej geriatrickej nemocnici v Tokiu. Počas niekoľkých rokov sa zaradila medzi epidemiologicky významné nemocničné patogény. Postupne bol hlásený výskyt v krajinách na piatich kontinentoch. V štátoch EÚ a EFSA sa od roku 2013, kedy boli zaznamenané prvé 3 prípady, zvýšil počet hlásených prípadov do roku 2017 na 620. Na Slovensku vyvstáva urgentná potreba zvýšiť povedomie zdravotníkov a laikov o *C. auris*, zaviesť laboratórnu diagnostiku uvedeného patogéna a v prípade importu urýchlene prijať protiepidemické opatrenia.

Kľúčové slová: *Candida auris*. Patogenita. Multirezistencia. Nozokomiálny prenos. Surveillance. Laboratórna diagnostika. Pripravenosť

ABSTRACT

Candida auris presents a serious threat to patients in healthcare facilities across Europe. Its characteristic features include: significant multi-resistance to antimycotics, exigent laboratory diagnostics and especially the ability to induce difficult controllable nosocomial epidemics of clinically significant infections such as fungal infections. *C. auris* was first isolated in 2009 from the ear canal of a 70-year-old Japanese woman at the metropolitan geriatric hospital in Tokyo. Over the years, it became one of epidemiologically important hospital pathogens. There has been successively reported a progressive occurrence in the five continents. In the EU and EFSA, since 2013, when the first 3 cases were recorded, the number of reported cases increased to 620 until 2017. In Slovakia, there is an urgent need to raise the awareness of health professionals and laity about *C. auris*, to introduce a laboratory diagnostics of this pathogen and, in the case of import, to take urgent anti-epidemic measures.

Key words: *Candida auris*. Pathogenicity. Multiresistance. Nosocomial transmission. Surveillance. Laboratory diagnostics. Readiness

ÚVOD

Invazívna kandidóza je najčastejšou mykózou u hospitalizovaných pacientov [1,2]. *Candida* spp.

bola v bodovom prevalenčnom sledovaní nozokomiálnych nákaz v európskych nemocniciach (2011-2012) piaty najčastejší patogén vyvolávajúci infekcie krvného riečiska. Tvoril 7,4 % všetkých zdokumentovaných prípadov [3]. Zatiaľ čo *C. albicans* zostáva prevládajúcou príčinou invazívnej kandidózy, v posledných rokoch došlo k posunu smerom k zvyšujúcemu sa podielu non-albicans *Candida* species, ako je *C. glabrata* [2,4]. V SR, ktoré sa tiež zapojilo do bodového prevalenčného sledovania, bola *Candida* spp. pôvodcom nozokomiálnych infekcií v roku 2012 v 7,3 % a v roku 2017 v 4,9 % [5].

Candida auris je nový druh epidemiologicky významnej kvasinky, ktorá bola prvýkrát popísaná v roku 2009 po izolácii z ušného kanála japonského pacienta [6] a následne boli popísané prípady invazívnych nemocničných infekcií a epidémií. Prípady *C. auris* boli hlásené z niekoľkých krajín na rôznych kontinentoch, ako Južná Kórea, Južná Afrika, India, Pakistan, Kuvajt, Kolumbia, Venezuela, Izrael, Omán, Keňa, Spojené kráľovstvo, Španielsko, Nemecko, Francúzsko, Rakúsko, Nórsko, Kanada, USA, Brazília [1,7].

Infekcie *C. auris* zahŕňajú infekcie krvného riečiska, infekcie rany a infekcie uší. Väčšina publikovaných prípadov boli infekcie krvného riečiska. Izolácie *C. auris* z moču, boli považované skôr za kolonizáciu močového traktu bez prejavom infekcie [1,6,7].

Non-albicans *Candida* spp. sa objavila v nemocniciach na celom svete. Pravdepodobne to súvisí s profylaktickým používaním antimykotík u vysokorizikových pacientov [8,9]. *C. auris* sa pre schopnosť prenosu medzi pacientami a pre sklon vytvárať nemocničné epidémie javí ako jedinečný nemocničný patogén. Bolo publikovaných množstvo nemocničných epidémií a tiež niekoľko molekulárnych štúdií potvrdzujúcich prenos *C. auris* nielen vrámci jednej nemocnice, ale aj medzi viacerými nemocnicami [10,11,12].

Verejnozdravotný význam *Candida auris*

Candida auris je novo objavená patogénna kvasinka, vyvolávajúca invazívne infekcie vrátane kandidémii v nemocniciach na celom svete. V Európe sa prvé prípady zaznamenali v Spojenom kráľovstve a Španielsku. Šírenie infekcií bolo ťažko ovplyvniteľné napriek sprísneným protiepidemiickým opatreniam.

C. auris spôsobuje invazívne infekcie u pacientov so závažnými základnými ochoreniami alebo imunosupresiou a väčšina izolátov *C. auris* je rezistentná na flukonazol. Bola popísaná rezistencia aj voči iným antifungálnym látkam a tiež multirezistencia voči všetkým trom hlavným skupinám antifungálnych látok. Na rozdiel od iných druhov kandid, *C. auris* má pravdepodobne vyššiu schopnosť šírenia z pacienta na pacienta, čo pravdepodobne súvisí s kontamináciou nemocničného prostredia, predmetov a zdravotníckych pomôcok alebo s prechodnou kolonizáciou osôb [7].

LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA

V kontexte klinickej a epidemiologickej závažnosti *C. auris* a nárastu kandidových infekcií rezistentných na antimykotiká je potrebné identifikovať izoláty non-albicans *Candida* spp. z invazívnych infekcií na úrovni druhov. *C. auris* nemožno identifikovať len na základe mikroskopie alebo raste na chromogénnych agaroch [12].

C. auris sa od iných druhov líši v schopnosti rastu pri 40-42 °C, čo sa využíva iba ako skríningový test za predpokladu ďalšej identifikácie vhodnými metódami. Na agarovom médiu CHROM-agar *Candida* vytvára *C. auris* kolónie bielej, svetlo ružovej až fialovej farby po 24-48 hodinovej kultivácii. Izoláty *C. auris* majú negatívne testy (Germ-tubes) na tvorbu zárodočných klíčkov. *C. auris* sa môže nesprávne identifikovať použitím tradičných fenotypových metód na identifikáciu kvasiniek, ako sú napr. VITEK 2 YST, API 20C, BD Phoenix kvasinkový identifikačný systém a MicroScan. V súvislosti s používaním niektorej z uvedených biochemických metód existujú vypracované materiály s možnými chybami pri diagnostike. Jednou z charakteristických vlastností *C. auris* je rezistencia na flukonazol, ktorá by mala byť súčasťou presnej identifikácie tohto druhu [7,12-15].

Správna identifikácia *C. auris* je možná s použitím metódy hmotnostnej spektrometrie s laserovou desorpciou a ionizáciou - MALDI-TOF. Metóda na rozlíšenie mikroorganizmov na úroveň rodu a druhu

využíva unikátne spektrum proteínového profilu. Spektrálny profil je jedinečný pre analyzované organizmy a pomocou nástroja na porovnávanie spektrálneho profilu s referenčnými databázami sa automaticky identifikuje presná fylogenetická klasifikácia organizmu.

Ak tieto testy nie sú k dispozícii, je potrebné non-albicans *Candida* spp. analyzovať na nadstavbovom pracovisku, najmä ak boli potvrdené biochemickými testami ako *Candida haemulonii*, *Candida famata*, *Candida sake*, *Rhodotorula* spp. alebo *Saccharomyces* spp. Toto je obzvlášť dôležité pre nemocnice s vyšším výskytom infekcií vyvolaných non-albicans *Candida* spp. alebo pre nemocnice, ktoré prijímajú pacientov preložených zo zahraničného zariadenia hlásiaceho ohnisko *C. auris* [14,16].

Alternatívnou metódou potvrdenia *C. auris* môže byť identifikácia uskutočnená sekvenovaním rôznych lokusov DNA v špecifických doménach ribozomálnych génov (18S rDNA, 28S rDNA alebo interné transkribované medzerníky *ITS1*, *ITS2*) [9,15]. Na rýchlu identifikáciu *C. auris* a blízkych príbuzných druhov bol vyvinutý PCR test, založený na analýze teploty topenia rDNA amplikónu [17]. Tento ako aj ďalšie rýchle testy na detekciu *Candida*, ktoré sú vo vývoji, čakajú na ďalšie klinické hodnotenie diagnostickej presnosti.

Sekvenovanie rDNA lokusov (*D1 / D2* alebo *ITS* oblastí) sa môže použiť na rozlíšenie medzi štyrmi hlavnými fylogeografickými vetvami tohto druhu. Ďalšie vymedzenie ohnísk miestnych nemocníc vyžaduje metódy s vyšším rozlíšením, vrátane vyšetrenia dĺžkového polymorfizmu amplifikovaných fragmentov (AFLP) a analýzy celkovej genómovej sekvencie [15].

V súčasnosti neexistujú žiadne stanovené hraničné hodnoty citlivosti na *C. auris*, preto sa pre interpretáciu testovania antifungálnej citlivosti používajú breakpointy príbuzných druhov *Candida* [1,7]. Metóda mikrodilúcie referenčného média EUCAST môže byť použitá a interpretovaná pomocou klinických breakpoints, ktoré nie sú spojené s druhom, kvôli náchylnosti na flukonazol [18]. Porovnanie metód mikrodilúcie baktérií EUCAST a CLSI vykazovalo veľmi podobné hodnoty MIC a odhadované epidemiologické medzné hodnoty pre množstvo antifungálnych látok proti zberu izolátov *C. auris* z Indie, čo potvrdilo rovnomernú rezistenciu na flukonazol [19].

Na základe stanovenia breakpointu MIC (minimálnej inhibičnej koncentrácie) sa zistilo, že niektoré izoláty *C. auris* z krajín mimo USA sú rezistentné voči všetkým trom triedam antifungálnych liekov a mnohé izoláty sú často rezistentné voči viacerým triedam liekov. V Spojených štátoch bolo približne 90 % izolátov *C. auris* rezistentných na flukonazol, 30 % bolo rezistentných voči amfotericínu B a 5 % bolo rezistentných na echinokandíny. Tieto pomery sa môžu meniť pri testovaní izolátov.

Aktívne sledovacie kultúry pre *C. auris* medzi kontaktnými pacientmi sú dôležitou súčasťou opatrení na kontrolu ohniska.

Prvé 3 prípady nozokomiálnej fungémie spôsobenej *C. auris* v roku 2011 v Južnej Kórey upozornili na skutočnosť, že tieto kvasinky sú bežne nesprávne identifikované ako *C. haemulonii* a *Rhodotorula glutinis* obchodnými identifikačnými systémami VITEK (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francúzsko) a API-20C AUX (BioMérieux) [4]. Tieto systémy zahŕňajú prefabrikované testy rastu pomocou súprav zlúčenín uhlíka a dusíka a sú stále široko používané na rutinnú identifikáciu kvasiniek.

Z niekoľkých nedávno publikovaných štúdií je zrejmé, že *C. auris* v rutinných mikrobiologických laboratóriách zostáva nezistiteľným patogénom, pretože 90 % izolátov charakterizovaných komerčnými biochemickými identifikačnými systémami je nesprávne identifikované hlavne kvôli nedostatku kvasiniek vo svojich databázach [1,7].

S cieľom umožniť laboratóriám overiť vlastné interné identifikačné systémy a umožniť obchodným spoločnostiam, aby ich dostali do svojich databáz, CDC nedávno zverejnila panel izolátov *C. auris* a blízkych príbuzných druhov prostredníctvom FDA / CDC AR Bank [24].

ANTIFUNGÁLNA REZISTENCIA

Veľká väčšina izolátov *C. auris* popísaných na celom svete bola rezistentná na flukonazol. Multirezistentné izoláty vykazovali rôzny pomer rezistencie na iné azoly, na amfotericín B, echinokandíny [1,7,19].

Nozokomiálne prípady a epidémie vyvolané *C. auris* v členských štátoch EÚ / EHP

V rokoch 2013-2017 zo šiestich krajín EÚ / EHP bolo hlásených 620 prípadov *Candida auris*. Počas tohto obdobia boli hlásené prípady zo Španielska (n=388), Spojené kráľovstvo (n=221), Nemecko (n=7), Francúzsko (n=2) [1]. Rakúsko zistilo jeden

prípady v januári 2018. Väčšina prípadov bola hlásená ako kolonizácia (n=466, 75,2 %), zatiaľ čo infekcia krvného riečiska alebo iný typ infekcie bol hlásený v 150 prípadoch (24,2 %). Väčšina prípadov bolo zaznamenaných v dvoch krajinách so štyrmi rozsiahlymi nozokomiálnymi ohniskami *C. auris*, v ktorých bolo postihnutých celkovo 573 pacientov. Počet prípadov v jednotlivých ohniskách sa pohyboval od 39 do 382. Prenos medzi nemocnicami bol zaznamenaný v štyroch epidemických ohniskách a jedno epidemické ohnisko trvalo takmer dva roky [1,7].

ODHAD RIZIKA VPLYVU NA ĽUDSKÉ ZDRAVIE

Klinicko-epidemiologická charakteristika infekcie vyvolanej *C. auris*

Nozokomiálne infekcie krvného riečiska vyvolané *C. auris* postihli pacientov s ťažkými základnými chorobami alebo imunosupresiami, ako sú diabetes mellitus, chronické ochorenie obličiek, infekcia HIV, solídne nádory a hematologické malignity [9,20]. Zaznamenané boli aj u novorodencov. Riziko akvirácie infekcie boli vystavení počas priebehu epidémií aj pacienti bez rizikových faktorov, avšak infekcia sa častejšie vyvinula u tých, ktorí podstúpili invazívne zákroky (zavedenie centrálného vaskulárneho katétra, močového katétra, chirurgický výkon), liečbu širokospektrálnymi antibiotikami, alebo boli prijatí na jednotku intenzívnej starostlivosti. Niektorí pacienti mali v anamnéze pred vznikom infekcie vyvolanej *C. auris* liečbu systémovými antimykotikami [8,9].

Obmedzené možnosti liečby

Flukonazol a echinokandíny sú antifungálne látky, ktoré sa najčastejšie používajú na liečbu kandidémie. Oba sú lepšie tolerované ako amfotericín B, ktorý sa menej používa pre riziko toxicity. Flukonazol sa na liečbu infekcie vyvolanej *C. auris* nepoužíva, pretože takmer všetky izoláty *C. auris* sú rezistentné voči flukonazolu. Rezistencia voči iným fungicídmi sa zdá byť viac premenlivá; ale boli popísané izoláty s rezistenciou na všetky tri hlavné triedy antifungálnych látok (azoly, echinokandíny a amfotericín B) [13]. Preto vznikajú vážne obavy nad dostupnosťou účinnej liečby u pacientov s invazívnymi infekciami vyvolanými *C. auris*.

Smrtnosť

V štúdiách sa hlásila smrtnosť na kandidémiu približne 30-40%, dokonca aj u pacientov, ktorí do-

stávali antifungálnu liečbu [2,21]. V experimentálnom modeli systémových infekcií u bezstavovcov bola patogenita kmeňou *C. auris* porovnateľná s patogenitoukmeňou *C. albicans* [22]. V súčasnosti sú obmedzené údaje o smrtnosti na infekciu krvného riečiska vyvolanú *C. auris* v dôsledku malého počtu pacientov zahrnutých do publikovaných prípadových štúdií alebo opisov epidémií. V štúdiu publikovanej v roku 2013 bola hlásená smrtnosť na infekcií krvného riečiska vyvolanú *C. auris* 33 % u všetkých pacientov a 57 % u podskupiny pacientov hospitalizovaných na jednotkách intenzívnej starostlivosti (JIS). Zvýšené hodnoty na JIS možno pripísať závažnosti základných ochorení pacientov [9]. Pri epidemickom výskyte v Spojenom kráľovstve nebola stanovená smrtnosť na infekcie vyvolané *C. auris* [11,15]. Všeobecne možno povedať, že vzhľadom na výskyt týchto infekcií u ťažko chorých pacientov s viacerými komorbiditami sa dá ťažko určiť kauzálny podiel infekcie a základného ochorenia na jednotlivých úmrtiach [15].

POTENCIÁL ŠÍRENIA

Ohniská a šírenie v zdravotníckych zariadeniach

Na základe molekulárnej typizácie bol dokázaný v jednej nemocnici v Indii prenos infekcie vyvolanej *C. auris* medzi nemocničnými oddeleniami, ktoré nemali spoločný zdravotnícky personál [9]. Prenos medzi nemocnicami bol popísaný v tej istej štúdiu a tiež vo všetkých štyroch ohniskách v nemocniciach EÚ / EHP [1]. Väčšina infekcií vyvolaných *C. auris* bola nozokomiálnych. Schopnosť prenosu infekcie vo vnútri nemocnice a medzi nemocnicami v kombinácii s rezistenciou voči viacerým antimykotikám naznačuje, že *C. auris* má typické vlastnosti nemocničného patogéna a možno očakávať ďalšie šírenie v zdravotníckych zariadeniach.

Ohniská spôsobené *C. auris* boli ťažko kontrolovateľné, vykazovali aktivitu dlhšie ako rok [10,11]. V okolí infikovaných alebo kolonizovaných pacientov s *C. auris* sa vyskytla rozsiahla kontaminácia prostredia, povrchov a prístrojov [11,20]. Nosiči kvasinky *C. auris* predstavujú dôležitý prameň nákazy. Bolo dokázané kontinuálne nosičstvo trvajúce až tri mesiace po prvotnej izolácii *C. auris* [20]. O dekolonizáciu sa pokúsili v jednom ohnisku, ale kolonizácia pretrvávala napriek každodennej celotelovej dekolonizácie a ústnej hygiene s chlórhexidínom [11]. V súčasnosti nie je dostatok vedeckých poznatkov o dekolonizačných postupoch a ich účinnosti na eradikáciu nosičstva *C. auris*. Nedostatočná

informovanosť o problematike v kombinácii s ťažkosťami s laboratórnou identifikáciou môže vyústiť do vypuknutia epidémie *C. auris* bez predchádzajúceho povšimnutia alebo jej zistenia až po rozšírení a vzniku závažných infekcií, či úmrtí. Preto je dôležité zvýšiť informovanosť klinických a laboratórných pracovníkov a zdravotnícky manažment o tejto vznikajúcej hrozbe a pripraviť sa na ňu [1]. Na Slovensku nemáme NRC pre laboratórnou diagnostiku kvasiniek. Prevažná väčšina laboratórií vykonávajúcich mikrobiologickú diagnostiku nie je schopná identifikovať *C. auris*. Prístroj na identifikáciu metódou MALDI-TOF má niekoľko veľkých mikrobiologických laboratórií. Identifikácia je možná za predpokladu, že *C. auris* je zahrnutá v databáze referenčného profilu [7]. V SR existuje Odborné usmernenie MZ SR pre diagnostiku a protiepidemické opatrenia pri výskyte bakteriálnych pôvodcov infekčných ochorení s klinicky a epidemiologicky významnými mechanizmami rezistencie, avšak kvasinky v ňom nie sú obsiahnuté.

Cezhraničný prenos

Z dôvodu ťažkostí s laboratórnou identifikáciou je málo známy výskyt *C. auris* v rôznych oblastiach sveta. Napriek tomu boli v piatich kontinentoch hlásené izoláty, ochorenia a epidemické výskyty *C. auris*: Európa, Ázia, Severná Amerika, Južná Amerika a Afrika. Nedávna štúdia ukázala, že izoláty *C. auris* prítomné vo Veľkej Británii majú niekoľko rôznorodých geografických pôvodov, čo naznačuje niekoľko zánosov do krajiny [23]. Podobne pomocou celogenómovej sekvenčnej analýzy (whole genome sequencing -WGS) všetkých klinických izolátov *C. auris* hlásených americkým centrom pre kontrolu a prevenciu chorôb (CDC) z rôznych nemocníc v Spojených štátoch bolo odhalené klonálne šírenie v rámci niekoľkých štátov USA. Podľa analýzy je možné predpokladať niekoľko zánosov *C. auris* do Spojených štátov, po ktorých nasledoval miestny prenos. Skúsenosti z USA naznačujú, že sa táto kvasinka môže rozšíriť v zdravotníckych zariadeniach a že protiepidemické opatrenia je potrebné prijať hneď na začiatku šírenia *C. auris*. Väčšina prípadov sa vyskytla u chronicky chorých pacientov s dlhodobým pobytom v zdravotníckych zariadeniach, ktorí vyžadovali intenzívnu starostlivosť (napr. zariadenia poskytujúce mechanickú ventiláciu). Rastúci počet sporadických prípadov hlásených v krajinách EÚ / EHP v roku 2018 v porovnaní s rokom 2016 potvrdzuje, že *C. auris* sa opakovane

dostáva do nemocníc v Európe, vždy s potenciálnym rizikom ďalšieho šírenia a vznikom epidémií medzi populáciami rizikových pacientov [1,7].

ZÁVER

C. auris, vzhľadom na tendenciu vyvolávať tiahle nozokomiálne epidémie a jej multirezistenciu na antifugálne látky, predstavuje riziko pre pacientov v európskych nemocniciach vrátane našich. Problémy s laboratórnou identifikáciou a nedostatočná informovanosť o tomto novom druhu kvasinky môžu mať za následok jej zános do nemocníc a vznik epidémie bez povšimnutia zdravotníkmi. *C. auris* sa rozšírila v priebehu niekoľkých rokov do piatich kontinentoch, kde vyvolala nozokomiálne infekcie a epidémie. Je potrebné zvýšiť informovanosť našich zdravotníckych zariadení s cieľom zaviesť adekvátne laboratórne vyšetrenia na ich identifikáciu, prijať účinné protiepidemické opatrenia dostatočne včas, aby sa zabránilo ďalšiemu šíreniu medzi oddeleniami nemocnice, ako aj šíreniu do iných nemocníc.

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

- [1] KOHLENBERG A., STRUELENS M.J., MONNET D.L., et al. The Candida Auris Survey Collaborative G. Candida auris: epidemiological situation, laboratory capacity and preparedness in European Union and European Economic Area countries, 2013 to 2017. *Euro Surveill.* 2018; 23 (13).
- [2] KULLBERG B.J., ARENDRUP M.C. Invasive Candidiasis. *N Engl J Med.* 2015; 373 (15): 1445-1456.
- [3] European Centre for Disease Prevention and Control. *Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals 2011-2012.* Stockholm: ECDC; 2013. Available from: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/publications/healthcare-associated-infections-antimicrobial-use-pps.pdf>.
- [4] PFALLER M.A., DIEKEMA D.J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 20 (1): 133-163.
- [5] LITVOVÁ S., ROVNÝ I., HUDEČKOVÁ H., et al. A point prevalence survey of healthcare-associated infections in the Slovak Republic - a part of the EU project. *Epidemiol Mikrobiol Immunol.* 2014; 63 (2): 107-112.
- [6] SATOH K., MAKIMURA K., HASUMI Y., et al. Candida auris sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiol Immunol.* 2009; 53 (1): 41-44.
- [7] European Centre for Disease Prevention and Control. *Candida auris in healthcare settings – Europe – first update, 23 April 2018.* Stockholm: ECDC; 2018
- [8] CHOWDHARY A., SHARMA C., DUGGAL S., et al. New clonal strain of Candida auris, Delhi, India. *Emerg Infect Dis.* 2013; 19 (10): 1670-1673.
- [9] CHOWDHARY A., VOSS A., MEIS J.F. Multidrug-resistant Candida auris: 'new kid on the block' in hospital-associated infections? *J Hosp Infect.* 2016; 94 (3): 209-212.
- [10] CALVO B., MELO A.S., PEROZO-MENA A., et al. First report of Candida auris in America: Clinical and microbiological aspects of 18 episodes of candidemia. *J Infect.* 2016; 73 (4): 369-374.
- [11] Schelenz S., Hagen F., Rhodes J.L., et al. First hospital outbreak of the globally emerging Candida auris in a European hospital. *Antimicrobial resistance and infection control.* 2016; 5: 35.
- [12] Public Health England. *Guidance for the laboratory investigation, management and infection prevention and control for cases of Candida auris (internet).* London: PHE; 2016. Available from: https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/534174/Guidance_Candida_auris.pdf.
- [13] Centers for Disease Control and Prevention. *Clinical alert to U.S. healthcare facilities: global emergence of invasive infections caused by the multidrug-resistant yeast Candida auris (Internet).* Atlanta: CDC; 2016. Available from: <http://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/candida-auris-alert.html>.
- [14] MIZUSAWA M., MILLER H., GREEN R., et al. Can Multidrug-Resistant Candida auris Be Reliably Identified in Clinical Microbiology Laboratories? *J Clin Microbiol.* 2017; 55 (2): 638-640.
- [15] JEFFERY-SMITH A., TAORI S.K., SCHELENZ S., et al. Candida auris: a Review of the Literature. *Clin Microbiol Rev.* 2018; 31 (1): pii: e00029-17.

- [16] KATHURIA S., SINGH P.K., SHARMA C., et al. Multidrug-Resistant *Candida auris* Misidentified as *Candida haemulonii*: Characterization by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry and DNA Sequencing and Its Antifungal Susceptibility Profile Variability by Vitek 2, CLSI Broth Microdilution, and Etest Method. *J Clin Microbiol.* 2015; 53 (6): 1823-1830.
- [17] KORDALEWSKA M., ZHAO Y., LOCKHART S.R., et al. Rapid and Accurate Molecular Identification of the Emerging Multidrug-Resistant Pathogen *Candida auris*. *J Clin Microbiol.* 2017; 55 (8): 2445-2452.
- [18] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Antifungal agents - breakpoint tables for interpretation of MICs: EUCAST; 2015.* Available from: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Clinical_breakpoints/Antifungal_breakpoints_v_8.0_November_2015.pdf.
- [19] ARENDRUP M.C., PRAKASH A., MELETIADIS J., et al. Comparison of EUCAST and CLSI Reference Microdilution MICs of Eight Antifungal Compounds for *Candida auris* and Associated Tentative Epidemiological Cutoff Values. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61 (6): pii: e00485-17.
- [20] VALLABHANENI S., KALLEN A., TSAY S., et al. Investigation of the First Seven Reported Cases of *Candida auris*, a Globally Emerging Invasive, Multidrug-Resistant Fungus - United States, May 2013-August 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2016; 65 (44): 1234-1237.
- [21] ANDES D.R., SAFDAR N., BADDLEY J.W., et al. Impact of treatment strategy on outcomes in patients with candidemia and other forms of invasive candidiasis: a patient-level quantitative review of randomized trials. *Clin Infect Dis.* 2012; 54 (8): 1110-1122.
- [22] BORMAN A.M., SZEKELY A., JOHNSON E.M. Comparative Pathogenicity of United Kingdom Isolates of the Emerging Pathogen *Candida auris* and Other Key Pathogenic *Candida* Species. *mSphere.* 2016;1(4): pii: e00189-16.
- [23] BORMAN A.M., SZEKELY A., JOHNSON E.M. Isolates of the emerging pathogen *Candida auris* present in the UK have several geographic origins. *Med Mycol.* 2017; 55 (5): 563-567.
- [24] LOCKHART S.R., BERKOW E.L., CHOW N., et al. *Candida auris* for the clinical microbiology laboratory: Not your grandfather's *Candida* species. *Clin Microbiol Newsl.* 2017; 39 (13): 99-103.

**NÁZORY OBYVATEĽOV MESTA MARTIN NA OČKOVANIE, VYKONÁVANÉ
V RÁMCI EURÓPSKEHO IMUNIZAČNÉHO TÝŽDŇA V ROKOCH 2010 AŽ 2016
OPINIONS OF THE RESIDENTS OF CITY OF MARTIN ON VACCINATION, CARRIED OUT
WITHIN THE EUROPEAN IMMUNIZATION WEEK IN YEARS 2010 TO 2016**

NOVÁK Martin, BAŠKA Tibor, MALOBICKÁ Eva, ŠVIHROVÁ Viera,
HUDEČKOVÁ Henrieta

Ústav verejného zdravotníctva JLF UK v Martine, Martin

ABSTRAKT

Počas Európskeho imunizačného týždňa 2010 až 2016 (v apríli) boli vykonané dotazníkové prieskumy na zhromažďovanie a analýzu názorov náhodne požiadaného obyvateľstva o rôznych témach týkajúcich sa očkovania. Otázky sa týkali zdrojov informácií o vakcínach, všeobecný postoj k očkovaniu a zbytočnosti očkovania, riziko z očkovania, úloha podnikania farmaceutických spoločností pri šírení očkovania, zmeny povinných očkovaní za nepovinné. Sériu ďalších otázok týkajúcich sa toho, či respondenti dali svojim deťom očkované a nežiaduce reakcie, boli navrhnuté pre respondentov, ktorí už majú deti. Terénna práca bola vykonaná na rôznych miestach v meste Martin. Pozitívnym zistením prieskumu je, že najbežnejším zdrojom informácií o očkovaní zostávajú lekári. Rastúci význam internetu súvisí s jeho rastúcim využívaním v populácii. Tento trend je potrebné primerane zvládnuť poskytnutím adekvátnych informácií z vedeckých základov, ktoré by mohli brániť škodlivým účinkom antivakcinačných skupín.

Kľúčové slová: Očkovanie. Dotazník. Postoje. Rodičia. Deti

ABSTRACT

During European Immunization Week 2010 to 2016 (April) the questionnaire surveys were performed to gather and analyse opinions of randomly asked population about different topics concerning vaccination. The questions were asked about sources of information about vaccines, general attitude to vaccination and on uselessness of vaccination, the risk from vaccination, the role of the business of pharmaceutical companies in spreading vaccination, changes of mandatory vaccinations for optional. A special series of questions concerning whether responders gave their children vaccinated and about adverse reactions were designed for responders who already have children. Fieldwork was carried at various locations in the town of Martin. A positive finding of the survey is that the most common source of information about vaccination remains the medical doctors. The rising importance of the internet is related to its growing use in population. This trend needs to be appropriately managed by providing adequate information from scientific bases that could adequately compensate harmful effect of antivaccination activists.

Key words: Vaccination. Questionnaire. Attitudes. Parents. Children

ÚVOD

Očkovanie patrí k najvýznamnejším a najefektívnejším spôsobom prevencie infekčných ochorení.

Prostredníctvom očkovania sa podarilo a stále sa darí znížiť chorobnosť a úmrtnosť na ochorenia preventabilné očkovaním, zabrániť vzniku epidémií, prípadne aj dosiahnuť ich elimináciu až eradikáciu. Na jeho úspešné vykonávanie je ale potrebný pozitívny vzťah laickej populácie, čo je v posledných rokoch problematickejšie vzhľadom na vzostup antivakcinačnej lobby. Z tohto dôvodu je dôležité poznať názory verejnosti na očkovanie. Negatívne postoje vedú k nižšej zaočkovanosti, čo má významný verejno-zdravotnícky, ekonomický a sociálny dopad a netýka sa len jednotlivcov odmietajúcich očkovanie, ale aj takých, ktorí nemôžu byť očkovaní, ale chráni ich kolektívna imunita [1]. Okrem toho je dôležité kontinuálne monitorovať situáciu, aby bolo možné identifikovať zmeny v postojoch a názoroch ľudí a adekvátne k nim prispôbiť formu a obsah odborných informácií poskytovaných laickej verejnosti. Výsledným cieľom týchto aktivít je podpora úrovne zaočkovanosti a zlepšenie informovanosti o očkovaní proti nákazám, ktorým sa dá očkovaním úspešne predchádzať a adekvátna odpoveď na antivakcinačne aktivity [2].

V rámci Európskeho imunizačného týždňa, ktorý od roku 2005 každoročne vyhlasuje Úrad Svetovej zdravotníckej organizácie pre Európu, sa v meste Martin od roku 2010 vykonávajú prieskumy vybraných aspektov názorov populácie na očkovanie. Naším cieľom bolo zistiť, aké sú postoje k očkovaniu u obyvateľov mesta Martin, dopĺňujúcim názormi rodičov o očkovaní ich detí.

MATERIÁL A METODIKA

Prieskumy sa vykonali v rokoch 2010 až 2016 v čase Európskeho imunizačného týždňa (apríl). Prostredníctvom jednoduchého dotazníka s uzavretými otázkami sa zisťovali okrem základných socio-demografických ukazovateľov respondentov (vek, pohlavie, počet detí, vzdelanie a zamestnanie) aj údaje o zdrojoch informácií o očkovaní, celkových

postojoch k očkovaniu a o vybraných názoroch (zbytočnosť očkovania, riziko, biznis farmaceutických spoločností, zmena povinného očkovania na dobrovoľné). Osobitná séria otázok sa týkala toho, či dávajú respondenti deti zaočkovať, o poskytovaní informácií lekármi o chorobách, proti ktorým sa očkuje, nežiadúcich reakciách, ako aj výskytu nežiaducej reakcie bola určená pre respondentov, ktorí už majú deti. Zber dát sa vykonával v dopoludňajších hodinách na rôznych miestach mesta Martin. Predovšetkým takých, kde sa vyskytuje väčšie množstvo ľudí (obchodné centrá, námestie, nemocnica, železničná stanica a pod.). Účasť na výskume bola dobrovoľná.

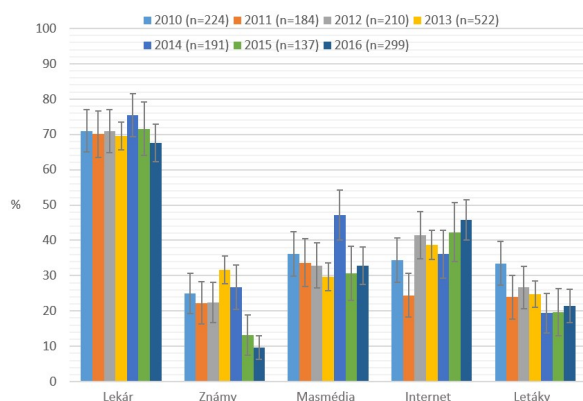
Získané údaje sú prezentované vo forme percent s príslušnými intervalmi spoľahlivosti 95 %. Za významné sa považovali rozdiely vo výskytu, kedy nedochádzalo k vzájomnému prekryvaniu intervalov spoľahlivosti.

Vzhľadom na mierne zmeny v znení otázok v dotazníku a vzájomnú kompatibilitu výsledkov, časť otázok sa analyzuje len za roky 2014 až 2016.

V tabuľke 1 sú uvedené základné charakteristiky súborov.

Tabuľka 1 Základné charakteristiky súborov

rok	n	mužov (%)	žien (%)	Vek priemer \pm SD
2010	224	31,3	68,8	34,6 \pm 16,9
2011	184	25,0	75,0	37,7 \pm 18,2
2012	210	30,5	69,5	39,2 \pm 16,5
2013	522	34,9	65,1	31,8 \pm 12,7
2014	191	37,7	62,3	31,4 \pm 12,9
2015	137	13,9	85,4	35,3 \pm 13,6
2016	299	36,5	63,6	34,3 \pm 14,2



Obrázok 1 Percentuálne počty respondentov uvádzajúcich jednotlivé informačné zdroje o očkovaní

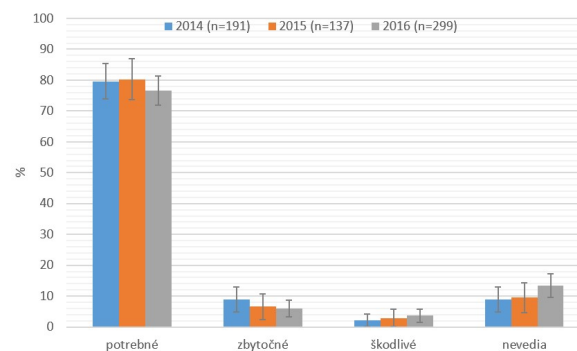
VÝSLEDKY

Dominantným zdrojom informácií o očkovaní u skupiny respondentov bol lekár (všeobecný praktický lekár). Túto možnosť označilo viac ako 7 z 10 respondentov (priemer 70,9 %), najnižšia hodnota bola v roku 2016 (67,6 %) a najvyššia (75,4 %) v roku 2014. Druhým najčastejším zdrojom sú masmédiá a internet, pričom výsledky poukazujú na postupný nárast zvyšovania významu internetu (z 24,5 % v roku 2011 na 45,8 % v roku 2016). Pokleslo percento respondentov, ktorí získavajú údaje od známych (z 31,6 % v roku 2013 na 9,7 % v roku 2016) ako aj tých, čo uviedli ako najčastejší zdroj informácií propagačné materiály (z 33,5 % v roku 2010 na 21,4 % v roku 2016) (Obr. 1).

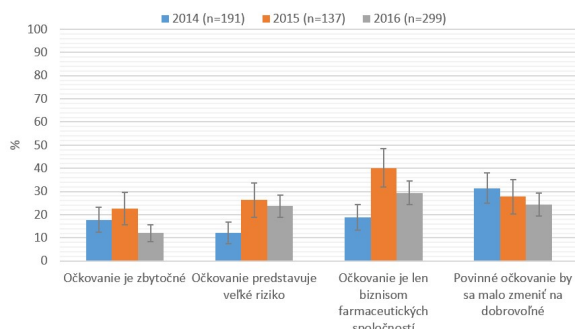
Významná väčšina respondentov považuje očkovanie za potrebné vo všetkých sledovaných rokoch. Od roku 2014, keď bola táto otázka zaradená do dotazníka, nedošlo k významným zmenám v odpovediach na túto otázku (Obr. 2).

Respondenti mali možnosť vyjadriť stanovisko, či sa stotožňujú (úplný, alebo čiastočný súhlas) s vybranými otázkami ohľadne negatívnych tvrdení o očkovaní. Stúpa percento respondentov s názorom, že očkovanie predstavuje riziko, ktoré môže ohroziť zdravie, a že je to biznis farmaceutických spoločností.

Na podobnej úrovni je aj názor, aby sa povinné očkovanie zmenilo na dobrovoľné. Znížil sa počet ľudí, ktorí považujú očkovanie za zbytočné. Najčastejším názorom je, že očkovanie slúži pre záujmy farmaceutických firiem, pričom jeho početnosť stúpla od roku 2014 z 18,8 % na 40,1 % v roku 2015, resp. 29,4 % v roku 2016.



Obrázok 2 Postoje respondentov k očkovaniu



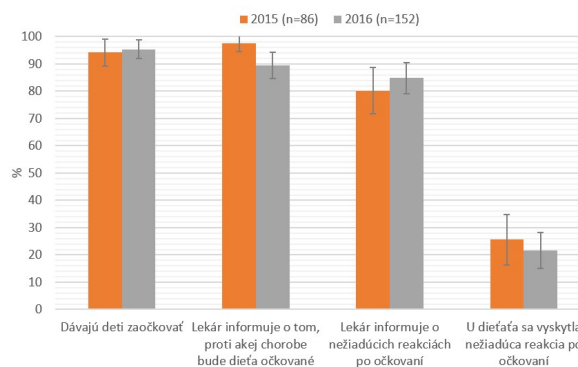
Obrázok 3 Výskyt súhlasných odpovedí na vybrané tvrdenia o negatívnych účinkoch očkovania

Podobne, narástol počet respondentov zdieľajúcich názor, že očkovanie predstavuje veľké riziko. Na druhej strane, poklesol výskyt názoru, že očkovanie je zbytočné. Názor, že očkovanie by malo byť dobrovoľné zdieľa približne štvrtina respondentov, pričom nedošlo od roku 2014 k významným zmenám. (Obr. 3).

Výrazná väčšina, t.j. viac ako 9 z 10 rodičov, dáva svoje deti zaočkovať (Obr. 4). Podobne, väčšina z nich uvádza, že ich lekár informuje o tom, proti akej chorobe sa očkuje ako aj o nežiadúcich účinkoch. Približne štvrtina respondentov uvádza, že sa u dieťaťa vyskytla po očkovaní nežiadúca reakcia.

DISKUSIA

Dominantným zdrojom informácií o vakcinácii je obvodný lekár. Tento nález je v zhode s nálezom v štúdií Allisona a kol. [3]. V tejto štúdií respondenti udávali ako zdroj informácií najčastejši lekára alebo sestru a bolo to v 81,7 %. Žiadne významné zmeny neboli zaznamenané v sledovanom období našej štúdie (2010-2016). Druhým najčastejším zdrojom informácií bol internet a masmédiá. Percent tých, čo uviedli tieto zdroje bol 37,6 % resp. 34,7 %. V Allisonovej štúdií z roku 2009 [3] internet dosiahol 9,9 % a masmédiá 14,2 %. Tieto údaje sa zhodujú s našimi výsledkami v zmysle postupného vzrastu významu vzostupu internetu ako hlavného zdroja informácií do budúcnosti, minimálne v našom prostredí. (vzostup z 24,5 % v roku 2011 na 45,8 % na 2016). Táto zmena bola signifikantná ako aj zmena –nárast medzi rokmi 2011 a 2012 (24,5 % resp. 41,4 %). Percento respondentov, ktorí získavali údaje zo sociálnych kontaktov (od známych) postupne klesalo (z 31,6 % v roku 2013 na



Obrázok 4 Skúsenosti rodičov s očkovaním svojich detí (hodnotené len u tých respondentov, ktorí uviedli, že majú aspoň jedno dieťa)

9,7 % v roku 2016). Rovnaká tendencia bola zaznamenaná aj v skupine respondentov, ktorí preferovali písomné reklamné materiály (od 33,5 % v roku 2010 do 21,4 % v roku 2016). Ako uvádza Mollema [4], monitorovanie on-line médií a internetu by mohlo byť užitočné pre zlepšenie komunikačných praktík zameraných na zachovanie prijateľnosti očkovania u širokej verejnosti.

Väčšina respondentov považuje vakcináciu za potrebnú 79,6 %, 80,3 % a 76,6 % v rokoch 2014, 2015 and 2016. Tento vývoj môžu byť dedičstvom posledných desaťročí, keď bolo očkovanie považované z úspech medicíny, pretože ľudia si ešte pamätali históriu svojich rodín, kedy každý poznal niekoho, kto zomrel na vtedy ešte nepreventabilné choroby. Len menej ako desatina (priemerne 7,1 %) považovala očkovanie za nepotrebné a ešte menej (2,9 %) ho deklarovalo za škodlivé. Z dôvodu šírenia antivakcinačných názorov môže toto percento v budúcnosti rásť a dosiahnuť aj vyššie hodnoty a to nielen tých, ktorí deklarujú očkovanie za nepotrebné a škodlivé ale aj tých, ktorí priznávajú, že deti nedávajú očkovať ako konštatuje Bloom [5]. Približne desať percent respondentov (10,2 %) na danú otázku neodpovedalo. Od roku 2014, keď bola táto otázka zahrnutá do dotazníka nebol sledovaný žiadny významný posun v pomere odpovedí v sledovanom období.

Respondenti sa mohli vyjadriť k tomu, či súhlasia čiastočne alebo úplne s vybranými tvrdeniami o očkovaní. Názory, že očkovanie predstavuje vysoké riziko a že môže poškodiť zdravie ako aj že znamená len zisk pre farmaceutické firmy mali signifikantne stúpajúcu tendenciu medzi rokmi 2014 a 2015 alebo 2016. Podobnú tendenciu má aj vývoj

zhody s názorom, že očkovanie by malo byť dobrovoľné, ale zmeny v percentuálnom vyjadrení neboli významné. Očkovanie proti vybraným ochoreniam je na Slovensku povinné. Nedávne výskumy ukázali súvislosť medzi obavami z očkovania, odmietaním povinného očkovania, zaočkovanosťou a incidenciou preventabilných ochorení [6]. Významne zredukovaný počet ľudí, ktorí považujú očkovanie za nepotrebné bolo zaznamenané medzi rokmi 2015 a 2016 (22, 6 % resp. 12,0 %).

Najbežnejším názorom v sledovanej skupine bolo vyjadrenie, že očkovanie je biznisom pre farmaceutické firmy a tento názor mal signifikantný nárast medzi rokmi 2014 (18,8 %) a 2015 (40,1 %), s následným nevýznamným poklesom v roku 2016 (29,4 %). Podobná bola dynamika nárastu počtu respondentov, ktorí súhlasili s názorom, že vakcíny predstavujú riziko. Názor, že by vakcinácia mala byť dobrovoľná zastáva približne štvrtina respondentov v roku 2016 a tento pomer sa významne nemenil od roku 2014.

Názor súhlasiaci s informáciou o dobrom obchodnom zisku pri produkcii vakcín je stále akceptovaný, aj keď skutočnosť je iná ako to dokazujú viacerí autori. Paul A. Offit píše: Počas posledných 50 rokov počet farmaceutických spoločností venujúcich sa výhradne výrobe očkovacích látok poklesol a tie, ktoré vakcíny vyrábajú redukovali zdroje investované do výroby. Farmaceutické spoločnosti opúšťajú pole výroby vakcín, pretože výskum, vývoj, testovanie a výroba očkovacích látok je finančne náročná a trh s očkovacími látkami je menší ako pri iných farmaceutických produktoch. Aktivity v oblasti podpory očkovania by sa mali zamerať na podporu kontinuálneho dostatku existujúcich očkovacích látok ako aj vývoja do budúcnosti [6].

Väčšina respondentov dáva deti očkovať. Vo viacerých predchádzajúcich štúdiách [7] sa potvrdilo, že obmedzený počet respondentov už niekedy odmietol dať zaočkovať svoje dieťa, je v zhode s našimi údajmi. Najčastejšie respondenti uvádzali, že lekár im povie pred očkovaním akú vakcínu podáva aké môžu byť vedľajšie účinky. Takmer štvrtina respondentov (23,3 %) tvrdila, že sa po očkovaní ich dieťaťa vyskytli „nežiaduce reakcie“. Nežiaduca reakcia bola definovaná ako akákoľvek reakcia, ktorú si rodič všimol a nebola bežná v živote dieťaťa. 46,3 % respondentov uvádzalo, že nedali deti očkovať a 82,9 % v porovnaní s priemerom v rokoch 2015 and 2016 (23,3 %) odpovedalo, že

ich deti mali nežiaduce reakcie po očkovaní. Nedávne publikácie popisovali postoje rodičov k očkovaniu ako spektrum skôr než jednoznačnú odpoveď a prikláňali sa k názoru, že je skôr potrebné komunikovať pri zbere informácií, aby sa získal pravdivý individuálny názor, ktorý by bolo možné spracovať [8]. Naďalej je dôležité pokračovať v nepretržitom sledovaní vývoja názorov obyvateľstva v malých oblastiach, ktoré môžu byť veľmi špecifické a môžu odrážať individuálne geografické, sociálne a mediálne zásahy, ktoré by bolo potrebné analyzovať a korigovať profesionálnym prístupom [9].

K limitáciám prieskumu patrí nestáli typ dotazníka, ktorý sa v priebehu rokov mierne upravoval s cieľom čo najlepšie zachytiť postoje respondentov. Ďalšou limitáciou je reprezentatívnosť respondentov, ktorí vzhľadom na čas a obdobie zberu údajov nemuseli vystihovať celkovú populáciu mesta. Medzi silné stránky patrí zber dát vykonávaný za rovnakých podmienok, vďaka čomu sa dá predpokladať, že zaznamenané zmeny vystihujú reálny stav.

ZÁVERY

Názory obyvateľov mesta Martin na očkovanie sa v sledovaných rokoch výrazne nemenili. Stále prevláda pozitívny vzťah či už k očkovaniu samotnému, alebo aj k lekárom, ktorí ho vykonávajú. Z hľadiska jednotlivých negatívnych názorov na očkovanie vyplývajú aj priority ohľadne zvýšenia informovanosti laickej populácie a to najmä adekvátne vysvetľovať to, že o význame očkovania existujú vedecké dôkazy, ktoré sú nezávislé od výrobcov vakcín.

Odpovede rodičov týkajúce sa očkovania ich detí tiež potvrdzujú, že len veľmi malá časť z nich odmieta očkovanie a vo väčšine prípadov je komunikácia s lekármi ohľadne očkovania na veľmi dobrej úrovni.

Naďalej treba pokračovať v sledovaní vývoja názorov populácie na očkovanie, aby sa na prípadne zmeny dalo pohotovo reagovať.

Podakovanie

Táto práca bola podporená slovenskou Agentúrou pre vedu a vývoj grantom č. APVV-0096 12

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

- [1] PIGOTT N., NOVELLI V., POOBONI S., et al. The importance of herd immunity against infection. *The Lancet*. 200; 360 (9333): 645.

- [2] OMER S.B., SALMON D.A., ORENSTEIN W.A., et al. Vaccine refusal, mandatory immunization, and the risks of vaccine-preventable diseases. *New England Journal of Medicine*. 2009; 360 (19): 1981-1988.
- [3] KENNEDY A., BASKET M., SHEEDY K. Vaccine attitudes, concerns, and information sources reported by parents of young children: results from the 2009 HealthStyles survey. *Pediatrics*, 2011; 127 (Suppl 1): S92-99.
- [4] MOLLEMA L., HARMSSEN I.A., BROEKHUIZEN E., et al. Disease detection or public opinion reflection? Content analysis of tweets, other social media, and online newspapers during the measles outbreak in The Netherlands in 2013. *Journal of medical Internet research*. 2015; 17 (5): e128.
- [5] BLOOM B.R., MARCUSE E., MNOOKIN S. Addressing vaccine hesitancy. *Science*. 2014; 344: 339.
- [6] OFFIT P.A. Why are pharmaceutical companies gradually abandoning vaccines?. *Health Affairs*. 2005; 24 (3): 622-630.
- [7] SALMON D.A., HABER M., GANGAROSA E.J., et al. Health consequences of religious and philosophical exemptions from immunization laws: individual and societal risk of measles. *Jama*. 1999; 282 (1): 47-53.
- [8] GUST D., BROWN C., SHEEDY K., et al. Immunization attitudes and beliefs among parents: beyond a dichotomous perspective. *American journal of health behavior*. 2005; 29 (1): 81-92.
- [9] HANQUET G., STEFANOFF P., HELLENBRAND W., et al. Strong public health recommendations from weak evidence? Lessons learned in developing guidance on the public health management of meningococcal disease. *BioMed research international*. 2015; 2015: 569235.

DYNAMIKA ZMIEN KONCENTRÁCIE PARAMETRA ICAM U VYBRANÝCH OCHORENÍ VPLYVOM HYPERBARICKEJ OXYGENOTERAPIE *DYNAMICS OF CONCENTRATION CHANGES OF THE PARAMETER ICAM IN SELECTED DISEASES DUE TO HYPERBARIC OXYGENE THERAPY*

KRAJČOVIČOVÁ Zdenka, BABIAK Juraj, MELUŠ Vladimír, KAŠLÍKOVÁ Katarína

Fakulta zdravotníctva, Trenčianska univerzita Alexandra Dubčeka v Trenčíne, Trenčín

ABSTRAKT

Laboratórne metódy disponujú množstvom laboratórnych parametrov, ktoré detailne a veľmi špecificky popisujú, mechanizmus vybraných dejov v organizme. Jedným z nich je aj parameter ICAM - intercelulárna adhézna molekula (*z angl.* Intercellular Adhesion Molecule), ktorá patrí do skupiny imunoglobulínov a zohráva dôležitú úlohu pri zápalovom procese, pri imunitnej odpovedi ako aj pri intracelulárnych signalizačných dejoch. Skupina ICAM sa skladá z piatich členov ICAM 1-5. Tieto molekuly sa viažu na leukocytové integríny CD11 alebo CD18 počas zápalu a počas imunitnej odpovede. Využitie tohto parametra v spojení s modernou terapeutickou metódou ako je hyperbarická oxygenoterapia (HBOT) poskytuje nové možnosti pre analýzu mechanizmu účinku viacerých ochorení. Zvýšený parciálny tlak kyslíka ovplyvňuje všetky tkanivá viacerými mechanizmami účinku vrátane modifikácie zápalovej odpovede. Vo všeobecnosti možno konštatovať, že liečba HBOT ukázala sľubné výsledky v niektorých modeloch ischemie, hlavným účinkom bolo zníženie lokálneho ischemického poškodenia, a tým aj zníženie koncentrácie parametra ICAM. Čo svedčí o tom, že tento parameter sa javí ako perspektívny, avšak výskum v danej oblasti je neustále potrebný.

Kľúčové slová: ICAM. Hyperbarická oxygenoterapia

ABSTRACT

Laboratory methods have a number of laboratory parameters that describe in detail and very specifically the mechanism of selected events in the organism. One of these is the ICAM - Intercellular Adhesion Molecule parameter, which belongs to the group of immunoglobulins and plays an important role in the inflammatory process, in the immune response as well as in intracellular signaling events. The ICAM group consists of five molecules ICAM 1-5. These molecules bind to leukocyte integrins CD11 or CD18 during inflammation and during immune response. Using this parameter in conjunction with a modern therapeutic method such as hyperbaric oxygen therapy (HBOT) provides new ways to analyze the mechanism of the effect of multiple diseases. Increased partial oxygen pressure affects all tissues by multiple mechanisms of action, including modification of inflammatory response. In general, HBOT treatment has shown promising results in some ischemic models, with the main effect being to reduce local ischemic damage and thereby reduce the ICAM parameter concentration. This suggests that this parameter appears to be perspective, but research in the field is still needed.

Key words: ICAM. Hyperbaric oxygene therapy

ÚVOD

Hyperbarická oxygenoterapia (HBOT) je terapeuticko-liečebná metóda pri ktorej pacient inhaluje 100% medicínsky kyslík pri tlaku vyššom ako je 1 atmosféra (1 atm; 101,3 kPa; 760 torr; 1 ATA). Počas terapie kyslík preniká do všetkých telesných tekutín a medzibunkových priestorov a postupne preniká aj do ischemických oblastí hlbšie ako pri normobarických podmienkach [1, 2].

Zvýšenie koncentrácie kyslíka v organizme spolu s vyšším tlakom pôsobia komplexne. Podporuje sa tým aeróbnym metabolizmus, t.j. tvorba molekúl adenosíntrifosfátu (ATP), znižuje tvorbu laktátu, eliminuje lokálnu acidózu, zvyšuje väčšiu difúziu do tkanív, má negatívny účinok na anaeróbne baktérie, obnovuje poškodené nervové bunky, redukuje edém a má veľa ďalších účinkov. Závisí to napr. od použitého tlaku, dĺžky a počtu expozícií, od zdravotného stavu pacienta, biologickej variability organizmu a mnoho ďalších faktorov [3]. HBOT sa využíva ako liečebný doplnok štandardných liečebných metód a má mnohé fyziologické a farmakologické účinky [2, 4, 5]. Medzi indikačné účinky patrí napr. dekompresná choroba, otrava oxidom uhoľnatým plynová gangréna, ale využíva sa aj pri popáleninách, omrzlinách, pri liečbe nehojajúcich sa rán a mnohých iných. Liečbu v HBOT v niektorých klinických prípadoch nie je možné nahradiť žiadnym iným lekárskeym postupom. Predstavuje ťažký doplnkovú terapeutickú metódu u viacerých diagnóz [4-6]. Počet expozícií sa pohybuje v rozmedzí od 10-20, v závislosti od indikácie lekára. Počas liečby je pacient monitorovaný prostredníctvom kamier, v prípade nevoľnosti či z dôvodu zhoršeného zdravotného stavu je možné terapiu prerušiť.

Adhézne molekuly

Adhézne molekuly sú fylogeneticky najstaršie nástroje medzibunkovej komunikácie. Niektoré sú konštitutívne (integrín $\beta 2$), iné sú ako konštitutívne, tak up-regulovateľné v prípade stimulácie (L-selektín), ďalšie zvyšujú rádovo svoju expresiu najmä pri

cytokínovej a prokoagulačnej aktivácií (vaskulárne selektín E a P, endoteliálny ICAM-1, ICAM-2 a VCAM-1). Koordinovaná expresia adhézných molekúl na endoteliách a cirkulujúcich zápalových elementoch spôsobuje spomalenie prúdu najmä monocitov (rolling) a následne ich príľnutie k aktivovanej cievnnej výstelke. Selektíny E, L, a P sú upregulované v cirkulujúcich elementoch predovšetkým lipopolysacharidov, TNF- α , IL-1 β , INF- γ a trombínom. Významnú úlohu tu má tiež PAF, tvorený prevažne trombocytmi po stimulácii histamínom a trombínom. Na strane endotelu sú hlavnými ligandami adhézných molekúl triedy imunoglobulínových molekúl ICAM a VCAM. Zvýšené koncentrácie adhézných molekúl v biologických tekutinách sú teda signálom interakcie endotelu so zápalovými elementami, avšak ide o nešpecifický fenomén. Diagnosticky majú značný význam u chronicky prebiehajúcich zápalov (vaskulitídy, autoimunitné procesy), v medicíne kritických stavov potvrdzujú vcelku očakávanú prítomnosť rôzne intenzívnych endoteliálnych aktivácií a dysfunkcií. Ich dynamika pre stanovenie prognózy prežitia neprináša v rozvinutej sepe zásadnejšiu informáciu [7].

ICAM

Intercelulárna adhézna molekula (z *angl.* Intercellular Adhesion Molecule, ICAM) patrí do veľkej skupiny imunoglobulínov, je dôležitá pri zápaloch, imunitnej odpovedi a aj pri intracelulárnych signalizačných dejoch. Skupina ICAM sa skladá z piatich členov ICAM 1, ICAM 2, ICAM 3, ICAM 4 a ICAM 5. Tieto molekuly sa viažu na leukocytové integríny CD11 alebo CD18 počas zápalu a počas imunitnej odpovede. Okrem toho sa ICAM môže nachádzať aj v rozpustnej forme v krvnej plazme, a v dôsledku aktivácie a proteolýzových mechanizmov aj na povrchu buniek. Môže sa indukovať bunkovo špecifickým spôsobom niekoľkými cytokínmi, napr. TNF- α , IL-1 a interferónom-gama, je inhibovaný glukokortikoidmi. Hrá úlohu pri zápalových procesoch a v obrannom systéme hostiteľa sprostredkovanom T-bunkami. Funguje ako kostimulačná molekula na antigén prezentujúcich bunkách na aktiváciu T-buniek obmedzených na MHC triedy II a na iné bunkové typy v spojení s MHC triedy I na aktiváciu cytotoxických T-buniek. ICAM-1 na endotelu hrá dôležitú úlohu pri migrácii (aktivovaných) leukocytov na miesta zápalu. ICAM-1 je prenesená do bunky a detegovaná v plazme ako sICAM-1 [7].

CIEĽ

Cieľom predkladaného príspevku bolo na základe dostupných vedeckých publikácií sumarizovať vplyvu hyperbarickej oxygenoterapie na koncentráciu parametra ICAM pri vybraných ochoreniach.

Vybrané štúdie sledovania vplyvu HBOT na ICAM

Hyperbarický kyslík sa skúma ako terapeutická intervencia pri ischemicko/reprfúznom (I/R) poškodení. Indukcia ICAM-1 z pupočnej žily a bovinnej aortálnej endotelovej bunky na skúmanie hypoxie a hypoglykémie sa stanovuje pomocou testu ELISA, Western blotom a konfokálnou laserovou skenovacou mikroskopiou. Výskumy ukázali že liečba pomocou HBOT znížila expresiu ICAM-1 na kontrolné hodnoty. Zistenia naznačujú, že priaznivé účinky HBOT pri liečbe I/R poškodenia môžu byť čiastočne sprostredkované inhibíciou expresie ICAM-1 indukciou endoteliálnych buniek oxidu dusnatého (eNOS). Ischémia a reperfúzia môžu spôsobovať až závažné ochorenia ako sú cievná mozgová príhoda, infarkt myokardu, syndrómu komôr a pod. ICAM-1 sa v týchto stavoch podieľala na poškodení I/R náborom polymorfonukleárných leukocytov (PMNs) exprimujúcich CD11/CD18 [8, 9].

Oxid dusnatý (NO) zohráva úlohu pri I/R poškodení. Inhibícia syntézy NO pochádzajúcej z endotelových buniek podporuje expresiu ICAM-1 a adhéziu PMN v niekoľkých modeloch [10, 11]. Expozícia kyslíku pri tlaku vyššom ako 1 atmosféra sa použila ako prídavná terapia pre niekoľko zranení I/R vrátane akútnej periférnej ischémie a infarktu myokardu. Posledné štúdie ukázali že terapia HBOT zlepšuje výsledok po experimentálnom poškodení I/R. Ukázalo sa, že predbežná liečba HBOT znižuje adhéziu leukocytov a zlepšuje postischemickú mikrovaskulárnu rýchlosť toku a hladiny ATP v tkanive po I/R v modeli pečene na hlodavce [12].

Vedecké štúdie naznačujú, že expresia proteínu ICAM-1 nie je vyvolaná samotnou hypoxiou a vyžaduje iné stimuly. Skúmalo sa, či hypoglykémia je schopná indukovať samotný ICAM-1 alebo modifikovať produkciu ICAM-1 v kombinácii s hypoxiou/reoxygenáciou. Ľudská endotelová bunka z pupočnej žily (HUVEC, z *angl.* Human Umbilical Vein Endothelial Cell) boli vystavené 4 hodinám hypoxie, hypoglykémie, potom nasledovalo 20 hodín normoxie a normoglykémie. Na stanovenie indukcie ICAM-1 bola použitá analýza CLSM.

CLSM demonštruje nízke hladiny proteínu ICAM-1 v neošetrených kontrolných HUVEC. Štyri hodiny hypoxie/hypoglykémie samotne nedokázali indukovať ICAM-1 po 24 hodinách. V kombinácii 4 hodín hypoxie a hypoglykémie bola dostatočná na vyvolanie expresie proteínu ICAM-1 po dobu 24 hodinách. Expresia ICAM-1 po hypoxii/hypoglykémii bola podobná hladine po stimulácii LPS. Po definovaných podmienkach *in vitro* vedúcich k indukcii ICAM-1 sa autori štúdiu snažili určiť, či liečba endotelovými bunkami HBOT by mohla inhibovať indukciiu proteínov ICAM-1. Falošný protokol I/R bol modifikovaný tak, aby zahŕňal 90 minút HBOT pri 2,5atm po hypoxickom/hypoglykemickom období a pred normotoxickým/normoglykemickým obdobím. HUVEC, ktoré boli podrobené samotnej hypoxii/hypoglykémii, boli prenesené priamo do normoxických/normoglykemických podmienok počas 90-minútového obdobia. Po celkovom čase 24 hodín boli bunky zozbierané a analyzované na expresiu proteínu ICAM-1 prostredníctvom CLSM. HBOT liečba endotelových buniek ošetrovaných hypoxiou/hypoglykémiou znížila expresiu proteínu ICAM-1 na kontrolné hladiny. Samotná expozícia HBOT neovplyvnila expresiu ICAM-1. Podobné výsledky boli získané použitím BAEC a identického imunohistochemického farbivacieho protokolu. Po vystavení hypoxii/hypoglykémii, spracovanie buniek s normálneho tlaku 100% kyslíka alebo N₂/O₂ zmes plynov ekvivalentné vzduchu na 2,5 atm neznížila/hladiny ICAM-1 hypoglykémii hypoxiou indukovanú. Boli vykonané ďalšie experimenty, aby sa zistilo, či je potrebný prahový tlak na potlačenie indukcie ICAM-1. Po vystavení hypoxie/hypoglykémii boli bunky ošetrované HBOT pri zvýšených tlakoch 1,5, 2,0 a 2,5 atm, po ktorých nasledovala normoxia/normoglykémia. Analýza ICAM-1 pomocou CLSM ukázala, že pre maximálnu inhibíciu ICAM-1 indukovanej hypoxiou/hypoglykémiou je potrebný tlak 2,5 atm. Zvyšujúci sa tlak ukázal prírastkové potlačenie expresie ICAM-1, najväčšie zníženie sa však vyskytlo medzi 2,0 a 2,5 atm. HUVEC boli vystavené hypoxii / hypoglykémii počas 4 hodín s alebo bez pôsobenia HBOT pri 2,5 atm. V rastúcich intervaloch po návrate do normoxie/normoglykémii boli bunky fixované a analyzované pomocou CLSM pre expresiu ICAM-1. Zvýšenie expresie ICAM-1 sa najskôr zaznamenalo 4 hodiny po hypoxii/hypoglykémii, pričom hladiny sa zvyšovali počas 24 hod. obdo-

bia. HUVEC ošetrované HBOT vykazovali tlmený nárast expresie ICAM-1 s malým, ale významným zvýšením pozorovaným iba 8 hodín po hypoxii/ hypoglykémii [13].

Kendal A.C. so spol. [14] robili výskum o rôznych tlakoch na expresiu zápalových génov v ľudských endotelových bunkách. Autori zistili, že hyperbarický kyslík sa ukázal ako užitočná liečba chronických rán. Endotelové bunky boli vystavené chronickému modelu poranenia, ktorý obsahoval hypoxiu v prítomnosti 0,5 mikrog/ml lipopolysacharidu a 1 ng/ml TNF-alfa počas 24 hodín, potom sa pôsobilo normobarickým kyslíkom (NBO₂, 95 % O₂ / 5 % CO₂ pri tlaku 1,0 atm, pO₂ približne 96,3 kPa), hyperbarickým kyslíkom (HBOT) pri 1,5 atm (1,5 HBO₂, 96,7 % O₂/ 3,3 % CO₂, pO₂ približne 147kPa) a HBOT pri 2,4 atm (2,4 HBO₂, 97,9 % O₂ / 2,1 % CO₂ pri 2,4 atm, pO₂ približne 238kPa). Expresia mRNA 92 zápalových génov sa potom analyzovala, a identifikovali zmeny v génoch, ktoré sa podieľajú na expresii adhezívnych molekúl, angiogenéze a remodelácii tkaniva, intracelulárnej signalizácii a reakciách bunkového kyslíka a redoxovej signalizácii. Autori zaznamenali rozdiely v prejave medzi rôznymi liečebnými tlakmi, zdôrazňujúc potrebu ďalšieho výskumu použitia rôznych terapeutických protokolov pri liečbe zápalových stavov, ako sú chronické rany.

Ye X. so spol. [15] robili výskum v oblasti HBOT a možných doplnkových terapiách pre orálne potenciálne malígne poruchy. Zistili že, ICAM-1 je konštitutívne exprimovaná endotelovými bunkami a rýchlo sa reguluje rýchlo počas zápalu, čo má za následok zvýšenú adhéziu buniek leukocytov a endotelových buniek. Na štúdium vplyvu HBOT na expresiu adhézie ICAM-1 a polymorfonukleárných neutrofilov vyvinula výskumná skupina *in vitro* model endotelových buniek I/R poškodenia a zistili, že liečba HBOT znižuje expresiu ICAM-1 na kontrolnú úroveň.

Fildisis G. a kol. [16] sa zamerali na prítomnosť protizápalových cytokínov, ktoré reguluje určité faktory vrátane adhezívnych molekúl, a ktoré zohrávajú významnú úlohu pri účinkoch HBOT. Autori štúdie konštatovali, že účinok HBOT je protizápalový a indukuje uvoľnenie cytokínov TNF- α , IL-6 a IL-8 a reguláciu adhezívnych molekúl sICAM-1 a sVCAM. Bol spracovaný celkový počet 64 vzoriek rozdelených do štyroch skupín: skupina A - nestimulovaná LPS a nevystavená HBOT, skupina B - stimulácia LPS a bez HBOT, skupina C - bez LPS

a bez HBOT, skupina D - stimulovaná LPS a vystavená HBOT. Stimulačná dávka LPS bola 100 ug/ml pre 0,1 ml plnej krvi zriedenej 1:10. Po inkubácii boli vzorky vystavené pôsobeniu HBOT so 100 % O₂ pri absolútnej hodnote 2,4 ATA po dobu 90 minút. TNF- α , IL-6, IL-8 a sICAM-1, hladiny sVCAM boli stanovené v supernatante kultúry pomocou ELISA. Autori pozorovali zvýšený účinok stimulácie LPS po expozícii HBOT, ktorý spôsobil zvýšenie produkcie cytokínov (TNF- α , IL-6, IL-8), zníženie sICAM a žiadnu zmenu sVCAM, zatiaľ čo ich hladiny bez stimulácie zostal takmer nezmenený. Pokles hladín sICAM by mohol súvisieť so zvýšenou hladinou IL-8, pretože produkcia tohto chemokínu je zahrnutá do regulácie adhézných molekúl [17].

Van den Blink so spol. [18] pozoroval, že expozícia HBOT zvyšuje uvoľňovanie cytokínov *in vitro* ako makrofágmi, ktoré nie sú stimulované, tak aj LPS. Hladiny TNF- α významne vzrástli počas a po jedinej expozícii HBOT u zdravých dobrovoľníkov, zatiaľ čo hladiny IL-6 a IL-1 β sa významne nezmenili. V štúdiách zdravých jedincov po stimulácii LPS autori skúmali vplyv HBOT na expresiu cytokínov (TNF- α , IL-6 a IL-8) a adhézných molekúl (sICAM-1, sVCAM) vo vzorkách zdravých jedincov. ICAM-1 je konštitutívne exprimovaný endotelovými bunkami a rýchlo sa reguluje rýchlo počas zápalu, čo má za následok zvýšenú adhéziu buniek leukocytov a endotelových buniek. LPS a zápalové cytokíny, vrátane TNF- α , IL-1 a IFN- γ , stimulujú akumuláciu ICAM-1 a VCAM mRNA a expresiu bunkového povrchu, aj keď tento mechanizmus predpokladá, že podporuje zápal tkanív. Up-regulácia génovej expresie adhézičných molekúl v mikrovaskulárnych endoteliálnych bunkách je dôležitým krokom pre migráciu a akumuláciu leukocytov v mieste zápalu, ktoré zohrávajú rozhodujúcu úlohu pri poškodení orgánov počas sepsy. Zvýšenie napätia kyslíka za normálnych, ale nie hyperbarických podmienok, stimuluje expresiu ICAM-1 a VCAM v ľudských mikrovaskulárnych a makrovaskulárnych endotelových bunkách, čo môže prispieť k adhézii a migrácii rôznych populácií leukocytov pri I/R poraneniach. ICAM-1 sa podieľa na poškodení indukovanom sepsou pri nábore PMN/CD18 exprimujúcich PM11. Schopnosť HBOT potlačiť uvoľňovanie sICAM-1, môže pomôcť vysvetliť priaznivý protizápalový účinok HBOT pri liečbe poškodenia I/R. Zvýšené hladiny

cytokínov uvoľňovaných za HBOT po LPS stimulácii a najmä IL-8 môžu sprostredkovať pokles sICAM-1. Chemotaktický cytokín IL-8 spôsobuje konformačné zmeny v štruktúre integrínov. Vyššie hladiny IL-8 uvoľňované pod HBOT, sprostredkujúce zmeny štruktúry receptorov adhézných molekúl, zvyšujú väzobnú kapacitu rozpustných molekúl ICAM-1 a detekované hladiny sICAM-1 sa znížili. Tento mechanizmus je posilnený, ako v prípade HBOT bez stimulácie, pozorované zmeny hladín IL-8 alebo sICAM-1 neboli významné. Avšak sVCAM zostal nezmenený pod HBOT, post-LPS. Možno, že väzba sVCAM na jeho receptor je neskorší proces ako sICAM-1. Zistenie supresívneho účinku HBO na hladiny sICAM-1 je v súlade s podobnými publikovanými výsledkami.

Experimentálne štúdie

Shinomiya N. so spol. [13] študovali účinok hyperbarického kyslíka na expresiu ICAM-1 v myších pľúcach a zistili, že pľúca sú jedným z najcitlivejších orgánov toxického účinku vysokotlakového kyslíka. Avšak prínos bunkových adhézných molekúl a zápalových leukocytov pri pľúcnej kyslíkovej toxicite, najmä v akútnej exudatívnej fáze, nie je dobre pochopený. Autori skúmali toxický účinok hyperbarického kyslíka vyjadrený analýzou koncentrácie ICAM-1 na pľúcne cievy endotelové bunky a funkciu leukocytov. Myši boli vystavené pôsobeniu HBOT pri 3 ATA pO₂ počas 3, 4 alebo 6 hodín. Expresia ICAM-1 bola sériovo pozorovaná imunohistochemickou analýzou. Po expozícii HBOT sa pozoroval nárast počtu pľúcnych intersticiálnych leukocytov (PIL) a bronchoalveolárnej laváže (BAL) po 72 a 48 hod. Expresia ICAM-1 bola výrazne zvýšená ihneď po expozícii HBOT a zotrvala po dobu 24 hod. To naznačuje dôležitosť zvýšenej expresie adhézných molekúl pri tvorbe pľúcnej kyslíkovej toxicity. Nebolo však možné zistiť zvýšenú chemiluminiscenčnú aktivitu v počiatočnej fáze buniek BAL a PIL. Z toho plynie, že expresia ICAM-1 bola zvýšená už od veľmi raného štádia po HBOT, ale v tejto fáze sa nepozorovala ani akumulácia leukocytov v pľúcach ani zvýšenie chemiluminiscenčnej aktivity. Preto aktivácia zápalových leukocytov v pľúcnej kyslíkovej toxicite sa môže vyskytnúť až po predĺženej (viac ako 4 hod.) alebo opakovanej expozícii HBOT.

Kayvan T. so spol. [19] uskutočnili štúdiu o reperfúzne indukovanvej polarizácii neutrofilov CD18

vo vzťahu k HBOT. Zistili, že HBOT inhibuje adhéziu neutrofilov indukovanú I/R na endotel prostredníctvom neznámeho mechanizmu. Táto štúdia hodnotí vplyv HBOT na I/R-stimulovanú adhéziu neutrofilov a polarizáciu exprimovaných adhézných molekúl CD18 s použitím nového *in vitro* adhézneho testu a konfokálnej mikroskopie. Neutrofilové zvierat sa izolovali z plnej krvi a inkubovali s plazmou z chlopni svaly s krysami gracilis na krycích línách, ktoré boli predbežne ošetrované ICAM. Percento adhézie k polarizácii ICAM a CD18 bolo hodnotené v nasledujúcich piatich skupinách: 1. neischemická kontrola, $n = 15$; 2. 4 hod. ischemia (I/R, $n = 15$); 3. 4 hod. ischemia s liečbou HBOT (100% kyslík pri absolútnej hodnote 2,5 ATA (I/R + HBOT, $n = 15$)); 4. 4 hod. ischemia so 100% kyslíkom pri izbovej teplote a tlaku (RTP) (I/R + normobarická hyperoxia, $n = 5$); a 5. 4 hod. ischemie s 8% kyslíka pri absolútnej hodnote 2,5 ATA (I/R + hyperbarická normoxia, $n = 5$). Bola tiež hodnotená priama liečba neutrofilmi HBOT. Výsledok bol, že neutrofilové vystavené I/R plazme vykazovali v porovnaní s kontrolami signifikantné zvýšenie percentuálnych adherentných a polarizovaných buniek. Hyperbarický kyslík významne znížil adhéziu a polarizáciu. Normobarická hyperoxia a hyperbarická normoxia neovplyvnili adhéziu neutrofilov alebo polarizáciu CD18 po I/R. Priama HBOT liečba neutrofilov nezmenila percento polarizovaných buniek v I/R. Výskum zistil, že hyperbarický kyslík inhibuje I/R-indukovanú adhéziu neutrofilov blokováním povrchovej polarizácie CD18 a vyžaduje plazmovú expozíciu voči HBOT. Liečba samotným kyslíkom alebo tlakom nie je účinná. Test bol vyvinutý s ICAM a bez neho, aby sa zabezpečilo, že adhézia PMN nie je len náhodná. Pretože sa ukázalo, že HBOT znižuje expresiu ICAM [20], táto premenná bola riadená tým, že koncentrácia ICAM bola udržiavaná konštantná tak, aby bol izolovaný účinok HBOT na CD18.

DISKUSIA A ZÁVER

ICAM je sľubná molekula v laboratórnej diagnostike, ktorá sa v súčasnej dobe využíva predovšetkým vo vedecko-výskumnej činnosti. Nakoľko je parameter ICAM ukazovateľom predovšetkým protizápalovej aktivity, zaujímala nás ako sa správa v súvislosti s HBOT.

Hyperbarický kyslík (HBOT), zvýšené dodávanie kyslíka do tkanív dýchaním 100%-ného kyslíka v okolitom tlakovom prostredí, väčšieho ako

1 ATA, indukuje kompresiu akýchkoľvek vyvinutých bublín, farmaceutický účinok na niektoré baktérie, stimuláciu imunitných odpovedí, zvrat otravy oxidom uhoľnatým (CO) a hypoxiu tkaniva a zrýchléné hojenie poranení a rán. Zvýšený parciálny tlak kyslíka (pO_2) ovplyvňuje všetky tkanivá niekoľkými rôznymi mechanizmami vrátane modifikácie zápalovej odpovede. Vo všeobecnosti možno konštatovať, že liečba HBOT ukázala sľubné výsledky v niektorých modeloch ischemie, hlavným účinkom bolo zníženie lokálneho ischemického poškodenia. Ukázalo sa, že HBOT inhibuje adhéziu neutrofilov na vaskulárny endotel a znižuje celkový obsah PMN v ischemickom tkanive po traume. Ďalšie štúdie s použitím rôznych zvieracích modelov naznačujú, že nábor neutrofilov je významne znížený pomocou HBOT po I/R poranení pečene, čreva a gracilového svaly. Klinických štúdií s využitím parametrom ICAM je v dostupných vedeckých databázach iba obmedzené množstvo [14-18], oveľa viac štúdií sa vykonáva experimentálne na zvieratách alebo bunkových kultúrach [19, 20]. Thom so spol. [21] vo svojej štúdií konštatovali, že HBOT účinne reguluje expresiu ICAM-1 v *in vitro* modeli poškodenia endotelálnych buniek I/R a toto zníženie regulácie môže byť sprostredkované čiastočne aktívou endotelovej syntázy oxidu dusnatého (eNOS). Larson so spol. [22] študovali vplyv hyperbarického kyslíka na zvieracom modeli I/R poškodenia. Vystavenie HBOT plnej krvi zo zdravých jedincov predtým vyvolaných LPS zvyšoval uvoľňovanie cytokínov a potlačil hladiny sICAM-1. Tieto najnovšie zistenia môžu podporiť potenciálny priaznivý účinok HBOT na adhéziu PMN na endotel prostredníctvom modulácie expresie proteínu ICAM-1. Ďalšie vyšetrenia môžu umožniť jasnejšie pochopenie mechanizmov, ktorými HBOT ovplyvňuje expresiu cytokínov.

Vo všeobecnosti možno na základe dostupných vedeckých publikácií vplyvu HBOT na parameter ICAM konštatovať, že liečba HBOT ukázala sľubné výsledky v niektorých modeloch ischemie. Hlavným mechanizmom účinku bolo zníženie lokálneho ischemického poškodenia. Ukázalo sa, že HBOT inhibuje adhéziu neutrofilov na vaskulárny endotel a znižuje celkový obsah PMN v ischemickom tkanive po traume. Väčšina štúdií potvrdzuje predpoklad, že HBOT pomáha pacientom tým, že prekrvuje tkanivá a tým znižuje koncentráciu parametra ICAM.

Pod'akovanie

Tento príspevok vyšiel s podporou projektu „Dobudovanie technickej infraštruktúry pre rozvoj vedy a výskumu na Trenčianskej univerzite Alexandra Dubčeka prostredníctvom hyperbarickej oxygenoterapie“ ITMS kód 26210120019 Operačného programu Výskum a vývoj.

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

- [1] KRAJČOVIČOVÁ Z., MELUŠ V. Proposed mechanism of action of selected antioxidant defenses induced by hyperbaric oxygen therapy. *University review*. 2014; 8 (1-2): 2-8.
- [2] JAIN K.K. *Textbook of hyperbaric medicine*. Hogrefe and Huber Publishers, Gottingen, 2009, 578s., ISBN 978-0-88937-361-7.
- [3] BARCAL R., EMMEROVÁ M., HADRAVSKÝ M. *Hyperbarie a hyperbarická oxygenoterapie*. Kuna, Plzeň, 2000, 1.vyd., ISBN 80-902017-7-6.
- [4] GERLICOVÁ K., MATIŠÁKOVÁ I., POLIAKOVÁ N. The role of nurse in hyperbaric oxygen therapy. *University review*. 2014; 8 (1-2): 14-20.
- [5] KRAJČOVIČOVÁ Z., ZIGO R., MIŠINOVÁ M., et al. Posúdenie vplyvu hyperbarickej oxygenoterapie na subjektívne vnímanie kvality života pacientov s tinnitom. *Zdravotnícke listy*. 2016; 4 (1): 7-12.
- [6] HÁJEK M., a kol. *Hyperbarická medicína*, Mladá fronta a.s., 2017, 1. vyd., 453 s., ISBN 978-80-204-4235-2.
- [7] ZIMA T. a kol. *Laboratorní diagnostika*, Galén, Praha, 2007, 2. vyd., 906 s., ISBN 978-80-7262-372-3.
- [8] MA X.L., LEFER D.J., LEFER A.M., et al. Coronary endothelial and cardiac protective effects of monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule-1 in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation*. 1992; 86: 937-946.
- [9] SMITH C.W., ENTMAN M.L., LANE C.L., et al. Adherence of neutrophils to canine cardiac myocytes in vitro is dependent on intercellular adhesion molecule-1. *J. Clin. Invest.* 1991; 88: 1216-1223.
- [10] DE CATERINA R., LIBBY P., PENG H.B., et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. *J. Clin. Invest.* 1995; 96: 60-68.
- [11] KUBES P., SUZUKI M., GRANDER D.N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991; 88: 4651-4655.
- [12] CHEN M.F., CHEN M.H., UENG S.W., et al. Hyperbaric oxygen pretreatment attenuates hepatic reperfusion injury. *Liver*. 1998; 18: 110-116.
- [13] SHINOMIYA N., SUZUKI S., HASHIMOTO A., et al. Effect of hyperbaric oxygen on intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in murine lung. *Aviat Space Environ Med*. 1998; 69 (1): 1-7.
- [14] KENDALL A.C., WHATMORE J.L., HARRIES L.W., et al. Different oxygen treatment pressures alter inflammatory gene expression in human endothelial cells. *Undersea Hyperb Med*. 2013; 40 (2): 115-123.
- [15] YE X., ZHANG J., LU R., et al. HBO: a possible supplementary therapy for oral potentially malignant disorders. *Med Hypotheses*. 2014; 83 (2): 131-136.
- [16] FILDISSIS G., VENETSANO K., MYRIANTHEFS P., et al. Whole blood pro-inflammatory cytokines and adhesion molecules post-lipopolysaccharides exposure in hyperbaric conditions. *Eur. Cytokine Netw*. 2004; 15 (3): 217-221.
- [17] KHIABANI K.T., STEPHENSON L.L., GABRIEL A., et al. A quantitative method for determining polarization of neutrophil adhesion molecules associated with ischemia reperfusion. *Plast Reconstr Surg*. 2004; 114: 1846.
- [18] VAN DEN BLINK B., VAN DER KLEIJ A.J., VERSTEEG H.H., et al. Immunomodulatory effect of oxygen and pressure. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2002; 132: 93.
- [19] KAYVAN T. KHIABANI, M.D., SETH A., et al. Reperfusion-Induced Neutrophil CD18 Polarization: Effect of hyperbaric oxygen. *Journal of Surgical Research*. 2008; 150 (1): 11-16.
- [20] BURAS J.A., STAHL G.L., SVOBODA K.S., et al. Hyperbaric oxygen down-regulated ICAM-1 expression induced by hypoxia and hypoglycemia: the role of eNOS. *Am J Physiol*. 2000; 278: C292.
- [21] THOM S.R. Functional inhibition of leukocyte B2 integrins by hyperbaric oxygen in carbon monoxide-mediated brain injury in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1993; 123: 248.
- [22] LARSON J.L., STEPFENSON L.L., ZAMBONI W.A. Effect of hyperbaric oxygen on neutrophil CD18 expression. *Plast. Reconstr. Surg*. 2000; 105: 1375.

MIKROBIÁLNE BIOFILMY: VZNIK, ŠTRUKTÚRA A SELEKČNÁ VÝHODNOSŤ *MICROBIAL BIOFILMS: FORMATION, STRUCTURE AND A SELECTIONAL ADVANTAGE*

KAŠLÍKOVÁ Katarína^{1,2}, SLOBODNÍKOVÁ Jana¹, MELUŠ Vladimír¹, KRAJČOVIČOVÁ Zdenka¹

¹ *Fakulta zdravotníctva, Trenčianska univerzita Alexandra Dubčeka v Trenčíne, Trenčín*

² *Vysoká škola zdravotníctva a sociálnej práce sv. Alžbety, Bratislava, študentka doktorandského štúdia*

ABSTRAKT

Mikrobiálne biofilmy sú v poslednom desaťročí predmetom intenzívnych štúdií hlavne z dvoch dôvodov. Prvým a základným dôvodom je vedecký záujem pochopiť život, koexistenciu a vzájomné vplyvy baktérií, ktoré žijú v mnohobunkových komunitách. Druhým dôvodom je tvorba biofilmu, ktorý spôsobuje značné problémy v medicínskom a priemyselnom prostredí, pretože baktérie v biofilme môžu odolávať antibiotickej liečbe, hostiteľskej imunitnej odpovedi a biocídnemu účinku. Znalosť environmentálnych podnetov, genetických prvkov a molekulárnych mechanizmov, ktoré sa podieľajú na tvorbe biofilmu je potrebná pre racionálny návrh stratégií na elimináciu biofilmov alebo na inhibíciu ich tvorby. Z mnohých faktorov, ktoré sa podieľajú na procese tvorby biofilmu sa v našom prehľadovom článku zameriavame na vznik a štruktúru biofilmu, na faktory, ktoré ovplyvňujú jeho rast a taktiež sumarizujeme aktuálne poznatky o selekčných výhodách biofilmu vzhľadom k rezistencii mikroorganizmov.

Kľúčové slová: Biofilm. Rezistencia na antibiotiká. Biocidy.

ABSTRACT

Microbial biofilms have been the subject of intense studies over the past decade, mainly for two reasons. The first and fundamental reason is the scientific interest in understanding the life, coexistence and mutual influences of bacteria which live in multi-cell communities. The second reason is the formation of biofilm, which causes considerable problems in the medical and industrial environment because bacteria in biofilm can withstand antibiotic treatment, host immune response and biocidal effect. Knowledge of environmental stimuli, genetic elements and molecular mechanisms involved in biofilm formation is necessary for the rational design of strategies to eliminate biofilms or inhibit their formation. Of the many factors involved in the biofilm formation process, our minireview focuses on the emergence and structure of biofilm, on the factors that influence its growth, and also summarizes current knowledge about the selective advantages of biofilm due to the resistance of microorganisms.

Key words: Biofilm. Resistance to antibiotics. Biocides.

ÚVOD

Väčšina mikroorganizmov existuje v biofilmoch, ktoré sú tvorené spoločenstvami mikroorganizmov žijúcich v samovoľne produkovanej extracelulárnej polymérnej matrici pripojenej k pevnému živému alebo neživému povrchu. Mikroorganizmy žijúce v biofilme na rozdiel od planktonických buniek menia fenotyp, preto sú rezistentnejšie na

liečbu antibiotikami a priebeh infekcií spôsobených biofilmami môže byť podstatne ťažší [1].

Biofilmy sú odolné voči antibiotickej liečbe kvôli mechanizmom viacerých tolerancií (fenotypová rezistencia). To spôsobuje pretrvávanie infekcií vyvolaných biofilmami, aj napriek expozícii antibiotikom, ktorá predučuje vývoj rezistencie na antibiotiká (genetická rezistencia). Pochopenie vzájomného pôsobenia fenotypových a genetických mechanizmov rezistencie pôsobiacich na biofilmy, ako aj zhodnotenie rôznorodosti environmentálnych podmienok biologických infekcií, ktoré ovplyvňujú účinnosť antibiotík je potrebné na optimalizáciu antibiotickej liečby infekcií spôsobených biofilmami [2].

Bakteriálne biofilmy sú spájané so širokou škálou infekcií, ako sú prípady súvisiace s používaním zdravotníckych prístrojov a pomôcok (napr. katétre alebo protetické kĺby, rôzne implantáty), s chronickými tkanivovými infekciami alebo s infekciami, ku ktorým dochádza v pľúcach pacientov s cystickou fibrózou [3].

VZNIK BIOFILMU

Vznik a vývoj biofilmu je komplexný a dynamický proces, ktorý je potrebné študovať, pretože lepšie pochopenie vlastností biofilmu môže byť dôležité pre vývoj nových terapeutických stratégií [4].

Tvorba biofilmu je regulovaná rôznymi genetickými a environmentálnymi faktormi. Genetické štúdie ukázali, že bakteriálna mobilita, bunkové membránové proteíny, extracelulárne polysacharidy a signalizačné molekuly hrajú významnú úlohu pri tvorbe biofilmu [5].

Characklis a Marshal [6] popísali niekoľkostupňový proces vývoja biofilmu, ktorý zahŕňa tvorbu počiatočnej kondicionačnej vrstvy, reverzibilnú a nezvratnú adhéziu baktérií a prípadné oddelenie buniek od zrelého biofilmu. Základom pri tvorbe biofilmu je podkladová vrstva na ktorej biofilm rastie. Môže byť zložená z mnohých organických alebo anorganických častíc. Podklad poskytuje biofilmu živiny, ktoré podporujú rast bakteriálnej komunity.

Počiatočná fáza vo vývoji biofilmu trvajúca len niekoľko minút je interakcia medzi planktónnymi bunkami a povrchom substrátu. Taktiež sa nazýva aj ako reverzibilná adsorpcia, pretože niektoré baktérie prilnú na povrch podkladu len na krátku dobu a potom sa odpoja. Tvorba charakteristického biofilmu nastáva po adhézii, kedy dochádza ku zmene regulácie génov. U tých génov, ktoré sa podieľajú na tvorbe extracelulárneho polyméru, je stimulovaná expresia [7].

V druhej fáze dochádza k nevratnému pripojeniu, baktérie sú pevne prichytené k povrchu podkladu a strácajú pohyblivosť. Bakteriálne bunky sa navzájom pripájajú k substrátu, a tým začína tvorba bakteriálnych mikrokolónií. Maturácia je tretou fázou tvorby biofilmu, vytvára sa v nej matrica extracelulárneho polysacharidu. Zvyšuje sa počet mikrokolónií, stávajú sa viacvrstvovými a ich hrúbka môže dosahovať až 10 μm . Táto fáza trvá tri dni. V ďalšej fáze, dozrievania, bakteriálne mikrokolónie narastú na ich maximálnu veľkosť a hrúbku [8].

Počas tvorby biofilmu sa v baktériách mení syntéza povrchových proteínov, mastných kyselín, fosfolipidov a produkcia niektorých enzýmov a polysacharidov. Cyklus tvorby biofilmu je ukončený uvoľňovaním dcérskych buniek do prostredia, čo môže byť indukované nedostatkom živín alebo mechanickými vplyvmi prostredia. Biofilm sa týmto spôsobom rozširuje ďalej po pevnom povrchu [9].

ŠTRUKTÚRA BIOFILMU

Základnú stavebnú jednotku biofilmu tvoria bakteriálne mikrokolónie, oddelené od komunity bakteriálnych buniek exopolysacharidovou substanciou. Mikrokolónie sú vo väčšine prípadov tvorené viacerými druhmi baktérií zakotvenými v extracelulárnej polysacharidovej matrici a poprepávané vodnými kanálkami. Vodné kanáliky fungujú v biofilme ako jednoduchý distribučný systém obehového systému živín a zároveň dostávajú von z biofilmu škodlivé metabolity. Súčasťou biofilmovej matrice sú aj mŕtve bunky, teikové kyseliny z bunkovej steny, DNK a N-acetylglukózamín z hostiteľských produktov. Exopolysacharidová matrica chráni bunky biofilmu pred rôznymi negatívnymi environmentálnymi podmienkami ako je napr. UV žiarenie, prudké zmeny v hodnotách pH, teplota a pod. [10].

V súčasnosti sú popísané dve najčastejšie sa vyskytujúce štruktúry biofilmu: typ honey-like a mushroom-shaped.

Mushroom-shaped štruktúra je odvodená od tvaru huby skladajúcej sa z hlúbika a klobúka. Pomyselný hlúbik je tvorený nepohyblivými subpopuláciami buniek, klobúk predstavuje pohyblivé subpopulácie, ktoré sa na vrchol dostali pohybom po nepohyblivých bunkách. Štruktúra bola pozorovaná u *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* a *Caulobacter crescentus*. Tento model predpokladá tvorbu hubovitých štruktúr od okamihu inokulácie baktérií, pričom sa hubovité štruktúry formujú iba v obmedzenom rozsahu v závislosti od úrovne živín a počiatkovej hustoty „hubových stoniek“. Tým sa otvára možnosť variability tvorby priestorových vzorov v bakteriálnych kolóniách s prihliadnutím na významný vplyv environmentálnych faktorov [11,12].

Ďalšia štruktúra zvyšujúca mechanickú stabilitu biofilmu má tvar šesťuholníka, pripomínajúceho včelie plasty. Honey-like typ štruktúry tvoria hlavne *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae* a *Listeria monocytogenes* [13].

Faktory ovplyvňujúce rast biofilmu

Rôzne signály z prostredia ako napríklad dostupnosť niektorých živín, prítomnosť kyslíka, hydrodynamika, teplota a pH sa podieľajú na regulácii tvorby biofilmu. Štúdie o tvorbe biofilmu u *Listeria monocytogenes* uvádzajú, že príliš nízka alebo príliš vysoká hladina fosfátov v životnom prostredí znižuje tvorbu biofilmu, zatiaľ čo prítomnosť sacharidov manózy a trehalózy naopak tvorbu biofilmu stimulovala [14].

Tvorba biofilmu u *Escherichia coli* je regulovaná prítomnosťou kyslíka. V prípade nedostatku kyslíka sa biofilm netvorí, pretože baktérie nedokážu prilnúť k povrchu substrátu. Štúdie zamerané na vplyv teploty na *Listeria monocytogenes* ukázali, že biofilm sa netvoril ak bola teplota vysoká, pretože proces spájania baktérií so substrátom bol inhibovaný. Ekologické pH je tiež dôležité pre tvorbu biofilmu, čo potvrdili štúdie uskutočnené na *Vibrio cholerae*. Optimálne pH pre množenie *Vibrio cholerae* je 8,2, ak je hodnota pH menšia ako 7, schopnosť tejto baktérie tvoriť biofilm je znížená kvôli faktu, že bakteriálne bunky strácajú v kyslom prostredí svoju mobilitu. Na rozdiel od *Vibrio cholerae*, baktérie *Staphylococcus epidermidis* a *Escherichia coli* nepotrebujú alkalické prostredie, aby sa mohli množiť, keďže tvoria biofilm napr. na uretrálnych katétroch, kde pH moču je kyslé [15-17].

Ďalší z faktorov ovplyvňujúci tvorbu biofilmu je koncentrácia glukózy. Tým, že je biofilm polymorfny, tak prispôsobuje svoju štruktúru v závislosti od množstva živín, ktoré boli preukázané pomocou experimentov s rôznymi koncentraciami glukózy. Ak je koncentrácia glukózy vysoká, mikrokolónie rastú rýchlo a následne sa výrazne zvyšuje aj hrúbka biofilmu. Opätovným znížením koncentrácie glukózy sa pôvodná štruktúra biofilmu obnoví [18].

Mnohé baktérie regulujú svoje kooperačné aktivity a fyziologické procesy prostredníctvom mechanizmu nazývaného snímanie kvóra (QS, z *angl.* quorum sensing) v ktorom bakteriálne bunky navzájom komunikujú uvoľňovaním, snímaním a reagovaním na malé difúzne signálne molekuly. Schopnosť baktérií komunikovať a správať sa ako skupina pre spoločenské interakcie ako multibunkový organizmus priniesla významné výhody baktériám pri kolonizácii hostiteľa, tvorbe biofilmov, obrane proti konkurentom a adaptácii na meniace sa prostredie [19].

Zisťovanie kvóra sa objavuje ako neoddeliteľná súčasť regulačných sietí bakteriálnych génov, ktoré sú zodpovedné za adaptáciu baktérií v biofilmoch. Zistenie rozsiahleho využívania systémov snímania kvót v baktériách je rozhodujúcim faktorom pre vedenie výskumných pracovníkov pri skúmaní bakteriálneho mnohobunkového správania ako dôraz na jednotlivé bunkové biologické procesy. Avšak výskum o tom, ako bakteriálne snímanie kvóra funguje mechanicky v biofilmoch zaostáva. Jasnou výzvou pre túto oblasť je určiť, ktoré faktory biofilmu ovplyvňujú nástup citlivosti kvóra a následnú expresiu génov. Ďalšou kľúčovou úlohou je určiť funkčné dôsledky snímania kvóra vo viacerých druhoch biofilmov [20].

Rast biofilmu spôsobuje vznik významnej populácie baktérií s rôznorodým súborom fenotypov, často označovaných ako „varianty“. Tieto bakteriálne subpopulácie majú často vlastnosti, ktoré môžu byť prínosom pre celú komunitu. Napr. niektoré varianty nájdené u biofilmov *Pseudomonas aeruginosa* vykazujú buď zvýšenú schopnosť rozširovať alebo urýchľovať tvorbu biofilmu. Prítomnosť rôznych subpopulácií v komunite prežije v širšom spektre podmienok a potenciálnych problémov, ako by to bolo spoločenstvo pozostávajúce z jedinej genetickej alebo fenotypovej populácie. V biofilmoch *Pseudomonas aeruginosa* sa ukázalo, že niektoré varianty majú zvýšenú odolnosť voči

oxidačnému stresu. Stabilné varianty izolované z biofilmov priamo ovplyvňujúce rast biofilmu boli opísané aj v niekoľkých ďalších mikroorganizmoch, vrátane *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas putida*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus* a dokonca aj u *Candida spp.* [21, 22].

SELEKČNÁ VÝHODNOSŤ BIOFILMU

Odolnosť biofilmu na antimikrobiálne látky

Od objavenia penicilínu v roku 1928 antibiotiká prešli veľkým vývojom pri liečbe akútnych bakteriálnych infekcií. Mikrobiológovia vedia určiť antibiotické účinky *in vivo* vyhodnotením minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) alebo minimálnej baktericídnej koncentrácie (MBC) *in vitro*. MIC a MBC posudzujú účinok antibiotík proti planktonickým organizmom v exponenciálnej rastovej fáze, a preto správne predpovedajú antibiotickú účinnosť proti rýchlo sa deliacim baktériám pri akútnych infekciách. Klinickí lekári, ktorí sa zaoberajú chronickými infekciami spojenými s biofilmom, vytvoreným napríklad na zdravotníckych prístrojoch alebo implantátoch, katédroch a pod., často nevyužívajú rovnaké liečebné postupy [23,24].

Obmedzená penetrácia antimikrobiálnych látok cez biofilmovú maticu môže v niektorých prípadoch prispieť k antimikrobiálnej tolerancii biofilmov. Hoci biofilmové matrice neinhibujú všeobecne difúziu antibiotík, obmedzená penetrácia antibiotík cez biofilmy sa môže vyskytnúť v prípadoch, keď sa antibiotiká viažu na zložky biofilmovej matrice alebo bakteriálnych membrán, ako je extracelulárna DNA alebo keď antibiotiká sú inaktivované enzýmami prítomnými v matrici, ako je beta-laktámová inaktivácia beta-laktamázami [25].

Diferenciálna fyziologická aktivita baktérií v biofilmoch je ďalšou základnou príčinou antimikrobiálnej tolerancie spojennej s biofilmom. Štúdie biofilmov *Pseudomonas aeruginosa* ukázali, že metabolická aktivita baktérií je vysoká vo vonkajšej časti biofilmu, zatiaľ čo je nízka vo vnútornej časti biofilmu [26].

Mnohé antibiotiká sú zamerané na procesy, ktoré sa vyskytujú v rastúcich baktériách (napr. replikácia, syntéza bunkovej steny), biofilmové baktérie s nízkou metabolickou aktivitou vykazujú zvýšenú antimikrobiálnu toleranciu voči týmto druhom antibiotík. Biofilmy môžu vykazovať antimikrobiálne tolerančné mechanizmy, ktoré môžu súvisieť s ex-

presiou niekoľkých špecifických génov v baktériách. Napríklad gén *ndvB* u *Pseudomonas aeruginosa* PA14, ktorý kóduje enzým, ktorý sa podieľa na syntéze periplazmatických glukánov, ktoré sa viažu na tobramycín a zabráňujú bunkovej smrti sekvestrovaním antibiotika [27].

Kombinácia antimikrobiálnych látok, najmä u pacientov s cystickou fibrózou sa bežne používa s cieľom predchádzať alebo oddialiť nástup rezistencie v prípade liečby infekcií súvisiacich s biofilmom. Keďže biofilmy sú bakteriálne komunity, ktoré vykazujú nielen rôzne štrukturálne oblasti, ale aj rôzne metabolické stavy. Na ich liečbu sa kombinujú niektoré antimikrobiálne látky (ako je ciprofloxacín, tobramycín alebo β -laktámy), ktoré napadajú metabolicky aktívne vrstvy s ďalšími (ako je kolistín), ktoré prednostne usmrcujú bunky biofilmu s nízkou metabolickou aktivitou [28].

Na eradikáciu stafylokokových biofilmov vytvorených na ortopedických implantátoch je účinná kombinovaná liečba klaritromycínom a daptomycínom. Kombinácia ceftarolín plus a daptomycín alebo vankomycín s fosfomycínom vykazujú silnú aktivitu proti MRSA produkujúcim biofilm [29]. Infekcie spôsobené biofilmami často odolávajú vyšším koncentráciám antibiotík. Vyskytlo sa mnoho prípadov biofilmových infekcií ohrozujúcich ľudské zdravie vrátane infekcií kostí, tkaniva dýchacích ciest a pľúc, srdcových tkanív, stredného ucha, gastrointestinálneho traktu, oka, urogenitálneho traktu, protetických pomôcok, katétrov, implantátov a zubných ochorení. Centrum pre kontrolu a prevenciu chorôb (CDC) uvádza, že biofilmy sa podieľajú na viac ako 65% nemocničných infekcií [22-24].

Rezistencia bakteriálnych biofilmov na dezinfekčné prostriedky

Spôsob rastu biofilmu indikuje mikrobiálnu odolnosť proti dezinfekcii, ktorá môže viesť k závažným ekonomickým a zdravotným problémom. Viacstranné interakcie sa tiež podieľajú na pretrvávaní patogénov na inertných povrchoch v medicínskom alebo priemyselnom prostredí. V takýchto prípadoch je biologická kontaminácia zariadenia spojená s nozokomiálnymi a potravinovými infekciami napriek častým a intenzívnym čistiacim a dezinfekčným postupom [30].

K odolnosti proti biocídom môže prispieť pomalý rast a indukcia stresovej reakcie sprostredko-

vanej rpoS. Fyzikálna a chemická štruktúra exopolysacharidov alebo iné aspekty architektúry biofilmu, by tiež mohli poskytnúť rezistenciu vylúčením biocídov z bakteriálnej komunity. Baktérie rastúce v biofilmoch môžu vyvinúť fenotyp rezistentný na biocíd, špecifický pre biofilmy. Vzhľadom na heterogénnu povahu biofilmu je pravdepodobné, že v rámci jednej komunity existuje niekoľko mechanizmov rezistencie. Výskumy začali objasňovať, ako a prečo mikrobiálne spoločenstvá na povrchu vytvárajú rezistenciu voči antimikrobiálnym látkam [31].

Hoci biocídy sú vysoko účinné na planktónnych baktériách, ich účinnosť vo vzťahu k priestorovo organizovaným biofilmom sa pripisuje mnohým faktorom, ktoré často pôsobia spoločne a ktoré zahŕňajú prítomnosť extracelulárnych polymérov, ktoré brzdia ich difúziu. Existuje tiež dôkaz, že medzidruhové interakcie v extracelulárnej matrixi zvyšujú toleranciu voči dezinfekčným prostriedkom pozorovaným pri biofilmoch s jedným kmeňom. Avšak špecifické mechanizmy, ktoré sú základom tejto tolerancie, sú stále slabo pochopené a ich objasnenie je zložité kvôli zložitosti a rôznorodosti týchto bioštruktúr [31].

Medzidruhové interakcie môžu v biofilme priňať ekologické výhody. Priestorová organizácia a stratifikácia nekompatibilných baktérií, ako sú aeróbne nitrifikátory a anaeróbne denitrifikátory, umožňujú ich ko-metabolizmus a degradáciu toxických zlúčenín. Antropocentrický negatívny vplyv interakcií medzi druhmi sa odráža v biofilmoch súvisiacich s chronickými infekciami. Kolonizácia natívnymi tkanivami ako sú pľúca pacientov s cystickou fibrózou, chronické rany alebo močový trakt, viacerými patogénnymi druhmi, často vyvoláva závažnejšie infekcie. Napr. koinfekcia spôsobená *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus* spomaľuje hojenie rán a vyvoláva zápalovú odpoveď hostiteľa. Podobne virulencia *Staphylococcus aureus* je indukovaná v prítomnosti *Pseudomonas aeruginosa* alebo huby *Candida albicans* [32].

ZÁVER

Selekčný tlak, ktorý odborná verejnosť obvykle automaticky zaraďuje do pôsobnosti výskumu evolučnej biológie, veľmi výrazne pôsobí i na úrovni mikroorganizmov. V priebehu posledných desaťročí sme svedkami výrazného nárastu rezistencie mikroorganizmov voči antibiotikám, ktorý je dôsledkom negatívnej selekcie kmeňov, ktoré boli

senzitívne na použité antibiotiká a ich postupného nahradenia rezistentnými kmeňmi. Veľmi významnú podpornú úlohu vo vývoji rezistencie mikroorganizmov zohráva biofilm, ktorý poskytuje nielen účinnú ochranu pred negatívnymi vonkajšími vplyvmi, ale aj vhodné životné prostredie potrebné pre jeho rast a prežitie. Súčasný interdisciplinárny výskum založený na genetických analýzach, mikroskopické pozorovania a štúdie génovej expície, vyústil do pokročilých vedomostí o molekulárnom a genetickom základe vývoja a prežitie biofilmu. Veľa súvislostí však naďalej zostáva neobjasnených.

Nakoľko biofilmy môžu byť nebezpečné pre ľudský zdravie, je nevyhnutné prijímať vhodné a účinné opatrenia na ich prevenciu a elimináciu. Je to nekončiaci proces, v ktorom má veľký význam aj vzdelávanie zdravotníckych a laboratórných pracovníkov.

Pod'akovanie

Tento príspevok vyšiel s podporou projektu VEGA č. 1/0431/18 „Vzťah medzi zložením, štruktúrou a vlastnosťami anorganicko-organických nanokompozitných vrstiev pre ochranu materiálov“.

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

- [1] GARRETT T.R., BHAKOO M., ZHANG Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*. 2008; 18 (9): 1049-1056.
- [2] GRANT S., HUNG D. Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and the oxidative stress response. *Virulence*. 2013; 4: 273-283.
- [3] CIOFU O., ROJO-MOLINERO E., MACIÀ M.D., et al. Antibiotic treatment of biofilm infections. *APMIS*. 2017; 125 (4): 304-319.
- [4] WATNICK K., KOLTER R. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol*. 2000; 182: 2675-2679.
- [5] DAVIES D.G., GEESEY G.G. Regulation of the alginate biosynthesis gene alg C in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Appl Environ Microbiol*. 1995; 61: 860-867.
- [6] CHARACKLIS W.G., MARSHAL K.C. *Biofilms*. John Wiley and Sons, New York. 1990. Pages 816. ISBN 13 9780471826637.
- [7] SERRA D.O., HENGGE R. Stress responses go three dimensional – the spatial order of physiological differentiation in bacterial macrocolony biofilms. *Environ Microbiol*. 2014; 16: 1455-1471.
- [8] JASS J., SURMAN S., WALKER J.T. *Medical Biofilms: Detection, Prevention and Control*. 1st Edition. The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, England. John Wiley & Sons Ltd., 2003. Pages 304. ISBN 978-0-471-98867-0.
- [9] DONLAN R.M., et al. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology*. 2002; 15 (2): 167-193.
- [10] DISTEL J.W., HATTON J.F., GILLESPIE M.J. Biofilm Formation in Medicated Root Canals. *Journal of Endodontics*. 2002; 28 (10): 689-693.
- [11] LEE K., YOON S.S. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm a Programmed Bacterial Life for Fitness. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2017; 27 (6): 1053-1064.
- [12] ROWLAND B.M. Bacterial contamination of dental unit waterlines: what is your dentist spraying into your mouth? *Clin Microbiol Newslett*. 2003; 25: 73-77.
- [13] O'TOOLE G., KAPLAN H.B., KOLTER R. Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*. 2000; 54: 49-79.
- [14] KIM K.Y., FRANK J.F. Effect of nutrients on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel. *J Food Protect*. 1995; 58: 24-28.
- [15] LANDINI P., ZEHNDER A.J. The global regulatory hns gene negatively affects adhesion to solid surfaces by anaerobically grown *Escherichia coli* by modulating expression of flagellar genes and lipopolysaccharide production. *J Bacteriol*. 2002; 184 (6): 1522-1529.
- [16] GORSKI L., PALUMBO J.D., MADRELL R.E. Attachment of *Listeria monocytogenes* to radish tissue is dependent upon temperature and flagellar motility. *Appl Environ Microbiol*. 2003; 69 (1): 258-266.
- [17] HOMMAIS F., LAURENT-WINTER C., LABAS V., et al. Effect of mild acid pH on the functioning of bacterial membranes in *Vibrio cholerae*. *Proteomics*. 2002; 2 (5): 571-579.
- [18] STOODLEY P., DODDS I., DE BEER D., et al. Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *J Appl Microbiol*. 1998; 85: 19S-28S.
- [19] YUNG-HUA L., XIAOLIN T. Quorum Sensing and Bacterial Social Interactions in Biofilms. *Sensors (Basel)*. 2012; 12 (3): 2519-2538.

- [20] BRACKMAN G., COS P., MAES L., et al. Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011; 55: 2655-2661.
- [21] YARWOOD J.M., et al. Generation of Virulence Factor Variants in *Staphylococcus aureus* Biofilms. *J Bacteriol.* 2007; 189 (22): 7961-7967.
- [22] DAVEY M.E., O'TOOLE G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000; 64: 847-867.
- [23] KURAMITSU H.K., HE X., LUX R., et al. Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiol Mol Rev.* 2007; 71: 653-670.
- [24] HOGAN D., KOLTER R. Why are bacteria refractory to antimicrobials? *Curr Opin Microbiol.* 2002; 5: 472-477.
- [25] CHIANG W.C., NILSSON M., JENSEN P.O., et al. Extracellular DNA shields against aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57: 2352-2361.
- [26] WALTERS M.C., ROE F., BUGNICOURT A., et al. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47: 317-323.
- [27] HENGZHUANG W., HOIBY N., CIOFU O. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibiotics in biofilm infections of *Pseudomonas aeruginosa* *in vitro* and *in vivo*. *Methods Mol Biol.* 2014; 1147: 239-254.
- [28] DORING G., FLUME P., HEIJERMAN H., et al. Treatment of lung infection in patients with cystic fibrosis: current and future strategies. *In J Cyst Fibros.* 2012; 11: 461-479.
- [29] SHI J., MAO N.F., WANG L., et al. Efficacy of combined vancomycin and fosfomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in biofilms *in vivo*. *PLoS ONE.* 2014; 9: e113133.
- [30] ABDALLAH M., BENOLIEL C., DRIDER D., et al. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Arch. Microbiol.* 2014; 196 (7): 453-472.
- [31] BRIDIER A., BRIANDET R., THOMAS V., et al. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling.* 2011; 27 (9): 1017-1032.
- [32] PASTAR I., NUSBAUM A.G., GIL J., et al. Interactions of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* USA300 and *Pseudomonas aeruginosa* in polymicrobial wound infection. *PLoS ONE.* 2013; 8: e56846 .

VEREJNÍ ZDRAVOTNÍCI A VZDELÁVANIE PUBLIC HEALTH PROFESSIONALS AND EDUCATION

MIČÍKOVÁ Lucia, SIVČÁKOVÁ Lenka

Regionálny úrad verejného zdravotníctva so sídlom v Trenčíne, Trenčín

ABSTRAKT

Východiská: Verejný zdravotník musí vedieť efektívne pracovať s informáciami. Kontinuálne vzdelávanie vo verejnom zdravotníctve je preto nevyhnutnosťou. Prioritou tvorcov politik, zástupcov akademickej pôdy, ale aj spoločnosti by malo byť vytváranie podmienok pre edukáciu pracovníkov, motiváciu sa ďalej vzdelávať a predovšetkým pre zotrvanie vo verejnom zdravotníctve.

Materiál a metódy: Na prieskum bol použitý neštandardizovaný dotazník v Google prostredí. Prieskumu sa zúčastnilo 42 respondentov, pracovníkov z rôznych oblastí verejného zdravotníctva. Na spracovanie výsledkov bol použitý program Microsoft Excel 2010. Na vyjadrenie využívame deskriptívnu štatistiku.

Výsledky: Zaznamenali sme, že verejní zdravotníci považujú svoje vzdelanie za dostatočné, ale je pre nich dôležité aj kontinuálne vzdelávanie. Viac ako polovica respondentov v súčasnosti neštuduje, ale väčšina absolvovala nejakú formu štúdia počas svojej praxe. Ako najväčšiu motiváciu študovať považujú finančné ohodnotenie a kariérny rast.

Záver: Je nevyhnutné vytvárať čoraz viac možností pre vzdelávanie verejných zdravotníkov a diskutovať o tejto problematike u odbornej verejnosti.

Kľúčové slová: Verejný zdravotník. Vzdelávanie. Špecializačné štúdium. Verejné zdravotníctvo

ABSTRACT

Background: Public health professional must be able to work effectively with information. Continuing education in public health is a necessity. The priority of policy-makers, academics, as well as companies should be to create conditions for worker education, motivation to further education, and, above all, to subsistence in public health.

Material and Methods: A non-standardized questionnaire in the Google was used for the survey. The survey was attended by 42 respondents, workers from various areas of public health. The Microsoft Excel 2010 program was used to the results. We use descriptive statistics to present the results.

Results: We noticed that public health professionals consider their education to be sufficient, but continuing education is also important to them. More than half of respondents are not currently studying, but most have completed some form of study during their practice. The greatest motivation to study is financial assessments and career growth.

Conclusion: It is necessary to create more and more opportunities for educating public health professionals and to discuss this issue with the professional public.

Key words: Public health professional. Education. Specialization study. Public health

ÚVOD

Aby sme udržali krok s počtom narastajúcich informácií, ktorými môžeme vo verejnom zdravotníctve disponovať, je potrebné zamerať sa na oblasť vzdelávania. Verejné zdravotníctvo je multidisciplinárny odbor, ktorého absolvent má vedomosti z rôznych oblastí, a to nielen zo zdravotníctva, ale aj humanitných vied. Dôležitým atribútom verejného zdravotníka je, že musí vedieť zaobchádzať a využívať dostupné informácie, vedomosti, zručnosti a kompetencie, ktoré tvoria základ pre ochranu a podporu verejného zdravia [1]. V súčasnej dobe, v ktorej je tlak na kvalitu vzdelávania enormný, vzniká potreba využívania moderných informačnokomunikačných technológií ako nástroja pre efektívny manažment informácií.

Verejné zdravotníctvo rovnako ako i mnoho iných odborov v súčasnosti trpí nedostatkom ľudských zdrojov. Pre tvorcov politik, zástupcov akademickej pôdy, ale aj pre verejnosť by malo byť dôležité vytvárať podmienky pre edukáciu pracovníkov, ktorí budú motivovaní ku kontinuálnemu vzdelávaniu.

Týmto príspevkom chceme poukázať na dôležitosť sústavného vzdelávania a taktiež prezentovať predbežné výsledky prieskumu záujmu a motivácie verejných zdravotníkov o ďalšie vzdelávanie, v ktorom budeme naďalej pokračovať.

SÚBOR A METÓDY

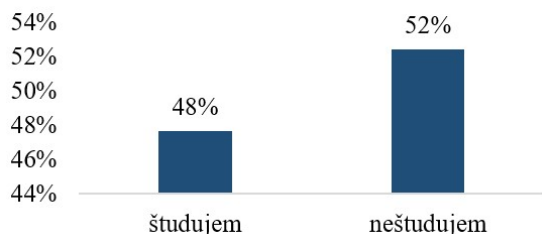
Pre zistenie záujmu verejných zdravotníkov o vzdelávanie sme využili neštandardizovaný dotazník, ktorý bol distribuovaný v Google prostredí. Prieskum bol realizovaný v roku 2018 u verejných zdravotníkov pracujúcich v rôznych oblastiach verejného zdravotníctva. Sledovaný súbor pozostával zo 42 respondentov – verejných zdravotníkov. Na spracovanie výsledkov sme využili program Microsoft Excel 2010. Interpretovali sme ich pomocou deskriptívnej štatistiky s využitím percentuálneho zhodnotenia grafov a tabuliek.

VÝSLEDKY

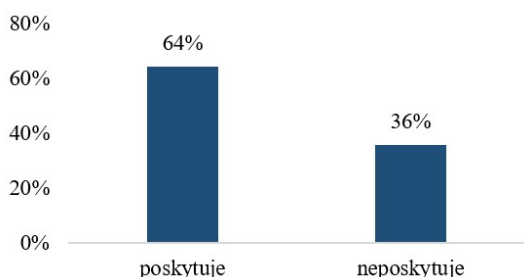
Súbor bol tvorený 42 respondentmi s priemerným vekom 35,4±9,8 roka. Väčšina respondentov bola vysokoškolsky vzdelaných, a to 88 %, stredoškolsky vzdelaných bolo 12 % respondentov. Na regionálnych úradoch verejného zdravotníka pracovalo až 57 % respondentov, v iných zdravotníckych zariadeniach ako nemocnice, výskumné ústavy, atď. pracovalo 26 % respondentov, v pracovných zdravotných službách pracovalo 12 % a na akademickej pôde pracovalo 5 % respondentov.

Prieskumom bolo zistené, že až 81 % respondentov považovalo ich vzdelanie zo štúdia za dostatočné, no napriek tomu považujú kontinuálne vzdelávanie za potrebné, 17 % respondentov považuje informácie zo štúdia za postačujúce a 2 % respondentov považuje svoje vzdelanie ako nedostatočné (Graf č. 1). V súčasnosti neštuduje 52 % respondentov a študuje 48 % respondentov (Graf č. 2).

Špecializačné štúdium (MPH) v našom súbore v súčasnej dobe študuje 60 % študujúcich respondentov, 15 % študujúcich respondentov je na doktorandskom štúdiu alebo sú prihlásení na rigorózne konanie a 10 % študujúcich respondentov študuje iný odbor na vysokej škole (Tabuľka č. 1).



Graf 2 Percentuálne zastúpenie respondentov podľa toho, či v súčasnosti študujú, n=42



Graf 4 Percentuálne zastúpenie respondentov podľa poskytovania určitej formy vzdelávania zamestnávateľom, n=42

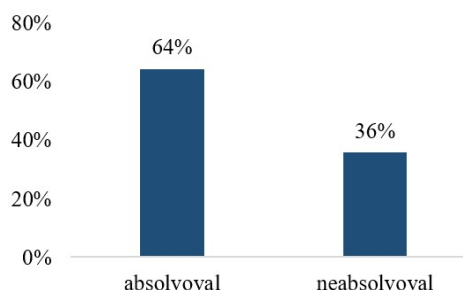
Tabuľka 1 Percentuálne zastúpenie respondentov podľa štúdia v súčasnosti, n=20

Súčasný štúdium	n	%
Špecializačné štúdium (MPH)	12	60
Doktorandské štúdium (PhD.)	3	15
Rigorózne konanie (PhDr.)	3	15
Iný odbor VŠ	2	10

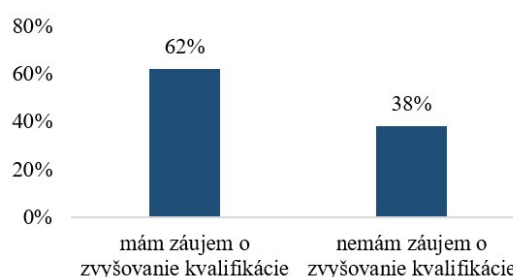
V rámci svojej praxe absolvovalo 64 % respondentov ďalší druh vzdelávania, špecializácie alebo certifikovanej pracovnej činnosti. Iný druh vzdelávania, špecializácie alebo certifikovanej pracovnej činnosti neabsolvovalo 36 % respondentov (Graf č. 3). Zamestnávateľia poskytujú v 64 % prípadov určitú formu vzdelávania, len 36 % zamestnávateľov vzdelávanie neposkytuje (Graf č. 4).



Graf 1 Percentuálne zastúpenie respondentov podľa hodnotenia vzdelania pri výkone ich práce, n=42



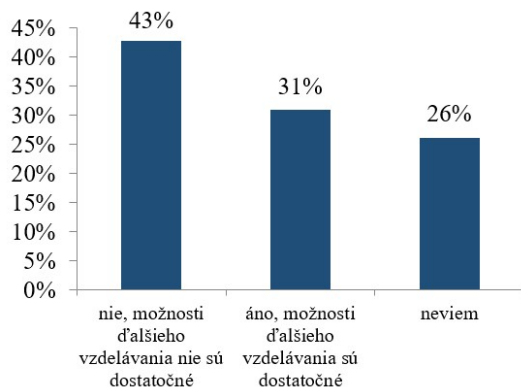
Graf 3 Percentuálne zastúpenie respondentov podľa absolvovania nejakého druhu vzdelávania počas svojej praxe, n=42



Graf 5 Percentuálne zastúpenie respondentov podľa záujmu o zvyšovanie kvalifikácie, n=42

Záujem o zvyšovanie kvalifikácie má 62 % respondentov, 38 % respondentov uviedlo, že záujem nemá (Graf 5).

To, že možnosti ďalšieho vzdelávania verejno-zdravotníckych pracovníkov nie sú dostatočné si myslí až 43 % respondentov, 31 % respondentov považuje možnosti ďalšieho vzdelávania za dostatočné a 26 % nevie, či možnosti sú alebo nie sú dostatočné (Graf č. 6).



Graf 6 Percentuálne zastúpenie respondentov podľa hodnotenia možností ďalšieho vzdelávania verejno - zdravotníckych pracovníkov, n=42

Zvýšenie mzdy by bolo motiváciou k ďalšiemu vzdelávaniu u 86 % respondentov. Kariérny postup by motivoval 55 % respondentov, zvýšenie odbornej kvalifikácie by motivovalo rovnako 55 % respondentov. O štúdium nemá záujem a žiadnu motiváciu nemá 7 % respondentov a 2 % respondentov študuje pre seba a nie pre kariéru (Tabuľka č. 2).

Tabuľka 2 Percentuálne zastúpenie respondentov podľa motivácie k ďalšiemu vzdelávaniu, n=42

Motivácia	n	%
zvýšenie mzdy	36	86
kariérny postup	23	55
zvýšenie odbornej kvalifikácie	23	55
nič by ma nemotivovalo, nemám záujem o štúdium	3	7
iné („študujem pre seba nie pre kariéru“)	1	2

DISKUSIA

Vzdelávanie verejných zdravotníkov je vysoko potrebné pre ďalšie efektívne fungovanie tohto odboru, ktorý sa stále rozvíja. V priebehu minulého storočia rozvoj verejného zdravotníctva prispel k prevencii, kontrole infekčných ochorení, vylepšovaniu vakcín, ale aj k bezpečnosti potravín, lepšej výžive a taktiež k podpore zdravia [2]. Tento odbor

má potenciál pre zlepšenie verejného zdravia, ale len za predpokladu, že bude disponovať vzdelanými profesionálmi, ktorí budú mať záujem o prehlbovanie si svojich vedomostí a odbornej praxe. Z našich výsledkov vyplýva, že väčšina respondentov má vysokoškolské vzdelanie. Táto skutočnosť súvisí s faktom, že v súčasnosti podľa Nariadenia vlády 296/2010 Z. z. o odbornej spôsobilosti na výkon zdravotníckeho povolania, spôsobe ďalšieho vzdelávania zdravotníckych pracovníkov, sústave špecializačných odborov a sústave certifikovaných pracovných činností, na výkon odborných pracovných činností v povolaní verejný zdravotník sa vyžaduje získanie vysokoškolského vzdelania v študijnom odbore verejné zdravotníctvo [3].

Primárnym zamestnávateľom absolventov z fakúlt verejného zdravotníctva sú regionálne úrady verejného zdravotníctva (RÚVZ), ktoré sa uvádzajú ako prvé pri uplatnení absolventa ako zdravotníckeho pracovníka vo všetkých odboroch RÚVZ [4]. Z tohto dôvodu bolo predvídateľné, že väčšina respondentov bude pracovať práve na RÚVZ (viac ako polovica). Medzi ďalšie inštitúcie, kde najviac pracujú verejní zdravotníci môžeme zaradiť pracovné zdravotné služby či nemocnice, čo korešponduje s našim prieskumom. Medzi respondentmi sme mali aj verejných zdravotníkov z akademickej pôdy. V súčasnosti sa dá verejné zdravotníctvo študovať na siedmich fakultách na Slovensku.

Viac ako tri štvrtina respondentov považuje svoje vzdelanie za dostatočné, čo môže svedčiť o názore, že výučba verejného zdravotníctva na Slovensku je dostatočná, ale potrebujú sa aj kontinuálne vzdelávať. Túto odpoveď považujeme za logickú, nakoľko aj keď je pregraduálne vzdelanie na dobrej úrovni, po príchode do praxe sme vystavení novým informáciám, na ktoré musíme vedieť adekvátne reagovať. Taktiež nás zaujímalo, koľko respondentov, ktorí považujú kontinuálne vzdelávanie za potrebné, v súčasnosti navštevuje nejaký druh štúdia. Viac ako polovica respondentov uviedla, že v súčasnosti neštuduje. Táto otázka bola zameraná predovšetkým na postgraduálne štúdium. Respondenti, ktorí študovali najčastejšie uviedli, že študujú študijný odbor Master of Public Health (MPH) – odborník na riadenie vo verejnom zdravotníctve. Predpokladáme, že toto zistenie súvisí s faktom, že podľa už vyššie citovaného nariadenia vlády č. 296/2010 Z. z. je jednou z podmienok pre vykonávanie funkcie vedúceho pracovníka dosiahnutie tohto vzdelania. Nasledovalo doktorandské štú-

dium, rigorózne štúdium a iné, ktoré sa venujú predovšetkým vedeckej činnosti spojenej s akademickou pôdou. Taktiež nás zaujímalo, či sa respondenti vzdelávali v minulosti. Z nášho prieskumu vyplýva, že viac ako polovica respondentov v minulosti absolvovala štúdium, a to predovšetkým špecializáciu. Toto zistenie je priamo prepojené s faktom, že v minulosti bol systém vzdelávania odlišný v získavaní špecializácií ako je tomu dnes. Zoznam špecializačného štúdia a certifikovaných pracovných činností, ktorý nájdeme v nariadení vlády č. 296/2010 Z. z. by sa mal zamerať na viac oblastí verejného zdravotníctva.

Z nášho pohľadu považujeme za potrebné, aby sa rozvíjali možnosti pre ďalšie vzdelávanie verejných zdravotníkov. V zahraničí má verejný zdravotník možnosť špecializovať sa v mnohých disciplínach a odvetviach už počas bakalárskeho štúdia. Bakalárske programy pripravujú študentov na širokú škálu pozícií v oblasti verejného zdravia. Taktiež už počas štúdia môžu absolvovať rôzne doplňujúce kurzy. Počas magisterského štúdia, ktoré je v zahraničí zakončené titulom MPH, ktorý sa predovšetkým v USA stáva štandardom. Výučba sa venuje predovšetkým oblastiam bioštatistiky, životnému prostrediu, epidemiológii, politike a manažmentu, sociálnym a behaviorálnym vedám. Za výhodu považujeme aj to, že študent sa môže na jednu z vybraných okruhov špecializovať a viac si prehĺbovať vedomosti v oblasti, ktorá ho prioritne zaujíma. Ako ďalšiu výhodu vo vzdelávaní verejného zdravotníctva v zahraničí môžeme uviesť možnosť vzdelávania verejných zdravotníkov vo viacerých odboroch, stále však so zameraním na verejné zdravotníctvo. Ako príklad uvádzame MPH / JD (Juris Doctor): Absolventi, ktorí majú MPH / JD sú zameraní na zdravotnú politiku a zákon v oblasti verejného zdravotníctva. Špecializačné programy sú taktiež zamerané na už vyššie uvedené okruhy verejného zdravotníctva, kde existuje mnoho modifikácií pre vzdelávanie [5]. Akceptujeme, že štúdium verejného zdravotníctva na Slovensku je postavené na iných základoch ako to v zahraničí, ale považujeme za potrebné, aby sme sa čoraz viac približovali zahraničným štandardom aj vzhľadom k tomu, že verejní zdravotníci hľadajú uplatnenie aj v zahraničí.

Taktiež jednou z vecí, ktoré nás zaujímali bolo, či zamestnávateľ poskytuje možnosti pre vzdelávanie. Viac ako polovica respondentov uviedla, že zamestnávateľ im poskytuje možnosti pre vzdelávanie a to predovšetkým formou interných seminárov

(najmä RÚVZ). Pracovníci z iných pracovísk uvádzali školenia, konferencie, jazykové kurzy, ale aj možnosti služobného voľna na ďalšie vzdelávanie. Sústavné vzdelávanie zdravotníckych pracovníkov na Slovensku je hodnotené podľa vyhlášky č. 366/2005 Z. z. o kritériách a spôsobe hodnotenia sústavného vzdelávania zdravotníckych pracovníkov na základe dosiahnutia kreditov v príslušnom zdravotníckom povolání. Sústavné vzdelávanie zdravotníckeho pracovníka sa hodnotí v pravidelných päťročných cykloch, kde zdravotnícky pracovník musí získať dostatok kreditov a ak ich nezíska, odporúča sa mu ďalší postup [6]. Podľa nášho názoru je potrebné prispôsobiť podmienky vzdelávania tak, aby pracovník mal možnosti vzdelávať sa v tom, čo ho zaujíma resp. v odbore, v ktorom pracuje. Kontrolu sústavného vzdelávania pomocou kreditného systému nepovažujeme za potrebnú. Faktom zostáva, že ak chce pracovník svoju prácu vykonávať pri súčasných nielen legislatívnych zmenách, ale aj zmenách vo využívaní informačných systémov, štandardoch a pod. sa musí kontinuálne vzdelávať. Viac ako polovica našich respondentov uviedla, že majú záujem o vzdelávanie. Často sa však stretávame s tým, že aj keď verejný zdravotník má záujem, možnosti pre zvyšovanie jeho kvalifikácie nie sú dostatočné. Podľa našej mienky môže táto skutočnosť súvisieť aj s nedostatkom špecializačných odborov. S našim názorom súhlasí skoro polovica respondentov, ktorí uviedli, že možnosti pre vzdelávanie v oblasti verejného zdravotníctva na Slovensku nie sú dostatočné. Tretina respondentov sa k tejto otázke nevedela vyjadriť. Predpokladáme, že nemajú dostatočné informácie alebo sa nezaujmajú o možnosti vzdelávania vo verejnom zdravotníctve. V tomto smere je potrebné motivovať verejných zdravotníkov k ďalšiemu vzdelávaniu. Väčšina verejných zdravotníkov uviedla, že by ich k štúdiu motivoval predovšetkým kariérny rast a finančné ohodnotenie, no vyskytli sa aj odpovede, že ich k štúdiu nemotivuje nič, nakoľko nemajú o štúdium vôbec záujem. Aj keď podľa nášho názoru by ďalšie vzdelávanie malo byť predovšetkým súčasťou kariérneho rastu každého verejného zdravotníka, súhlasíme aj s motiváciou vo forme finančného ohodnotenia.

Vo väčšine krajín bolo v minulosti vzdelávanie vo verejnom zdravotníctve integrované ako súčasť lekárskeho fakúlt. Verejné zdravotníctvo bolo tým pádom súčasťou medicíny, čo prinášalo určité vý-

hody - prepojenie potrieb spoločnosti, ale aj jednotlivca v oblasti zdravia. Dnes sa vytvárajú fakulty verejného zdravotníctva, ktoré majú rôzne úlohy, ciele, vnútorné štruktúry, inštitucionálne vzťahy a pod. [7]. Je potrebné, aby aj kontinuálne vzdelávanie bolo prispôsobené rôznym požiadavkám verejných zdravotníkov, aby mali možnosti si vybrať špecializačné štúdium podľa ich záujmu, ale aj rozšírenia možnosti doplnenia ďalšieho vzdelávania. Z tohto dôvodu sme sa rozhodli v našom prieskume pokračovať. Chceli by sme zistiť, čo najviac názorov na problematiku ďalšieho vzdelávania, ale aj vzdelávania ako takého v oblasti verejného zdravotníctva.

ZÁVER

V súčasnosti do praxe prichádza čoraz viac absolventov verejného zdravotníctva. Je dôležité nastaviť formy vzdelávania tak, aby sa dali čo najlepšie využiť v praxi. Považujeme za potrebné začať diskusiu o možnostiach ďalšieho vzdelávania verejných zdravotníkov a doplnenie možnosti špecializačného štúdia. Ako ukázali predbežné výsledky realizovaného prieskumu, verejní zdravotníci majú záujem vzdelávať sa, je však dôležité im vytvoriť vhodné podmienky. Ak verejného zdravotníka jeho práca zaujíma a má možnosti sa v nej ďalej rozvíjať a napredovať, stáva sa profesionálom, ktorý dokáže pozdvihnúť fungovanie odboru, akým je verejné zdravotníctvo na Slovensku.

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

- [1] CARON R.M. *Public Health Workforce*. Preparing the Public Health Workforce. Springer, Cham, 2015. p. 21-40. ISBN 978-3-319-07289-0.
- [2] TULCHINSKY T.H., McKEE M. Education for a public health workforce in Europe and globally. *Public health reviews*. 2011; 33: 33:BF03391617. Dostupné na internete: <https://doi.org/10.1007/BF03391617>
- [3] *Nariadenie vlády Slovenskej republiky 296/2010 o odbornej spôsobilosti na výkon zdravotníckeho povolania, spôsobe ďalšieho vzdelávania zdravotníckych pracovníkov, sústave špecializačných odborov a sústave certifikovaných pracovných činností*.
- [4] AKREDITAČNÁ KOMISIA. *Opis študijného odboru verejné zdravotníctvo*. 2018. Dostupné na internete: <https://www.portalvs.sk/sk/studijne-odbory/zobrazit/70402>
- [5] PUBLIC HEALTH CARE EREDU. *Public health degrees*. 2018. Dostupné na internete: <https://www.publichealthcareeredu.org/degrees/>
- [6] *Vyhláška č. 366/2005 Z. z. Vyhláška Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky o kritériách a spôsobe hodnotenia sústavného vzdelávania zdravotníckych pracovníkov*.
- [7] PACCAUD F., WEIHOFEN A., NOCERA S. Public health education in Europe: old and new challenges. *Public Health Reviews*. 2011; 33.1: 66. Dostupné na internete: <https://doi.org/10.1007/BF03391621>

VPLYV VEKU A POHLAVIA JEDINCOV NA PRIEMERNÉ HODNOTY AKTIVITY ENZÝMOV V SÉRE PACIENTOV S VYBRANÝMI SKUPINAMI OCHORENÍ
EFFECT OF AGE AND GENDER ON AVERAGE VALUES OF ENZYME ACTIVITIES
IN SERA OF PATIENTS WITH SELECTED DISEASE GROUPS

MATEJOVÁ Monika, KAŠLÍKOVÁ Katarína, KRAJČOVIČOVÁ Zdenka, MELUŠ Vladimír

Fakulta zdravotníctva, Trenčianska univerzita Alexandra Dubčeka v Trenčíne, Trenčín

ABSTRAKT

Enzýmy patria v dnešnej dobe medzi rutinné laboratórne parametre, ktoré majú význam pri mnohých ochoreniach. Naša štúdia sa venuje významu laboratórneho stanovenia aktivity vybraných enzýmov v sére: asparátaminotransferázy (AST), alanínaminotransferázy (ALT) a gama-glutamyltransferázy (GMT). Cieľom štúdie bolo overiť základné charakteristiky priemernej aktivity enzýmových aktivít v základnom súbore 80 pacientov s nádorovým ochorením (n=21), ischemickým ochorením srdca (n=24) a chorobami pečene (n=35). Medzi jednotlivými tromi podsúbormi boli štatisticky významné rozdiely vo veku (ANOVA, $p < 0,001$), pričom najnižší priemerný vek bol zistený u pacientov s chorobami pečene (49,9±9,6 roku), najvyšší priemerný vek vykazoval súbor s ischemickým ochorením srdca (62,2±3,2 roku). Na vekových rozdieloch mali podiel najmä muži (ANOVA, $p < 0,001$). V enzýmových aktivitách sme medzi jednotlivými podsúbormi zistili rozdiel v enzýmovej aktivite ALT u mužov (ANOVA, $p = 0,004$) a AST taktiež u mužov (ANOVA, $p = 0,03$). Naše výsledky naznačujú, že v sledovanom súbore predstavovalo zastúpenie pohlaví významný faktor, ktorý ovplyvňoval základné vekové charakteristiky posudoborov, ako aj mieru štatistickej významnosti rozdielov v priemernej enzýmovej aktivite. Naše zistenia podporujú predpoklad, že heterogametické pohlavie je z aspektu metabolických ochorení jedným z rizikových faktorov.

Kľúčové slová: Enzým. Enzýmová aktivita. Alanínaminotransferáza. Asparátaminotransferáza. Gama-glutamyltransferáza

ABSTRACT

Nowadays, enzymes belong to the routine laboratory parameters and are important factors in many diseases. Our study focuses on the importance of laboratory examination of the activity of selected serum enzymes: aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and gamma-glutamyl transferase (GMT). The aim of the study was to verify the basic characteristics of average enzyme activities in a population of 80 patients with cancer (n=21), ischemic heart disease (n=24) and liver disease (n=35). There were statistically significant differences in age (ANOVA, $p < 0.001$) among the three subgroups, with the lowest value being found in patients with liver disease (49.9±9.6 years), the highest mean of the age had the subgroup with ischemic heart disease 62.2±3.2 years). In age differences, the main proportion was caused mainly by male (ANOVA, $p < 0.001$). In enzyme activities, we found differences in male ALT enzyme activity (ANOVA, $p = 0.004$) and also in AST activity in males (ANOVA, $p = 0.03$) among the same subgroups. Our results indicate that gender was a significant factor in the observed population, which influenced the basic age characteristics of the subgroup, as well as the degree of statis-

tical significance of the differences in average enzyme activities. Our findings support the assumption that heterogametic sex is one of the risk factors for the metabolic disease aspect.

Key words: Enzyme. Activity of enzymes. Alanine aminotransferase. Aspartate aminotransferase. Gamma-glutamyltransferase

ÚVOD

Enzýmy sú významnou súčasťou každého organizmu. Ide o špecifické biokatalyzátory, ktoré umožňujú, aby chemické reakcie v organizme uskutočňovali za podmienok zlučiteľných so životom.

V laboratórnej diagnostike má stanovenie enzýmovej aktivity aj napriek významným pokrokom stále svoje miesto. Nami vybrané enzýmy asparátaminotransferáza (AST), alanínaminotransferáza (ALT) a gama-glutamyltransferáza (GMT), ktorým sa bližšie venujeme, patria k dôležitým a významným parametrom predovšetkým pri diagnózach spojených s ochoreniami pečene, žlčových ciest a zároveň dochádza k nárastu ich katalytickej aktivity v sére aj pri rôznych ochoreniach spojených s chorobami srdca alebo svalov.

ALT (L-alanín-2-oxoglutarát-aminotransferáza - EC 2.6.1.2.)

ALT patrí medzi aminotransferázy, preto katalyzuje prenos amino skupiny z aminokyseliny alanínu na kyselinu 2-oxoglutarátovú za vzniku kyseliny glutámovej a pyruvátu. Ide o intracelulárny enzým, ktorý sa nachádza hlavne v cytoplazme, ale aj v mitochondriách. Koenzýmom tohto enzýmu je pyridoxál-5-fosfát. Enzým u cicavcov (z pečene potkana) má relatívnu molekulovú hmotnosť M_r 18 300 a pH optimum 8,5 [1]. ALT sa nachádza predovšetkým v pečeni, ale aj v obličkách, kostrovom svalstve, srdci, pľúcach, slezine a aj v pankrease. Jeho aktivita v pečeni je 3000 násobne vyššia ako je v sére. Počas ALT v sére je 47±10 hodín. Na biochemické vyšetrenia sa odoberá krv za štandardných podmienok a materiál, ktorý sa používa je sérum alebo plazma. Stanovenie aktivity ALT môže

ovplyvňovať ikerus, ak je hodnota bilirubínu nad 1000 $\mu\text{mol/l}$. Hemoglobín v koncentrácii 3 g/l pri hemolýze zvyšuje hodnoty aktivity ALT asi o 10 % a ak je koncentrácia triacylglycerolov pri lipemii nad 11,4 mmol/l. Falošne zvýšené výsledky môžu byť aj pri užívaní rôznych drog a liečiv ako sú napríklad opiáty alebo pri užívaní erythromycínu. Pokles, ale aj nárast aktivity môže spôsobiť aj požitie bylenných a prírodných prípravkov. Falošné zníženie sa sleduje aj pri požití kávy a kávových výrobkov. U detí bývajú aktivity ALT zvyčajne vyššie, rovnako je aktivita vyššia aj u mužov ako u žien. K zvýšeniu môže dôjsť po väčšej fyzickej námahe. Hodnoty sa menia aj zo dňa na deň, a to aj o 30 %. U obéznych ľudí, predovšetkým s ťažkou obezitou, je takisto pozorovaná zvýšená aktivita enzýmu, môže ísť o zvýšenie o 40 %.

AST (L-asparát-2-oxoglutarát-aminotransferáza - EC 2.6.1.1.)

AST sa zaradzuje rovnako ako ALT do skupiny aminotransferáz. Katalyzuje prenos amino skupiny z asparátu na kyselinu 2-oxoglutarátovú za vzniku kyseliny glutámovej a oxalacetátu. AST sa sleduje v dvoch izoenzýmoch. Jedným z nich je cytosólová (cAST) a druhá mitochondriálna forma (mAST). Až 80 % z celej AST v pečeni a v iných orgánoch tvorí práve mAST. V sére to u chorých, ale i zdravých ľudí predstavuje iba menej ako 12 % [2]. Práve aktivita cytosólvej formy je v sére prevažujúca [1, 4]. Pyridoxál-5-fosfát je koenzýmom aj u AST. U cicavcov (cytoplazma potkana) má enzým relatívnu molekulovú hmotnosť M_r 44 600 [3]. Aktivita AST sa pozoruje v kostrových svaloch, srdci, mozgu, obličkách, pankrease, pečeni, ale aj v erytrocytoch. V pečeni je jeho aktivita až 7000-krát vyššia ako je v sére. AST má polčas približne 17 ± 5 hodín [4]. Materiál sa odoberá za štandardných podmienok, používa sa plazma alebo sérum. Interferovať výsledky katalytickej aktivity enzýmu môže hemolýza, ktorá zvyšuje aktivitu AST, pretože lokalizácia tohto enzýmu je aj v erytrocytoch. Ovplyníť aktivitu môže aj koncentrácia triacylglycerolov, ktorá je nad 11,4 mmol/l pri lipemii a aj koncentrácia

bilirubínu približne nad 1000 $\mu\text{mol/l}$. K zníženým výsledkom môže dôjsť aj po užívaní niektorých liečiv ako napríklad metronidazol. Zníženie spôsobujú aj niektoré prírodné látky a byliny. Vyššie hodnoty sú u detí, rovnako aj muži majú vyššie hodnoty ako ženy. Hlavne u mužov je hodnota AST ovplyvňovaná aj pri fyzickej aktivite, a to až trojnásobne. K takémuto zvýšeniu môže dochádzať aj pri poškodení svalov. Nárast aktivity je pozorovaný aj pri ľuďoch s ťažšou obezitou, a to i o 40 %.

GMT (γ -glutamyltransferáza – EC 2.3.2.2.)

Za prenos gama-glutamylového zvyšku na iný akceptor je zodpovedný enzým GMT. Tento akceptor môže byť napr. aminokyselina alebo iný peptid. GMT sa radí medzi transferázy. Nachádza sa na membráne buniek a rôznych tkanív, ktoré môžu mať sekrečnú alebo absorpčnú funkciu. GMT sa vyskytuje v 11 izoenzýmoch. Je zodpovedný za syntézu glutathionu v bunkách. Aktivita enzýmu je hlavne v pečeni, pankrease, obličkách, ale aj v mozgu, srdci a slezine. Relatívna molekulová hmotnosť M_r ľudského pečeneového enzýmu je 90 000-120 000 a izoenzým z obličiek má $M_r=84$ 000 [5].

GMT sa v pečeni nachádza v hepatocytoch, žľčových cestách, ale aj pankreatických vývodoch v bunkách žľčovodov. Polčas rozpadu je 7-10 dní [4]. Hemolýza pri stanovení nemusí byť problém, keďže erytrocyty neobsahujú GMT. Medzi faktory, ktoré môžu ovplyvniť výsledky patria niektoré lieky ako sú napr. fenobarbitaly, ale aj zvýšená konzumácia mäsa zodpovedá za nárast hodnôt tohto enzýmu.

Aktivita enzýmu môže byť vyššia u mužov až o 50 %, pretože enzým sa nachádza aj v prostate a seminálnych vačkoch. Vzhľadom na to, že GMT obsahuje aj semenná tekutina, sa tento poznatok využíva aj pri forenznom vyšetrení znásilnení. U novorodencov je aktivita až päťkrát vyššia, pretože aj placenta obsahuje tento enzým. Aktivita je závislá aj od ďalších faktorov. S vekom aktivita stúpa. Rasa tiež podmieňuje aktivitu, u afrických ľudí môže byť až dvojnásobne vyššia. GMT sa nachádza aj v ľudskom mlieku, kde je jeho aktivita 1300-8300 U/l [6]. Referenčné hodnoty enzýmov sú uvedené v tab. 1.

Tabuľka 1 Referenčné intervaly aktivity vybraných enzýmov v sére človeka [7]

Enzým	Enzýmová aktivita ($\mu\text{kat/l}$)				
	6 týždňov	6 týždňov - 1 rok	1 - 15 rokov	15 - 60 rokov	nad 90 rokov
ALT	0,15 - 0,73	0,15 - 0,85	0,25 - 0,60	0,17 - 0,78	0,18 - 0,63
AST	0,38 - 1,21	0,27 - 0,97	0,20 - 0,63	0,16 - 0,72	0,10 - 0,63
GMT	0,37 - 3,0	0,10 - 1,04	0,10 - 0,39	Muži 0,14 - 0,84, ženy 0,14 - 0,68	0,05 - 0,78

Ochorenia a stavy spojené so zmenou aktivity ALT, AST, GMT

Hepatoocelulárne poškodenie

V rámci biochemickej diagnostiky existuje štandardný súbor vyšetrení, ktorý sa označuje ako pečňové testy. Medzi najdôležitejšie ukazovatele hepatocelulárneho poškodenia patria enzýmy ALT a AST. Zvýšenie 3 až 20 násobné je prítomné pri hepatitídach ako aj pri akútnych tak aj pri chronických. Pri akútnej hepatitíde A je enzým ALT prvým markerom, ktorý sa zvyšuje pri tomto ochorení. K jeho nárastu dochádza približne 3 až 4 týždne po infikovaní a hodnoty sa späť do normálneho rozpätia dostávajú po 8 až 12 týždňoch. Keďže pri hepatitíde B je inkubačná doba zväčša dlhšia, enzýmy zostávajú v norme aj po dobu 2-6 mesiacov a k následnému návratu k normálnym hodnotám oboch enzýmov dochádza až po 2-3 mesiacoch. Podobne je to aj pri hepatitíde C. Pre chronickú aktívnu hepatitídu je typický nárast hodnôt enzýmových aktivít aminotransferáz o 5 až 10 násobne oproti norme v závislosti od štádia ochorenia. Nárast hodnôt ALT a AST je mierny pri cholestatických ochoreniach pečene, pečňových cirhózach a pečňových neopláziách. Dôležitý je rovnako aj pomer AST/ALT, ktorý sa označuje ako de Ritisov index, ktorého využitie je hlavne pri alkoholovom poškodení pečene. Za špecifický pri alkoholových poškodeniach pečene sa považuje, ak je vyšší ako 2. De Ritisov index menší ako 1 je charakteristický pre vírusovú hepatitídu, ale ak dochádza k progresii ochorenia a pečňovej cirhóze, nadobúda hodnoty vyššie ako 1. Pomer vyšší ako 1 je aj pri metastázach v pečeni. ALT môže na krátku dobu vzrásť aj pri požití alkoholu. V konečných štádiách mnohých ochorení dochádza k návratu zvýšených hodnôt enzýmov k norme alebo iba mierne zvýšeným hodnotám.

Pri väčšine ochorení postihujúcich pečň je vyššia aktivita ALT ako AST. Výnimku tvorí Reyeov syndróm a alkoholové poškodenia [4].

GMT sa často posudzuje spoločne s ALP, ale GMT je citlivejší ukazovateľ. Pri cholestáze sa zvyšuje GMT priemerne dvanásťnásobne. Zvýšenie 5 a viac násobne je pri ochoreniach žľčových ciest. K miernemu zvýšeniu dochádza pri pečňových ochoreniach, približne dvojnásobné. Možné sú aj prípady, kedy je aktivita GMT pri cholestatických syndrómoch nízka. Mnohé látky, ktoré sú používané

v priemysle, chemikálie a liečivá, ale aj alkohol dokážu indukovať syntézu GMT v hepatocytoch de novo. Často sa teda stanovuje aktivita GMT pri teste chronickej konzumácii alkoholu. Tento test je však limitovaný hlavne nešpecifickosťou a individuálnou variabilitou. Po prerušení konzumácie alkoholu je polčas GMT 26 dní. Pri akútnej intoxikácii dochádza k zvýšeniu až desaťnásobne. Až k päťnásobnému zvýšeniu môže dôjsť pri akútnej vírusovej hepatitíde a chronickej aktívnej hepatitíde. Môže sa používať aj pomer GMT/AST, ktorý ak je nad 6 môže ísť o chronickú alkoholickú hepatitídu, hodnoty 3 až 6 sú pri cirhózach. V prípade, že sa hodnoty enzýmových aktivít pohybujú okolo normy, to v niektorých prípadoch nemusí znamenať vyliečenie pacientov, ale poukazovať na konečné štádia ochorenia pečene a vyčerpanie, resp. rapídny pokles syntézy enzýmov v hepatocytoch [8].

Podľa najnovších štúdií je aj u pacientov s chronickou hepatitídou alebo pacientov s cirhózou ako dôsledkom hepatitídy B, so zvýšenými hodnotami GMT a pomerom GMT/ALT > 1 a zároveň pomerom AST/ALT > 1, možný výskyt primárneho karcinómu pečene aj bez ohľadu na iné parametre (napr. alfa-fetoproteín) [9].

Ochorenia kardiovaskulárneho systému

Medzi biochemické ukazovatele pri poškodeniach srdca patrí aj AST. Jeho aktivita v sére stúpa po 3-8 hodinách od poškodenia srdca a vrchol aktivity dosahuje približne po 24 hodinách. K normálnym hodnotám sa opäť vracia po 3 až 6 dňoch. V minulosti bolo AST považované za dobrý a vhodný ukazovateľ poškodenia srdca, keďže jeho aktivita zostáva v norme pri pľúcnej embólii, ale aj pri angine pectoris, perikarditíde. Neskôr sa však zistilo, že k nárastu aktivity dochádza aj pri ochoreniach pečene alebo poškodeniach svalov. K nárastu hodnôt AST dochádza aj pri zlyhaní srdca, ktoré je spôsobené venostázou pečňových ciev a zhromažďovaním krvi v pečeni. Po resuscitácii a operáciách srdca tiež stúpa AST.

Pri infarkte myokardu vždy dochádza k nárastu hodnôt AST, ale hodnoty ALT nemusia stúpať proporcionálne. Ak teda dôjde k nárastu hodnôt AST, ale ALT zostane v normálnych hodnotách, potvrdzuje to ochorenia srdca [10].

Mnoho štúdií poukazuje na súvislosť nárastu aktivity GMT s výskytom ochorení kardiovaskulárneho systému, vysokého krvného tlaku, arytmií a vyššou kardiovaskulárnou mortalitou. Katalytická

aktivita GMT bola pozorovaná aj v aterosklerotických plakoch a táto aktivita korelovala s celkovou aktivitou tohto enzýmu. Je však nutné, aby boli vykonané ďalšie štúdie, ktoré sa budú venovať práve zvýšenej aktivite GMT pri kardiovaskulárnych ochoreniach, ktoré by mohli určiť či je enzým skutočne vhodným ukazovateľom zvýšeného rizika kardiovaskulárnych ochorení [11].

Ostatné ochorenia

So zmenou aktivity aminotransferáz, predovšetkým AST sa spájajú aj ochorenia kostrových svalov. V začiatkových štádiách svalovej dystrofie dochádza k nárastu hodnôt AST, ale napr. aj pri pomliaždení svalov. Aktivita tohto enzýmu narastá aj pri šoku, otrave oxidu uhoľnatým, po podaní morfínu a pri závislosti od heroínu. Aktivita ALT a AST môže byť znížená v dôsledku nedostatku vitamínu B9, ktorého derivátom je pyridoxálfosfát – koenzým aminotransferáz [1]. V plodovej vode dochádza k zvýšeniu hodnôt AST pri infarktoch placenty [2]. K nárastu aktivity GMT dochádza aj pri obštrukčnej chorobe pľúc, renálnej insuficiencii a diabetes mellitus [4].

Tehotenstvo

Počas fyziologického tehotenstva dochádza k miernemu poklesu ALT, AST aj GMT oproti referenčným hodnotám u zdravých netehotných žien. V prvom trimestri dochádza k zníženiu do 10 %. V druhom trimestri ALT aj AST zostáva znížené do 10 %, ale pri GMT dochádza k zníženiu medzi 11 až 30 %. V treťom trimestri sa pozoruje u AST a ALT pokles do 2 % a u GMT do 10 % [12].

CIEĽ

Cieľmi štúdie bolo overenie miery rozdielov medzi enzýmovými aktivitami v súbore pacientov s nádorovým ochorením (podsubor C), ischemickým ochorením srdca (podsubor I) a chorobami pečene (podsubor K), s prihliadnutím na vekovú štruktúru súboru a zastúpenie oboch pohlaví.

MATERIÁL A METÓDY

Pri *in vitro* kvantitatívnom stanovovaní katalytickej aktivity ALT laboratórium využívalo diagnostickú súpravu COBAS INTEGRA Alanine Aminotransferase systémom COBAS INTEGRA, ktorá umožňuje stanovenie v plazme aj v sére. Diagnostické súpravy použité pre stanovenie AST a GMT boli použité od rovnakého výrobcu.

Súbor pacientov

Základný súbor pacientov tvorilo 80 jedincov, ktorí boli vyšetrení v období mesiacov január až jún 2015 v ambulantných pracoviskách spádového zdravotníckeho zariadenia a boli zahrnutí do štúdie konzekutívnym spôsobom. Pacienti boli rozdelení do troch súborov na základe ich diagnózy. Prvý súbor tvorilo 21 pacientov s nádorovým ochorením (podsubor C). Priemerný vek všetkých pacientov v tomto súbore bol 56,3 rokov, pričom v súbore bolo 12 mužov a 9 žien. Priemerný vek mužov bol 56,9 rokov a priemerný vek žien bol 55,4 rokov. Druhý súbor tvorili pacienti s diagnózou ischemické ochorenie srdca (podsubor I). Celkovo súbor pozostával z 24 pacientov s priemerným vekom 62,2 rokov. Súbor obsahoval z pohľadu zastúpenia pohlaví 17 mužov s priemerným vekom 62,4 rokov a 7 žien s priemerným vekom 61,7 roku. Tretí súbor boli pacienti s chorobami pečene (podsubor K), ktorých bolo spolu 35. Ich priemerný vek bol 49,9 roku. Počet mužov bol 25 a ich priemerný vek predstavoval hodnotu 48,5 rokov. Počet žien bol 10 pričom ich priemerný vek bol 53,2 rokov. Z hľadiska štúdie bolo veľmi dôležité pracovať s vyváženým zastúpením oboch pohlaví. Predbežné štatistické testy našu požiadavku nevyhlúčili (Chí-kvadrátový test, $p=0,4991$, d.f. =2).

Štatistické spracovanie dát

Súbor dát sme spracovali v tabuľkovej databáze editora MS Excel. Pre všetky numerické sledované parametre enzýmovej aktivity sme vypočítali základnú štatistickú charakteristiku, danú celkovým počtom jedincov, aritmetickým priemerom, smerodajnou odchýlkou, mediánom, minimálnou a maximálnou hodnotou. Významnosť štatistických rozdielov v priemernej aktivite sledovaných enzýmov medzi podsúbormi pacientov sme overili s pomocou analýzy rozptylu (ANOVA) a následným Tukeyovým testom. Základné podsúbory spĺňali predpoklad normality distribúcie dát (overené Komogorov-Smirnovým testom, ktorý bol súčasťou algoritmu výpočtov), preto sme ANOVA použili aj v prípade ich rozdelenia na menej početné celky (podľa pohlavia). Ako neparametrickú alternatívu ANOVA pri nesplnení viacerých podmienok jej použitia sme využili neparametrický Kruskal-Wallisov test a následný Dunnov test. V prípade, ak p-hodnota testovacieho kritéria bola menšia ako číselná hodnota 0,05, zamietli sme predpoklad zhody priemerných hodnôt porovnávaných súborov.

VÝSLEDKY

Základné charakteristiky súborov jedincov

V podsúbore C bolo $n=21$ jedincov. Priemerný vek pacientov bol $56,3\pm 9,9$ rokov. V druhom podsúbore I s počtom pacientov 24, priemerný vek nadobudol hodnotu $62,2\pm 3,2$ rokov. Podsúbor K obsahoval 35 pacientov, ich priemerný vek mal hodnotu $49,9\pm 9,6$. Pristúpili sme k štatistickému overeniu pomocou testu ANOVA a na porovnávanie dvojíc sme použili Tukeyov test. Štatisticky významné rozdiely v priemernom veku sme pozorovali medzi podsúbormi pacientov C a K a extrémne významné rozdiely medzi podsúbormi I a K (tabuľka 2).

Podsúbor C tvorilo 12 mužov, ktorých priemerný vek nadobudol hodnotu $56,9\pm 9,8$ rokov. V druhom podsúbore I bolo 17 mužov. Aritmetický priemer so smerodajnou odchýlkou mal hodnotu $62,4\pm 3,3$ rokov. Počet mužov v treťom podsúbore K s pacientami s ochorením pečene bol $n=25$ a ich priemerný vek bol $48,5\pm 8,7$ rokov. Následne sme rozdiely medzi jednotlivými podsúbormi overili pomocou analýzy rozptylu (ANOVA) a Tukeyovým testom dvojíc. Zistili sme, že štatisticky veľmi významné rozdiely v priemernom veku u mužov sú medzi podsúbormi pacientov C a K, štatisticky extrémne významné rozdiely sme sledovali u mužských pacientov medzi podsúbormi I a K (tabuľka 2).

V podsúbore s nádorovými ochoreniami (C) bolo 9 žien. Ich priemerný vek mal hodnotu $55,4\pm 10,5$ rokov. Podsúbor pacientov s ischemickým ochorením srdca s označením I tvorilo 7 žien.

Priemerný vek mal hodnotu $61,7\pm 3,3$ rokov. V poslednom podsúbore K bolo 10 žien s chorobami pečene a ich priemerný vek nadobudol hodnotu $53,2\pm 11,3$ rokov. Po porovnaní rozdielov prostredníctvom analýzy rozptylu ANOVA a následným Tukeyovým testom dvojíc sme u žien nesledovali štatisticky významné rozdiely v priemernom veku medzi podsúbormi (tabuľka 2).

Porovnanie aktivity ALT

Počet pacientov v prvom podsúbore C $n=21$. Aritmetický priemer so smerodajnou odchýlkou zistenej enzýmovej aktivity ALT predstavoval hodnotu $0,547\pm 0,328$ $\mu\text{kat/l}$. U pacientov podsúboru I ($n=24$) sme zistili priemernú enzýmovú aktivitu ALT na úrovni $0,390\pm 0,141$ $\mu\text{kat/l}$. V podsúbore K, ktorý obsahoval 35 pacientov s chorobami pečene, sme zistili priemernú enzýmovú aktivitu ALT na úrovni $0,927\pm 0,858$ $\mu\text{kat/l}$ (tabuľka 3). Z údajov v tabuľke 3 je zrejmé, že na výslednej štatistickej významnosti sa podieľajú predovšetkým rozdiely medzi podsúbormi u mužov ($p=0,004$).

Vzhľadom k tomu, že analýza rozptylu (ANOVA) odhalila štatisticky významné rozdiely medzi podsúbormi ($p=0,003$), pristúpili sme k overeniu významnosti rozdielov medzi priemernými hodnotami jednotlivých dvojíc podsúborov (tabuľka 4). Zistili sme štatisticky významné rozdiely medzi priemernými hodnotami podsúboru I a K (Tukeyov test, $p<0,01$; tabuľka 4). K významnosti celkových rozdielov prispievali predovšetkým muži (tabuľka 3, testovanie rozdielov medzi dvojicami podsúborov udáva tabuľka 4).

Tabuľka 2 Štatistické porovnanie veku medzi jednotlivými podsúbormi

Podsúbor	Popisná štatistika						<i>p</i> (ANOVA)	<i>p</i> (Tukey)			
	<i>n</i>	\bar{x}	<i>sd</i>	x_m	<i>min</i>	<i>max</i>		Podsúbor	C	I	K
Všetci pacienti											
C	21	56,3	9,9	59,0	35	67	p<0,001	C	-	ns	*
I	24	62,2	3,2	62,5	57	69		I	ns	-	***
K	35	49,9	9,6	52,0	31	66		K	*	***	-
Muži											
C	12	56,9	9,8	59,5	35	67	p<0,001	C	-	ns	**
I	17	62,4	3,3	63,0	57	69		I	ns	-	***
K	25	48,5	8,7	48,0	34	66		K	**	***	-
Ženy											
C	9	55,4	10,5	58,0	35	67	p=0,21	C	-	ns	ns
I	7	61,7	3,3	62,0	57	66		I	ns	-	ns
K	10	53,2	11,3	56,0	31	66		K	ns	ns	-

Legenda: C – pacienti s nádorovým ochorením, I – pacienti s ischemickým ochorením, K – pacienti s chorobami pečene, *n* – počet pacientov, \bar{x} – aritmetický priemer, *sd* – smerodajná odchýlka, x_m – medián, *min* – minimálna hodnota, *max* – maximálna hodnota, *p* – hodnota testovacieho kritéria ANOVA s následným Tukeyovým testom dvojíc: ns – štatisticky nevýznamný $p>0,05$, * – štatisticky významný $p<0,05$, *** – štatisticky extrémne významný $p<0,001$

Tabuľka 3 Štatistické porovnanie hodnôt ALT medzi jednotlivými podsúbormi

Podsúbor	<i>n</i>	\bar{x}	<i>sd</i>	x_m	<i>min</i>	<i>max</i>	<i>p</i>
Všetci pacienti							
C	21	0,547	0,328	0,470	0,110	1,240	0,003
I	24	0,390	0,141	0,375	0,180	0,660	
K	35	0,927	0,858	0,710	0,160	3,540	
Muži							
C	12	0,621	0,329	0,625	0,110	1,240	0,004
I	17	0,376	0,144	0,380	0,180	0,640	
K	25	1,001	0,792	0,730	0,260	3,330	
Ženy							
C	9	0,449	0,318	0,360	0,170	1,110	0,540
I	7	0,423	0,137	0,360	0,290	0,660	
K	10	0,741	1,027	0,330	0,160	3,540	

Legenda: C – pacienti s nádorovým ochorením, I – pacienti s ischemickým ochorením, K – pacienti s chorobami pečene, *n* – počet pacientov, \bar{x} – aritmetický priemer, *sd* – smerodajná odchýlka, x_m – medián, *min* – minimálna hodnota, *max* – maximálna hodnota, *p* – hodnota testovacieho kritéria ANOVA

Tabuľka 4 Štatistické porovnanie rozdielov ALT medzi podsúbormi

Podsúbor	C	I	K
Všetci pacienti			
C	-	ns	ns
I	ns	-	**
K	ns	**	-
Muži			
C	-	ns	ns
I	ns	-	**
K	ns	**	-

Legenda: Tukeyov test dvojíc: ns – štatisticky nevýznamný $p > 0,05$, ** – štatisticky veľmi významný $p < 0,01$

Porovnanie aktivity AST

Pacientov v podsúbore C bolo spolu 21, priemerná hodnota zistenej enzýmovej aktivity AST bola $0,595 \pm 0,541$ $\mu\text{kat/l}$. V podsúbore pacientov I bolo $n=24$ a aritmetický priemer so smerodajnou

odchýlkou nadobudol hodnotu $0,385 \pm 0,108$ $\mu\text{kat/l}$. Podsúbor K tvorilo 35 pacientov priemerná hodnota zistenej enzýmovej aktivity AST bola $0,699 \pm 0,841$ $\mu\text{kat/l}$ (tabuľka 5). Celkové štatistické rozdiely neboli štatisticky významné ($p=0,17$), avšak u mužov boli rozdiely významné na hladine $p=0,03$, čo spôsoboval rozdiel medzi priemernými hodnotami AST u pacientov s ischemickými ochoreniami ($0,372 \pm 0,114$) a ochoreniami pečene ($0,766 \pm 0,946$; tabuľka 5).

Porovnanie aktivity GMT

Výsledky štatistického spracovania výsledkov laboratórneho stanovenia GMT u pacientov sú uvedené v tabuľke č. 6. Ako vyplýva z uvedených výsledkov, medzi jednotlivými podsúbormi neboli zistené štatisticky významné rozdiely, a to ani v prípade zohľadnenia rozdielov medzi pohlaviami.

Tabuľka 2 Štatistické porovnanie nameraných hodnôt AST medzi jednotlivými podsúbormi

Podsúbor	<i>n</i>	\bar{x}	<i>sd</i>	x_m	<i>min</i>	<i>max</i>	<i>p</i>
Všetci pacienti							
C	21	0,595	0,541	0,360	0,150	2,320	0,170
I	24	0,385	0,108	0,375	0,240	0,670	
K	35	0,699	0,841	0,440	0,210	5,080	
Muži							
C	12	0,713	0,677	0,370	0,240	2,320	0,030
I	17	0,372	0,114	0,340	0,240	0,670	
K	25	0,766	0,946	0,550	0,270	5,080	
Ženy							
C	9	0,437	0,226	0,330	0,150	0,850	0,740
I	7	0,417	0,091	0,430	0,260	0,560	
K	10	0,534	0,490	0,335	0,210	1,820	

Legenda: C – pacienti s nádorovým ochorením, I – pacienti s ischemickým ochorením, K – pacienti s chorobami pečene, *n* – počet pacientov, \bar{x} – aritmetický priemer, *sd* – smerodajná odchýlka, x_m – medián, *min* – minimálna hodnota, *max* – maximálna hodnota, *p* – hodnota testovacieho kritéria Kruskal-Wallisovho testu

Tabuľka 6 Štatistické porovnanie nameraných hodnôt GMT medzi jednotlivými podsúbormi

Podsúbor	<i>n</i>	\bar{x}	<i>sd</i>	x_m	<i>min</i>	<i>max</i>	<i>p</i>
C	21	0,931	1,011	0,670	0,110	4,030	0,190
I	24	0,810	0,862	0,480	0,150	3,680	
K	35	1,403	1,895	0,880	0,190	10,200	
muži							
C	12	1,338	1,165	0,830	0,430	4,030	0,110
I	17	0,945	0,980	0,580	0,250	3,680	
K	25	1,564	2,128	0,890	0,280	10,200	
ženy							
C	9	0,389	0,329	0,260	0,110	1,120	0,180
I	7	0,483	0,331	0,370	0,150	1,180	
K	10	1,003	1,114	0,370	0,190	3,430	

Legenda: C – pacienti s nádorovým ochorením, I – pacienti s ischemickým ochorením, K – pacienti s chorobami pečene, *n* – počet pacientov, \bar{x} – aritmetický priemer, *sd* – smerodajná odchýlka, x_m – medián, *min* – minimálna hodnota, *max* – maximálna hodnota, *p* – hodnota testovacieho kritéria Kruskal-Wallisovho testu s použitým Dunnovým testom dvojíc

DISKUSIA

V súčasnosti sme svedkami o definovanie širšej palety pohlaví u človeka ako aj akcentu na absolútnu rovnosť pohlaví, ktorá sa prejavuje najmä na úrovni spoločenských a filozofických vedných disciplín. Z pohľadu laboratórnych vyšetrovacích metód však musíme zotrvať na konceptuálnej báze, ktorá je jednoznačne definovaná biochemickými, metabolickými, anatomickými a fyziologickými parametrami Homo sapiens. Z tejto premisy sú odvodené aj koncepty a ciele našej štúdie.

Sledovali sme tri podsúbory pacientov, ktoré tvorili pacienti s rôznymi diagnózami. Prvý podsúbor C obsahoval spolu 21 pacientov s nádorovým ochorením. Z celkového počtu pacientov v tomto podsúbore bolo 12 mužov a 9 žien. Podsúbor I tvorili pacienti s ischemickým ochorením srdca, ktorých bolo 24, z toho 17 mužov a 7 žien. Posledný sledovaný podsúbor pacientov s označením K bol zložený z pacientov s chorobami pečene. Počet všetkých pacientov v tomto podsúbore bol $n=35$, pričom ho tvorilo 25 mužov a 10 žien. Použitím kontingenčnej tabuľky a chí-kvadrátového testu sme overili či sú rozdiely v zastúpení pohlaví v sledovaných podsúboroch pacientov štatisticky významné. Zistená hodnota $p=0,4991$ svedčí o paritnom zastúpení oboch pohlaví v sledovaných podsúboroch.

Druhým krokom bolo overenie vekovej štruktúry jednotlivých troch podsúborov. Ako ukazujú naše výsledky, rozdiely v priemernej vekovej štruktúre medzi sledovanými podsúbormi boli štatisticky extrémne významné (ANOVA, $p<0,001$), pričom takmer identické dáta vykazovali súbory pri zastúpení oboch pohlaví ako aj pri zastúpení mužov. Najvyšší priemerný vek sme zistili v skupine pacientov

s ischemickým ochorením ($\bar{x}=62,2$ roku), nasledovali pacienti s nádorovými ochoreniami ($\bar{x}=56,3$ roku), najmladšou skupinou z hľadiska priemerného veku boli pacienti s chorobami pečene ($\bar{x}=49,9$ roka). V prípade mužov boli tieto dáta veľmi podobné, naopak, u žien sme nezistili štatisticky signifikantné rozdiely v priemernom veku medzi jednotlivými tromi súbormi (ANOVA, $p=0,21$). Tieto zistenia nám nebránili v ďalšom štatistickom spracovaní dát, avšak boli cenným obrazom zloženia a štruktúry vyšetrených súborov, ktoré sa do značnej miery zhoduje s predošlými štúdiami [13]. Uvedená heterogenita môže byť dôsledkom organizácie liečebno-preventívnej starostlivosti v zdravotníckych zariadeniach, ktoré využívajú služby laboratória..

V ďalšom slede sme sa venovali overovaniu rozdielov v katalytických aktivitách sledovaných enzýmov. Zo zistených katalytických aktivít jednotlivých enzýmov sme následne vypočítali aritmetický priemer, smerodajnú odchýlku, medián, minimálnu a maximálnu hodnotu a štatisticky porovnávali jednotlivé namerané hodnoty medzi podsúbormi. Významnosť štatistických rozdielov medzi súbormi sme porovnávali pomocou analýzy rozptylu (ANOVA) a následným Tukeyovým testom alebo Kruskal-Wallisovým testom a následným Dunnovým testom dvojíc.

Štatisticky významné rozdiely sme zistili pri porovnaní zistených hodnôt enzýmovej aktivity ALT medzi dvojicou podsúborov pozostávajúcich z pacientov s ischemickým ochorením srdca a podsúborom s chorobami pečene ($p<0,01$). Rovnako sme pri porovnávaní pozorovali štatisticky významné rozdiely medzi priemernými hodnotami zistenej enzy-

movej aktivity ALT aj u mužov v podsúboroch pacientov s ischemickým ochorením srdca a chorobami pečene ($p < 0,01$). Pri porovnávaní rozdielov medzi priemernými hodnotami zistených enzýmových aktivít AST u mužov sme medzi podsúborom pozostávajúcím z pacientov s ischemickou chorobou srdca a podsúborom s pacientmi s chorobou pečene pozorovali, že rozdiely sú štatisticky významné ($p < 0,05$).

Všetky tri enzýmy, ktorým sme sa v našej štúdií bližšie venovali, patria do súboru testov, ktorý označujeme ako pečenné testy. Práve enzýmy ALT a AST patria k najvýznamnejším ukazovateľom hepatocelulárneho poškodenia. Pri hepatitídach dochádza k zvýšeniu ich aktivity 3 až 20 násobne oproti norme. Práve pri hepatitídach, či už vírusových alebo toxických, dochádza k najvyššiemu zvýšeniu týchto enzýmov. Oproti aminotransferázam katalytická aktivita enzýmu GMT pri mnohých ochoreniach pečene zostáva v norme alebo dochádza iba k miernym nárastom aktivity. Pri malignitách je zase naopak výraznejší nárast aktivity GMT oproti ALT a AST. V súčasnosti sa upúšťa od stanovovania enzýmovej aktivity AST ako ukazovateľa poškodenia srdca, vzhľadom k nízkej špecificite, keďže k jeho zvyšovaniu dochádza hlavne pri ochoreniach spojených s pečenu a jej poškodením, ale aj pri poškodeniach svalov. Pri angine pectoris, ktorá je jednou z foriem ischemického poškodenia srdca, zostáva enzýmová aktivita AST zväčša v normálnych hodnotách. Pri infarkte myokardu dochádza spravidla k zvýšeniu AST, ale ALT môže v tomto prípade zostávať v norme [9, 14, 15].

Preto je možné, že štatisticky významné rozdiely môžeme pozorovať práve medzi priemernými hodnotami podsúborov pacientov s ischemickým ochorením srdca a ochorením pečene. Zároveň zvýšenie enzýmových aktivít pri rôznych ochoreniach pečene pretrváva dlhšie, čo predstavuje časové rozmedzie od niekoľko týždňov až po niekoľko mesiacov (hlavne pri odlišných typoch hepatitíd) ako zvýšenie katalytickej aktivity enzýmov pri ischemických ochoreniach srdca (pri infarkte myokardu dochádza k návratu k normálnym hodnotám po 3-6 dňoch) [9].

Dôležité je prihliadať aj na fakt, že u enzýmov ALT aj AST dochádza k zmene ich aktivity aj zo dňa na deň aj o 30 %. U ľudí s ťažkou obezitou dochádza k nárastu aktivít aj o 40 %. Zvážiť by sme mali aj skutočnosť, že pacienti mohli byť v čase odberu vzoriek liečení, čo mohlo spôsobiť pokles

enzýmových aktivít až k norme alebo v prípade mnohých liekov aj nárast aktivít [16].

Napokon musíme zdorazniť aj fakt, že v prípade uvedených troch podsúborov sa jednalo o veľmi široko stanovené selekčné kritériá jednotlivých ochorení. Preto nám uvedené podsúbory už len zo svojej podstaty nemohli priniesť viac informácií.

ZÁVER

Vyšetrovanie enzýmovej aktivity patrí k rutinným činnostiam medicínskej laboratórnej diagnostiky. Vzhľadom na multifaktoriálnosť ochorení, u ktorých sa AST, ALT i GMT stanovujú, nie je zmysluplné predpokladať ich jednoznačnú špecificitu v zmysle zvýšenej koncentrácie v súboroch pacientov s daným ochorením. V prípadoch niektorých parametrov výrobcovia diagnostických súprav jednoznačne udávajú rôzne referenčné hodnoty pre mužov i pre ženy, ktoré musí laboratóriu zohľadniť pri validácii výsledkov vyšetrenia, navyiac s dôrazom na overenie vlastností spádovej populácie, v ktorej sa vyšetrenia vykonávajú. Vplyv veku na výsledky vyšetrení je podmienený vekovou skladbou ochorení a čiastočne aj špecializáciou a zameraním zdravotníckeho zariadenia, ktoré poskytuje liečebnopreventívnu starostlivosť.

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

- [1] BISSWANGER H. *Practical enzymology*. 2nd Edition, Wiley-Blackwell, 2013, 376 s., ISBN 978-3-527-65924-1.
- [2] MEŠKO D. et al. *Vademékum klinickej biochémié/Vademecum of Clinical Biochemistry*. Osveta, 1998, 1647 s., ISBN 8080630054.
- [3] RACEK J. et al. *Základy biochemie*. Galén, 2006, 329 s., ISBN 80-7262-324-9.
- [4] ZIMA T. *Laboratorní diagnostika*. Galén, 2009, 906 s., ISBN 9788072623723.
- [5] SHAW L.M., PETERSEN-ARCHER L., LONDON J.W., et al. Electrophoretic, Kinetic, and Immunoinhibition Properties of γ -Glutamyltransferase from Various Tissues Compared. *Clin Chem*. 1980; 26 (11): 1523-1527.
- [6] HEIL W., KOBERSTEIN R., ZAWTA M. Reference Ranges for Adults and Children: Pre-analytical Considerations, Roche Diagnostics GmbH, 2004, 231 s.
- [7] PRŮŠA R., ČEPOVÁ J., PETRÝLOVÁ K. *Průručka laboratorních vyšetření*. Triton, 2002, 176 s., ISBN 8072542737.

- [8] McCLATCHEY K.D. *Clinical Laboratory Medicine*. Lippincott Williams & Wilkins, 2002, 1693 s., ISBN 9780683307511.
- [9] JIAN-GONG Y., XIAO-FENG H., BING H., et al. Rule of changes in serum GMT levels and GMT/ALT and AST/ALT ratios in primary hepatic carcinoma patients with different AFP levels. *Cancer Biomark*. 2018; 21 (4): 743-746.
- [10] BYRNE C.J. *Laboratory tests: implications for nursing care*. Addison-Wesley Pub. Co., Health Sciences Division, 1986, 756 s., ISBN 0-201-12670-2.
- [11] KAZMIERCZAK S., AZZAZY H.M.E., BROWN S.M. *Diagnostic Enzymology*. De Gruyter; 2nd fully revised and extended edition, 2014, 220 s., ISBN: 9783110207248.
- [12] TURECKÝ L. Klinickobiochemické vyšetrenia a gravidita. *Praktická gynekologia*. 2005; 12 (4): 174–178.
- [13] VAN BEEK J.H.D.A., DE MOOR M.H.M., DE GEUS E.J.C., et al. The Genetic Architecture of Liver Enzyme Levels: GMT, ALT and AST. *Behavior Genetics*. 2013; 43 (4): 329–339.
- [14] EHRMANN J., HŮLEK P. et al. *Hepatologie*. 2. vyd., Grada, 2014, 658 s., ISBN: 859-404-924-027-2.
- [15] McCLATCHEY K.D. *Clinical Laboratory Medicine*. Lippincott Williams & Wilkins, 2002, 1693 s., ISBN 9780683307511.
- [16] MAŠTEROVÁ V., ČURDA M. *Úvod do laboratórnej diagnostiky v klinickej biochémií*. Rokus, 2016, 101 s., ISBN 9788089510467.

SYNDRÓMY DEFICITU KREATÍNU, ICH BIOMARKERY A POTENCIÁLNY VÝSKYT U DETÍ S PORUCHAMI AUTISTICKÉHO SPEKTRA CREATINE DEFICIENCY SYNDROMES, BIOMARKERS AND POTENTIAL FREQUENCY IN CHILDREN WITH AUTISM SPECTRUM DISORDERS

JURDÁKOVÁ Helena, GÓROVÁ Renáta

Chemický ústav, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Bratislava

ABSTRAKT

Syndrómy deficitu kreatínu patria medzi vrodené metabolické poruchy, zahŕňajú poruchy v syntéze a transporte kreatínu a spôsobujú deficit kreatínu v mozgu a tým aj závažné neurologické poruchy. V niektorých prípadoch sú prítomné poruchy autistického spektra, najmä pri deficite kreatínového transportéra. Pre potreby včasnej diagnostiky boli vyvinuté viaceré metódy stanovenia biomarkerov týchto ochorení, kreatínu a kyseliny guanidinooctovej, v biologických matriciach a ich vyšetrenie by malo byť súčasťou diferenciálnej diagnostiky u pacientov s mentálnou retardáciou a/alebo poruchami autistického spektra.

Kľúčové slová: Kreatín. GAA. AGAT. GAMT. Deficit kreatínového transportéra

ABSTRACT

The creatine deficiency syndromes are inborn errors of metabolism and include defects in synthesis and transport of creatine. Creatine deficiency in the brain causes neurological disease and is the characteristic hallmark of all types. In some cases the clinical symptoms include autistic spectrum disorders mainly in creatine transporter deficiency. Several methods for the determination of specific biomarkers of the syndromes, which are creatine and guanidinoacetic acid were developed for early diagnostic purposes in various biological matrices. Their examination should be included in differential diagnostics in patients with mental retardation and/or autistic spectrum disorders.

Key words: Creatine. GAA. AGAT. GAMT. Creatine transporter deficiency

ÚVOD

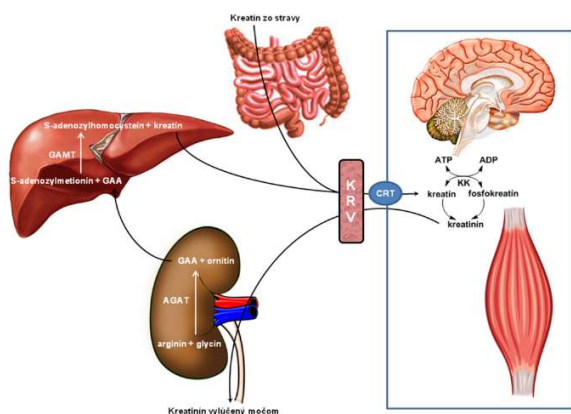
Syndrómy deficitu kreatínu (CDS, Creatine Deficiency Syndromes) patria do skupiny dedičných metabolických ochorení, kedy dochádza k poruche tvorby alebo transportu kreatínu. Kreatín a jeho fosforylovaná forma kreatín fosfát zohrávajú významnú úlohu pri ukladaní a prenose energie vo väčšine tkanív, prevažne však v kostrovom svalstve a mozgu [1]. Do skupiny CDS ochorení patria dve autozómálne recesívne poruchy syntézy kreatínu – deficit enzýmu arginín-glycínamidinotransferázy (AGAT) a guanidinoacetátmetyltransferázy

(GAMT), ako aj X-viazaná porucha deficitu kreatínového transportéra (CTD, Creatine Transporter Deficiency), kódovaného génom SLC6A8. Hlavnými symptómami CDS sú mentálna retardácia, poruchy reči, autistické správanie, hypotónia, epilepsia a znížený obsah kreatínu v mozgu, detegovateľný pomocou magnetickej rezonančnej spektroskopie [1,2].

Poruchy biosyntézy a transportu kreatínu

Endogénna syntéza kreatínu prebieha v dvoch enzymatických reakciách. V obličkách sa z arginínu a glycínu produkuje kyselina guanidinooctová (GAA). Táto reakcia je katalyzovaná enzýmom AGAT. Následne je GAA po prenose do pečene metylovaná s využitím metionínu a účinkom enzýmu GAMT za vzniku kreatínu. Do mozgu sa kreatín dostáva prostredníctvom špecifického membránového Na⁺ dependentného kreatínového transportéra (CRT), ktorý slúži ako prenášač cez hematoencefalickú bariéru (Obr. 1. a 2) [3]. Pacienti s GAMT deficitom vykazujú najzávažnejšie klinické spektrum príznakov, pre AGAT deficit býva typickým odlišovacím znakom myopatia [4]. Podľa Asociácie pre kreatínovú deficienciu (ACD; <https://creatine-info.org/>) sa odhaduje, že nedostatok kreatínového transportéra predstavuje druhú najčastejšiu príčinu X-viazaného mentálneho postihnutia, stále je však poddiagnostikovaný [1,5]. Presná prevalencia CTD nie je známa, napriek tomu niektoré zdroje odhadujú prevalenciu 0,2-3,5% medzi chlapcami s mentálnym postihnutím alebo poruchami autistického spektra (ASD, Autism Spectrum Disorders) [5]. Viacerí autori študovali prevalenciu CTD u pacientov s mentálnou retardáciou alebo ASD, pričom výsledky preukázali veľmi nízku prevalenciu CTD u detí s autistickým spektrom správania v porovnaní s pacientami s mentálnou retardáciou [5-9]. Avšak, pri skúmaní kohorty 20 pacientov s CTD malo 6 z nich poruchu autistického spektra [10].

Odporúča sa preto zahrnúť stanovenie charakteristických markerov CTD, prípadne deficitu AGAT a GAMT do selektívneho/novorodeneckého skríningu pre vrodené metabolické poruchy [4,8,9,11, 12], najmä v skupine detí s ASD.

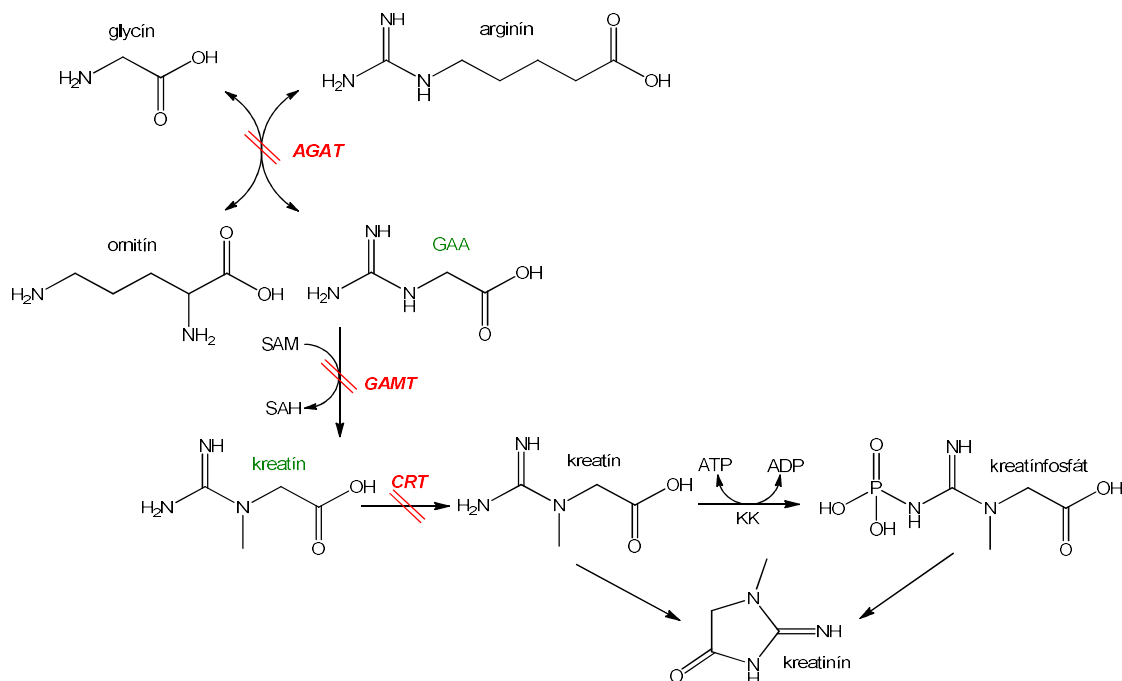


Obrázok 1 Hlavné cesty metabolizmu kreatínu v organizme. Legenda: ATP – adenzíntrifosfát, ADP – adenzíndifosfát, KK – kreatínkináza.

Biomarkery

Charakteristickým diagnostickým markerom AGAT deficitu je znížená koncentrácia GAA

v plazme, moči a cerebrospinálnej tekutine, zatiaľ čo pre GAMT deficit je charakteristická jej vysoká koncentrácia. Ako diagnostický marker pre CTD slúži zvýšený pomer kreatín/kreatinín v moči (Obr. 2). Plazmový kreatín je v prípade deficitu AGAT a GAMT deficitu znížený, pri CTD normálny [2,4]. S ohľadom na diagnostické potreby boli vyvinuté viaceré analytické metódy na stanovenie nízkych koncentrácií GAA a/alebo kreatínu v biologických vzorkách, ako napríklad plynová chromatografia s hmotnostnospektrometrickou detekciou (GC-MS) [13-16], neskôr najmä kvapalinová chromatografia s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (LC-MS/MS) [16-19], prípadne MS/MS s priamym nástrekom vzorky [20]. Nevýhodou pri stanovení obsahu kreatínu v moči je jeho nestabilita a narastajúca koncentrácia spôsobená bakteriálnou kontamináciou. V prípade, že sa stanovenie neuskutoční ihneď po odobratí, je nevyhnutné vzorku ihneď hlboko zamraziť a znížiť počet rozmrazení na minimum [14,21]. Auray-Blais a kol. (2014) publikovali metódu stanovenia CDS markerov vo vzorkách moču odobratých na filtračný papier v rámci skríninového programu v Quebecu. Výhodou je neinvazivnosť, ľahké vzorkovanie, zníženie nákladov na prepravu a skladovanie vzorky [22].



Obrázok 2 Schéma metabolickej dráhy kreatínu s vyznačenými miestami poruchy metabolizmu a transportu kreatínu (červeným) a charakteristickými biomarkermi (zeleným). Legenda: SAM – S-adenozylmetionín, SAH – S-adenozylhomocysteín, ATP – adenzíntrifosfát, ADP – adenzíldifosfát, KK – kreatínkináza.

Liečba

Stratégia liečby spočíva v orálnej suplementácii vysokých dávok monohydrátu kreatínu vo všetkých troch prípadoch. V prípade GAMT deficitu je nutné znížiť tvorbu neurotoxického medziproduktu GAA a to orálnou suplementáciou vysokých dávok ornitínu a nízkoproteínovou diétou vzhľadom na restrikciiu arginínu [1,2,4]. Terapia benzoátom sodným tiež prispieva k zníženiu tvorby GAA prostredníctvom naviazania glycinu, jedného zo substrátov pre tvorbu GAA [2]. V prípade CTD sa tiež pristupuje k suplementácii arginínom a glycinom, substrátov pre intracerebrálnu syntézu kreatínu [2,4]. Pre úspešnú liečbu AGAT a GAMT deficitu je nevyhnutná včasná diagnostika a nasadenie liečby čím skôr po narodení, čím sa dá predísť mentálnej retardácii [2,23,24]. Odpoveď na liečbu CTD je slabšia, skôr symptomatická (zlepšenie hypotónie a záchvatov), mentálna retardácia je však v tomto prípade nezvratná [2,23-25]. Správna diagnóza a včasná intervencia sú rozhodujúce pre stanovenie potrebnej liečby na zlepšenie kvality a dĺžky života pacienta s CDS [4,12].

ZÁVER

Zavedenie stanovenia kreatínu a kyseliny guanidinoacetovej ako charakteristických biomarkerov syndrómov deficitu kreatínu do klinickej praxe predstavuje významný prínos pre určenie správnej diagnózy, včasné nasadenie potrebnej liečby a zlepšenie kvality života pacientov s CDS. Ich vyšetrenie by malo byť riadnou súčasťou diferenciálnej diagnostiky u pacientov s mentálnou retardáciou a/alebo poruchami autistického spektra.

Pod'akovanie

Tento článok vznikol vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre dopytovo-orientovaný projekt: Univerzitný vedecký park Univerzity Komenského v Bratislave, ITMS 26240220086 spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja, projekt: Vybudovanie kompetenčného centra pre výskum a vývoj v oblasti molekulárnej medicíny, ITMS 26240220071 a podpore Agentúry pre výskum a vývoj, APVV-0840-11.

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

- [1] NASRALLAH F., FEKI M., KAABACHI N. Creatine and creatine deficiency syndromes: biochemical and clinical aspects. *Pediatr Neurol.* 2010; 42 (3): 163-171.
- [2] LONGO N., ARDON O., VANZO R., et al. Disorders of creatine transport and metabolism. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2011; 157C (1): 72-78.
- [3] WYSS M., KADDURAH-DAOUK R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev.* 2000; 80 (3): 1107-1213.
- [4] STOCKLER-IPSIROGLU S., VAN KARNEBEEK C.D. Cerebral creatine deficiencies: a group of treatable intellectual developmental disorders. *Semin Neurol.* 2014; 34 (3): 350-356.
- [5] THURM A., HIMELSTEIN D., D'SOUZA P., et al. Transporter Deficiency: Screening of Males with Neurodevelopmental Disorders and Neurocognitive Characterization of a Case. *J Dev Behav Pediatr.* 2016; 37 (4): 322-326.
- [6] CAMERON J.M., LEVANDOVSKIY V., ROBERTS W., et al. Variability of Creatine Metabolism Genes in Children with Autism Spectrum Disorder. *Int J Mol Sci.* 2017; 18 (8): pii: E1665.
- [7] SCHULZE A., BAUMAN M., TSAI A.C., et al. Prevalence of Creatine Deficiency Syndromes in Children With Nonsyndromic Autism. *Pediatrics.* 2016; 137 (1).
- [8] MERCIMEK-MAHMUTOGLU S., MUEHL A., SALOMONS G.S., et al. Screening for X-linked creatine transporter (SLC6A8) deficiency via simultaneous determination of urinary creatine to creatinine ratio by tandem mass-spectrometry. *Mol Genet Metab.* 2009; 96 (4): 273-275.
- [9] ARIAS A., CORBELLA M., FONS C., et al. Creatine transporter deficiency: prevalence among patients with mental retardation and pitfalls in metabolite screening. *Clin Biochem.* 2007; 40 (16-17): 1328-1331.
- [10] MILLER J.S., THOMAS R.P., BRUCHEY A., et al. Creatine Transporter Deficiency: A Rare Neurodevelopmental Disorder with ASD Symptomatology. 2017. Abstract Number:25807. <https://www.centerforautismresearch.org/creatinetransporterdeficiencyrareneurodevelopmentaldisorderasdSYMPTOMATOLOGY>
- [11] WANG L., ANGLELY M.T., SORICH M.J., et al. Is there a role for routinely screening children with autism spectrum disorder for creatine deficiency syndrome? *Autism Res.* 2010; 3 (5): 268-272.
- [12] DUNBAR M., JAGGUMANTRI S., SARGENT M., et al. Treatment of X-linked creatine transporter (SLC6A8) deficiency: systematic review of the literature and three new cases. *Mol Genet Metab.* 2014; 112 (4): 259-274.

- [13] CARTIGNY B., AZAROUAL N., MILLEHAMARD L., et al. ¹H NMR urine analysis as an effective tool to detect creatine supplementation. *J Anal Toxicol.* 2002; 26: 355-359.
- [14] PRIETO J.A., ANDRADE F., MARTÍN S., et al. Determination of creatine and guanidinoacetate by GC-MS: study of their stability in urine at different temperatures. *Clin Biochem.* 2009; 42 (1-2): 125-128.
- [15] NASRALLAH F., FEKI M., BRIAND G., et al. GC/MS determination of guanidinoacetate and creatine in urine: A routine method for creatine deficiency syndrome diagnosis. *Clin Biochem.* 2010; 43 (16-17): 1356-1361.
- [16] YOUNG S., STRUYS E., WOOD T. Quantification of creatine and guanidinoacetate using GC-MS and LC-MS/MS for the detection of cerebral creatine deficiency syndromes. *Curr Protoc Hum Genet.* 2007; Chapter 17: Unit 17.3.
- [17] JOVANOVIĆ P., VRANEŠ M., SAKAČ M., et al. Hydrophilic interaction chromatography coupled to tandem mass spectrometry as a method for simultaneous determination of guanidinoacetate and creatine. *Anal Chim Acta.* 2018; 1028: 96-103.
- [18] BOENZI S., RIZZO C., DI CIOMMO V.M., et al. Simultaneous determination of creatine and guanidinoacetate in plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *J Pharm Biomed Anal.* 2011; 56 (4): 792-798.
- [19] COGNAT S., CHEILLAN D., PIRAUD M., et al. Determination of guanidinoacetate and creatine in urine and plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 2004; 50 (8): 1459-1461.
- [20] CARDUCCI C., SANTAGATA S., LEUZZI V., et al. Quantitative determination of guanidinoacetate and creatine in dried blood spot by flow injection analysis-electrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta.* 2006; 364 (1-2): 180-187.
- [21] SAUDE E.J., SYKES B.D. Urine stability for metabolomic studies: effects of preparation and storage. *Metabolomics.* 2007; 3 (1): 19-27.
- [22] AURAY-BLAIS C., MARANDA B., LAVOIE P. High-throughput tandem mass spectrometry multiplex analysis for newborn urinary screening of creatine synthesis and transport disorders, Triple H syndrome and OTC deficiency. *Clin Chim Acta.* 2014; 436: 249-255.
- [23] SCHULZE A. Creatine deficiency syndromes. *Mol Cell Biochem.* 2003; 244 (1-2): 143-150.
- [24] LEUZZI V. Inborn errors of creatine metabolism and epilepsy: clinical features, diagnosis, and treatment. *J Child Neurol.* 2002; 17 Suppl 3: 3S89-97; discussion 3S97.
- [25] FONS C., SEMPERE A., ARIAS A., et al. Arginine supplementation in four patients with X-linked creatine transporter defect. *J Inheret Metab Dis.* 2008; 31 (6): 724-728.

**MONITORING ÚČINNOSTI STERILIZAČNÝCH PRÍSTROJOV
S VYUŽITÍM BIOINDIKÁTOROV**
**MONITORING OF THE EFFECTIVENESS OF STERILIZATION EQUIPMENT
USING BIOINDICATORS**

KAŠLÍKOVÁ Katarína, HMÍROVÁ Soňa, MELUŠ Vladimír, KRAJČOVIČOVÁ Zdenka

Fakulta zdravotníctva, Trenčianska univerzita Alexandra Dubčeka v Trenčíne, Trenčín

ABSTRAKT

Vestník Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky z roku 2014 uvádza odborné usmernenie na vykonávanie kontroly účinnosti procesu sterilizácie zdravotníckych pomôcok v zdravotníckych zariadeniach. V našej štúdii sme sa zamerali na využitie bioindikátorov v monitoringu sterilizačných prístrojov. Ako bioindikátor bola využitá suspenzia bakteriálnych spór (*Bacillus atropheus* a *Geobacillus stearothermophilus*) nanesených na primárnom nosiči. Cieľom štúdie bolo vyhodnotiť výsledky kontroly účinnosti sterilizácie vykonaných v období rokov 2016 a 2017. Vzorky boli rozdelené podľa okresov Trenčianskeho kraja a tiež podľa druhu testovaného sterilizačného prístroja. Bioindikátory boli doručené zo 7 okresov Trenčianskeho kraja a zo 4 druhov sterilizačných prístrojov. Všetky vzorky boli spracované na Regionálnom úrade verejného zdravotníctva so sídlom v Trenčíne (RÚVZ). Celkový počet vyhodnotených výsledkov bol 1208, z ktorých bolo 2,73 % pozitívnych. Naše výsledky svedčia o význame kontroly kvality sterilizačných postupov s využitím bioindikátorov.

Kľúčové slová: Bioindikátor. Sterilizácia. Sterilizačný prístroj. Kontrola.

ABSTRACT

The Bulletin of the Ministry of Health of the Slovak Republic of 2014 sets out the expert guidelines for performing a check on the effectiveness of the process of sterilization of medical devices in healthcare facilities. In our study, we focused on the use of bioindicators in the monitoring of sterilizing devices. As a bioindicator, a suspension of bacterial spores (*Bacillus atropheus* and *Geobacillus stearothermophilus*) applied on the primary carrier was used. The aim of the study was to evaluate the results of the sterilization effectiveness control in 2016 and 2017. The samples were distributed according to the districts of the Trenčín Region and also by the type of sterilization apparatus tested. The bioindicators were delivered from 7 districts of the Trenčín region and from 4 types of sterilizing devices. All samples were processed at the Regional Public Health Service (RÚVZ) in Trenčín. The total number of evaluated results was 1208 from both years, of which 2.73% were positive. Our results demonstrate the importance of controlling the quality of sterilization procedures using bioindicators.

Key words: Bioindicator. Sterilization. Sterilization device. Control.

ÚVOD

Sterilizácia je proces, ktorý vedie k usmrteniu živých mikroorganizmov, ktoré sa vedia rozmnožovať, vrátane inaktivácie ich spór. Nevratne ničí vírusy a usmrčuje zdravotne významné parazity a ich vajíčka. Cieľom sterilizácie je dosiahnuť stav úplnej sterility. Za sterilné sa považujú predmety, ktoré boli zbavené mikroorganizmov. Pre zdravotnícke pomôcky sa musí zvoliť vhodná metóda sterilizácie, pretože sú vyrobené z rôznych druhov materiálov. Okrem toho sa musí pred sterilizáciou vykonať predpísaná predsterilizačná príprava. Sterilizačné metódy sa vo všeobecnosti rozdeľujú do dvoch skupín a to na fyzikálne a chemické. Medzi fyzikálne patrí sterilizácia horúcim vzduchom, parou a plazmou. Chemické metódy sú založené na účinku chemických látok a predovšetkým formaldehydu a etylénoxidu [1-3].

Pri sterilizácii horúcim vzduchom sa mikroorganizmy ničia zohriatym vzduchom, t.j. suchým teplom. Využíva sa tu sálavosť a vodivosť tepla. Sterilizácia parou patrí k najefektívnejším technológiám. Dosahuje krátky expozičný čas, netoxickosť a nízku teplotu v porovnaní so sterilizáciou horúcim vzduchom. Plazmová sterilizácia vzniká pôsobením vysoko-frekvenčných vln na prekursor v elektromagnetickom poli v sterilizačnej komore pri vysokom vákuu. Táto sterilizácia je vhodná na sterilizáciu termolabilných pomôcok [4].

Etylénoxid sa využíva na sterilizáciu termolabilných pomôcok, optiky a gumy. V niektorých prípadoch je možná sterilizácia perín i matracov. Sterilizačný účinok formaldehydu pracuje na princípe alkalizácie bielkovín a inaktivácie enzýmov mikrobiálnych buniek. Formaldehydová sterilizácia je určená na sterilizáciu termolabilných predmetov, kanýl a katétrov. Neodporúča sa sterilizácia pomôcok z textilu.

Všetky horeuvedené metódy majú výhody i obmedzenia, ktoré sú prehľadne uvedené v tabuľke č. 1 [5].

Tabuľka 1 Výhody a nevýhody sterilizačných prístrojov [5]

Sterilizátor	Výhody	Nevýhody
Plazmový	<ul style="list-style-type: none"> • jednoduchá obsluha • vysoká bezpečnosť pre personál • nízka sterilizačná teplota (do 50 °C) • krátky sterilizačný program (max. 72 min) • nie je potrebné odvetrávanie • možnosť sterilizácie kovových predmetov 	<ul style="list-style-type: none"> • potreba špeciálneho obalového materiálu • pri dutých a dlhých nástrojoch je potrebný zosilňovač • nemožnosť sterilizácie papiera, textilu a roztokov
Horúcovzduchový	<ul style="list-style-type: none"> • jednoduchá sterilizácia a inštalácia • bezpečnosť pre personál • neprítomnosť chemických látok na nástrojoch a v prostredí • možnosť sterilizácie masť, olejov 	<ul style="list-style-type: none"> • vysoké teploty a dlhý expozičný čas • otupovanie nástrojov • poškodzovanie materiálov • nevhodný pre textil, gumu, plasty a porézny materiál
Parný	<ul style="list-style-type: none"> • krátka doba sterilizácie • možnosť sterilizácie väčšiny zdravotníckych materiálov • nízka ekonomická náročnosť • neprítomnosť žiadnych chemických látok 	<ul style="list-style-type: none"> • špeciálne požiadavky na inštaláciu • nebezpečenstvo výbuchu (tlaková nádoba) • nevhodnosť pre termolabilný materiál
Etylénoxidový	<ul style="list-style-type: none"> • dobrá penetrácia cez väčšinu plastových materiálov a obalov • vhodnosť použitia na duté pomôcky • jednoduchá kontrola cyklu 	<ul style="list-style-type: none"> • nutné odvetrávanie • dlhý sterilizačný cyklus • výbušnosť etylénoxidu • nutnosť skladovania v tlakových nádobách • toxicita, mutagenita a možná karcinogenita etylénoxidom
Formaldehydový	<ul style="list-style-type: none"> • nízka sterilizačná teplota • dobrá materiálová kompatibilita • nevýbušnosť formaldehydu • možnosť skladovania formaldehydu v tekutej forme 	<ul style="list-style-type: none"> • dĺžka sterilizačného cyklu • nevhodné na sterilizáciu textilu a dlhých dutých pomôcok • nízka stabilita a polymerizácia formalínu

BIOINDIKÁTORY

Na kontrolu účinnosti sterilizačných prístrojov sa používa fyzikálna, chemická a biologická kontrola. Biologická kontrola sa vykonáva pomocou bioindikátorov. Bioindikátory sú ideálnym ukazovateľom merania usmrtenia všetkých mikroorganizmov, ktoré sa nachádzajú na sterilizovaných pomôckach. Bioindikátor je prostriedok s presne definovaným počtom bakteriálnych spór, ktoré sú nanesené na papierovom nosiči v jeho primárnom obale. Na monitoring sterilizačných cyklov sa používajú bioindikátory s baktériami *Bacillus atrophaeus* a *Geobacillus stearothermophilus*. Počas sterilizácie sa vkladajú chemické a biologické indikátory podľa objemu sterilizátorov. Využívajú sa pri tom tzv. sterilizačné jednotky. Jedna sterilizačná jednotka zodpovedá objemu 54 litrov (tabuľka 2) [6, 7].

Biologické indikátory sa nikdy neumiestňujú mimo sterilizovaných predmetov. Umiestnené by

mali byť tam, kde sa sterilizuje najťažšie. V prípade dutých predmetov a predmetov so štrbinou nie je možné, aby sa bioindikátor umiestnil do tohto miesta, preto sa používa simulačná pomôcka. Simulačná pomôcka je zariadenie, ktoré sťažuje podmienky vo vnútri zdravotníckej pomôcky, tak aby boli dosiahnuté hodnoty pri sterilizačnom procese. Musí byť vyrobená podľa typu sterilizačného procesu a druhu sterilizovaných zdravotníckych pomôcok. V certifikáte od výrobcu sú uvedené vlastnosti stimulačnej pomôcky pórovitého typu alebo dutinového typu [8,9].

Kontrola účinnosti sterilizačného prístroja je veľmi dôležitá a je neoddeliteľnou súčasťou sterilizačného cyklu. Kontrola procesu sa riadi podľa vyhlášky MZ SR č. 553/2007 a Vestníka MZ SR 2014. Kontrolu vykonáva kvalifikovaný pracovník, ktorý musí dohliadať na fyzikálne hodnoty prístroja (čas, teplota, tlak) a tiež správnosť farebnej zmeny na chemických a biologických indikátoroch. Zmena oproti

Tabuľka 2 Stanovenie počtu biologických indikátorov podľa druhu sterilizátora [6]

Typ sterilizátora	Počet sterilizačných jednotiek/ objem komory	Počet biologických indikátorov (ks)
Parný	1 SJ	4
	2 – 5 SJ	8
	6 – 9 SJ	10
	10 – 17 SJ	16
	18 a viac SJ	22
Horúcovzduchový	do 5 l	3
	do 30 l	6
	do 60 l	8
	do 120 l	10
	nad 120 l	12
Etylénoxidový, formaldehydový a plazmový	do 60 l	4
	do 150 l	8
	nad 150 l	8 + 1 na každých 50 l

Legenda: SJ – sterilizačná jednotka, 1 SJ = 54 l

norme môže byť dôvodom na prerušenie alebo ukončenie sterilizačného procesu. Táto zmena môže viesť k oprave sterilizačného cyklu alebo celého prístroja. Za výkon a kontrolu je zodpovedný prevádzkovateľ [9].

Výber kmeňov je závislý od sterilizačného procesu. Vyberú sa také kmene, ktoré nie sú patogénne a ich rezistencia je vyššia ako patogénnych mikroorganizmov. Pre jednotlivé sterilizačné procesy sa vyberajú určité druhy mikroorganizmov a uprednostňujú sa tie, ktoré vytvárajú spóry. Používajú sa iba biologické indikátory, ktoré majú certifikát od výrobcu, v ktorom je uvedený testovací kmeň, populácia a dátum expirácie. Každý bioindikátor je vyrobený tak, aby obsahoval štandardný počet mikroorganizmov a aby ich trvácnosť bola niekoľko rokov. Biologické indikátory musia spĺňať požiadavky podľa normy STN EN ISO 11138-1 [8,11].

- pre parnú sterilizáciu: bioindikátor s hustotou suspenzie 10^6 ml baktérie *Geobacillus stearothermophilus*,
- pre formaldehydovú sterilizáciu: bioindikátor s hustotou suspenzie 10^6 ml baktérie *Geobacillus stearothermophilus*,
- pre plazmovú sterilizáciu bioindikátor s hustotou suspenzie 10^6 ml baktérie *Geobacillus stearothermophilus*,
- pre horúcovzduchovú sterilizáciu: bioindikátor s hustotou suspenzie 10^6 ml baktérie *Bacillus atrophaeus*,
- pre etylénoxidovú sterilizáciu: bioindikátor s hustotou suspenzie 10^6 ml baktérie *Bacillus atrophaeus* [10].

CIELE

Cieľom našej štúdie bolo vyhodnotenie účinnosti sterilizačných prístrojov v spádovej oblasti RÚVZ Trenčín v rokoch 2016 a 2017 a monitoring celkového počtu vyšetrených bioindikátorov spolu s ich vyhodnotením podľa druhu testovaného sterilizačného prístroja. Ďalej sme vykonali vyhodnotenie počtu pozitívnych bioindikátorov z celkového množstva otestovaných sterilizačných prístrojov.

MATERIÁL A METÓDY

Materiál

Parný sterilizátor, Horúcovzduchový sterilizátor, Chemické indikátory triedy 6, Biologické indikátory:

- so spórmi baktérie *Geobacillus stearothermophilus* a s hustotou suspenzie 1×10^5 /ml,
- so spórmi baktérie *Bacillus atrophaeus* a s hustotou suspenzie 1×10^6 /ml.

Inkubátor nastavený na teplotu $37 \pm 1^\circ\text{C}$, inkubátor nastavený na teplotu $55 \pm 1^\circ\text{C}$, skúmavky, nožnice, pinzeta, stojany na skúmavky, plynový kahan [12]

Tryptón – sójový bujón: Médium sa pripravuje za účelom testovania bioindikátorov so spórmi *Bacillus atrophaeus*. Konečné pH média by malo byť $7,3 \pm 0,2$ pri teplote 25°C . Skladovanie by malo byť pri laboratórnej teplote, pripravené médium sa skladuje pri $2-8^\circ\text{C}$ [13].

Pečeňový bujón: Médium sa pripravuje za účelom testovania bioindikátorov so spórmi *Bacillus atrophaeus*. Konečné pH média by malo byť $7,0 \pm 0,2$ pri teplote 25°C . Skladovanie by malo byť

pri laboratórnej teplote, pripravené médium sa skladuje pri 2-8 °C [13].

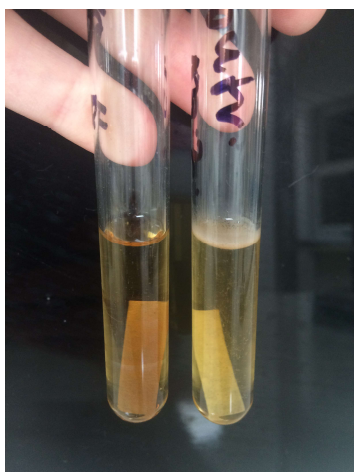
Kultivačné médium na kontrolu bioindikátora s *Geobacillus stearothermophilus* (fialová pôda): Médium sa pripravuje za účelom testovania bioindikátorov so spórami *Geobacillus stearothermophilus*. Pri príprave je pH média 6,9-7,0, no konečné pH môže o niečo klesnúť, čo nie je závada. Po príprave sa médium inkubuje 24-48 hodín pri 55 °C, aby sa vylúčila možnosť kontaminácie. Skladovanie média by malo v rozsahu po dobu 3 týždne [13].

Krvný agar s baranou krvou: Krvný agar so sa využíva na kultiváciu a izoláciu rastovo náročných baktérií. Pripravuje sa z Blood Agar Base No. 2 a pridaním čerstvej sterilnej 7 % baranej krvi. Je to tuhé kultivačné médium a jeho pH je 7,0. Skladuje sa pri teplote 2-8 °C [13].

Metódy

Na kontrolu sterilizačných prístrojov pomocou biologických indikátorov sa používa norma STN EN ISO 11138 platná od roku 2017 [9].

Kontrola účinnosti parného sterilizátora: Do sterilizačnej komory sa vkladajú biologické a chemické indikátory. Do každej jednej sterilizačnej jednotky (SJ) sa vložia dva bioindikátory a na každú ďalšiu jednotku sa pridá jeden bioindikátor. Jedna sterilizačná jednotka predstavuje 54 l. Bioindikátory sa ukladajú na police zhora nadol. Chemické indikátory sa vkladajú do sterilizátora tiež podľa sterilizačnej jednotky. Na jednu sterilizačnú jednotku sa vloží jeden chemický indikátor, pri 2-5 SJ dva chemické indikátory, 6-10 SJ tri chemické indikátory a do viac ako 10 SJ sa vložia štyri chemické



Obrázok 1 *Bacillus atrophaeus* po kultivácii v pečovom bujone, vľavo je skúmavka s negatívnym výsledkom a vpravo s pozitívnym

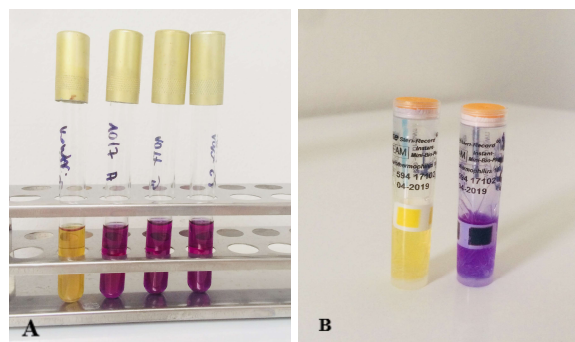
indikátory. Počas sterilizačného cyklu sa kontroluje teplota a čas sterilizácie. Po jeho skončení sa vyhodnotia chemické indikátory (zmena farby z červenej na zelenú). Biologické indikátory sa vyhodnocujú priamo v laboratóriu [7].

Kontrola účinnosti horúcovzduchového sterilizátora: Pri kontrole účinnosti horúcovzduchového sterilizátora sa vkladajú do sterilizačnej komory biologické a chemické indikátory. Sterilizátor je rozdelený na sterilizačné jednotky (SJ). Na jednu SJ sa vložia dva bioindikátory a na každú ďalšiu jednotku sa pridá jeden bioindikátor. Jedna sterilizačná jednotka predstavuje objem 60 l. Bioindikátory sa ukladajú na police zhora nadol. Chemické indikátory sa ukladajú do sterilizátora rovnakým spôsobom ako bioindikátory. Do jednej sterilizačnej jednotky sa vloží jeden chemický indikátor, 2-5 SJ dva chemické indikátory, 6-10 SJ tri chemické indikátory a do viac ako 10 SJ sa vložia štyri chemické indikátory. Počas sterilizačného cyklu sa kontroluje teplota a čas sterilizácie. Po skončení sterilizačného cyklu sa vyhodnotia chemické indikátory (zmena farby z červenej na zelenú). Biologické indikátory sa vyhodnocujú v laboratóriu [7].

Spracovanie výsledkov

Bacillus atrophaeus: Ak po 72 hodinách kultivácie sa nepozoruje v skúmavke vznik zákalu, sedimentu alebo blanky, výsledok skúšky sa považuje za negatívny. V prípade, že sa v médiu nachádzajú uvedené zmeny, tak sa výsledok skúšky považuje za pozitívny (obrázok 1) [12].

Geobacillus stearothermophilus: Ak po 48 hodinách kultivácie naneseného kmeňa na papierovom



Obrázok 2 Bioindikátory s *Geobacillus stearothermophilus* po kultivácii: A) v prvej skúmavke je pozitívny výsledok a v ostatných negatívny, B) prvá ampulka je pozitívna kontrola a druhá negatívna

Tabuľka 3 Prehľad zariadení a počet testovaných bioindikátorov podľa typu sterilizačného prístroja

Zariadenie	Rok	Typ sterilizačného prístroja			
		parný	horúco-vzduchový	formaldehydový	plazmový
Nemocnice	2016	173	59	11	10
	2017	169	47	3	8
Špecializované ambulancie	2016	128	98	0	0
	2017	112	95	0	0
Zdravotné služby	2016	3	34	0	0
	2017	2	29	0	0
Starostlivosť o telo	2016	4	99	0	0
	2017	8	116	0	0
Súčet	2016	308	290	11	10
	2017	291	287	3	8

nosiči sa nepozoruje v skúmavke zmena zafarbenia kultivačného média z fialovej na žltú farbu, tak sa výsledok skúšky považuje za negatívny. V prípade, že sa zmení farba média, tak sa výsledok skúšky považuje za pozitívny. Bioindikátor v ampulke sa považuje za negatívny, keď sa farba nezmení. Za pozitívny výsledok sa považuje ak sa zmení z fialovej farby na žltú (obrázok 2).

Zabezpečenie kvality

Vzorky sa spracovávajú v sterilnom boxe s laminárnym prúdením vzduchu, ktorého plocha pred prácou musí byť vydezinfikovaná. Ak nie je možné dodržať tieto podmienky, tak sa vzorka spracováva v laboratóriu za prísnych aseptických podmienok.

Pri kultivácii bioindikátora sa kultivuje aj kontrolná vzorka (bioindikátor, ktorý neprešiel sterilizačným cyklom). Ak kultivuje viac bioindikátorov súčasne, stačí pridať iba jednu kontrolnú vzorku.

Vzorky sa spracovávajú ihneď po doručení do laboratória. Ak to nie je možné, spracujú sa do 24 hodín od doručenia, vzorky sa skladujú v tme pri laboratórnych podmienkach [12]

Vzorky

Vzorky boli spracované v rámci kontroly testovania sterilizačných prístrojov pomocou bioindikátorov v rokoch 2016-2017. Všetky vzorky boli z okresov patriacich pod spádovú oblasť RÚVZ Trenčín - Trenčín, Nové Mesto nad Váhom, Myjava, Bánovce nad Bebravou, Partizánske, Ilava a Považská Bystrica. Kontrolu funkčnosti sterilizačných prístrojov na pracoviskách vykonávali pracovníci Oddelenia epidemiológie RÚVZ Trenčín a RÚVZ Považská Bystrica. Samotná analýza bola vykonaná na Oddelení mikrobiológie a biológie životného prostredia RÚVZ Trenčín v súlade s platnou legislatívou a vypracovanými Štandardnými pracovnými postupmi.

VÝSLEDKY

V tabuľke 3 uvádzame zdravotnícke a nezdravotnícke zariadenia rozdelené na 4 skupiny a celkové počty bioindikátorov za roky 2016 a 2017. V každom zariadení sme využili rôzne druhy sterilizátorov. Pozitívne bioindikátory v rokoch 2016-2017, ktoré sa nachádzali v zdravotníckych zariadeniach sú uvedené v tabuľke 4.

Tabuľka 4 Pozitívne výsledky v zdravotníckych zariadeniach

Zariadenie	Počet pozitívnych bioindikátorov	
	2016	2017
Nemocnice	6	3
Špecializované ambulancie	8	5
Zdravotné služby	2	4
Starostlivosť o telo	2	3
Súčet	18	15

Tabuľka 5 Počet spracovaných bioindikátorov podľa druhu sterilizátora

Typ sterilizátora	Počet bioindikátorov		Pozitívne výsledky	
	2016	2017	2016	2017
Parný	308	291	10	3
Horúco-vzduchový	290	287	8	12
Plazmový	10	8	0	0
Formaldehydový	11	3	0	0
Súčet	619	589	18	15

Celkový počet spracovaných bioindikátorov v rokoch 2016 a 2017 sme znázornili v tabuľke 5. Tabuľka je rozdelená do dvoch hlavných stĺpcov, kde v prvom sú vyjadrené počty vyhodnotených vzoriek a v druhom stĺpci pozitívne vzorky z daných druhov sterilizátorov.

Tabuľka 6 znázorňuje počet pozitívnych bioindikátorov v roku 2016 a 2017. V okresoch Trenčianskeho kraja sa vyskytovali pozitívne výsledky iba pri dvoch druhoch sterilizátorov. V roku 2016 to boli Trenčín, Ilava, Nové Mesto nad Váhom a roku 2017 to boli okresy Trenčín, Myjava a Nové Mesto nad Váhom.

Tabuľka 6 Počet pozitívnych bioindikátorov v rokoch 2016 a 2017 v jednotlivých okresoch spadajúcich pod RÚVZ Trenčín

Roky	2016			2017		
Druh sterilizátora	TN	IL	NM	TN	MY	NM
Parný	5	3	2	2	0	1
Horúco-vzduchový	6	0	2	10	1	1
Súčet	11	3	4	12	1	2

Legenda: TN - Trenčín, IL - Ilava, NM - Nové Mesto nad Váhom, MY - Myjava

DISKUSIA

Dopyt po sterilizačných prístrojoch sa celosvetovo zvyšuje. Rastie počet chronických infekčných ochorení, a tým sa zvyšuje aj dopyt po sterilizácii. Hlavnou úlohou pre zdravotnícky personál by malo byť zabezpečenie sterilných nástrojov.

V našej práci sme zisťovali počet vyšetrených bioindikátorov na RÚVZ v Trenčíne na Oddelení mikrobiológie a biológie životného prostredia. Sledovali sme roky 2016 a 2017 počas ktorých bol celkový počet prijatých a vyhodnotených vzoriek 1208. V roku 2016 to bolo 618 vzoriek a v roku 2017 to bolo o niečo menej, teda 589 vzoriek. Tieto čísla predstavujú množstvo, ktoré bolo nadobudnuté z rôznych druhov sterilizátorov. Kontrolovali sa parné, horúcovzduchové, plazmové a formaldehydové sterilizátory.

V roku 2016 boli spracované bioindikátory podľa druhu sterilizátora. Zo všetkých vzoriek sa vyskytli aj pozitívne bioindikátory. Uvedené je porovnanie medzi jednotlivými sterilizátormi. Parné sterilizátory boli testované najviac, a to 308-krát, o niečo menej to bolo pri horúcovzduchových (290). Plazmové sterilizátory boli testované pri-

bližne 10-krát do roka, čo predstavuje časové obdobie približne raz za mesiac. Pri formaldehydových sterilizátoroch to bolo iba 11-krát za celý rok. Pri posledných dvoch je zjavné, že v Trenčianskom kraji sa nevyskytuje väčšie množstvo týchto sterilizátorov. Pozitívne vzorky sa vyskytli iba pri parných a horúcovzduchových sterilizátoroch. Pri parných sterilizátoroch to bolo 10 vzoriek, čo predstavuje 3,25 % z celkových 308 bioindikátorov. Z 290 testov, ktoré boli odobrané z horúcovzduchových sterilizátorov bolo 8 bioindikátorov pozitívnych, čo je 2,76 %. V roku 2017 bolo množstvo spracovaných bioindikátorov podľa druhu sterilizátora podobné. Parné a horúcovzduchové sterilizátory predstavovali 98,13 % z celkového množstva. Plazmové a formaldehydové sterilizačné prístroje znázornili iba 1,87 %. Pozitívne vzorky v roku 2017 sa taktiež objavili iba u parných a horúcovzduchových sterilizátorov. Parné sterilizátory mali v porovnaní s predchádzajúcim rokom nižšie množstvo pozitívnych vzoriek, čo bolo iba 1,03 % z 291 spracovaných bioindikátorov. Naopak pri horúcovzduchových sterilizátoroch bolo v roku 2017 viac pozitívnych vzoriek ako v roku 2016. Z počtu 287 to bolo 4,18 %. Z týchto zistení môžeme predpokladať, že pozitívne kontroly mohli vzniknúť chybou sterilizačného prístroja, nedostatočným dohľadom zodpovedného pracovníka, alebo nesprávnou kontrolou. Toto zistenie potvrdzuje aj štúdia, ktorá porovnávala účinnosť parných a horúcovzduchových sterilizátorov [14]. Preukázalo sa, že v špecializovaných ambulanciách sa najčastejšie využívajú tieto dva typy sterilizátorov. Na predchádzanie vzniku chybivosti sterilizačnej techniky by sa mala dodržiavať doba na opakované kontroly. Je potrebné nezanebdávať tieto kroky, pretože sa môže predchádzať vzniku infekcií, ktoré sú každým rokom častejšie. Britská štúdia o tomto probléme hovorí dosť jasne [15]. Dopyt po sterilizačnej technike je vysoký, pretože narastá chorobnosť a tiež záujem o operačné zákroky. Pri dodržiavaní kontroly prístrojov môžeme tak zabrániť vzniku ďalších infekcií.

V našej práci sme sa zamerali aj na vyhodnotenie bioindikátorov podľa okresov spadajúcich pod oblasť RÚVZ Trenčín. Počet, ktorý bol spracovaný je 1208 bioindikátorov za roky 2016 a 2017. Najviac vzoriek, ktoré sa spracovali počas oboch rokov boli z okresu Trenčín, bolo to 60,01 %. Z okresu Bánovce nad Bebravou bolo dodaných 136 vzoriek (11,26 %). Nové Mesto nad Váhom doručilo z celkového počtu 1208 vzoriek 12,5 %. Okresy Myjava

9,52 %, Ilava 0,75 %, Partizánske 1,99 % a Považská Bystrica 2,98 %. Okrem celkového počtu bioindikátorov sme sa zamerali aj na vyhodnotenie pozitívnych bioindikátorov nami sledovaných okresoch. V oboch rokoch sa objavili v troch okresoch. V prvom roku sa najviac pozitívnych bioindikátorov objavilo v okrese Trenčín, čo predstavovalo 12 vzoriek, v okrese Ilava to boli 3 vzorky a z okresu Nové Mesto nad Váhom boli 4 pozitívne bioindikátory. V rok 2017 bolo zaznamenaných 15 pozitívnych výsledkov z čoho bolo najviac znovu z Trenčianskeho okresu. Okresy Myjava a Nové Mesto nad Váhom mali minimálne počty. Pre lepšie porovnanie sme urobili grafické znázornenie okresov v jednotlivých rokoch. Príčinou zistenia pozitívnych bioindikátorov mohlo byť to, že z okresov Trenčín a Nové Mesto nad Váhom bolo doručených a spracovaných najviac bioindikátorov. Z počtu 888 bioindikátorov z oboch rokov bolo iba 3,27 % pozitívnych, čo z môjho pohľadu nie je až tak veľmi veľa vzhľadom k počtu, ktorý bol spracovaný. Okres Ilava v roku 2016 doručila do laboratória RÚVZ 5 vzoriek a z toho boli pozitívne 3. To značí, že sterilizačný prístroj z ktorého boli odobrané mal nejakú vážnejšiu poruchu. Príčinou pozitívnych výsledkov nemusí byť iba chyba v sterilizačnej technike. Dôvodom môže byť nevhodné skladovanie bioindikátorov, tiež to môže byť chyba pri výrobe danej šarže alebo pridlhé skladovanie bioindikátorov. Toto tvrdenie potvrdzuje aj americký zdroj [16]. Spracovanie bioindikátorov trvá niekoľko dní, preto sa môže stať, že v zariadeniach kde sa sterilizácia vykonáva sa môže stať, že pri poruche prístroja pomôcky, ktoré by mali byť sterilné nie sú. Takúto situáciu skúmala štúdia, kde sa preukázalo, že zdravotnícke zariadenia používali zdanlivo vysterilizované pomôcky ešte skôr ako im bol oznámený výsledok kontroly vysterilizovaného bioindikátora v ich sterilizačnom zariadení, preto by sa mali vyrábať bioindikátory, ktoré sa dajú vyhodnotiť ihneď [17].

ZÁVER

Z výsledkov našej štúdie vyplýva, že proces sterilizácie je nutné neustále kontrolovať a riadiť jeho kvalitu. Z prirodzenej povahy biologických systémov vyplýva, že s rastúcou početnosťou vykonaných sterilizácií bude narastať aj počet chýb v sterilizačných technikách. V súčasnosti je preto dôležité nielen dodržiavanie všetkých noriem a štandard-

ných pracovných postupov, ale aj sledovanie najnovšieho výskumu a technických inovácií v tejto oblasti.

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

- [1] PODSTATOVÁ H. *Základy epidemiologie a hygieny*. 1. vyd. Praha 5: Galén, 2009. 158 s. ISBN 978-80-7262-597-0.
- [2] ŠRÁMOVÁ H. a kol., 2013. *Nozokomiální nákazy*. 3 vyd., Praha 4: Maxdorf s. r. o. 400 s. ISBN 978-80-7345-286-5
- [3] KOPPOVÁ, K., SLOTOVÁ, K., BARTOVÁ, P., 2009. *Odborná spôsobilosť na vykonávanie epidemiologicky závažných činností v zariadeniach starostlivosti o ľudské telo*. Banská Bystrica. 2009. 26s. [online]. [cit. 2017-11-05]. Dostupné na: www.vzbb.sk/sk/aktuality/sos/ludske_telo_studijny_material.pdf
- [4] KAWAMURA K., SAKUMA A., NAKAMURA Y., et al. Evaluation of bactericidal effects of low-temperature nitrogen gas plasma towards application to short-time sterilization. *Microbiol Immunol*. 2012; 56 (7): 431-440.
- [5] ŠTEFKOVIČOVÁ M., LITVOVÁ S. *Vybrané kapitoly z verejného zdravotníctva III*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita a Trenčianska univerzita Alexandra Dubčeka v Trenčíne, 2016. 120 s. ISBN 978-80-210-8438-4.
- [6] MELICHERČÍKOVÁ V. *Sterilizace a dezinfekce*. 2 vyd., Praha 5: Galén, 2015. 174 s. ISBN 978-80-7492-139-1.
- [7] *Vyhláška 556/2007MZSR ktorou sa ustanovujú podrobnosti o požiadavkách na prevádzku zdravotníckych zariadení z hľadiska ochrany zdravia*.
- [8] SHETH N., RATHOD Y., SHENOI P., et al. Evaluation of new technique of sterilization using biological indicator. IN *Journal of Conservative Dentistry*. 2017. vol. 20, no. 5. [online]. [cit. 2017-12-05]. Dostupné na internete: <https://ezproxy.cvtisr.sk:5572/docview/1979773882?pq-origsite=summon>
- [9] VESTNÍK, MZ SR, 2014, 14. *Odborné usmerenie Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky na vykonávanie kontroly účinnosti procesu sterilizácie zdravotníckych pomôcok v zdravotníckych zariadeniach*. Bratislava: V OBZOR s. r. o., [online]. roč. 62, čiastka 24-26. [cit. 2017-10-18]. Dostupné na internete: <http://www.health.gov.sk/?VestnikyMzSr2014>.

- [10] ŠTEFKOVIČOVÁ M. et al. *Dezinfekcia a sterilizácia*. 1. vyd. Žilina: Vrana s. r. o., 2007. 164 s. ISBN 978-80-968248-3-0.
- [11] SANOFER A.A. Glass Bead Steriliser Used As Chair Side Sterilisation in the. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2015; 7 (7): 466-467.
- [12] *Štandardný pracovný postup 31/III*. Biologická kontrola správnej funkcie sterilizačných prístrojov bioindikátormi *Bacillus atropheus* a *Geobacillus stearothermophilus*. Oddelenie mikrobiológie a biológie životného prostredia, Regionálny úrad verejného zdravotníctva so sídlom v Trenčíne.
- [13] *Kniha kultivačných médií 13/III*. Oddelenie mikrobiológie a biológie životného prostredia, Regionálny úrad verejného zdravotníctva so sídlom v Trenčíne.
- [14] PATINO-MARÍN N., MARTÍNEZ-CASTAÑÓN G.A., ZAVALA-ALONSO N.V., et al. Biologic monitoring and causes of failure in cycles of sterilization in dental care offices in Mexico. *American Journal of Infection Control*. 2015; 43 (10): 1092-1095.
- [15] PRESSWIRE M. *Sterilization Technology Market 2018; to Touch US 15,84 bilion Dollars Due To Market Trends By 2023*. [online]. [cit. 2018-02-25]. Dostupné na internete: <https://ez-proxy.cvtisr.sk:5572/docview/1993288772?pq-origsite=summon>
- [16] SANDLE T. *Sterility, Sterilisation and Sterility Assurance for Pharmaceuticals. Technology, Validation and Current Regulations*. 1st Edition. Woodhead Publishing. 2013. eBook ISBN 9781908818638. Page Count 362.
- [17] CUNY E. The use of a process challenge device in dental Office gravity displacement tabletop sterilizers. *American Journal of Infection Control*. 2015; 43 (10): 1131-1133.

MODULÁCIA KONCENTRÁCIE VEGF VPLYVOM HYPERBARICKEJ OXYGENOTERAPIE *MODULATION OF VEGF CONCENTRATION DUE TO THE HYPERBARIC OXYGENE THERAPY*

KRAJČOVIČOVÁ Zdenka, KUDLÁČKOVÁ Antónia, MELUŠ Vladimír, KAŠLÍKOVÁ Katarína

Fakulta zdravotníctva, Trenčianska univerzita Alexandra Dubčeka v Trenčíne, Trenčín

ABSTRAKT

V súčasnej dobe sa pozornosť lekárov i vedcov zameriava na štúdium nových terapeutických možností, resp. aplikácii vo vzťahu k jednotlivým medicínskym odborom. Jednou z oblastí štúdiá je aj úloha laboratórneho parametra VEGF, pri rôznych typoch ochorení predovšetkým v kombinácii s perspektívnymi terapeutickými metódami, medzi ktoré bezpochybné patrí aj hyperbarická oxygenoterapia (HBOT). Na základe literárnych údajov možno konštatovať, že HBOT zvyšuje koncentráciu VEGF, vo väčšine z nich bol efekt pozitívny, čo svedčí o skutočnosti, že sa po inhalácii kyslíka sa za určitý čas zlepšila angiogenéza, regenerácia chronických rán ale aj poškodených tkanív po rádioterapii. VEGF faktor je perspektívny parameter a vo vzťahu k štúdiu mechanizmu účinku HBOT, avšak táto problematika si vyžaduje ďalší klinický a experimentálny výskum.

Kľúčové slová: VEGF. Hyperbarická oxygenoterapia. Modulácia koncentrácie

ABSTRACT

At present, the attention of physicians and scientists is focused on studying new therapeutic options, application in relation to individual medical branches. One of the areas of study is the role of the VEGF laboratory parameter in various types of disease, especially in combination with prospective therapeutic methods, including undoubtedly hyperbaric oxygen therapy (HBOT). On the basis of the literature resources it can be concluded that HBOT may increase the concentration of VEGF, most of which has been observed positive effect, indicating that angiogenesis, regeneration of chronic wounds, and damaged tissue after radiotherapy have improved over time after inhalation of oxygen. VEGF factor is a prospective parameter and in relation to the study of the mechanism of HBOT action, but this problematic requires further clinical and experimental research.

Key words: VEGF. Hyperbaric oxygen therapy. Modulation of concentration

ÚVOD

Dýchanie je základnou fyziologickou potrebou človeka. Pri nedostatočnom zásobení tela kyslíkom je človek ohrozený na živote a s tým spojené stavy mávajú spravidla veľmi dramatický priebeh. Hyperbarická oxygenoterapia (HBOT) je liečebná metóda, pri ktorej je podstatnou liečivou zložkou práve

kyslík. Samotná liečba sa uskutočňuje v hyperbarických komorách, ktorých existuje viacero typov a kyslík môže byť aplikovaný za zvýšeného tlaku buď priamo v uzatvorenom priestore alebo pomocou rôznych zdravotníckych pomôcok. HBOT je liečebná metóda založená na schopnosti krvi pri vyššom atmosférickom tlaku dopraviť ku tkanivám viac molekúl kyslíka. Sheffield a kol. [1] vo svojej štúdiu uviedol, že HBOT nie je schopné zvýšiť koncentráciu kyslíka viazaného na hemoglobín, ale môže zvýšiť množstvo rozpustného kyslíka v plazme. Pri normálnom tlaku v atmosfére nie je hemoglobín schopný naviazať viac kyslíka, nakoľko vzduch ho obsahuje približne 21 %, pri hyperbaroxii sa vdychovaná koncentrácia kyslíku blíži ku 100 % a je teda 5x vyšší ako vo vzduchu. Tým sa zlepši zásobenie tkanív kyslíkom, ktoré sú buď akútne alebo chronicky poškodené s prítomnou hypoxiou [2]. HBOT je veľmi perspektívna terapeutická metóda, nakoľko má viacero využití, a to napr. pri rôznych ochoreniach ako prvotná liečba alebo v doplnení komplexnej či chirurgickej liečby. HBOT slúži taktiež na výskumné činnosti hyperbarického prostredia na organizmus [3].

VEGF

Vaskulárny endoteliálny rastový faktor (VEGF, z *angl.* Vascular Endothelial Growth Factor) [4]. V roku 1989 Ferrara so spoluautormi publikovali primárnu sekvenciu peptidu VEGF, ktorý bol neskôr premenovaný na VEGF-A. VEGF systém spolu s jeho receptormi je hlavný zdroj regulácie tvorby endoteliálnych buniek a ciev. Následné štúdie preukázali, že priaznivo pôsobí aj ako angiogenický stimulant [5]. Štruktúrou patrí do VEGF-PDGF (skupina glykoproteínov, tzv. doštičkových rastových faktorov), t.j. supergénovej rodiny, ktorá obsahuje proteíny: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D a PDGF ako rastový faktor placenty. Známa je ale aj skupina, ktorá sa tiež podobá štruktúrou proteínom (tzv. homológy), do ktorej patrí parapoxývirus Ofr, s označením VEGF-E (alebo aj rastový faktor)

alebo tiež VEGF-F, ktorý býva izolovaný z hadieho jedu. Proteíny sa tvoria pomocou buniek v klasických podmienkach alebo v podmienkach, kedy sú bunky ovplyvňované hypoxiou [6, 7].

Faktory VEGF sa podieľajú ako regulátory vaskulogenézy, angiogenézy, vaskulárnej permeability a prežívania endotelových buniek:

- VEGF-A: je v mnohých tkanivách spolu s VEGF-B – ich výskyt je v srdci, kostravom svalstve, pankrease a v prostate [8],
- VEGF-C: nachádza sa v placentе, srdcovom svalstve, vaječníkoch a v tenkom čreve [9],
- VEGF-E: pôsobí ako silný spúšťač expzie tkanivového faktora, proliferácie, migrácie a pučenia vaskulárnych endotelových buniek, angiogenézy v systéme *in vivo*, vyskytuje sa aj v podobe natívneho proteínu u *Escherichia coli* (E-coli) [10],
- VEGF-F: obsahuje všetky proteíny VEGF ktoré sa nachádzajú v hadom jede - sú nimi napr. VR-1 zo Zmije retiazkovej (*Daboia russelli russeli*), HF z Vretenice aspisy (*Vipera aspis aspis*) [6, 11].

Členovia skupiny VEGF sa navzájom viažu rozdielnymi, ale štruktúrou podobnými receptormi, ktoré obsahujú tyrozínkinázovú aktivitu a sú označované ako VEGFR. Receptory sa delia do troch hlavných skupín: VEGFR-1 (Fit-1), VEGFR-2 (Fit-1 alebo aj ľudský KDR), ktorý zohráva úlohu pri angiogenéze a aktivácii endotelialných buniek, VEGFR-3, táto proteosyntéza sa spája aj s rozširovaním rakovinových buniek do lymfatických uzlín a uplatňuje sa vo vaskulogenéze [7].

VEGFR-1: súvisí s migráciou monocytov, prežitie krvotvorných kmeňových buniek a uvoľňuje rastový faktor z pečňových endotelialných buniek. Prevažne sa nachádza na povrchu endotelových buniek a zároveň je exprimovaný trofoblastmi a renálnymi mezangiálnymi bunkami [12].

VEGFR-2: viaže VEGF-A s 10x menšou afinitou ako VEGFR-1, no napriek tomu patrí medzi dôležité regulátory angiogenézy, pretože má vysokú tyrozínkinázovú aktivitu. Vyskytuje sa na povrchu hematopoetických buniek, megakaryocytov a retinálnych progenitorových buniek. Jeho produkcia sa zvyšuje pri väčšom výskyte zhubných ochorení (napr. rakovina ženského pohlavného systému, prostaty, štítnej žľazy a pod.) [13].

VEGFR-3: jeho aktivácia závisí od VEGF-C a VEGF-D. Prispieva k budovaniu a udržiavaniu

lymfatického systému. Jeho zvýšená koncentrácia súvisí s prítomnými metastázami [14].

Vybrané vedecké štúdie pozorujúce vplyv hyperbarickej oxygenoterapie na faktor VEGF

Ochorenia, ktoré sú sprevádzané hypoxiou, vedú k zníženej kvalite života pacientov. Cieľom prehľadovej štúdie bolo na základe dostupnej literatúry a vedeckých štúdií sumarizovať vplyv HBOT na koncentráciu VEGF faktora pri rôznych typoch ochorení, nakoľko aj vaskulárny endotelialny rastový faktor zohráva v tele človeka veľmi dôležitú úlohu, najmä z pohľadu vaskulogenézy a angiogenézy. Momentálne je vzťah medzi HBOT a VEGF faktorom zatiaľ málo prebádaný, preto je väčšina vedeckých štúdií na túto tému experimentálneho charakteru.

Chronická rana

Chronická rana vrátane dekubitov je spravidla definovaná ako chronicky sa hojaca rana, ktorá vznikla zmenou tkaniva po predchádzajúcom poranení. Doba hojenia je výrazne predĺžená a samotný proces hojenia býva narušený [15, 16]. Chronickou ranou sa označuje aj komplikovane sa hojaca rana, hoci môže ísť o akútny stav. Hlavný rozdiel medzi akútnou a chronickou ranou spočíva v schopnosti fibroblastov, endotelu a keratinocytov dostatočne replikovať a produkovať medzibunkovú matrix. Príčina vzniku chronickej rany môže byť prechod rany akútnej do chronickej, a to spravidla v ktorejkoľvek fáze hojenia. Ďalšie príčiny môžu byť infekcia, vplyv pridružených ochorení (diabetes mellitus, cievne choroby a pod.), mikrotraumatizácia alebo nekróza kože na podklade základného ochorenia (napr. pri ateroskleróze dolných končatín [17]. Shan J.B. [18] opisuje zvýšenie hladiny kyslíka v hypoxicko-rane veľmi prospešné až nevyhnutné, najmä ak ide o bunky ako sú neutrofilny, fibroblasty a makrofágy, ktoré sa podieľajú na procese reparácie tkaniva. Game F.L. so spol. [19] spolu s Stoenbrokom R.M. so spol. [20] opisujú túto súvislosť s poznatkom, ktorý dokazuje, že HBOT znižuje počet amputácií dolných končatín u diabetických pacientov.

V klinickej štúdii Sureda so spol. [21] analyzovali účinky HBOT v plazme na antioxidačnú odpoveď a hladiny endotelínu-1, interleukínu-6 (IL-6) a VEGF u pacientov s chronickými ranami (20,0±10,0 mesiacov bez zlepšenia zdravotného stavu). Štúdie sa dobrovoľne zúčastnilo celkovo

14 pacientov, 10 mužov a 4 ženy (vo veku $65,8 \pm 5,8$ roka). Na začiatku štúdie bolo prijatých 18 pacientov, ale dvaja z nich štúdiu opustili kvôli klaustrofóbií a dvaja zo zdravotných dôvodov, pretože hlásili bolesti v uchu počas prvej expozície. Sedem jedincov trpelo diabetickou nohou, štyria mali osteomyelitídu, dvaja radiačnú enteritídu a jeden pacient osteoartritídou. Predchádzajúca liečba zahŕňala typické antibiotiká (v prípade osteomyelitídy pre jej infekčný proces boli podávané aj systémovo), typické obvazy a odstraňovanie nekrotického tkaniva. V štúdiu sa však uvádza, že doterajšia liečba bola u týchto pacientov neúčinná. Všetci účastníci boli nefajčiari a mesiac pred začiatkom štúdie nebrali žiadny antioxidantný doplnok stravy. Pred začiatkom HBOT absolvovali štandardnú lekársku kontrolu a rany im boli ošetrené podľa predpisov. Postup štúdie pozostával z 20 expozícií HBOT počas jedného mesiaca (5 dní v týždni). Pacienti vdychovali 100% kyslík pri tlaku 2,2 ATA po dobu 60 minút. Vzorky krvi sa odoberali 2 hodiny pred a 2 hodiny po prvej, piatej a dvadsiatej (poslednej) expozícii HBOT. Okrem týchto vzoriek bola odobratá ešte jedna krvná vzorka mesiac po ukončení HBOT. Významné štatistické účinky neboli dokázané v žiadnom z výsledkov analyzovaných hematologických parametrov. Trvanie HBOT výrazne ovplyvnilo aktivitu CK s progresívnym poklesom počas sedení. Výsledky po piatej expozícii boli významne nižšie ako tie z prvého sedenia a výsledky z dvadsiateho sedenia boli tiež nižšie oproti prvému a piatemu sedeniu. Podobne aj plazmatická koncentrácia MDA aduktov bola významne ovplyvnená trvaním liečby. Hladina MDA bola významne znížená na poslednom sedení vzhľadom na prvé sedenie. Koncentrácia VEGF a IL-6 sa významne zvýšila po každom sedení HBOT oproti predchádzajúcim výsledkom. Progresívny pokles koncentrácie endotelínu-1 bol pozorovaný počas celej HBOT, ale štatistický rozdiel bol dokázaný iba na dvadsiatom sedení oproti prvému sedeniu.

Luo so spol. [22] uvádza, že výsledky HBOT v miernej produkcii reaktívnych foriem kyslíka môžu indikovať uvoľňovanie VEGF s následným podporením angiogenézy a zlepšenou regeneráciou rán. Lee so spol. [23] sa zamerali na endotelový bunkový model ľudskej pupočníkovej žily, v ktorej bola hlásená významná indukcia v expresii génu VEGF po HBOT. HBOT môže zlepšiť proces hoje-

nia pri chronických nehojivých ranách pochádzajúcich z patologických stavov ohrozujúcich dostupnosť kyslíka v tkanivách [21].

Poškodenie tkaniva spôsobeného rádioterapiou u pacientov s karcinómom prsníka

Karcinóm prsníka je podľa GLOBOCAN série Medzinárodnej agentúry pre výskum rakoviny jeden z najčastejšie diagnostikovaných druhov onkologického ochorenia na svete. Odhaduje sa, že je to približne 1,67 milióna pacientov ročne [24].

Teguh so spol. [25] v svojej štúdiu uvádzajú, že pri samotnej rádioterapii prsníka sa čiastočne poškodzujú aj ostatné okolité zdravé tkanivá, ktoré sa postupne menia na hypocelulárne, hypovaskulárne a hypoxické, často označované aj ako „3H tkanivo“. Podľa Colletta a kol. [26] nepriama toxicita tkanív môže tiež spôsobiť rádiofibrózu, čo spôsobuje pacientovi ťažkosti s pohybom ramien a následne sa môže zvýšiť riziko lymfedému. U 25-33 % pacientov, ktorí musia podstupovať rádioterapiu a chemoterapiu sú prítomné ťažkosti ako bolesť, únava, sexuálne problémy, úzkosti a depresie zo samotného vzhľadu tela, zhoršenej telesnej funkcie a pod. [27-29]. Vilholm so spol. [29] pripisuje tieto ťažkosti aj predchádzajúcemu chirurgickému zákroku, umiestneniu nádoru, veku a disekcii axilárnych lymfatických uzlín.

Teas J. so spol. [30] uskutočnili štúdiu vplyvu HBOT u pacientiek s karcinómom prsníka za účelom terapie lymfedému ramena. Štúdie sa zúčastnilo desať zdravých postmenopauzálnych žien (vo veku $58 \pm 5,7$ rokov) s perzistujúcim lymfedémom ($9,4 \pm 9,1$ roka) po liečbe karcinómu prsníka a rádioterapii ($n = 10$), plus chemoterapii ($n = 7$), ktoré absolvovali 20 expozícií HBOT (90 min.; 2,0 ATA; päťkrát týždenne počas 4 týždňov). Po ukončení série expozícií HBO boli sledované nasledovné parametre: objem horných končatín, počet krvných doštičiek, plazmatické hladiny VEGF a VEGF-C spojeného s lymfatickým angiogénom. Objem lymfedému (LV) bol definovaný ako objem neovplyvneného ramena odobratého od objemu postihnutého ramena. Pri ukončení HBOT autori pozorovali 38 % priemerné zníženie počtu lymfedémov, ktoré bolo nezávislé o zmeny telesnej hmotnosti. Pre pacientky, u ktorých bola liečba HBOT účinná ($n = 8$), bola redukcia pozorovaná aj v období v priemere 14,2 mesiacov od ukončenia HBOT. VEGF-C sa po terapii zvýšil oproti východiskovej hodnote pred liečbou 20-násobne ($p=0,004$), čo naznačuje, že

HBOT začal stimulovať tento rastový faktor. Budúce štúdie by však mali preskúmať účinky väčšieho počtu liečby HBOT na lymfedém s väčším počtom pacientov.

Sheikh so spol. [31] preukázali hyperoxiu v experimentálnej štúdiu na myšiach C3H (vo veku 7 až 9 týždňov). Na základe výsledkov z imunohistochemickej analýzy, v ktorých sa zvýšil VEGF vplyvom HBOT, sa pozitívne prejavila angiogenéza a zlepšilo sa ukládanie kolagénových vlákien v okolí neovaskularizácie.

Účinky HBOT na opuch miechy po akútnom poškodení

Poranenie miechy (SCI; z *angl.* Spinal Cord Injury) je poškodenie miechovej časti CNS úrazovým mechanizmom (napr. fraktúra, penetrujúce poranenia úločkami kostí, bodnými a strelnými poraneniami) samostatne alebo spolu s poranením chrbtice. Poranenie miechy môže byť primárne (mechanické poškodenie otrasom, natrhnutím, preseknutím, stlačením alebo nepriamo extradurálnymi procesmi – hematómom, nádorom, metastázou a i.) alebo sekundárne, ktoré vzniká následkom narušenia cievneho zásobenia poranením artérií, trombózou, alebo hypoperfúziou a hypoxiou pri šoku [32]. HBOT môže regulovať MMP-2, MMP-9 a VEGF, znížiť sekundárne komplikácie poškodenia miechy ako napr. opuch a zápal, podporuje angiogenézu a zlepšuje funkciu miechy u potkana. Autori v štúdiu uvádzajú, že ideálny čas na intervenciu s terapiou HBOT po poškodení miechy a mechanizmy, ktoré sú základom stabilizácie a regenerácie neurónov je potrebné ďalšie štúdium [33].

Angiogenéza hrá zásadnú úlohu pri ischemickom poranení mozgu alebo cerebrovaskulárnych poruchách, ako sú mozgové arteriovenózne malformácie. VEGF a matrixové metaloproteinázy (MMP) sú kľúčovými faktormi pri aktivácii angiogenézy u dospelých. VEGF sa zvyšuje pri mozgových ochoreniach ako je napr. cievna mozgová príhoda alebo Alzheimerova choroba. MMP sú zodpovedné za degradáciu zložky extracelulárnej matrix a sú potrebných počas angiogenézy v experimentoch v systémoch *in vivo* aj *in vitro*. MMP-9 je obzvlášť dôležitá, pretože zohráva ústrednú úlohu v angiogenéze, aktivita MMP-9 je zvýšená po VEGF stimulácii sprevádzané zvýšenou fokálnou angiogenézou. Inhibícia deplécie MMP-9 alebo neutrofilov môže znížiť odpoveď MMP na stimuláciu VEGF. Výsledky experimentálnej štúdie autorov

Hao so spol. [34] naznačujú, že zvýšenie hladiny IL-6, MMP-2, MMP-9 a VEGF po akútnom poškodení miechy. Zvýšená hladina MMP-2 a MMP-9 však aktivuje mnoho cytokínov vrátane TNF- α , čo zvyšuje transkripciu MMP a tým sa zhoršuje poškodenie miechy.

DISKUSIA

VEGF faktor patrí medzi rastové faktory, zohráva o.i. dôležitú úlohu najmä z hľadiska angiogenézy a lymfagiogenézy. Akonáhle dôjde k aktivácii bunkových receptorov, v bunke sa spustí celý rad reakcií [35]. Proces angiogenézy je navyše zosilnený kyslými a zásaditými fibroblastovými rastovými faktormi (FGF1/2). Proces angiogenézy a stabilizácia ciev sa uskutočňuje vo chvíli, keď sa ukončí rast orgánu, nastáva optimálny počet pericytov a v novovaskularizovanej oblasti sa zvýši koncentrácia kyslíka, následkom čoho sa zníži hladina VEGF a cyklus sa uzavrie, avšak stále je i naďalej striktné regulovaný. Ako inhibítor slúži trombospodín 1. Súčasnú štúdiu uvádzajú, že bolo indentifikovaných približne 200 aktivátorov a inhibítorov angiogenézy [35, 36].

Cieľom prehľadovej štúdie bola sumarizácia vplyvu HBOT na parameter VEGF pri rôznych typoch ochorení. Na význam vplyvu HBOT v medicíne poukazujú mnohí lekári, zdravotnícki pracovníci a autori vo svojich vedeckých článkoch. HBOT sa ukázala ako účinná liečebná metóda napr. pri gangréne, otravách oxidom uhoľnatým a ďalších chorobných stavoch týkajúcich sa predovšetkým tkanivovavej a orgánovej hypoxie. VEGF parameter v súčasnosti podľa dostupných literárnych údajov nepatrí medzi štandardné laboratórno-diagnostické parametre. Využíva sa predovšetkým vo vedecko-výskumnej činnosti. V súčasnosti je dostupné iba obmedzené množstvo klinických štúdií zameraných na vplyv HBOT na koncentráciu VEGF faktora. Väčšina z nich je skôr na experimentálnej úrovni. Vybraným vedeckým štúdiám týkajúcich sa vplyvu HBOT na VEGF faktor sa venuje napr. Hou so spol. [37] ktorý sledoval účinky HBOT na expresiu proteínov MMP-2, MMP-9 a na opuch miechy po akútnom poškodení. Ďalej Carroll a kol. [38] spolu s Zimmetman a kol. [38] skúmali koncentráciu VEGF vplyvom HBOT na: 1. polarizáciu a adhéziu CD18 (Integrin beta-2), 2. adhéziu neutrofilov, 3. účinok plazmínu pri expresii VEGF v kostrovom svalstve po poranení. Surredda a kol. [21] ana-

lyzovali účinky HBO pri chronických ranách. Sheikh a kol. [31] spolu s ďalšími autormi obdobných štúdií [40-42] sledovali vplyv HBOT na poškodené tkanivo po rádioterapii u onkologických pacientov. Hao a kol. [34] uviedli vo svojej experimentálnej štúdií na potkanoch Sprague-Dawley výsledky, v ktorých naznačujú zvýšenie hladiny interleukin-6 (IL-6), matrix metalloproteinase (MMP-2), matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) a VEGF po akútnom poškodení miechy. Dôvodom by mohol byť fakt, že VEGF indukuje angiogénu prostredníctvom regulácie expresie MMP-2 a MMP-9.

ZÁVER

Vo všeobecnosti sa vo vedeckých štúdiách uvádza, že po každej expozícii HBOT sa v porovnaní s predchádzajúcimi výsledkami stanovenia koncentrácia VEGF zvýšila, čo sa pozitívne prejavilo na angiogéne ako aj na zlepšení ukladania kolagénových vlákien v okolí novovaskularizácie.

VEGF parameter však v súčasnosti podľa dostupných literárnych údajov nepatrí medzi štandardné laboratórno-diagnostické parametre, je to perspektívny parameter ktorého využitie si vyžaduje ešte ďalší klinický a experimentálny vývoj, preto je väčšina štúdií skôr na experimentálnej úrovni.

Pod'akovanie

Tento príspevok vyšiel s podporou projektu „Dobudovanie technickej infraštruktúry pre rozvoj vedy a výskumu na Trenčianskej univerzite Alexandra Dubčeka prostredníctvom hyperbarickej oxygenoterapie“ ITMS kód 26210120019 Operačného programu Výskum a vývoj.

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

- [1] SHEFFIELD P.J. Measuring tissue oxygen tension: a review. *Undersea Hyperb Med.* 1998; 25 (3): 179-188.
- [2] KAPOUNOVÁ G. *Ošetrovatelství v intenzivní péči*. 1. vyd., Grada Publishing a.s., Praha, 2007, ISBN: 978-80-247-1830-9.
- [3] JAIN K.K. *Textbook of Hyperbaric Medicine*. Hografe and Hubert Publishers, Göttingen, 2009, 578 s., ISBN 978-0-88937-361-7.
- [4] ZIMA T. *Laboratorní diagnostika*. Galén, Praha, 2. vyd., 2007. ISBN: 978-80-7262-372-3.
- [5] SCHLUNEGGER M.P., GRÜTTER M.G. An unusual feature revealed by the crystal structure at 2.2. A resolution of human transforming growth factor-beta2. *Nature.* 1992; 358: 430-434.
- [6] TOKUNAGA Y., YAMAZAKY Y., MORITA T. Specific distribution of VEGF-F in Viperinae snake venoms: Isolation and characterization of a VEGF-F from the venom of *Daboia russelli siamensis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2005; 439: 241-247.
- [7] STUTTFELD E., BALLMER-HOFER K. Structure and function of VEGF receptors. IUMB life, 2009 – Wiley Online Library. Online dostupné na: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/iub.234/full> [citované: 10. 11. 2017]
- [8] OLOFSSON B., PAJUSOLA K., KAIPAINEN A., et al. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93: 2576-2581.
- [9] RAMANI P., NASH R., RADEVSKÝ L., et al. VEGF-C, VEGF-D and VEGFR-3 expression in peripheral neuroblastic tumors. *Histopathology.* 2012; 61: 1006-1016.
- [10] MEYER M., CLAUSS M., LEPPLE-WIENHUES A., et al. A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Fit-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* 1999; 18 (2): 363-374.
- [11] FERRARA N. Vascular Endothelial Growth Factor. Basic Science and Clinical Progress. *Endocrine Reviews.* 1996; 25: 581-611.
- [12] MAHARAJ A.S., SAINT-GENIEZ M., MALDONADO A.E., et al. Vascular endothelial growth factor localization in the adult. *Am J. Pathol.* 2006; 168 (2): 639-648.
- [13] RODRIGUEZ-ANTONA C., PALLARES J., MONTERO-CONDE C., et al. Overexpression and activation of EGFR and VEGFR2 in medullary thyroid carcinomas is related to metastasis. *Cancer.* 2010; 17 (1): 7-16.
- [14] ACHEN M.G., MANN G.B., STACKER S.A. Targeting lymphangiogenesis to prevent tumour metastasis. *Br J Cancer.* 2006; 94 (10): 1355-1360.
- [15] POSPIŠILOVÁ A., FRANCŮ M. Akutní a chronické rány - etiologie, rozdíly v hojení a léčba. *Československá dermatologie.* 2008; 5: 232.
- [16] SMOLÍČKOVÁ L., MATIŠÁKOVÁ I. Dekubity ako ošetrovateľský problém v geriatrickej. *Zdravotnícke listy.* 2016; 3-4:72-76.

- [17] STRYJA J. *Repetitorium hojení ran*. Semily: Geum s.r.o., 1. vyd., 2008, 199 s. ISBN: 978-80-86256-60-3.
- [18] SHAN JB. Correction of Hypoxia, a Critical Element for Wound Bed Preparation Guidelines: TIME02 Principle of Wound Bed Preparation. *J Am Col Certif Wound Spec*. 2011; 3 (2): 26-32.
- [19] GAME F.L., HINCHLIFE R.J., APELQVIST J., et al. A systematic review of interventions to enhance the healing of chronic ulcers of the foot in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2012; 28 Suppl 1: 119-141.
- [20] STOEKENBROEK R.M., SANTEMA T.B., LEGEMATE D.A., et al. Hyperbaric oxygen for the treatment of diabetic foot ulcers: a systematic review. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2014; 47 (6): 647-655.
- [21] SURREDA A., BATLE J.M., MARTORELL M., et al. Antioxidant Response of Chronic Wounds to Hyperbaric Oxygen Therapy. *Plos ONE*. 2016; 11 (9): e0163371.
- [22] LUO J.D., CHEN A.F. Nitric oxide: a newly discovered function on wound healing. *Acta Pharmacol*. 2005; 26: 259-264.
- [23] LEE C.C., CHEN S.C., TSAI S.C., et al. Hyperbaric oxygen induces VEGF expression through ERK, JNK and c-Jun/AP-1 activation in human umbilical vein endothelial cells. *J Biomed SCI*. 2006; 13 (1): 146-156.
- [24] FERLAY J., SOERJOMATARAM I., DIKSHIT R., et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015; 136 (5): E359-386.
- [25] TEGUH D.N., LEVENDAG P.C., NOEVER I., et al. Early hyperbaric oxygen therapy for reducing radiotherapy side effects: early results of a randomized trial in oropharyngeal and nasopharyngeal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009; 75 (3): 711-716.
- [26] COLLETTE S., COLLETTE L., BUDIHARTO T., et al. Predictors of the risk of fibrosis at 10 years after breast conserving therapy for early breast cancer: a study based on the EORTC Trial 22881- 10882 'boost versus no boost'. *Eur J Canc*. 2008; 44 (17): 2587-2599.
- [27] GANZ P.A., GUADAGNOLI E., LANDURM M.B., et al. Breast cancer in older women: quality of life and psychosocial adjustment in the 15 months after diagnosis. *J Clin Oncol*. 2013; 21 (21): 4027-4033.
- [28] VAITTINEN P., HEMMINKI K. Risk factors and age – incidence relationships for contralateral breast cancer. *Int J Cancer*. 2000; 88 (6): 998-1002.
- [29] VILHOLM O.J., COLD S., RASMUSSEN L., SINDRUP S.H. The postmactectomy pain syndrome: an epidemiological study on the prevalence of chronic pain after surgery for breast cancer. *Br J Cancer*. 2008; 99 (4): 604-610.
- [30] TEAS J., CUNNINGHAM J.E., CONE L., et al. Can hyperbaric oxygen therapy reduce breast cancer treatment-related lymphedema? A pilot study. *J Womens Health (Larchmt)*. 2004; 13 (9): 1008-1018.
- [31] SHEIKH A.Y., GIBSON J.J., ROLLINS M.D., et al. Effect of hyperoxia on vascular endothelial growth factor levels in a wound model. *Arch Surg*. 2000; 135: 1293-1297.
- [32] DOBIÁŠ V. Poranenia chrbtice a miechy. *Via Practica*. 2008; 5 (12): 537-538.
- [33] KRUEGER M., HÄRTIG W., REICHENBACH A., et al. Blood-Brain Barrier Breakdown after Embolic Stroke in Rats Occurs without Ultrastructural Evidence for Disrupting Tight Junctions. *PLoS One*. 2013; 8 (2): e56419.
- [34] HAO Q., LIU J., PAPPU R., et al. Contribution of bonemarrow- derived cells associated with brain angiogenesis is primarily through leukocytes and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28: 2151-2157.
- [35] MLADOŠIEVIČOVÁ B. a kol. *Molekulové mechanizmy patogenézy nádorov*. SAP, Bratislava 2011, 123 s., ISBN 978-80-8095-069-9.
- [36] DOBROTA D. a kol. *Lékařská biochemia*. Osveta s.r.o., Martin, 1.vyd., 2012, ISBN 978-80-8063-293-9.
- [37] HOU Y.N., DING W.Y., SHEN Y., et al. Effect of hyperbaric oxygen on MMP9/2 expression and motor function in rats with spinal cord injury. *Int J Clin Exp Med*. 2015; 8 (9): 14926-14934.
- [38] CARROLL W.R., ESCLAMADO R.M. Ischemia/reperfusion injury in microvascular surgery. *Head Neck*. 2000; 22: 700-713.
- [39] ZIMMETMAN B.J., GRANGER D.N. Mechanism of reperfusion injury. *Am J Med Sci*. 1994; 307: 284-292.
- [40] GANGULY B.J., TONOMURA N., BENSON R.M., et al. Hyperbaric oxygen enhances apoptosis in hematopoietic cells. *Apoptosis*. 2002; 7: 499-510.

- [41] ZHANG Q., CHANG Q., COX R.A., et al. Hyperbaric oxygen attenuates apoptosis and decreases inflammation in an ischemic wound model. *J Invest Dermatol.* 2008; 128: 2102-2112.
- [42] MATSUNAMI T., SATO Y., HASEGAWA Y., et al. Enhancement of reactive oxygen species and induction of apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rats under hyperbaric oxygen exposure. *Int J Clin Exp Pathol.* 2011; 4: 255-266.

**MONITORING ČINNOSTI VÝJAZDOVEJ PORADNE ZDRAVIA NA VÝSTAVE
SENIOR EXPO ZA ROKY 2012 – 2017
MONITORING THE ACTIVITIES OF AN OUTREACH HEALTH ADVISOR AT AN EXHIBITION
SENIOR EXPO FOR THE YEARS 2012-2017**

MIČÍKOVÁ Lucia, PAVLÍKOVÁ Miroslava

Regionálny úrad verejného zdravotníctva so sídlom v Trenčíne, Trenčín

ABSTRAKT

Východiská: Výjazdová poradňa zdravia pri Regionálnom úrade verejného zdravotníctva so sídlom v Trenčíne sa zúčastňuje výstavy Senior expo. Pracovníci oddelenia Výchova k zdraviu svoju činnosť zameriavajú na preventívne vyšetrenia a zdravotno-výchovné poradenstvo k rizikám vzniku chronických neinfekčných ochorení. Príspevkom chceme zmonitorovať činnosť výjazdovej poradne zdravia za obdobie rokov 2012-2017 u seniorov na výstave Senior expo.

Materiál a metódy: Za sledované obdobie bolo vo výjazdovej poradni zdravia vyšetrených 589 klientov - seniorov. Činnosť výjazdovej poradne sa zameriavala predovšetkým na biochemické, somatické, antropometrické vyšetrenia a odborné poradenstvo.

Výsledky: Najväčší záujem klientov bol o vyšetrenie cholesterolu a zmeranie krvného tlaku, nasledovali antropometrické vyšetrenia. Všetkým klientom boli poskytnuté informácie o vzniku a prevencii rizikových faktorov. Na spracovanie výsledkov bol použitý program Microsoft Excel. Na prezentáciu výsledkov sme použili deskriptívnu štatistiku.

Diskusia: Populačné starnutie sa stáva čoraz viac diskutovanou témou. Seniori predstavujú skupinu ľudí, ktorá si vyžaduje osobitnú pozornosť. Vzhľadom na fakt, že vek do dôchodku sa neustále zvyšuje je nevyhnutné, aby ľudia prejavili čo najvyšší záujem o svoje zdravie.

Záver: Môžeme konštatovať, že výjazdová poradňa zdravia má miesto na takomto podujatí. Prináša nové poznatky pre seniorov, je spoluorganizátor sprievodných akcií, ale predovšetkým preventívnymi vyšetreniami zachytáva rizikové faktory životného štýlu.

Kľúčové slová: Poradňa zdravia. Seniori. Výchova k zdraviu

ABSTRACT

Background: The department of Health Promotion and Health Counseling at the Regional Public Health Office in Trenčín is participating in the Senior expo exhibition. Workers in the Health Education Unit focus on preventive examinations and health-education advice on the risks of developing chronic noninfectious diseases. We monitoring the activity of the outpatient health advisor for the period 2012 - 2017 for seniors at the Senior expo exhibition.

Material and Methods: During the reporting period, 589 clients – seniors, were examined in the department of Health Promotion and Health Counseling. The activity of the focused mainly on biochemical, somatic, anthropometric examinations and professional counseling.

Results: The greatest interest of clients was cholesterol and blood pressure measurement, followed by anthropometric examinations. All clients were provided with information on the development and prevention of risk factors. Microsoft Excel

was used to process the results. We used descriptive statistics to present the results.

Discussion: Population aging is becoming an increasingly discussed subject. Seniors are a group of people who require special attention. Due to the fact that retirement age is constantly increasing, it is essential for people to show the highest interest in their health.

Conclusion: We can state that the department of Health Promotion and Health Counseling has a place for such events. It brings new knowledge to seniors, co-organizes accompanying actions, in particular preventative examinations capture life-style risk factors.

Key words: Department of Health Promotion and Health Counseling. Seniors. Health education

ÚVOD

Starnutie populácie predstavuje dlhodobý trend, ktorý sa v Európe vyskytuje už desaťročia. Prejavuje sa zmenou vekovej štruktúry obyvateľstva, pričom narastá podiel starších osôb a klesá podiel osôb v produktívnom veku. Môžeme konštatovať, že tento trend je spojený s rastúcou dĺžkou života počas obdobia, kedy stúpa stredná dĺžka života [1]. Podľa Štatistického úradu Slovenskej republiky bola v roku 2016 stredná dĺžka života na Slovensku u mužov 73,7 roka a u žien 80,4 roka [2]. V súčasnosti väčšinu populácie tvoria starší ľudia. Predpokladá sa, že do roku 2050 sa počet obyvateľov starších ako 60 rokov zdvojnásobí. Táto demografická zmena predstavuje priamy dopad na trvalo udržateľný rozvoj krajín, ktoré musia byť na nastávajúcu situáciu pripravené. Aj keď obyvatelia žijú dlhšie ako v minulosti, viac ako polovica Európanov vo veku 65 a viac uvádza, že trpia zdravotnými problémami. Tento fakt ovplyvňuje nielen samotných občanov, ale aj prosperitu spoločnosti či verejnú politiku a má taktiež priamy vplyv na udržateľnosť fungovania systému zdravotnej starostlivosti [3]. Z tohto dôvodu je prioritou krajín snaha o zdravé starnutie, aby senior do čo najvyššieho veku viedol aktívny život bez zdravotných ťažkostí.

Regionálne úrady verejného zdravotníctva majú vo svojej pôsobnosti poradenské centrá zdravia,

ktoré sa zaoberajú prevenciou chronických neinfekčných ochorení. Jednou z cieľových skupín, na ktorú je intervencia zameraná, sú aj seniori. Svoje aktivity sa pracovníci oddelenia Výchova k zdraviu snažia čo najviac prispôbiť cieľovej skupine. Preto pre seniorov pripravujú výjazdové poradne zdravia, ako aj prednáškovú činnosť, či už v kluboch dôchodcov alebo aj na podujatiach, ktoré sú pre nich primárne určené.

Jedným z podujatí priamo určených pre seniorov, ktorých sa výjazdová poradňa zdravia zúčastňuje je aj výstava Senior expo. Táto výstava poskytuje produkty, informácie a služby primárne určené pre seniorov. V spolupráci s rôznymi organizáciami, medzi ktorými je aj Regionálny úrad verejného zdravotníctva so sídlom v Trenčíne, odborný garant Jednota dôchodcov Slovenska zabezpečuje sprievodný program. Neoddeliteľnou súčasťou tohto programu je aj konferencia, ktorej problematika sa dotýka seniorov.

Príspevok, ktorého cieľom je priblížiť činnosť výjazdovej poradne zdravia na výstave Senior expo za roky 2012-2017, bol prezentovaný na medzinárodnej vedeckej konferencii Ošetrovatelstvo a zdravie XI. v roku 2018.

MATERIÁL A METÓDY

Výjazdová poradňa zdravia na výstave Senior expo realizuje somatické, antropometrické a biochemické vyšetrenia. Taktiež podľa požiadaviek klientov realizuje vyšetrenie oxidu uhoľnatého vo výdychu u fajčiarov prístrojom Smokerlyzer.

Od roku 2012-2017 bolo v našej výjazdovej poradni zdravia na výstave Senior expo vyšetrených 773 klientov, pričom viac ako tri štvrtinu klientov (589) tvorili seniori. Pracovníci oddelenia Výchova k zdraviu každý rok štatisticky vyhodnocujú vý-

sledky [4]. Zameriavajú sa predovšetkým na priemerný vek, pohlavie a hodnotu celkového cholesterolu a krvného tlaku u seniorov. Všetky merania a vyšetrenia boli v súlade s manuálom pre činnosť základnej poradne zdravia. Biochemické vyšetrenie - celkový cholesterol bolo realizované odberom kapilárnej krvi z prsta, následne analyzovanej na prístroji Reflotron. Na meranie krvného tlaku bol použitý oscilometrický prístroj s manžetou nakladanou na rameno [5]. Výsledky sú spracované pomocou programu Microsoft Excel 2010. Na vyjadrenie výsledkov bola použitá deskriptívna štatistika.

VÝSLEDKY

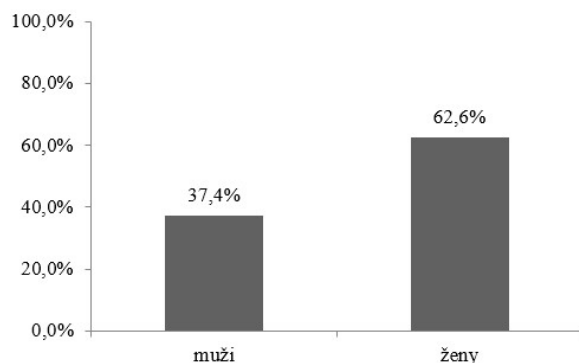
Priemerný vek seniorov na výstave Senior expo za sledované obdobie rokov 2012-2017 bol 64,5 roka, modus predstavoval hodnotu 75,0 roka.

Rozdelenie podľa pohlavia poukazuje na fakt, že výjazdovú poradňu zdravia navštevujú predovšetkým ženy. Za sledované obdobie tvorili viac ako polovicu klientov 62,6 % (n=369), muži tvorili 37,4 % (n=220) (Graf 1).

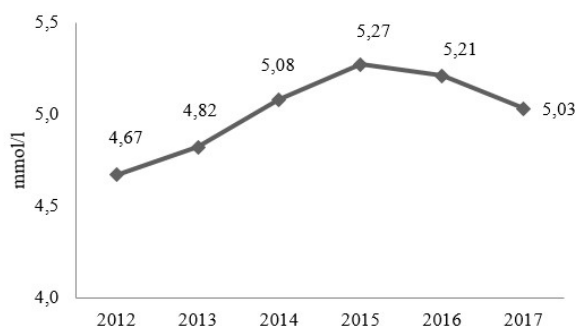
Normálna hladina celkového cholesterolu predstavuje hodnotu do 5 mmol/l. V sledovanom období za roky 2012 – 2017 priemerné hodnoty korešpondovali s touto hodnotou resp. boli mierne zvýšené (Graf 2).

U seniorov sme štatisticky hodnotili aj priemernú hodnotu krvného tlaku, ako vyplýva z grafu 3 hodnoty tlaku boli iba mierne zvýšené nad optimálnu hranicu krvného tlaku.

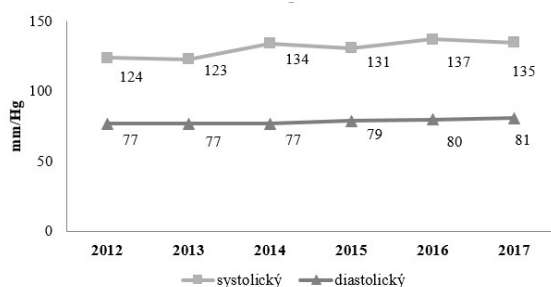
Okrem preventívnych vyšetrení a odborného zdravotno-výchovného poradenstva sme sa tento rok zúčastnili aj konferencie, ktorá je súčasťou sprievodného programu. V spolupráci s krajskou jednotou dôchodcov boli prednášané témy zo života seniorov.



Graf 1 Pohlavie klientov za roky 2012 – 2017



Graf 2 Priemerná hodnota celkového cholesterolu za sledované obdobie



Graf 3 Priemerné hodnoty krvného tlaku za sledované obdobie 2012 - 2017

Prezentovali sme prednášku o ľudskom mozgu, pamäti a Alzheimerovej chorobe. Táto téma seniorov zaujala, nakoľko je vzhľadom na ich vek vysoko aktuálna.

DISKUSIA

Zdravie a zdravé starnutie seniorov predstavuje dôležitý faktor pre fungovanie spoločnosti. Záujem o zdravé starnutie musí byť prioritou a súčasťou politik štátu. U seniora zdravie predstavuje významnú hodnotu, preto aj aktivity, ktoré sa realizujú musia zodpovedať zmenám organizmu. Poslaním ochrany a podpory zdravia je upevňovať, ochraňovať a podporovať zdravie. Súčasťou je aj motivácia seniorov k aktívnej účasti na starostlivosti o svoje zdravie [6]. Z týchto dôvodov je výjazdová poradňa zdravia súčasťou výstavy od jej vzniku v roku 2012 a je prínosom pre ľudí v poproduktívnom veku.

Zdravotno-výchovné poradenstvo je zamerané predovšetkým na dialóg s klientom. Pracovník oddelenia Výchova k zdraviu sa snaží ozrejmiť činnosť výjazdovej poradne zdravia. Následne interpretuje zistené výsledky z preventívnych vyšetrení a poskytne klientovi poradenstvo. Okrem individuálneho rozhovoru sú poskytované rôzne zdravotno-výchovné materiály vo forme brožúr a letákov, ktoré sú svojím zameraním určené pre seniorov.

Ako vyplýva zo zistených výsledkov, výjazdovú poradňu zdravia, každý rok navštevuje viac žien ako mužov. S našim výsledkom súhlasí aj fakt, že vo všeobecnosti sa, ženy viac starajú o svoje zdravie ako muži. Medzi našimi respondentmi boli od roku 2014 namerané hodnoty celkového cholesterolu, ktoré boli mierne nad 5 mmol/l. Pri hodnotách krvného tlaku sa horný tlak (systola) pohyboval mierne nad hranicou 120/80 mm/Hg a to po celé sledované obdobie. Môžeme konštatovať, že výsledky realizovaných vyšetrení boli uspokojivé a korešpondujú s výsledkami, ktoré zisťujeme aj v štandardných podmienkach poradenských centier zdravia.

Populačné starnutie sa stáva čoraz viac diskutovanou témou. Seniori predstavujú skupinu ľudí, ktorá si vyžaduje osobitnú pozornosť. Vzhľadom na fakt, že vek do dôchodku sa neustále zvyšuje je nevyhnutné, aby ľudia prejavili čo najvyšší záujem o svoje zdravie.

Aj keď sa na Slovensku stredná dĺžka života zvyšuje, stále zaostávame za priemerom Európskej únie. Slovenské obyvateľstvo vo veku 65 rokov môže očakávať, že bez zdravotného postihnutia prežije približne štyri roky zo svojich zostávajúcich rokov. Dožiť čo najdlhší čas v zdraví sa z tohto dôvodu stáva prioritou. Viac ako tretina chorôb je spôsobená ovplyvniteľnými rizikovými faktormi správania ako sú fajčenie, alkohol či obezita. Preto rizikové faktory predstavujú v Slovenskej republike problém v oblasti zdravia verejnosti [7].

Výjazdová poradňa zdravia má nezastupiteľné miesto v ochrane, podpore a rozvoji zdravia verejnosti. Aj na výstave ako je Senior expo má svoje opodstatnenie. Jej návštevnosť je stabilná a záujem prejavujú nielen seniori, ale aj ľudia v produktívnom veku. Svojimi činnosťami zvyšuje povedomie o zdraví a prevencii. Taktiež poukazuje na to, ako predchádzať rizikovým faktorom životného štýlu. Aj keď boli nami štatisticky sledované výsledky na hraniciach normy, vždy je dôležité šíriť myšlienku starostlivosti o svoje zdravie medzi verejnosťou, lebo človek nikdy nevie, kedy sa môže zhoršiť zdravie práve jemu. Práve z toho dôvodu, sme sa rozhodli, že naďalej budeme spracovávať výsledky z tejto výstavy.

ZÁVER

Zdravé starnutie je súčasťou mnohých politik. Medzi najvýznamnejšie patrí Zdravie 21, kde je zdravé starnutie zakotvené medzi hlavné body tohto dokumentu, ktorý vychádza z politik Svetovej zdravotníckej organizácie [8]. Je dôležité, aby prioritou každého z nás bolo, v budúcnosti byť zdravým seniorom, ktorý svojimi aktivitami môže byť stále produktívny a potrebný pre spoločnosť. To sa dá len vtedy, keď sa od stredného veku budeme venovať svojmu zdraviu a vyvarujeme sa rizikovým faktorom životného štýlu. Práve tie sú často dôvod k vzniku chronických neinfekčných ochorení, ktoré sú na prvých miesta v úmrtnosti nielen na Slovensku. Starnutie prináša zo sebou dôsledky, na ktoré sa môže prevencia zamerať. Jedná sa predovšetkým o polymorbiditu, ale aj problémy psychického a sociálneho charakteru. Výhodou zdravotnej výchovy

a poradenstva u seniorov je, že sa jedná o cieľovú skupinu, ktorá ma záujem a je ochotná spolupracovať, preto je dôležité využiť tento potenciál [9]. Poradenské centrá zdravia a výjazdové poradne zdravia pri regionálnych úradoch verejného zdravotníctva, poskytujú nielen seniorom, ale aj širokej verejnosti možnosť ako sa zaujímať o svoje zdravie, dozvedieť sa nové informácie o možnostiach prevencie vzniku a rozvoja chronických neinfekčných ochorení.

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

- [1] WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2018. Healthy Ageing and the Sustainable Development Goals. 2018. Dostupné na internete: <http://www.who.int/ageing/sdgs/en/>
- [2] EUROSTAT. 2017. Štruktúra a starnutie obyvateľstva. 2017 Dostupné na internete: http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Population_structure_and_ageing/sk
- [3] ŠTATISTICKÝ ÚRAD SLOVENSKEJ REPUBLIKY. 2018. Naše regióny 2017. Bratislava: Štatistický úrad Slovenskej republiky ISBN 978-80-8121-675-6 41s.
- [4] TEST ZDRAVÉ SRDCE – program poradní zdravia pri RÚVZ.
- [5] AVDIČOVÁ M., et al. *Manuál pre prácu v základnej poradni zdravia*. 2016. Bratislava: Úrad verejného zdravotníctva Slovenskej republiky. 2016. 70 s. ISBN 978–80–7159-224-2.
- [6] OECD/European Observatory on Health Systems and Policies (2017), Slovensko: Zdravotný Profil Krajiny 2017, State of Health in the EU, OECD Publishing, Paris/European Observatory on Health Systems and Policies, Brussels. Dostupné na internete: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264285408-sk>
- [7] ZANOVITOVÁ. M. et al. Vybrané aspekty starostlivosti o zdravie seniorov. 2018. Dostupné na internete: <https://portal.jfmed.uniba.sk/download.php?fid=677>
- [8] BAŠKOVÁ M., et al. *Výchova k zdraviu*. Martin: Osveta. 2009. ISBN 978-80-8063320-2, 222s.
- [9] HEGYI. L., OCHABA, R. *Výchova k zdraviu a podpora zdravia*. Bratislava: Herba. 2013. ISBN 978-80-89631-14-8 96s.

LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA ĽUDSKÝCH PARAZITOV LABORATORY DIAGNOSTICS OF HUMAN PARASITES

KAŠLÍKOVÁ Katarína, ŠOLTÝS Igor, MELUŠ Vladimír, KRAJČOVIČOVÁ Zdenka

Fakulta zdravotníctva, Trenčianska univerzita Alexandra Dubčeka v Trenčíne, Trenčín

ABSTRAKT

Parazitológia je veda zaoberajúca sa parazitmi, hosťiteľmi a vzťahom medzi nimi. Rozdeľuje parazity na protozoa, helmintov a článkonožcov. Parazit je organizmus príživujúci sa na druhom organizme – hosťiteľovi, ktorému odoberá živiny a látky potrebné pre život. Svojho hosťiteľa týmto správaním poškodzuje a vyvoláva u neho infekčné ochorenia nazývané parazitózy. Predkladaná práca sa zaoberá laboratórnou diagnostikou ľudských parazitov, ktorá využíva metódy priameho a nepriameho dôkazu. Vykonáva sa v mikrobiologických a parazitologických laboratóriách. K metódam priameho dôkazu patria mikroskopické, kultivačné, molekulárno-biologické metódy a metódy na dôkaz parazitárnych antigénov. Metódy nepriameho dôkazu sa využívajú pri dôkaze špecifických protilátok. Práca je zameraná prevažne na helmintov a ich diagnostiku. Spracované výsledky z vyšetrení helmintov pozostávajú z vyšetrení stolice a perianálneho odtlačku. Stolica bola vyšetrená koncentračnou metódou Kozák – Magrová (KOMA), ktorá je metódou flotačného typu. Perianálne odtlačky boli robené metódou podľa Grahama a Brumpta. Využívali sa pri dôkaze vajíčok *Enterobius vermicularis*. Vo vzorkách bola zistená prítomnosť *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Trichuris trichiura* a *Hymenolepis nana*. Vzorky obsahovali prevažne vajíčka helmintov, ktoré boli mikroskopicky identifikované na základe charakteristických znakov. Pacienti, u ktorých boli nájdené parazity, boli následne preliečení. Tým sa zabránilo ďalšiemu šíreniu parazitov. Zozbierané výsledky boli použité pri zhotovení štatistiky.

Kľúčové slová: Parazit. Parazitológia. *Enterobius vermicularis*. KOMA. Perianálny odtlačok

ABSTRACT

Parasitology is a science dealing with parasites, hosts and the relationship between them. It divides parasites to protozoa, helminths and arthropoda. Parasite is an organism feeding on the other organism – the host, which it removes nutrients and substances needed for life. This behavior damages his host and causes infectious disease called parasitosis in him. The present work deals with laboratory diagnostics of human parasites that uses the methods of direct and indirect evidence. It is performed in microbiological and parasitological laboratories. The methods of direct evidence include microscopic, cultivative, molecular-biology methods and the methods for the detection of parasites antigens. The methods of indirect evidence are used in the demonstration of specific immunoglobulins. This work is mainly focused on helminths and their diagnostics. Processed results of helminths examinations consist of stool examinations and perianal imprint. Stool was examined by the concentration method of Kozak-Magrova (KOMA), the method of the flotation type. Perianal imprints were made by the method of Graham and Brumpt. They were used in evidence *Enterobius ver-*

micularis eggs. In the samples was determined presence of *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Trichuris trichiura*, and *Hymenolepis nana*. Samples contained mainly helminth eggs that were microscopically identified on the basis of characteristics. Patients, who in were found parasites, were re-treatment then. This prevented further spread of parasites. The collected results were used in the production of statistics.

Key words: Parasite. Parasitology. *Enterobius vermicularis*. KOMA. Perianal imprint

ÚVOD

Parazitózy, ochorenia vyvolané parazitmi patria medzi najčastejšie sa vyskytujúce infekčné choroby na svete. V súčasnosti je známe obrovské množstvo parazitických ochorení. Postihujú predovšetkým ľudí v rozvojových krajinách, v krajinách s teplým podnebí a nízkou hygienickou úrovňou. Vo vyspelých štátoch je riziko nakazenia sa ľudskými parazitmi menšie vďaka dobrej osobnej a potravinovej hygiene. Výskyt parazitárnych nákaz v Slovenskej republike je pomerne nízky a zodpovedá európskemu štandardu. Vyššia incidencia bola zaznamenaná len u detí pochádzajúcich z rómskych rodín, v osadách a u bezdomovcov.

Medzi najčastejšie sa vyskytujúce parazitické prvky u nás patrí *Trichomonas vaginalis*, *Toxoplasma gondii* a *Giardia intestinalis*. Z helmintov, parazitických červov to sú *Enterobius vermicularis* (mrľa ľudská), *Ascaris lumbricoides* (hlísta detská) a *Trichuris trichiura* (vlasovec nerovnaký).

Prítomnosť parazitov v ľudskom tele môžeme dokázať pomocou priamych a nepriamych laboratórných metód. Metódy diagnostiky parazitov sa z roka na rok vyvíjajú a prechádzajú veľkými kvalitatívnymi zmenami. S ich využitím dnes už možno diagnostikovať pôvodcov väčšiny parazitárnych ochorení človeka.

Laboratórna diagnostika parazitóz

Diagnostika parazitárnych ochorení na základe klinických prejavov je veľmi obtiažna vzhľadom na ich rozmanitosť. Pri nejasných klinických prízn-

koch alebo pri ich nedostatku sú hlavnou a neraz jedinou metódou potvrdenia parazitárneho ochorenia metódy laboratórnej diagnostiky. Rozdeľujú sa na priame metódy (umožňujú lokalizáciu parazita v tele človeka a jeho priamy dôkaz špecifickou laboratórnou technikou), nepriame metódy (dôkaz protilátok) a pomocné vyšetrovacie metódy [1-3].

Metódy priameho dôkazu

Zameriavajú sa na dôkaz cudzopasnika a jeho vývinových štádií vo vyšetrovanom materiáli (v stolici, krvi, moči, spúte, duodenálnej šťave, punktátoch, vzorkách tkanív).

Vyšetrenie vzorky na parazitologické vyšetrenie využíva metódy:

- Mikroskopické (svetelná mikroskopia s technikami fázového kontrastu, tmavého poľa, fluorescenčné techniky, elektrónmikroskopické techniky).
- Kultivačné (na záchyt trichomonád, črevných prvokov, voľne žijúcich meňaviek, lariev helmintov).
- Metódy na dôkaz antigénov (imunoenzýmové a imunofluorescenčné techniky).
- Molekulárno-biologické metódy dôkazu DNA, RNA parazita (technika polymerázovej reťazovej reakcie – PCR) [2, 4].

Metódy nepriameho dôkazu

Využívajú sa pri diagnostike tkanivových parazitárnych nákaz. Uskutočňujú sa v sére, telových tekutinách použitím rôznych metód na dôkaz špecifických protilátok z triedy IgG, IgM, IgA, IgE. Medzi najpoužívanejšie metódy nepriameho dôkazu patrí metóda imunoenzýmového dôkazu protilátok - ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), techniky imunoblotu, ISAGA (Immunosorbent Agglutination Assay), reakcia väzby komplementu, hemaglutinačné testy a iné. Využitie majú napr. pri dôkaze toxoplazmózy, larválnej toxokarózy, extraintestinálnej amebózy, echinokokózy [5-8].

CIELE PRÁCE

V našej štúdií zameranej na výskyt ľudských parazitov sme sa zamerali na:

- charakteristiku najčastejšie diagnostikovaných ľudských parazitov v Popradskom okrese v rokoch 2013-2016 a ich laboratórnú diagnostiku,
- zmapovanie situácie výskytu helmintov v okrese Poprad v rokoch 2013-2016,

- porovnanie výsledkov zo situáciou v SR.

MATERIÁL A METÓDY

V sledovanom období rokov 2013-2016 sme sa zamerali na sledovanie výskytu *Enterobius vermicularis*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* a *Hymenolepis nana* vo vzorkách stolice pacientov z okresu Poprad. Všetky vzorky bolo vyšetrené na Oddelení klinickej mikrobiológie (OKM) Nemocnica Poprad, a.s. K odberu vzoriek, prípravy mikroskopických preparátov a pri analýze vzoriek boli použité prístroje a laboratórne pomôcky potrebné k správne dôkazu a identifikácii parazitov.

Odber vzoriek

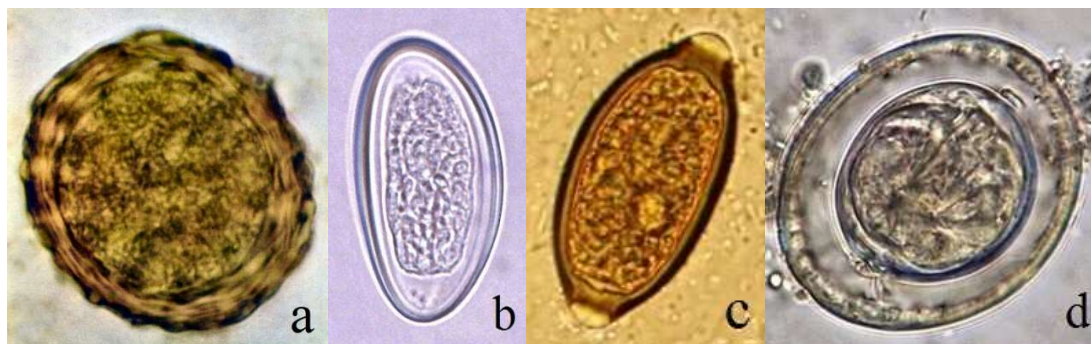
Pri odbere stolice na vyšetrenie črevných parazitov sme odobrali čerstvú vzorku o veľkosti vlašského orecha do nádoby na to určenej. Použila sa jednorazová skúmavka so širokým hrdlom, dobre tesniacim uzáverom a lopatkou. Vzorku sme odobrali 3x (každý druhý deň) a vždy pred aplikovaním antibiotík a antiparazitík. Označenú vzorku sme čo najrýchlejšie doručili do laboratória, pretože pri dlhšej doprave v teple by mohlo dôjsť ku poškodeniu vegetatívnych štádií a cýst prvokov. Ak to nie je možné, tak dáme vzorku na chladné miesto a uskladňujeme ju pri teplote 2-8 °C. Negatívny nález nemusí znamenať neprítomnosť parazitov [8-10]. Na laboratórnú diagnostiku helmintov sme použili metódou perianálneho odtlačku a KOMA (koncentračná flotačná metóda Kozák-Magrova) [11-15].

Vyhodnotenie nálezov parazitov

Pri prehliadaní zhotovených preparátov svetelným mikroskopom pri 100-200 násobnom zväčšení v nich boli nájdené vajčka niektorých helmintov, ktoré boli určované podľa charakteristickej morfológie a veľkosti s použitím parazitologických určovacích atlasov.

***Ascaris lumbricoides*:** Pravidelne oválne vajčka (Obr. 1a) o veľkosti 50-90 x 40-50 µm so žltohnedým bielkovinovým obalom. Povrch obalu je drsný a jeho steny sú pevné, čo zapríčiňuje vysokú odolnosť vajčiek. Vnútna stena obalu je tvorená chitínom a vonkajšia, silnejšia stena albumínom [6,16].

***Enterobius vermicularis*:** Vajčka (Obr. 1b) majú oválny tvar, na povrchu dvojité blanu a sú na jednej strane viditeľne sploštené. Ich veľkosť sa pohybuje v rozmedzí 50-60 x 20-30 µm. Vajčka zostávajú životaschopné po dobu 2-3 dní pri teplote 22°C [6,7].



Obrázok 1 Vajíčka a) *Ascaris lumbricoides* [17], b) *Enterobius vermicularis* [18], c) *Trichuris trichiura* [19], d) *Hymenolepis nana* [20]

***Trichuris trichiura*:** Jej vajíčka (Obr. 1c) sú charakteristické svojím citrónovitým až súdkovitým tvarom. Ich bočné steny sú hnedého zafarbenia a na oboch póloch majú svetlé zátky. Veľkosť vajíčok dosahuje 50-55 x 20-25 µm. Ich životnosť sa pohybuje okolo 6-8 rokov [6, 16].

***Hymenolepis nana*:** Má okrúhle až oválne vajíčka (Obr. 1d), obsahujú dve tenké blany tvoriace silný obal zo 6 embryonálnymi háčikmi. Ich veľkosť sa pohybuje v rozmedzí 40-45 x 34-37 µm [6, 14].

VÝSLEDKY

V našej práci sme sa zamerali na monitorovanie výskytu helmintov vo vzorkách stolice a perianálnych odtlačkoch. Výsledky parazitárnych vyšetrení pre túto prácu, nám boli poskytnuté Oddelením klinickej mikrobiológie (OKM), patriacim pod Nemocnicu Poprad, a.s. Pacientom bolo vykonané parazitologické vyšetrenie z dôvodu podozrenia na napadnutie niektorým z parazitov na základe klinických príznakov (gastrointestinálne ťažkosti a pod.). Vyšetrenie parazitov zvyklo byť robené aj všetkým rodinným príslušníkom v prípade, že u jedného z nich bola zistená prítomnosť parazitov alebo u pacientov, ktorí toto vyšetrenie vyžadovali.

Počas sledovaného obdobia rokov 2013-2016 sa celkovo odobralo 9350 vzoriek stolice a 2893 vzoriek perianálnych odtlačkov, ktoré pochádzali zo spádového územia okresu Poprad a boli vyšetrené na prítomnosť helmintov. Z pohľadu pohlaví bolo u mužov za sledované obdobie odobratých 4236 vzoriek stolice a 1387 vzoriek perianálnych odtlačkov. U žien bolo odobratých 5114 vzoriek stolice a 1506 perianálnych odtlačkov.

Zo všetkých odobratých vzoriek stolice za sledované obdobie, bolo 8758 vzoriek negatívnych (93,67 %), 481 vzoriek pozitívnych (5,14 %) a 111

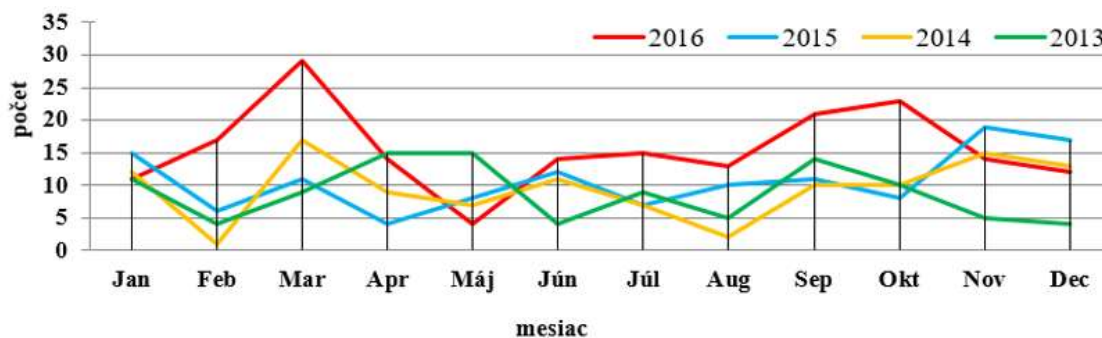
vzoriek bolo nehodnotiteľných / nevyšetrených (1,19 %). Z celkového počtu vzoriek perianálnych odtlačkov za sledované obdobie, 2604 vzoriek (90,01 %) bolo negatívnych, 250 vzoriek pozitívnych (8,64 %) a 39 vzoriek bolo nehodnotiteľných / nevyšetrených (1,35 %). Nehodnotiteľné / nevyšetrené vzorky – vzorky, ktoré nemohli byť vyšetrené, alebo sa nedali vyhodnotiť v dôsledku malého množstva vzorky (stolice), zlého odberu vzorky (napr. stolica, krém na sklíčku pri perianálnom odtlačku), zlého alebo žiadneho označenia vzorky.

Vo vzorkách stolice pozitívnej na prítomnosť helmintov sa vyskytovali - *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Trichuris trichiura* a *Hymenolepis nana*. V pozitívnych vzorkách perianálneho odtlačku boli diagnostikované *Ascaris lumbricoides* a *Enterobius vermicularis* (tabuľka 1). V niektorých odobratých vzorkách stolice a perianálneho odtlačku bola zistená prítomnosť viacerých parazitov (napr. vzorka stolice pozitívna na *Ascaris lumbricoides* a *Enterobius vermicularis* zároveň). Takéto vzorky boli počítané ako 1 pozitívna vzorka v rámci pozitívnych vzoriek, ale v rámci výskytu konkrétnych parazitov vo vzorkách, boli pripočítané ku každému parazitovi zvlášť.

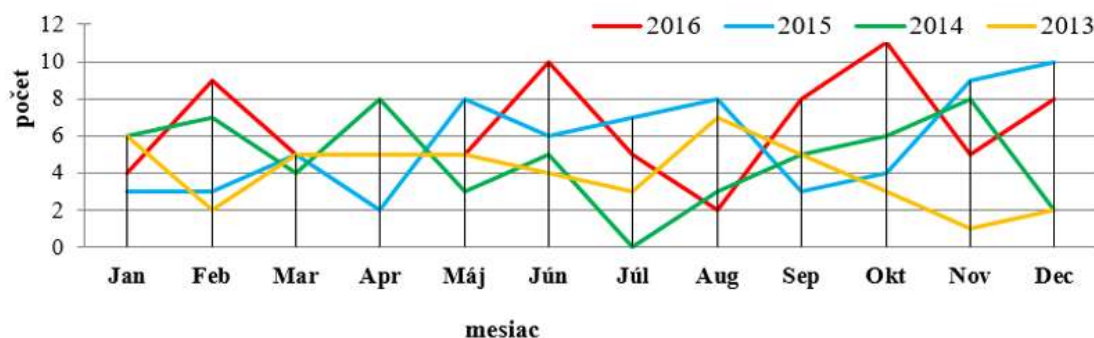
Tabuľka 1 Pozitívne počty vzoriek z rokov 2013-2016

Vzorka	n	AS	EN	TR	HY
Stolica	spolu	296	122	81	34
	muži	136	46	34	22
	ženy	160	76	47	12
Perianálny odtlačok	spolu	44	214	-	-
	muži	24	110	-	-
	ženy	20	104	-	-

Legenda: AS - *Ascaris lumbricoides*, EN - *Enterobius vermicularis*, TR - *Trichuris trichiura*, HY - *Hymenolepis nana*, n - počet



Graf 1 Počet pozitívnych vzoriek stolice rozdelený v rámci mesiacov



Graf 2 Počet pozitívnych vzoriek perianálnych odtlačkov rozdelený v rámci mesiacov

Tabuľka 2 Miera pozitivity vo vzorkách stolice v rokoch 2013-2016

Pohlavie	Parazit	Počet pozitívnych vzoriek	Pozitivita (%)
Stolica			
Muži	AS	136	3,21
	EN	46	1,09
	TR	34	0,80
	HY	22	0,52
Ženy	AS	160	3,13
	EN	76	1,49
	TR	47	0,92
	HY	12	0,23
Perianálny odtlačok			
Muži	AS	24	1,73
	EN	110	7,93
Ženy	AS	20	1,33
	EN	104	6,91

Legenda: AS - *Ascaris lumbricoides*, EN - *Enterobius vermicularis*, TR - *Trichuris trichiura*, HY - *Hymenolepis nana*, M - muži, Ž - ženy

Na základe celkového počtu odobratých vzoriek u oboch pohlaví a počtu pozitívnych vzoriek na konkrétnych parazitov sa vypočítala miera pozitivity (počet pozitívnych vzhľadom ku celkovému

počtu odobratých vzoriek), s cieľom zistiť, u ktorého pohlavia bolo diagnostikovaných viac parazitov. Vyjadrenie miery pozitivity v percentách uvádzame v tabuľke 2.

V grafoch 1 a 2 uvádzame početnosť výskytu parazitárnych ochorení vzhľadom na jednotlivé mesiace počas sledovaného obdobia

DISKUSIA

Za sledované obdobie rokov 2013-2016 bolo celkovo odobratých 12 243 vzoriek, ktoré pozostávali z 9350 vzoriek stolice a 2893 vzoriek perianálnych odtlačkov. Zo všetkých týchto vzoriek bolo 92,80 % negatívnych, 5,97 % pozitívnych a 1,23 % vzoriek bolo nehodnotiteľných / nevyšetrených.

Vzorky stolice určené na diagnostiku helmintov boli vyšetřované koncentračnou, flotačnou metódou Kozák – Magrová. Pozitívnych vzoriek stolice počas sledovaného obdobia bolo 481 čo predstavovalo 5,14 % zo všetkých odobratých vzoriek stolice. Bola v nich diagnostikovaná prítomnosť parazitov *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Trichuris trichiura* a *Hymenolepis nana*. Najčastejšie sa vyskytujúcim parazitom v pozitívnych vzorkách stolice bol *Ascaris lumbricoides* (56 %), najmenej častým bola pásomnica *Hymenolepis nana* (6 %).

Vzorky perianálneho odtlačku boli robené metódou podľa Grahama a Brumpta. Pozitívnych vzoriek za sledované obdobie bolo 250, čo predstavovalo 8,64 % zo všetkých odobratých vzoriek perianálnych odtlačkov. Bola v nich diagnostikovaná prítomnosť parazitov *Ascaris lumbricoides* a *Enterobius vermicularis*. Z týchto dvoch parazitov dominoval pozitívnym záchyтом v 83 % *Enterobius vermicularis*, pre ktorého je táto metóda aj primárne určená.

Celkovo v pozitívnych vzorkách stolice a perianálnych odtlačkov bol výskyt parazitov *Ascaris lumbricoides* a *Enterobius vermicularis* približne rovnaký, oba parazity totiž mali po 43 %. Rozdiel medzi nimi predstavujú iba 4 pozitívne vzorky. Výskyt parazita *Trichuris trichiura* zodpovedá 10 % a u *Hymenolepis nana* sú to 4 %.

Pri pozitívnych vzorkách stolice a perianálnych odtlačkov bol zistený stúpajúci trend záchyту parazitov počas sledovaného obdobia rokov 2013-2016. V roku 2013 bol celkový výskyt parazitov najnižší a v roku 2016 bol najvyšší. To mohlo byť čiastočne spôsobené väčším počtom vyšetrených vzoriek, použitím diagnostických metód s vyšším záchyтом, ale aj zvyšujúcim sa počtom nakazených ľudí, čo je najpravdepodobnejšia možnosť. Dokazuje to aj stúpajúca miera pozitivity vzoriek u oboch pohlaví.

Miera pozitivity vo vzorkách stolice za sledované obdobie bola približne rovnaká u mužov aj u žien. Rozdiely boli minimálne. V priebehu rokov sledovaného obdobia miera pozitivity na konkrétne parazity u oboch pohlaví striedavo stúpala a klesala, ale v konečnom dôsledku išlo o jej mierny nárast.

Miera pozitivity vo vzorkách perianálneho odtlačku za sledované obdobie bola u mužov o niečo vyššia ako u žien. V priebehu sledovaných rokov u nich bol zaznamenaný aj viac ako 2 % rozdiel. Tak ako pri vzorkách stolice aj tu je evidentný nárast miery pozitivity.

Pri rozdelení pacientov pozitívnych na prítomnosť helmintov podľa veku možno vidieť, že najvyšší výskyt parazitov sa pohybuje vo veku 5-9 rokov. Zvýšený výskyt pretrváva do veku 19 rokov a potom prudko klesá. Výskyt parazitov u starších pacientov je menej častý. U *Hymenolepis nana* za sledované obdobie nebol zaznamenaný ani jeden prípad pozitivity u staršieho pacienta. Celkovo najstarší pacient z rokov 2013-2016, ktorý bol pozitívny na parazity *Ascaris lumbricoides* a *Trichuris trichiura* súčasne, mal 84 rokov.

Pri rozdelení pozitívnych vzoriek stolice a perianálnych odtlačkov podľa mesiacov v priebehu sledovaných rokov si možno všimnúť, že v každom roku sa nachádzalo obdobie kedy bol výskyt parazitov výrazne vyšší. Celkovo bol zvýšený výskyt pozitívnych vzoriek zaznamenaný koncom roku 2015 (november až december), vo februári a marci roku 2016 a v septembri a októbri toho istého roku. V týchto mesiacoch bol výskyt parazitov v porovnaní s tými istými mesiacmi v priebehu iných rokov takmer dvojnásobný.

Pri porovnaní našich výsledkov výskytu parazitov so situáciou v Slovenskej republike, sa narazilo na problém, ktorým bol malý počet publikovaných zdrojov, zameraných na rovnakú problematiku. Zo všetkých nájdených zdrojov bolo pre túto prácu použiteľných len niekoľko. Väčšina výsledkov publikovaných výskumov sa týkala detských kolektívov, rómskych osád a ľudí s nízkym hygienickým štandardom.

Štúdie z pred niekoľkých rokov vykazujú klesajúce počty diagnostikovaných prípadov črevných parazitárnych nákaz [5].

To sa celkom nezhoduje s našim výskumom, ktorý vykazuje presný opak a to postupný nárast parazitóz vyvolaných črevnými parazitmi počas sledovaného obdobia.

Výskyt infekcií spôsobených *Ascaris lumbricoides* by sa mal celkovo podľa štúdií pohybovať v rozmedzí 1-5 % [1, 21], kde okres Poprad na základe našich výsledkov spadá, s 3,17 % pozitivity pri vzorkách stolice a s 1,52 % pri vzorkách perianálnych odtlačkov. Jeden zdroj uvádza dokonca až 24,7 % [9]. Parazitózy, ktoré spôsobuje by mali byť podľa zdrojov rozšírené prevažne medzi dospelými, čo nesúhlasí s našimi výsledkami, pri ktorých patrilo najviac nakazených medzi deti. Výskum vykonaný na východe Slovenska u rómskych detí zameraný na *Ascaris lumbricoides* uvádza 19,6 % mieru pozitivity v Košiciach, 32,9 % v Prešove, 7,9 % v Michalovciach a 10,3 % vo Vranove nad Topľou [22]. Percentuálna hodnota týchto výsledkov je príliš vysoká pre nerovnorodú skupinu vyšetovaných ľudí a pri vyšetrení celkovej populácie by bola ďaleko menšia.

Výskyt infekcií spôsobených *Enterobius vermicularis* by sa mal podľa starších štúdií pohybovať okolo 50 % u detí a 20 % u dospelých [1, 21]. V dnešnej dobe to bude zrejme o niečo nižšie. Naš výskum vykazuje u vyšetrených vzoriek stolice

3,17 % pozitivitu a pri vzorkách perianálneho odtlačku 7,40 % pozitivitu. Zdroj z roku 2002 uvádza *Enterobius vermicularis* ako najfrekvencovanejšieho črevného parazita na Slovensku [20]. To očividne neplatí pre okres Poprad, kde sa výskyt *Enterobius vermicularis* v pozitívnych vzorkách pohybuje okolo 43 %, rovnako ako u *Ascaris lumbricoides*.

Výskyt parazitóz vyvolaných parazitom *Trichuris trichiura* sa na Slovensku vyskytuje zriedkavo a pohybuje sa len okolo 5 % [1, 21]. V našom výskume bola zistená 0,87 % pozitivita.

Pri výskume robenom v Košickom a Prešovskom kraji sa pozitivita na tohto parazita pohybovala v rozmedzí 4-6 %, až na výnimku rómskej osady Sečovce, kde pozitivita dosahovala 16 %.

Miera pozitivity u pásomnice *Hymenolepis nana* v Slovenskej republike sa podľa získaných zdrojov pohybuje v rozmedzí 0,50-1,84 %. V našom výskume bol tento parazit prítomný v 0,36 % vyšetrených vzoriek [23-24].

ZÁVER

Najčastejšie sa vyskytujúcimi črevnými parazitmi vo vzorkách stolice a perianálnych odtlačkov jedincov v sledovanej oblasti boli *Ascaris lumbricoides* a *Enterobius vermicularis*, ktorých zastúpenie v týchto vzorkách bolo rovnaké a to 43 %. Menej časté boli vzorky pozitívne na *Trichuris trichiura* (10 %) a *Hymenolepis nana* (4 %). Počas sledovaného obdobia rokov 2013-2016 bol u všetkých týchto parazitoch zaznamenaný stúpajúci trend záchyty. Miera pozitivity na týchto parazitov u oboch pohlaví vo vzorkách stolice bola takmer rovnaká, vo vzorkách perianálnych odtlačkoch bola mierne zvýšená u mužov. Najväčší výskyt parazitov bol zaznamenaný u detí od 5-9 rokov a zvýšený výskyt sa pohyboval až do 19 roku. Najviac parazitov počas sledovaného obdobia bolo diagnostikovaných v marci a októbri roku 2016.

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

- [1] SZILÁGYIOVÁ M. Parazitárne ochorenia – aktuálne poznatky. *Via practica*. 2006; 3 (11): 515-517.
- [2] ONDRISKA F. *Lexikón lekárskej parazitológie*. Bratislava, HPL spol. s r. o., 2012, 84s. ISBN 978-80-970873-3-3.
- [3] NOVÁKOVÁ E., et al. *Mikrobiológia – princípy a interpretácia laboratórnych vyšetrení*, 1.

časť, Martin, 2015, 104s. ISBN 978-80-89544-98-1.

- [4] VOTAVA M., et al. *Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody*. Brno, Neptun, 2010, 504s. ISBN 987-80-86850-04-8.
- [5] ONDRISKA F., et al. *Klinická parazitológia*. Bratislava, PriF UK, 2016, 239s. ISBN 978-80-223-4217-9.
- [6] KMEŤOVÁ M. *Parazitológia, helminty*. dostupné na: <http://medickeforum.sk/otazky/otazka/mikrobiologia-vypisky-prednasky-testy/file/559>, [citované 29.1.2017].
- [7] ČERMÁKOVÁ Z., et al. Enterobióza – zapomenutá diagnóza. *Folia Gastroenterol Hepatol*. 2009; 7 (2): 55-56.
- [8] *Odběr materiálu na střevní parazity*. 2012, dostupné na: <http://www.zuusti.cz/wp-content/uploads/2012/10/Odb%C4%9Br-na-st%C5%99evn%C3%AD-parazity.pdf>, [citované 13.3. 2017]
- [9] *Pokyny na odber – OKM*, dostupné na: http://www.synlab.sk/fileadmin/standortseiten/synlab_sk/pdf/ostatne/pokyny-na-odber-OKM-PO.pdf [citované 13.3.2017]
- [10] Skúmanka s lopatkou určená na odber čerstvej stolice, prevzaté z: http://www.dialab.cz/static/foto_zbozi/1/2/2/7/027443102...o.jpeg
- [11] KNOTKOVÁ H., et al. *Klinická biochémia*, Martin : KLINICKÁ BIOCHÉMIA, s.r.o., 2016, 96s, [on line], [citované 14.3.2017], dostupné na: http://klinickabiochemia.sk/download/MMT_prirucka.pdf
- [12] Vyšetrenie na dôkaz *Enterobius vermicularis* (perianálny odtlačok), dostupné na: <http://www.hpl.sk/main.php?go=odborna-zona/vysetrenia/parazitologia/vermicularis>, [citované 8.3.2017]
- [13] Přehled nejběžnějších koprologických vyšetřovacích metod, 2011, dostupné na: http://home.czu.cz/storage/84698_01.diagnostika.pdf, [citované 15.2.2017]
- [14] PRANTLOVÁ RAŠKOVÁ V., WAGNEROVÁ P. *Obrazový atlas parazitů pro praktická cvičení z veterinární parazitologie*, 2013, 92s, [citované 15.2.2017], dostupné na: <http://kaf.zf.jcu.cz/upload/roman/Obrazovy%20atlas%20parazitu.pdf>
- [15] KVÁČ M., et al. Comparison of Selected Diagnostic Methods for Identification of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium andersoni* in Routine Examination of Faeces. *Journal of*

- Veterinary Medicine, Series B.* 2003; 50: 405-411.
- [16] MYŠKOVÁ E. Paleoparazitologická analýza organických sedimentů archeologického naleziště na Národní třídě, Praha, bakalářská práce, České Budějovice, PřF JU, 2011, 49 s.
- [17] Vajíčko *Ascaris lumbricoides*, prevzaté z: <https://s-media-cache-ak0.pinimg.com/564x/71/9e/25/719e25b6fa8c46aaa160ad22645aa7e8.jpg>
- [18] Vajíčko *Enterobius vermicularis*, prevzaté z: <http://www.kstate.edu/parasitology/625tutorials/FIGenterobius01.jpg>
- [19] Vajíčko *Trichuris trichiura*, prevzaté z: <http://www.minutobiomedicina.com.br/uploads/posts/846/tricuriase.jpg>
- [20] Vajíčko *Hymenolepis nana*, prevzaté z: http://1.bp.blogspot.com/-tEUPHIWjEqc/VI0JmKoie6I/AAAAAAAAAJoo/z-QIN-SIxyEM/s1600/14-%2BH_nana%2B1000X.jpg
- [21] BLAŽEKOVÁ M. Parazity a člověk – čo nového v 21. storočí, Martin, Alpha medical, s.r.o., in Vitro 2 (3), 2015, 172s. ISSN 1339-5912.
- [22] JURÍŠ P. Epidemiológia a profylaxia helmintozoonóz u obyvateľov Slovenskej republiky, Habilitačná práca, Fakulta zdravotníctva a sociálnej práce – Trnavská univerzita, Košice, 2004.
- [23] TOTKOVÁ A. Výskyt črevných parazitov u detí vo veľkomestskej aglomerácii, Dizertačná práca, Parazitologický ústav SAV, Bratislava, 2002.
- [24] ŠTRKOLCOVÁ G., et al. Survey on intestinal helminths of children and dogs in Roma settlements in Eastern Slovakia, In Proceedings of scientific contributions and abstracts, Infectious and Parasitic Diseases of Animals, 5th International Conference Košice, UVLF Košice, 2014, 119 s.
- [25] GALÍKOVÁ L. Výskyt helmintóz v detskej populácii stredného Spiša, UPJŠ Košice, Prírodovedecká fakulta, Diplomová práca, 2014, 73 s.

ODBER VZORIEK PITNEJ VODY A SÚVISIACICH MATRÍC SAMPLING OF DRINKING WATER AND ASSOCIATED MATRICES

UMRIAN Marián^{1,2}, KANIKOVÁ Milada^{1,2}, PAVLEOVÁ Emília¹, SPUSTOVÁ Jana¹,
KNOŠKOVÁ Eliška³

¹ Úrad verejného zdravotníctva Slovenskej republiky, Odbor objektivizácie faktorov životných podmienok, Bratislava

² Vysoká škola zdravotníctva a sociálnej práce sv. Alžbety, Bratislava, študent doktorandského štúdia

³ Vysoká škola zdravotníctva a sociálnej práce sv. Alžbety, Bratislava

ABSTRAKT

Správna technika odberu pitnej vody podľa príslušných legislatívnych predpisov je predpokladom na spoľahlivú analýzu predpísaných ukazovateľov, ktorých zhodnotením je možné overiť kvalitu pitnej vody dodávanej spotrebiteľovi. Súhrn a priblíženie požadovaných informácií môže byť pomôckou pre odberových a laboratórnych pracovníkov.

Kľúčové slová: Odber pitnej vody. Kvalita pitnej vody. Technika odberu vody. Fyzikálno – chemické analýzy. Biologické analýzy. Mikrobiologické analýzy

ABSTRACT

The correct sampling technique of drinking water is a main requirement for a valid results of analysis of the prescribed indicators in accordance with the relevant legislation. The evaluation of these indicators allows verify the quality of drinking water supplied to consumers. Summary of the required information regarding the sampling water, may be helpful for sampling and laboratory staff.

Key words: Drinking water collection. Drinking Water quality. Water collection technique. Physical-chemical analysis. Biological analysis. Microbiological analysis

ÚVOD

Pitná voda z verejných vodovodov je pod neustálou kontrolou jej dodávateľov aj orgánov verejného zdravotníctva, ktoré pre overenie jej kvality vykonávajú monitoring. Kvalita vody v studniach je ponechaná na vlastníkov. Odbery vzoriek vôd realizujú skúsení odborníci, ktorí sú akreditovaní v danej oblasti. Predmetom odberu vzoriek je kontrola vody určenej na ľudskú spotrebu a vody používanej v priemyselných podnikoch na výrobu, spracovanie alebo konzervovanie alebo predaj výrobkov alebo materiálov určených na ľudskú spotrebu, ak kvalita vody môže ovplyvniť bezpečnosť potravín v ich konečnej podobe. Odber pitnej vody sa vykonáva v súlade s predpismi uvedenými v literatúre [1-4].

Miesta odberu pitnej vody sú napríklad vodovodný kohútik, úpravňa vody, distribučná sieť, vodojem, pri odberoch podzemnej vody je možný odber zo studne, prameňa, vyvieracky alebo vrtu.

Pri odberoch pitnej vody je nutné dodržiavať všeobecné zásady a pokyny na návrhy programov odberov vzoriek a techniky odberu vzoriek, podľa STN EN ISO 5667-1 Kvalita vody. Odber vzoriek. Časť 1: Pokyny na návrhy programov odberu vzoriek a techniky odberu vzoriek.

Všeobecné pokyny na odber vzoriek, ich konzerváciu, dopravu všetkých typov vzoriek, vrátane vzoriek na biologickú analýzu (okrem mikrobiologickej analýzy) sú uvedené v STN EN ISO 5667-3 Kvalita vody. Odber vzoriek. Časť 3: Konzervácia vzoriek vody a manipulácia s nimi a STN EN ISO 5667-16 Kvalita vody. Odber vzoriek. Časť 16: Pokyny na biologické skúšanie vzoriek. Pokyny na plánovanie režimu odberu vzoriek vody a postupov odberu vzoriek na mikrobiologickú analýzu a prepravu, manipuláciu a skladovanie vzoriek až po ich analýzu špecifikuje STN EN ISO 19458 Kvalita vody. Odber vzoriek na mikrobiologickú analýzu [5-8].

Program a ciele odberu vzoriek

Pred vypracovaním samotného návrhu odberu vzoriek je potrebné stanoviť jeho ciele, pripraviť zoznam stanovovaných ukazovateľov, prekonzultovať príslušné metódy analýz, určiť miesta odberu vzoriek, čas a početnosť odberu vzoriek, techniky odberu, popíšu sa zariadenia na odber (ak to technika odberu vyžaduje) vrátane vzorkovníc, spôsob dopravy, skladovanie vzoriek a označovanie vzoriek spolu so záznamom o odbere. Odber sa následne realizuje podľa programu odberu vzoriek, ktorý musí byť vypracovaný v súlade s STN EN ISO 5667-1.

Do programu odberu vzorky pre odberom treba zaznačiť číslo programu odberu, objednávateľa, lokalitu, odberové miesto, dátum odberu, účel vyšetrenia, druh vzorky, zdroj, postup odberu, rozsah analýz a úpravu vzorkovníc a ďalšie doplňujúce informácie. Pokyny uvedené v príslušných častiach STN EN ISO 5667 a STN EN ISO 19458 musia byť

zohľadnené v závislosti od typu vzorky, matrice, stanovovaných ukazovateľov, ako aj typu rozborov.

Pokyny pre konkrétne situácie pri odbere vzoriek, pokyny k vhodnosti materiálov vzorkovníc na uchovanie pôvodných vlastností vzoriek a odporúčané typy vzorkovníc pre konkrétny stanovovaný analyt (ukazovateľ) sú uvedené v STN EN ISO 5667-3. Na základe cieľov programu odberu vzoriek je pred odberom nutné vykonať:

- výber vzorkovníc, prípravu a umytie, vrátane predprípravy,
- prípravu konzervačných činidiel a chemikálií podľa požiadaviek vyplývajúcich z odberu vzoriek, kontrolu dátumov spotreby, prípravu pipiet, prípravu osobitnej prepravky na konzervačné činidlá,
- výber potrebného počtu a druhu pripravených vzorkovníc na požadovaný rozsah analýz, kontrolu stavu fliaš a uzáverov,
- prípravu osobitných vzorkovníc na terénne meranie vybraných ukazovateľov (pH, teplota,...),
- výber zariadení na odber vzoriek na požadovaný rozsah analýz, kontrolu funkčnosti a neporušiteľnosti zariadení a tesnení, prístrojov a pomôcok na odber na stanovenie ukazovateľov v teréne a pre odber vzoriek na analýzy,
- prípravu prepraviek a držiakov na vzorky, chladiacich boxov (resp. prenosných chladičiek) na prepravu vzoriek, kontrolu stavu a čistoty (dezinfekcia), prípravu potrebného množstva chladiacich vložiek, pomôcky na zaistenie vzorkovníc v prepravných boxoch na zabránenie poškodenia vzorkovníc pri preprave vplyvom nežiaducich otrasov a svetelných vplyvov, prípravu a umiestenie monitorovacieho zariadenia na kontrolu teploty v chladiacom boxe počas prepravy,
- prípravu terénnych prístrojov a súprav pre skúšky,
- prípravu štítkov, záznamovej dokumentácie k odberu vzoriek a pracovných postupov do terénu,
- prípravu osobných ochranných pomôcok,
- zabezpečiť dopravu a transport vzoriek, odberových zariadení a pomôcok.

Ak sa odber vzoriek vykonáva na mimoriadne účely, získajú sa špecifické pokyny na odber vzoriek od laboratória, ktoré vykonáva analýzu, prípadne od zadávateľa [4-12].

Vzorkovnice a objemy vzoriek

Výber a druh vzorkovníc na fyzikálno-chemické a biologické rozborov vychádza z STN EN ISO 5667-3 a STN EN ISO 5667-16. Objem, tvar a materiál odberových nádob závisí od charakteru vzorky, počtu paralelných stanovení, požadovaného objemu na vybrané skúšky a od potreby konzervácie a skladovania vzoriek pred samotným spracovaním. Platí pravidlo, že vzorkovnica so zátkou nesmie spôsobiť znečistenie a kontamináciu vzorky, absorpciu, alebo pohltenie stanovovaných ukazovateľov alebo reakciu so stanovovanými ukazovateľmi vo vzorke. Odberové nádoby majú byť chemicky inertné, ľahko čistiteľné a odolné pri zahrievaní a zmrazovaní. Na bežné odbery vzoriek pre fyzikálno – chemické ukazovatele sú najvhodnejšie sklené, polyetylénové alebo polytetrafluóretylénové odberové nádoby. Fľaše so závitovým uzáverom s úzkym alebo širokým hrdlom majú mať chemicky odolné plastové zátky alebo viečka. Pri odbere vzoriek s vodou súvisiacich matric (sedimenty) sa na odber použijú vzorkovnice so širokým hrdlom.

Pokyny na úpravu vzorkovníc na mikrobiologický rozbor sú uvedené v STN EN ISO 19458. Pre rutinné odbery sa používajú čisté sterilné vzorkovnice. Na opakované použitie sú vhodné sklené vzorkovnice, je možné použiť aj vzorkovnice z rôznych plastových materiálov (jednorazové polyetylénové). Uzávery sú sklené alebo plastové, všetky je nutné chrániť pred znečistením, napríklad hliníkovou fóliou. V prípade, že je vzorka odoberaná načieraním, vzorkovnica musí byť sterilná zvnútra aj zvonka (uchovávanie v hliníkovej fólii alebo obale na sterilizáciu). Vzorkovnice musia vydržať vysoké teploty počas sterilizácie, nesmú ovplyvňovať kvalitu vzorky a až do otvorenia v laboratóriu musia zostať uzatvorené.

Sterilné vzorkovnice majú zátku obalenú hliníkovou fóliou a na vzorkovnici je vyznačený dátum sterilizácie (exspirácie). Účinnosť sterilizácie sa kontroluje chemickými alebo biologickými indikátormi. Sterilné vzorkovnice sa skladujú na suchom a tmavom mieste.

Pri zisťovaní mikrobiologickej kvality vody, ktorá je dezinfikovaná oxidačnými činidlami (chlór, chloramín, bróm, ozón a podobne), je nutné zastaviť činnosť oxidačného činidla hneď pri odbere. Na tento účel sa do vzorkovníc pridáva redukčné činidlo tiosíran sodný (na každých odobratých 100 ml objemu vzorkovnice sa pridáva 0,1 ml roztoku pentahydrátu tiosíranu sodného v koncentrácii

18 mg/ ml, čo postačuje na inaktiváciu najmenej 2 až 5 mg/ l zvyškového voľného chlóru).

Celkový objem odobratej vzorky závisí od počtu a druhu ukazovateľov a jednotlivé typické objemy vzoriek potrebné na požadované analýzy sú uvedené v STN EN ISO 5667-3. Celkový objem odobratej vzorky má byť dostatočný na požadované analýzy a na dopĺňajúce alebo opakované analýzy. V niektorých prípadoch je možné, po konzultácii s pracovníkmi laboratória, odobrať aj menší objem vzorky. Nepoužité čiastkové vzorky, ktoré sa skladujú zmrazené, sa majú ponechať uskladnené až do konečného vyhodnotenia analýz. Do záznamu o odbere vzorky sa zaznačí objem odobratých vzoriek, počet a typ vzorkovníc pre jednotlivé typy analýz [6-8].

Technika odberu vzoriek

Na chemické, mikrobiologické a biologické analýzy sa používajú osobitné vzorky z dôvodu odlišností postupov na odber a manipuláciu s nimi. Techniky odberu sa menia podľa konkrétnej situácie, zväčša ide o odber bodovej vzorky. Spôsoby odberu vzoriek sú popísané v príslušných častiach STN EN ISO 5667 [5-12].

Zariadenia na terénne merania

Pri odberoch pitnej vody sa na mieste môžu stanovovať podľa požiadavky pH, voľný chlór (prípadne ozón, chlórdioxid) a teplota. Odber vzorky vody sa riadi príslušnými postupmi pre konkrétny ukazovateľ, pričom platí pravidlo, že na analýzu pri odbere sa používa iná odberová nádoba (vzorkovnica) ako na vzorky, ktoré budú transportované do laboratória. Zariadenia musia byť kalibrované, záznamy o kalibráciách a platnosti kalibrácií sa uvádzajú v príslušných prístrojových knihách. Namierané údaje sa zaznačia do protokolu o odbere [4].

Konzervácia vzoriek

Konzervácia vzoriek a úprava vzorkovníc na fyzikálno-chemickú a biologickú analýzu sa vykonáva v súlade s STN EN ISO 5667-3, na mikrobiologickú analýzu podľa STN EN ISO 19458 alebo podľa príslušných analytických noriem. Spôsob konzervácie a skladovania vzorky musí byť kompatibilný s používanou analytickou metódou a nesmie rušiť stanovenie. Niektoré fyzikálne a chemické zložky sa môžu stabilizovať pridaním selektívnych zlúčenín buď priamo do vzorky po odbere alebo pred odberom do prázdnej vzorkovnice. Vzorky na biologické skúšanie majú byť spracované čo najskôr

po odbere alebo podľa pokynov v príslušných normách. Ku vzorkám na biologické analýzy je možné pridať chemikálie na fixáciu alebo konzerváciu. Na vzorkovnici je nutné vyznačiť konkrétne pridané konzervačné činidlo. V prípade, že nie sú techniky konzervácie vhodné pre všetky stanovované analyty, je nutné odobrať samostatné čiastkové vzorky. Reagenčné roztoky na konzerváciu podliehajú príprave a evidencii v príslušnom laboratóriu.

Najbežnejšie používaný spôsob konzervácie je chladenie vzoriek, ktoré sa vykonáva ihneď po odbere v chladiacich boxoch s chladiacimi vložkami, prípadne sa používajú chladiace boxy s peltierovým článkom, pričom teplotou prostredia sa rozumie teplota vzduchu okolia vzorky. Vzorky na mikrobiologické a vybrané biologické analýzy nesmú zmraznúť, ideálna teplota je 5 ± 3 °C. Ak sa vzorky zmrazujú, repsektíve skladujú pri teplote pod -18 °C až -20 °C, používajú sa polyetylénové (PE) alebo polytetrafluóretylénové (PTFE) vzorkovnice, aby sa zabránilo ich rozbitiu, pričom nesmú byť úplne plné. Skladované zmrazené vzorky sa majú rozmraziť tesne pred použitím.

Počas transportu vzoriek do laboratória je potrebné kontinuálne zaznamenávať teplotu v chladiacom zariadení [6,8,4].

Postup odberu, výber a meranie vybraných terénnych ukazovateľov

Výber miesta a techniky odberu vzorky ovplyvňuje cieľ odberu vzorky. Odber vzoriek vôd sa v závislosti od typu odobratej vzorky vykonáva podľa príslušných noriem STN EN ISO 5667, STN EN ISO 19458 a podľa pracovných postupov odberovej skupiny (laboratória). Odber sa vykonáva podľa vopred dohodnutého programu odberu vzoriek. Podľa typu vzorky sa pri odbere na mieste vykonávajú merania terénnych ukazovateľov v súlade s príslušnými normami: teplota vody, pach, pH, farba, voľný chlór (chlórdioxid, ozón).

Poradie, v ktorom sa vzorky odoberajú, závisí od účelu odberu a existencie novej kontaminácie, alebo od iných nepriaznivých vplyvov na odber vzoriek. Jednotlivé vzorky sa odoberajú v poradí: 1. vzorky pre fyzikálno-chemické analýzy, 2. vzorky pre mikrobiologické analýzy, 3. vzorky pre biologické analýzy. Vzorkovnice na stanovenie fyzikálno-chemických ukazovateľov sa plnia doplna a uzatvoria tak, aby vo vzorkovnici nezostal vzduch. Ak sa vzorky v rámci konzervácie zmrazujú, vzorkovnica sa neplní doplna. Pri konzervácii

vzorky musí vo vzorkovnici zostať miesto na prida-
nie konzervačného činidla. Na vzorkovnici sa
vyznačí použité konzervačné činidlo a vykoná zá-
znam v príslušnom zázname o odbere vzorky.
Vzorkovnice na mikrobiologické a biologické ana-
lýzy sa plnia do 4/5 objemu. Spravidla vzorkovnica
obsahuje pridaný tiosíran sodný, ak to vyžaduje typ
odoberanej vzorky. Vnútorný povrch vzorkovnic
a uzáverov sa nemá chytať prstami a nesmie prísť
do kontaktu s inými predmetmi. Vzorka, v ktorej sa
vykonali terénne merania sa nesmie vrátiť alebo po-
užiť na ďalšie analýzy.

Miesta odberu vzoriek sa rozmiestňujú ďalej od
zdroja po celej vodovodnej sieti, počet má byť
úmerný počtu spojov alebo odbočiek v sieti. Miesta
odberu vzoriek sa určujú v súlade s STN EN ISO
5667-5. Techniky odberu vzoriek sa menia podľa
konkrétnej situácie. Odber vzoriek sa vykonáva
v súlade s vytyčeným cieľom odberu.

Odberový pracovník na mieste odberu skontro-
luje kohútik určený na odber vzorky vody z distri-
bučnej siete a odstráni akékoľvek prídavné zariade-
nia, doplnky a perlátory na kohútiku. Pred odberom
vzoriek sa voda nechá určitý čas odtekať (podľa
doby stagnácie vody). Ak sa voda používa pravi-
delne, stačí nechať odteciť vodu 2-3 minúty. V prí-
pade, že voda dlhodobo stagnuje, nechá sa odteciť
cca. 20-30 minút do ustálenia konštantnej teploty
vody silnejším prúdom, aby sa z vodovodnej prí-
pojky odstránila stojatá voda. Potom sa voda pustí
stredne silným prúdom tak, aby neboli strhávané
častice z potrubia. Zmeria sa teplota vody v mieste
odberu ponorením teplomera do tečúcej vody, ak to
nie je možné, teplota sa zmeria vo vzorkovnici
určenej na meranie terénnych ukazovateľov. Vzor-
kovnica nesmie byť vystavená vplyvu tepelného
zdroja ani priamemu slnečnému žiareniu. Teplotu
odberový pracovník odčíta po ustálení hodnoty na
stupnici (displeji). Teplotu je potrebné stanoviť pri
každom odbere. Výsledok sa zaznačí do záznamu
o odbere vzorky. Po stanovení teploty odberový
pracovník vyberie vzorkovnicu na fyzikálno-chemi-
ckú analýzu (objem a druh podľa stanovovaného
ukazovateľa). Otvorí vzorkovnicu, umiestni ju otvo-
rom pod kohútik bez toho, aby zavrel a znova otvo-
ril kohútik. Odber vykoná tak, že sa voda nechá po-
maly vtekať do vzorkovnice až po preliatie cez
okraj. Potom sa vzorkovnica tesne uzatvorí a overí
sa, či v nej nezostali vzduchové bubliny. Vzorky
z kvapkajúcich odberových miest sa neodoberajú.
Vzorkovnice s prídavkom konzervačného činidla sa

nepreplňajú, to znamená, že sa plnia len pod okraj
vzorkovnice. Vzorkovnica musí byť označená štít-
kom s potrebnými údajmi a uloží sa do prenosného
boxu. Postup sa ďalej opakuje pre všetky vzorkov-
nice [5-12].

Odber vzoriek vody na mikrobiologickú a biolo- gickú analýzu

Odber na mikrobiologickú analýzu sa vykonáva
podľa STN EN ISO 19458, na biologickú analýzu
podľa príslušných STN EN ISO 5667 respektíve
STN 75 7711 a STN 75 7712. Na mieste odberu sa
skontroluje kohútik určený na odber vzorky. Na
hodnotenie kvality vôd z úpravní, akumuláčnych
nádrží, vôd v distribučnom systéme a vody dodáva-
nej do kohútika spotrebiteľa platia pravidlá, ktoré sú
závislé od cieľa. Na hodnotenie kvality vody v distri-
bučnom systéme a dodávanej do kohútika sa od-
stránia akékoľvek prídavné zariadenia, perlátory
a iné doplnky na kohútiku. Ak je to možné, treba sa
vyhnúť zmiešavacím kohútikom. Pred odberom
vzoriek pitných vôd sa z kohútika odstránia nečis-
toty a opakovane sa naplno otvorí a uzavrie, aby sa
z neho vyplavili nečistoty. Nasleduje dezinfekcia
v závislosti od typu kohútika: kovové kohútiky sa
vydezinfikujú dokonalým nastriekaním dezinfekč-
ného roztoku na vonkajší a vnútorný povrch kohú-
tika, ako alternatívu je možné využiť sterilizáciu
plameňom; plastové kohútiky sa ponoria na cca.
2-3 minúty do kadičky s dezinfekčným roztokom
chlórnanu, etanolu alebo izopropanolu.

Pre monitorovanie vody v distribučnom systéme
sa kohútik po dezinfekcii otvorí do polovičného
prietoku a voda sa nechá odtekať tak, aby neboli str-
hávané častice z potrubia a aby sa zabránilo ovplyv-
neniu vzorky zvyškami použitej dezinfekcie kohú-
tika dovedy, kým sa nedosiahne konštantná teplota
vody. V prípade vody dodávanej do kohútika spo-
trebiteľa sa odpúšťanie vykonáva krátko, iba na pre-
konanie vplyvu dezinfekcie kohútika. Kohútik zos-
táva počas odberu otvorený.

Odberový pracovník vyberie sterilnú vzorkov-
nicu určenú na mikrobiologickú analýzu a otvorí ju
pred odberom tak, aby zabránil kontaminácii zátky
a hrdla vzorkovnice rukou alebo prostredím (vnú-
torná časť zátky smeruje nadol, voľne ukrytá pod
hliníkovou fóliou, nikde sa neukladá). Vzorkovnicu
naplní tak, aby nedošlo do kontaktu vzorkovnice
s kohútikom. Hneď po odbere vzorkovnicu uzavrie
zátkou s hliníkovou fóliou, skontroluje a doplní
údaje na štítku a odloží do prenosného boxu.

Voda na spotrebu sa pri štátnom zdravotnom dozore odoberá s cieľom zistiť kvalitu vody tak, ako je konzumovaná (ako vyteká z kohútika). Odber vzoriek sa realizuje v špeciálnych situáciách, napríklad pri podozrení alebo vypuknutí ochorenia. Pri odbere vzorky vody na spotrebu sa musí brať do úvahy kontaminácia vody súvisiaca s materiálom vodovodného potrubia (fyzikálno-chemické ukazovatele) a/alebo kontaminácia vody baktériami pochádzajúcimi z vonkajšej strany kohútika alebo z akéhokoľvek prídavného zariadenia alebo doplnku, respektíve vnútornej kontaminácie samotného vodovodného potrubia (mikrobiologické a biologické ukazovatele). Prídavné zariadenia v tomto prípade zostávajú na mieste a odberá sa prvá vzorka pitnej vody bez vyplachovania a odpúšťania, kohútik sa pred odberom nedezinfikuje.

Odber vzoriek z prameňov a studní je závislý od cieľa a je potrebné vybrať rôzne spôsoby odberu vzoriek, kde treba rozlišovať medzi studňami a vrtmi, v ktorých sú trvalo nainštalované čerpadlá alebo sú bez stálych čerpadiel. Pre čerpanie, dezinfekciu kohútika a výber vzorkovník je nutné vedieť, či chceme zistiť kvalitu vody zo studne alebo kvalitu vody na spotrebu [5-14].

Odber vzoriek s vodou súvisiacich matric

Častice skorodovaného kovu pri odbere vzoriek vôd z vodovodného potrubia sa môžu získať oškrabaním alebo pomocou prudkých zmien tlaku vo vodovodnom potrubí. Vzorky sedimentov získavame z tekutých vzoriek filtráciou, dekantáciou alebo centrifugáciou.

Označovanie vzoriek, manipulácia so vzorkami, záznamy o odbere, doprava a skladovanie vzoriek

Vzorkovníce musia byť vode odolne označené, označenie musí odolať sušeniu a zmrazeniu bez toho, aby bolo nečitateľné alebo znehodnotené. Na vzorkovníci musí byť vyznačený dátum odberu vzorky, miesto odberu a číslo vzorky. Označenie zabezpečuje odberový pracovník pri odbere. Osobitné vzorky anomálnych látok musia byť jasne označené a dodané spolu s popisom anomálie do laboratória. Vzorky obsahujúce nebezpečné alebo potenciálne nebezpečné látky sa musia jasne označiť ako nebezpečné.

Záznam o odbere vzorky musí obsahovať najmä: identifikáciu vzorky, objednávateľa, dátum a čas odberu vzorky, miesto odberu, popis miesta odberu,

dezinfekcia zdroja, výsledky meraní požadovaných terénnych ukazovateľov meraných na mieste, druh vzorky, celkový objem odobratej vzorky, spôsob konzervácie, podmienky prostredia a poveternostné údaje, meno a podpis odberového pracovníka, ďalšie potrebné údaje. Po zvážení situácie na mieste odberu sa rozsah a počet stanovovaných ukazovateľov môže meniť.

Pokyny na prepravu a skladovanie vzoriek vody na fyzikálno-chemickú, chemickú a biologickú analýzu sú uvedené v STN EN ISO 5667-3. odobraté vzorky chránené pred svetlom v čo najkratšom čase, pri teplote $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ sa dopravujú do laboratória na analýzu. Vzorky, ktoré nie je možné doručiť na vyšetrenie v priebehu jedného dňa sa musia stabilizovať alebo zakonzervovať v súlade s normou alebo príslušnou analytickou metódou. Vzorky nesmú zmraznúť, musia byť vhodne oddelené od chladiaceho média. Vzorkovníce je vhodné zaistiť, aby sa zabránilo pri transporte ich poškodeniu vplyvom otrasov a aby sa neznehodnotil ich obsah, prípadne nenastali straty zložiek vzorky.

Podľa STN EN ISO 19458 má byť čas medzi odberom vzoriek na mikrobiologické analýzy a samotnou analýzou čo najkratší, maximálny čas je stanovený na 8 hodín. Vzorky sa počas transportu chránia pred poškodením, zvýšením teploty a vonkajšou kontamináciou. Chladenie vzoriek sa vykonáva hneď po odbere uložením do chladiaceho boxu pri teplote $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Pri transporte je potrebné zaznamenávať teplotu v chladiacom boxe. Doba skladovania vzoriek pred začatím analýzy je špecifická pre každý ukazovateľ. Vzorky sa nesmú skladovať dlhšie, ako je odporúčaná doba skladovania podľa STN EN ISO 5667-3. Maximálna doba skladovania pred začatím analýzy zahŕňa aj dobu transportu do laboratória a počítajú sa od odberu vzorky. Ak sa v prípade nepredvídaných udalostí prekročí maximálny odporúčovaný čas skladovania vzorky pred začatím analýzy, laboratórium po dohovore s objednávateľom dohodne, či sa budú vzorky analyzovať. Informácie sa zaznačia do protokolu o odbere a prenesú sa aj do výsledkového listu vo vyhlásení „analytické výsledky nemusia zodpovedať koncentrácii v čase odberu vzorky v dôsledku prekročenia maximálneho času skladovania“ [6,8,4].

Zabezpečenie kvality pri odbere vôd

Pokyny na výber a používanie rôznych techník zabezpečenia kvality pri odbere pitných vôd uvádza

STN ISO 5667-14 Kvalita vody. Odber vzoriek. Časť 14: Pokyny na zabezpečenie kvality pri odbere environmentálnych vzoriek vody a manipulácii s nimi. Zdroje chýb zahŕňajú napríklad znečistenie, ktoré môžu spôsobiť materiály zariadení na odber vzoriek, vzájomná kontaminácia vzoriek, konzervácia, nevhodné skladovanie a doprava, nestabilita vody, nesprávny odber vzoriek, odber z nehomogenizovaných vodných telies.

Cieľom riadenia kvality pri odbere je nájsť spôsob monitorovania a zisťovania chýb pri odbere vzoriek a vylúčenia neplatných alebo zavádzajúcich údajov, preukázať adekvátnu kontrolu zdrojov chýb pri odbere vzoriek a indikovať variabilitu odberu vzoriek a určiť jej dôležitosť pri vzniku chýb. Na tento účel sa používa odber opakovaných vzoriek na kontrolu zhodnosti odberu vzoriek, terénne vzorky na slepý pokus na monitorovanie zdrojov znečistenia vzorky a používanie obohatených vzoriek ako vzoriek na kontrolu kvality na posúdenie stability vzorky počas dopravy a skladovania [11].

Bezpečnostné opatrenia

Odberoví pracovníci musia dodržiavať bezpečnostné predpisy a používať ochranné pracovné pomôcky. Niektoré konzervačné činidlá sa musia používať opatrne, je nutné rešpektovať pri nich bezpečnostné predpisy.

ZÁVER

Súhrn a priblíženie požadovaných informácií k odberom vzoriek pitných vôd môže byť vhodnou pomôckou pre odberových a laboratórnych pracovníkov.

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

- [1] Zákon 355/2007 Z.z. zákon o ochrane, podpore a rozvoji verejného zdravia a o zmene a doplnení niektorých zákonov.
- [2] Vyhláška č. 247/2017 Z.z. Vyhláška Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky, ktorou sa ustanovujú podrobnosti o kvalite pitnej vody, kontrole kvality pitnej vody, programe monitorovania a manažmente rizík pri zásobovaní pitnou vodou.
- [3] Zákon NR SR č. 306/2012, Zákon, ktorým sa mení a dopĺňa zákon č. 355/2007 Z. z. o ochrane, podpore a rozvoji verejného zdravia a o zmene a doplnení niektorých zákonov v znení neskorších predpisov a o zmene a doplnení zákona č. 364/2004 Z. z. o vodách a o zmene zákona Slovenskej národnej rady č. 372/1990 Zb. o priestupkoch v znení neskorších predpisov (vodný zákon) v znení neskorších predpisov.
- [4] STN EN ISO/IEC 17025: 2005 Všeobecné požiadavky na kompetentnosť skúšobných a kalibračných laboratórií. SÚTN, Bratislava, 2005.
- [5] STN EN ISO 5667-1 Kvalita vody. Odber vzoriek. Časť 1: Pokyny na návrhy programov odberu vzoriek a techniky odberu vzoriek. SÚTN, Bratislava, 2013.
- [6] STN EN ISO 5667-3 Kvalita vody. Odber vzoriek. Časť 3: konzervácia vzoriek vody a manipulácia s nimi. SÚTN, Bratislava 2013.
- [7] STN EN ISO 5667-16 Kvalita vody. Odber vzoriek. Časť 16: Pokyny na biologické skúšanie vzoriek. SÚTN, Bratislava, 2000.
- [8] STN EN ISO 19458 Kvalita vody. Odber vzoriek na mikrobiologickú analýzu. SÚTN, Bratislava, 2007.
- [9] STN ISO 5667-5 Kvalita vody. Odber vzoriek. Časť 5: Pokyny na odber vzoriek pitnej vody z úpravni vôd a z distribučnej siete. SÚTN, Bratislava, 2007.
- [10] STN ISO 5667-11 Kvalita vody. Odber vzoriek. Časť 11: Pokyny na odber vzoriek podzemných vôd. SÚTN, Bratislava, 1999.
- [11] STN ISO 5667-14 Kvalita vody. Odber vzoriek. Časť 14: Pokyny na zabezpečenie kvality pri odbere environmentálnych vzoriek vody a manipulácii s nimi. SÚTN, Bratislava, 2000.
- [12] STN EN ISO 5667-21 Kvalita vody. Odber vzoriek, Časť 21: Pokyny na odber vzoriek pitnej vody dodávanej cisternami a inými spôsobmi ako vodovodnou sieťou. SÚTN, Bratislava, 2012.
- [13] STN 757711 Kvalita vody. Biologický rozbor. Stanovenie biosestónu, SÚTN, Bratislava, 2000.
- [14] STN 757712 Kvalita vody. Biologický rozbor. Stanovenie abiosestónu, SÚTN, Bratislava, 2000.

**VÝZNAM SAMOVYŠETROVANIA PRSNÍKOV V RÁMCI VČASNEJ DIAGNOSTIKY
KARCINÓMU PRSNÍKA ŽIEN DO 45 ROKOV
THE IMPORTANCE OF BREAST SELF-TESTING IN THE EARLY DIAGNOSTICS
OF BREAST CANCER IN WOMEN UNDER 45 YEARS**

SLOBODNÍKOVÁ Jana^{1,2}, KLEPANEC Andrej², MELUŠ Vladimír¹

¹ *Fakulta zdravotníctva, Trenčianska univerzita Alexandra Dubčeka v Trenčíne, Trenčín*

² *Inštitút fyzioterapie, balneológie a liečebnej rehabilitácie v Piešťanoch, Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Piešťany*

ABSTRAKT

Medzi hmatné nálezy u žien rôznych vekových kategórií, všeobecne nazývané ako „hrčky“ patrí až 80 % benígnych (nezhubných) ochorení prsníka. Niektoré predstavujú „len“ zmeny štruktúry žľazy, napr. na podklade difúzných či ložiskových hormonálnych zmien, iné patria medzi typické solídne alebo cystické ochorenia (fibroadenóm, cysta, adenóm, papilómy a pod.) s typickými i menej typickými klinickými nálezmi. Diferenciálna diagnostika, manažment a liečba nebývajú jednoduché. Cieľom práce je definovať význam samovyšetovania prsníkov v populácii žien do 45 roku života, význam sonografie a jej miesto v pozícii ďalšieho sledovania, biopsie a/alebo k indikácii chirurgickému riešeniu.

Kľúčové slová: Samovyšetovanie. Prevencia. Benígne lézie. cysta. Fibroadenóm. Sonografia

ABSTRACT

Among palpable findings in women of various age categories, commonly referred to as "lumps", account for up to 80 % of benign (nonmalignant) breast diseases. Some represent "only" changes in the structure of the gland, e.g. on the basis of diffuse or bearing hormonal changes, others are typical for solid or cystic diseases (fibroadenoma, cyst, adenoma, papillomas, etc.) with typical and less typical clinical findings. Differential diagnostics, diagnostics, management and treatment are not easy. The aim of this work is to determine the role of breast self-examination in the population of women under 45 years of age, the importance of sonography and its place in the position of follow-up, biopsy and / or indication of surgical treatment.

Key words: Self-examination. Prevention. Benign lesions. Cyst. Fibroadenoma. Sonography

ÚVOD

Skupina tzv. hrčiek v prsníkoch, ktoré patria k najčastejším hmatným nálezom, sú štatisticky až z 80 % benígnymi (nezhubnými) zmenami v prsníkoch. Skupina benígnych zmien je pomerne široká, klinické, morfológické charakteristiky ako aj nálezy zobrazovacích metód sú rôznorodé a nie vždy jednoznačné. Najčastejšie sa stretávame s pojmi mastopatia, fibrocystické ochorenie prsníka a mikrocystósa. Tieto výrazy sa používajú najčastejšie v odboroch, ktoré sa venujú diagnostike a liečbe

ochorení prsníkov - mamológia v gynekológii, gynekológia, chirurgia, onko-chirurgia, klinická onkológia, endokrinológia a histopatológia. Ku všetkým menovaným ochoreniam sa vzťahuje to, že sa nejedná o karcinóm, tzn. zhubné ochorenie prsníka. Benígne ochorenia prsníkov bývajú často klinicky sypomatické, prejavujú sa difúznymi alebo lokálnymi sypómami ako sú napr. bolesť (mastodynia, často cyklická), hrčky, nodularizácia, nálezy obojstranné alebo lokalizované do jednotlivých kvadrantov, často viazané na hormonálnu aktivitu, cyklického charakteru vznikajúce v období ovulácie alebo premenštruálne. Tieto ochorenia sa vyskytujú najčastejšie v mladej ženskej populácii [1]. Pri suspekcií na benígne ochorenie je metódou prvej voľby v skupine žien do 35-teho roku života sonografia (ultrazvuk, ultrasonografia). Ženám je všeobecne odporúčané samovyšetovanie. Tieto vyšetrenia sú predmetom praktického nácviku a majú veľký význam vo včasnej prevencii karcinómu prsníka. U mladých žien je objektívnou zobrazovacou metódou práve sonografia. Je to vyšetrenie bez rizika ionizujúceho žiarenia v porovnaní s mamografiou, má vyššiu senzitivitu a špecificitu ako mamografia v teréne tzv. denzných, hutných prsníkov. Mladé ženy majú prevažne prsníky veľmi bohaté na fibroglandulárne tkanivo, s malou prímiesou tukovej zložky. V prípade, že pri sonografickom vyšetrení striktné používame a aplikujeme sonografické priame a nepriame kritériá benígnych a malígnych lézií, skutočne sme schopní oddiferencovať cystické a solídne ložiská a určiť aj suspekciu na benígne alebo malígne ochorenie. Používame k tomu stupnicu hodnotenia BI-RADS (z angl. Breast Imaging Reporting and Data System) vypracovaný Americkou rádiologickou spoločnosťou pre hodnotenie mamografického, sonografického, magneto-rezonančného a v neposlednom rade aj histologického nálezu v prsníkoch [2]. V prípade neurčitosti, presnejšie skôr susp. na karcinóm, ktorý naozaj nie je

výnimkou ani v mladšom veku, tzn. pri použití stupnice BI-RADS 4a, b, c a alebo BI-RADS 5, indikujeme na doriešenie nálezu histologickú verifikáciu ložiska, sonograficky riadenú core cut biopsiu. Je to rýchla a relatívne jednoduchá metóda pre presnú diagnostiku a overenie suspekcie nálezu. Vakuová mamotómia ako najprogressívnejšia forma core biopsie je formou až malého chirurgického zákroku k odberu vzorky a nahrádza tzv. otvorenú minimálnu chirurgickú biopsiu – excíziu [3].

Najčastejším solidným nálezom u mladších žien sú hormonálne aktívne dependentné okrsky žľazy alebo fibroadenómy [4]. Riziko vzniku karcinómu prsníka z fibroadenómu nie je však vyššie ako všeobecne riziko vzniku karcinómu prsníka u normálnej populácie.

K excízii sú indikované predovšetkým tie typy fibroadenómov, ktoré majú v náleze core cut biopsie alebo tenkoihlovej biopsie stromálnu prestavbu, vyššiu celularitu a ťažko ich oddiferencovať od phyllodes tumoru. Indikovaná k chirurgickej liečbe je aj väčšina z tzv. juvenilných fibroadenómov [5, 6]. Medzi benígne lézie prsníkov patrí ešte veľké množstvo ďalších patologických jednotiek, ako sú intraduktálny papilóm, galaktokéla, phyllodes tumor (obrovský fibroadenóm), adenóm, lipóm, hamartóm, tubulárny a laktačný adenóm, pseudoangiomatózna stromálna hyperplázia, infarkt prsníka, radial scare (obraz radiálnej – vnútornej parenchymatóznej jazvy), infekcie, zápalové ochorenia, edematózne zmeny, kam patria napr. aj alergické reakcie, lymfédem nemalígneho pôvodu, diabetická mastopatia, traumy – úrazy, postraumatické stavy, z nich najčastejšie hematómy, tukové nekrózy a olejové cysty, ako aj keloidné jazvy a kožné afekcie. Medzi benígne a časté zmeny sú radené aj intramamárne lymfatické uzliny a kožné lézie.

U mladých žien je výskyt karcinómu prsníka nižší v porovnaní s ženami nad 45 a 50 rokov. V roku 2008 bolo diagnostikovaných na Slovensku 2608 nových karcinómov prsníka, v roku 2003 len 2016 prípadov, v roku 1983 1002 prípadov a v porovnaní s rokom 1968, kedy bol počet novo-diagnostikovaných karcinómov prsníka žien 821, ide o nárast o viacej ako 200% nových prípadov za obdobie 45 rokov [9]. Nárast je jednoznačne signifikantný.

U mladých žien do 40-teho roku života [10-12] na celom svete je diagnostikovaných až 6-8 % z novo-diagnostikovaných prípadov karcinómu prsníka. Prognóza tohto závažného ochorenia závisí od

viacerých faktorov, jedným z hlavných rizikových faktorov je vek pacientky, potom štádium ochorenia, histologická diagnóza – grading a imunohistochemické výsledky, genetický status a prítomnosť ostatných rizikových faktorov. Pre pacientky od 40-teho roku je preventívnym vyšetrením mamografia a následné modalities sonografia, biopsia a ak je potrebné aj magnetická rezonancia. U mladých asymptomatických žien medzi 20-tym a 40-tym rokom, je prvou diagnostickou modalitou sonografia. Podľa znenia prílohy č.2 Zákona o rozsahu uhrádzaní zdravotnej starostlivosti č. 577/2004 Z.z. [13] majú asymptomatické ženy od 18 roku veku indikované v rámci preventívnej gynekologickej prehliadky klinické, palpačné vyšetrenie raz ročne a sonografické preventívne vyšetrenie prsníkov v intervale raz za dva roky.

CIEĽ

Cieľom práce je posúdiť význam samovyšetrovania, palpačného vyšetrenia u mladých žien na základe počtu zachytených malígnych ložísk u mladých žien v retrospektívnej štúdií z obdobia 13 rokov práce mamodiagnostického pracoviska Rádiologickej kliniky s.r.o. v Trenčine. Zo zachytených a histologicky verifikovaných malígnych lézií v súbore diagnostikovaných malígnych ložísk porovnáваме výstupy z palpačného vyšetrenia, sonografie a biopsie s konečnou histopatológiou.

MATERIÁL A METÓDY

V sledovanom období bolo na našom pracovisku diagnostikovaných spolu 97 žien. V rámci vyšetrenia boli aplikované vyšetrenie ultrazvukom (USG – prístroj B-K 400, Siemens SG 50), mamografia (MG – Nova 3000 Siemens, FUJI Amulet) a MR (1,5 T Siemens). Biopsie boli realizované metódou z voľnej ruky, pod kontrolou sonografie, core cut 16 a 14 G, jadro 15 a 22 mm., alebo tenkoihlovej biopsie, ihly 20 G. Sledovali sme vek žien a v prípade vyšetrenia aj hmatnosť ložiska, výsledok bioptického vyšetrenia, grading intraduktálneho karcinómu, proliferatívny index, prítomnosť HER2, BRCA, rodinnú anamnézu a veľkosť ložiska.

Pacientky sme rozdelili podľa veku do piatich skupín. Skupina A bola tvorená ženami vo veku do 30 rokov (n=6), v skupine B boli ženy vo veku 31-35 rokov (n=8), v skupine C boli ženy vo veku 36-40 rokov (n=28), skupinu D tvorili ženy vo veku od 41-45 rokov (n=32) a posledná skupina E zahŕňala pacientky vo veku od 46-50 rokov (n=23).

VÝSLEDKY

Na porovnanie numerických dát sme využili neparametrický Kruskal-Wallisov test. V prípade závislosti medzi jednotlivými sledovanými parametrami sme použili neparametrický Spearmanov korelačný koeficient. Početnosti nominálnych dát v jednotlivých kategóriách sme spracovali s pomocou kontingenčných tabuliek s využitím chí-kvadrátového testu. Ak p -hodnota testovacieho kritéria štatistických testov bola menšia ako 0,05, považovali sme rozdiely medzi sledovanými premennými za nenáhodné a spôsobené pôsobením sledovaných faktorov.

Z aspektu výsledkov uvedených v tabuľkách výsledkovej časti je dôležité uviesť, že nie všetky pacientky z uvedeného súboru mali vykonané všetky vyšetrenia. Z toho dôvodu môžu byť číselné hodnoty výsledkov jednotlivých kategórií nižšie,

ako počiatočný počet pacientok v danej skupine. Prehľad je uvedený v tabuľke 1.

V prvom kroku sme testovali rozdiely medzi piatimi súbormi v parametroch proliferačného indexu a veľkosti lézií. Výsledky testovania proliferačného indexu sú uvedené v tabuľke 2. Z výsledkov vyplýva zaujímavé zistenie. Výsledok neparametrickeho testu síce nedosiahol formálnu hranicu číselnej p -hodnoty 0,05, ktorá je nutná pre zamietnutie predpokladu zhody medzi jednotlivými vekovými podskupinami, avšak je tejto hodnote pomerne blízka ($p=0,07$). Inými slovami, ak by sme dosiahli napr. výsledkom s p -hodnotou testovacieho kritéria $p=0,70$, svedčilo by to jasne v prospech vzájomnej zhody súborov vo veľkosti proliferačného indexu. V tomto prípade však p -hodnota testovacieho kritéria sa nachádza v zóne tzv. marginálnej hladiny významnosti ($0,05 < p < 0,10$), v ktorej si už takýto jednoduchý záver nemôžeme dovoliť. Pri pohľade na

Tabuľka 1 Prehľad vyšetrených parametrov

Vek	n	USG	MG	MR	L	Bio	Bio-	Bio+	IDC	prolif	Her	RA	BRCA	Velk
< 30	6	6	1	5	5	6	I II III IV	I 5 II 1 III IV V	I II 3 III 2 IV	6	+ 1/6 x	I II 1/6 x	+ 1 X 5	6
31-35	8	8	6	5	6	8	I II III IV	I 5 II 2 III 1 IV V	I 1 II III 4 IV	8	+2/6 x 2	I II 1/6 X 2	+ X 1	8
36-40	28	28	24	20	19	25	I II 1 III IV 2	I 12 II 1 III 11 IV V 1	I 3 II 2 III 5 IV 2	17	+ 2/22 X 6	I - II 8/24 X 4	+ 2/9 X 19	25
41-45	32	32	32	19	19	32	I II III IV	I 14 II 4 III 12 IV 2 V	I 4 II 3 III 6 IV 1	29	+ 5/30 X 2	I 1/31 II 6/31 X 1	+ 2/7 x	32
46-50	23	23	23	16	14	23	I II III IV	I 13 II 5 III 4 IV 1 V	I 3 II 3 III 6 IV 1	23	+ 7/23 x	I 4/23 II 7/23 x	+ 2/13 x	23

Legenda: n - celkový počet žien vo vekovej skupine; USG - počet žien vyšetrených ultrazvukom; MG - počet žien vyšetrených MG; MR - počet žien vyšetrených MR; L - počet žien s hmatným ložiskom; Bio - počet žien s pozitívnou biopsiou; Bio- - nález pri negatívnej biopsii (1=fibroadenóm, 2=adenóza, 3=ADH, 4=Phyllodes tumor - iba v tretej vekovej skupine žien u troch žien); Bio+ typ v prípade pozitívneho nálezu biopsie (1=IDC, 2=ILC, 3=DCIS, 4= mucinózny, 5=gelatinózny); IDC - grade (1=IDCI, 2=IDCII, 3=IDCIII, 4=triple negat); prolif - počet žien, u ktorých bol stanovený proliferačný index; HER- počet pozitívnych nálezov zo všetkých nálezov, pričom x=nevyšetrené; BRCA - počet pozitívnych/zo všetkých plus x=nevyšetrené; velk - počet žien so stanovenou veľkosťou lézie

Tabuľka 2 Testovanie rozdielov v proliferáčnom indexe medzi súbormi

Veková skupina	<i>n</i>	\bar{x}	<i>sd</i>	x_m	<i>min.</i>	<i>max.</i>	<i>p</i>
Do 30r.	6	28,3	19,4	25	10	60	0,07
31-35 r.	8	44,4	21,9	50	5	70	
36-40 r.	17*	22,6	24,0	10	5	80	
41-45 r.	29	19,3	20,4	10	5	80	
46-50 r.	23	24,8	23,3	15	5	70	

Legenda: *n* - počet pacientok; \bar{x} - aritmetický priemer; *sd* - smerodajná odchýlka; x_m - medián; *min.* - minimálna hodnota; *max.* - maximálna hodnota; *p* - hodnota testovacieho kritéria Kruskal-Wallisovho testu; * v súbore bolo 28 žien, avšak proliferáčny index bol stanovený iba u 17 žien

ukazovatele stredu (aritmetický priemer a medián) v tabuľke 2 môžeme vidieť, že pacientky majú v prvých dvoch vekových kategóriách vyššie hodnoty, ako v zostávajúcich troch skupinách. Inými slovami sa javí, že vo vekových kategóriách do 35 rokov bol proliferáčny index o niečo vyšší než u starších vekových skupín.

Použitý štatistický test však túto skutočnosť nevyhodnotil ako štatisticky významnú zrejme pre nižší počet pacientok v spomenutých prvých dvoch skupinách (*n*=6; resp. *n*=8; tabuľka 2).

Dá sa predpokladať, že ak je skutočne proliferáčny index vyšší v mladšom organizme, tak so zvýšením počtu vyšetrených pacientok v týchto vekových skupinách naozaj budeme môcť očakávať štatisticky významné rozdiely v porovnaní s vyššími vekovými skupinami. Je treba zdôrazniť, že aj keď sme použili pojem „nižší počet pacientok“, tak vzhľadom na požiadavky použitého neparametrickeho Kruskal-Wallisovho testu na minimálny počet vzoriek (*n*>5) sme podmienku jeho použitia splnili.

Následne sme testovali rozdiely medzi súbormi vo veľkosti útvarov. Z tabuľky č. 3 nevyplývajú žiadne náznaky diferenciácie veľkosti lézií medzi jednotlivými kategóriami žien. V tomto prípade to však nemá nič spoločné s biometabolickými dejmi pri neoplazmatickej transformácii, ale zrejme iba prirodzený dôsledok vyhľadania lekárskej pomoci pri nájdení hmatného útvaru. Lézia musí zrejme dosiahnuť určitú veľkosť, aby si ju pacientka nahmatala a vyhľadala pomoc, avšak ani raz nedošlo k situácii, že by pacientky z nejakého dôvodu podcenili objav anomálie a vyhľadali lekársku pomoc až neskôr pri väčšej veľkosti ložiska.

Následne sme testovali zastúpenie jednotlivých kategórií histologických nálezov biopptickej vzorky vzhľadom k vekovým skupinám pacientok. Výsledky sú uvedené v tabuľke 4. V tomto prípade sme museli zlúčiť nielen vekové kategórie

Tabuľka 3 Testovanie rozdielov veľkosti lézií v jednotlivých vekových kategóriách žien

Veková skupina	<i>n</i>	\bar{x}	<i>sd</i>	x_m	<i>min.</i>	<i>max.</i>	<i>p</i>
Do 30r.	6	2,5	1,1	2,5	1	4	0,70
31-35 r.	8	2,4	0,7	2,0	2	4	
36-40 r.	25	2,6	1,1	2,0	1	5	
41-45 r.	32	2,7	1,0	2,5	1	5	
46-50 r.	23	2,4	0,7	2,0	2	4	

Legenda: *n* - počet pacientok; \bar{x} - aritmetický priemer; *sd* - smerodajná odchýlka; x_m - medián; *min.* - minimálna hodnota; *max.* - maximálna hodnota; *p* - hodnota testovacieho kritéria Kruskal-Wallisovho testu

Tabuľka 4 Testovanie pozitivity biopsie

Parametre	IDC	ILC	DCIS+muc*	Spolu
Vek do 40 r.	22	4	12	38
Vek nad 40r.	27	9	19	55
Spolu	49	13	34	93

Legenda: Chí-kvadrátový test, *p*=0,82; *df*=2; *gelatinózny bol iba jediný prípad – nezahrnutý do výpočtov

pacientok, ale aj kategórie histologických nálezov v bioptovanom materiáli. Z tabuľky 4 jednoznačne vyplýva, že typ nálezu nijakým spôsobom nesúvisí s vekovou kategóriou pacientok.

DISKUSIA

Cieľom tohto príspevku bolo preukázať vplyv veku na výskyt, grading, histologický typ a veľkosť lézie pri diagnostikovaných karcinómoch prsníka mladých žien. Hlavným cieľom bolo posúdenie významu samovyšetovania prsníkov mladých žien a postavenie preventívnej sonografie v diagnostickom algoritme prevencie a skríningu karcinómu prsníka.

Najčastejším solidným nálezom u mladších žien sú hormonálne aktívne, dependentné okrsky žľazy alebo fibroadenómy, pričom tieto bývajú hmatné a sú najčastejšou príčinou sonografického vyšetrenia žien s hmatným nálezom [4]. Riziko vzniku karcinómu prsníka z fibroadenómu nie je však vyššie ako všeobecné riziko vzniku karcinómu prsníka

u normálnej populácie. Na základe prepočtu štatistických údajov sme zistili, že napriek nárastu absolútnych počtov novo-diagnostikovaných karcinómov mladých žien, ich nárast nie je vyšší ako u žien ostatných vekových skupín [14]. Sonografia nie je metódou skríningu a prevencie u mladých žien, bez hmatného nálezu neprináša želaný efekt. Navýši sa len počet diagnostikovaných cýst, cystoidných benigných lézií, okrskov žľazy s hormonálnymi zmenami a počet fibroadenómov [15]. Všetky nájdené karcinómy v retrospektívnej štúdií z mamografického pracoviska Rádiologickej kliniky s.r.o. v Trenčíne u žien do 40. roku života boli klinicky hmatné. Samovyšetovanie má v tejto vekovej skupine nezapustiteľný význam [16].

ZÁVER

U žien mladších ako 40 rokov sme nepreukázali významnejší vplyv veku na výskyt, grading, histologický typ a veľkosť lézie nádorov prsníka.

Naopak, z našich výsledkov sa javí, že všetky diagnostikované karcinómy boli veľkostne v hranici hmatných lézií. Preventívne sonografické vyšetrenia u žien s nehmatnými nálezmi preto podľa nášho názoru nie sú opodstatnené. Pri obrovskom množstve sonografických preventívnych vyšetrení žien do 40. života veku by mohli diagnostické pracoviská venovať väčšiu pozornosť skríningu žien nad 45 rokov, ktorý na Slovensku (aj pre nedostatok financií) nie je doteraz realizovaný.

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

- [1] STRNAD P., DANEŠ J. *Nemoci prsu pro gynecology*. Grada Publishing, 2001, ISBN 80-7169-714-1, 324 str.
- [2] BURNSIDE E., SICKLES E.A., et al. The ACR BI-RADS experience: learning from history. *J Am Coll Radiol*. 2009; 6: 851-860.
- [3] ENION D.S., DIXON A.M. *Benign breast disease. Breast ultrasound*, Elsevier, 2008, ISBN - 13: 978 0 443 10076 5, str. 139-162
- [4] HEYWANG-KOBRUNNE S.H., DERSHAW D.D. *Diagnostic Breast Imaging*, 1997, Georg, Thieme, ISBN 3-13-102891-2, 400 str.
- [5] PASQUALINI J.R., CORETS-PRIETO J., et al. Concentration of estrone, estradiol and their sulfates and evolution of sulfatase and aromatase activities in patients with breast fibroadenoma. *Int J Cancer*. 1997; 70 (6): 639-643.
- [6] APPLE S.K., DASCALOS J.M., BASSETT L.W. *Solid Benign Lesions of the Breast. Breast Imaging*, Elsevier, 2011, ISBN: 978-1-4160-5199-2, str. 255-260.
- [7] APPLE S.K., DOEPKE L., BASSETT L.W. *Benign cystic Lesions of the Breast. Breast Imaging*, Elsevier, 2011, ISBN : 978-1-4160-5199-2, str. 239-254.
- [8] GURAY M., SAHIN A.A. Benign breast diseases: classification, diagnosis and management. *Oncologist*. 2006; 11: 435-449.
- [9] LEHMAN C.D., LEE C.I., LOVING V.A., et al. Accuracy and value of breast ultrasound for primary imaging evaluation of symptomatic women 30-39 years of age. *AJR Am J Roentgenol*. 2012; 199: 1169-1177.
- [10] ASSI H.A., et al. Epidemiology and prognosis of breast cancer in young women. *J Thorac Dis*. 2013; 5 (Suppl 1): S2-8.
- [11] KHEIRELSEID E.H., BOGGS J.M., CURRAN C., et al. Younger age as prognostic indicator in breast cancer: a cohort study. *BMC Cancer*. 2011; 11: 383-389.
- [12] RIES A., EISNER M., KOSARY C., et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2002, Bethesda, MD: National Cancer Institute. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2002/, based on November 2004 SEER data submission, posted to the SEER web site 2005 (accessed 5 March 2013)
- [13] 577/2004 Z. z. - Zákon o rozsahu zdravotnej starostlivosti uhrádzanej na základe verejného zdravotného poistenia a o úhradách za služby súvisiace s poskytovaním zdravotnej starostlivosti, Príloha č. 2
- [14] SLOBODNÍKOVÁ J., KRAJČOVIČOVÁ Z., MELUŠ V. Karcinóm prsníka mladých žien - retrospektívna štúdia z pracoviska rádiologickej kliniky s.r.o. *Zdravotnícke listy*. 2015; 3 (1): 19-26.
- [15] KOPANS D.B. *It's time to stop the misinformation about breast cancer screening*, in: *Screening and Beyond*, ESR. EUSOBI, 2016, ISBN 978-3-9504388-3-3, 188.
- [16] SKOVAJSOVÁ M. *Řeším svou bulku v prsu*, Nadace Vize, Alaiince žien s rakovinou prsu, Praha 2015.