



ROČNÍK 2021 | ČÍSLO 39

in vitro diagnostika

**POMŮŽE NÁM
OČKOVÁNÍ PROTI
COVID-19?**

**LABORATORNÍ
DIAGNOSTIKA
ČASNÉ SEPSE**

**BUNĚČNÝ
SORTER
CytoFLEX SRT**

DxA 5000 Fit

AUTOMATIZACE PRO STŘEDNĚ VELKÉ LABORATOŘE

- ✓ Vyhodnocení kvality vzorku před analýzou
- ✓ Centrifugace on-line
- ✓ Prioritizace statimových vzorků
- ✓ Archivace a třídění
- ✓ Dodělání vyšetření
- ✓ Řízení klinických dat



ELIMINACE preanalytických chyb

REDUKCE manuálních kroků

RYCHLÝ a konzistentní TAT

EFEKTIVNÍ workflow

Z obsahu

COVID-19



Rozhovor s V. Thonem: Jak nám pomůže očkování. A pomůže? ... 4

Protilátky proti SARS-CoV-2 ve Fakultní nemocnici Plzeň ... 7

Stanovení protilátek SARS-CoV-2 IgG na analyzátoru UniCel DxI 800 v praxi aneb produkce protilátek po vakcinaci ... 9

Access IL-6 nyní i pro predikci těžkého průběhu COVID-19 ... 13

Spojení miniaturizované SPE s nano core-shell technologií bioZen™ XB-C18 pro detekci nukleokapsidových proteinů SARS-CoV-2 virových peptidů ve vzorcích výtěru z nosohltanu ... 37

PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE



Představujeme buněčný sorter CytoFLEX SRT ... 21

Novinky v průtokové cytometrii ... 24

Cytometrie v botanice: Detekce endopolyploidie u rostlin pomocí průtokového cytometru ... 26

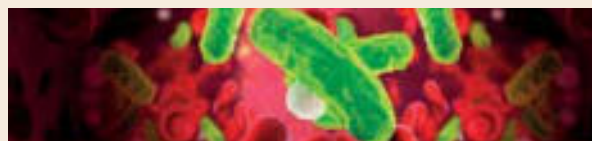
AUTOMATIZACE



DxA 5000 Fit: Automatizace pro středně velké laboratoře ... 15

Unikátní algoritmus z CIIRC: Výsledky laboratorních testů je možné získat rychleji ... 17

SEPSE



Podíl hematologických vyšetření na diagnostice COVID-19 infekcí ... 30

Novinky v laboratorní diagnostice časně sepsy ... 34

NOVINKY



Skvělé věci v malém provedení: DxH 560 AL ... 20

Nová generace fluorochromů SuperNova ... 24

HbA1c ... 28

Série počítačů částic ve vzduchu MET ONE 3400+ pro čisté GMP prostory ... 42

Karcinom prostaty: I ve složitých časech... myslíme na prevenci ... 44

ZE ŽIVOTA FIRMY



Desáté výročí Beckman Coulter v koncernu Danaher ... 2

Nová pobočka PHENOMENEX v České republice a na Slovensku ... 3

Beckman Coulter LifeSciences převzal německého výrobce mikrobioreaktorů společnost m2p-labs ... 25

Firemní e-setkání: Virtuální KickOff ... 43

in vitro diagnostika ROČNÍK 2021 | ČÍSLO 39

vydává a distribuuje Beckman Coulter Česká republika, Radiová 1, 102 00 Praha 10 | www.beckmancoulter.cz | grafická úprava a sazba Jan Franta | obálka Miroslav Janošík | tisk Serifa, spol. s r. o. | náklad čísla 1500 ks

do tohoto čísla přispěli: Sylva Adamovská, Vojtěch Drbohlav, Roxana Eggleston-Rangel, Irena Francová, Jan Grohmann, Radomír Hyšpler, Zuzana Chumová, Helena Lahoda Brodská, Miroslav Janošík, Jarmila Juráňová, Eva Králová, Pavel Kružík, Radek Kučera, Martin Máša, Martin Novák, Veronika Novotná, Petr Matějka, Pavlína Nimrichter, Martin Polčík, Hana Řezáčková, Vojtěch Thon, Alena Tichá, Ondřej Topolčan, Pavel Trávníček, Luděk Slavík, Petr Suchan, Václav Šimánek, Přemysl Šucha, Tereza Tietze, Jana Úlehová, Veronika Vášová, Roman Vlček

Desáté výročí Beckman Coulter v koncernu Danaher

Když se řekne Danaher, tak si asi většina zákazníků Beckman Coulter nespojí toto jméno s naší společností. Přesto je Beckman Coulter již 10 let součástí tohoto koncernu. Pro některé z Vás může být také překvapivé, že v tomto koncernu jsou i jiné Vám velmi dobře známé společnosti jako je Phenomenex, Cytiva (dříve část GE Healthcare Life Sciences), Radiometer, Cepheid, Pall, Hach, Sciex, Leica Biosystems a Leica Microsystems, Molecular Devices a Integrated DNA Technologies (IDT).

Vojtěch Drbohlav

Danaher sdružuje více než 20 společností s 59 tisíci zaměstnanci po celém světě (<https://www.danaher.com/our-businesses/business-directory>).

Řada společností Danaher přispěla v boji proti onemocnění COVID-19. Nejen v diagnostice tohoto onemocnění jako nově uvedené soupravy Beckman Coulter na stanovení IgM, IgG a antigenu, ale také se podílely na výzkumu a vývoji vakcín proti SARS-COV-2 (<https://www.danaher.com/covid-19-response>).

Možná se zeptáte, co tyto společnosti kromě společného vlastníka spojuje, když nevystupují pod stejnou značkou jako jiné velké nadnárodní koncerny. Danaher u všech svých společností aplikuje standardizované nástroje pro zvýšení efektivity služeb poskytovaných našim zákazníkům pod názvem Danaher Business System (<https://www.danaher.com/how-we-work/danaher-business-system>).

Desáté výročí je příležitostí k bilancování, co nám začlenění do tohoto koncernu přineslo. Díky společnosti Danaher cítíme stabilní zázemí z pohledu investic do nových výrobků a technologií. Příkladem může být uvedení robotické linky DxA 5000 a v le-



tošním roce menší varianty DxA 5000 Fit vhodné pro střední a menší laboratoře. Případně velmi očekávaný nový imunochemický analyzátor DxI 9000. Významným rozšířením nabídky pro výzkumné laboratoře je sorter buněk CytoFLEX SRT.

Od října 2020 je součástí týmu Beckman Coulter Česká republika zastoupení společnosti Phenomenex vedené v České republice Ing. Pavlínou Nimrichter. Phenomenex se stal součástí skupiny Danaher v roce 2017. Tímto mi dovolu,te, abych Pavlínu přivítal do rodiny Beckman Coulter Česká republika a předal jí slovo, aby Vám na další stránce Phenomenex a jeho produkty představila.

LIFE SCIENCES



DIAGNOSTICS



ENVIRONMENTAL & APPLIED



Nová pobočka PHENOMENEX v České republice a na Slovensku

Pavína Nimrichter

Děkuji Vojtovi za uvedení a současně za podporu, kterou nám firma Beckman Coulter poskytuje. Je mi velkou ctí Vám představit novou pobočku americké firmy Phenomenex www.phenomenex.com, která byla oficiálně otevřena 1. října loňského roku, a stala se tak dalším členem skupiny Danaher, který má přímé zastoupení v České republice a na Slovensku.

Phenomenex je světovým výrobcem UHPLC, HPLC kolon, GC kolon, produktů pro přípravu vzorků a dalšího chromatografického příslušenství.



Společnost byla založena v roce 1982 Fashou Farshad Mahjoorem za účelem distribuce chromatografických kolon a už o dva roky později se pustila do jejich výroby. Zásadním zlomem byl rok 1996, kdy byla na trh uvedena řada HPLC kolon **LUNA**, která patří dodnes k našim hlavním pilířům a našla si tisíce spokojených zákazníků po celém světě, kteří denně oceňují její kvalitu. Už o rok později byla uvedena řada GC kolon **ZEBRON**. Jsme si jistí, že každý analytik bude znát náš další unikát, kterým jsou kolony **KINETEX** s core-shell technologií, která znamenala zásadní posun v analytické chemii. Naše produktová řada dále zahrnuje HPLC/UHPLC kolony **AERIS** Core-Shell pro bioseparace, kolony **GEMINI**, **SYNERGI**, chirální kolony **LUX**, preparativní kolony **AXIA**, produkty pro extrakci na pevné fázi **STRATA**, **STRAXA-X** a mnoho dalších chromatografických produktů, bez kterých se žádný analytik neobejde. V letošním roce přicházíme na trh s vlastní řadou nano kolon **bioZen**.

Ráda bych uvedla, že naše firma nepatří k žádným nováčkům v obou zemích, a to díky více než dvacetileté distributorské spolupráci. Možná se ptáte, proč tedy nastala tato změna. Jsme světovým technologickým lídrem, který se zavázal vyvíjet nová řešení v analytické chemii a poskytnout maximální technickou podporu svým zákazníkům. Klademe obrovský důraz na kvalitu jednotlivých produktů, kdy i malá odchylka může ovlivnit samotnou analýzu. Jako výrobce máme naprostý dohled nad celým procesem od výroby až po dodání koncovému zákazníkovi. Cílem Phenomenexu a současně skupiny Danaher je poskytnout přímou, a tudíž tu nejlepší podporu svým zákazníkům.



Vy, naši zákazníci, jste hnacím motorem našeho úsilí v oblasti výzkumu a vývoje. Jsme hrdí, že jsme se zařadili mezi další země, které mají přímé zastoupení, a mohou tak využít veškeré výhody podpory samotného výrobce.

*Ing. Pavína Nimrichter, obchodní ředitelka pro CZ a SK (Murmanská 1475/4, 10000 Praha 10; Digital Park II, Einsteinova 23, 851 01 Bratislava);
cz-info@phenomenex.com
sk-info@phenomenex.com*

Rozhovor s prof. Vojtěchem Thonem: Jak nám pomůže očkování. A pomůže?

Vojtěch Thon, Miroslav Janošík

Epidemie „oslavila“ rok svého působení nejen v Čechách, ale i ve světě. Co Vy ze svého odborného hlediska považujete za klíčové ke zvládnutí takové epidemie?

Myslím si, že pro zvládnutí epidemie je velmi důležité porozumění, oč se zde jedná. To znamená znát etiologii, tedy to, co vyvolává dané onemocnění. A my víme jednoznačně, že je to nový koronavirus SARS-CoV-2. Ale současně s tím je také podstatné vědět a pochopit patogenezi, jakým způsobem se rozvíjí onemocnění COVID-19. Je zde tedy velmi podstatný rozdíl mezi pouhou infekcí novým koronavirem SARS-CoV-2 a onemocněním COVID-19, neboť patogenetický mechanismus už není pouze infekčním onemocněním, ale jeví se, že má komplexní autoimunitní charakter. A to je pro zvládnutí onemocnění jako takového, a tím pádem také celé epidemie, naprosto zásadní. My se musíme umět

bránit danému viru jako takovému, ale současně musíme umět léčit důsledky rozvoje této infekce, které pak už přecházejí do přemrštěnosti imunitní reakce. Fakticky dochází k poškození výstelky cév a rozvoji endotelitidy a vaskulitidy.

Jak vidíte úlohu očkování v boji proti koronaviru?

Musíme si uvědomit, kde je brána vstupu této infekce do organismu člověka. Zde je jednoznačně slizniční cestou, a to zejména přes sliznice dýchacích cest. Ideální by proto bylo mít vakcínu, která působí jako vakcína slizniční. Tuto v současné době však nemáme k dispozici. Máme však jiné typy moderních vakcín, které se aplikují parenterálně, to znamená, že jsou podávány do svalu. Vyvolávají tím pádem systémovou odpověď, přičemž tyto nové moderní vakcíny jsou připravené genetickou technologií, takže dostáváme do našeho organismu ne přímo



Foto: Deník/Attila Racek

antigen jako takový, ale genetickou informaci o té části viru, která po přepisu na protein umožňuje, aby imunitní systém mohl reagovat. Takto sice primárně nezískáváme přímo slizniční imunitní odpověď jako takovou, ale v rámci komplexní patogeneze, kdy může docházet také k virémii, kterou je třeba zastavit, můžeme těmito vakcínami bránit rozvoji těžkého průběhu onemocnění COVID-19, a tím také úmrtím. A to proto, že tyto vakcíny jsou vytvořené tak, že jsou schopny vyvolat jak specifickou buněčnou imunitní odpověď, tak také specifickou protilátkovou odpověď. Takže ony se v podstatě chovají tak, jako by byly živými vakcínami. Je to imunologicky velmi významné, neboť u těchto vakcín je možné podávat druhou dávku později, a to dokonce s lepším efektem rozvoje obranné imunitní odpovědi.

To znamená, že těmito moderními vakcínami tedy nezískáváme pouze protilátkovou imunitní odpověď, v tomto případě systémovou, ale také buněčnou imunitní odpověď. A tyto dohromady jsou pak schopny zabránit rozvoji těžké formy onemocnění COVID-19. Spojení a propojení směrem ke slizničnímu imunitnímu systému je pak ještě složitější. Virus, který se dostává do organismu jakožto patogen, může svými faktory virulence vytvořit slizniční lézi s důsledkem prolomení bariéry. I když je SARS-CoV-2 virus novým koronavirem, člověk se již dříve běžně setkával s dalšími 4 typy lidských koronavirů. Není zcela naivní. Takže zde pak máme ze všech úhlů pohledu možnost funkčního propojení, byť i sekundárně, nejen slizniční imunitní odpovědi, kterou získáváme přirozenou infekcí, ale také systémové, fakticky povakcinační odpovědi.

Očkování již nějakou dobu probíhá, byť ne tak rychle, jak bychom potřebovali. Které skupiny obyvatel bychom měli chránit (očkovat) přednostně?

Na rizikovou část populace je potřeba zacílit, protože v případě rozvoje COVID-19 umírají mnohem častěji než ti, kteří v riziku nejsou. Odborně je to naprosto jasná záležitost. Prvořadý význam očkování je pro ty, kteří jsou s komorbiditami v riziku. Tito pacienti umírají častěji a samozřejmě mohou mít také těžší průběh onemocnění COVID-19. Takže potřebují zdravotní péči v nemocnicích. A to je jak pro daného člověka, tak pro společnost, nesmírně závažné. Tím pak může dojít k tomu, že se systém zdravotní péče zahltí, a tomu je potřeba bránit. Správně použité vakcíny to již od účinku první dávky dokáží udělat. Proto je povinnost se zaměřit na tu část populace,



kteří je nejrizikovější. Riziková populace je definována komorbiditami, jako je nadváha nebo obezita, tzn. prozánětlivé stavy, ale také kardiovaskulární onemocnění, případně další. Takže to není pouze věk, řekněme nad 65 let, který může být s těmito onemocněními spojován. I mladší populace, pokud je v riziku, by měla být také preventivně chráněna oním očkováním. Tedy odpověď na Vaši otázku, na koho zacílit, je zřejmá. Na rizikovou část populace. Tím pádem nemusí být hned očkováno plošně, ale stačí takto cíleně zajistit ten základ a můžeme fakticky během 8–10 týdnů otevírat naši společnost. U nás jsou o tom ode mě odborně informováni, jak písemně, s vědeckými mezinárodními daty a studiemi, tak i médií, všichni odpovědní ústavní činitelé již od 6. ledna 2021. I s imunologicky zřejmou skutečností, že při nedostatku vakcín je nejprve nutno očkovat první dávkou a druhou stačí podat později. Odpovědní představitelé však na tyto informace nebrali zřetel, se všemi důsledky zbytečných úmrtí tisíců lidí a s kolapsem zdravotnictví v ČR na začátku března, na rozdíl od Spojeného království, kde takto začali očkovat 10. ledna jednou dávkou a již na konci února zachráněnou adaptovanou společnost začali otevírat.

Již jsem uvedl, že tyto moderní vakcíny vyvolávají jak buněčnou, tak protilátkovou odpověď, ale zdůrazňuji tu buněčnou část specifické imunitní odpovědi. Neboť toto očkování chrání již po první dávce podané vakcíny nezávisle na tom, zda se jedná o mRNA vakcíny nebo o vakcínu, která je vektorovou vakcínou. Takto všechny chrání za 3 týdny právě klinicky tak, že se nerozvíjí těžká forma COVID-19 a stav, který by vedl k úmrtí. Podstatné je to, že je to za 3 týdny. Druhá dávka pak může být podána s větším časovým odstupem, jakmile bude vakcín dostatek. To znamená, že můžeme naočkovat část naší populace velice rychle, a to právě tu, která je riziková.

Hodně se mluví o tzv. kolektivní imunitě. Kdy myslíte, že kolektivní imunita začne fungovat?

Kolektivní imunita se vytváří kontinuálně a už fakticky začala fungovat. Samozřejmě to závisí na tom, v jaké fázi pandemie je, protože pokud zde stále ještě máme velké množství těch, kteří jsou naivní a budeme-li mít ohnisko, tak tito se nakazí, a mohou přejít i do onemocnění COVID-19. Ale pokud bychom už nyní neměli ve hře kolektivní imunitu, situace by byla ještě mnohem horší, než je. Abychom dosáhli vysokého stupně kolektivní imunity při současných nových mutacích viru, tak se odhaduje, že by se měla takzvaná promořenost pohybovat až kolem 80 %. My toho můžeme dosáhnout v kombinaci právě těch vakcín, ale i toho, že už zde rok epidemii máme. Jedná se již nyní o desítky procent lidí, kteří se v naší populaci s virem SARS-CoV-2 setkali. Někteří měli středně těžký nebo těžký průběh onemocnění a někteří mírnější průběh onemocnění a mnozí si toho ani nemuseli všimnout. Takže je zde i diagnostická stránka stanovení, také i s možností sledování adaptační dynamiky na úrovni vytvoření specifické imunity, s laboratorním vyhodnocením paměťových protilátek. Pro toto poznání je to velmi významné a spolupracujeme i s WHO.

To jste mi pěkně nahrál, pane profesore, protože moje další otázka se týká právě testování protilátek. Měli by si lidé aktivně zjišťovat, zda mají protilátky? I třeba před očkováním?

Myslím si, že je to velmi podstatná záležitost a důležitá cesta. Protože ten, kdo už se setkal s touto virovou infekcí, která se chová také jako oportunní infekce, a velká část populace to nemusela ani vědět, si začal vytvářet imunitní paměť. A my můžeme v tomto případě, i když se jedná o slizniční imunitní systém, který se aktivuje, nalézt také systémovou imunitní odpověď. Nemusí to být ve všech případech, ale možné to je. Pakliže zachytíme i paměťové protilátky sérologicky, tzn. na úrovni systémové imunity, víme, že zde tato infekce proběhnout musela. A tím pádem ten člověk v dané chvíli nepotřebuje vakcínu a může ji rezervovat tomu, kdo se s infekcí nesetkal a kdo ji skutečně potřebuje a komu zachrání život. Jak jsme si řekli, všechny vakcíny, které máme nyní k dispozici, již po první dávce za 3 týdny po jejím podání zachraňují život.

Děkuji. Možná bych se ještě zeptal, protože dnes máme těsná epidemiologická opatření, máme k dispozici vakcínu, máme k dispozici testování,

co ještě dalšího bychom mohli nebo měli udělat, abychom se s touto epidemií definitivně vypořádali?

V podstatě bychom měli udělat právě to, co jsem říkal. A to se zde zcela zanedbalo. Bohužel se infekce dostala k seniorům, kam se dostat neměla. To je selhání, ke kterému bohužel došlo, a tím pádem mnozí toto nepřežili. My zde už ale máme dva a půl měsíce vakcíny a přitom ani ty nevyužíváme správným způsobem. Je potřeba aplikovat vakcíny nejprve v první dávce těm, kteří jsou v riziku, a i to málo vakcín, co ČR postupně v současných dodávkách dostává, je dostatečné k tomu, abychom především je ochránili. Všechno ostatní je navíc. A vůbec není od věci si uvědomit, že imunitní systém potřebuje právě antigenní stimulaci. Není možné si myslet, že se před tímto virem navždy schováme za nějaké otvory v těle ucpávající respirátory. Naopak. Tento virus a i další mikroorganismy jsou všude kolem nás a náš organismus je vybaven kvalitním imunitním systémem, abychom dokázali tyto výzvy zvládat, a to aktivně. Nikoliv tak, abychom před nimi pouze utíkali nebo se schovávali za nějaké stále sofistikovanější respirátory, přičemž někteří lidé s obstrukčními chorobami v nich nemohou ani pořádně ventilovat a sliznice fyziologicky prodechnout. A nejsme také bez léčby, včetně včasné podpůrné lokální léčby (např. organicky vázaný jód ve formě kloktadla) i celkové, běžně dostupnými léky a jejich kombinacemi. A nezapomínat přitom, že se musí u COVID-19 bránit i poruchám krevního srážení a že i zde mohou být k dispozici i přímo působící perorální antikoagulantia, také zachraňující život.

Děkuji, pane profesore, za Váš čas a Vaše odpovědi. Přejme si, aby Vaše výzva byla vyslyšena a boj s epidemií úspěšně pokračoval. Na shledanou v lepších časech.

Prof. MUDr. Vojtěch Thon, Ph.D. je imunolog a alergolog. Působí v Centru RECETOX Masarykovy univerzity a AKIMED v Brně. Odborník zabývající se zdravím populace, principy bezpečné vakcinace a diagnostikou a léčbou poruch imunity, alergických a autoimunitních chorob. Je členem výzkumné skupiny Metabolomika a cílená proteomika Centra RECETOX Masarykovy univerzity. Je autorem řady odborných prací a kontinuálně se věnuje pregraduální a postgraduální výuce studentů na Masarykově univerzitě v Brně a dalších, včetně Karlovy univerzity.

Protilátky proti SARS-CoV-2 ve Fakultní nemocnici Plzeň

Od loňského jara probíhá ve Fakultní nemocnici Plzeň vyšetřování protilátek IgG proti SARS-CoV-2. Laboratorní testování je postaveno na dvou různých pilířích: na jedné straně detekce akutního onemocnění pomocí měření virové RNA reverzní transkripční polymerázovou řetězovou reakcí (RT-PCR) a na druhé straně měření protilátek různých izotypů proti složkám SARS-CoV-2, což odráží imunitní odpověď a obranyschopnost hostitele.

Ondřej Topolčan, Radek Kučera, Hana Řezáčková, Václav Šimánek

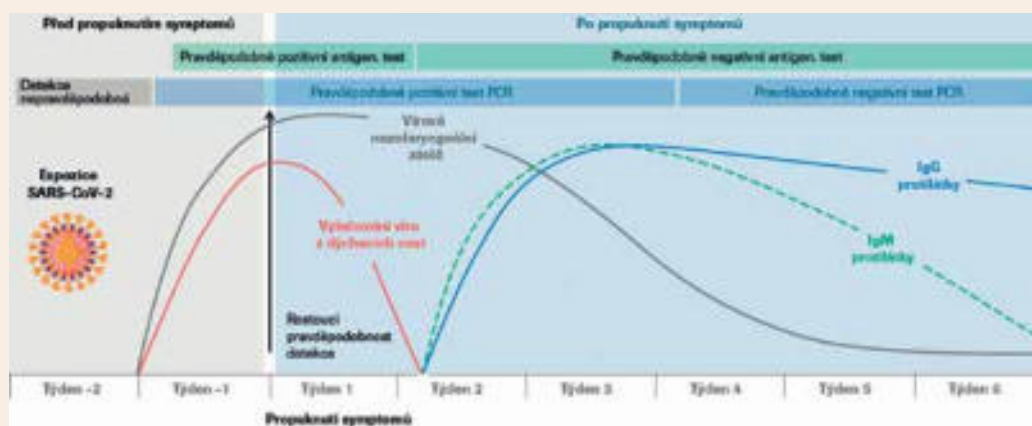
Druhy protilátek

Protilátky můžeme třídit různým způsobem. Nejčastější třídění je podle typu imunoglobulinu a s tím úzce související i čas, kdy po vzniku onemocnění vznikají a jak dlouho přetrvávají zvýšené. Z tohoto pohledu existují tři základní skupiny protilátek – skupiny IgA, označované jako protilátky slizniční. Jsou projevem vstupu viru do organismu ne projevem rozvinutého onemocnění. Dalším typem jsou protilátky třídy IgM, které se objevují v časně fázi onemocnění, obvykle mezi 1–3 dnem infekce a jsou projevem celkového napadení, čili manifestace onemocnění. Tento druh protilátek přetrvává nejčastěji 30 dnů. Za nejdůležitější jsou považovány protilátky třídy IgG, vypovídající o tom, že se člověk setkal s infekcí. Většinou relativně brzy ze své maximálně dosažené hodnoty poklesnou, ale dlouhodobě přetrvávají.

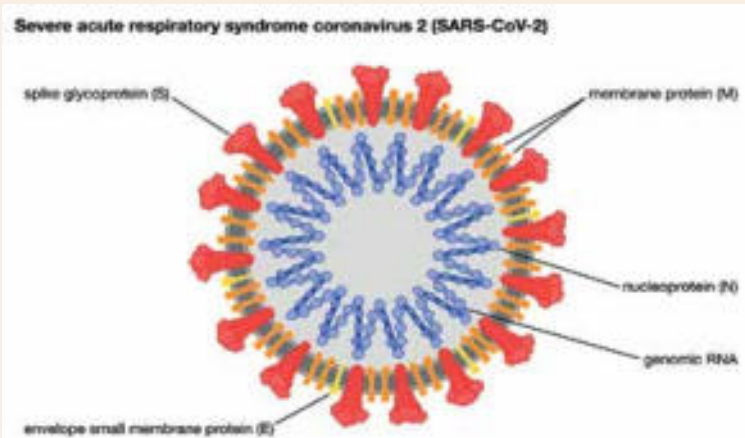
Druhé dělení protilátek vyháází z toho, proti které části viru jsou protilátky tvořeny. Virové proteiny vyplývají ze schématického viru, viz obrázek 2. Nejdůležitější je spike glykoprotein. Vědci zjistili, že ko-

ronavirus využívá tento glykoprotein pro specifické navázání na receptory angiotenzin konvertujícího enzymu (ACE2), který je obsažen na vnější straně buněk epitelu dýchacích cest. Proto dokážeme-li vytvořit nebo dodat tělu protilátky blokující tuto vazbu, minimalizujeme možnost vstupu viru do buněk, a tím výrazně snižujeme i riziko infekce. Dále existují protilátky proti všem ostatním proteinům, uvedeným na schématu. Význam těchto protilátek pro boj s infekcí je podstatně menší než antispirových.

Ve FN Plzeň jsou nejčastěji vyšetřovány protilátky při diagnostice akutního podezření na COVID-19 u pacientů, u kterých se projeví příznaky, a RT – PCR bylo negativní. Dalším důvodem vyšetření je vyhodnocení imunitní odpovědi u pacientů se závažným průběhem onemocnění nebo v epidemiologických průzkumech promořenosti v rizikových skupinách. Takovými skupinami jsou např. zdravotníci, záchranáři, hasiči, příslušníci Policie ČR apod. V neposlední řadě je možné ve FN Plzeň vyšetřit protilátky i u laické veřejnosti (jako samoplátci), kteří



Obr. 1 Znárodnění doby vzniku a přetrvávání jednotlivých Ig protilátek



Obr. 1 Zdroj: Encyclopaedia Britannica

chtějí vědět, zda se již v minulosti setkali s infekcí SARS-CoV-2 a zda mají imunitní odpověď.

Jak vyšetřovat a jak posuzovat výsledek

V zásadě stačí vědět, zda člověk má nebo nemá protilátky. Ve Fakultní nemocnici Plzeň je poskytován číselný výsledek, což umožňuje posoudit vývoj hladin protilátek IgG – stoupání nebo pokles.

Protilátky IgG u zaměstnanců FN Plzeň

Zájem o vyšetření protilátek IgG, který probíhal současně s vyšetřením hladiny D vitamínu byl a stále je obrovský. Vyšetřeno bylo zatím přes 2000 zaměstnanců a pozitivní protilátky byly zjištěny u 8,9 % osob. Prakticky ve 100 % případů byly protilátky přítomny tam, kde bylo RT-PCR pozitivní a nemocný měl příznaky onemocnění. Zde platilo, že čím těžší průběh onemocnění nebo čím starší nemocný, tím vyšší hladina protilátek. Vyskytly se ale i situace, kdy se RT-PCR s vyšetřením protilátek doplňovalo – negativní RT-PCR, typický průběh COVID-19 a byly nalezeny protilátky IgG. Existovaly i opačné situace, kdy bylo RT-PCR pozitivní a nebyly přítomny žádné klinické příznaky onemocnění a současně ani my jsme neprokázali IgG protilátky, tudíž se jednalo o falešnou pozitivitu RT-PCR.

A jak je to s očkováním, když člověk COVID-19 již prodělal? Prodělaná infekce nepochybně spolehlivě chrání přítomnými protilátkami proti reinfekci. Výjimky jsou velice ojedinělé. Spolehlivé hladiny protilátek existují 3–6 měsíců a poté postupně klesají. Po prodělané infekci je možné očkování odložit, nikoliv však zcela vynechat. Po první dávce očkování stoupají hladiny IgM i IgG protilátek. Již

týden po druhé dávce však většinou dochází k výraznému vzestupu IgG protilátek. Hladiny po očkování jsou ve většině případů až 10× vyšší než po prodělané infekci.

RT-PCR pozitivita po očkování

FN Plzeň má zatím jen ojedinělé zkušenosti s výskytem positivity RT-PCR po aplikaci druhé dávky očkování. Při vyšetření protilátek u těchto osob jsme zaznamenali 3 různé situace. U tří zdravotnických pracovníků, kteří současně s pozitivitou RT-PCR měli i klinické příznaky COVID-19 a hladina protilátek byla podstatně nižší, než jsme zvyklí po druhé očkovací látce. U dvou pacientů ve věku 93 a 94 let 14 dní po druhé dávce, byla prokázána pozitivita RT-PCR a byly i klinické příznaky. Protilátky u těchto pacientů nebyly vůbec prokázány. Vysvětlení pro nepřítomnost protilátek zatím nemáme. U osmi zaměstnankyň FN Plzeň jsme prokázali sice pozitivní RT-PCR a nebyly přítomny klinické známky onemocnění COVID-19. Hladina protilátek byla totožná s hladinou běžnou u ostatních zaměstnanců po druhé dávce očkování. Zde se domníváme, že se jednalo o falešnou pozitivitu RT-PCR.

V budoucnosti plánujeme vyšetřovat protilátky u nemocných i zaměstnanců následujícím způsobem:

- Dojde-li k neshodě mezi klinickým obrazem a výsledkem RT-PCR.
- Dojde-li ke vzniku infekce po aplikaci druhé očkovací dávky.
- Plošné vyšetření protilátek u zaměstnanců FN Plzeň.
- Placená služba pro veřejnost.

Stanovení protilátek SARS-CoV-2 IgG na analyzátoru UniCel Dxl 800 v praxi aneb produkce protilátek po vakcinaci

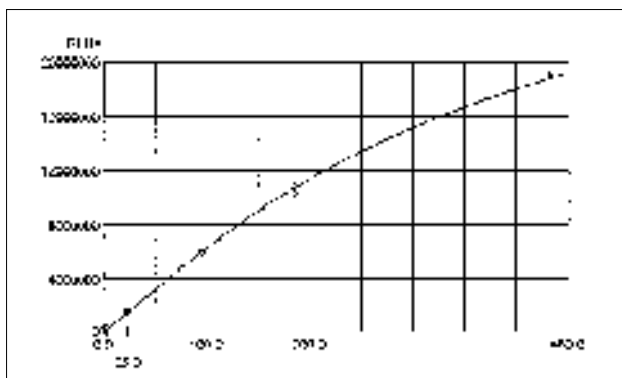
Přítomnost protilátek SARS-CoV-2 IgG je jednou z možností nepřímého průkazu proběhlé infekce Covid-19. Tyto protilátky se začínají tvořit za 1–3 týdny po nástupu symptomů onemocnění.¹ Imunochromatografické metody na pevné fázi jsou založeny na principu kvalitativního stanovení. V současné době lze tyto protilátky stanovit i semikvantitativně. Imunitní odpověď na vakcínu je obdobná jako u expozice patogenem. Cílem naší výzkumné studie bylo stanovit semikvantitativní metodou na analyzátoru Dxl 800 množství protilátek po prodělaném onemocnění, a zejména pak po vakcinaci.

Alena Tichá, Radomír Hyšpler, Tereza Tietze

Metoda stanovení IgG SARS-CoV-2

Tato chemiluminiscenční imunochemická analýza využívá paramagnetické částice s rekombinantním proteinem SARS-CoV-2 s receptorovou vazebnou doménou S1 a dále monoklonální protilátkou proti lidskému IgG.² Jedná se o nekompetitivní imunoanalýzu. Kalibrační křivka je na obrázku 1.

Použité komerční kontrolní vzorky byly v oblasti negativní a pozitivní (30,4 AU/ml). Časový průběh měření kontrolního materiálu je uveden



Obr. 1 Kalibrační křivka. Osa x – arbitrální jednotky/ml, osa y – relativní luminiscenční jednotky

na obrázku 2. Průměr našich stanovení byl u této hodnoty 31,96 AU/ml a variační koeficient 3,97 %.

Dále byla ověřena preciznost stanovení biologického materiálu, tj. krevního séra, kdy průměrná hodnota z 5 měření byla 29,84 AU/ml, směrodatná odchylka 1,3 AU/ml a variační koeficient 4,32 %.

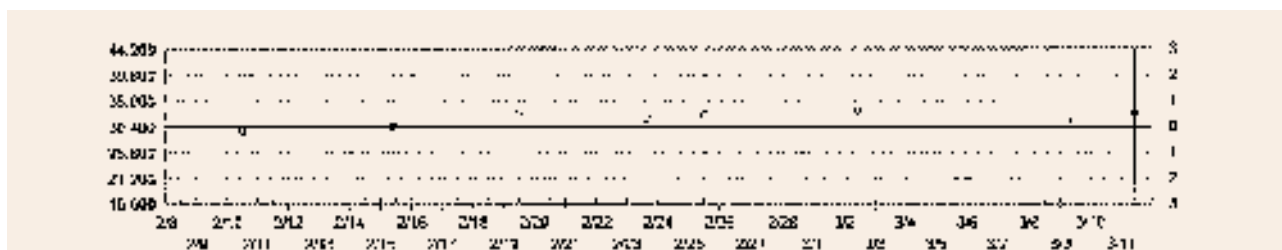
Cut off pro pozitivitu SARS-CoV-2 IgG je u této metody 10 AU/ml.²

Studované skupiny

Výše popsaná metoda byla použita pro stanovení sérových protilátek SARS-CoV-2 IgG u skupin, které byly tvořeny většinou ze zdravotnického personálu. Byl proveden standardní odběr krve a protilátky byly stanoveny v krevním séru.

Skupina **COV-0** byla bez příznaků onemocnění a bez aplikace vakcíny. V této skupině bylo otestováno jednorázově 22 dobrovolníků, z toho 32 % mužů a 68 % žen. Průměrný věk 43,7 (SD 15,6) let. Parametry z deskriptivní statistiky pro IgG skupinu COV-0 jsou uvedeny ve výsledcích v tabulce 1.

Skupina **COV-1** byli dobrovolníci, kteří prodělali onemocnění s mírnými příznaky, měli pozitivní PCR



Obr. 2 Graf kontrolního materiálu – pozitivní vzorek. Osa x – data měření, osa y vpravo – AU/ml, osa y vlevo – směrodatné odchylky

test a nebyli vakcinováni. Jednalo se o skupinu probandů, kteří byli v různém časovém odstupu 30, 60 nebo 90 dní od PCR pozitivita testování jednorázově. Bylo vyšetřeno 45 osob, z čehož bylo 33 % mužů a 67 % žen, průměrný věk 48,2 (SD 14,5) let. Parametry z deskriptivní statistiky pro IgG skupinu COV-1 jsou uvedeny ve výsledcích v tabulce 1 a 2.

Další sledovanou skupinou byli dobrovolníci, kteří podstoupili očkování vakcínou obsahující messenger RNA – označení **Comirnaty** (Pfizer a BionTech, USA). Celkový počet byl 25 osob, z čehož bylo 88 % žen a 22 % mužů. Věkové rozmezí této skupiny je uvedeno ve výsledcích v tabulce č. 3. U této skupiny byla sledována variabilita v čase a závislost produkce IgG na 1. a 2. dávce vakcíny. Vakcína Comirnaty byla aplikována dle guideline³ ve dvou dávkách, s časovým odstupem 3–4 týdny. Odběry krve byly provedeny v den 14. (tj. 14 dní po 1. dávce), následně 7. den po 2. dávce a dále za 3 týdny po 2. dávce vakcíny. Produkce protilátek v závislosti na věku byla ověřena u skupiny 37 probandů. Dále byly vyhodnoceny nežádoucí účinky po vakcinaci.

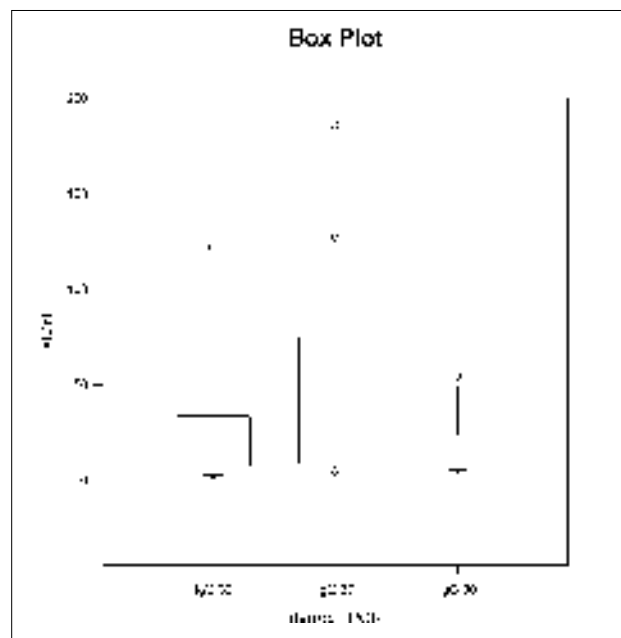
Statistické zpracování

Získaná data byla zpracována statistickým software SigmaPlot (Systat, USA) a MS Excel.

Výsledky

Deskriptivní statistika pro skupinu COV-0 a COV-1 stanovených SARS-CoV-2 IgG protilátek je uvedena v tabulce 1.

Skupina COV-1 byla dále rozdělena dle časových odstupů, kdy byla stanovena pozitivita PCR testem.



Obrázek 3 Krabicový graf – Jednocestná Anova porovnání SARS-CoV-2 IgG u skupiny s pozitivním PCR testem SARS-CoV-2, $p = 0,369$

skupina	průměr	SD	Max	Min	Median	25 %	75 %	šikmost	špičatost
COV-0	0,5	0,44	1,6	0,08	0,3	0,2	0,5	1,7	1,8
COV-1	32,5	39,8	185,5	2,3	16,5	7,0	38,7	2,1	4,5

Tabulka 1 Deskriptivní statistika IgG SARS-CoV-2 (AU/ml)

skupina COV-1	počet	průměr	SD	Max	Min	Median	25 %	75 %	šikmost	špičatost
30 dní	14	29,2	34,9	121,5	2,3	16,72	7,0	33,3	1,9	3,3
60 dní	20	43,4	49,6	185,5	3,6	21,0	8,7	74,1	1,6	2,3
90 dní	11	16,7	14,8	53,9	5,3	8,2	5,9	23,0	1,8	3,5

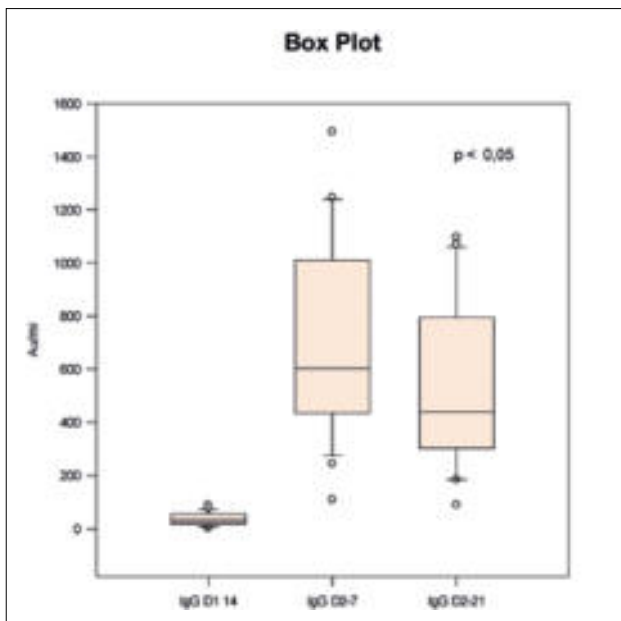
Tabulka 2 Deskriptivní statistika IgG SARS-CoV-2 u pacientů s pozitivním PCR testem SARS-CoV-2

	průměr	SD	Max	Min	Median	25 %	75 %	Skewness	Kurtosis
věk	43,8	11,6	68	24	47	32,5	52	-0,0739	-0,779
D1-14	38,1	23,8	88,03	1,44	32,3	18,8	56,3	0,404	-0,847
D2-7	691,2	366,4	1493,4	108,7	603,3	434,5	1011,53	0,555	-0,581
D2-21	523,8	300,1	1096,6	88,8	439,3	302,3	793,775	0,637	-0,76

Tabulka 3 Deskriptivní statistika SARS-CoV-2 IgG – skupina COMIRNATY (D1–14 – odběr 14 dní po 1. dávce vakcíny, D2–7 – týden po aplikaci 2. dávky, D2–21 – 3 týdny po aplikaci 2. dávky)

	průměr	SD	Max	Min	Median	25 %	75 %	šikmost	špičatost
věk	45,7	11,0	68	24	47	35	56	-0,398	-0,595
IgG	680,2	360,2	1493,4	108,7	606,6	409,2	944,1	0,517	-0,523

Tabulka 4 Deskriptivní statistika SARS-CoV-2 IgG – odběr týden po 2. dávce vakcíny

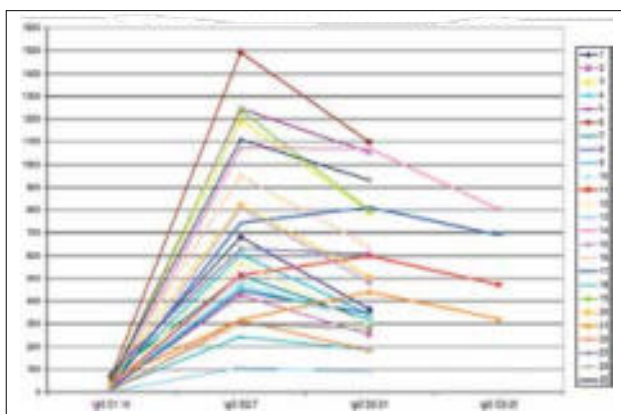


Obrázek 4 Krabicový graf – produkce SARS-CoV-2 IgG – skupina COMIRNATY – Jednocestná Anova (D1–14 – odběr 14 dní po 1. dávce vakcíny, D2–7 – týden po aplikaci 2. dávky, D2–21 – 3 týdny po aplikaci 2. dávky)

Byly stanoveny protilátky SARS-CoV-2 IgG od pozitivity testu PCR – 30 dní \pm 5 dní, dále 60 dní \pm 5 dní a 90 dní \pm 5 dní. Data z deskriptivní statistiky jsou uvedena v tabulce 2. Tato data byla porovnána testem 1cestná Anova. Byla stanovena p hodnota 0,369. Krabicový graf je uveden na obrázku 3.

Dále byla sledována produkce SARS-CoV-2 IgG protilátek po aplikacích vakcíny mRNA – Comirnaty. Deskriptivní statistika je v tabulce 3.

Získaná data byla porovnána testem Jednocestná Anova – opakovaná měření. Byly nalezeny signifikance $p < 0,5$. Výsledek je na obrázku 4. Dále je



Obrázek 5 Graf produkce SARS-CoV-2 IgG - skupina COMIRNATY – zobrazení jednotlivých probandů (1–25) (D1-14 – odběr 14 dní po 1. dávce vakcíny, D2–7 – týden po aplikaci 2. dávky, D2–21 – 3 týdny po aplikaci 2. dávky, D2–28 – měsíc po aplikaci 2. dávky – viz diskuze)

pro ilustraci uvedeno zobrazení jednotlivých probandů – obrázek 5.

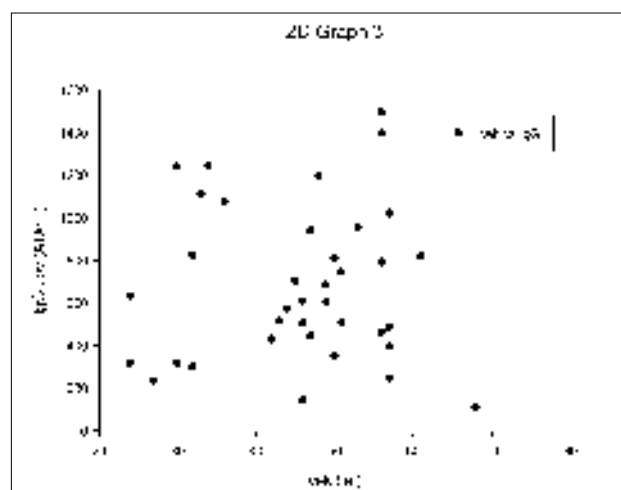
Také byla sledována závislost produkce SARS-CoV-2 IgG na věku. Do statistického zhodnocení bylo zařazeno 37 probandů odebraných týden po aplikaci 2. dávky vakcíny mRNA. Výsledky jsou v tabulce 4 a na obrázku 6, kdy byla provedena Spearmanova korelace dat, korelační koeficient byl 0,04 a p hodnota = 0,813.

Rovněž byly sledovány nežádoucí účinky po vakcinaci. Bez jakýchkoliv příznaků po obou dávkách bylo 26 % dotázaných dobrovolníků. Incidence nežádoucích účinků po jednotlivých dávkách je uvedena v tabulce 5.

Diskuze

Cílem práce bylo stanovit protilátky SARS-CoV-2 IgG v klinické praxi zejména pak po vakcinaci, výše popsanou semikvantitativní chemiluminiscenční metodou. Tato metoda vykazovala výborné analytické parametry zhodnocené stanovením přesností a opakovatelností.

Metoda byla ověřena u probandů, kteří neměli žádné klinické příznaky onemocnění Covid-19 a tato data byla srovnána se skupinou s prokázanou infekcí SARS-Cov-2 metodou PCR. Jak vyplývá z dat uvedených v tabulce 1, koncentrace protilátek u skupiny s pozitivním PCR testem byla nad cut off >10 AU/ml v době 30–90 dní od pozitivity testu. Skupina byla dále rozdělena dle časového odstupu od pozitivity PCR testu. Jak je patrné z grafu na obrázku 3, produkce IgG SARS-CoV-2 u jednotlivých osob byla naprosto odlišná a nelze s určitostí stanovit, že tyto protilátky budou přítomny ještě za 90 dní. Porovnáním hodnot min a max u skupin COV-1



Obrázek 6 Graf závislosti produkce SARS-CoV-2 IgG na věku – nebyla nalezena závislost

% výskyt	po vakcíně 1	po vakcíně 2
bez příznaků	48	29
bolest ramene	38	19
GIT obtíže	10	5
teplota, zimnice	7	33
bolest svalů, kloubů	5	31
únava	12	19
zvětšení uzlin v axile	2	17

Tabulka 5 Incidence nežádoucích účinků po vakcinaci mRNA

a COV-0 v tabulce 1 lze však poměrně spolehlivě odlišit osoby s prodělaným onemocněním, neboť tyto skupiny se nepřekrývají.

Hlavním cílem bylo stanovit protilátky u osob podstupujících očkování vakcínou Comirnaty (messenger RNA). Medián koncentrace protilátek za 14 dní po první dávce vakcíny byl 32,3 AU/ml. Tato hodnota je nad cut-off hodnotu udávanou výrobcem. Lze se domnívat, že počáteční reakce na vakcínu je obdobná jako primární odpověď po onemocnění (viz tabulka 1 skupina COV-1). Na základě dat z obrázku 3 lze konstatovat, že další dávka vakcíny způsobila mnohonásobné navýšení této složky imunitní odpovědi. Toto navýšení bylo shledáno u všech probandů v testované skupině za týden po druhé dávce vakcíny. Tři týdny po 2. dávce byl shledán pokles koncentrace protilátek u 84 % probandů. Jak je uvedeno na obrázku 5, u 16 % osob došlo i po této době k nárůstu koncentrace. U těchto osob

(viz osoby označené v grafu číslem 11, 14., 17 a 21) došlo k poklesu za další týden. Lze se tedy domnívat, že produkce protilátek po vakcinaci probíhá individuální rychlostí danou imunitním systémem každého jedince. Dále byla Spearmanovou korelací zamítnuta hypotéza závislosti produkce protilátek na věku, jak je patrné z obrázku 6. Věkové rozpětí probandů bylo 24–68 let. Pro ověření toho jevu by bylo vhodné zařadit do sledování starší populaci.

Závěr

Semikvantitativní souprava Beckman Coulter SARS-CoV-2 IgG je vhodná ke sledování krátkodobé i dlouhodobější protilátkové odpovědi jak po prodělaném onemocnění, tak k monitoringu hladiny protilátek po vakcinaci. Závěrem lze konstatovat, že v naší sledované skupině po vakcinaci mRNA byla zjištěna koncentrace protilátek nad cut-off hodnotu deklarovanou výrobcem již po první dávce. Jedná se však pouze o jednu složku z imunitní odpovědi jak na vakcinaci, tak i po expozici patogenem.

Literatura:

- https://www.who.int/docs/default-source/coronavirus/risk-comms-updates/update-34-immunity-2nd.pdf?sfvrsn=8a488cb6_2
- https://www.beckmancoulter.com/download/phxC69158A-EN_US
- <https://koronavirus.mzcr.cz/wp-content/uploads/2020/12/Strategie-ockovani-proti-nemoci-covid-19.pdf>

COVID MENU



BIOCHEMIE

D-Dimery
LDH
CRP
Ferritin
...



IMUNOCHEMIE
SARS-CoV-2 AG
SARS-CoV-2 IgG/IgM
SARS-CoV-2 IgG II kvant.
IL-6
Ferritin
PCT
...



HEMATOLOGIE

WBC
MDW
...



Access IL-6 nyní i pro predikci těžkého průběhu COVID-19

Tereza Tietze

Interleukin 6 (IL-6) je multifunkční protein, který reguluje imunitní odpověď, reakce akutní fáze a hematopoézu. IL-6 je produkován celou řadou buněk, jako např. lymfatickými, nelymfatickými, normálními a transformovanými buňkami, včetně buněk T a B, monocytů, fibroblastů, vaskulárních endoteliálních buněk, buněk kardiálních myxomů, buňkami karcinomu močového měchýře, myelomů, astrocytomů a glioblastomů. Produkce IL-6 v těchto různých buňkách je regulována, buď pozitivně, nebo negativně celou řadou signálů včetně mitogenů, antigenní stimulace, lipopolysacharidů, IL-1, TNF, PDGF a virů. Na základě jeho různých aktivit se IL-6 nazývá také interferon- β 2 (IFN- β 2), 26 kDa protein, stimulační faktor-2 B-lymfocytů (BSF-2), růstový faktor hybridomu/plazmocytomu, stimulační faktor hepatocytů a indukční faktor 2 A (MGI-2 A) makrofágů-granulocytů.

Výše popsané různorodé aktivity IL-6 naznačují, že tento faktor hraje důležitou roli při zprostředkování zánětlivých a imunitních reakcí vyvolaných infekcí nebo zraněním. I když přesné funkce IL-6 *in vivo* nejsou známy, zvýšené hladiny IL-6 byly zjištěny ve spojení s celou řadou onemocnění včetně



autoimunitních onemocnění, jako např. Castlemanova choroba, mesangiální proliferativní glomerulonefritida, psoriáza, zánětlivá střevní onemocnění, zhoubná bujení, např. plazmocytomy, myelomy, lymfomy, leukémie a karcinomy ovaria.

IL-6 při onemocnění COVID-19

Koronavirové onemocnění 2019 (COVID-19) způsobované virem SARS-CoV-2 zapříčinilo globální pandemii kvůli svému rychlému šíření z člověka na člověka. Komplikace onemocnění COVID-19 mohou



zahrnovat syndrom akutní dechové tísně (ARDS) a septický šok. Oba tyto stavy patří mezi hlavní příčiny úmrtí pacientů s onemocněním COVID-19. Studie ukázaly, že pacienti s těžkým průběhem onemocněním COVID-19 mají zvýšené hladiny IL-6 a u podskupiny pacientů s onemocněním COVID-19 může IL-6 přispívat k těžké zánětlivé odpovědi (často nazývané „cytokinová bouře“) ve stavu zhoršujícího se hemodynamického a respiračního stavu. Vzhledem k tomu, že zvýšené hodnoty IL-6 jsou typickým znakem zánětu pozorovaným u pacientů s onemocněním COVID-19 s rizikem rozvoje střední až těžké hypoxemie, může měření tohoto parametru sloužit jako užitečný nástroj, který lékařům pomáhá při časně identifikaci těžké zánětlivé odpovědi a při určení pacientů, u kterých hrozí riziko respiračního selhání a intubace s mechanickou ventilací.

Z tohoto důvodu byla provedena studie, která umožnila využití soupravy Access IL-6 pro predikci rizika respiračního selhání a intubace s mechanickou ventilací. Příslušné informace byly přidány do návodu k použití soupravy.

Data sloužící jako podklad pro klinické funkční charakteristiky testu Access IL-6 tvořila část retrospektivní studie, která byla provedena v univerzitním veřejném výzkumném středisku Hospital Germans Trias I Pujol (UHG) ve Španělsku. Studie zahrnovala dospělé pacienty přijaté na pohotovostní oddělení mezi 18. březnem a 4. květnem 2020 s příznaky naznačujícími onemocnění COVID-19, u kterých byly při standardním testování provedeny testy na IL-6 a RT-PCR COVID-19.

Do analýzy klinických funkčních charakteristik bylo zahrnuto sedmdesát pět (75) pacientů se SARS-CoV-2 potvrzeným RT-PCR. Analýza je založena na prvním výsledku Access IL-6 získaném při přijetí pacienta na pohotovostní oddělení. Statistické hodnoty uvedené v tabulce níže byly vypočteny na základě limitní hodnoty 35 pg/ml a pacientech



s poměrem $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 150$ mm Hg, což značí riziko intubace s mechanickou ventilací (PaO_2 je parciální tlak kyslíku v arteriální krvi a FiO_2 je podíl kyslíku ve směsi vdechovaných plynů). Prevalence poměru $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 150$ mmHg v této kohortě byla 55 % (41/75). 95% intervaly spolehlivosti byly vypočteny přístupem s použitím skóre.

IL-6 (pg/ml)	Poměr $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 150$ mm Hg	Poměr $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \geq 150$ mm Hg	Celkem
> 35	35	12	47
≤ 35	6	22	28
Celkem	41	34	75

Pacientům s onemocněním COVID-19 potvrzeným metodou PCR, kteří mají podle testu Access při přijetí koncentrace **IL-6 > 35 pg/ml**, hrozí během hospitalizace zvýšené riziko intubace s mechanickou ventilací.

Podklady pro objednání soupravy:

A16369	Access IL-6 2x50 tests
A16370	Access IL-6 calibrators
A16371	Access IL-6 QC



DxA 5000 Fit: Automatizace pro středně velké laboratoře

Beckman Coulter navazuje na revoluční technologický koncept DxA 5000 a přináší do širší skupiny laboratoří výhody automatizace v podání DxA 5000 Fit. Plná automatizace díky tomu přestává být doménou pouze velkých laboratoří.

Petr Suchan

V minulém čísle časopisu In Vitro Diagnostika (38/2020) jsme se v článku *Nový koncept automatizace laboratoře* věnovali novince v portfoliu plně automatizace DxA 5000. Tímto bychom na něj rádi navázali a představili Vám další z novinek, kterou je **DxA 5000 Fit**. Automatizační řešení DxA 5000 Fit vychází z konceptu DxA 5000 s tím rozdílem, že je určeno pro středně velké laboratorní provozy. Díky této novince již **laboratorní automatizace není doménou větších provozů, ale je dostupná také menším a středně velkým laboratořím.**

V preanalytické části laboratorního procesu dochází až k 75 % všech chyb spojených se zpracováním a vyšetřením vzorků. Navíc je zde zastoupeno až 60 % celkového počtu všech manuálních laboratorních kroků, při kterých dochází k manipulaci a kontaktu obsluhy se vzorkem^{1,2}. To je hlavním důvodem, proč se v poslední době laboratoře orientují nejenom na vybavení analytické části, ale také na možnosti optimalizace preanalytických a postanalytických procesů formou automatizace.

Manuální nakládání a vykládání centrifug, odvíčkovávání, přenášení vzorků mezi analyzátory,

vkládání a vykládání vzorků do/ze stojánek a analyzátorů nebo integrovaných analyzátorů, příprava vzorků k archivaci a vlastní skladování, manuální dohledávání vzorků pro opakování nebo dodělení vyšetření. Přesně to je každodenní náplň činností, které jsou velice pracné a časově náročné. Obsluha při nich navíc přichází do pravidelného kontaktu s infekčním materiálem. Systém DxA 5000 Fit všechny zmíněné kroky eliminuje a ušetřený čas je tak možné věnovat prioritním činnostem.

Součástí DxA 5000 Fit jsou následující prvky **zpracování preanalytických kroků**:

- Společný modul sloužící jako **jedno vstupní a současně výstupní místo pro všechny vzorky**
- Připojená **roboticky obsluhovaná centrifuga** s automatickým vyvažováním a možností vysokorychlostního stáčení 4 minuty při 4000 g
- **Detekce kvality vzorků před vyšetřením v analyzátořech**: Během pouhých 3 sekund systém provede ověření řady charakteristik důležitých pro další zpracování vzorků. Předem je tak známá informace, zda je dostupný objem vzorku dosta-



Příklad konfigurace systému DxA 5000 Fit v jednom z možných uspořádání, které zahrnuje online centrifugu, vstupní a výstupní modul s detekcí kvality vzorku, imunochemické analyzátory UniCel DxI 800 a biochemické analyzátory DxC 700 AU.

tečný pro všechna požadovaná vyšetření, zda je materiál odebrán do správné odběrové zkumavky, jaká je hmotnost vzorku k samovyvažování při centrifugaci, popř. zda je již vzorek zcentrifugován.

- **Prioritizace statimových vzorků** na několika úrovních
- **Algoritmus inteligentního trasování** optimalizuje cestu zpracování vzorků systémem, a to od jejich vložení až po vydání výsledků. Díky tomu produkuje výsledky s nízkými, a především **konzistentními hodnotami TAT** vydávaných výsledků nezávisle na tom, zda jsou vzorky analyzovány v provozní špičce či mimo ni. Statimové vzorky jsou vždy zpracovány a trasovány přednostně.

Automatizace v podání DxA 5000 Fit tak přináší do laboratoří nejenom snížení pracovní náročnosti a redukci manuálních kroků, ale navíc také optimalizaci celého laboratorního workflow a eliminaci chybivosti přesně tam, kde se vyskytuje nejvíce.

Analytická část procesu je zastoupena připojenými výkonnými biochemickými a imunochemickými analyzátoři Beckman Coulter – DxC 700 AU, AU 5800 a UniCel DxI 800 – v konfiguracích navržených dle specifických potřeb každé konkrétní laboratoře.

Při vývoji DxA 5000 Fit se nezapomnělo ani na zpracování vzorků po jejich vyšetření v analyzátořích. Z pohledu automatizace post-analytických procesů tak nabízí:

- Přípravu vzorků k **uskladnění v archivačních stojácích**.
- Vytřídění vzorků přímo **do stojánek analyzátorů** pro případné další vyšetření mimo linku.
- **Automatické dohledání vzorků a opakování nebo doděláné vyšetření**, a to bez zásahu obsluhy.

Stejně jako v případě DxA 5000 hrají podstatnou roli nástroje Clinical IT i pro DxA 5000 Fit, a tvoří tak **nedílnou součást celého automatizovaného řešení**:

- **Remisol Advance** – middleware řídí tok vzorků a dat laboratoře, pomocí uživatelských pravidel navíc umožňuje např. provádění autovalidací výsledků, změny priorit a zobrazování uživatelsky definovaných pokynů pro obsluhu.
- **Dashboard** – vizualizuje na obrazovkách důležité výkonnostní charakteristiky laboratoře v reálném čase (např. hodnoty TAT pro aktuálně vydávané výsledky statimů i rutiny, počet aktuálně zpracovávaných vzorků apod.).
- **Command Central** – centralizace monitorování a ovládání analyzátorů z jednoho místa.
- **ProService** – dálková zpráva analyzátorů a dalších komponent.

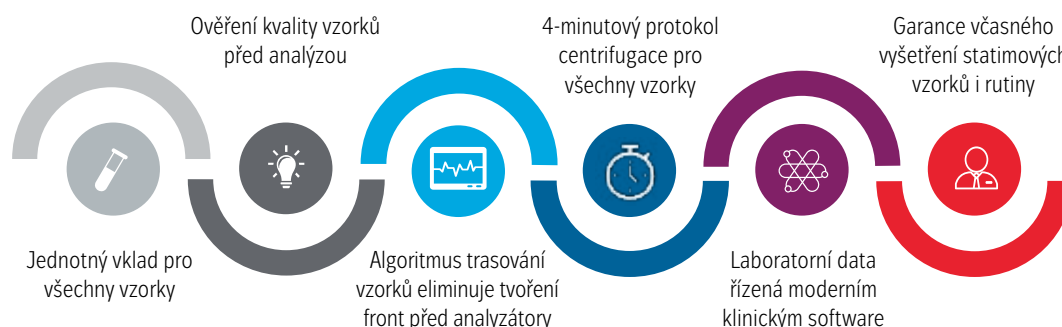
DxA 5000 Fit je obdobně jako DxA 5000 plně automatizovaný systém, který přináší laboratoři nejenom standardizaci, automatizaci procesů a redukci manuálních kroků v pre-, postanalytické a analytické fázi. Navíc řídí celý proces zpracování vzorků od jejich vložení po vydání výsledků díky novému přístupu k prioritizaci vzorků, ověření kvality vzorků před analýzou, inteligentnímu trasování, centrifugaci a integrovanému klinickému software. Výsledkem je tak rychlý a konzistentní TAT vydávaných výsledků, eliminace chybivosti a výrazné zlepšení efektivity laboratoře.

Reference:

¹ Anthony M. Barresi. The evolution of laboratory automation: A journey from tube- to patient-focused solutions. *MLO-Online*, December 2019.

² Bonini P., Plebani M., Ceriotti F. et al.: Errors in laboratory medicine. *Clin Chem*. 2002; 48: 691–698.

RYCHLÝ A KONZISTENTNÍ TAT S DxA 5000 Fit



Inteligentní trasování a nejmodernější klinický software poskytuje krátké a konzistentní hodnoty TAT patientských výsledků a to bez nutnosti manuálního předřazování statimových vzorků

Unikátní algoritmus z CIIRC: Výsledky laboratorních testů je možné získat rychleji

Vědci z Českého institutu informatiky, robotiky a kybernetiky (CIIRC) při ČVUT v Praze vytvořili unikátní algoritmus, který dokáže nalézt optimální nastavení laboratorního systému tak, aby vyhodnotil co nejvíce vzorků v co nejkratším čase. Pro pacienty to znamená, že laboratoř dokáže vyhodnotit jak více vzorků, tak to, že výsledky testů dodá mnohem rychleji.

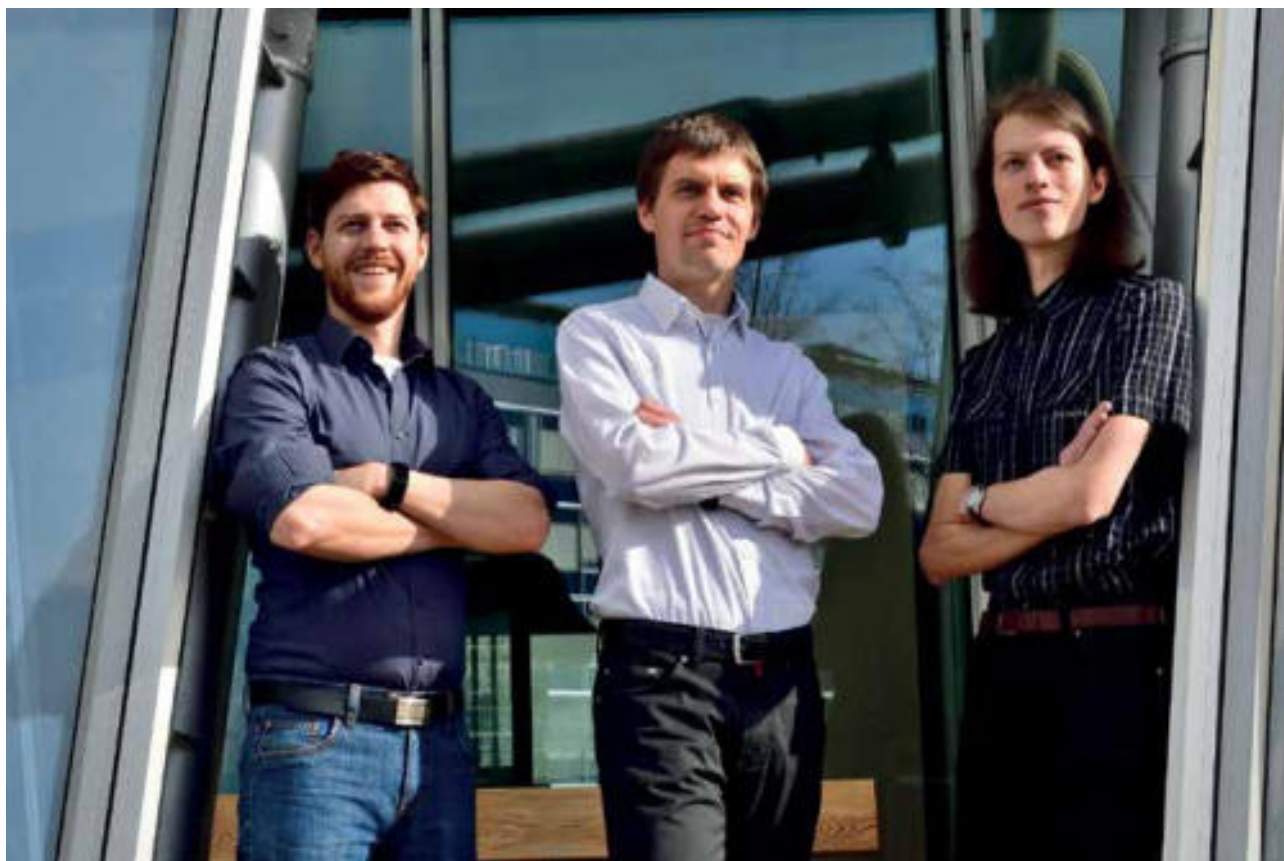
tiskové materiály CIIRC ČVUT

V reakci na situaci kolem celosvětové pandemie COVID-19 spojili své síly **PREVEDIG medical** – laboratorní diagnostické centrum, **Beckman Coulter** – přední dodavatel laboratorních analyzátorů a laboratorní automatizace a **CIIRC**. Společně se zaměřili na to, jak zpracovat více vzorků při stávající kapacitě laboratoře. Optimalizací a úpravou nastavení laboratorního systému se podařilo navýšit množství vzorků o desítky procent.

Laboratoř **PREVEDIG medical**, ve které byl optimalizační algoritmus zkoušen, využívá inovativní laboratorní systém **DxA 5000** od společnosti **Beckman**

Coulter. Jedná se o špičkové moderní zařízení, jež dokáže téměř bez lidského zásahu zpracovat vzorek a provést celou řadu testů na různých analyzátořech. Jak zmiňuje obchodní ředitel společnosti **Beckman Coulter Ing. Lukáš Palivec, Ph.D.**: „Tento nový koncept automatizace, vybavený třídvaceti novými patentovanými technologiemi, přináší zcela nový standard zpracování laboratorních vzorků. Minimalizuje počet manuálních kroků laboratorního procesu, a umožňuje tak laboratoři dosahovat krátkého a předvídatelného času od přijetí vzorku do

Obr. 1 Tým z CIIRC, který vytvořil optimalizační algoritmus.





laboratoře po vydání výsledku (takzvaný TAT z angl. Turnaround time).“ Ředitel laboratoří PREVEDIG medical Ing. Kamil Řáda k tomu dodává: „Fakt, že se vzorkem nemusí manipulovat personál (kromě vložení do linky), znamená, že vyhodnocení vzorků je nejen rychlejší, ale zároveň se minimalizují i chyby obsluhy. Navíc v této náročné době lze personál, který byl potřeba k obsluze původního systému, využít tam, kde je více zapotřebí.“

S tím, jak se laboratorní systémy vyvíjí, roste výrazně i jejich složitost. Aby bylo možné využít potenciál systémů jako je DxA 5000 na maximum, je nutné zcela přesně určit, na jakém analyzátoru či jeho části bude který test prováděn a v jakém pořadí budou jednotlivé testy prováděny. Vzhledem k obrovskému objemu vzorků, jež musí laboratoř každý den zpracovat, a velkému množství testů, které se s jednotlivými vzorky provádí, se jedná o velmi obtížný úkol. Tohoto úkolu se ujal tým odborníků z CIIRC a Beckman Coulter. Společnou analýzou dat z laboratoře se podařilo určit místa v systému, která nejvíce brání využití jeho maximálního výkonu, a poté vytvořit optimalizační algoritmus pro určení konfigurace laboratorního systému. V laboratoři se tímto povedlo zvýšit průchodnost analytických jed-

Obr. 2 Plně automatizovaný laboratorní systém DxA 5000 instalovaný v laboratoři PREVEDIG medical.

notek zajišťujících biochemické vyšetření až o 30 % oproti původnímu nastavení systému DxA 5000. Jak uvedl doc. Ing. Přemysl Šůcha, Ph.D., vedoucí týmu na CIIRC: „Mně a mým kolegům Bc. Patriku Březinovi a Ing. Antonínu Novákovi se podařilo vytvořit jedinečný algoritmus, který dokáže optimalizovat výkon laboratorního systému přesně podle potřeby dané laboratoře. Náš algoritmus pracuje s velkým množstvím anonymizovaných historických dat z laboratoře, tudíž přesně ví, jaké testy jsou obvykle prováděny společně a jak často. Díky tomu dokážeme přesně určit, kdy a kde se má který test provádět. Další nespornou výhodou je, že náš algoritmus umí rozlišit mezi potřebami soukromé laboratoře, jako je např. laboratoř PREVEDIG medical, a potřebami laboratoří v nemocnicích, které mají odlišné požadavky na zpracování vzorků.“

České vysoké učení technické v Praze patří k největším a nejstarším technickým vysokým školám v Evropě. V současné době má ČVUT osm fakult (stavební, strojní, elektrotechnická, jaderná a fy-

zikálně inženýrská, architektury, dopravní, biomedicínského inženýrství, informačních technologií) a studuje na něm přes 18 000 studentů. Pro akademický rok 2020/21 nabízí ČVUT svým studentům 214 akreditovaných studijních programů a z toho 84 v cizím jazyce. ČVUT vychovává odborníky v oblasti techniky, vědce a manažery se znalostí cizích jazyků, kteří jsou dynamičtí, flexibilní a dokáží se rychle přizpůsobovat požadavkům trhu. ČVUT v Praze je v současné době na následujících pozicích podle žebříčku QS World University Rankings, který hodnotil 1604 univerzit po celém světě. V celosvětovém žebříčku QS World University Rankings je ČVUT na 432. místě a na 9. pozici v regionálním hodnocení „Emerging Europe and Central Asia“. V rámci hodnocení pro „Engineering – Civil and Structural“ je ČVUT mezi 151.–200. místem, v oblasti „Engineering – Mechanical“ na 201.–250. místě, u „Engineering – Electrical“ na 201.–250. pozici. V oblasti „Physics and Astronomy“ na 201. až 250. místě, „Natural Sciences“ jsou na 283. příčce. V oblasti „Computer Science and Information Systems“ je na 251.–300. místě, v oblasti „Mathematics“ a „Material Sciences“ na 301.–350. místě a v oblasti „Engineering and Technology“ je ČVUT na 256. místě. Více informací najdete na www.cvut.cz

Český institut informatiky, robotiky a kybernetiky je moderní vědecko-výzkumný ústav Českého vysokého učení technického v Praze (CIIRC ČVUT), který spojuje excelentní výzkumné týmy, mladé talenty a unikátní know-how s cílem posouvat technologické hranice a navázat na to nejlepší z tradic českého technického vzdělávání. Těžiště výzkumné



Obr. 3 Vkládání vzorků do DxA 5000, ostatní zajistí plně automatizovaný systém.

práce CIIRC ČVUT se zaměřuje na čtyři základní pilíře: průmysl, energetiku, chytrá města a zdravou společnost, a to jak v základním, tak aplikovaném výzkumu. CIIRC ČVUT byl založen v roce 2013, přičemž plný provoz zahájil v polovině roku 2017 v nově postavené budově. V současné době čítá téměř 300 zaměstnanců v 8 výzkumných odděleních, která jsou doplněna tzv. Centry včetně Testbedu pro Průmysl 4.0. Oblast odborného zájmu CIIRC ČVUT je široká: zahrnuje umělou inteligenci, robotiku, automatické řízení a optimalizaci, počítačovou grafiku, počítačové vidění a strojové učení, automatické rozhodování, návrh softwarových systémů a výpočetních prostředků, návrh rozhodovacích a diagnostických systémů a jejich aplikace v medicíně, bioinformatiku, biomedicínu či asistenční technologie. ČVUT CIIRC vytváří jedinečný ekosystém akademicko-průmyslové spolupráce, ve kterém využívá diverzifikované formy financování projektů z národních, evropských a soukromých zdrojů. Více informací na www.ciirc.cvut.cz.

Beckman Coulter vyvíjí, vyrábí a dodává inovativní produkty pro *in vitro* diagnostické systémy a automatizaci klinických laboratoří. Společnost byla založena již v roce 1935 profesorem Arnoldem O. Beckmanem a již více než 85 let je důvěryhodným partnerem laboratoří a dalších zdravotnických a laboratorních zařízení. Dnešní Beckman Coulter, to je jedinečná kombinace lidí, procesů a řešení navržených tak, aby pomáhali klinickým laboratořím či jiným zdravotnickým zařízením zvýšit jejich efektivitu při poskytování kvalitní péče o pacienty.

PREVEDIG medical, s. r. o. je progresivní, dynamicky se vyvíjející česká laboratoř s více než 25letou tradicí. Současné spektrum prováděných laboratorních vyšetření zahrnuje klinickou biochemii a hematologii, imunologii a alergologii, infekční sérologii a mikrobiologii vč. PCR diagnostiky. Velká pozornost a péče je zde věnována neustálému zvyšování kvality práce. Mimořádný důraz je kladen nejen na přesnost a rychlost měření, ale i na vstřícný přístup ke klientům. Tato laboratoř je známá jako průkopník používání moderních technologií, ať se jedná o nové moderní přístroje, nebo o elektronickou komunikaci mezi laboratořemi a klienty.

Český institut informatiky, robotiky a kybernetiky
ČVUT; Jugoslávských partyzánů 1580/3, Praha 6
Alena Nováková, alena.novakova@cvut.cz

Skvělé věci v malém provedení: DxH 560 AL

DxH 560 AL je kompaktní a výkonný hematologický analyzátor pro stanovení pětipopulačního diferenciálu s integrovanou dotykovou obrazovkou a automatickým vkládáním vzorků.

Miroslav Janošík

Kompaktně navržený model DxH 560 AL využívá cca o 30 % méně prostoru než jiné analyzátor ve své třídě. Analyzátor umožňuje snadné vložení až 50 vzorků bez nutnosti zastavení analýzy. Laboratoře mají také možnost volby odběru menších objemů v režimu otevřené zkumavky a propichovacích bezvíčkových odběrových zkumavek. DxH 560 AL poskytuje výsledky za 60 sekund nebo méně při nasátí pouze 17 μ L vzorku – jeden z nejmenších aspiračních objemů na trhu.

Analyzátor také poskytuje špičkové funkce ochrany osobních údajů a zabezpečení, včetně přípůsobilného přihlášení uživatele, správy bezpapírových dat a plně sledovatelných automatických časových limitů, které chrání elektronické osobní údaje pacienta.

DxH 560 se vyznačuje velice intuitivním ovládacím softwarem. Jakoukoli operaci systému provedete maximálně ve třech krocích a všechny hlavní funkce jsou přístupné z každé obrazovky softwaru. Zabudovaná čtečka čárových kódů snímá do zařízení číslo šarže, dobu skladovatelnosti, dobu výměny reagentie; a jméno uživatele a stabilitu otevřené lahvičky.

Systém DxH 560 AL poskytuje přesné výsledky díky technologii Coulterova principu a průtokové cytometrii s patentově chráněným dynamickým gatingem pro získání diferenciálu leukocytů (WBC).

Více informací naleznete na stránkách www.beckmancoulter.com/dxh560. První představení na českém trhu proběhlo v rámci konference Pařížkovy dny.

RYCHLÁ ANALÝZA ZA
≤ 60
SEKUND

MALE SPÍŠEJŠÍ VÝŠK
< 1
POČET SERVISNÍCH VOLÁNÍ ZA ROK*

Aspirace pouze
17 μ L
vzorku

PROHÁDEJTE JAKOUKOLI
OPERACI SYSTÉMU
MAXIMÁLNĚ
3
DOTEKY

Průtoková cytometrie
s patentově chráněným
Dynamic Gating

Dědictví osvědčené
spolehlivosti
< 1 servisní výjezd ročně*

Integrovaná 8,4palcová
barevná dotyková obrazovka
s vysokým rozlišením

Aspirace pouze
17 μ L
vzorku

30 000
dohledatelných
údajů pacientů

2 reagentie
pro CBC/Diff
Plus 1 předinstalovaný
čisticí prostředek

Vložení
50 zkumavek
a schopnost
samostatného provozu

Žádné
každodenní ruční
čištění

Bezpapírový
a **obousměrný** chod

Pouze 50 cm (19,7 palce) šířky stolu

Představujeme:

Buněčný sorter CytoFLEX SRT

Beckman Coulter Life Sciences neustále pracuje na vývoji nových systémů, a tak se dočkala nového přírůstku i skupina našich sorterů. High speed Jet-in-air sortery MoFLO XDP a MoFLO Astrios EQ doplnil nově květový systém **CytoFLEX SRT**.

Roman Vlček

CytoFLEX SRT vychází z velmi oblíbené a rozšířené řady výzkumných cytometrů CytoFLEX a zachovává tak architekturu citlivých APD detektorů, výkonných laserů a software CytEXPERT. **CytoFLEX SRT je 4-cestný květový sorter**, který lze vybavit až 4 excitačními lasery a 15 detektory pro fluorescence. Systém umožňuje sortovat do různých formátů – zkumavka 12x75, 15 ml falcon, destičky 96 a 384 jamek nebo na uživatelsky definovatelné formáty (sklíčka apod.). Systém umožňuje několik módů sortování (purity, enrich, single cell) a také jejich kombinaci v různých sortovacích proudech (mix mode sorting).

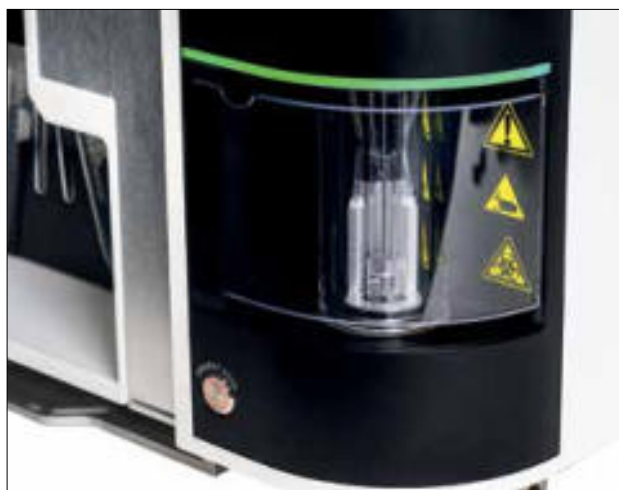
CytoFLEX SRT má stejně jako systémy CytoFlex vysokou citlivost detekce slabých fluorescenčních kanálů (<30 MESF-FITC, <10 MESF-PE, <25 MESF-APC) a 7 dekadové rozlišení dat, to vše při načítání až 40 000 událostí za sekundu.



CytoFLEX SRT je díky APD detektorům a vysokému rozlišení malých částic vhodný také pro detekci a sortování extracelulárních vesikulů.

CytoFLEX SRT je možné vybavit Biosafety kabinetem třídy 2 (Baker), chlazením či vyhříváním vzorku a řešením pro aseptické sortování. Celý systém je zcela automatizovaný – od QC procedury pro nastavení sortování a udržování optimálního nastavení sortingu a nevyžaduje tak zkušeného operátora se zaměřením pouze na sortování.

Pokud Vás systém zaujal, neváhejte nás kontaktovat pro více detailů a předvedení systému.





CytoFLEX SRT...

...CytoFLEX, který



CytoFLEX SRT

umí sortovat

www.beckman.com

Novinky v průtokové cytometrii

Roman Vlček, Pavel Kružík

IOtest Myeloid Activation Antibody Cocktail (CD169-PE/HLA-DR-APC/CD64-PB) Aneb jak rychle rozlišit bakteriální a virovou infekci

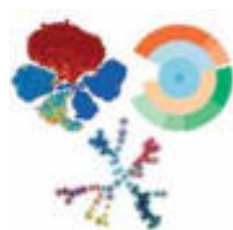
Rádi bychom Vás informovali o dostupnosti nové soupravy pro rychlou cytometrickou identifikaci virové, resp. bakteriální infekce.

Jde o kombinaci protilátek CD169/CD64/HLA-DR pro rychlé rozlišení virové a bakteriální infekce na základě zvýšené exprese znaků na monocytech, resp. neutrofilech. Celý postup zahrnuje pouze 15 min. přípravu vzorku včetně inkubace a lýzy erythrocytů. Analýza je navíc zcela bez kompenzací pro cytometrii s modrým, červeným a fialovým laserem.

Detailní informace naleznete v brožuře: FLOW-7757SB08.20 IOtest Myeloid Activation

Nové verze cytometrických programů

Týmy vývojářů pro Vás nadále zlepšují software pro analýzu cytometrických dat. Nové verze jsou ke stažení ze stránek <https://www.beckman.com/flow-cytometry/software/>



Kaluza 2. 1. 2
Kaluza C Analysis Software
Version 1. 1. 2
Cytobank 8.0
CytExpert for Dx FLEX Release
Version 2. 0. 2.18

Nová generace fluorochromů SuperNova

SuperNova dyes jsou novou generací polymerních fluorochromů určených pro průtokovou cytometrii. Byly vyvinuty experty společnosti Beckman Coulter v Marseille, kteří mají více než 30 letou praxi ve výrobě a konjugaci protilátek pro průtokovou cytometrii.

SuperNova v428 je fluorochrom kompatibilní s fialovým (405 nm) laserem cytometrů a kanálem určeným pro měření Pacific Blue.

SuperNova v605 and **SuperNova v786** jsou tandemové polymerní fluorochromy odvozené od základní SuperNova v428. Z tohoto důvodu mají stejné absorbanční charakteristiky a maximum excitace při 414 nm.

Emisní vrcholy jsou 605, respektive 786 nm, a fluorochromy jsou tak optimálně detekovány při použití pásmových filtrů 610/20 a 780/60 nm nebo obdobných.

SuperNova dyes mají výrazně vyšší svítivost (Stain Index) oproti PacificBlue, Brilliant Violet i Phycoerythrinovým fluorochromům.

Všechny fluorochromy SuperNova vykazují díky pečlivé formulaci výrazně nižší nespecifickou vazbu na monocyty.

Dostupné jsou v konjugaci s libovolnou IgG1 nebo IgG2a protilátkou z katalogu Beckman Coulter. Pro bližší informace nás prosím kontaktujte.

Jako katalogové produkty jsou již nyní dostupné tyto konjugáty:

Objednací číslo	Specifická	Objem	Regulační status
C69243	CD38-SuperNova v428	0,5 ml	Analyte Specific Reagent
C69244	CD19-SuperNova v428	0,5 ml	Analyte Specific Reagent
C69245	CD25-SuperNova v428	0,5 ml	Analyte Specific Reagent
C69246	CD22-SuperNova v428	50 testů	Research Use Only

Souprava DURAClone SC pro stanovení kmenových mezenchymálních a hematopoetických buněk

Soupravy DURAClone SC obsahují 8-barevný panel vysušených protilátek. Uchovávání při laboratorní teplotě a výroba dle standardů ISO 9001:2015 zaručují spolehlivý postup značení a reprodukovatelné výsledky. Souprava obsahuje 25 testových zkumavek včetně třech setů (resp. dvou pro DURAClone SC Hematopoietic) pro nastavení 8-barevné kompenzace.



Toto 8-barevné značení je možné doplnit dalšími protilátkami proti povrchovým nebo intracelulárním znakům nebo značením na životnost pomocí ViaKrome.

Detailní informace jsou k dispozici v brožuře: FLOW-7330SB06.20 DURAClone SC.

Všechny informace Vám rádi na vyžádání zašleme.

Nové lyzační činidlo FLEXLyse

FLEXLyse je určen pro lýzu červených krvinek v **malém celkovém objemu lýzy**, což umožňuje zpracování vzorků plné krve v mikrotitračních destičkách. FLEXLyse je kompatibilní s metodami bez promývání a promývání s flexibilní inkubací v rozmezí od 5 do 40 minut pro usnadnění automatizace. FLEXLyse je kompatibilní s kapalnými formami protilátek i s vysušenými protilátkami řady DURA Innovations. Pro použití mělkých mikrotitračních destiček je k dispozici metoda s objemem krve 25–40 μL a přidáním 50 μL FlexLyse.



Biomek i7 s integrovaným cytometrem CytoFLEX

Pro mikrotitrační destičky s hlubokým dnem je určena metoda s objemem krve 50–100 μL a přidáním 300 μL FlexLyse.

Tato metody lýzy je ideální pro plnou automatizaci na pipetovacích automatech Biomek. Pro menší série vzorků je možné i manuální pipetování, kde je výhodou zpracování malých objemů krve.

Více detailů naleznete v brožuře 20. 11. 237.FLOW
Objednací číslo C54313; počet testů: 330–2000

Beckman Coulter Life Sciences převzal německého výrobce mikrobioreaktorů společnost m2p-labs

Beckman Coulter LifeSciences podepsal konečnou dohodu o převzetí společnosti m2p-labs, výrobce mikrobioreaktorových systémů zaměřených na mikrobiální kultivace a automatizovaná řešení pro screening a optimalizaci fermentace. Portfolio výrobků se skládá z vysokovýkonných mikrofermentačních systémů BioLector, mikrotitračních destiček FlowerPlates a automatických kultivačních platform RoboLector.

Tato technologie s online monitoringem umožňuje získat větší množství informací z mikrobiálních experimentů včetně aerobních, mikroaerofilních nebo striktně anaerobních.

BioLector: mikrobioreaktor pro fermentaci s online monitoringem biomasy, pH, DO a fluorescenci.

BioLector Pro: mikrofluidní mikrobioreaktor navíc s kontinuální kontrolou pH a výživy.

Mikroreaktory BioLector používají 48-jamkové mikrotitrační destičky až pro 36 až 48 fermentací současně s on-line měřením čtyřech parametrů (biomasy, pH, DO a fluorescenci) s kontrolou pH a dávkováním živin.

RoboLector L a XL: automatizované fermentační platformy, které kombinují vysoký výkon fermentace



a on-line monitoring systému BioLector s přesností robotických systémů pro přenos kapalin.

Přístroj pipetuje v rozmezí 10–950 μl , objemy vyšší než 950 μl pipetuje ve dvou krocích.

Tyto systémy se uplatňují v syntetické biologii, screeningu klonů s analýzou metabolismu, optimalizaci médií, vývoji bioprocusů a anaerobní fermentaci.

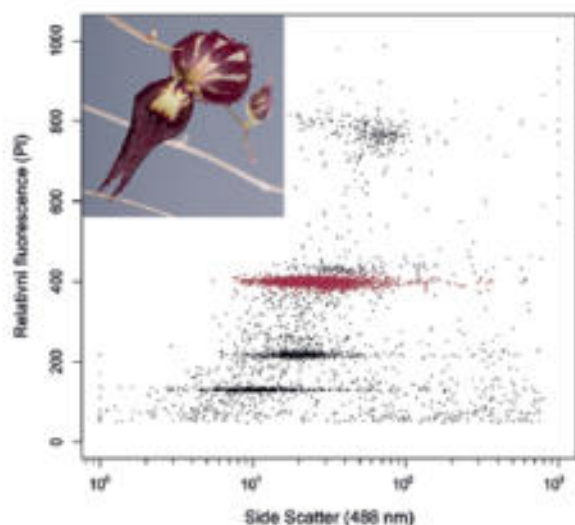
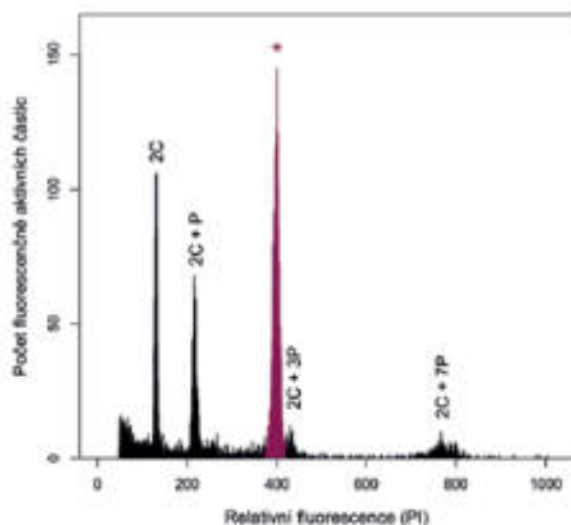
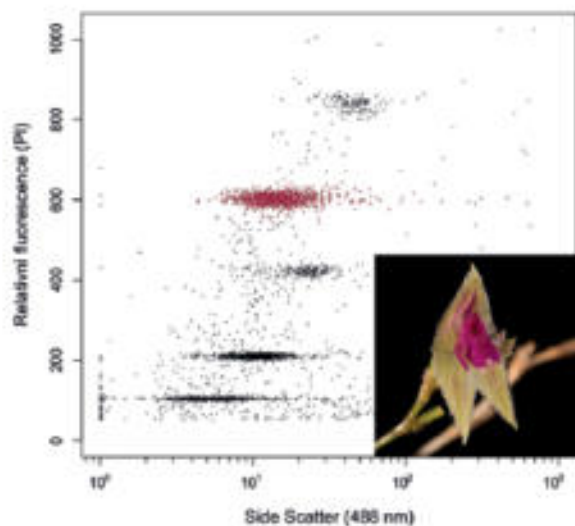
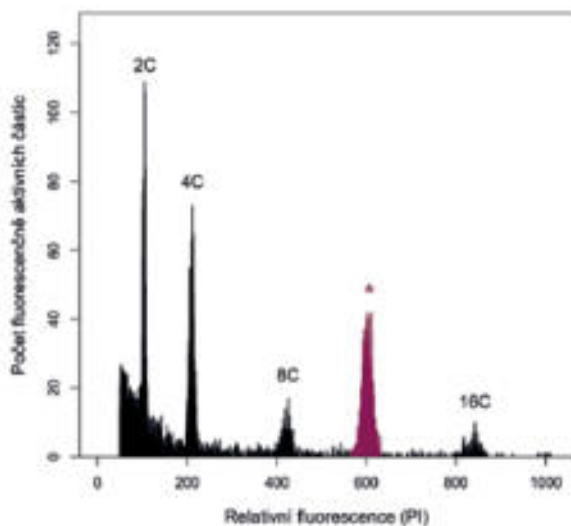
Cytometrie v botanice: Detekce endopolyploidie u rostlin pomocí průtokového cytometru

Zuzana Chumová, Pavel Trávníček

Endopolyploidie je jev, který obecně popisuje zmnožení celého genomu na úrovni buněk v rámci jednoho organismu. U rostlin se nejčastěji odehrává prostřednictvím **endoreduplikace**, při které dojde ke zdvojení jaderné DNA bez následného dělení, což vede k tomu, že jsou rostlinná pletiva složená z buněk s různým ploidním stupněm (mají různý počet sad chromosomů). Endopolyploidie je u krytosemenných rostlin poměrně častá, běžně se s ní setkáme například ve vyživovací části se-

mene (endospermu). Vyskytuje se buď na úrovni pletiv (např. dělohy), nebo je charakteristická pro celé čeledi (brukvovité – Brassicaceae; tykvovitě – Cucurbitaceae). Může být též vyvolána stresem, který na rostliny vyvíjí okolní prostředí (teplota, vlhkost, apod.).

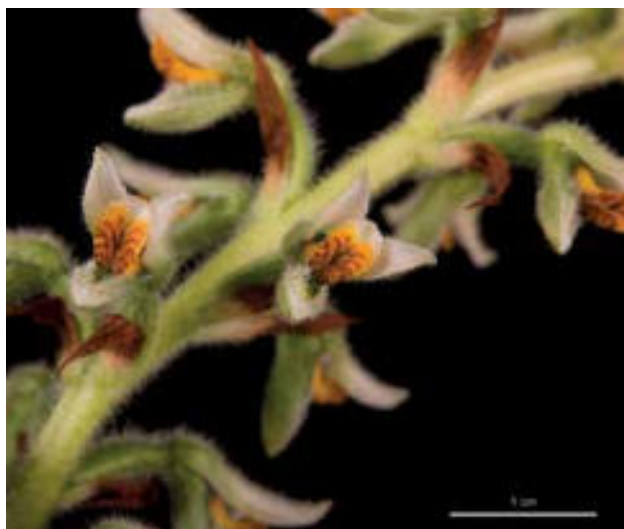
U orchidejí (Orchidaceae) se kromě klasické endoreduplikace objevuje i částečná **endoreplikace**, při které nedochází ke zdvojení celého genomu, ale k namnožení pouze jeho části. Nejedná se však



o náhodný proces, u každého druhu se zmožuje stále stejná část genomu. Výsledkem jsou tak pleťiva s buňkami, které mají charakteristický obsah celkové DNA podle toho, kolik cyklů zmožení mají za sebou. Spekuluje se o tom, že taková vlastnost umožňuje orchidejím těžit z výhod endoreplikace a zároveň šetřit omezené zdroje na replikování celého genomu.

Dobře rozpoznatelná je endoreplikace pomocí průtokového cytometru, a to jak klasická, tak částečná. Na obrázku jsou vidět výstupy z analýz dvou zástupců jihoamerického rodu orchidejí *Leptanthes*, které se právě typem endoreplikace liší. Nahoře *L. acarina* s klasickou endoreplikací, kdy pozice píků odpovídají dvojnásobnému poměru. Ve spodní části *L. katleri* s částečnou endoreplikací, kdy je mezi prvními dvěma píky 1.7násobný rozdíl, **P** značí endoreplikovanou část (určité procento 2C, v tomto případě 70 % základní velikosti genomu). Fialovou barvou a hvězdičkou je označen interní standard lilek višňový (*Solanum pseudocapsicum*).

U měřených rostlin často dopředu nevíme, jaký typ endoreplikace očekávat, je tedy potřeba být ve střehu a správně píky odečítat. U částečné en-



doreplikace může tvořit replikovaná část genomu 12–95 % a záleží na mnoha faktorech, aby došlo ke správné interpretaci výsledků. V posledním roce jsme měli možnost měřit na průtokovém cytometru CytoFLEX, kde lze pomocí 2D grafu se zobrazením fluorescence a side scatteru přesněji detekovat zájmové částice a lépe určit přesnou pozici píků. U analýz s DAPI, které používáme zejména při výpočtu GC-obsahu bazí, jsme tento přístup vyzkoušeli poprvé, a stal se pro nás dobrým pomocníkem.

Botanický ústav AV ČR, v. v. i., Oddělení evoluční biologie rostlin, laboratoř průtokové cytometrie se zabývá rychlým stanovením obsahu jaderné DNA (velikosti genomu) v relativních i absolutních jednotkách. Získané údaje jsou využívány ke studiu diverzity a dynamiky polyploidních komplexů cévnatých rostlin či ke zhodnocení evolučních a ekologických důsledků genomové duplikace (polyploidie) a variability v chromozomových počtech. Další okruhy řešených otázek zahrnují studium vlivu velikosti jaderného genomu na vlastnosti organismů a stanovení způsobů reprodukce. Nespornou výhodou průtokové cytometrie je značná rychlost analýz, která umožňuje analyzovat rozsáhlé populační vzorky a získat tak informace o cytotypové variabilitě na různých úrovních organizace i na různých prostorových a časových škálách. Ve studiích je kladen důraz na propojení cytometrických technik s dalšími metodickými přístupy, zejména s molekulárními analýzami.

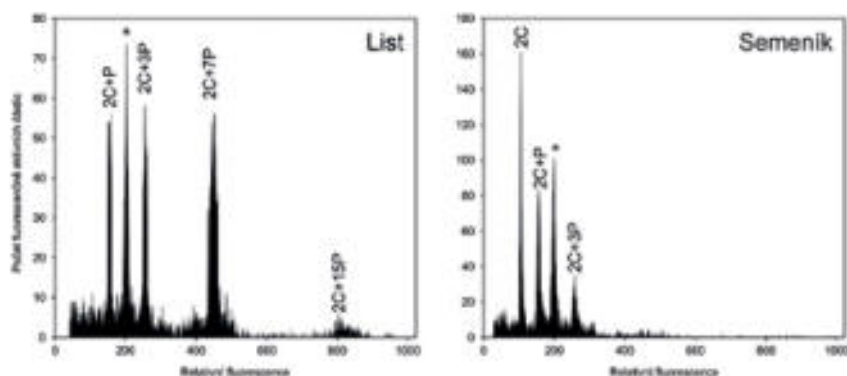
**RNDr. Zuzana Chumová, Ph.D. & Mgr.,
Ing. Pavel Trávníček, Ph.D.**

Oddělení evoluční biologie rostlin

Botanický ústav AV ČR, v. v. i.; travnicek@ibot.cas.cz

Autor všech fotografií rostlin použitých v článku:

RNDr. Jan Ponert, Ph.D.



U rostlin s endopolyploidii je třeba dbát i na správný výběr pleťiva tak, aby byl vidět celkový pattern píků. Na obrázku je orchidej *Gomphichis macbridei* a histogramy odečtené z analýzy jejich listů a semeníků. Z výsledků vyplývá, že správnou velikost genomu lze odečíst pouze z analýzy semeníků, kde je vidět i základní signál buněk s 2C obsahem DNA. Standard je označen hvězdičkou.

HbA1c Advanced

Koncentrace HbA1c v krvi je považována za rutinní a nejefektivnější nástroj sledování průběhu diabetes mellitu a představuje tak vhodný nástroj pro kontrolu koncentrace glukózy u diabetiků v dlouhodobém horizontu. Stanovení HbA1c je v České republice standardizováno již po mnoho let a řídí se doporučeními ČSKB a ČSD. Z tohoto pohledu jsou preferované metody stanovení na bázi HPLC. Přesto jsou případy, kdy laboratoř chce/potřebuje sáhnout po jiné variantě jako jsou imunoanalytické metody. Důvodem může být např. malé množství vzorků, které neumožňuje umístění HPLC formou OTL, případně snaha laboratoře o redukci počtu přístrojů/dodavatelů nebo možnost začlenění HbA1c do rutinního, plně automatizovaného provozu.

Petr Matějka, Miroslav Janošík

Společnost Beckman Coulter zcela nedávno rozšířila své portfolio biochemických testů o plně automatizovanou analýzu hemoglobinu A1c (HbA1c) z plné krve. Souprava **HbA1c Advanced assay** (kat. č. B93009) je určena pro biochemické analyzátoři DxC 700 AU.

Test HbA1c Advanced (kat. č. B93009) tvoří tři druhy reagensí:

Hemolyzační činidlo slouží k předpřípravě vzorku plné krve. Reagencie R1 T-Hb je určena pro měření celkové koncentrace hemoglobinu (T-Hb) kolorimetrickou metodou. Změna absorbance je měřena při 570/660 nm.

Reagencie R1 a R2 HbA1c se používají k měření koncentrace hemoglobinu A1c (A1c) turbidimetrickou imuno-inhibiční metodou.

Jediným finálním výsledkem analýzy vzorku je vypočítaná hodnota HbA1c (jako poměr A1c/T-Hb) v jednotkách mmol/mol (IFCC) nebo % (DCCT/NGSP). Obsluha analyzátoru je upozorněna flagem Tx na případné výsledky dílčích metod mimo dynamický rozsah stanovení.

Metodu v praxi již ověřily a srovnaly s jinými, běžně dostupnými HPLC metodikami dvě laboratoře – oddělení OKBH v Nemocnici Valtice s.r.o. a OKBH Karvinská hornická nemocnice. V krátkosti bychom Vás chtěli seznámit s výsledky porovnání.

Testovací laboratoře provedly ověření přesnosti – opakovatelnosti a mezilehlé preciznosti s využitím kontrolních materiálů extendSure™ (Cantebury Scientific). Dále pak porovnání výsledků získaných na analyzátoru DxC 700 AU naší soupravou HbA1c Advanced se standardní metodou používanou v konkrétní laboratoři, tj. HPLC Tosoh G8 (Nemocnice Valtice) a HPLC Arkray Adams (Karvinská hornická nemocnice). Korelační studie zahrnuje i

ověření shody klinické interpretace výsledků cca 80 pacientů.

Přesnost

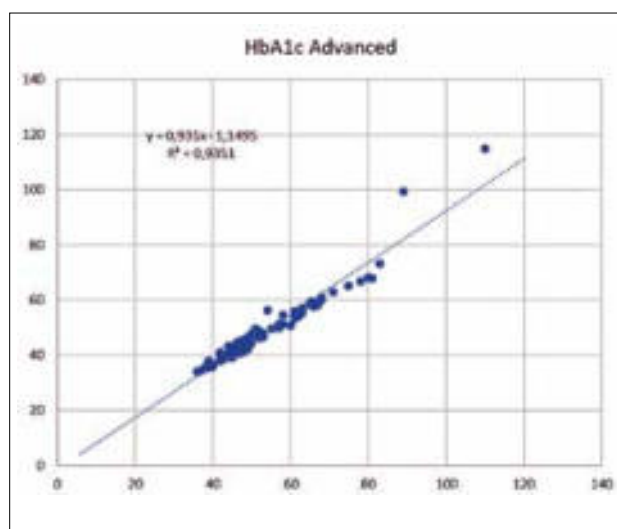
	Kontrola	Opakovatelnost			Mezilehlá preciznost		
		N	Průměr mmol/mol	%CV	N	Průměr mmol/mol	%CV
1	QC Level 1	10	40,8	1,37 %	20	39,8	1,63 %
2	QC Level 2	10	98,1	0,49 %	18	94,9	1,77 %

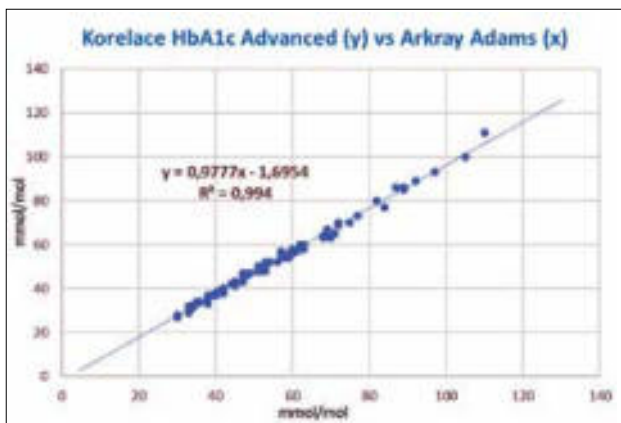
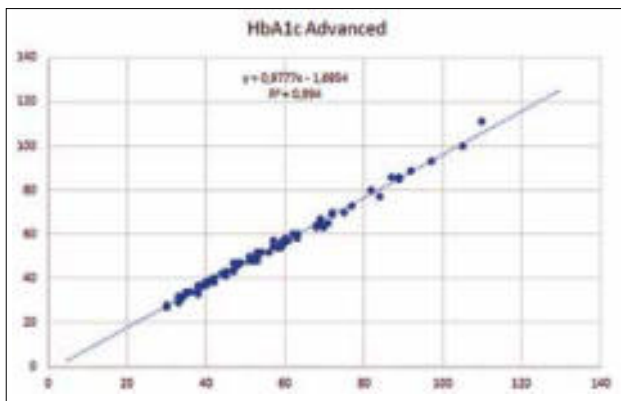
Zjištěné hodnoty pro přesnost jsou plně v souladu s návodem na použití

Porovnání metod

Porovnání metod ukazují následující obrázky.

Sumárně lze konstatovat, že naměřené hodnoty reagensiemi HbA1c jsou v porovnání s Arkray Adams o 5 % nižší a v případě Tosoh G8 je posun o něco výraznější, tj. – 6,5 %.





Klinická shoda

Při porovnání klinické interpretace vzhledem k v návodech reagentů, resp. v laboratořích používanému cut-off (dle laboratorních příruček) shoda dosáhla v obou případech více než 96 % – více níže uvedená schémata.

		HbA1c									
Arkray Adams	mmol/l	<=39		>39		Tosoh G8	mmol/l	<=39		>39	
	<=40	20	0	<=42	11		2				
	>40	3	61	>42	1		73				

Testovaná metoda HbA1c Advanced ukázala velmi slibné analytické charakteristiky, včetně klinické shody potvrzené testováním rutinních neselektovaných vzorků. Studie ukázala, že stanovení HbA1c na moderních biochemických analyzátořech může splňovat náročné požadavky na preciznost a může tak být alternativou pro mnohé laboratoře, které hledají alternativu k HPLC.

Poděkování

Rádi bychom touto cestou poděkovali oddělení OKBH v Nemocnici Valtice s.r.o. a oddělení OKBH Karvinská hornická nemocnice za ochotu a pomoc při studii i za v dnešní době poněkud komplikovaných podmínek.

HbA1c EFEKTIVNOST A PRECIZNOST

Dostupné
na analyzátořech
DxC 700 AU



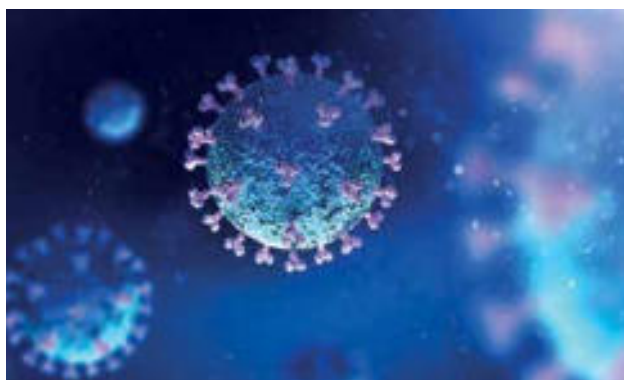
Více na
www.beckmancoulter.com/hba1c

Podíl hematologických vyšetření na diagnostice COVID-19 infekcí

Luděk Slavík, Sylva Adamovská, Jana Úlehová, Jan Grohmann, Jarmila Juráňová, Martin Novák

Současná pandemie COVID-19 vzniklá v prosinci 2019 ve městě Wuhan vedla ke značnému potencionální vývoje metod detekce viru i jeho projevů. Už na začátku pandemie byl izolován a charakterizován virus, který pandemii způsobil, později nazvaný 2019 – nCoV, přejmenovaný na SARS – CoV2 a nakonec COVID-19. Stejně jako virová agens odpovědná za propuknutí těžkého akutního respiračního syndromu (SARS) v letech 2002-2003 a respiračního syndromu na Středním východě (MERS) v letech 2012-2013 je COVID-19 koronavirem. Koronaviry mají jednovláknový genom RNA s obalem z šroubovicového kapsidu složeným z lipidové dvojvrstvy. Sekvenční analýza genomu COVID-19 odhalila, že má silnou homologii se SARS a podobnými koronaviry, které normálně infikují netopýry, a z tohoto důvodu je pandemie pravděpodobně zoonotického původu.

Stejně jako u SARS a MERS jsou převládající klinické příznaky pandemie COVID-19 respirační. Po inkubační době trvající až 2 týdny se pacienti stávají symptomatickými. Typickými symptomy jsou horečka (zjištěná u ~ 99 % pacientů), kašel (~ 50 % pacientů) a dýchací potíže (~ 33 % pacientů). Přibližně 80 % infikovaných jedinců má mírné až středně závažné příznaky, což se v poslední době s nástupem mutací mění. Zbytek má závažný průběh onemocnění, které vyžaduje hospitalizaci. U těžce nemocných jedinců jsou nejzávažnějšími komplikacemi syndrom akutní respirační tísně způsobený difúzním alveolárním poškozením. Na základě vyšetření těchto pacientů bylo zjištěno několik rizikových faktorů, které pre-



disponují pacienty k těžkému průběhu onemocnění, mezi nimiž je z hematologického hlediska na prvním místě D-dimer vyšší než 750-1000 ng/ml při přijetí.

Nedávno identifikovaným klinickým jevem je také reaktivace infekce COVID-19 u podskupiny pacientů po zotavení z počátečního onemocnění, kdy se snadno tvoří závažná pneumonie.

Hematologické markery u pacientů s infekcí COVID-19

Na základě posledních zjištění hrají hematologické parametry důležitou roli tím, že poskytují klinikům řadu užitečných prognostických markerů pro triážování pacientů.

TABULKA 1. Hematologické biomarkery důležité pro infekci COVID-19

Parametr	Klinický význam
Lymfopenie	Porucha imunitní odpovědi hostitele viru
Leukocytóza, CD64	Superinfekce bakteriemi
Neutrofilie	Bakteriální superinfekce, cytokinová bouře
Trombocytopenie	Konzumpční koagulopatie
Pozitivita MDW	Systémový zánět

Lymfopenie

Lymfopenie je běžným nálezem u pacientů s infekcí COVID-19 a předpokládá se, že představuje defektní imunitní odpověď na virus. Dle prvních publikovaných údajů RT-PCR potvrzených případů COVID-19 infekcí se lymfopenie (definovaná jako absolutní počet lymfocytů $<1,0 \times 10^9/l$) vyskytuje u 63 % pacientů. Další analýzou literárních dat bylo zjištěno, že u 35 % – 75 % COVID-19 pozitivních pacientů se vyvinula lymfopenie, což byl častější rys pacientů, kteří zemřeli na nemoc. Jako hranice prediktivní hodnoty pro přijetí na jednotku intenzivní péče (JIP) byl definován počet lymfocytů $<0,6 \times 10^9/l$.

U dětí je lymfopenie mnohem méně častá. To je rozdílné od jiných podobných virových infekcí, jako

je SARS, u nichž byla lymfopenie mnohem častějším nálezem.

Leukocytóza

Leukocytóza, bez ohledu na to, zda představuje neutrofilii, lymfocytózu nebo obojí, je zaznamenána u menší části pacientů infikovaných COVID-19 a zdá se, že je předzvěstí bakteriální infekce nebo superinfekce. Poslední práce zaznamenaly, že leukocytóza byla identifikována u 11,4 % pacientů se závažným onemocněním ve srovnání s 4,8 % pacientů s mírným až středně závažným onemocněním (poměr šancí [OR], 2,54; 95% interval spolehlivosti [CI], 1,43-4,52).

Neutrofilie

Údaje o neutrofilii jsou neúplné a nejsou v literatuře široce řešeny. Dostupné údaje naznačují, že neutrofilie je výrazem cytokinové bouře a hyperzánětlivého stavu, které mají důležitou patogenetickou roli v COVID-19 a souvisejících infekcích, jako je SARS. Cytoplazmatické a jaderné morfologické anomálie, od hyposegmentovaných jader po apoptózu, byly popsány v cirkulujících granulocytech v době přijetí do nemocnice, pravděpodobně ve vztahu k hyperzánětlivému stavu s cytokinovou bouří. Obvykle předcházejí zvýšení reaktivních lymfocytů. Neutrofilie může také indikovat superponovanou bakteriální infekci. Například Fan a kol. ¹ zaznamenali, že neutrofilie je častá u pacientů léčených na JIP během hospitalizace (11,6 vs. 3,5 × 10⁹/l).

Markery systémového zánětu – MDW a CD 64

V posledních letech byla zařazena do diagnostického procesu řada biomarkerů systémového zánětu včetně sepsise jako součást vyšetření krevního obrazu na běžně dostupných analyzátoch. Mezi ně patří exprese neutrofilů CD64, průměrný objem buněk neutrofilů a monocytů, nezralá frakce granulocytů, index neutrofilů delta a šířka distribuce monocytů (MDW). Jeví se, že některé z těchto markerů mohou být užitečné při identifikaci pacientů s rizikem sekundární bakteriální sepsise, i když údaje v tomto okamžiku pandemie chybí. Výjimkou je MDW (Beckman Coulter), u kterého bylo hlášeno zvýšení u téměř všech pacientů infikovaných COVID-19, zejména u pacientů s nejhoršími klinickými příznaky. Údaje MDW je třeba interpretovat opatrně, protože přítomnost reaktivních lymfocytů u pacientů pozitivních na COVID-19 může vést k falešně zvýšenému MDW.

Další potenciální aplikací údajů odvozených z CBC by bylo použití vzorců, jako je poměr neutrofilů

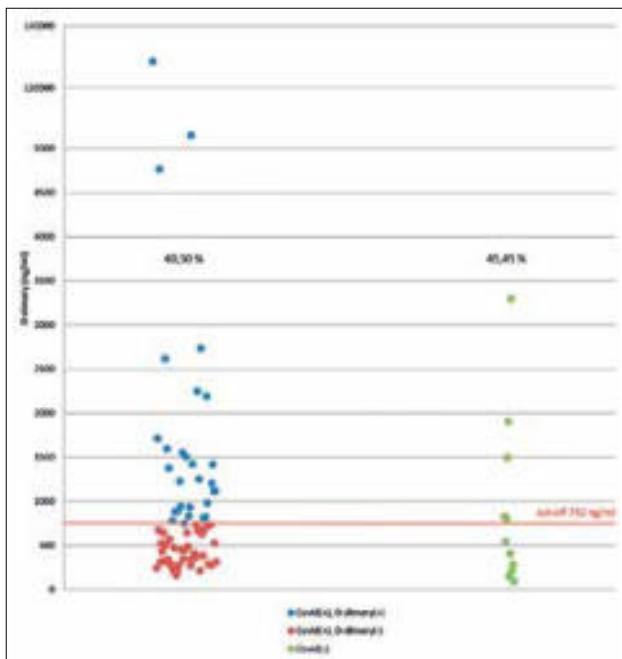
k lymfocytům (NLR), poměr krevních destiček k lymfocytům a poměr monocytů k lymfocytům, které slouží jako náhrada k posouzení rozsahu systémových zánětů. Ačkoli v tomto okamžiku chybí rozsáhlá studie, Qin a kol. ² uvádějí zvýšení NLR u pacientů se závažným onemocněním ve srovnání s těmi bez.

Trombocytopenie

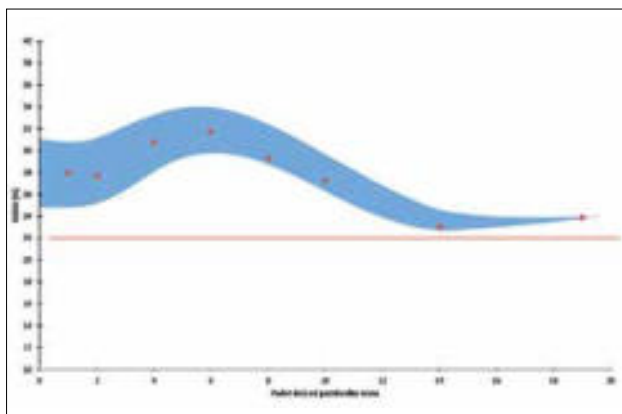
Trombocytopenie je důležitým indikátorem závažného onemocnění u pacientů s COVID-19, jak zdůraznil nedávný přehled dostupných recenzovaných údajů. To není překvapující, protože počet krevních destiček je využíván skórovacími systémy, jako je skóre více orgánových dysfunkcí, Metaanalýza shromážděná z devíti studií ukázala, že u většiny pacientů byla hlášena trombocytopenie. To je podobné údajům hlášeným v ohnisku SARS, ve kterých byla trombocytopenie hlášena v ~ 55 % případů a korelovala se zvýšeným rizikem závažného onemocnění. U pacientů se závažnou infekcí je trombocytopenie identifikována až u 57,7 % pacientů oproti 31,6 % pacientů s méně významnými příznaky COVID-19 (OR 2,96, 95% CI, 2,07-4,22). Je zajímavé, že trombocytóza byla identifikována u menší části pacientů, například Chen a kol. ³, kteří uvádějí tento nález ve ~ 4 % případů.

Koagulační parametry

Typickým znakem části pacientů s těžkou pneumonií je vývoj virové sepsise, diseminované intravaskulární koagulace (DIC) a multiorgánového selhání. Koagulační parametry ukazují abnormální výsledky související se sepsí nebo DIC. Protrombinový čas (PT) a D-dimer jsou užitečnými indikátory prognózy a závažnosti onemocnění u COVID-19. Ve studii u 183 koronavirových pneumonií byly během 2týdenní hospitalizace postupně měřeny PT, aktivovaný parciální tromboplastinový čas (APTT), fibrinogen, antitrombin, FDP a D-dimer. Celková úmrtnost byla 11,5 %. Pacienti, kteří zemřeli na následky virové infekce měli významně vyšší hladiny D-dimeru a FDP a současně delší PT a APTT. U pacientů s úmrtím na infekci během hospitalizace byla pozorována progredující konzumpční koagulopatie ve smyslu zvýšení hladin D-dimeru, FDP a výrazného snižování hladiny AT a FIB antikoagulační léčbu LMWH. Kromě toho bylo u několika kriticky nemocných pacientů hlášeno, že u nich došlo ke koagulopatii, vývoji antifosfolipidových protilátek a zvýšenému riziku výskytu arteriálních a žilních trombotických příhod jako je mozkový infarkt.



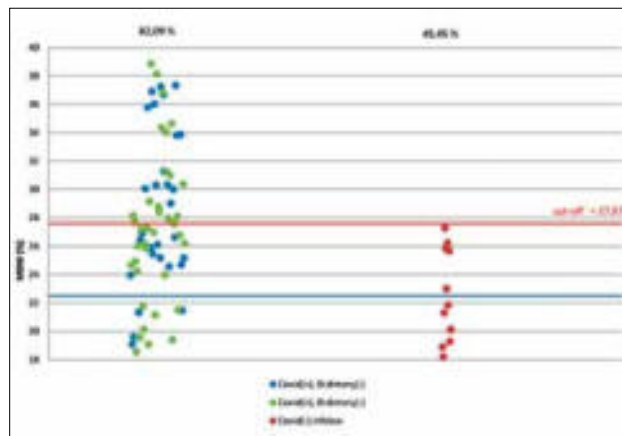
Graf 1 Hodnocení D-dimerů dle průkazu Covid-19 infekce.



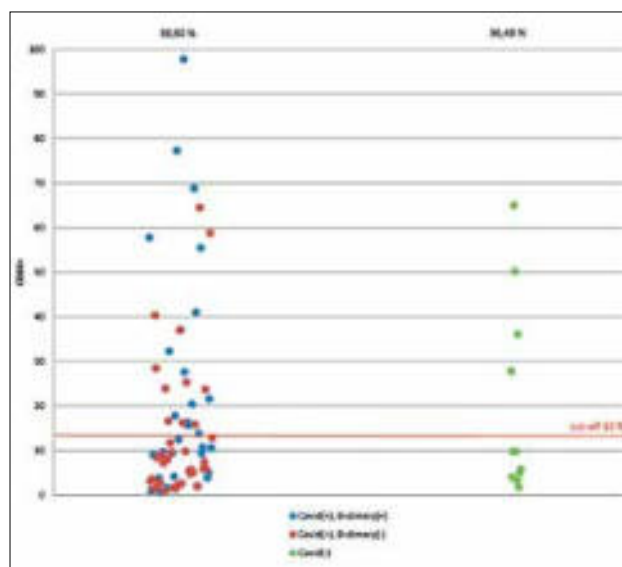
Graf 3 Dynamika vývoje MDW od pozitivního průkazu COVID-19 infekce na základě PCR testu.

Naše výsledky

V období druhé vlny pandemie COVID-19 bylo prováděno na Hemato-onkologické klinice FN Olomouc ve spolupráci s privátní laboratoří SPEA Olomouc s. r. o. vyšetření souboru 78 pacientů přijatých na oddělení urgentního příjmu pro podezření na příznaky virového onemocnění. Soubor tvořilo 41 mužů a 37 žen, průměrný věk souboru byl 59 let, medián 61,5 let. U pacientů byla provedena základní diagnostika krevního obrazu a koagulace, kde byly sledovány parametry distribuční šíře monocytů (MDW) a D-dimery. Cílem vyšetření bylo identifikovat závažnost klinické manifestace a virového onemocnění s ohledem na potřebu plicní podpory. Vyšetření bylo také doplněné o stanovení markeru CD64 pro diagnostiku sekundární bakteriální sepse. Ze 78 pacientů mělo 67 pacientů prokázanou při-



Graf 2 Hodnocení MDW dle průkazu Covid-19 infekce.



Graf 4 Analýza sekundární bakteriální sepse u COVID-19 pozitivních pacientů.

tomnost viru COVID-19 na základě PCR diagnostiky a 11 mělo klinické znaky virového respiračního onemocnění, nicméně pozitivita COVID-19 viru nebyla prokázána. Pacienti byli diagnostikováni v různých dnech ode dne positivity PCR testu na COVID-19, a to zejména v závislosti na zhoršení symptomů tohoto onemocnění např. ztráta chuti a čichu, neustupující horečky, progredující dušnost, celková únava a slabost organismu.

Základní rozdělení pacientů je standardně prováděno dle hladiny D-dimeru a v našem souboru jsme použili cut off hodnotu 750 ng/ml. Z 67 pozitivních pacientů (graf 1) mělo zvýšené hodnoty D-dimerů nad 750 ng/ml 27 pacientů. 40 pacientů mělo hodnoty nižší. Bez ohledu na PCR pozitivitu pacientů pozorujeme zvýšenou hladinu D-dimerů u 40, respektive 45 % pacientů.

Positivní (n = 67) i negativní (n = 11) pacienti byli rozděleni na dvě skupiny podle cut off hod-

noty 750 ng/ml. 27 pozitivních pacientů (40,30 % souboru) mělo zvýšené hodnoty D-dimerů ($d = 1469,80 \pm 842,28$ ng/ml). 40 pacientů mělo hodnoty nižší ($d = 431,37 \pm 169,19$ ng/ml). U 11 COVID-19 negativních pacientů mělo 5 (45,45 % souboru) pacientů hodnoty D-dimerů nad cut off ($1665 \pm 915,10$ ng/ml), 6 bylo negativních ($282,17 \pm 155,28$ ng/ml).

Z markerů systémového zánětu byly u všech pacientů vyšetřeny širší distribuce monocytů (MDW) a znak CD64 jako marker bakteriální sepse. V celém souboru pacientů nacházíme zvýšené hodnoty MDW u 80 % COVID-19 pozitivních pacientů a 45 % u COVID-19 negativních pacientů. Jako cut off jsme zvolili hodnotu 22,0 % MDW podle Polilli a kol.⁴ Přičemž u PCR pozitivních je průměrná hodnota celého souboru ($n = 67$) 27,83 % oproti PCR testem COVID-19 negativním pacientům ($n = 11$; $d = 22,52$ %), což je pravděpodobně způsobeno časovým hlediskem od počátku virové nákazy.

Průměrná hodnota u souboru COVID-19 pozitivních pacientů ($n = 67$) byla $27,83 \pm 5,3$ % oproti pacientům negativním ($n = 11$), kde $d = 22,52 \pm 3,13$ %. Podle Polilli a kol.⁴ je cut off hodnota pro predikci sepse nad 22 % se specifitou 70 %. Nad touto hladinou se nacházelo 80,09 % COVID-19 pozitivních pacientů a 45,45 % COVID-19 negativních pacientů. Pro pacienty s hodnotou nad 29 % je sepse predikována s 98,7 % specifitou.

Z tohoto důvodu jsme hodnotili dynamiku vývoje MDW z hlediska doby od počátku diagnostikovaného virového infektu. Z grafu 3 je patrný postupný nárůst MDW s maximem 6. dne od potvrzení virové infekce PCR testem, s následným postupným poklesem.

Hodnoty MDW narůstají do maxima 6. dne, kdy následně zase dochází k pozvolnému opětovnému poklesu. Jednotlivé body v grafu jsou vyjádřeny jako průměrné hodnoty, kdy den 1 a 2 byl hodnocen samostatně díky většímu množství výsledků. Ostatní body vyjadřují průměry součtů s dny předchozími.

Z hlediska odlišení příčiny infekčního stavu jsme vyšetřovali znak CD64 na neutrofilech jako marker bakteriální sepse. V celém souboru (graf 4) byla zvýšená hodnota u 38 %, respektive 36 % pacientů. Samozřejmě je nutné brát hodnotu cut off pro CD64 pozitivitu, která byla stanovena dle práce Hálek a kol.⁵ na zcela odlišné skupině pacientů.

Z 67 COVID-19 pozitivních pacientů mělo 26 pacientů (38,80 %) hodnoty CD64 nad cut off hranici 13 %, charakterizující počínající vznik bakteriální

sepse. 41 pacientů (62,20 %) bylo negativních. Ze skupiny COVID-19 negativních pacientů měli 4 (36,40 %) pacienti zvýšené hodnoty CD64. 7 pacientů (63,60 %) bylo negativních.

Závěr

V triázování pacientů s podezřením na příznaky virového onemocnění v důsledku COVID-19 je klíčová pozice D-Dimeru s cut-off hodnotou mezi 750–1000 ng/ml FEU. Jeho kombinace s markery systémového zánětu, kterými je širší distribuce monocytů MDW a CD64 znakem, se jeví jako velice přínosná, protože nám pomůže odhalit sekundární bakteriální sepse u primárně virově postižených pacientů.

U COVID-19 pozitivních pacientů dochází k výraznému zvýšení parametru MDW nad cut off hodnotu 22 % než u běžných infekcí⁴. Nejvyšší hodnoty byly dosaženy 6. dne od positivity PCR testu s následným jeho postupným poklesem. Literárně uváděná možnost ovlivnění MDW⁶ pomocí reaktivních lymfocytů byla analyzována porovnáním manuálního diferenciálu s počítačem vyhodnoceným diferenciálem. Ovlivnění MDW nebylo prokázáno.

Z hlediska hodnocení příčiny stavů na základě positivity CD64 znaku je z našich výsledků patrné, že více než 1/3 pacientů je po prodělaném virovém infektu náchylná k závažné sekundární bakteriální infekci.

Literatura

- 1 Fan BE, Chong VCL, Chan SSW, et al. Hematologic parameters in patients with COVID-19 infection. *Am J Hematol.* 2020.
- 2 Chen N, Zhou M, Dong X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet.* 2020;395(10223):507-513.
- 3 Qin C, Zhou L, Hu Z, et al. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clin Infect Dis.* 2020.
- 4 Polilli E, Sozio F., Frattari A, et al. Comparison of Monocyte Distribution Width (MDW) and Procalcitonin for early recognition of sepsis. *PLoS ONE* 2020; 15(1): e0227300
- 5 Halek J, Novak M., Medkova A, et al. The role of nCD64 in the diagnosis of neonatal sepsis in prevent newborns. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc* 2018; 162(4):248-288.
- 6 Frater JL, Zini G, d'Onofrio G, et al. COVID-19 and the clinical hematology laboratory. *Int J Lab Hematol.* 2020 Jun;42 Suppl 1:11-18.

Slavík L.¹, Adamovská S.², Úlehlová J.¹, Grohmann J.¹, Juráňová J.¹ a Novák M.¹

¹ Hemato-onkologická klinika, Lékařská fakulta Palackého University Olomouc a Fakultní nemocnice Olomouc

² Laboratoře Spea Olomouc s. r. o.

Novinky v laboratorní diagnostice časně sepsě

Laboratorní markery mají v diagnostice a prognóze zánětu nejen u kriticky nemocných nezastupitelnou roli. Pro jejich správnou interpretaci je naprosto zásadní respektování patofyziologických konsekvencí, tedy výběr vhodného markeru pro daný klinický stav, načasování, zohlednění případných limitací. Vzhledem k tomu, že stále neexistuje jednoznačný marker pro rozlišení jednotlivých typů zánětu (infekční, neinfekční, systémový, lokalizovaný) je nasnadě hledání nových markerů a také pro zvýšení diagnostické a prognostické účinnosti kombinovat markery nové a stávající.

Irena Francová, Veronika Vášová, Helena Lahoda Brodská

Od listopadu 2019 do června 2020 probíhala ve Všeobecné fakultní nemocnici v Praze unikátní studie zaměřená na porovnání laboratorních markerů zánětu a vyhodnocení jejich diagnostické výtěžnosti pro časnou sepsi. V rámci studie byly stanovovány, kromě již běžně využívaných biochemických markerů (CRP, laktát, prokalcitonin, IL-6 a presepsin) a hematologických (parametry krevního obrazu), i povrchové buněčné markery CD64 a CD11b na neutrofilech. Vyšetření krevního obrazu bylo rozšířeno o marker distribuční šíře monocytů (MDW), který byl měřen na analyzátoru DxH 900 firmy Beckman Coulter.

Cílem studie bylo tedy porovnat diagnostickou výtěžnost stanovovaných markerů pro definovaný klinický stav. Do studie byli zařazeni pacienti akutně přijatí na urgentním příjmu s podezřením na sepsi na základě klinických příznaků a vyhodnocení qSOFA. Krev odebraná primárně pro stanovení krevního obrazu a standardně indikovaných biochemických markerů byla dále využita na vyšetření následujících markerů zánětu – CRP, prokalcitonin, presepsin, IL-6, laktát, CD-64 na neutrofilech a CD11b na neutrofilech. Běžně stanovované parametry krevního obrazu byly rozšířeny o MDW (Monocyte Distribution Width) a ICIS (Intensive Care Infection Score). Při interpretaci výsledků jsme zohlednili

i bakteriologické nálezy hemokultur, pokud tedy byly odebrány.

Unikátní byla tato studie i v tom, že do ní byly zapojeny všechny složky laboratorního komplexu – klinická biochemie, hematologie, imunologie i bakteriologie. V pavilónovém typu nemocnice, kterým VFN je, to znamenalo především logistický problém. Dále bylo nutné zohlednit požadavky preanalytické fáze pro stanovení průtokovou cytometrií, a to především dobu stability markerů na neutrofilech, ověřili jsme si, že maximální přijatelná doba je 6 hodin od odběru, což byl další limitující fakt pro sběr vzorků. Postupně se nám podařilo nastavit následující protokol – zařazení do studie na základě vyhodnocení klinického stavu a qSOFA z nočních a ranních příjmů, odběr vzorků do dvou hodin od příjmu, okamžité stanovení parametrů krevního obrazu, cytometrická stanovení do 6 hodin od odběru a zamražení krevní plazmy na -80°C , následné doplnění biochemických stanovení ze zmražených vzorků. Vzorky, které nesplňovaly tento protokol, byly ze studie následně vyřazeny. Ze studie byli také vyřazeni pacienti pod 18 let a pacienti s primárně hematoonkologickým onemocněním.

Po uplatnění vylučovacích kritérií nám v souboru zbylo 104 pacientů, kteří byli retrospektivně na zá-



kladě klinického nálezu a laboratorních výsledků rozdělení do následujících skupin – sepsé/septický šok (n=40), lokalizovaný infekt (n=35), neinfekční SIRS (n=14) a kontroly bez přítomnosti lokalizovaného či systémového zánětu (n=15). Bakteriologické vzorky těchto pacientů byly posouzeny klinickým mikrobiologem z hlediska relevance bakteriologického nálezu. Při hodnocení jsme zohlednili i stav orgánových funkcí z důvodu správné interpretace například hladin CRP při poruše jaterní proteosyntézy, hladin presepsinu při zjištěné renální insuficienci a dalších známých limitací (nespecifické, respektive neinfekční elevace PCT u neinfekční systémové zánětlivé odpovědi, možnost ovlivnění produkce leukocytů – případně imunoprese, biologická léčba).

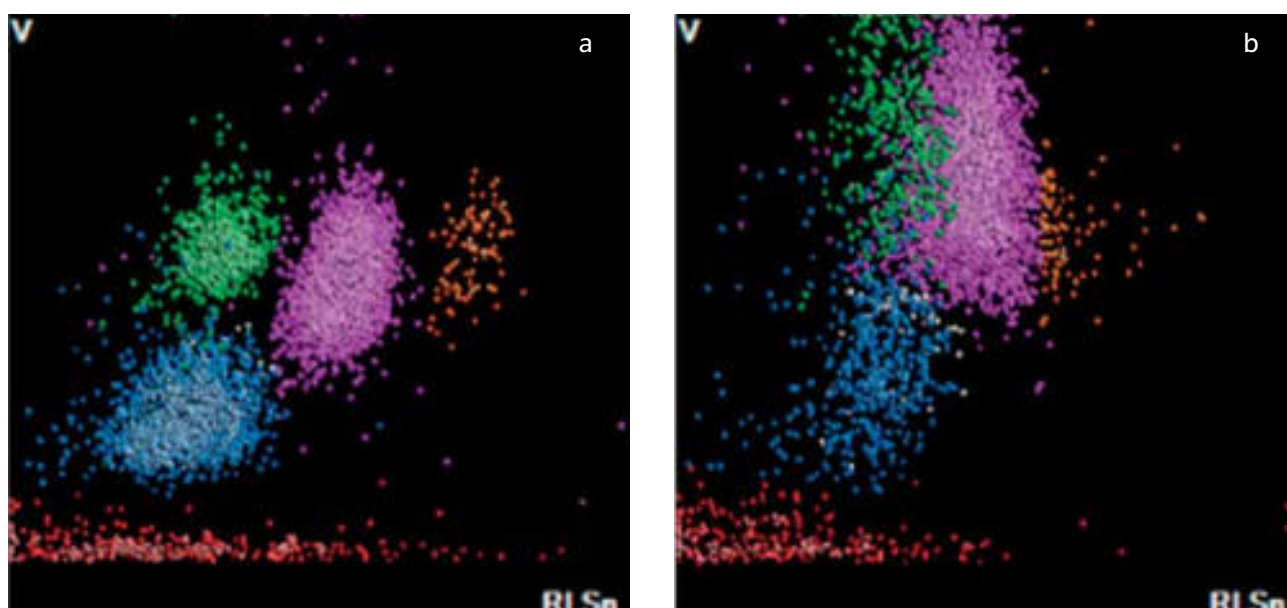
MDW

Hematologická laboratoř se zaměřila především na parametr MDW (Monocyte Distribution Width) tzv. distribuční šíře monocytů. Velkou výhodou MDW je jeho přímé stanovení v rámci základního krevního obrazu s diferenciálním počtem leukocytů na hematologickém analyzátoru DxH 900 firmy Beckman Coulter. Probíhá-li v organismu infekční onemocnění, tak první obrannou linií v rámci nespecifické imunity jsou neutrofily a také monocyty. V boji s infekčním agens se monocyty aktivují, zvyšují intracelulární obsah lysozomů, a tím mění svoji velikost. Zvýšení hodnoty MDW tedy odráží aktivitu monocytů v infekčním prostředí organismu. Cut off hodnota MDW, jakožto časného markeru sepsé, byla na základě multicentrické studie provedené výrobcem stanovena na 20

jednotek. Pokud se hodnota MDW u dospělých pacientů pohybuje nad tuto hodnotu, pak se zvyšuje i pravděpodobnost, že se u nich do 12 hodin rozvine septický stav. Na obr. 1 je patrný rozdíl v MDW u pacienta s fyziologickým nálezem (a), hodnota MDW se pohybuje kolem 13. Monocyty nevykazují žádnou aktivitu a jejich objem je více méně stejný. Naopak, hodnota MDW u pacienta s prokázanou sepsí (b) je 44, tedy hodně přes cut off.

Stabilita MDW byla vyhodnocena po 6 hodinách u 23 vzorků, u nichž MDW nepřesáhlo hodnotu 24. Variační koeficient stability u těchto vzorků nepřesáhl 5 %. U 17 vzorků s hodnotou MDW větší než 24 byl variační koeficient stability menší než 10 %. Vzhledem k tomu, že se nám podařilo celkem dobře nastavit systém spolupráce napříč všemi dotčenými laboratořemi, byly všechny vzorky periferní krve změřeny v průměru do 3 hodin od odběru. Posledním krokem v hematologické laboratoři bylo zhotovení nátěru všech vzorků periferní krve a vyhodnocení manuálního diferenciálního počtu leukocytů, včetně zhodnocením morfologických změn u nezralých granulocytů, neutrofilů, lymfocytů a monocytů.

Pro zajímavost jsme do studie zařadili srovnání MDW s parametrem ICIS (Intensive Care Infection Score), který napomáhá odlišit infekční sepsi od neinfekční systémové zánětlivé reakce organismu (SIRS). Na analyzátoru firmy Sysmex byl změřen krevní obraz s šestipopulačním diferenciálem a s retikulocyty. Skóre ICIS bylo poté vypočítáno z pěti parametrů, které prezentují časnou vrozenou imunitní odpověď na infekční agens. Je to absolutní počet



Obr.1 Rozdíl v MDW resp., rozložení populací leukocytů: a) zdravý pacient, b) pacient s prokázanou sepsí. Zelená = monocyty, růžová = neurofily, oranžová = eosinofily, modrá = lymfocyty, bílá = bazofily, červená = debris.

neutrofilů, intenzita fluorescence neutrofilů, celkový počet nezralých granulocytů, parametr odrážející protilátkovou aktivitu organismu a posledním je parametr, který zohledňuje dostupnost železa jako obranného mechanismu s krátkým reakčním časem.

CD64, CD11b

Metodou průtokové cytometrie jsme stanovovali intenzitu exprese povrchových markerů na neutrofilech. CD64 je integrální membránový glykoprotein s funkcí receptoru pro Fc fragment imunoglobulinů, FcγRI. V klidovém stavu je exprimován na monocyttech a v nízkém množství i na neutrofilech. Působením prozánětlivých cytokinů (INF ale i G-CSF) se jeho exprese výrazně zvyšuje. V odpovědi na infekci je tak zajištěna efektivnější fagocytóza patogenních mikroorganismů.

Receptor CD11b je součástí integrinu Mac-1 (CD11b/CD18). V zánětlivé odpovědi má význam při migraci monocytů a neutrofilů do místa zánětu. Na nestimulovaných neutrofilech je míra jeho exprese velmi nízká, ta však významně narůstá při bakteriální patogenní expozici.

MFI obou těchto povrchových markerů jsme měřili metodou průtokové cytometrie. Pro stanovení jsme používali monoklonální protilátky výrobce Beckman Coulter – CD64–FITC (klon 22) a CD11b-APC (klon Bear1). Pro přípravu vzorku jsme používali lyzační činidlo VersaLyse (Beckman Coulter) a vzorek jsme 2x promývali PBS. Gatovací strategie byla velmi jednoduchá, neutrofilů jsme gatovali na základě rozdělení FS a SS a exprese znaku CD45 (CD45-KO). Poté jsme stanovili průměrnou intenzitu fluorescence v příslušných kanálech znaků CD64 a CD11b. Měřili jsme na cytometru NaviosEx.

Výsledky

Cílem studie bylo vyhodnotit vhodné markery, či jejich kombinaci, pro časnou diagnostiku sepse a k stratifikaci septického pacienta najít marker s vysokou rozlišovací schopností mezi sepsí a neinfekční systémovou zánětlivou odpovědí – zde se v průběžném hodnocení velice nadějně jeví imunologický marker CD64 na neutrofilech především v kombinaci s PCT. Intenzita fluorescence u markeru CD64 na neutrofilech poměrně dobře rozlišuje mezi kontrolní a septickou skupinou, u septické skupiny byla zvýšena až 10 násobně. Především jeho kombinace s PCT ukazuje možnosti ve zvýšení specifity laboratorní diagnostiky časně sepse. Předběžné výsledky nám ukázaly, že z hlediska hodnocení

časného septického stavu, není stanovení markeru CD11b na neutrofilech u dospělých, často polymorbidních pacientů, vhodné.

Zajímavé jsou též výsledky potvrzující diagnostickou účinnost nového hematologického markeru MDW pro sepsi. Překvapilo nás, že MDW u kontrolní skupiny se pohybovala kolem 20, tedy při cut off hodnotě. V některých případech dosáhla až na hodnotu 24, což se liší od hodnoty stanovené v primární firemní studii. Ve skupině septických pacientů dobře koreluje vzrůstající hodnota MDW s leukocyty a posunem doleva, avšak korelace MDW a ICIS je spíše proměnlivá. Podobné je i chování obou parametrů vůči PCT. Samostatně však nemá, ani jeden z parametrů, jednoznačnou specifitu k laboratorní diagnostice časně sepse. Nicméně, chování parametru MDW naznačuje, že je lepším diagnostickým parametrem pro septické stavy. Nespornou výhodou obou parametrů je jejich rychlé, jednoduché a levné stanovení v rámci krevního obrazu.

Závěr

Toto sdělení nemá za cíl prezentaci výsledků studie, výsledky v současné době statisticky zpracováváme a připravujeme jejich publikaci. Cílem bylo upozornit na možnosti rozšířit diagnostiku zejména časně sepse o nové zajímavé primárně hematologické a imunologické parametry. Při zvládnutí často obtížné logistiky (všechny laboratoře nepracují v modu 24/7) propojit hlavní odvětví klinické laboratorní praxe a ve spolupráci s kliniky zlepšit a zpřesnit diagnostiku u kriticky nemocných, a stát se tak nedílnou součástí nemocničního alert systému.

Poděkování

Rády bychom poděkovaly firmě Beckman Coulter za zapůjčení analyzátoru DxH 900 a Ing. Petru Lehnertovi za spolupráci.

Mgr. Irena Francová, Klinická imunologie a alergologie-laboratoř, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky; Všeobecná fakultní nemocnice v Praze

Mgr. Veronika Vášová, Centrální hematologické laboratoře, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky; Všeobecná fakultní nemocnice v Praze

Doc. MUDr. Helena Lahoda Brodská, Ph.D., Centrální laboratoř, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky; Všeobecná fakultní nemocnice v Praze

Spojení miniaturizované SPE s nano core-shell technologií bioZen™ XB-C18 pro detekci nukleokapsidových proteinů SARS-CoV-2 virových peptidů ve vzorcích výtěru z nosohltanu

Zlatým standardem pro detekci virů v komplexních matricích vzorků se stala amplifikace genetického materiálu pomocí PCR (polymerázová řetězová reakce). Ačkoli jsou PCR metody pro detekci virů dobře zavedené, vědci se stále potkávají s mnoha problémy, jako je nedostačující citlivost způsobená vysokou rychlostí výskytu nových virových mutací, nízká propustnost vzhledem k dlouhým experimentálním krokům a dostupnosti specializovaných reagensů.^{1,2}

Roxana Eggleston-Rangel a kolektiv autorů

Analytické metody jako kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) schopny detekovat viry ve složitých matricích se objevily, buď jako doplnění, nebo jako náhrada. Detekce virů metodou LC-MS spoléhá na přítomnost peptidů, které jsou specifické pro virus, a nikoli pro jeho hostitele. Aby metoda LC-MS dosáhla citlivosti potřebné k detekci virových peptidů, klíčovými aspekty jsou metoda čištění vzorku a volba použité LC kolony. Čištění vzorku zvyšuje poměr signálu k šumu, což umožňuje detekci virových peptidů při stopových hladinách. SPE (extrakce na pevné fázi) je nejefektivnější technika přípravy vzorků, která pomáhá eliminovat interference spojené se složkami matrice vzorku, přičemž selektivně zadržuje požadované peptidy.

Dosažení požadované citlivosti závisí také na dimenzích LC kolony. Již dlouho je známo, že nano LC technologie zvyšuje citlivost a umožňuje uživateli provádět chromatografickou separaci v menším měřítku skrze snížení vnitřního průměru kolony, což má za následek snížení průtokové rychlosti, zvýšení koncentrace analytu a tím zvýšení citlivosti.³⁻⁵ Zatímco nano LC dokáže zvýšit citlivost, kombinace úzkých vnitřních průměrů kolon a core shell bioZen technologie společnosti Phenomenex, vede k minimálnímu rozšíření píku, zkrácení difúzní dráhy, nárůstu výšky píku a tím ke zvýšení citlivosti ve srovnání s plně porézními částicemi.⁶

Mikroeluční SPE lze úspěšně spojit s nano LC-MS. Mikroeluce je miniaturizovaný formát SPE, který je ideální při práci s malými objemy vzorků, nízkou koncentrací analytu a potřebou zvýšení signálu analytu.⁷ Tato technická poznámka poskytuje miniaturizované LC-MS a SPE metody pro spolehlivou a přesnou de-

tekci virových peptidů v koncentraci 1 fmol/μl s použitím nukleokapsidového proteinu SARS-CoV-2 (N-protein) jako modelového systému s použitím SPE Strata-X mikroeluce pro čištění vzorku a bioZen 2,6 μm Peptide XB-C18 nano kolon spojených s Sciex QTRAP 6500+ hmotnostním spektrometrem pro maximální citlivost.

Příprava vzorků

Extrakce na pevné fázi

Sorbent:	Strata®-X 96-Well Plate, 2 mg/well
Katalogové číslo:	8M-S100-4GA
Aktivace:	200 μl metanolu
Ekvilibrace:	200 μl vody
Nástřik vzorku:	400 μl zředěného vzorku stěru z nosohltanu (200 μl vzorku s 200 μL 4% kyseliny fosforečné ve vodě s přidaným těžkým peptidem)
Promývání 1:	200 μl 20 kyseliny mravenčí ve vodě
Promývání 2:	200 μl vody
Eluce:	2×40 μl 1% TFA v ACN: voda (75:25)
Sušení:	Dusíkem při teplotě nižší než 40 °C
Rekonstituce:	Resuspendace suchého vzorku ve 100 μl 0,1% kyseliny mravenčí ve vodě

LC podmínky

Kolona:	bioZen 2,6 μm Peptide XB-C18
Parametry:	150×0,075 mm
Katalogové číslo:	00F-4768-AW-21
Tlak (bar):	200
Mobilní fáze:	A: 0,1 % kyseliny mravenčí ve vodě B: 0,1 % kyseliny mravenčí ve acetonitrilu
Gradient:	Čas (min) % B 0 3 30 40 35 70 40 80 41 3 50 3
Průtok:	250 μl/min
Teplota:	25 °C
Systém LC:	NanoLC™ 425 (SCIEX)

Detekce: MS/MS
 Detektor: 6500 QTRAP® (SCIEX)
 Nástřik: 1 µl

MS Parameters

CUR: 30
 IS: 2500
 GS1: 35
 GS2: A: 0
 IHT: 150
 CAD: Nízký
 EP: 10

Materiály a metody

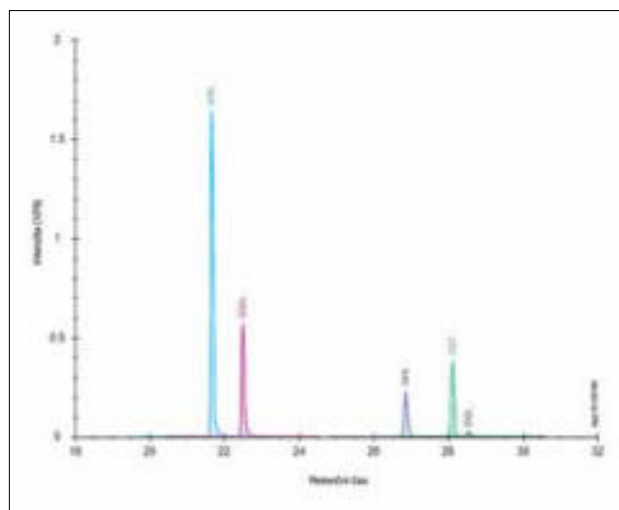
Vzorky z výtěru nosohltanu byly odebrány do PBS pufru a poté podrobeny tryptickému štěpení. Po štěpení byly ke vzorkům přidány syntetické peptidy (tabulka 1) a následovalo sériové ředění. Izo-topově značené syntetické peptidy byly označeny na C-konci argininu (R) nebo lysinu (K) (tabulka 1) a byly přidány pro účely kvantifikace. Purifikace metodou mikroeluční SPE byla provedena znázorněným způsobem.

Zpracování dat

Ke kvantitativním účelům byl použit software Sciex OS (verze 2.0.0), zatímco kvalitativní účely použil software Skyline (verze 20.1.0.31).

Výsledky a diskuse

K trypsinem štěpeným vzorkům z výtěru nosohltanu (obsahujícím pět přidávaných syntetických peptidů specifických pro nukleokapsidové proteiny viru SARS-CoV-2 jako v tabulce 1) byly přidány jejich peptidové protějšky značené na C-konci argininu



Obrázek 1 Chromatografická separace 5 syntetických peptidů SARS-CoV-2

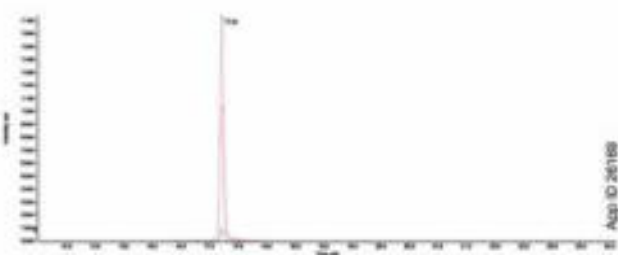
(R) nebo lysinu (K) (tabulka 1), což umožnilo kvantifikaci s využitím poměru plochy píku těžkého značeného peptidu vůči neznačenému (lehkému) peptidu. Metoda s kolonou bioZen™ 2,6 µm Peptide XB-C18 umožnila dostatečnou retenci virových peptidů a poskytla skvělé rozlišení mezi pěti analyty. Nanorozměry kolony spolu s technikou miniaturizované SPE navíc výsledně poskytly ultračistý extrakt s minimálním šumem pozadí, čímž bylo dosaženo výrazně nižší hladiny kvantifikace, 1 fmol/µl.

Za účelem stanovení dynamického rozsahu testu byla analyzována kalibrační křivka konstruovaná pro extrahované vzorky v rozmezí koncentrací 1 až

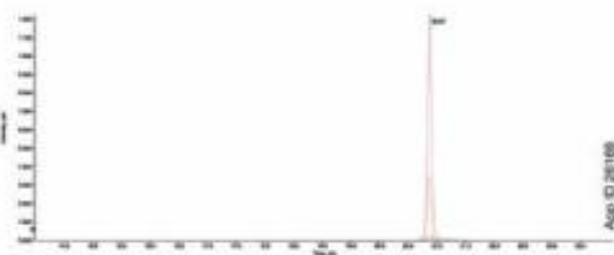
Tabulka 1 MRM (Monitorování více reakcí) optimalizované parametry přechodu.

ID	Hmotnost Q1 (Da)	Hmotnost Q3 (Da)	RT – Retenční čas (min)	sMRM prodleva	DP	CE	CXP
GQGVPIINTSSPDDQIGYYR+3y16+2.heavy	731,015	925,433	17,1	208,871	70	31	50
GQGVPIINTSSPDDQIGYYR+3y16+2.light	727,678	920,429	17,1	208,871	70	31	50
GQGVPIINTSSPDDQIGYYR+3y9+2.light	727,678	563,762	17,1	208,871	70	31	50
NPANNAIVLQLPQGTTLPK+3y8.heavy	690,06	849,492	20,9	224,491	80	40	40
NPANNAIVLQLPQGTTLPK+3y8.light	687,388	841,478	20,9	224,491	80	40	40
NPANNAIVLQLPQGTTLPK+3b9.light	687,388	865,453	20,9	224,491	80	40	40
DGIWVATEGALNTPK+3y7.heavy	564,973	708,413	22,3	155,65	80	36	10
DGIWVATEGALNTPK+3y7.light	687,388	865,453	20,9	224,491	80	40	40
DGIWVATEGALNTPK. +3y5.light	562,302	572,34	22,3	155,65	80	35	18
AYNVTQAFGR +2y6. heavy	569	689,4	16,3	209,429	50	24	12
AYNVTQAFGR +2y6. light	564	679,4	16	250	50	24	12
AYNVTQAFGR +2y6. light	564	892,6	16,3	209,429	50	26	15
QQTVTLTPAADLDDFSK+2y10.heavy	935,6	1086,8	22	129,08	80	40	20
QQTVTLTPAADLDDFSK+2y10.light	931,6	1078,5	22	129,08	80	40	20
QQTVTLTPAADLDDFSK+2y11.light	931,6	1191,6	22	129,08	70	37	20

GQGVPIINTSSPDDQIGYYR



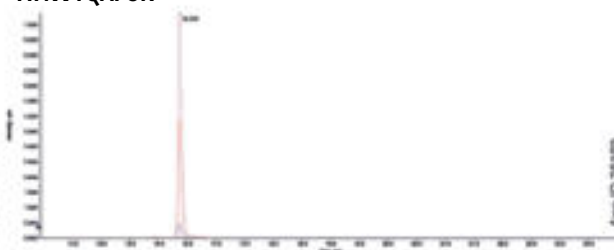
NPANNAIVLQLPQGTTLPK



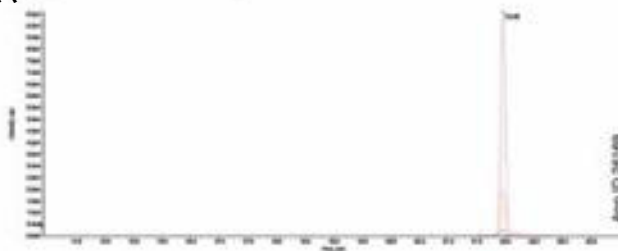
DGIWVATEGALNTPK



AYNVTQAFGR



QQVTLLPAADLDDFSK



Tabulka 2 Poměr signálu k šumu pro jednotlivé peptidy při koncentraci 1fmol/μl.

ID peptidu	S/N
AYNVTQAFGR+2y6.light	408
DGIWVATEGALNTPK+3y7.light	460
QQVTLLPAADLDDFSK+2y10.light	1293
NPANNAIVLQLPQGTTLPK+3y8.light	323
GQGVPIINTSSPDDQIGYYR+3y16+2.light	112

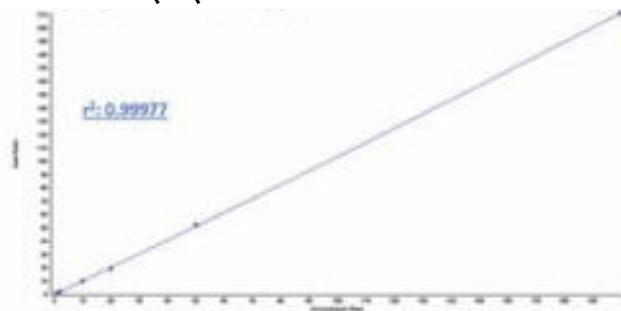
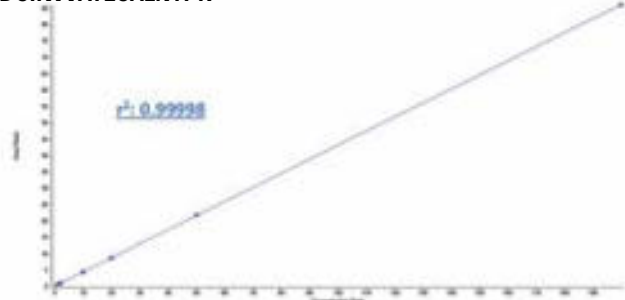
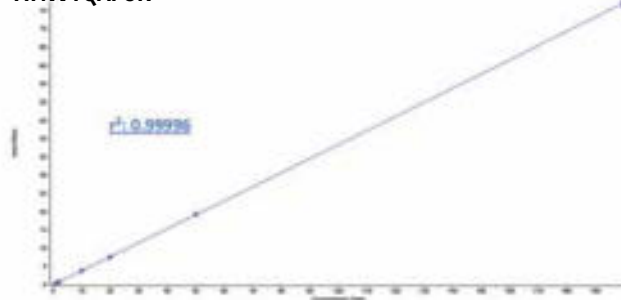
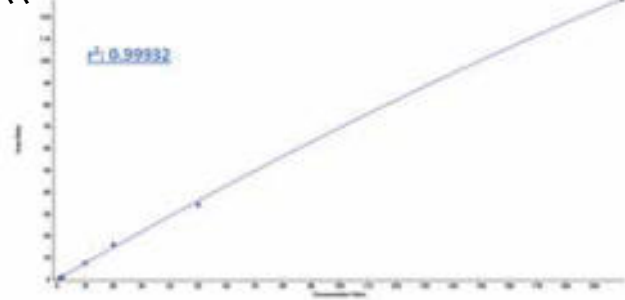
Obrázek 2 Vytažené iontové chromatogramy individuálních MRM přechodů.

200 fmol/μl. Všech pět peptidů vykazovalo linearitu v celém rozsahu koncentrací (obrázek 3). To ukazuje, že každý peptid lze spolehlivě kvantitativně stanovit až do koncentrace nejméně 1 fmol/μl. Poměry signálu k šumu (S/N) byly vypočítány při nejnižší testované koncentraci 1 fmol/μl a vycházely z relativní odezvy proti extraktu slepé matrice. Byly zjištěny odezvy proti extraktu slepé matrice. Byly zjištěny poměry S/N v rozmezí 112 až 1293 (tabulka 2). Vzorky kontroly kvality byly testovány na opakovanou extrakci při 3 různých hladinách koncentrace (tabulka 3). Byla vypočtena správnost v rozmezí 93–118 % a variační koeficient <7 %, což odpovídá přijatelným oborovým standardům.

Závěr

Metoda s kolonou bioZen™ Peptide XB-C18 s nanočásticemi s pevným jádrem a porézním povrchem má dostatečnou retenci peptidů viru SARS-CoV-2 a poskytuje mezi těmito analyty skvělé rozlišení. S využitím mikroeluční SPE Strata-X byly vzorky ex-

trahovány efektivněji a v mnohem kratším čase než při konvenční SPE. Tato selektivní extrakce a citlivá chromatografie poskytly poměry signál/šum ≥ 112 při koncentraci 1 fmol/μl. Selektivita při nejnižší testované koncentraci 1 fmol/μl naznačuje, že detekční rozsah lze pro tyto peptidy snadno rozšířit na mnohem nižší koncentrační rozmezí, a tak dosáhnout nejnižší úrovně kvantifikace. Dynamický rozsah testované mikroeluční SPE prokazuje přijatelnou linearitu s hodnotami $r^2 \geq 0,995$ pro všechny peptidy. Oborové standardy také vyžadují správnost 80–120 % a přesnost <20 % na dolní mezi kvantifikace (LLOQ) a <15 % v celém rozsahu kalibrační křivky, což předložená metodika dobře splnila. Předložená data ukazují, že při použití mikroeluční SPE ve spojení s kolonami bioZen 2,6 μm Peptide XB-C18 s nanočásticemi s pevným jádrem a porézním povrchem lze peptidy viru SARS-CoV-2 vyvolávajícího onemocnění COVID-19 detekovat s velkým rozlišením a citlivostí.

QGVPIINTSSPDDQIGYYR**NPANNAIVLQLPQGTTLPK****DGIWVATEGALNTPK****AYNVTQAFGR****QQTVTLLPAADLDDFSK****Tabulka 3** Preciznost a správnost pro vzorky QC každého peptidu.**AYNVTQAFGR**

Očekávaná koncentrace (fmol/μl)	Vzorek	Opakování (N)	% CV	Správnost
5	QC1-1	4	3.7	96
40	QC1-2	4	1.2	102
100	QC1-3	4	2.1	96

DGIWVATEGALNTPK

Očekávaná koncentrace (fmol/μl)	Vzorek	Opakování (N)	% CV	Správnost
5	QC1-1	4	4	118
40	QC1-2	4	3.9	115
100	QC1-3	4	1.2	113

QGVPIINTSSPDDQIGYYR

Očekávaná koncentrace (fmol/μl)	Vzorek	Opakování (N)	% CV	Správnost
5	QC1-1	4	0.6	110
40	QC1-2	4	6	107
100	QC1-3	4	4	93

QQTVTLLPAADLDDFSK

Očekávaná koncentrace (fmol/μl)	Vzorek	Opakování (N)	% CV	Správnost
5	QC1-1	4	7	104
40	QC1-2	4	5	102
100	QC1-3	4	5	110

Obrázek 3 Kalibrační křivky jednotlivých peptidů.**Zdroje**

¹ Orooji, Yasin et al. „An Overview on SARS-CoV-2 (COVID-19) and Other Human Coronaviruses and Their Detection Capability via Amplification Assay, Chemical Sensing, Biosensing, Immunosensing, and Clinical Assays.“ Nano-micro letters vol. 13,1 (2021): 18. doi:10.1007/s40820-020-00533-y.

² Islam, Khursheed Ul, and Jawed Iqbal. „An Update on Molecular Diagnostics for COVID-19.“ Frontiers in cellular and infection microbiology vol. 10

560616. 10 Nov. 2020, doi:10.3389/fcimb.2020.560616

³ Wilm, M. & Mann, M. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. Anal. Chem. 68, 1–8 (1996).

⁴ Gatlin, C. L., Kleemann, G. R., Hays, L. G., Link, A. J. & Yates, J. R. III Protein identification at the low femtomole level from silver-stained gels using a new fritless electrospray interface for liquid chromatography–microspray and nanospray mass spectrometry. Anal. Biochem. 263, 93–101 (1998).

⁵ Bian, Y., Zheng, R., Bayer, F.P. et al. Robust, reproducible and quantitative analysis of thousands of proteomes by microflow LC–MS/MS. Nat Commun 11, 157 (2020)

⁶ <https://phenomenex.blog/2017/07/25/porous-core-shell-tech/>

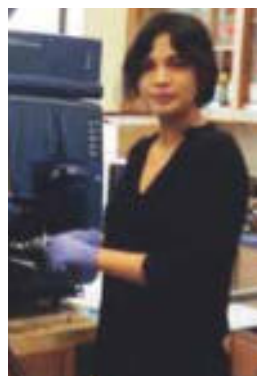
⁷ Justyna Plotka-Wasyłka, Natalia Szczepańska, Miguel de la

Guardia, Jacek Namieśnik, Miniaturized solid-phase extraction techniques, TrAC Trends in Analytical Chemistry, Volume 73, 2015, Pages 19–38 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993615002010>)

Roxana Eggleston-Rangel¹, Shahana Huq¹,
Dr. Jason Anspach¹, Dr. Bryan Tackett¹,
Anthony Maus², Ph. D., Jennifer Kemp²,
Kari Gurtner², Ravinder Singh², Ph. D.,
and Stefan Grebe², M.D., Ph. D

¹Phenomenex, Inc., 411 Madrid Ave., Torrance, CA
90501 USA

²Oddělení klinické biochemie a imunologie, Oddělení
laboratorní medicíny a patologie, Mayo Clinic,
200 First St. SW Rochester, MN 55905



Roxana Eggleston-Rangel
aplikační vědecká pracovnice

Roxana ráda tráví čas se
svojí rodinou a jejich psem.
Má křížence německého ov-
čáka jménem Cobi, který byl
pojmenován podle oficiál-
ního maskota letních olym-
pijských her v roce 1992,
a nikoli podle slavného bas-
ketbalisty.

Kromě laboratoře můžete Roxanu najít
ve starých epizodách Duchů šepotů, MAD TV, The L
word a dalších, protože během školních let se často
objevovala v TV seriálech.

Lepší citlivost a selektivita s

**LC kolonami
bioZen nano**
pro omické analýzy



Kupte **2**
nano kolony >>
50% sleva
na bioZen nano trapy a fitinky

Kupte **3**
nano kolony >>
Zdarma
1x bioZen frakční kolona s
vysokým pH

Vyprší: 28.5.2021
Zmiňte kód nabídky: BZEN0521
www.phenomenex.com/bioZenNano



Krátké zprávy

Martin Polčík

Série počítačů částic ve vzduchu MET ONE 3400+ pro čisté GMP prostory

Nové přenosné počítače částic řady MET ONE 3400+ umožňují uživatelům načíst mapu jejich monitorovaných prostorů a konfigurovat vzorkování pro každé měřící místo. „Standard operation procedure“ (SOP) se tak stane interaktivní vzorkovací mapou přímo na obrazovce přístroje, která uživatele provede denním odběrem vzorků. To pomáhá snížit požadavky na školení, eliminovat chyby a opomenutí vzorkování dat.

Vzdálený přístup přes webový prohlížeč, funkce jako kontrola / schválení pracovního postupu, řízení verzí SOP a export elektronických záznamů jsou integrovány přímo v softwaru přístroje – není potřeba žádný externí software. „Audit trail“ je úplný a zabezpečený a možnost jeho prohledávání / filtrování zrychluje reportování během auditů. V kombinaci s Microsoft Active Directory pro kontrolu uživatel-



ského jména a hesla pro přihlášení a elektronické podpisy je software přístroje v souladu s regulací 21 CFR, část 11.

Přístroj je dostupný ve více verzích s odlišným průtokem vzduchu a rozsahem měřících kanálů částic (0,3–10 μm nebo 0,5–10 μm).

Detailní informace jsou dostupné v brožuře PAR -7003SB06.20

EMnetik 24

- Malé stacionární zařízení pro PCR Cleanup a purifikaci plasmidů pomocí paramagnetických kuliček.
- Uložené protokoly pro automatickou elektromagnetickou separaci a míchání kuliček.
- Zpracování až 24 vzorků do 16 minut.



Biomek NGenius

- Flexibilní, snadno použitelný pipetovací automat pro přípravu NGS knihoven.
- Zpracování až 24 vzorků najednou.
- Rozmanitá nabídka demonstrovaných metod a aplikací.

Coming in 2021!

Firemní e-setkání: Virtuální KickOff

Veronika Novotná

Stejně jako každý rok, byl leden 2021 ve znamení firemního setkání KickOff, v jehož rámci byly stanoveny priority pro začínající rok. Co bylo ale jiné? Letošní KickOff se odehrával virtuálně. Po ¾ roce na Home Office jsme si sice už zvykli fungovat virtuálně, ale KickOff pro nás vždy znamenal, že jsme se společně jako celá firma sešli, sdíleli pracovní i nepracovní informace, povídali si, vymýšleli... a samozřejmě jsme také večer prožili nějaké to neformální posezení nad zlatavým mokem. Co si budeme povídat, na to jsme se těšili hodně. To ale letos kvůli pandemické situaci nešlo.

Když se jednotliví zaměstnanci podívali na plánovaný program KickOffu, tak nám přišlo nemálo reakcí v duchu „Nějaký program večer nebude?“, „Co nějaká e-hospoda?“, nebo „Virtuální ochutnávka vín?“. Nad kreativitou nápadů, ale hlavně nadšením, že kolegové chtějí společně něco nepracovního podniknout, jsme jen obdivně přikyvovali. Ohromně nás to povzbudilo pustit se do vymýšlení následné večerní akce, kterou by si všichni užili a mohli být aktivně zapojeni... Virtuální, virtuální... co takhle virtuální únikovka? – „To zní dobře! Pojdme zjistit možnosti.“

Teambuildingové agentury zareagovaly rychle na měnící se dobu a některé své nabízené aktivity byly schopny převést do online podoby. Mohli



jsme si vybírat. Nejvíce nás oslovila strategická hra GALAKTICKÁ DOMINANCE od společnosti Questerland (<https://questerland.cz>), ve které jednotlivé týmy soupeří o vesmírnou nadvládu. Ačkoliv se nejedná o klasický koncept únikové hry, kdy je třeba se odněkud dostat ven, tak virtuální interaktivní hra protkaná vyjednáváním, strategickými rozhodnutími, plánováním, ale i intrikami a podrazy všeho druhu nás dokázala na celé dvě hodiny proměnit v nadšené soutěživé děti, které si ji pořádně užily a pobavily se.

A co říkají naši účastníci?

„Byla to zábava, doufám, že zopakujeme.“

„Překvapilo mě, jak nás téma dokázalo vtáhnout do děje.“

„Rád bych si hru zopakoval. Docela mne láká představa, zapojit vedle kolegů také naše zákazníky“ říká například Lukáš Palivec, obchodní ředitel.



Karcinom prostaty: I ve složitých časech... MYSLEME NA PREVENCI

Současná pandemická situace, vytížené nemocnice a stále přítomný lockdown nepřejí preventivním programům, což může mít v budoucnu nedozírné následky na celkové zdraví populace. Jedním z mnoha takto postižených programů je prevence mužského zdraví a zejména karcinomu prostaty (KP).

Miroslav Janošík

Rakovina prostaty je jedním z nejčastějších a nejnebezpečnějších maligních nádorů mezi muži¹. Odhaduje se, že u jednoho ze šesti mužů ve věku 65 let a starších se během jeho života vyvine rakovina prostaty².

Součástí aktuálních diagnostických procesů u KP jsou také nádorové markery. Použití prostatického specifického antigenu (PSA) bylo doplněno stanovením poměru volné izoformy PSA (fPSA) ku celkovému PSA (%fPSA) v séru pacienta³⁻⁵ a hlavně stanovením p2PSA – prekursoru PSA, který je výrazně specifičtější pro karcinom prostaty než ostatní izoformy PSA. Kombinací výsledků těchto tří imunochemických testů (PSA, fPSA a p2PSA) se vypočítá tzv. PHI Index (Index Zdraví Prostaty). PHI Index výrazně zpřesňuje diagnostiku KP, zejména v tzv. šedé zóně hodnot PSA a velmi dobře koreluje s Gleason skóre a zvyšuje tak klinickou specifitu detekce KP^{6,7}.

Právě v této době, kdy jsou nemocnice nuceny zastavovat veškeré neakutní zákroky a neustále se přesouvají plánovaná operativní vyšetření, se role diagnostických nádorových markerů stává mnohem důležitější než kdykoliv předtím. PHI Index může zabránit zbytečným biopsiím, a tím kromě zlepšení komfortu pacienta, pomáhá uvolnit ruce již tak přetíženému zdravotnickému personálu.



V rámci osvěty a edukace pacientů i odborné veřejnosti, jsme ve spolupráci s Českou urologickou společností (ČUS) připravili sérii odborných seminářů na téma diagnostika KP. Chtěli bychom tak přispět ke zvýšení obecného povědomí a vyššímu zájmu odborné i laické veřejnosti o prevenci a v konečném důsledku i snížení mortality KP. Semináře jsou naplánovány již od března tohoto roku a měly by postupně zaznít ve všech krajích Čech a Moravy. Odbornou garancí nad semináři převzala ČUS a účast na nich bude ohodnocena kreditními body. Věříme, že se s mnohými z Vás na seminářích potkáme, i když teď z jara spíše virtuálně. Více informací naleznete na www.beckmancoulter.cz/phi nebo na webu ČUS (<https://www.cus.cz/pro-odborniky/akce/>).

Reference

- ¹ Daniyal M, Siddiqui ZA, Akram M, Asif HM, Sultana S, Khan A. Epidemiology, etiology, diagnosis and treatment of prostate cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(22):9575–8.
- ² Bashir MN. Epidemiology of prostate cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(13):5137–41.
- ³ Catalona WJ, Smith DS, Wolfert RL, et al. Evaluation of percentage of free serum prostate-specific antigen to improve specificity of prostate cancer screening. *JAMA* 1995; 274: 1214–20.
- ⁴ Catalona WJ, Southwick PC, Slawin KM, et al. Comparison of percent free PSA, PSA density, and age-specific PSA cutoffs for prostate cancer detection and staging. *Urology* 2000; 56: 255–60.
- ⁵ Mikolajczyk SD, Catalona WJ, Evans CL, et al. Proenzyme forms of prostate specific antigen in serum improve the detection of prostate cancer. *Clin Chem* 2004; 50(6): 1017–1025.
- ⁶ Lamy PJ, Allory Y, Gauchez AS, Asselain B, Beuzebec P, de Cremoux P, Fontugne J, Georges A, Hennequin C, Lehmann-Che J, Massard C, Millet I, Murez T, Schlageter MH, Rouvière O, Kassab-Chahmi D, Rozet F, Descotes JL, Rébillard X. Prognostic Biomarkers Used for Localised Prostate Cancer Management: A Systematic Review. *Eur Urol Focus*. 2018 Dec; 4(6): 790-803. doi: 10.1016/j.euf.2017.02.017.
- ⁷ NCCN Guidelines Version 1.2018, Prostate Cancer Early Detection, National Comprehensive Cancer Network, 2018.08

Index zdraví prostaty

VÁM POMŮŽE ROZHODNOUT

- výrazně zpřesňuje diagnostiku KP, zejména v tzv. šedé zóně hodnot PSA
- velmi dobře koreluje s Gleason skóre a zvyšuje klinickou specificitu detekce KP
- má široké využití v režimu aktivní surveillace
- přináší další rozhodovací kritérium pro lékaře
- snižuje počet zbytečných biopsií

RIZIKOVÉ
FAKTORY

PSA
TEST

PHI
INDEX ZDRAVÍ
PROSTATY

MONITOROVÁNÍ

BIOPSIE
PROSTATY

I ve složitých časech ...

MYSLEME NA PREVENCI

Test **phi** může pomoci rozhodnout, jestli zvýšené hodnoty PSA znamenají riziko rakoviny prostaty a jestli je nutné podstoupit biopsii.



Akce, na kterých se můžeme potkat,
naleznete prostřednictvím QR kódu
na průběžně aktualizovaných stránkách.



www.beckmancoulter.cz

Beckman Coulter
na komunitní síti LINKEDIN

