

VAKCINOLOGIE 2/2022

ČTVRTLETNÍK PRO PRAKTICKÉ LÉKAŘE, PEDIATRY, INFEKTOLOGY, VIROLOGY A MIKROBIOLOGY



Z OBSAHU

PŮVODNÍ PRÁCE (ORIGINAL PAPER)

Historie a proměny antivakcinačního hnutí
History and changes of the anti-vaccination movement

PŘEHLEDOVÉ ČLÁNKY (REVIEWS)

Očkování proti HPV infekci v těhotenství
HPV vaccination in pregnancy

Role vakcín v prevenci a léčbě nádorů hlavy a krku
The role of vaccines in the prevention and treatment of head and neck cancer

SARS-CoV-2 diagnostika pomocí RT-PCR
SARS-CoV-2 diagnosis using RT-PCR



Vaccinology

Ročník (Volume) 17, 2022, číslo (Number) 2

Šéfredaktor (Editor-in-Chief)

prof. MUDr. Roman Prymula, CSc., Ph.D.
LF UK Hradec Králové

Redakční rada (Editorial Board)

prof. RNDr. Vanda Boščíková, Ph.D.
FVZ UO Hradec Králové

MUDr. Hana Cabrnová, MBA
OSPDL, Praha

MUDr. Daniel Dražan
DD ordinace, Jindřichův Hradec
prof. MUDr. Roman Chlíbek, Ph.D.
FVZ UO Hradec Králové

doc. MUDr. Vilma Marešová, CSc.
Klinika infekčních, tropických a parazitárních nemocí
2. LF UK a FN Na Bulovce, Praha

prof. MUDr. Petr Pazdiora, CSc.
Ústav epidemiologie LF UK, Plzeň

doc. MUDr. Jan Smetana, Ph.D.
FVZ UO Hradec Králové

Mezinárodní redakční rada (International Editorial Board)

prof. Zsófia Mészner, M.D.
Národní ústav dětského zdraví, Budapešť, Maďarsko

prof. Vytautas Usonis, M.D.
Universita Vilnius, Vilnius, Litva

Odpovědný redaktor (Editor)

Mgr. Lukáš Malý
e-mail: ortopedie@eezy.cz

Vydavatel (Publisher)

EEZY Publishing, s.r.o.
www.eezy.cz

Grafika a technické zpracování (DTP)

Jan Borovka

Korektury (Copy Editor)

Mgr. Lukáš Malý

Obchodní oddělení (Advertising)

e-mail: kupcova@eezy.cz

DISTRIBUCE (Distributed by)

SEND Předplatné, spol. s r.o., Ve Žlábku 1800/77,
hala A3, 193 00 Praha 9
tel. 225 985 225, Mobil: 777 330 370
e-mail: mf@send.cz, www.send.cz

Smluvní vztah mezi vydavatelem a předplatitelem se řídí všeobecnými obchodními podmínkami pro předplatitele. Předplatné se automaticky prodlužuje.

Tisk (Printed by)

GRAFOTECHNA PLUS, s. r. o.

Všechny publikované články procházejí recenzí
(A peer-reviewed journal).

Číslo bylo předáno do tisku 31. 10. 2022.

Časopis je indexován v Embase a Scopus.

Časopis je excerpován v Bibliographia Medica
Čechoslovaca.

Časopis je zařazen Radou pro výzkum, vývoj a inovace
vlády ČR na Seznam recenzovaných neimpaktovaných
periodik vydávaných v České republice.

Vydavatel nese odpovědnost za údaje a názory
autorů jednotlivých článků.

Vydavatel a redakční rada nenesou odpovědnost
za obsah inzerátů ani jiných materiálů komerční povahy.

Současně si redakce vyhrazuje právo na drobné
stylistické úpravy článků. Reprodukce obsahu je
povolena pouze s přímým souhlasem redakce.

© EEZY Publishing, s.r.o., 2022

Evidenční číslo MK ČR: E 17165

ISSN 1802-3150

Vážení čtenáři, kolegové a kolegyně,

na dveře nám klepe neodbytně podzim a teploty nám klesají do chladnějších pásem. To nás bude nutit k těsnějším kontaktům, v letošním roce možná těsnějším než jindy, neboť redukce topení nás bude nutit zahřívát se vzájemně. Na to se již těší naše oblíbené mikroorganismy, a tak můžeme očekávat z tohoto hlediska opět zajímavou podzimní a zimní sezónu.

Covid-19 nezmizel v propadlišti dějin, jak jsme si všichni přáli, ale stále je tu s námi a bohužel o sobě dává vědět. V posledních dnech vidíme očekávané nárůsty pozitivních záchytů, ale i narůstající počty hospitalizovaných. Naštěstí počet závažných průběhů onemocnění příliš nestoupá. Protože nálada ve společnosti nepřeje plošnému používání roušek nebo respirátorů, dá se po dvou mírných sezónách očekávat i výrazný nástup chřipky. Zde nás čeká tradiční souboj o zvýšení proočkovanosti, která je u nás dlouhodobě hluboko pod 10 %, tedy násobně níže než v některých západních zemích. Také nás trochu děsil výskyt opičích neštovic. Celosvětově již máme 69 tisíc případů, naštěstí se však počáteční prudký nárůst zastavil a epidemie již výrazně klesá. To znamená, že přijímaná opatření mají výrazný dopad.

V uplynulých dnech jsme absolvovali tradiční výroční konferenci – Hradecké vakcinologické dny. Konal se již 17. ročník a s výjimkou doby covidové se uskutečnila každý rok. Konference se zúčastnilo na 350 delegátů, zároveň jsme přivítali i ministra zdravotnictví prof. Vlastimila Válka a hlavní hygieničku MUDr. Pavlu Svrčinovou. Měli jsme možnost diskutovat řadu sdělení s přímým dopadem do současné praxe. V diskuzích dominovala témata přeočkování u meningokokových onemocnění, úhrada vícevalentních vakcín proti pneumokokům, přeočkování u diptherie a polia a celá řada dalších. Do programu se vrátila i oblíbená sekce otázek a odpovědí.

S přáním klidného podzimu za redakční radu
prof. MUDr. Roman Prymula, CSc., Ph.D.





EDITORIAL.....65

PŮVODNÍ PRÁCE (ORIGINAL PAPER)

Historie a proměny antivakcinačního hnutí
History and changes of the anti-vaccination movement
Vanda Bošτίková, Václav Moravec68

PŘEHLEDOVÉ ČLÁNKY (REVIEWS)

Očkování proti HPV infekci v těhotenství
HPV vaccination in pregnancy
Borek Sehnal, Jiří Sláma, Jiří Vojtěch74

Role vakcín v prevenci a léčbě nádorů hlavy a krku
The role of vaccines in the prevention and treatment of head and neck cancer
Stanislav Batko80

SARS-CoV-2 diagnostika pomocí RT-PCR
SARS-CoV-2 diagnosis using RT-PCR
Barbora Macúchová, Vanda Bošτίková, Hana Bílková Fránková86

NOVINKY VE VAKCINOLOGII (NEWS IN VACCINOLOGY)

Využití biofilmů pro design a přípravu očkovacích látek – technologie 21. století
Use of biofilms for vaccine design and preparation – 21st century technology
Vanda Bošτίková, Michaela Hympánová, Hana Straková, Jan Marek98

Historie a proměny antivakcinačního hnutí

History and changes of the anti-vaccination movement

Vanda Boščíková,^{1,2} Václav Moravec³

¹Katedra epidemiologie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany, Hradec Králové

²Fakulta sociálních studií, Univerzita Karlova, Praha

³Katedra žurnalistiky, Fakulta sociálních věd, Univerzita Karlova, Praha

Souhrn

Ačkoli termín „antivax“ je termínem novodobým, odpor k očkování se projevuje dlouhodobě. První kroky odmítačů očkování byly zaznamenány v době, kdy anglický lékař Edward Jenner zavedl vakcínu proti pravým neštovicím a očkovací kampaň vedla k dosud jediné úspěšné eradikaci vysoce nebezpečného, životy ohrožujícího virového onemocnění. Je dobře známo, že očkování je celosvětově nejbezpečnější a nejúčinnější metodou prevence řady infekčních chorob. Lidé, kteří jsou proti očkování, bohužel představují nezanedbatelnou část světové populace. Hnutí proti očkování mají nejen negativní vliv na kolektivní očkování, například na pokles proočkovanosti, ale dnes již také ovlivňují rozhodovací procesy. Ve světle rostoucího počtu antivakcinačních skupin by tento fenomén neměl být podceňován a brán jen jako pouhá reakce odporu proti vakcínám, ale měl by být podrobně, transdisciplinárně studován, aby mu bylo možno co nejúčinněji čelit.

Klíčová slova: infekční choroby, očkování, vakcíny, antivakcinační hnutí, dezinformace, Edward Jenner, pravé neštovice

Summary

Although the term “antivax” is a modern term, opposition to vaccination has been around for a long time. The first steps by vaccine rejectionists were recorded when the English physician Edward Jenner introduced the smallpox vaccine and the vaccination campaign led to the only successful eradication of the highly dangerous, life-threatening viral disease to date. It is well known that vaccination is the safest method of preventing many infectious diseases worldwide. Unfortunately, people who oppose vaccination represent a significant proportion of the world’s population. The anti-vaccination movements not only have a negative impact on collective vaccination, for example on the decline in vaccination coverage, but are now also influencing decision-making processes. In the light of the growing number of anti-vaccine groups, this phenomenon should not be underestimated and treated as a mere reaction against vaccines, but should be studied in detail in a transdisciplinary manner in order to counter it as effectively as possible.

Keywords: infectious diseases, vaccination, vaccines, antivaccine movement, misinformation, Edward Jenner, smallpox

Vakcinologie 2022;17(2):68–72

Úvod

Navzdory stále se rozšiřujícímu spektru léků, ať už antibiotik, či antivirotik, jsou infekční choroby stále v centru pozornosti. Jejich původci nerozeznávají hranice mezi jednotlivými státy, nerespektují kontinenty, nelze proti nim bojovat pouze na místní či národní úrovni. I v první polovině 21. století se všemi dostupnými vědeckými poznatky a technologiemi jsme svědky drama-

tického nárůstu infekčních onemocnění a rozšiřování jejich ohnisek.

Cestování, migrace obyvatelstva či změny klimatu jsou jen některé ze současných známých faktorů, které se podepisují na měnícím se a viditelně se rozšiřujícím spektru infekčních nemocí nejen v Evropě, ale na celé naší planetě.

S postupujícím oteplováním Země se pro populaci žijící v oblastech mírného pásu stávají stále aktuálnějšími některá onemocnění, která byla dosud

typická pro oblasti tropů a subtropů. Stále častěji se v souvislosti se široce rozvinutou turistikou diskutuje také problematika přenosu vysoce nebezpečných nálezů mimo původní typické oblasti jejich výskytu (1).

Jako v mnoha dalších obdobných situacích i v této problematice infekčních chorob a jejich šíření vidíme nezaměnitelný negativní a velmi znepokojivý dopad jednotlivých typů informačních poruch, v čele s dezinformacemi a misinformacemi neboli

informačním chaosem. Zatímco první pojem odkazuje na záměrně šířené nepravdivé zprávy a informace motivované ekonomickými, ideologickými či politickými cíli, druhý předpokládá nezáměrnou a nevědomou distribuci (2, 3). Nástup síťových digitálních médií (především webu 2.0 a sociálních sítí) na počátku nového tisíciletí výrazně zdynamizoval šíření dezinformací, potažmo zvýšil potenciál obav veřejnosti z možných vedlejších účinků očkování, což se odrazilo v počtech očkováných jedinců v populaci. Rodiče jsou v digitální mediální krajině poměrně často vystaveni negativním či nepravdivým zprávám o vakcínách. Ač byl nechvalně známý případ tvrzení o kauzální spojitosti mezi vakcínou MMR (kombinovaná vakcína proti spalničkám, příušnicím a zarděnkám) a autismem rozsáhle prověřován a odborně vyvrácen, publikace na toto téma stažena z renomovaného časopisu, přesto zmiňovaná kauza nadále zůstává součástí antivakcinační propagandy (2, 4).

Historie antivakcinačního hnutí od jeho počátků v 18. století

Z historického pohledu tu byli odpůrci očkování již v 18. století a argumenty, jež předkládali veřejnosti před více

než dvěma sty lety, se příliš nelišily od těch současných. Již na samém počátku antivakcinačního hnutí stálo promyšlené využívání nástrojů mediální komunikace tehdejší doby, zprvu letáků, pohlednic či novin. Kupříkladu na jednom z letáků (obr. 1), který byl vydán v USA v roce 1807, můžeme číst: „Toto monstrum pojmenované jako očkování přispívá k postupné devastaci lidí a jeho řádění je strašné a velmi znepokojující.“

Počátky očkování – historie očkování proti pravým neštovicím

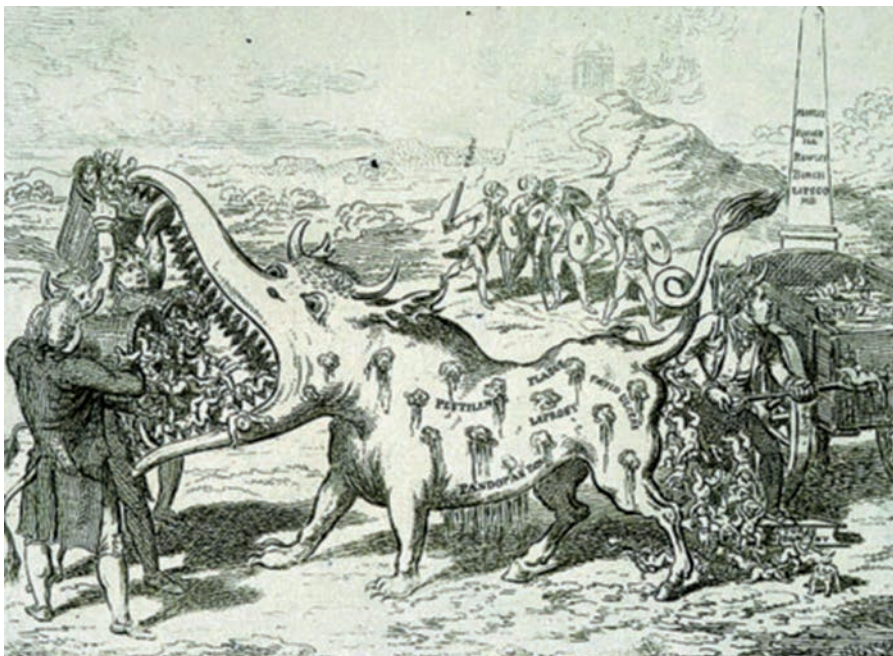
Virus pravých neštovic vyvolával onemocnění, které devastovalo lidstvo od dob starověké egyptské říše. Trvalé oslepnutí po prodělání onemocnění bylo relativně velmi běžným následkem u přeživších. Postupně si lidstvo uvědomilo, že pokud infikovaná osoba přežila první infekci, tak se jí další epidemická vlna nedotkla. Lékaři na Blízkém východě začali své pacienty vystavovat tekutině odebrané z neštovičných lézí a viděli, že závažnost a komplikace onemocnění jsou u takto exponovaných lidí výrazně nižší než u naivní populace (5).

Manželka britského diplomata Mary Wortley Montagu se při svém pobytu v Cařihradě seznámila s me-

todou boje proti pravým neštovicím technikou inokulace. Ještě v době pobytu rodiny v Osmanské říši ji dala aplikovat u svého syna Edwarda. Po návratu do Anglie nechala tato osvícená aristokratka projít stejným procesem i dceru. To inspirovalo tehdejší princeznu z Walesu ke stejnému postupu u svých dvou dcer. Anglie se vzápětí rozdělila na dva tábory, které si spojily zdravotnický úkon s politikou. První skupina sympatizující s vládou a jejími představiteli tuto metodu uznávala a oceňovala. Naopak odmítači vytvořili tábor, který neuznával vedoucí představitele země a s nimi i tento zdravotnický úkon (2, 5).

Edwardu Jennerovi je připisováno zjištění, že dojičky mléka zřidkakdy onemocněly pravými neštovicemi. Jedním ze zásadních komplimentů ženám pak byla v Anglii v 17. století věta: „Vaše pokožka je hladká jako pleť dojičky.“ Jenner ze svých pozorování vyvodil, že prodělání kravských neštovic chrání člověka před nákazou pravými neštovicemi a zavedl metodu infikování člověka materiálem z postel kravských neštovic. Pro svůj obvod pacientů zřídil očkovací kliniky, kam mohli přijít z ulice ti nejchudší, kteří si nemohli dovolit běžnou návštěvu lékaře (5, 6).

18. století bylo poznamenáno pustošivým vlivem epidemických vln zmiňovaného onemocnění. Každoročně umíralo na půl milionu pacientů. Během tohoto období zemřeli na pravé neštovice čtyři evropské panovníci a tolik dědiců Habsburského trůnu, že se opakovaně měnila dědičná linie. Španělský král Karel IV. po seznámení se s Jennerovou metodou nařídil v roce 1798 svým dekretem povinné očkování v celé zemi. V roce 1800 byla většina španělského obyvatelstva úspěšně očkována proti pravým neštovicím. Nicméně tento zdravotnický problém nadále sužoval španělské zámořské kolonie, kde zásadně snižoval hospodářskou produktivitu a ohrožoval tak ve svém důsledku centrální stát. Onemocnění bylo zodpovědné za nízké výnosy, ekonomika chřadla a státní pokladna zela prázdnotou. Proto se španělský král rozhodl pro zásadní vakcinační kampaň ve španělských koloniích – první program



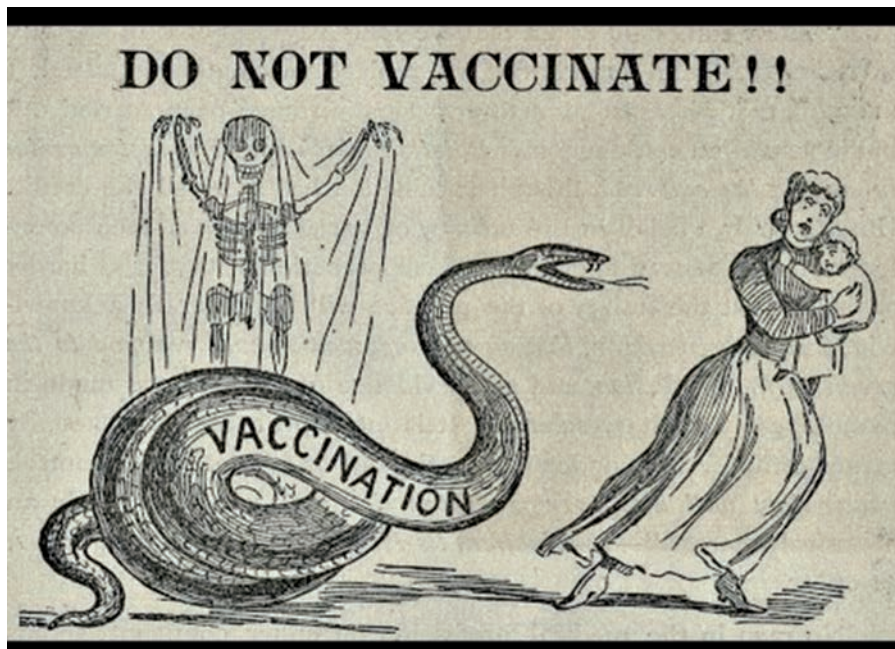
Obr. 1 Historická ilustrace pocházející z roku 1807, z letáku nabádajícího proti očkování. Zdroj: <https://www.minnpost.com/second-opinion/2015/07/100-plus-year-history-anti-vaccination-movement>

podpory veřejného zdraví byl na světě (5–7).

V letech 1803 až 1806 se uskutčnila Balmisova-Salvanyho expedice. Směřovala na Kanárské ostrovy, Portoriko, do Venezuely, Kolumbie, Ekvádoru, prošla Peru, Bolívií, Chile, Mexiko. Očkovací týmy pracovaly na Filipínách a v Číně. Povinnou očkovací kampaň v koloniích koordinoval vojenský lékař Xaviere de Balmis, původem z Valencie, za pomoci Katalánce Josepa Salvanyho. Za očkování se neplatilo, bylo poskytováno zdarma. Problémem bylo, jak do kolonií dopravit životaschopnou vakcínu. A byl to opět Edward Jenner, kdo předešel moderní farmaceutické technologii. Přišel s procesem fixace infekčního materiálu na podložní mikroskopická sklíčka uzavřená do parafínu. Nicméně se ukázalo, že tento způsob uchování očkovacího infekčního materiálu nebyl pro dlouhou cestu dostatečně efektivní. Španělské úřady se proto přiklonily k původní Jennerově vakcinační metodě, předávání viru „z paže do paže“ (7, 8).

V průběhu historie bylo nahlíženo na dvě skupiny obyvatelstva jako na postradatelné osoby – vězně a sirotky. Pro přepravu viru v lidském inkubátoru byli španělskou vládou určeni sirotci. Na rozdíl od dospělých a vězňů zabrali na lodích méně místa, snědli méně jídla a nebylo zapotřebí se o ně starat v režimu vojenského dozoru. Péče a dohled nad sirotky byla svěřena jeptiškám. V případě Balmisovy-Salvanyho expedice šlo o 22 dětí. S požehnáním španělské katolické církve, Královské lékařské společnosti a králova dekretu se tito sirotci stali prvními biomedicínskými „*in vivo* kontejnery“ přepravujícími biologické agens. Virus byl životaschopný čtyři až deset dnů, plavba trvala týdny, proto se na palubě plavilo právě 22 sirotků, kteří byli postupně očkováni. Po cestě koloniemi pak byli vybíráni místní sirotci, ti původní buď v koloniích zůstali, nebo se vrátili zpět do Španělska na základě předem uzavřené dohody (7, 8).

Není bez zajímavosti, že vůči expedici byly ve své době vznášeny námitky náboženského charakteru, stejně jako se konaly protesty proti finanční



Obr. 2 Historická kresba z roku 1894 nabádající k odmítnutí očkování. Zdroj: https://www.researchgate.net/publication/346845872_Disinformation_and_Conspiracy_Theories_in_the_Age_of_COVID-19

náročnosti akce, ale nikdo se nezabýval expedicí z hlediska etiky a nenařadil fakt využití sirotků coby „živých inkubátorů“ (6, 8–10).

Antivakcinační hnutí na přelomu 19. a 20. století

Dne 9. října 1869 byl v odborném časopise *British Medical Journal* publikován úvodník nazvaný *The AntiVaccination Agitators*. Text pojednával mimo jiné o obavách odborné komunity před antivakcinačními náladami části obyvatel, vyznačujících se „pošetilostí a nevědomostí, kteří bojují proti jednomu z nejpřínosnějších objevů, které byly kdy uvedeny do lékařské praxe“.

Antivakcinační hnutí začalo britskou společností sužovat natolik, že v roce 1910 Sir William Osler vyhlásil, že osobně zaplatí náhrady a pohřby všem odmítačům očkování, kteří podstoupí očkování a zemřou (nenašel se žádný příbuzný, žádná rodina, která by tento nárok uplatnila).

Odpor k vakcínám se projevoval v několika rovinách. V první řadě v rovině finanční. Bylo vznášeno množství skeptických a teologických argumentů, stejně jako právních a politických (4, 9). V polovině 19. století přijala Velká Británie zákon ukládající rodi-

čům povinnost očkovat své děti proti pravým neštovicím. Odpovědí antivakcinačních aktivistů bylo vytvoření Ligy proti očkování, která opět využívala efektivitu tehdejších forem mediální komunikace, tedy letáků, brožur a novin (obr. 2). Motem jejich snažení bylo chránit svobodu britského lidu, kterou příslušný parlamentní zákon dle jejich názoru napadl a popřel. Tlak Ligy proti očkování vedl k ústupku ve formě beztrestnosti rodičů, pokud povinné očkování svých dětí odmítnou (10, 11).

Současnost antivakcinačního hnutí

Dnes je situace jiná, především v USA, kde je jednoznačně požadováno a kontrolováno očkování dětí při nástupu a v průběhu jejich školní docházky, stejně jako ve všech licencovaných zařízeních zabývajících se péčí o děti a dospívající. Tato nařízení tradičně přispívají k udržení tzv. stádní imunity. V posledních letech je nicméně i v této zemi vyzorován negativní dopad nárůstu udělování výjimek z očkování, a to v důsledku víry či osobního přesvědčení.

Tomuto jevu přičítá americké CDC (Centers for Disease Control and Prevention), na základě svých šetření a analýz dat ve spolupráci se zdravotní pojišťovnou Kaiser Permanente,

rozvoj jedné z nejhorších epidemií spalniček na území USA, která nastala v roce 2019. I proto například senát státu Kalifornie schválil návrh zákona (SB-276), který zpřisňuje kalifornský školní imunizační zákon. Odpůrci zákona charakterizovali normu jako bezprecedentní a nebezpečné narušení osobní svobody rodičů a jejich dětí. Část nejradičalnějších antivakcinačních agitátorů jej pak neváhala označit za „zákona proti lidskosti“ (10, 12–14).

Současné antivakcinační hnutí se velmi často opírá – jak bylo popsáno v úvodu článku – o zneplatněnou studii publikovanou v roce 1998 britským lékařem Andrewem Wakefieldem v celosvětově uznávaném prestižním časopise Lancet. Časopis Wakefieldův článek o spojitosti mezi očkováním vakcínou MMR a autismem v roce 2010 stáhl, nicméně dvanáct let debat o zneplatnění studie zasadilo tvrdou ránu důvěryhodnosti odborných prací z pohledu laické veřejnosti.

Jak pracovat se současným naladěním části laické veřejnosti proti očkování – příklady z USA

Opakovaně bývá ze strany odborníků upozorňováno na absurdnost současné situace. Právě proto, že očkování je tak úspěšné, vymizela z paměti lidí povědomost o projevech závažných infekčních onemocnění (12, 14–16). Americké CDC se daným problémem zabývá velmi podrobně. Využívá dotazníkové průzkumy, sociologické studie, interní, vysoce odborné online školicí semináře pro pracovníky jednotlivých států Unie ve veřejném zdravotnictví zaměřené na přímou i nepřímou (online) komunikaci jak se skupinami odmítačů, tak jednotlivými vůdčími představiteli těchto názorových skupin.

Všichni zmiňovaní pracovníci ve zdravotnictví jsou pravidelně školeni v otázkách: „Jak komunikovat s rodiči o přínosech vakcín oproti potenciálním rizikům dětské populace?“ či „Jak se orientovat v éře informačního chaosu, jehož nedílnou součástí jsou dezinformace na sociálních sítích?“

CDC klade v očkovacím procesu mimo jiné důraz na aktivní spoluúčast a význam lékárníků. Náplň jejich prá-

ce nově nepředstavuje „jen“ distribuci a prodej očkovacích látek. Úloha lékárníků stejně jako zdravotních sester a lékařů zde spočívá i v samotném poskytování rutinního očkování v komunitních lékárnách, školách, ordinacích a dalších zařízeních, stejně jako v aktivní práci na poli osvěty v oblasti veřejného zdraví.

Autoři studií publikovaných ve Spojených státech amerických, které mapovaly mediální prostor i názory konkrétních zastánců antivakcinačních idejí a nálad, dospěli ve spolupráci se CDC k návrhu souboru opatření. Zahrnují potřebu rozhovorů s konkrétními lidmi, a to jednotlivě, případ od případu, a v komunikaci a argumentaci také zapojení nejen odbornosti, ale i osobního přístupu a snahy o detailní vysvětlování. Kromě objasňování principů a mechanismu očkování se dále ukazuje jako nezbytné se také zaměřit na hodnotový rámec a otázky etiky; konkrétními důkazy se snažit podpořit důvěru ve zdravotnictví a zdravotnické pracovníky; analyzovat a vysvětlovat skutečná rizika očkování, nikoli ta, která se virálně šíří dezinformacemi (17–19, 22). Dále se ukazuje jako účinné a efektivní budovat vztahy v rámci komunit ve fyzickém prostoru, což může být jedna z reakcí na fragmentovanou a afektivní komunikaci v prostředí síťových digitálních médií. Posilovat mediální gramotnost populace a iniciovat porozumění a spolupráci mezi farmaceutickým průmyslem, poskytovateli zdravotní péče a širokou veřejností. Povzbudit lékaře, aby naslouchali obavám svých pacientů, aniž by odsuzovali zdroje jejich obav a neobornost názorů. Vysvětlovat obzvláště rodičům malých dětí co nejcitlivěji a s maximální empatií danou problematiku. Možná se nám pak v důsledku takto soustředěného úsilí podaří eradikovat i další závažná infekční onemocnění, nejen právě neštovice (20, 21).

Závěr

Dostat šíření infekčního onemocnění pod kontrolu očkováním nelze na základě jednotek očkovanych jedinců, ale tím, že bude na určité úrovni proočkována populace jako celek. Jedině

tak dosáhneme „stádní imunity“, jež zamezuje šíření infekčního agens na přič populací. Každý z nás je článkem, součástí tohoto jevu, takže tím pádem není zodpovědný jen sám za sebe, ale nese svým chováním zodpovědnost k populaci jako celku. Jinými slovy, pokud rodiče neočkují své děti proti dětským nemocem z přesvědčení, pak tyto neočkované děti chrání imunita jejich proočkovaného okolí, ale ony samy představují riziko pro své okolí a ohrožují populační imunitu jako takovou. A co více, ohrožují ty jedince, kteří se nemohou očkovat ze zdravotních důvodů. Na odlišnost náhledu na problém mezi americkou a evropskou veřejností velmi výstižně poukazuje obecně přijímaný názor většiny amerických občanů, kteří považují za svoji morální povinnost příslušníků globální komunity podílet se pozitivním přístupem k očkování na snížení dětské úmrtnosti a posilování veřejného zdraví.

V současnosti je více než zřejmé, že je zapotřebí důsledně odpovědět na celosvětově stoupající antivakcinační hnutí, jež těží z informačního chaosu v prostoru síťových digitálních médií. Jedním ze způsobů, jak napomoci kvalitní a efektivní spolupráci mezi poskytovateli zdravotní péče, výrobci vakcín a širokou veřejností, je nepochybně podpora a realizace účinnější, vědecky ověřené a podložené sociální komunikace, v čele s mediální. Konstruktivní komunikační strategie mohou napomoci obnovit důvěru v lékařské autority a úspěšně bojovat proti nepravdivým či nepřesným narativům placených celebrit a pochybných platforem v prostoru síťové digitální komunikace (4, 6).

Podporováno projektem Central European Digital Media Observatory (CEDMO), 2020-EU-IA-0267.

Literatura:

1. Bostikova V, et al. Hemorrhagic fever: Epidemiology, Clinical Manifestations, and diagnosis. Canada: NOVA, 2015.
2. Louten J. Essential human virology. 1st ed. Kennesaw. GA: Elsevier Inc, 2017.
3. Wardle C. The need for smarter definitions and practical, timely empirical research on information disorder. Digital Journalism. 2018;6(8):951–963.

4. Fine P, Mulholland K. Community immunity. In: Plotkin S, Orenstein W, Offit P, eds. *Vaccine*. 6th ed. Philadelphia: Saunders, 2012, pp. 1395–1412.
5. Sleha R, et al. From Jenner to modern vaccines. *Vakcinologie*. 2015;9(3):139–143.
6. Riedel S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Baylor Univ Med Cent Proc*. 2005;18(1):21–25.
7. Oldstone M. *Viruses, Plagues & History*. New York: Oxford University Press, 1998.
8. Franco-Paredes C, et al. The Spanish royal philanthropic expedition to bring smallpox vaccination to the New World and Asia in the 19th century. *Clin Infect Dis*. 2005;41(9):1285–1289.
9. Henderson D, et al. Smallpox and vaccinia. In: Plotkin S, Orenstein W, Offit P, eds. *Vaccines*. 5th ed. Philadelphia: Saunders, 2008, pp. 773–803.
10. Religious conviction and the Boston inoculation controversy of 1721. Available from: <https://scholarworks.wm.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1409&context=historstheses>.
11. Downs J, et al. Parents' vaccination comprehension and decisions. *Vaccine*. 2008;26:1595–1607.
12. Pan R. *Immunizations: Medical exemptions*. California, 2019. Available from: https://leginfo.legislature.ca.gov/faces/TextClient.xhtml?bill_id=2019202005B276.
13. Gutierrez M, Karlamangla S. Opponents call it a “crime against humanity”, but vaccine bill moves forward. *Kaiser Health News*. Available from: <https://khn.org/morning-briefing/thursday-april-25-2019>.
14. May T, Silverman R. Clustering of exemptions as a collective action threat to herd immunity. *Vaccine*. 2003;21(11-12):1048–1051.
15. Kortum P, et al. The impact of inaccurate Internet health information in a secondary school learning environment. *J Med Internet Res*. 2008;10:e17.
16. Campbell J. Anti-vax group defends comparing immunisation to rape. *Northern Star*. Available from: <https://www.northernstar.com.au/news/anti-vax-group-defends-comparing-immunisation-rape/2617477>.
17. Andre F. Vaccinology: past achievements, present roadblocks and future promises. *Vaccine*. 2003;21(7-8):593–593.
18. Pires MA, et al. Antivax movement and epidemic spreading in the era of social networks: Nonmonotonic effects, bistability, and network segregation. *Phys Rev E*. 2021;104(3-1): 034302.
19. Kata A. Anti-vaccine activists, Web 2.0, and the postmodern paradigm – An overview of tactics and tropes used online by the antivaccination movement. *Vaccine*. 2012;30(25):3778–3789.
20. Phadke V, et al. Association between vaccine refusal and vaccine-preventable diseases in the United States. *JAMA*. 2016;315(11):1149.
21. Andre FE, et al. Vaccination greatly reduces disease, disability, death and inequity worldwide. *Bulletin of World Health Organisation*. 2008;86(2):140–146.
22. Jaiswal J, Halkitis PN. Towards a more inclusive and dynamic understanding of medical mistrust informed by science. *Behav Med*. 2019;45(2):79–85.

Korespondující autorka:
prof. RNDr. Vanda Boščíková, Ph.D.
 Katedra epidemiologie
 Fakulta vojenského zdravotnictví
 Univerzita obrany
 Třebešská 1575
 Hradec Králové, 500 01
 Tel.: 973 253 128
 E-mail: vanda.bostikova@unob.cz

Očkování proti HPV infekci v těhotenství

HPV vaccination in pregnancy

Borek Sehnal,¹ Jiří Sláma,² Jiří Vojtěch²

¹Gynekologicko-porodnická klinika, Fakultní nemocnice Bulovka
a 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha

²Gynekologicko-porodnická klinika 1. lékařské fakulty a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze

Souhrn

Infekce lidským papilomavirem (HPV) je nejčastější sexuálně přenosnou infekcí. Přetrvávající HPV infekce je opakovaně spojována s rozvojem anogenitálních a orofaryngeálních karcinomů a také genitálních bradavic. Prevalence HPV infekce se zdá být dvakrát vyšší u těhotných ve srovnání s netěhotnými ženami. Navíc různé studie naznačují negativní účinek infekce HPV na průběh a komplikace těhotenství. Dosud byly po celém světě podány miliony dávek vakcíny proti HPV. K neúmyslnému podání vakcíny proti HPV během těhotenství dochází proto, že hlavními příjemkyněmi vakcíny jsou fertilní mladé ženy, které o svém těhotenství v čase vakcinace často neví. Očkování proti HPV není v současnosti v těhotenství doporučeno a nebylo schváleno. V případě těhotenství se doporučuje aplikaci zbývajících dávek vakcíny odložit na dobu po porodu. Na druhou stranu, podle současných vědeckých poznatků neexistují žádné důkazy spojující očkování proti HPV v těhotenství nebo před těhotenstvím s nepříznivými výsledky těhotenství. Po očkování proti HPV v graviditě nebyl zjištěn zvýšený výskyt vrozených vývojových vad plodu a umělé ukončení těhotenství není v takovém případě opodstatněné.

Klíčová slova: lidský papilomavirus, HPV vakcinace, těhotenství, těhotenské komplikace, porodnické výsledky

Summary

Human papillomavirus (HPV) infection is the most common sexually transmitted infection. Persistent HPV infection has been repeatedly associated with the development of anogenital and oropharyngeal cancers and genital warts. The prevalence of HPV infection appears to be twice as high in pregnant persons compared to non-pregnant persons. In addition, various studies suggest a negative effect of HPV infection on the course and complications of pregnancy. To date, millions of doses of HPV vaccine have been administered worldwide. Unintentional administration of the HPV vaccine during pregnancy occurs most often in fertile young women, who are often unaware of their pregnancy at the time. The HPV vaccine has not been approved for pregnant persons and is therefore not recommended. If unintentionally administered during pregnancy, it is recommended to delay the remaining doses of the vaccine until after delivery. On the other hand, according to current scientific evidence, there is no link between HPV vaccination before or during pregnancy and adverse pregnancy outcomes. No increased incidence of fetal birth defects has been observed after vaccination and termination of pregnancy is not warranted in this case.

Keywords: human papillomavirus, HPV vaccination, pregnancy, pregnancy complications, obstetric outcomes

Vakcinologie 2022;17(2):74–79

Úvod

Lidský papilomavirus (*human papillomavirus*, HPV) zahrnuje skupinu malých neobalených dvouřetězcových DNA virů *Papillomaviridae*. HPV je celosvětově nejčastější sexuálně přenosná lidská infekce, která postihne alespoň jednou

za život 75–80 % sexuálně aktivních jedinců. Existuje více než 200 HPV genotypů, fylogeneticky jsou papilomaviry seskupeny do 53 rodů, z nichž pět je infekčních pro člověka: α (alfa), β (beta), γ (gama), μ (mí) a ν (ný) (1).

HPV se přenáší běžným kontaktem mezi kůží a sliznicemi, nejčastěji bě-

hem koitálních a nekoitálních sexuálních aktivit, přenos se může uskutečnit i pomocí sexuálních pomůcek nebo autoinokulace (tzn. přenos mezi různými anatomickými lokalitami vlastní rukou infikované osoby) (2, 3). HPV infekce napadá přes drobné defekty epitel kůže a sliznice a anogenitální a orofarynge-

ální oblasti. Pod vlivem vysoce rizikových genotypů HPV mohou vzniknout maligní nádory anogenitální oblasti a některé nádory hlavy a krku, níže rizikové genotypy způsobují benigní bradavice lokalizované hlavně na genitálu s velmi vysokou incidencí.

Životní cyklus viru probíhá v epitelu infikovaného orgánu, většina infekcí je přechodná. Infekce není provázena viremii a jen část infikovaných jedinců vytvoří detekovatelné specifické protilátky proti konkrétnímu HPV genotypu (2, 3). Nízké hladiny protilátek často nechrání proti opakované infekci, reinfekce dokonce i stejným genotypem HPV může probíhat za velmi podobných podmínek, jaké jsou u HPV „naivních“ jedinců (2).

HPV infekce v těhotenství

Ve většině publikovaných studiích byla nalezena vyšší prevalence HPV infekce u těhotných žen ve srovnání s netěhotnými. Navíc bylo prokázáno, že „clearance“ HPV je během těhotenství snížena a vysoká virová nálož s dlouhodobou perzistencí virů spolu s přirozeně sníženou imunitou v graviditě podporuje potenciální negativní vliv HPV infekce (4). Většina prací na těhotných ženách studovala infekci v děložním hrdle (5), ale HPV DNA infekce byla detekována také v placentě (6), plodové vodě (7) a pupečnickové krvi (8). Poměrně velké množství prací poukazuje na negativní vliv perzistující HPV infekce na průběh gravidity. You et al. prokázali, že aktivní infekce HPV snižuje počet trofoblastů a také snižuje jejich schopnost adheze k buňkám deciduy, čímž podporuje spontánní potrat plodu (9). Boulenouar et al. hodnotili reakci trofoblastických buněčných linií na virové onkogeny E5, E6 a E7 a vyzorovali výrazně sníženou schopnost růstu a adheze těchto buněk (10).

Ambühl et al. ve svém systematickém review poukázali na vyšší prevalenci HPV u žen se spontánním potratem ($p < 0,05$) i s předčasným porodem ($p < 0,0001$) (11). Tyto výsledky jsou v souladu s dřívějšími studii, kde byl detekován vyšší výskyt HPV u spontánních potratů ve srovnání s umělými potraty (12, 13).

Jiné studie přinesly opačné výsledky: Conde-Ferráezová et al. nenašli žádnou souvislost mezi cervikální HPV infekcí a rizikem spontánního potratu (14). Publikované studie tedy uvádějí protichůdné výsledky. Zatímco někteří autoři nevyzorovali žádný negativní vliv, jiní zdůrazňovali různé nepříznivé důsledky HPV infekce, jakými jsou předčasný porod (15), spontánní potrat (16), předčasný odtok plodové vody (17), hypertenze v graviditě (18), fetální růstová restrikce (19), porod novorozence s nízkou porodní hmotností (20) a také intrauterinní úmrtí plodu (18). Jednotlivé studie se ale výrazně liší v metodice, sledovaných parametrech a velikosti studované populace.

Podle metaanalýzy z roku 2014 je riziko předčasného porodu u HPV pozitivních těhotných žen dvakrát vyšší než u HPV negativních žen (21). Také kohortová studie HERITAGE na 899 těhotných ženách potvrdila významně vyšší riziko předčasného porodu při perzistující HPV infekci vysoce rizikovými (high-risk) genotypy (22). Retrospektivní kohortová studie na 2 153 těhotných ženách odhalila, že předčasný porod při infekci HPV nastupuje často v důsledku předčasného odtoku plodové vody (23). V roce 2021 byla publikována retrospektivní analýza 1 044 023 nulipar před porodem ze švédského populačního registru (24). Přítomnost HPV infekce byla definována jako rizikový faktor pro předčasný porod ($p = 0,042$), předtermínový předčasný odtok plodové vody ($p < 0,001$), předčasný odtok plodové vody v termínu porodu ($p = 0,002$) a také pro neonatální mortalitu ($p = 0,011$) (24). Přestože výsledky vyznívají poměrně jednoznačně, kontroverze v této oblasti přetrvávají. Komplexní závěry všech prací nejsou zcela přesvědčivé, ale výsledky velkých kohortových studií svědčí pro vliv HPV infekce na riziko spontánního potratu, předčasného odtoku plodové vody a předčasného porodu (1).

Vakcinace těhotných žen

V současnosti jsou na trhu tři komerčně vyráběné profylaktické vakcíny proti HPV infekci – bivalentní

Cervarix (HPV 16, 18), kvadrivalentní Gardasil (dříve Silgard) (HPV 6, 11, 16, 18) a nonavalentní Gardasil 9 (HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 53, 58). Standardně se všechny HPV vakcíny aplikují v třídávkovém očkovacím schématu, ideálně během šesti měsíců. V České republice je HPV vakcinace hrazena od 1. dubna 2012 pro dívky a od roku 2018 také pro chlapce ve věku 13 až 14 let z prostředků veřejného zdravotního pojištění (3). Všechny tři vakcíny jsou bezpečné, vysoce imunogenní a účinné proti perzistující HPV infekci a HPV asociovaným onemocněním (3).

Vzhledem k tomu, že vakcína může být aplikována během celého reprodukčního života ženy, může dojít k neúmyslné imunizaci buď během těhotenství, nebo těsně před ním (1). Problém HPV vakcinace v těhotenství je tedy žhavým tématem ve světě imunologie, virologie a každodenní gynekologicko-porodnické praxe kvůli obavám o bezpečnost pro průběh gravidity a pro nenarozený plod. Toto téma je aktuální i vzhledem k tomu, že procento neplánovaných těhotenství se celosvětově pohybuje mezi 18 a 47 % v závislosti na regionu (25). Jelikož studie na těhotných ženách nejsou z etického hlediska možné, nebylo podání HPV vakcín těhotným ženám schváleno. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO, World Health Organization), Evropské komise pro zdravotnictví (EMA, European Medical Evaluation Agency), Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv v USA (FDA, Food and Drug Administration), Kanadského poradního výboru pro imunizaci (CACI, Canadian Advisory Committee on Immunization) a výrobců vakcín se v současnosti očkování proti HPV během těhotenství nedoporučuje (26). Nicméně výzkum, který pro regulační účely provedli výrobci vakcín proti HPV, odhalil, že frekvence a typ nežádoucích reakcí po HPV vakcinaci byl u těhotných žen srovnatelný s běžnou populací.

Nejvíce dat je k dispozici o riziku spontánního potratu po HPV vakcinaci v graviditě (27–30). V analýze celkového počtu 8 092 těhotných žen z několika studií, které obdržely HPV

vakcínu, potratilo 1 119 žen, což odpovídalo míře potratovosti od 6,6 % (29) do 18,2 % (30). Žádná ze studií ve svých analýzách nezjistila všeobecně významně vyšší riziko spontánního potratu po HPV vakcinaci. Při analýze dalších faktorů (věk těhotných, interval početí od HPV vakcinace, počet aplikovaných dávek) pouze jedna studie zaznamenala vyšší riziko potratu (14,7% vs. 9,2%, $p = 0,031$) (28). Nicméně autoři této studie konstatují, že přestože tento výsledek může vzbuzovat obavy, nejspíše se jedná o chybu malých čísel. Navíc velkou limitací této studie byl fakt, že ve své kalkulaci rizika spontánního potratu nebrala v úvahu důležité proměnné, jako je parita, rasa těhotných nebo socioekonomický status, které mohly výsledky výrazně ovlivnit (28).

Práce, která analyzovala 18 296 hlášení ze systému VAERS (Vaccine Adverse Event Reporting System) po podání kvadrivalentní HPV vakcíny u žen ve Spojených státech v letech 2006 až 2013, vyselekovala 1 572 (0,1 %) hlášení, která se týkala podání u těhotných žen s průměrným věkem 17 let (31). Z definitivní analýzy bylo vyloučeno celkem 1 188 hlášení od výrobce vakcíny a dalších 237 z jiných důvodů. Zbýlých 147 hlášení, která byla referována poskytovateli zdravotní péče a očkovánými osobami, bylo podrobena detailnější analýze. Celkem 105 (71,4 %) referencí nepopisovalo žádné nežádoucí účinky a důvodem hlášení byla pouze aplikace vakcíny během těhotenství. Ve většině případů (124; 84,4 %) byla kvadrivalentní HPV vakcína podána během prvního trimestru těhotenství. Nebylo hlášeno žádné úmrtí matky nebo dítěte. Nejčastějším nežádoucím účinkem v souvislosti s graviditou byl spontánní potrat (15 případů; 10,2 %) a také umělé ukončení těhotenství na přání těhotné (6 případů; 4,1 %), často z důvodu strachu z potenciálního postižení plodu po vakcinaci. Nejčastěji hlášeným nežádoucím účinkem nesouvisejícím s těhotenstvím byla horečka (3 případy; 2,0 %), nevolnost, zvracení (2 případy; 1,4 %) a neanafylaktická alergická reakce (2 případy; 1,4 %). Sedm hlášení (4,8 %) popisovalo následky u novorozenců a ko-

jenců včetně dvou vrozených vývojových vad (1,4 %) a jednoho případu Downova syndromu (0,7 %) (31). Tato studie se systematickým, analytickým zpracováním potenciálních nežádoucích účinků podání kvadrivalentní HPV vakcíny těhotným ženám nezjistila žádné statisticky významné nežádoucí účinky na průběh těhotenství a na narození plodu (31).

Jiná studie analyzovala 517 prospektivních hlášení (USA, Francie, Kanada) po podání kvadrivalentní HPV vakcíny bezprostředně před koncepcí nebo během těhotenství (29). Z 517 těhotenství celkem 451 (87,2 %) skončilo porodem živého plodu včetně tří případů dvojčat. Z celkového počtu 454 novorozenců jich 439 (96,7 %) bylo zcela zdravých. Frekvence spontánního potratu byla 6,9 %. Závažné vrozené vývojové vady byly detekovány u 2,2 % živě narozených. Také bylo zaznamenáno sedm úmrtí plodu (1,5 případů na 100 porodů). Jedná se sice o vyšší frekvence než v obecné populaci, ale autoři dospěli k závěru, že tento výsledek nesouvisí s očkovaním proti HPV (29).

Recentní kohortová studie analyzovala zdravotnická data týkající se průběhu gravidity po aplikaci kvadrivalentní nebo nonavalentní HPV vakcíny kolem početí a v těhotenství ze sedmi zdravotnických systémů participujících v databázi Vaccine Safety Datalink. Byla zahrnuta jednočetná těhotenství z období od října 2015 do listopadu 2018 (32). Cílová kohorta zahrnuje 1 493 těhotenství s průměrným věkem těhotných 23,9 let. Celkem 445 (29,8 %) těhotných obdrželo nonavalentní HPV vakcínu v graviditě a její podání nebylo spojeno se statisticky významně zvýšeným relativním rizikem ($RR = 1,12$; 95% CI: 0,66–1,93) pro spontánní potrat ve srovnání s kontrolní skupinou. Při podání nonavalentní HPV vakcíny těsně před koncepcí bylo RR ještě menší ($RR = 0,72$; 95% CI: 0,42–1,24). Podání nonavalentní HPV vakcíny v graviditě nebylo spojeno s vyšším relativním rizikem předčasného porodu ($RR = 0,73$; 95% CI: 0,44–1,20) ani růstové restrikce plodu ($RR = 1,31$; 95% CI: 0,78–2,20). Frekvence vrozených vývojových vad byla obecně nízká (pod 1 %) ve všech

sledovaných skupinách. Podání nonavalentní HPV vakcíny v graviditě tedy nepředstavovalo vyšší riziko pro narození plodu (32).

Podle jiné metaanalýzy se nezjistil žádný negativní vliv HPV vakcinace aplikované během těhotenství na průběh gravidity a perinatální výsledky (33). Při analýze relativního rizika spontánního potratu se pracovalo s cílovým vzorkem 16 867 případů a RR bylo stanoveno na 0,99 ($p = 0,77$). V případě intrauterinního úmrtí plodu splnilo vstupní kritéria pro metaanalýzu 7 965 subjektů a RR bylo stanoveno na 1,16 ($p = 0,56$). Při analýze potenciálního vlivu podání HPV vakcíny během těhotenství na nízkou porodní hmotnost plodu (22 104 rodiček, $RR 0,96$, $p = 0,43$), na předčasný porod (21 295 rodiček, $RR 1,04$, $p = 0,56$) ani na výskyt vrozených vývojových vad novorozenců (21 879 rodiček, $RR 1,18$, $p = 0,10$) nebyl zaznamenán žádný statisticky významný negativní dopad. Autoři metaanalýzy závěrem jasně konstatují, že vakcinace v graviditě bivalentní nebo kvadrivalentní HPV vakcínou nemá negativní vliv na průběh těhotenství a ani nezvyšuje riziko pro plod (33).

Souhrnně lze tedy konstatovat, že zvýšené riziko spontánního potratu je následkem HPV vakcinace v graviditě dle současných poznatků nejspíše nulové či zanedbatelné (27). Ani riziko mimoděložního těhotenství, vrozených vývojových vad plodu nebo intrauterinního úmrtí nebylo po HPV vakcinaci aplikované během jednoho měsíce před graviditou nebo v časně graviditě vyšší ve srovnání s běžnou populací (29). Současné poznatky o HPV vakcinaci během těhotenství nebo krátce před otěhotněním neukazují na nepříznivé dopady na graviditu. Přesto každé neúmyslné podání HPV vakcíny je nutné zaznamenat a graviditu včetně správného vývoje plodu pečlivě sledovat. Podle současných doporučení Středisek pro kontrolu a prevenci nemocí (CDC, Centers for Disease Control) je podání HPV vakcín v těhotenství kontraindikováno pro nedostatek důkazů o jejich bezpečnosti (34). FDA klasifikuje vakcíny proti HPV jako léky kategorie B (26). Pokud žena otěhotní po první nebo

druhé dávce, očkování by mělo být přerušeno a dokončeno až po porodu a kojení, protože k definitivnímu závěru o bezpečnosti HPV vakcinace v graviditě jsou nutné další studie (34). Bez ohledu na dobu mezi jednotlivými dávkami je pak očkování považováno za úplné. Na druhou stranu, neexistují ani důkazy o zvýšeném riziku na průběh gravidity nebo na nenarozený plod (34). Pro bivalentní, kvadrivalentní a nonavalentní HPV očkování se nepoužívá živá vakcína. Vakcíny obsahují viru podobné částice (virus-like particles, VLPs), tvořené hlavním papilomavirovým kapsidovým proteinem L1 a jsou posíleny adjuvantním systémem. Viru podobné částice neobsahují žádnou virovou DNA a nemohou tak infikovat buňky ani se nemohou množit, ale jsou schopné vyvolat mnohem silnější imunitní odpověď než přirozená infekce (3). Umělé ukončení těhotenství není v případě neúmyslného očkování v těhotenství proti HPV opodstatněné (27, 35).

Diskuze

Zavedení plošného očkování pro širokou populaci proti řadě infekčních nemocí byl největší celosvětový pokrok v oblasti veřejného zdraví. To umožnilo podstatnou, nebo úplnou eradikaci některých infekčních nemocí (1). Přes neoddiskutovatelně velký přínos a bezpečnost vakcinace se stále ozývají silné hlasy a obavy ohledně bezpečnosti vakcín (1). V graviditě je situace díky strachu matky o nenarozený plod ještě složitější, pouze přibližně třetina těhotných žen dostává během těhotenství všechna doporučená očkování (36).

Před aplikací vakcíny těhotným musí důkazy o bezpečnosti vakcíny zahrnovat nejen důkazy o bezpečnosti pro matku a pro průběh těhotenství, ale také pro perinatální a postnatální vývoj plodu (37). Sběrání a analýza těchto bezpečnostních údajů musí být zajištěny standardizací postupů při sběru zdravotnických dat a standardizací definic nežádoucích událostí, aby shromážděné informace byly objektivní a přenositelné mezi různými poskytovateli zdravotní péče (37). WHO v roce 2014 iniciovala

setkání, kterého se zúčastnilo široké celosvětové spektrum odborníků z oblasti porodnické a neonatální péče, a byly definovány klíčové termíny pro standardizaci klíčových veličin (38). Cílem těchto aktivit je postupné zvyšování počtu žen očkovaných v těhotenství. Výsledkem setkání bylo založení projektu GAIA (The Global Alignment of Immunization Safety Assessment in Pregnancy) v roce 2014, který s použitím metodologie Brighton Collaboration vypracoval a publikoval definice a doporučené postupy klinických studií pro sběr, analýzu a prezentaci údajů o očkování těhotných žen včetně bezpečnosti. Klinické studie na těhotných jsou složité, protože i u zdravých těhotných žen se často vyskytují komplikace (například vrozené vývojové vady plodu, předčasné porody, spontánní potraty, poruchy růstu plodu, gestační hypertenze, gestační diabetes mellitus, preeklampsie a další), a tyto komplikace lze očekávat také v rámci klinické studie nezávisle na podání účinné látky. Mnoho žen, u kterých se později závažné těhotenské komplikace rozvinou, nemají před graviditou žádné známé rizikové faktory, a tyto komplikace jsou tedy neprediktabilní. Také srovnání s běžnou těhotenskou populací je často obtížné, protože přesná incidence některých komplikací v graviditě je nejasná a jejich frekvence se pouze odhaduje (37, 38). Z těchto důvodů je velmi obtížné ve studiích správně definovat vstupní a vylučovací kritéria a také primární výstupní cíle, což jsou často nejkritičtější rozhodnutí u designu studie. V současné době chybí standardizované pokyny pro výběr a zařazení těhotných žen pro jakoukoli studii v kterékoli fázi vývoje vakcíny. Ve snaze překlenout některé problémy a pomoci klinickým zdravotníkům při očkování těhotných matek se pracovní skupina GAIA rozhodla, že vypracuje strategii a definuje kritéria pro výběr žen v klinických studiích zabývajících se aplikací vakcín v těhotenství. Prvořadým cílem bylo vytvoření kritérií pro hodnocení výsledků a stanovení konkrétních rizikových faktorů v těhotenství, které by měli autoři klinických studií zahrnout do studijního protokolu. Zatím jsou tato

kritéria stanovena pro studie některých očkovacích látek, ale v budoucnu se mohou uplatnit i v jiných studiích zahrnujících těhotné (37). V současnosti jsou speciálně pro těhotné ženy v klinickém výzkumu vakcíny proti nejméně dvěma patogenům: respirační syncytiální virus (respiratory syncytial virus, RVS) a *Streptococcus* skupiny B (GBS). Dalšími vakcínami, u kterých probíhá aktivní hodnocení bezpečnosti pro aplikaci těhotným, jsou vakcíny proti černému kašli (*Bordetella pertussis*), cytomegaloviru (CMV) a hepatitidě E (37).

Očkovací kalendáře doporučují očkování proti HPV před začátkem pohlavního života ve věku 9–13 let, kdy je účinnost vakcinace nejvyšší. Poměrně často se ale HPV vakcína aplikuje ženám ve fertilním období s pravidelným sexuálním životem. Od zavedení HPV vakcinace byly neúmyslně podány celosvětově miliony dávek HPV vakcín těhotným ženám. Zatím ale všechny přehledové práce i metaanalýzy nenalezly zvýšené riziko nežádoucích účinků na těhotenství a plod. Na základě těchto dat je možné uklidnit zdravotníky i těhotné ženy, které byly očkovány proti HPV infekci. Je také důležité zdůraznit ženám, které otěhotní v období kolem očkování proti HPV, že na základě současných důkazů není důvod k obavám, pokud jde o potenciální nežádoucí účinky pro těhotenství a plod. Na druhé straně, studie, ze kterých se retrospektivně analyzují tato data, byly navrženy ke sledování jiných nežádoucích účinků a měly primárně jiný design s jinými primárními výstupy, původně bez kalkulace těhotenských výsledků. To mohlo výsledky částečně zkreslit. Provedení studie v potřebném rozsahu na těhotné populaci není etické, a proto dosud nebyla a ani v budoucnu nejspíše nebude oficiálně žádná prospektivní, randomizovaná, kontrolovaná studie provedena. Nicméně publikovaných údajů je již v celosvětovém měřítku dostatečné množství, aby mohlo být konstatováno, že HPV vakcinace v těhotenství nemá žádné významné nežádoucí účinky.

WHO i výrobci vakcín, společnosti Merck a GlaxoSmithKline, doporučují vyhnout se očkování proti HPV během

těhotenství (27). Nicméně provedení těhotenského testu před očkováním proti HPV není povinné a nedoporučuje se ani přerušování těhotenství v případě náhodného očkování těhotné ženy (27, 35). Tento přístup podporuje i Americká odborná společnost porodníků a gynekologů (ACOG American College of Obstetricians and Gynecologists) (27). Povinnost provádět těhotenské testy před HPV vakcinací by teoreticky mohla odradit některé poskytovatele i příjemce kvůli snížení „compliance“ očkování.

Závěr

Infekce HPV během těhotenství může negativně ovlivnit zdravotní stav matky i dítěte a zvýšit riziko některých těhotenských komplikací, jako je spontánní potrat, předčasný odtok plodové vody a předčasný porod. Absolutní závěry nelze v tuto chvíli stanovit, ale další výzkum s velkou pravděpodobností potvrdí kauzální spojitost mezi HPV infekcí a některými nepříznivými výsledky těhotenství. Podání žádné registrované HPV vakcíny není pro těhotné ženy schváleno. V případě neúmyslné aplikace HPV vakcíny gravidní ženě se umělé ukončení těhotenství nedoporučuje.

Literatura:

- Condrat CE, Filip L, Gherghe M, et al. Maternal HPV Infection: Effects on Pregnancy Outcome. *Viruses*. 2021;13:2455.
- Giuliano AR, Nyitray AG, Kreimer AR, et al. EUROGIN 2014 roadmap: differences in human papillomavirus infection natural history, transmission and human papillomavirus-related cancer incidence by gender and anatomic site of infection. *Int J Cancer*. 2015;136(12):2752–2760.
- Sehnal B, Rozsypal H, Nipčová M, Sláma J. Prevalence, incidence, persistence a možnosti přenosu infekce lidským papilomavirem (HPV). *Epidemiol Mikrobiol Imunol*. 2017;66(4):198–209.
- Værnesbranden MR, Wiik J, Sjøborg K, et al. Maternal human papillomavirus infections at mid-pregnancy and delivery in a Scandinavian mother-child cohort study. *Int J Infect Dis*. 2021;108:574–581.
- Luo D, Peng M, Wei X, et al. Prevalence of Human Papillomavirus and Genotype Distribution in Pregnant and Non-Pregnant Women in China. *Risk Manag Healthc Policy*. 2021;14:3147–3157.
- Slatter TL, Hung NG, Clow WM et al. A clinicopathological study of episomal papillomavirus infection of the human placenta and pregnancy complications. *Mod Pathol*. 2015;28:1369–1382.
- Rintala MA, Grénman SE, Järvenkylä ME et al. High-risk types of human papillomavirus (HPV) DNA in oral and genital mucosa of infants during their first 3 years of life: Experience from the Finnish HPV Family Study. *Clin Infect Dis* 2005;41:1728–1733.
- Rombaldi RL, Serafini EP, Mandelli J, et al. Perinatal transmission of human papillomavirus DNA. *Virology*. 2009;6:83.
- You H, Liu Y, Carey MJ, et al. Defective 3A trophoblast-endometrial cell adhesion and altered 3A growth and survival by human papillomavirus type 16 oncogenes. *Mol Cancer Res*. 2002;1:25–31.
- Boulenouar S, Weyn C, Van Noppen M, et al. Effects of HPV-16 E5, E6 and E7 proteins on survival, adhesion, migration and invasion of trophoblastic cells. *Carcinogenesis*. 2010;31:473–480.
- Ambühl LMM, Baandrup U, Dybkær K, et al. Human Papillomavirus Infection as a Possible Cause of Spontaneous Abortion and Spontaneous Preterm Delivery. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2016;2016:3086036.
- Hermonat PL, Han L, Wendel PJ, et al. Human papillomavirus is more prevalent in first trimester spontaneously aborted products of conception compared to elective specimens. *Virus Genes*. 1997;14:13–17.
- Bober L, Guzowski G, Moczulska H, Sieroszewski P. Influence of human Papilloma Virus (hPV) infection on early pregnancy. *Ginekol Pol*. 2019;90:72–75.
- Conde-Ferráez L, May ADAC, Carrillo-Martínez JR, et al. Human papillomavirus infection and spontaneous abortion: A case-control study performed in Mexico. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2013;170:468–473.
- Aldhous MC, Bhatia R, Pollock R, et al. HPV infection and pre-term birth: A data-linkage study using Scottish Health Data. *Wellcome Open Res*. 2019;4:48.
- Xiong Y Q, Mo Y, Luo QM, et al. The Risk of Human Papillomavirus Infection for Spontaneous Abortion, Spontaneous Preterm Birth, and Pregnancy Rate of Assisted Reproductive Technologies: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Gynecol Obstet Investig*. 2018;83:417–427.
- Cho G, Min KJ, Hong HR, et al. High-risk human papillomavirus infection is associated with premature rupture of membranes. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2013;13:173.
- Niyibizi J, Zanré N, Mayrand MH, Trottier H. The association between adverse pregnancy outcomes and maternal human papillomavirus infection: A systematic review protocol. *Syst Rev*. 2017;6:53.
- Ford JH, Li M, Scheil W, Roder D. Human papillomavirus infection and intrauterine growth restriction: A data-linkage study. *J Matern-Fetal Neonatal Med*. 2019;32:279–285.
- Niyibizi J, Zanré N, Mayrand MH, Trottier H. Association Between Maternal Human Papillomavirus Infection and Adverse Pregnancy Outcomes: Systematic Review and Meta-Analysis. *J Infect Dis* 2020;221:1925–1937.
- Huang QT, Zhong M, Gao YF, et al. Can HPV vaccine have other health benefits more than cancer prevention? A systematic review of association between cervical HPV infection and preterm birth. *J Clin Virol*. 2014;61:321–328.
- Niyibizi J, Mayrand MH, Audibert F, et al. Association Between Human Papillomavirus Infection Among Pregnant Women and Preterm Birth. *JAMA Network Open*. 2021;4:e2125308.
- Cotton-Caballero A, Dudley D, Ferguson J, et al. Maternal Human Papillomavirus Infection Increases the Risk of Premature Rupture of Membranes [19M]. *Obstet Gynecol*. 2017;129:S137.
- Wiik J, Nilsson S, Kärrberg C, et al. Associations of treated and untreated human papillomavirus infection with preterm delivery and neonatal mortality: A Swedish population-based study. *PLoS Med*. 2021 May 10;18(5):e1003641.
- Kuehn BM. Pandemic Contributes to Worse Pregnancy Outcomes Worldwide. *JAMA*. 2021;325:1931.
- World Health Organization. Human papillomavirus vaccines: WHO position paper, May 2017—Recommendations. *Vaccine*. 2017;35:5753–5755.
- Bonde U, Joergensen JS, Lamont RF, Mogenssen O. Is HPV vaccination in pregnancy safe? *Hum Vaccin Immunother*. 2016;12:1960–1964.
- Wacholder S, Chen BE, Wilcox A, et al. Risk of miscarriage with bivalent vaccine against human papillomavirus (HPV) types 16 and 18: pooled analysis of two randomised controlled trials. *BMJ*. 2010;340:c712.
- Dana A, Buchanan KM, Goss MA, et al. Pregnancy outcomes from the pregnancy registry of a human papillomavirus type 6/11/16/18 vaccine. *Obstet Gynecol* 2009;114:1170–8.
- Garland SM, Ault KA, Gall SA, et al. Pregnancy and infant outcomes in the clinical trials of a human papillomavirus type 6/11/16/18 vaccine: a combined analysis of five randomized controlled trials. *Obstet Gynecol*. 2009;114:1179–88.
- Moto PL, Zheteyeva Y, Lewis P, et al. Safety of Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine (Gardasil®) in Pregnancy: Review of Non-manufacturer reports in the Vaccine Adverse Event Reporting System, 2006–2013. *Vaccine*. 2015;33(4):519–522.
- Kharbanda EO, Vazquez-Benitez G, DeSilva MB, et al. Association of Inadvertent 9-Valent Human Papillomavirus Vaccine in Pregnancy With Spontaneous Abortion and Adverse Birth Outcomes. *JAMA Network Open*. 2021;4(4):e214340.

33. Wang A, Liu C, Wang Y, et al. Pregnancy Outcomes After Human Papillomavirus Vaccination in Periconceptional Period or During Pregnancy: A Systematic Review and Meta-analysis. *Hum Vaccin Immunother.* 2020;16(3):581–589.
34. Etti M, Calvert A, Galiza E, et al. Maternal vaccination: a review of current evidence and recommendations. *Am J Obstet Gynecol.* 2021:S0002-9378(21)01228-X.
35. Tempfer C. Vaccinations for pregnant women and women attempting to become pregnant. *Gynakol Endokrinol.* 2022:1–8.
36. Marshall H, McMillan M, Andrews RM, et al. Vaccines in pregnancy: The dual benefit for pregnant women and infants. *Hum Vaccin Immunother.* 2016;12:848–856.
37. Eckert LON. Human Papillomavirus Vaccination: ACOG Committee Opinion Summary, Number 809. *Obstet Gynecol.* 2020;136:E15–E21.
38. Munoz FM, Eckert LO, Katz MA, et al. Key terms for the assessment of the safety of vaccines in pregnancy: Results of a global consultative process to initiate harmonization of adverse event definitions. *Vaccine.* 2015;33(47):6441–6452.

Korespondující autor:

MUDr. Jiří Vojtěch

Gynekologicko-porodnická klinika

1. LF UK a VFN

Apolinářská 18

120 00 Praha 2

jiri.vojtech@gmail.com

Role vakcín v prevenci a léčbě nádorů hlavy a krku

The role of vaccines in the prevention and treatment of head and neck cancer

Stanislav Batko

Onkologická klinika FN Motol a 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy,
Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita Obrany, Hradec Králové

Souhrn

Nádory hlavy a krku se významně podílejí na incidenci i mortalitě maligních onemocnění. V této heterogenní skupině nádorů lze vyzorovat celosvětově významný trend vzestupu incidence podskupiny asociované s infekcí HPV, reprezentované hlavně nádory orofaryngu. V současné době zastupují HPV pozitivní karcinomy hlavy a krku 70–90 % všech nádorů orofaryngu. V léčbě nádorů hlavy a krku se uplatňuje chirurgie, radioterapie, chemoterapie, cílená léčba i imunoterapie, přesto však více než 40 % pacientů nakonec tomuto onemocnění podléhá. Zkoumaní role očkování proti HPV bivalentní a kvadrivalentní vakcínou prokázalo schopnost indukovat tvorbu neutralizačních protilátek a ve studiích srovnávajících incidenci HPV positivity v orálních vzorcích vedla vakcinace k významnému poklesu prevalence HPV positivity odpovídající 72–88% účinnosti vakcinace. V červnu 2020 byla rozšířena indikace vakcíny Gardasil o prevenci orofaryngeálních karcinomů a doporučena pro obě pohlaví ve věkovém rozmezí 9–45 let.

Klíčová slova: nádory hlavy a krku, karcinom orofaryngu, HPV, vakcinace

Summary

Head and neck tumors significantly contribute to the overall cancer incidence and mortality. Recently, notable rise of the HPV associated tumors has been observed in this heterogeneous group, mainly represented by oropharyngeal carcinomas. Currently, 70–90% of all oropharyngeal carcinomas are HPV positive. Treatment algorithms involve surgery, radiotherapy, chemotherapy, targeted therapy and immunotherapy, nevertheless overall mortality from this malignancy still exceeds 40%. Investigation of the role of HPV bivalent and quadrivalent vaccination has demonstrated the ability to induce the production of neutralizing antibodies. Furthermore, studies which compared the incidence of HPV positivity in oral specimens found that vaccination led to a significant decrease in the prevalence of HPV positivity, corresponding to a 72–88% vaccination efficacy. In June 2020, the indication for Gardasil vaccine was expanded to include prevention of oropharyngeal carcinomas and recommended for both sexes in the age range 9–45 years.

Keywords: head and neck cancer, oropharyngeal cancer, HPV, vaccination

Vakcinologie 2022;17(2):80–84

Úvod – epidemiologie nádorů hlavy a krku

Nádory hlavy a krku představují širokou skupinu nádorů ve smyslu anatomických lokalizací zahrnujících rty a ústní dutinu, hltan, hrtan, dutinu nosní, paranasální dutiny a slinné žlázy. Histologicky se jedná o v naprosté většině spinocelulární karcinomy. V žebříčku nádorových diagnóz zaujímají sedmé místo v incidenci s celosvětově více než 625 tisíci novými

případy a 323 tisíci úmrtími (1). Klasické rizikové faktory rozvoje těchto nádorů představují kouření a konzumace alkoholu. V oblasti dutiny ústní vede dlouhodobé kouření k 10násobnému zvýšení rizika rozvoje nádoru, v oblasti hrtanu až 40násobnému riziku (2). Role lidského papilomaviru (HPV) coby rizikového faktoru vzniku nádoru v oblasti hlavy a krku byla u těchto nádorů poprvé popsána v roce 1983 (3). HPV patří do skupiny neobalených DNA virů, čeledi

Papillomaviridae, rodu *Papillomavirus*. Virová kapsida tvořená proteiny L1 a L2 uzavírá dvouvláknovou DNA o velikosti 8Kb kódující osm proteinů.

Při zkoumání podílu HPV na celkové incidenci nádorů hlavy a krku vyšly najevo významné regionální odlišnosti; ve studii analyzující celkem 1420 vzorků nádorů byla v USA prokázána HPV pozitivita u 60 %, naproti tomu v Evropě u 30 % a v Brazílii u pouhých 4 % pacientů (4). Další práce naproti tomu ukazuje na vysokou incidenci HPV po-

zitivních nádorů i v Evropě (5). V běžné klinické praxi se jako marker HPV infekce používá imunohistochemické stanovení proteinu p16. Zajímavostí je, že se nejedná o virovou DNA kódovaný protein, nýbrž produkt genu CDKN2A nacházejícího se na chromozómu 9. Při infekci HPV dochází k jeho zvýšené expresi na podkladě negativní zpětné vazby při inhibici Rb proteinu virovým onkoproteinem E7. Ačkoliv je tedy nepřímým markerem HPV infekce, vykazuje dostatečnou senzitivitu, srovnatelnou s PCR technikami (6), a je proto používán i v rámci oficiální (TNM) klasifikace nádorů (7). Alternativní metody stanovení HPV pozitivivity využívají především sekvenaci DNA, zlatým standardem je průkaz E6/E7 mRNA metodou RT-PCR. Z dalších metod lze využít detekci HPV DNA prostřednictvím polymerázové řetězové reakce (PCR) či metody *in situ* hybridizace (ISH).

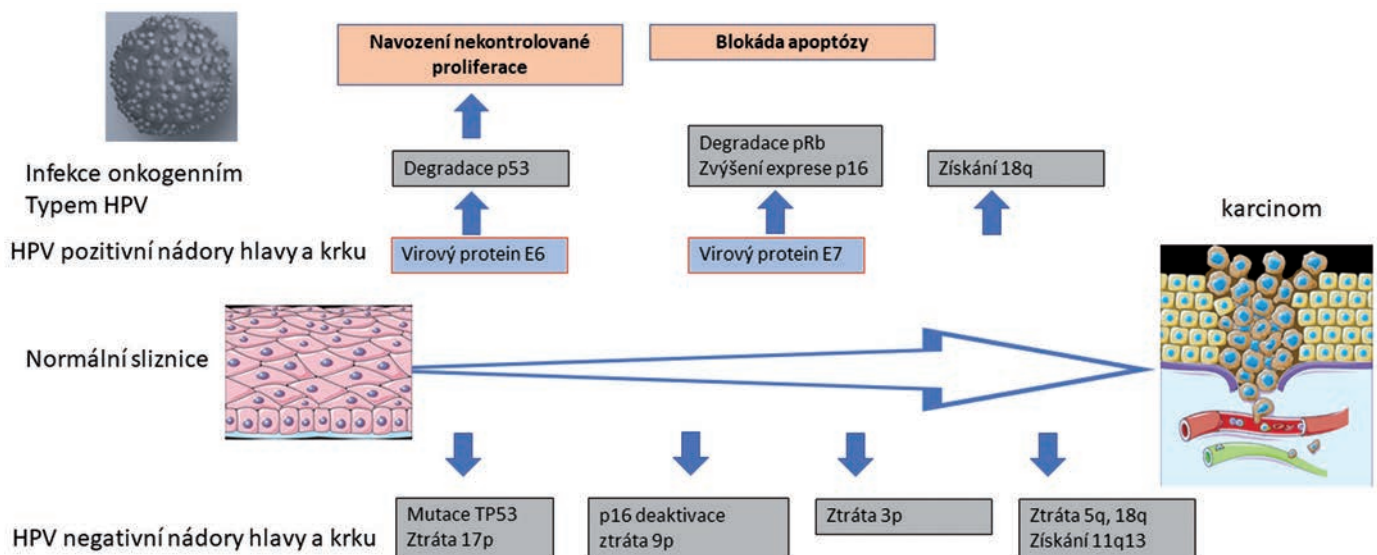
Trendy ve vývoji incidence nádorů hlavy a krku odhalují současnou a budoucí zátěž populace a zdravotnického systému tímto onemocněním. Zatímco u HPV negativních nádorů lze pozorovat pokles počtu nových případů, u HPV pozitivních nádorů naopak incidence vzrůstá. V metaanalýze publikované v roce 2012 udávají autoři vzestup pozitivních HPV nádorů orofaryngu z 40,5 % před rokem 2000 na 72,2 % v období mezi lety 2005–2009. Ve Švédsku je tento trend ještě významnější, incidence HPV pozitivních nádorů v práci z roku 2009 dosáhla 93 % (8). V současné době je mezi celkovými 200 typy pa-

pilomavirů identifikováno 13 karcinogenních typů: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66. Jejich zastoupení mezi nádory hlavy a krku však není rovnoměrné, 91 % nádorů dutiny ústní a orofaryngu a 53 % nádorů hrtanu je spojeno s infekcí typem HPV 16 (9). V rámci České republiky patří nádorům hlavy a krku desáté místo v incidenci a jedenácté v mortalitě (10). V absolutních počtech se za rok 2018 jednalo o 1 776 nově diagnostikovaných případů, přičemž dlouhodobě převažují muži v poměru 2,4 : 1, v důsledku tohoto nádorového onemocnění pak v témže roce zemřelo 812 osob. Celkově, při zahrnutí všech stádií, činí pětileté přežití 53,7 %. Lze tedy říct, že téměř polovinu pacientů se nám zatím nedaří vyléčit. Pacienty s HPV pozitivními nádory od pacientů s HPV negativními nádory odlišují některé demografické charakteristiky, jako je mladší či střední věk 35–60 let, nekuřáctví, vyšší socioekonomický status, menší primární tumor a rozsáhlejší postižení regionálních lymfatických uzlin (11). Nejsilnější rizikový faktor spojený s HPV pozitivitou je orální sex a počet partnerů (12). Je zajímavé, že vyšší četnost přenosu byla zaznamenána od žen mužům, u kterých byla také zaznamenána delší doba do „clearance“. Kouření také zřejmě prodlužuje dobu perzistence HPV infekce (13).

HPV indukovaná kancerogeneze

Infekce HPV je realizována prostřednictvím mikrotraumat umožňujících

kontakt viru s buňkami bazální vrstvy epitelu. Receptory, pomocí nichž probíhá přenos virionu přes membránu do cytoplazmy buňky, byly identifikovány jako $\alpha 6$ integrin a heparan sulfátové proteoglykany (14). Zvýšená exprese těchto membránových receptorů nastává v rámci odpovědi na hojení mikrotraumat a zvyšuje senzitivitu k infekci HPV. Po internalizaci virionu dochází k uvolnění virové DNA z obalu a jejímu transportu do jádra, kde přetrvává v počtu několika desítek kopií jako epizomální DNA. Posun k integraci virového genomu do DNA hostitelské buňky vede k zvýšené expresi virových proteinů E6 a E7. Protein E6 se váže na onkosupresorový protein p53 a inaktivuje ho. Velmi zjednodušeně lze funkci p53 popsat jako hlídače; pokud je v buňce signalizováno poškození DNA, normálně fungující p53 navodí zástavu buněčného cyklu a poskytne tak čas k opravě DNA, případně při kritickém poškození DNA spustí apoptózu. Inaktivace p53 tudíž rezultuje ve stavu, kdy nedojde k opravě chyb v DNA a při replikaci buňky jsou naopak zachovány v dceřiných buňkách. Obdobnou roli jako p53 zastává i protein Rb, který je inhibován virovým proteinem E7. Tato dysregulace buněčného cyklu postupně navodí chromozomální instabilitu (viz obr. 1). Další mechanismy vedoucí ke kancerogenezi představuje aktivace stimulačních signálních drah WNT/ β -katenin a AKT/mTOR, MAPK a JAK/STAT (15).



Obr. 1 Zjednodušené schéma genetických alterací navozených HPV

Klinická symptomatologie a léčba nádorů hlavy a krku

Počáteční příznaky nádorů hlavy a krku jsou pestré, ze začátku je lze snadno přehlédnout nebo zaměnit s projevy zánětlivých onemocnění. Patří mezi ně přetrvávající bolest v krku, chrapot nebo změna hlasu, zápach z úst, otok, později se přidávají potíže se žvýkáním, polykáním nebo pohybem čelisti či jazyka, někdy až charakteru trismu. U části pacientů se objevuje krvácení z tumoru. Potíže s příjmem potravy se obvykle promítanou do váhového úbytku. Při vyšetření pacienta je pak možné spatřit ulceraci v ústní dutině, hmatat či přímo zpozorovat lymfadenopatii na krku. U velmi pokročilých nálezů je pak často nutné provést tracheostomii a zajistit adekvátní proteino-kalorický příjem pomocí PEG. Pokročilé onemocnění má obvykle devastující vliv na kvalitu života pacientů (viz obr. 2). V současné době tvoří pilíře léčby nádorů hlavy a krku chirurgická léčba, radioterapie podávaná pooperačně či s radikálním záměrem u inoperabilních nádorů, chemoterapie v kombinaci s radiopotenciačním záměrem nebo u pacientů s pokročilým, metastazujícím onemocněním. Cílenou léčbu doposud reprezentuje pouze cetuximab a nově také imunoterapie. Obecně představuje terapie nádorů hlavy a krku pro

pacienty významnou zátěž z hlediska náročnosti jednotlivých léčebných modalit i z hlediska dopadů na kvalitu života. Obvyklá délka radioterapie je šest až sedm týdnů, podávaná od pondělí do pátku nejčastěji jednou denně. Pokud je současně podávána radiopotenciačně chemoterapie, lze volit z režimů aplikovaných jednou týdně či jednou za tři týdny. Běžným důsledkem léčby jsou významné negativní vlivy na kvalitu života plynoucí ze samotné podstaty terapeutického výkonu nebo vedlejších účinků terapeutických modalit. Po resekčním zákroku často pacienti čelí změně vzhledu na podkladě asymetrií či deformit. Změny funkce zahrnují potíže s polykáním, poruchy chuti.

Už v době před zavedením imunoterapie činily náklady na léčbu nádorů hlavy a krku jednu z nejrychleji rostoucích položek, jak vyplývá ze zprávy VZP z roku 2019, s více než 375 miliony korun a průměrnými náklady 52 tisíc korun na jednoho pacienta, a lze předpokládat další jejich nárůst (16).

Role vakcinace u nádorů hlavy a krku

Nejefektivnější léčebnou intervencí vždy představuje prevence, přičemž v poslední době publikovaná data vedla v červnu 2020 americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA)

k rozšíření indikace Gardasilu 9 o prevenci orofaryngeálních karcinomů způsobených typy 16, 18, 31, 33, 45, 52 a 58 u chlapců i dívek od devíti let, horní věková hranice byla stanovena na 45 let (17).

V době vydání tohoto rozhodnutí byly k dispozici data ze čtyř průřezových studií, jedné longitudinální kohortové studie, jedné randomizované komunitní studie a dvou studií případů a kontrol čítajících 49 tisíc osob. Mezi prvními byla v roce 2016 publikována studie případů a kontrol, jež si dala za cíl zhodnotit efektivitu očkování Gardasilem 4 v populaci 150 mužů vyhodnocením hladiny sérových i slizničních protilátek proti HPV 16 a HPV 18 při zařazení do studie a poté měsíc po absolvování třech dávek očkování (ve schématu den 1., po 2 měsících a 6 měsících). Při vstupu byla prokázána pozitivita slizničních protilátek proti HPV 16 u 5,8 %, po dokončení očkovacího schématu u 95,7 % participujících, v parametru positivity sérových protilátek pak u 19 % zařazených, po očkování u 100 % účastníků. Pro typ HPV 18 byly výsledky obdobné; sérové protilátky byly přítomné vstupně u 20,6 %, po očkování u 100 % přítomných, u slizničních protilátek nastal vzestup z 4,1 % na 72,1 % (18).

V průřezové studii uskutečněné v období 2009–2014 byl shromážděn vzorek 3 040 mužů a žen ve věkové skupině 19–30 let. V této populaci pak autoři z Texaské univerzity hodnotili přítomnost virové DNA pro 37 HPV typů, přičemž s vakcinací spojené typy 6, 11, 16, 18 byly hodnoceny odděleně. Studiová populace zahrnovala 22 % (668/3040) vakcinovaných účastníků. Incidence s vakcinací spojených typů HPV činila u nevakcinovaných 1,5 % v porovnání s 0,2 % u vakcinovaných, a byla tudíž významně nižší ($p < 0,001$) (19).

Další, v roce 2018 publikovaná průřezová studie provedená v USA na vzorku 2 627 mladých mužů a žen ve věku 18–33 let ukázala významné snížení incidence orální HPV infekce u vakcinovaných účastníků (0,1 %) v porovnání s nevakcinovanými účastníky (1,6 %) odpovídající 88,2% snížení prevalence



Obr. 2 Pokročilý nádor dutiny ústní

HPV infekce (20). Obdobné výsledky zaznamenali výzkumníci v jiné průřezové studii, z Kolumbie, kde ve věkové skupině 14–17 let na vzorku 1 784 chlapců a dívek detekovali HPV DNA ve vzorcích z dutiny ústní u 2,3 % nevakcinovaných dívek ve srovnání s 0,7 % vakcinovaných dívek, což představovalo 72% redukci četnosti detekce HPV (21).

Evropskou populaci pak zastupuje například studie ze Spojeného království, kde byla pacientům podstupujícím tonzilektomii odebrána tkáň k analýze přítomnosti HPV DNA. Na vzorku 243 participujících zaznamenali autoři u vakcinovaných osob statisticky signifikantní ($p < 0,04$) pokles četnosti pozitivních vzorků (0,5 %) oproti nevakcinovaným (5,6 %) (22).

V randomizované studii z Kostariky bylo 7 455 žen v zaslepeném designu očkováno bivalentní vakcínou proti HPV 16 a 18 (Cervarix) nebo v kontrolním rameni vakcínou proti hepatitidě A (*Havrix*). Po čtyřletém sledování poskytl vzorky z ústní dutiny k detekci HPV DNA 5 840 zařazených. V kontrolním rameni byla prokázána pozitivita HPV 16 a 18 u 15 žen (0,5 %), ve vakcinované skupině u žádné z žen, korespondující s 72% účinností vakcíny ve snížení prevalence positivity HPV 16 a 18 ve vzorcích z dutiny ústní (23).

Nedávno publikovaná randomizovaná, zaslepená studie provedená ve Finsku přiřadila dívky či chlapce ve věku 13–15 let v aktivním rameni k očkování bivalentní vakcínou proti HPV 16 a 18 (Cervarix) nebo k podání vakcíny proti hepatitidě B v kontrolním rameni. Celkově byly zanalyzovány vzorky 4 871 účastníků v odstupu 3–6 let po očkování, přičemž byla zjištěna 82,4% účinnost v poklesu prevalence positivity HPV 16 a 18 (24).

Efekt vakcinace proti HPV se očekává v horizontu následujících 25 let (25). V současné chvíli ho lze vyzorovat na incidenci karcinomu čípku, kde byla kauzální role HPV. Publikované epidemiologické studie sledovaly incidenci karcinomu děložního čípku v období po zahájení očkování HPV. Švédská studie porovnáující incidenci karcinomu děložního čípku mezi očkovanými a neočkovanými dívkami ukázala 88% pokles incidence kar-

cinomu čípku (26). K velmi obdobným výsledkům dospěla i studie ze Spojeného království (27).

Závěr

Nádory hlavy a krku celosvětově reprezentují významnou část malignit, přičemž lze zpozorovat nárůst podílu pacientů, u nichž je vyvolávajícím činitelem virová infekce onkogenními typy HPV. I přes pokroky v léčbě představuje nejefektivnější intervenci očkování proti HPV. Během poslední dekády byla publikována řada dat, která konzistentně potvrzují roli HPV vakcinace ve schopnosti navodit produkci neutralizujících slizničních protilátek a snížit prevalenci positivity HPV DNA v ústní dutině. Tato data vedla k rozšíření indikace HPV vakcíny Gardasil 9 o prevenci orofaryngeálních karcinomů způsobených typy 16, 18, 31, 33, 45, 52 a 58 u mužů i žen ve věkové skupině 9 až 45 let.

Vzhledem k tomu, že se průměrný věk diagnózy HPV pozitivních nádorů hlavy a krku pohybuje kolem 61 let a očkování proti HPV bylo v Evropě zavedeno do klinické praxe v roce 2006, bude pravděpodobnější vidět pokles incidence těchto nádorů až s delším odstupem. Data prokazují benefit očkování u dětí, které doposud nebyly vystaveny viru. U starší populace, kde lze předpokládat expozici HPV, je situace doposud méně prozkoumána. Na jednu stranu je prokázána schopnost „clearance“ HPV infekce imunitním systémem, u části infikovaných však virus v latentní formě perzistuje a prostřednictvím změn v regulaci buněčného cyklu a narušení mechanismů senescence a apoptózy dává prostor rozvoji chromozomální instability vedoucí k nádorové transformaci. Lepší informovanost veřejnosti by mohla zvýšit proočkovanost starších ročníků, které neměly možnost podstoupit pojišťovnou hrazené očkování v dětském věku.

Literatura:

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A, et al. GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;2018:1–31.

- Di Credico G, Edefonti V, Polesel J, et al. Joint effects of intensity and duration of cigarette smoking on the risk of head and neck cancer: a bivariate spline model approach. *Oral Oncol.* 2019;94:47–57.
- Syrjanen K, Syrjanen S, Lamberg M, Pyrhonen S, Nuutinen J. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg.* 1983;12:418–24.
- Anantharaman D, Abedi-Ardekani B, Beachler DC, Gheit T, et al. Geographic heterogeneity in the prevalence of human papillomavirus in head and neck cancer. *Int J Cancer.* 2017;140:1968–1975.
- Mehanna H, Beech T, Nicholson T, El-Hariry I, et al. Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer—systematic review and meta-analysis of trends by time and region. *Head Neck.* 2013;35:747–755.
- Prigge ES, Arbyn M, von Knebel Doeberitz M, Reuschenbach M. Diagnostic accuracy of p16(ink4a) immunohistochemistry in oropharyngeal squamous cell carcinomas: A systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer.* 2017;140:1186–1198.
- Huang SH, O'Sullivan B. Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. *Curr Treat Options Oncol.* 2017 Jul;18(7):40.
- Nasman A, Attner P, Hammarstedt L, et al. Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma? *Int J Cancer.* 2009;125:362–6.
- de Sanjose S, Serrano B, Tous S, et al. Burden of human papillomavirus (HPV)-related cancers attributable to HPV6/11/16/18/31/33/45/52 and 58. *JNCI Cancer Spectr.* 2019;2:pk0405
- ÚZIS. Novotvary 2018 ČR. Praha: ÚZIS. Available from: <https://www.uzis.cz/res/f/008352/novotvary2018.pdf>.
- Pavel Šlampa, et al. Radiační onkologie. Pro postgraduální přípravu i každodenní praxi. Praha: Maxdorf, 2021.
- D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med.* 2007;356:1944–1956.
- Kero K, Rautava J, Syrjanen K, Willberg J, Grenman S, Syrjanen S. Smoking increases oral HPV persistence among men: 7-year follow-up study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014 Jan;33(1):123–33.
- Letian T, Tianyu Z. Cellular receptor binding and entry of human papillomavirus. *Virol J.* 2010 Jan 6;7:2.
- Rasi Bonab F, Baghbanzadeh A, Ghaseminia M, Bolandi N, Mokhtarzadeh A, Amini M, Dadashzadeh K, Hajiasgharzadeh K, Baradaran B, Bannazadeh Baghi H. Molecular pathways in the development of HPV-induced cervical cancer. *EXCLI J.* 2021 Feb 12;20:320–337.

16. Tichý O. Výdaje za léčbu rakoviny rostou rychleji než počty nemocných. Za 5 let o 2 miliardy [online]. VZP. Available from: <https://www.vzp.cz/o-nas/aktuality/vydaje-za-lecbu-rakoviny-rostou-rychleji-nez-pocty-nemocnych-za-5-let-o-2-miliardy>.
17. FDA. Gardasil 9 [online]. Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/gardasil-9>.
18. Pinto LA, Kemp TJ, Torres BN, Isaacs-Soriano K, et al. Quadrivalent Human Papillomavirus (HPV) Vaccine Induces HPV-Specific Antibodies in the Oral Cavity: Results From the Mid-Adult Male Vaccine Trial. *The Journal of Infectious Diseases*. 2016 Oct 15;214(8):1276–1283.
19. Hirth JM, Chang M, Resto VA, Guo F, Berenson AB. Prevalence of oral human papillomavirus by vaccination status among young adults (18–30 years old). *Vaccine*. 2017;35:3446–3451.
20. Chaturvedi AK, Graubard BI, Broutian T, Pickard RK, et al. Effect of prophylactic human papillomavirus (HPV) vaccination on oral HPV infections among young adults in the United States. *J Clin Oncol*. 2018;36:262–267.
21. Castillo A, Osorio JC, Fernández A, Méndez F, et al. Effect of vaccination against oral HPV-16 infection in high school students in the city of Cali, Colombia. *Papillomavirus Res*. 2019;7:112–117.
22. Mehanna H, Bryant TS, Babrah J, Louie K, et al. Human Papillomavirus (HPV) Vaccine Effectiveness and Potential Herd Immunity for Reducing Oncogenic Oropharyngeal HPV-16 Prevalence in the United Kingdom: A Cross-sectional Study. *Clin Infect Dis*. 2018; 69:1296–1302.
23. Herrero R, Quint W, Hildesheim A, Gonzalez P, et al. Reduced Prevalence of Oral Human Papillomavirus (HPV) 4 Years after Bivalent HPV Vaccination in a Randomized Clinical Trial in Costa Rica. *PLoS ONE*. 2013;8(7):e68329.
24. Lehtinen M, Apter D, Eriksson T, Harjula K, et al. Effectiveness of the AS04-adjuvanted HPV-16/18 vaccine in reducing oropharyngeal HPV infections in young females—Results from a community-randomized trial. *Int J Cancer*. 2020;147:170–174.
25. Johns Hopkins University Bloomberg School of Public Health. HPV vaccination will reduce throat and mouth cancers, but overall impact will take 25-plus years to see: Modeling study concludes that rates of HPV-related cancers will fall substantially in well vaccinated, younger age groups in the next two decades [online]. *ScienceDaily*, 2021 Sep 2. Available from: www.sciencedaily.com/releases/2021/09/210902174722.htm.
26. Lehtinen M, Apter D, Eriksson T, Harjula K, et al. Effectiveness of the AS04-adjuvanted HPV-16/18 vaccine in reducing oropharyngeal HPV infections in young females. Results from a community-randomized trial. *Int J Cancer*. 2020;147:170–174.
27. Falcaro M, Castanon A, Ndlela B, Checchi M, et al. The effects of the national HPV vaccination programme in England, UK, on cervical cancer and grade 3 cervical intraepithelial neoplasia incidence: a register-based observational study. *Lancet*. 2021 Dec 4;398(10316):2084–2092.

Korespondující autor:

MUDr. Stanislav Batko

Onkologická klinika FN Motol a 2.

LF UK

Roentgenova 37

150 00 Praha 5-Motol

E-mail: stanislav.batko@gmail.com

SARS-CoV-2 diagnostika pomocí RT-PCR

SARS-CoV-2 diagnosis using RT-PCR

Barbora Macúchová,^{1,2} Vanda Boštíková,¹ Hana Bílková Fránková²

¹Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany, Hradec Králové

²Laboratoř klinické mikrobiologie, Laboratoře Agel, Ostrava-Vítkovice

Souhrn

Vysoce infekční onemocnění covid-19, vyvolávané velmi rychle se vyvíjejícími variantami a subvariantami nového koronaviru SARS-CoV-2, je bezesporu zásadní výzvou pro mikrobiologické laboratoře, stejně jako celá pandemická situace, ve které se nyní nacházíme celosvětově již třetím rokem. Během velmi krátké doby bylo nutné v diagnostických laboratořích po celém světě nejen přeorientovat provoz na mnohonásobně zvětšení objemu testovaných klinických vzorků, ale v první řadě přizpůsobit nově vzniklé zdravotnické situaci diagnostiku jako takovou. Zlatým standardem diagnostické klinické detekce viru SARS-CoV-2 jsou RT-PCR testy, které jsou velmi senzitivní a specifické. Je to právě molekulárně biologická diagnostika, která má při správném nastavení a použití schopnost dostat spolu s protiepidemickými opatřeními situaci pod kontrolu. Nicméně v laboratorní diagnostice je nutné počítat s celou řadou faktorů, od odběru vzorku až po samotné vyhodnocení výsledků analýzy. Následující text vychází z konkrétní zkušenosti české molekulárně biologické laboratoře, kde jsou klinické vzorky zpracovávány od samého počátku po odběru až po jejich vyhodnocení a předání výsledných dat zpět na klinická pracoviště.

Klíčová slova: covid-19, SARS-CoV-2, koronaviry, pandemie, molekulární diagnostika, mikrobiologie, PCR, virové onemocnění, infekční choroby

Summary

The highly infectious disease COVID-19 caused by rapidly evolving variants and sub-variants of the novel SARS-CoV-2 is a grand challenge for microbiological laboratories as well as the whole world pandemic situation that has been going on for three years. During very short period all the laboratories were pushed to change their routine to be able to process increased number of clinical samples and also change the entire diagnostics to suit the new situation in healthcare. The golden standard of clinical diagnostic detection of SARS-CoV-2 are RT-PCR tests, which are very sensitive and specific. It is the molecular biological diagnostics that, when properly set up and used, can bring the situation under control together with antiepidemic measures. Nevertheless, it is important to count with a couple of important factors from a sample collection to the final analysis of the results in laboratory diagnostics. The following text is based on the experience of Czech molecular biology laboratory, where the samples are processed from the very beginning after collection of samples to their evaluation of results and transmission of the resulting data back to clinical workplaces.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, coronaviruses, pandemic, molecular diagnostic, microbiology, PCR, viral disease, infectious diseases

Vakcinologie 2022;17(2):86–96

Úvod

Virus SARS-CoV-2 se za pouhé čtyři měsíce od svého prvního popisu rozšířil prakticky po celé planetě a vyvolal pandemii, která přetrvává do současnosti. Onemocnění covid-19 se projevuje širokou škálou symptomů, od kašle, bolesti v krku, přes horečnaté stavy, bolest svalů, ztrátu čichu

a chuti, bolesti hlavy. Nicméně různé varianty a subvarianty SARS-CoV-2 vyvolávají u infikovaných osob různé symptomatické projevy. Faktem zůstává, že bez ohledu na specifitu viru může onemocnění přejít až do akutní plicní nedostatečnosti a postihovat také další orgány (1).

Rychlé šíření nového koronaviru bylo jednoznačnou výzvou a nut-

ností pro vytvoření rychlé, specifické a senzitivní diagnostiky, jejímž zlatým standardem stále zůstává „real-time“ RT-PCR (polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí v reálném čase).

Pro rychlou diagnostiku s výsledkem do desítek minut je možné využít antigenní testy, které ale mají nižší senzitivitu. Přestože konfirmace výsledku antigenního testu pomocí

PCR není již povinná, je stále vhodné využít PCR test pro ověření. Na provedení tohoto testu je potřeba indikace lékařem, případně laboratoř může test zájemci provést za úplatu (2).

Důležité je nezapomínat na možnou navazující sekvenaci či genotypizaci pozitivního klinického materiálu. Obzvláště v souvislosti s atypickými symptomy či průběhem předpokládaného onemocnění covid-19. Jedině sekvenace nám dává informaci o tom, jaké varianty či subvarianty SARS-CoV-2 v populaci cirkulují a umožňuje predikci, stejně jako zavedení příslušných protiepidemických opatření, včetně modifikace očkovacích látek.

Molekulárně genetická diagnostika viru SARS-CoV-2 – úvodní preanalytická fáze

Důležitým bodem v diagnostice SARS-CoV-2 je preanalytická fáze, tedy správně provedený odběr vzorku od testované osoby a následné uchování vzorku při transportu do laboratoře. Podle doporučení Střediska pro kontrolu a prevenci nemocí a Světové zdravotnické organizace (CDC, Centers for Disease Control and Prevention; WHO, World Health Organization) je při odběru nejdůležitější odebrat vzorek ze správné lokality (výtěr z orofaryngu nebo nazofaryngu), použít pro odběr standardizovaný materiál a odběr zbytečně neuspěchat (je doporučeno držet odběrový tampon na místě pár sekund a několikrát jej protočit). Po odběru je nutné vzorek umístit do VTM, transportního média pro viry (Biocomma Limited, Hunan Runmei Gene Technology Co. a další výrobci) (3). Lze použít také UTM – univerzální transportní médium (Copan Diagnostics), které je vhodné i pro odběr na PCR vyšetření pro chřipku, RSV (respirační syncytiální virus), stejně jako bakterii *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* a jiné původce respiračních onemocnění (4, 5). Pro počáteční fázi onemocnění je doporučeno odebrat vzorky z horních cest dýchacích (doporučení WHO).

Společný odběr z nazofaryngu a orofaryngu zvyšuje senzitivitu vyšetření na 89–92 %. Separátní odběry mají 85% senzitivitu pro nazofarynge-

ální výtěry a 80% senzitivitu pro orofaryngeální výtěry (6). Oba odběrové tampony je možné umístit do společné zkumavky s transportním médiem. Pro zvýšení komfortu testování byly také použity odběry ze slin. Světová zdravotnická organizace doporučuje pro pozdější fázi onemocnění nebo pro případy, kdy je pacient SARS-CoV-2 negativní po odebrání nazofaryngeálního stěru i přes klinické příznaky, odebírat vzorky z dolních cest dýchacích (sputum, endotracheální aspirát, bronchoalveolární laváž) (7).

Vzorky by měly dorazit do laboratoře co nejdříve po odebrání a měly by být přepravovány při teplotě 2–8 °C (doporučení WHO, CDC). Teplota a čas nejsou jednoznačně kritickým faktorem pro preanalytickou fázi. Pokud nedochází k extrémním výkyvům teplot (nad 37 °C), jsou vzorky schopny vydržet při pokojové teplotě (18–21 °C) až pět dní, ačkoliv uskladnění vzorků v lednici při teplotě 2–8 °C zajišťuje vyšší reprodukovatelnost výsledků. U vzorků s malou virovou náloží (asymptomatictí pacienti, pacienti na začátku nebo konci onemocnění) je nejkritičtější právě samotný odběr, který při nesprávném provedení generuje falešně negativní výsledky (8, 9).

Analytická fáze testování

Zcela zásadní vliv na výsledek RT-PCR analýzy, od kterého se vše dále odvíjí, má extrakce nukleových kyselin viru (v případě SARS-CoV-2 ribonukleové kyseliny RNA) – jejich kvalita a kvantita. V průběhu PCR analýzy je RNA SARS-CoV-2 reverzní transkripcí přepsána do cDNA (komplementární DNA), protože PCR reakce potřebuje jako výchozí templát dvouvláknovou nukleovou kyselinu. Následně v opakujících se krocích denaturace (rozvolnění dvoušroubovice), annealingu (připojení značených primerů) a elongace (syntéza prodlužování řetězce nukleové kyseliny začínající od primerů podle templátu jednoho vlákna původní molekuly cDNA) je původně izolovaná RNA mnohonásobně pomnožena a díky primerům s připojenou fluorescenční značkou jsme schopni sledovat nárůst počtu kopií v reálném čase pomocí „real-

-time“ termocyklérů. Nejčastěji interferuje DNA (deoxyribonukleová kyselina) a proteiny z lidských buněk, které se izolují spolu s RNA a kompetitivně snižují efektivitu reakce. Zvolení vhodné extrakční procedury je klíčové pro získání kvalitních výsledků. Můžeme se setkat se dvěma hlavními přístupy – extrakcí na kolonkách (Qiagen, Elisabeth Pharmacon, Geneproof, Roche) a extrakcí s pomocí magnetických částic (Generi Biotech, Roche, Diana Biotechnologies, Nextactor NX-48S Genolution). Oba přístupy je možné automatizovat, ale rozšířenější jsou automaty na principu magnetických částic (cobas 6800 System, Roche; Bravo Automated Liquid Handling System, Agilent), které zvládnou izolovat 96 vzorků v řádu desítek minut.

Metoda spočívá ve smíchání vyšetřovaného vzorku s lyzačním roztokem. Z odběrové zkumavky s patientským vzorkem odebereme dle výrobce užívané diagnostiky menší množství média (např. pro diagnostiku firmy Diana Biotechnologies odebíráme 100 µl patientského vzorku, pro Nextactor firmy Genolution 200 µl) a napipetujeme ho do jedné jamky v izolační destičce, kde je definovaný objem lyzačního roztoku (opět závisí na výrobci diagnostik). Pro velkokapacitní testování se využívá formát 96jamkové destičky, kde se souběžně izoluje 94 patientských vzorků, negativní kontrola a pozitivní kontrola. Lyzační roztok obsahuje látky porušující virové obaly pro uvolnění nukleové kyseliny a také proteiny, které denaturují RNázy – enzymy degradující RNA. K lyzátu jsou následně přidány magnetické částice, které jsou uchovávány v roztoku etanolu. Za stálého promíchávání na magnetické částice adsorbuje RNA a po dostatečné inkubaci (liší se dle použité diagnostické soupravy) je celá 96jamková deska přenesena na magnetický podstavec, který stáhne magnetické částice ke dnu, aby bylo možné odsát zbytek lyzátu od magnetických částic se zachycenou RNA. Částice jsou několikrát promyty roztokem etanolu, kdy se opakuje postup promytí na podstavci bez magnetu a poté přenos na magnetický podstavec pro umožnění odsátí promývacího roztoku od

magnetických částic. Nakonec je RNA eluována do PCR vody, což je ultra čistá voda bez kontaminantů a enzymů degradujících RNA (RNázy) (10). Testy PCR jsou náchylné ke kontaminaci, je proto nutné dodržovat přesně všechny postupy a opatření, abychom tomu předešli.

RT-PCR

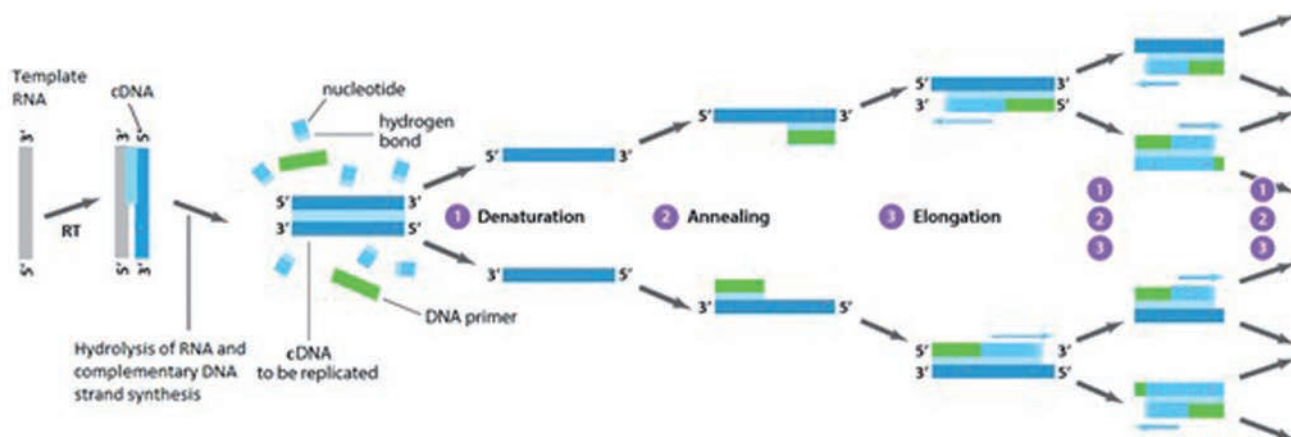
RT-PCR je zkratka pro polymerázovou řetězovou reakci s reverzní transkripcí. Pokud je jako detekční přístroj používán „real-time“ termocyklér, jedná se o polymerázovou řetězovou reakci s reverzní transkripcí s detekcí v reálném čase. Jak již bylo popsáno výše, jedná se o cyklickou reakci, která slouží k namnožení úseku nukleové kyseliny na základě primerů (krátké úseky nukleových kyselin mohou být navázané na fluorescenční značení) specifických pro patogen. Primery pro jednotlivé patogeny jsou odvozovány z jejich genomové sekvence. Pokud neznáme genom patogenu, nejsme schopni připravit ani specifickou PCR reakci.

SARS-CoV-2 je obalený, jednovláčkový RNA virus s pozitivní polaritou a relativně velkým genomem (30 kb). Cílem RT-PCR analýzy je nejčastěji průkaz sekvencí genů pro ORF1ab (open reading frame – otevřený čtecí rámec nukleové kyseliny, začíná u start kodonu transkripce a končí stop kodonem, podle kterého se syntetizuje polypeptidový řetězec pro skladbu virových proteinů; počátků i konců v jedné sekvenci může být více a vytváří se tak odlišné polypeptidy podle toho, kde transkripce začne),

nukleokapsidu (N), obal (E), RNA-dependentní RNA polymerázu (RdRp) a spike (S), na které jsou designované primery. V prvních publikacích byl pro odvození primerů na SARS-CoV-2 použit gen S, protože byl specifický pro tento konkrétní typ koronaviru a nesdílel podobnost s geny jiných lidských koronavirů (11). Primery pro ORF1ab, N a RdRp mají vyšší druhovou specifitu než S a E, které se používají pro obecnější screening (rozeznávají obecně koronaviry spojené s těžkým akutním respiračním syndromem, tedy i SARS-CoV-1) a v analýze jsou vždy doplněny jedním z prvních tří jmenovaných (12). CDC doporučuje využívat primery pro N gen (N1 a N2), zatímco WHO doporučuje kombinaci primerů pro RdRp spolu s E. Ačkoliv se jedná o variabilní regiony, není tím zasažena citlivost primerů právě kvůli použití dvou různých genů pro detekci přítomnosti SARS-CoV-2. Je však stále nutné sledovat nové varianty viru, protože časem může dojít k natolik významné mutaci, že ovlivní navazování primerů. Při velké změně sekvence viru by aktuální diagnostické postupy nemusely přítomnost viru rozpoznat, což se dosud nestalo, ale již byly vypořádovány posuny ve výsledcích analýz na základě přítomnosti mutace (13). WHO také doporučuje použití primerů pro gen S, který kóduje povrchový spike protein, zodpovědný za navazání viru na receptory buněk. Jedná se o intenzivně mutující region v genomu, a právě primery na jednotlivé mutace umožnily použití diskriminační PCR pro rozlišení jednotlivých variant koronaviru (14).

rRT-PCR je doslovně polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí v reálném čase. Reverzní transkripce je proces, kdy se RNA viru přepisuje do cDNA, protože DNA polymeráza potřebuje jako templát dvouvláčkovou nukleovou kyselinu. Diagnostické testy na většinu RNA virů kombinují reverzní transkripci spolu se samotnou polymerázovou řetězovou reakcí. Transkripce trvá obvykle 10–20 minut, zatímco PCR 60–120 min, čas je u každého výrobce odlišný (15, 16).

Výsledek je odečten pomocí amplifikační křivky, kdy, pokud je vzorek pozitivní, s každým cyklem reakce roste také fluorescence vzorku snímaná přístrojem. Fluorescence pochází z fluorescenčních značek navázaných na primery, které v případě rozeznání cílové sekvence emitují fluorescenci detekovatelnou termocyklérem. Platí, že čím více cílových sekvencí, tím silnější fluorescenční signál. V případě negativity je přítomna pouze amplifikační křivka, která se do reakce přidává pro kontrolu izolace a inhibice. V případě nepřítomnosti interní kontroly je nutné analýzu zopakovat, a pokud nevyjde ani poté, je třeba znovu odebrat vzorek pacienta. Pozitivní vzorky by měly mít Ct („crossing point“ – cyklus reakce, ve kterém se sumární signál zvýšil natolik, že překročil „threshold“ – hodnotu signálu stanovenou pro pozitivitu) do 40. Vzorky s Ct po 40. cyklu jsou považovány za negativní, pokud nejsou známy podrobnější údaje o pacientovi (nemocný člen rodiny, klinické přízna-



Obr. 1 Schéma polymerázové řetězové reakce s reverzní transkripcí. Zdroj: <https://laboratorytests.org>

ky). Vzorky s Ct mezi 37–40 se také obvykle testují podruhé. V případě, že i podruhé vyjdou stejně, doporučuje se opětovné odebrání vzorku (doporučení dle výrobce kitu Diana Biotechnologies, souprava DB-1211 COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit). Rozpor mezi výrobcí (negativní výsledek nad Ct 40, ideální je i takové vzorky opakovaně testovat) a doporučením MZ ČR (negativní výsledek nad Ct 35 při splnění určitých podmínek) vedl k tomu, že většina laboratoří přistoupila k jisté „střední cestě“ a došlo k vytvoření interních manuálů upravujících postup při nejasném výsledku testu. Při nastavování thresholdu je nutné vzít do úvahy také aktuální epidemiologickou situaci. V případě mohutného rozšíření nemoci budou pravděpodobně pozitivní i vzorky s vysokým Ct, zatímco v době malého rozšíření by měly být Ct hodnoty nižší (6).

Ct a virová nálož

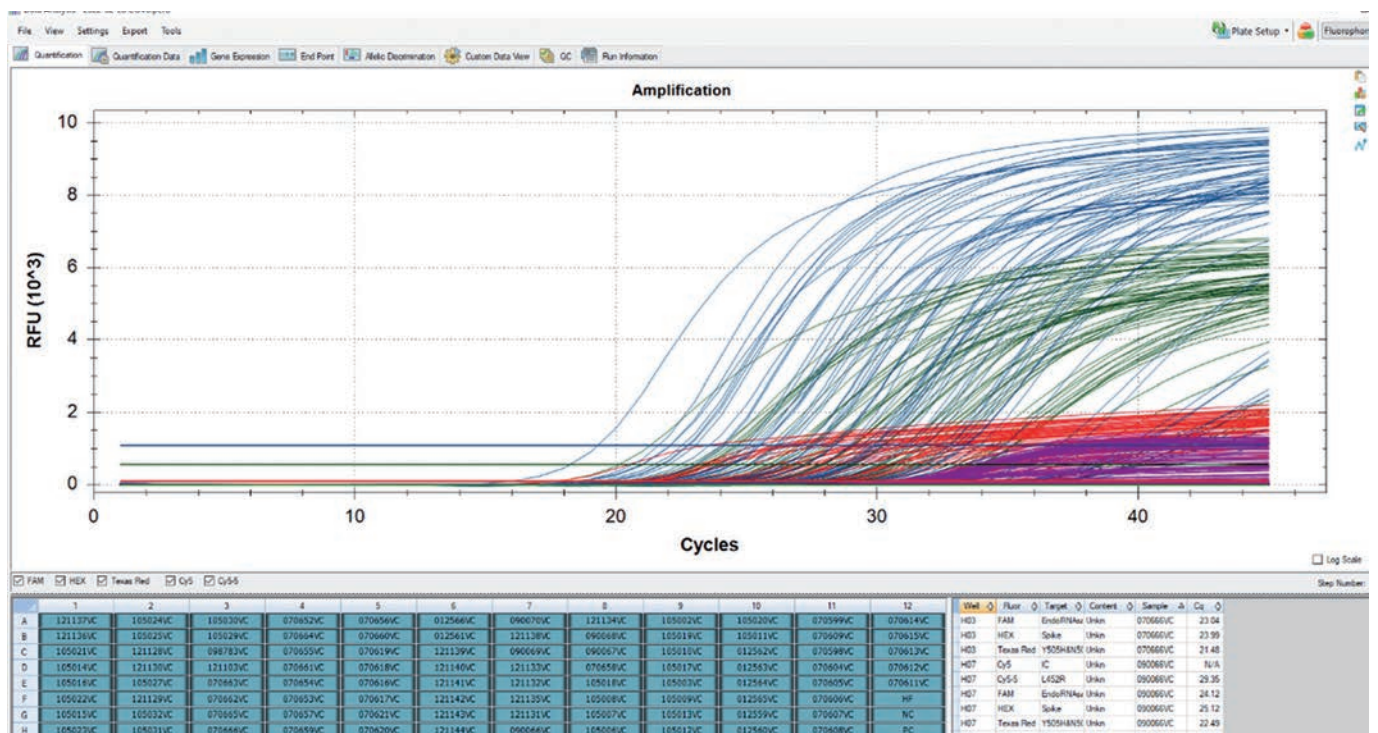
Celosvětová data naznačují, že virová nálož je u pacienta nejvyšší v době nástupu symptomů a klesá jeden až tři týdny. Obecně po dvou týdnech od nástupu symptomů bychom již

ve vzorcích z horních cest dýchacích neměli detekovat přítomnost virové RNA, ačkoliv to je u každého pacienta individuální. Ve vzorcích z dolních cest je možné RNA viru detekovat o něco déle (15,5 dne), jelikož vrchol virémie přichází později a virus zde přežívá déle. Vztah mezi virovou náloží, infekčností a detekovatelností SARS-CoV-2 není plně objasněn, jelikož přítomnost virové RNA ještě neznamená přítomnost živého viru. Studie ukazují, že pacienti mohou být infekční jeden až tři dny před nástupem příznaků a životaschopný virus byl izolován ze vzorků pacientů až šest dní před nástupem příznaků. Některé studie uvádějí úspěšnou izolaci viru i po 18 dnech. Virové nálož u symptomatických a asymptomatických pacientů se příliš neliší a je složité odlišit, zda došlo k nákaze presymptomatickým nebo asymptomatickým člověkem (17). Doporučení ohledně izolace pozitivních osob se různí – WHO doporučuje 10 dní po pozitivním testu bez ohledu na to, zda má člověk příznaky (18). CDC doporučuje pět dní izolace a minimálně dalších pět dní striktního nošení respirátoru a v ČR je doba izolace sedm dní po pozitivním testu. Po roz-

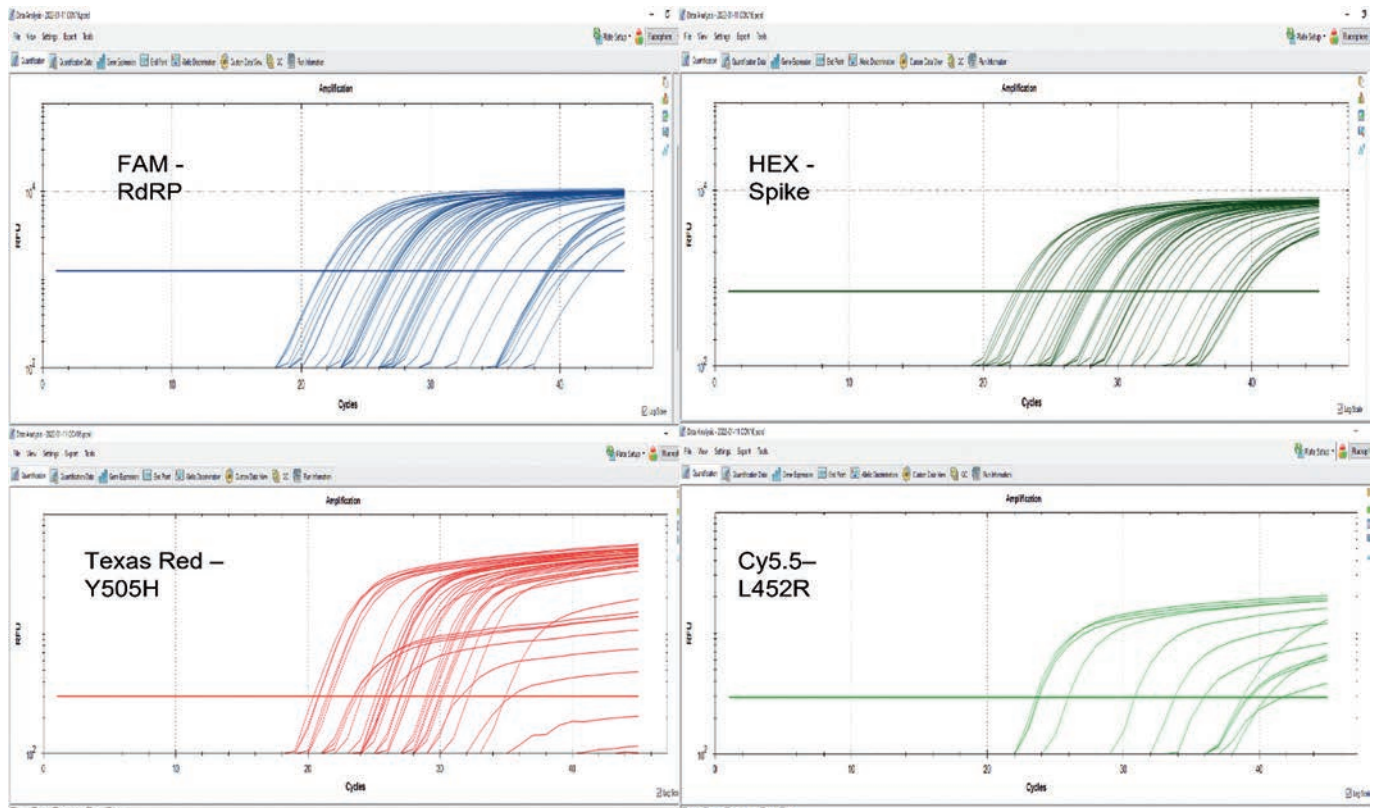
šíření varianty omikron se izolační doby zkrátily, protože nejčastěji docházelo k nákaze jeden až dva dny před symptomy a dva až tři dny po nich (19, 20, 21).

Virová nálož je spjata s hodnotou Ct, ale v kvalitativním rozlišení reakce (tzn. nemáme v každé reakci přesný kalibrátor) vypovídá o kvantitě pouze orientačně. Bez dalších souvislostí a informací nemůžeme považovat Ct hodnotu za rozhodující faktor pro určení skutečné pozitivity či negativity. Vysoké hodnoty Ct (nad 35) jsou odrazem množství viru izolovaného ze vzorku odebraného v určitém momentu. Může se jednat jak o začátek onemocnění, tak o jeho konec a také nemůžeme vyloučit chybu při odběru nebo samotném zpracování. Za pravděpodobně neinfekční mohou být považováni pacienti s Ct nad 35, pouze pokud jim byla již dříve prokázána pozitivita na covid-19 (s odstupem max. 1 měsíce), mají pozitivní nález IgG protilátek na covid-19, nejsou v riziku reinfekce a jsou imunokompetentní (22).

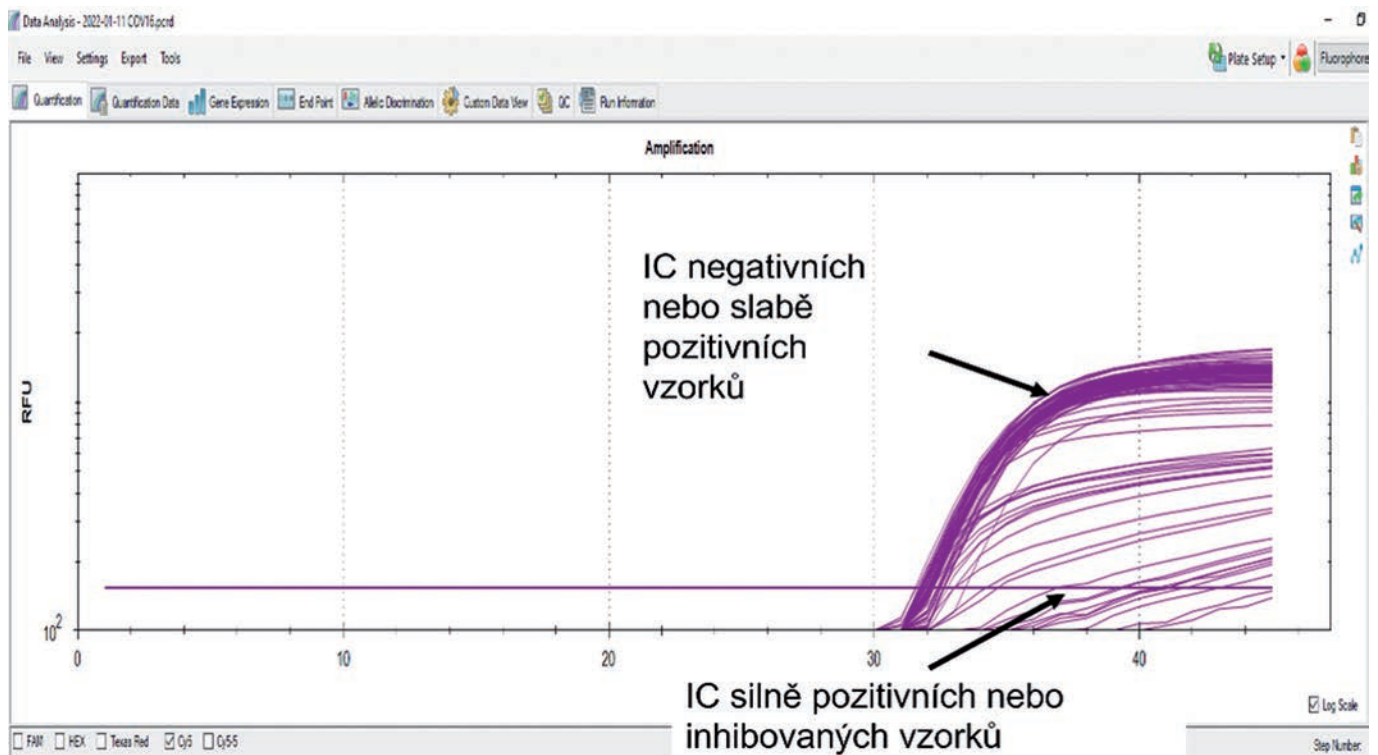
V prosinci loňského roku se objevila varianta omikron a převážila všechny ostatní cirkulující varianty v populaci. Přibýlo více nakažených



Obr. 2 Surová data po ukončení RT-PCR analýzy covidu-19 na pěti fluorescenčních kanálech. V každé analýze je možné vyšetřovat až 94 vzorků a k nim dvě kontroly – pozitivní a negativní. Na obrázku jsou data v lineárním módu, pro samotné vyhodnocení se častěji využívá logaritmický mód. Zdroj: Laboratoře Agel



Obr. 3 Pohled na jednotlivé fluorescenční kanály, na kterých je vyhodnocována pozitivita vzorku, případně mutace. Kanál FAM a HEX slouží pro určení positivity a odečtení Ct hodnot pro vzorky. Kanál Texas Red detekuje přítomnost mutace Y505H typické pro variantu omikron (obě verze, jak BA.1 tak BA.2) a kanál Cy5.5 přítomnost (v dnešních dnech již málo rozšířená) mutace L452R varianty delta. Při detekci mutace L452R dochází k nárůstu signálu také v kanálu Texas Red, proto je před odečtem z kanálu Texas Red třeba nejdříve odfiltrovat vzorky pozitivní v kanálu Cy5.5. Zdroj: Laboratoře Agel

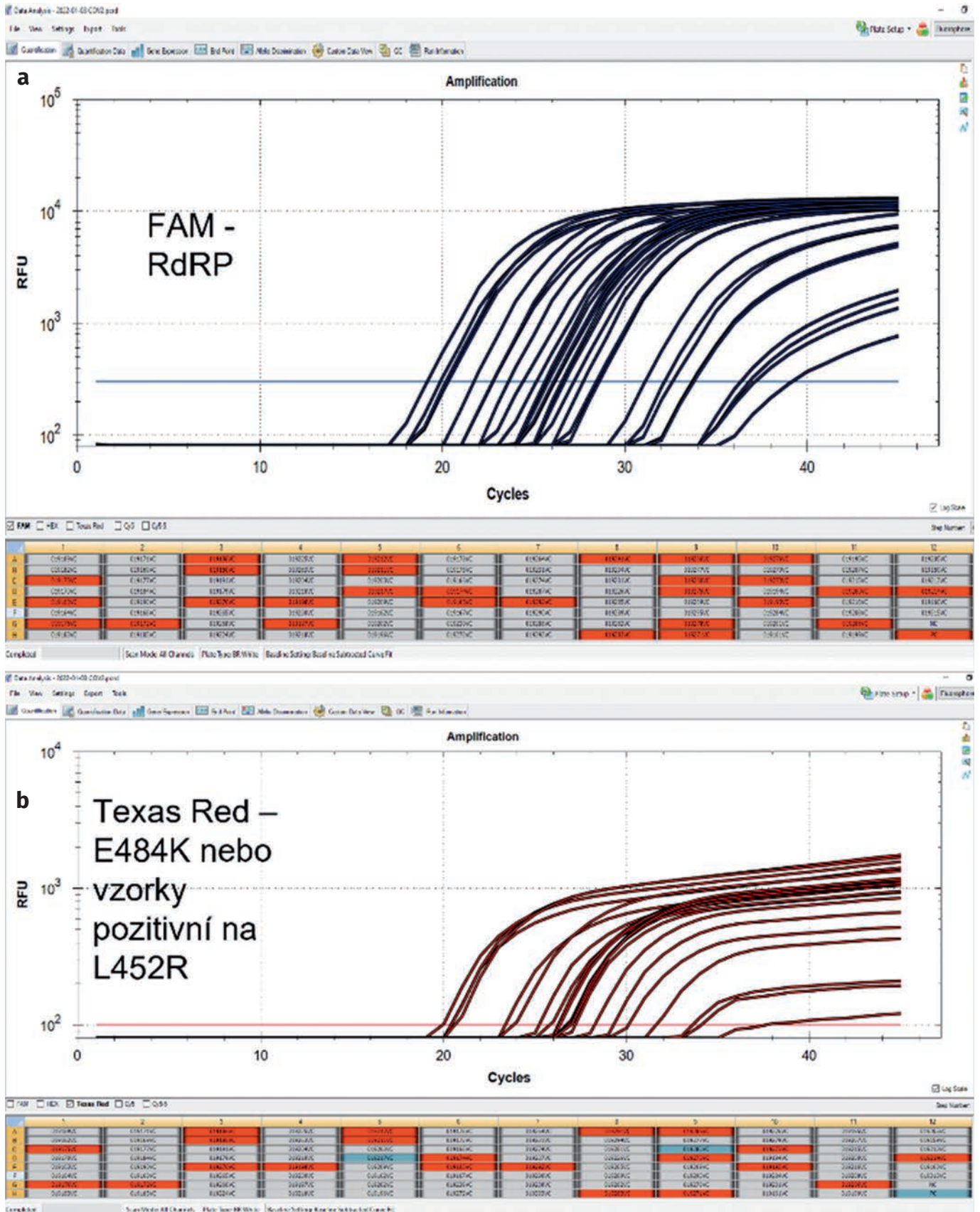


Obr. 4 Pátý fluorescenční kanál Cy5 je vyhrazen interní kontrole (IC). Ta musí být prokázána u všech negativních vzorků, u pozitivních bývá deformovaná. Deformace nebo nepřítomnost IC u negativního vzorku je důvodem k opětovné izolaci a opětovné analýze vzorku. Pokud se ani podruhé neprokáže přesvědčivě pozitivita nebo negativita s dobrou IC, je vyžadován nový odběr z důvodu přítomnosti inhibitorů ve vzorku. Při odběrech slin je častá inhibice z důvodu nedodržení podmínek před samotným odběrem (konzumace potravin, nápojů, kouření nebo kloktání). Zdroj: Laboratoře Agel

očkováných pacientů oproti variantě delta, ale tito lidé nebyli tak často hospitalizováni na jednotkách intenzivní péče a nemoci nepodléhali.

Nebyl prokázán významný rozdíl v Ct hodnotách mezi jednotlivými variantami mezi očkovánými a neočkovánými. U varianty delta byl menší záchyt

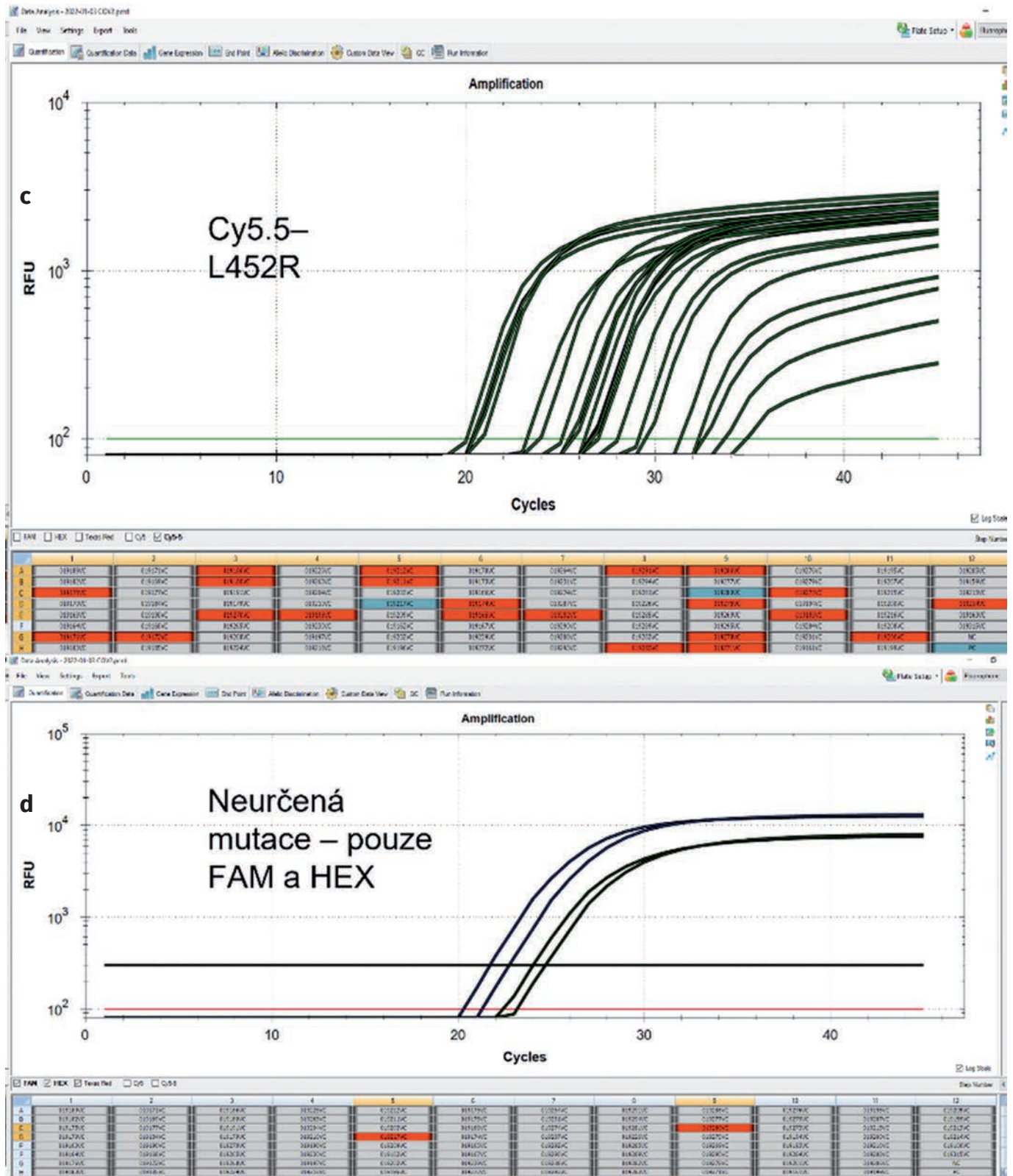
viabilního viru ze vzorků u pacientů s boosterem, zatímco u omikronu neměla vakcinace na záchyt infekčního viru vliv (23).



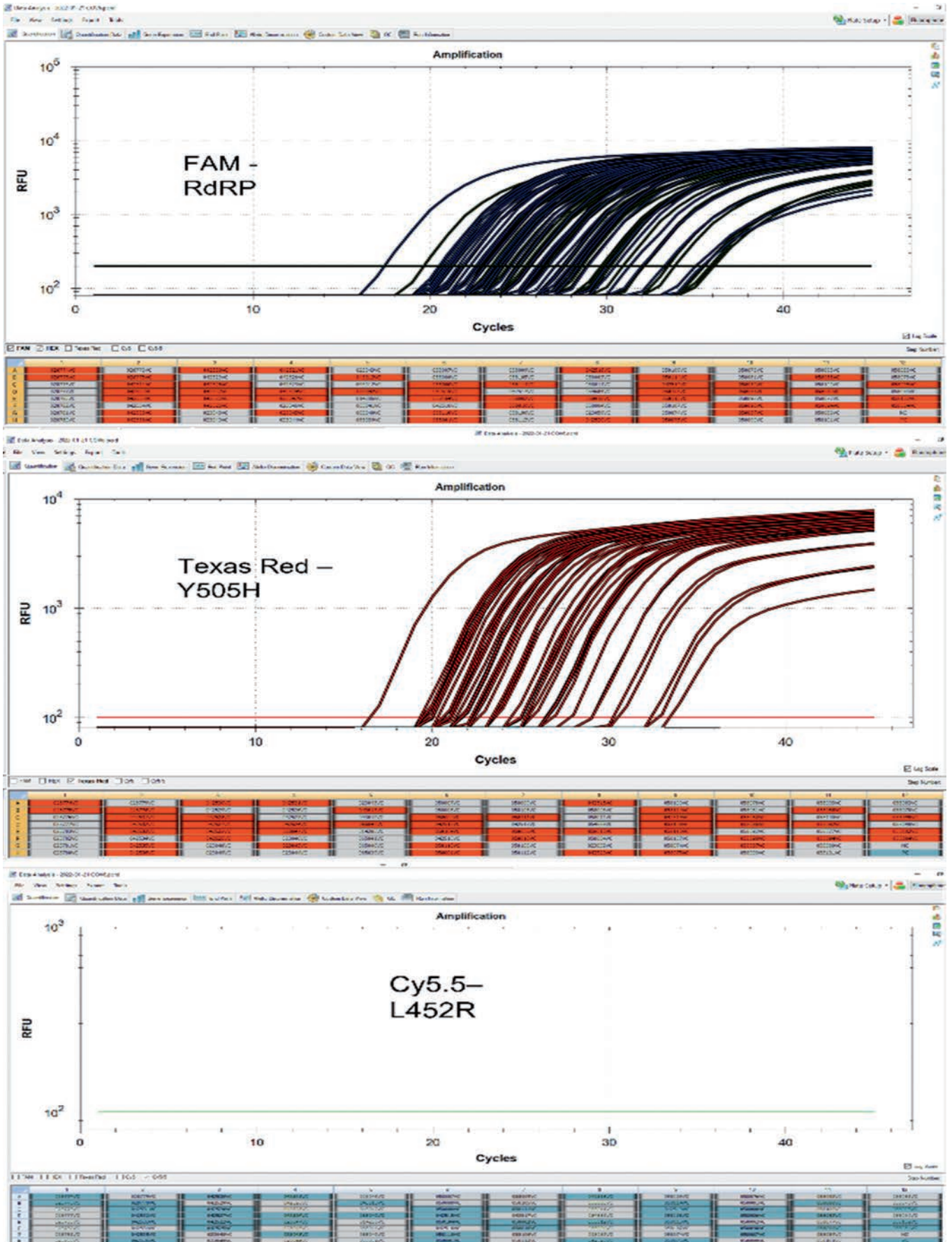
Většina laboratoří při interpretaci výsledků z analýzy všechny tyto informace o pacientovi nemá, proto ke všem vzorkům s hodnotami

Ct mezi 35–40 přistupují obezřetně a často přihlížejí k doplňkovým informacím na žádankách od lékařů. Je však nutné mít na paměti, že při

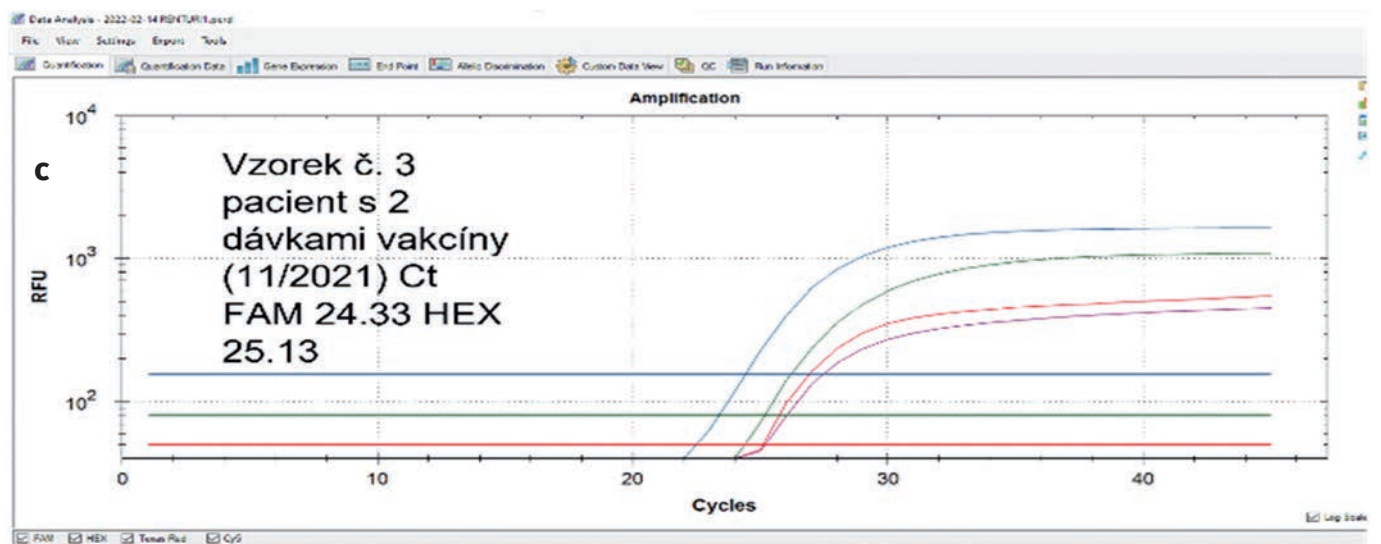
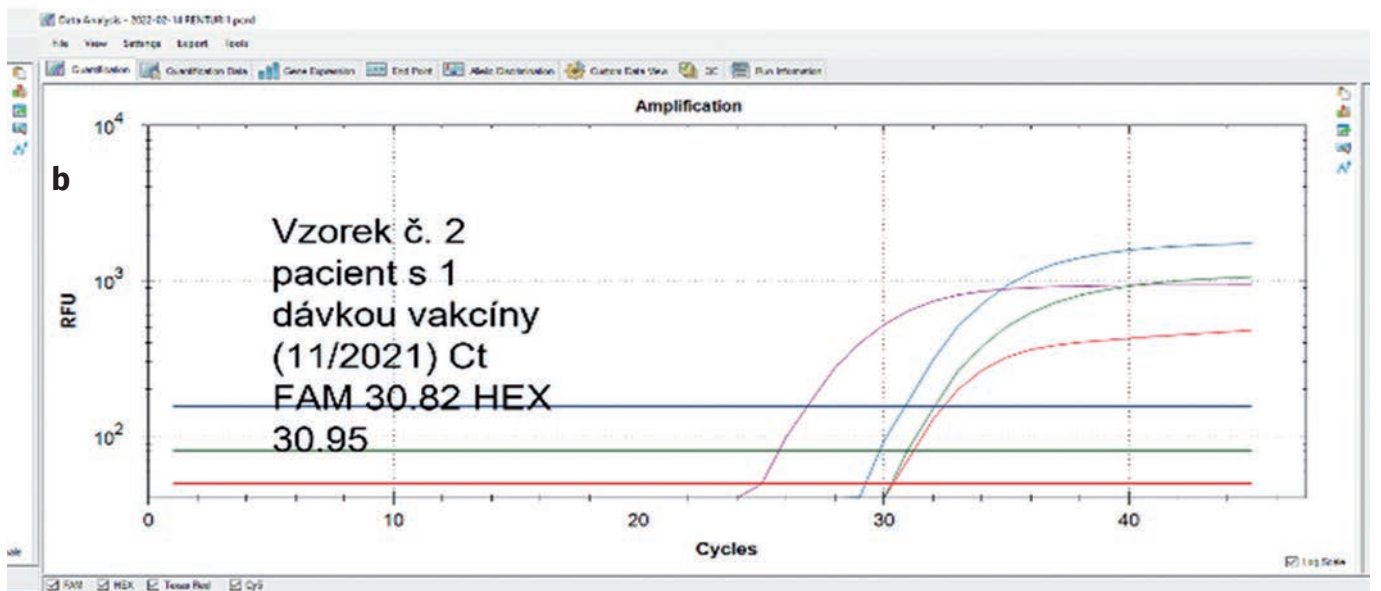
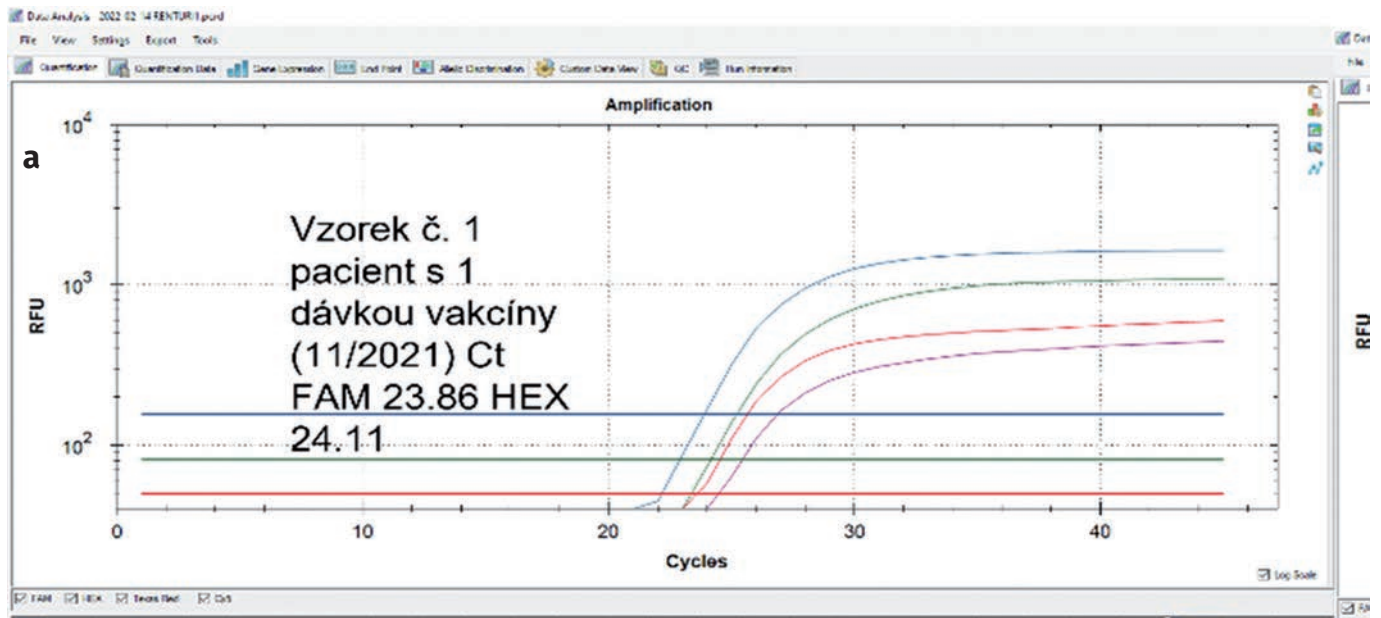
kvantu vzorků, které byly zpracovávány na vrcholu pandemických vln, je nemožné se každému vzorku věnovat dopodrobna. V naší laboratoři jsme



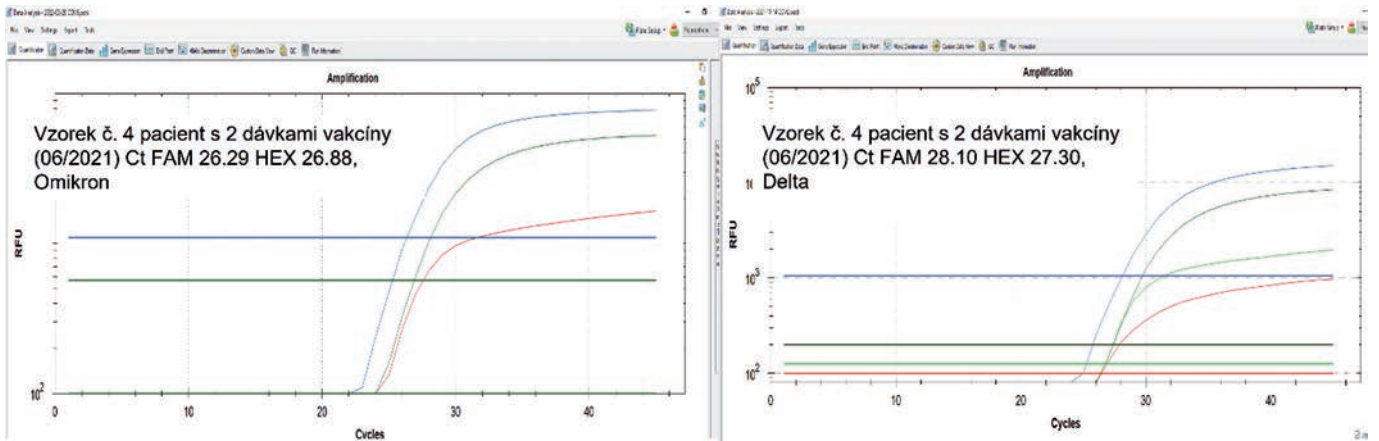
Obr. 5a–d Použití aditiva DB-1244 COVID-19 Additive S:L452R|E484K, kde na kanálu Texas Red detekujeme mutaci E484K, případně pozitivní L452R. Na začátku tohoto roku se začaly objevovat vzorky, kde se s pomocí této soupravy mutace určit nedala. Byly to první případy varianty omikron, která během pár týdnů převládla. Zdroj: Laboratoře Agel



Obr. 6 Rychlý nástup převahy varianty omikron. Analýza v obr. 4 proběhla 3. 1. 2022 a analýza v obr. 5 21. 1. 2022. Omikron se udržuje jako převládající varianta a na detailnějších diskriminačních PCR je možné rozlišit varianty BA.1 a BA.2. Většina vzorků, u kterých nevyjde mutace Y505H v první RT-PCR reakci, jsou později identifikovány jako BA.2. Zdroj: Laboratoře Agel



Obr. 7a–c Očkování, kteří se nakazí omikronem, mají relativně vysoké Ct hodnoty, bez ohledu na počet dávek vakcíny. Zdroj: Laboratoře Agel



Obr. 8 Pacient s druhou dávkou vakcíny (17. 6. 2021), Ct hodnoty po infekci variantou delta (14. 10. 2021) a omikronem (28. 2. 2022). Ct hodnoty se výrazně neliší Zdroj: Laboratoře Agel

zpracovávali ve vrcholícím období až 5 000 vzorků za den.

Experimentální výsledky

Na všech vyobrazených snímcích z reálných analýz je použita PCR souprava české firmy Diana Biotechnologies, konkrétně souprava DB-1211 COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit v kombinaci s příslušnými aditivami, což jsou primery pro detekci mutací. Velkou výhodou této soupravy je možnost detekovat kromě genů pro RdRp a spike také alespoň dvě mutace, v závislosti na přidaném aditivu (E484K – jihoafrická mutace, L452R – delta, Y505H – omikron).

Závěr

Ačkoliv pandemie způsobená virem SARS-CoV-2 slábne, je třeba mít neustále na paměti, s jakou rychlostí je tento virus schopen mutovat a šířit se. Přes všechno zlé nám pandemie ukázala sílu molekulárně biologických vyšetření, které se za ten krátký čas posunuly k prakticky plně automatizaci, a díky tomu bylo možné zpracovávat najednou tisíce vzorků v krátkém čase. Laboratoře velmi rychle reagovaly a přešly od ruční izolace k nízkokapacitním izolátorům a automatům. Teprve ve finální fázi se ukázala jako nejlepší cesta kombinace automatických pipetorů s vysokokapacitními izolátory. Rychlé reakce výrobců diagnostických souprav umožnily dobrý přehled laboratoří o cirkulujících mutacích a jejich rozšíření. Vývoj detekčních souprav byl umožněn díky velmi rychlé sekvenaci genomu viru pomocí metody

NGS (next generation sequencing, sekvenování nové generace), která trvala pouze několik dní od objevení prvních případů. Po této zkušenosti se také zvýšilo povědomí veřejnosti o molekulárně diagnostických metodách a o práci v klinických laboratořích, bez kterých by nebylo možné toto onemocnění sledovat.

Podporováno projektem Dopady klimatických změn na vektory přenášená onemocnění se zaměřením na problematiku klíšťat přenášených infekčních onemocnění v České republice KLÍŠŤATA (SV/FVZ202203).

Literatura:

1. Kevadiya BD, Machhi J, Herskovitz J, Oleynikov MD, et al. Diagnostics for SARS-CoV-2 infections. *Nature materials*. 2021;20(5):593–605.
2. MZČR. Covid portál. Jak se nechat otestovat [online]. Available from: <https://covid.gov.cz/situace/testovani/jak-se-nechat-otestovat>.
3. CDC. Interim Guidelines for Collecting and Handling of Clinical Specimens for COVID-19 Testing [online]. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>.
4. Copan. Product Information and How-to-Use. 2004 Dec 14. Available from: https://nvr1.ucd.ie/sites/default/files/uploads/pdfs/UTM-RT_Flocked_Polyester_Swabs.pdf.
5. Rahbari R, Moradi N, Abdi M. rRT-PCR for SARS-CoV-2: Analytical considerations. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2021; 516:1–7.
6. Sutjipto S, Lee PH, Tay JY, Mendis SM, et al. National Centre for Infectious Diseases COVID-19 Outbreak Research Team. The Effect of Sample Site, Illness Duration, and the Presence of Pneumonia on the Detection

of SARS-CoV-2 by Real-time Reverse Transcription PCR. *Open Forum Infect Dis*. 2020 Aug 3;7(9):ofaa335.

7. WHO. Diagnostic testing for SARS-CoV-2 [online]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/diagnostic-testing-for-sars-cov-2>.

8. Basso D, Aita A, Navaglia F, Franchin E, et al. SARS-CoV-2 RNA identification in nasopharyngeal swabs: issues in pre-analytics. *Clin Chem Lab Med*. 2020 Jun 22;58(9):1579–1586.

9. Hardt M, Förderl-Höbenreich E, Freydl S, Kourou A, et al. Pre-analytical sample stabilization by different sampling devices for PCR-based COVID-19 diagnostics. *New Biotechnology*. 2022;70:19–27.

10. Klein S, Müller TG, Khalid D, Sonntag-Buck V, et al. SARS-CoV-2 RNA Extraction Using Magnetic Beads for Rapid Large-Scale Testing by RT-qPCR and RT-LAMP. *Viruses*. 2020 Aug 7;12(8):863.

11. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579(7798):270–273.

12. Li D, Zhang J, Li J. Primer design for quantitative real-time PCR for the emerging Coronavirus SARS-CoV-2. *Theranostics*. 2020;10(16):7150–7162.

13. Peñarrubia L, Ruiz M, Porco R, Rao, SN, et al. Multiple assays in a real-time RT-PCR SARS-CoV-2 panel can mitigate the risk of loss of sensitivity by new genomic variants during the COVID-19 outbreak. *International journal of infectious diseases*. 2020;97:225–229.

14. Mohamadian M, Chiti H, Shoghli A, Biglari S, et al. COVID-19: Virology, biology and novel laboratory diagnosis. *The journal of gene medicine*. 2021;23(2):e3303.

15. Caruana G, Croxatto A, Coste AT, Opota O, et al. Diagnostic strategies for SARS-CoV-2 infection and interpretation of microbiological results. *Clin Microbiol Infect*. 2020 Sep;26(9):1178–1182.

16. Corman VM et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro surveillance: bulletin*

European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin. 2020;25,3:2000045.

17. Walsh KA, Jordan K, Clyne B, Rohde D, et al. SARS-CoV-2 detection, viral load and infectivity over the course of an infection. *The Journal of infection*. 2020;81(3):357–371.

18. WHO. Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance, 2 March 2020. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331329>.

19. CDC. CDC Updates and Shortens Recommended Isolation and Quarantine Period for General Population [online] Available from: <https://www.cdc.gov/media/releases/2021/s1227-isolation-quarantine-guidance.html>.

20. WHO. Coronavirus disease (COVID-19):

Home care for families and caregivers [online]. Available from: <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/coronavirus-disease-covid-19-home-care-for-families-and-caregivers>.

21. MZČR. Covid portál. Izolace [online]. Available from: <https://covid.gov.cz/situace/onemocneni-obecne-o-opatrenich/izolace>

22. Dřevínek P, Ježo E, Zákoucká H, Lengerová M, et al. Komentář k interpretaci slabě pozitivních nálezů metodou PCR s vysokými hodnotami Ct [online] Available from: <https://ppo.mzcr.cz/upload/files/narodni-strategie-testovani-onemocneni-covid-19-a-ostatni-dokumenty-komentar-k-interpretaci-slabe-pozitivnich-nalezu-metodou-pcr-s-vysokymi-hodnotami-ct-6061f4519a6d3.pdf>.

23. Fall A, Eldesouki RE, Sachithanandham J,

Paul Morris C, et al. A Quick Displacement of the SARS-CoV-2 variant Delta with Omicron: Unprecedented Spike in COVID-19 Cases Associated with Fewer Admissions and Comparable Upper Respiratory Viral Loads [online]. *MedRxiv*. 2022 Jan 28. Available from: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2022.01.26.22269927v1>.

Korespondující autorka:

Mgr. Barbora Macúchová

Fakulta vojenského zdravotnictví

Univerzita obrany

Třebešská 1575

500 05 Hradec Králové

E-mail: b.macuchova@seznam.cz

Využití biofilmů pro design a přípravu očkovacích látek – technologie 21. století

Use of biofilms for vaccine design and preparation – 21st century technology

Vanda Bošťíková,¹ Michaela Hympánová,^{1,2} Hana Straková,^{1,2} Jan Marek^{1,2}

¹Katedra epidemiologie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany

²Centrum biomedicínského výzkumu, Fakultní nemocnice Hradec Králové

Souhrn

Biofilmy mohou vytvářet bakterie, stejně jako kvasinky, houby, prvoci, či drobné mnohobuněčné organismy, které okolo sebe produkují slizovitý polysacharidový obal. Buňky biofilmu přisedají k sobě navzájem nebo jsou pevně upoutané k povrchu. Tato obálka pak umožňuje buňkám transportovat živiny, komunikovat mezi sebou, vytváří stálé prostředí a poskytuje ochranu proti toxinům, záření a také proti antimikrobním látkám. Kromě polysacharidů, nukleových kyselin, lipidů nebo enzymů v ní mohou být obsaženy i nejrůznější neorganické látky. Z toho vyplývá, že biofilm je schopný přilnout na rozličné povrchy. Biofilmy vytvořené v lidském i zvířecím organismu hrají velmi významnou roli v patogenezi nezanedbatelného množství infekčních chorob. Stojí často za velmi závažnými, chronickými a mnohdy rezistentními infekcemi. Inovace ve vývoji vakcín využívajících antigeny izolované z biofilmů představují velmi slibný přístup k prevenci infekčních onemocnění a mohou zvýšit ochranné účinky stávajících očkovacích látek.

Klíčová slova: vakcíny, vakcinace, biofilm, matrix, infekční nemoci, bakterie, viry, imunitní systém, reverzní vakcinologie

Summary

Biofilms can produce bacteria, as well as yeast, fungi or protozoa, or small multicellular organisms that produce a mucous polysaccharide shell around them. The biofilm cells adhere to each other or are firmly attached to the surface. This “envelope” then allows the cells to transport nutrients, communicate with each other, creates a stable environment and provides protection against toxins, radiation as well as antimicrobials. In addition to polysaccharides, nucleic acids, lipids or enzymes, it can contain a various of inorganic substances. It follows that the biofilm is able to adhere to various surfaces. Biofilms produced in both human and animal play a very important role in the pathogenesis of a significant number of infectious diseases. It is often the cause of very serious, chronic and often resistant infections. Innovations in the development of vaccines using antigens isolated from biofilms represent a very promising approach to the prevention of infectious diseases and may increase the protective effects of existing vaccines.

Keywords: vaccines, vaccination, biofilm, matrix, infectious diseases, bacteria, viruses, immune system, reverse vaccinology

Vakcinologie 2022;17(2):98–101

Úvod

Obecná definice biofilmu říká, že jde o dynamické, velmi dobře strukturované mikrobiální společenství se schopností adherence k pevným povrchům. Zároveň je toto uskupení schopno tvořit agregáty usazené v ex-

tracelulárním matrixu (1). Velmi rozšířena je schopnost vytváření biofilmů mezi prokaryoty. První důkazy jsou známy z fosilií pocházejících z období před třemi miliardami let. Tyto nálezy mají své opodstatnění. Přírodní prostředí bylo vysoce nestabilní jak teplotně, tak z pohledu měnících se hod-

not pH, či hodnot intenzity UV záření. Na základě těchto vlivů byl biofilm vynikající odpovědí a jasnou evoluční výhodou živých organismů. Ochrana před fyzikálními a chemickými vlivy prostředí byla nesporná. Nicméně to není jediná pozitivní vlastnost biofilmů. Jsou například schopny zlepšit



mezibuněčnou katalytickou aktivitu či jejich přítomnost napomáhá hromadění živin (1, 2).

Biofilmy jsou všudypřítomné. V přírodě je nalézáme na povrchu stojatých vod, v horkých pramenech, stejně jako na ledovcích Antarktidy (1, 3).

Jejich přítomnost nám znesnadňuje průmyslovou výrobu, kontaminují výrobní linky, byly detekovány i v ropovodech. Běžně se s nimi setkáváme ve vodovodním potrubí případně v jakémkoli vlhkém prostředí sprch, bazénů nebo lázní (4).

Světová zdravotnická organizace udává, že průběh a léčba až 68 % humánních infekčních onemocnění je ovlivněna přítomností bakteriálních biofilmů. Zdravotníkům zcela zásadně znesnadňují proces léčby infekčně nemocného pacienta. Biofilmy se v rámci patogeneze určitých infekčních onemocnění formují na lidských tkáních, implantátech, katetrech a dalších zdravotnických nástrojích. Hlavní hrozbou biofilmů osídlujících lidský organismus je jejich odolnost. Následné odstranění těchto biomas je mimořádně náročné. Mikroorganismy v biofilmech často nereagují na obvyklou antimikrobiální léčbu. Proces terapie a rekonvalescence infekčních onemocnění se tak může výrazně prodloužit. Nepřehlédnutelným faktorem je pak i výrazně vyšší nákladovost na komplikovanou léčbu takto postižených pacientů (5, 6).

Vliv biofilmu na průběh infekčních onemocnění

Typickým příkladem je adheze bakterií rodů *Staphylococcus* nebo *Streptococcus* k proteinům bazální membrány poškozené výstelky srdce, což je příčinou vzniku endokarditid. Vlivem snížené činnosti řasinek sliznice dýchacích cest a zvýšené viskozity hlenu u pacientů s cystickou fibrózou zase dochází ke kolonizaci dýchacích cest a k vytváření biofilmu druhu *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* a *Pseudomonas aeruginosa* (6, 9).

Dalším známým příkladem biofilmu je zubní plak primárně tvořený druhem *Streptococcus mutans* (7, 9).

Tvorba biofilmu byla popisována také u uropatogenních kmenů

Escherichia coli, které jsou následně odpovědné za komplikované a chronické infekce močových cest (8, 9, 24).

Zánětlivé onemocnění kostí – osteomyelitida je nejčastěji vyvolána druhem *Staphylococcus aureus*. Ten se k povrchu kosti přesune přímo nebo hematogenní cestou z místa chirurgického zákroku, traumatu nebo jiné nezávislé infekce. Při pohybu krevním řečištěm začíná patogen rychle exprimovat velké množství adhezivních molekul vázajících fibrinogen, fibrin, kolagen nebo elastin. Po nasednutí prvních buněk na povrch kosti dochází k jejich množení a produkci extracelulární matrix. Ta tkáň deformuje, a tak usnadňuje adhezi dalším buňkám. Biofilm z kostí je obvykle u dospělých nutné odstranit chirurgicky. U dětských pacientů je léčba možná vysokými dávkami antibiotik (9).

Tvorba biofilmu ovlivňuje mimo jiné i používání očních čoček, zátek slzných kanálků, stentů slzných cest nebo očních implantátů. Biofilm lze nalézt i na kapsli oční čočky stejně jako na stromatu rohovky. Tyto nálezy pak představují nebezpečí různé závažných očních infekcí, typu keratitid, které neléčené mohou vyústit až ve ztrátu zraku (10).

Stejně tak mohou být bakteriemi kolonizovány zevní rány pacientů. Tyto kolonizace výrazně komplikují a prodlužují hojení. Stafylokokové i jiné biofilmy (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter* spp., *Klebsiella oxytoca*, *Proteus* sp.) často vznikají na chronických ranách, jako jsou vředy v důsledku diabetu, dekubitů či venózních bércových vředů (11, 25).

Rezistence biofilmů na antimikrobiální látky

Biofilmy přispívají k patogenitě mikroorganismů díky své rezistenci k antibiotikům a fagocytóze, čímž usnadňují rozvoj chronické infekce (11, 12).

Mikrobiální rezistence je definována jako schopnost mikroorganismů množit se i při působení zvýšené koncentrace antimikrobiálních látek. Zjednodušeně řečeno platí, že kmeny s vyšší minimální inhibiční koncentrací (MIC – minimum inhibitory con-

centration) vykazují vyšší rezistenci. Podle tohoto konvenčního kritéria by nicméně bakteriální buňky tvořící biofilm zvýšenou rezistencí nevykazovaly. Buňky v biofilmu obvykle nerostou lépe v přítomnosti většiny antimikrobiálních látek než buňky volně flotující (tzv. planktonní bakteriální buňky neboli buňky volně plovoucí nebo v suspenzi). Rezistence biofilmového společenstva spočívá především ve schopnosti přežít při působení antimikrobiálních látek ve vyšších koncentracích. Lze tedy říci, že mikroby sdružené do komplexní struktury biofilmu, vykazují vyšší rezistenci vůči látkám, které mají cidní účinek. Tuto „relativní“ rezistenci vyčíslují některé experimentální práce jako sto až tisícinásobně vyšší v porovnání s rezistencí flotujících buněk (13). Navíc v rámci biofilmového společenství může docházet k šíření rezistence mezidruhově například genovým přenosem. Původně citlivé kmeny se tak mohou lehce stát kmeny rezistentnějšími i při opětovném uvolnění do planktonické formy.

Nejnovější imunologické poznatky pak dokládají, že přežívání bakteriálních biofilmů a unikání lidskému imunitnímu systému je zapříčiněno nejen atypickým fenotypem bakterií uvnitř biofilmu včetně enormní antibiologické rezistence, ale také zeslabením imunitní reakce v okolí biofilmu. Zatímco planktonické bakterie vedou makrofágy ke klasické aktivaci – fagocytóze, uvolnění prozánětlivých cytokinů a reaktivních sloučenin kyslíku a dusíku, biofilm indukuje protizánětlivou odpověď organismu, charakterizovanou hromaděním alternativně aktivovaných makrofágů v jeho okolí a expanzí myeloidních supresorových buněk. Alternativně aktivovaný makrofág uvolňuje protizánětlivé cytokiny, velmi neochotně fagocytuje a indukuje fibrotizaci tkáně. Není bez zajímavosti, že experimentálně bylo prokázáno, že injekční aplikace makrofágů – které jsou již z předchozího *in vitro* prozánětlivého prostředí aktivovány klasickou cestou – na právě se rodící biofilm výrazně zpomalí jeho růst a vývoj. V přítomnosti biofilmu je tedy imunitní systém výrazně kompromitován (14).

Experimentální veterinární a humánní vakcíny

Schopnost bakterie *Staphylococcus aureus* vytvářet biofilm je významným faktorem, který ovlivňuje například patogenezi mastitidy u ovcí a krav. V souvislosti s tímto faktem bylo provedeno testování účinnosti několika experimentálních vakcín, které ukázalo různou míru získané ochrany před touto nemocí. Watson et al. (15) a Nordhaug et al. (16) použili vakcíny využívající celých inaktivovaných buněk *Staphylococcus aureus* usazených v jejich vlastním extracelulárním matrixu (pseudokapsu). Experimentální vakcínou testované Amorenou et al. (17) zase obsahovaly směs slizu (exopolysacharidová matrix biofilmu) v liposomech, toxoidů a různých inaktivovaných izolátů *Staphylococcus aureus*.

Perez et al. (18) testoval preventivní účinky vakcín proti intramamární infekci způsobené virulentním kmenem *Staphylococcus aureus*, přičemž pro konstrukci vakcín použil bakteriny (celé inaktivované bakteriální buňky), několik různě extrahovaných polysacharidů a několik druhů adjuvans. Výsledky studie ukázaly, že vakcíny obsahující bakteriny vzniklé z bakterií produkujících silný biofilm vykazaly v porovnání s ostatními použitými vakcínami (komponovanými z bakterií vytvářejících slabý biofilm) nejvyšší titer specifických protilátek a také nejvyšší míru ochrany proti intramamární infekci.

Tyto a další studie se staly základem pro první schválenou vakcínu proti mastitidě u skotu, která byla prostřednictvím Evropské agentury pro léčivé přípravky registrována v Evropské unii. Vakcína obsahuje inaktivované buňky kmene *Staphylococcus aureus* tvořící silný biofilm. Dále pak inaktivovaný kmen *Escherichia coli* J5 a vhodné adjuvans posilující imunitní odpověď. Klinické zkoušky na skotu potvrdily, že vakcinace významně snížila výskyt klinických i subklinických mastitid a zmírnila i závažnost jejich klinických příznaků. Po očkování se navíc zvýšilo procento spontánně vyléčených infikovaných krav (19, 20).

V současnosti je hojně využívána reverzní vakcinologie coby revoluční genomový přístup ke konstrukci nových vakcín. V principu jde o využití zcela nových technologických možností k identifikaci kandidátních antigenů vakcín, a to proti nemocem vyvolaným bakteriálními i virovými agens. Tyto vhodné antigeny mohou být izolovány buď z vybraných buněk bakteriálního biofilmu, nebo z příslušné extracelulární matrix (21, 23).

Na této bázi je testována další veterinární vakcína, která má snížit výskyt vředů, hniloby ocasu, ploutví, eventuálně hemoragické septikémie v chovech sladkovodních kaprovitých ryb. Hemoragická septikémie je velmi závažné onemocnění, které vyvolává léze spojené ve svých důsledcích s krvácením v žábrách a v oblasti análního otvoru. Původcem těchto problémů je bakterie *Aeromonas hydrophila*. V současnosti je testována orálně podávaná kandidátní vakcína využívající již dříve selektované antigeny biofilmu produkovaného výše zmiňovanou bakterií (21, 26–28).

Úspěchy i ve vývoji humánních vakcín

Haemophilus influenzae je takřka nemožné z lidského organismu eradikovat (antibiotiky). Způsobuje celou řadu infekčních onemocnění, z nichž některá mohou mít závažný průběh. U dospělých vídáme infekce horních cest dýchacích – relativně banální stavy spojené s kašlem, bolestmi v krku, únavou a horečkami. U malých dětí se nicméně může vyvinout akutní epiglotitida. Dále tato bakterie způsobuje zánět hltanu, může být odpovědná za zápal plic, stejně jako meningitidy či záněty středního ucha.

Proti bakterii *Haemophilus influenzae* je v současnosti vyvíjena očkovací látka založená na antigenu izolovaném z jejího biofilmu. Vakcinační antigen je navržen tak, aby byl schopen zprostředkovat narušení tvorby biofilmu vytvářeného právě touto bakterií, který hraje klíčovou roli v patogenezi chronických a rekurentních onemocnění (22, 29).

Dalším onemocněním, pro které se vyvíjí nové vakcíny na základě celých biofilmových buněk nebo specifických proteinů exprimovaných v biofilmu, je

tuberkulóza. Původní BCG vakcína cílená proti *Mycobacterium bovis* byla poprvé použita u lidí téměř přesně před 100 lety. I přestože tato vakcína vykazuje trvale vysokou účinnost (70–80 %) proti dětské formě TBC, ochranný účinek proti plicní variantě u dospělých je značně nižší. Proto se v posledních 20 letech zvýšilo úsilí v hledání nových vakcinačních strategií. Příkladem může být využití bakteriální signální molekuly c-di-GMP, která hraje klíčovou roli v regulaci bakteriální motility, adheze, komunikace mezi buňkami, syntézy exopolysacharidů, tvorby biofilmu a virulence (30–33).

Závěr

Rozvoj analýzy velmi malých molekul se za poslední dekádu velmi zdokonalil. Odvětví, jako je proteomika, genomika a metabolomika, nám tak umožňují za relativně krátkou dobu identifikovat obrovské množství vhodných kandidátních antigenů. Podle principů reverzní vakcinologie pak můžeme tyto molekuly výhodně využít pro rychlé a efektivní nalezení vakcinačních cílů. Přestože tradiční metody nás mohou dovést k cíli za nepoměrně delší časový úsek, mohou také nalézt další biomolekulární cíle. Nevýhodou nových přístupů může být identifikace a použití antigenu, který vyvolá odpověď nejen na patogenní kmene, ale i na kmene prospěšné lidskému organismu (komezální bakterie). Závěrem lze zhodnotit, že inovace ve vývoji vakcín využívajících antigeny odvozené z biofilmů představují velmi slibný přístup k prevenci infekčních onemocnění a mohou zvýšit ochranné účinky stávajících očkovacích látek.

Práce byla podpořena z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. NV-19-09-00198 a projektem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (projekt specifického výzkumu SV/FVZ202206).

Literatura:

1. Callow JA, Callow ME. Biofilms. *Prog Mol Subcell Biol.* 2006;42:141–69.
2. Aparna MS, Yadav S. Biofilms: Microbes and disease. *Braz J Infect Dis.* 2008;12(6):526–30.



3. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15:167–193.
4. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Rev Microbiol.* 2004;2:95–108.
5. Julak J, Scholtz V, Vnakova E. Medically important biofilms and non-thermal plasma. *World J Microbiol Biotechnol.* 2018;34(12):178.
6. Hemmati F, Rezaee MA, Ebrahimzadeh S, et al. Novel Strategies to combat bacterial biofilms. *Mol Biotechnol.* 2021;63(7):569–586.
7. Donlan, RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(9):881–890.
8. Feneley, RCL, Hopley IB, Wells PN. Urinary catheters: history, current status, adverse events and research agenda. *J Med Eng Technol.* 2015;39(8):459–457.
9. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Surveillance of antimicrobial resistance in Europe. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/ECDC-WHO-AMR-report.pdf>.
10. Lebeaux D, Chauhan A, Rendueles O, et al. From in vitro to in vivo Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. *Pathogens.* 2013;13;2(2):288–356.
11. Kirmusaoglu S. Staphylococcal Biofilms: Pathogenicity, Mechanism and Regulation of Biofilm Formation by Quorum-Sensing System and Antibiotic Resistance Mechanisms of Biofilm-Embedded Microorganisms. *Viruses.* 2016;14(5):196–218.
12. Mah TF, O’Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 2011;9(1):34–39.
13. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(4):999–1007.
14. Oliviera A, Pereira VC, Pinheiro L, et al. Antimicrobial Resistance Profile of Planktonic and Biofilm Cells of *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative *Staphylococci*. *Int J Mol Sci.* 2016;17(9):1423.
15. Watson DL, Davies HI. Influence of adjuvants on the immune response of sheep to a novel *Staphylococcus aureus* vaccine. *Vet Microbiol.* 1993;34:139–153.
16. Nordhaug ML, Nesse LL, Norcross NL, et al. A field trial with an experimental vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis in cattle. Clinical parameters. *J Dairy Sci.* 1994;77:1267–1275.
17. Amorena B, Baselga R, Albizu I. Use of liposome-immunopotentiated exopolysaccharide as a component of an ovine mastitis staphylococcal vaccine. *Vaccine.* 1994;2:243–249.
18. Pérez MM, Prenafeta A, Valle J, et al. Protection from *Staphylococcus aureus* mastitis associated with poly-N-acetyl β -1,6 glucosamine specific antibody production using biofilm-embedded bacteria. *Vaccine.* 2009;27:2379–2386.
19. Watson DL, Watson NA. Expression of a pseudocapsule by *Staphylococcus aureus*: influence of cultural conditions and relevance to mastitis. *Research in Veterinary Science.* 1989;47:152–157.
20. Corrigan RM, Rigby D, Handley P, et al. The role of *Staphylococcus aureus* surface protein SasG in adherence and biofilm formation. *Microbiology.* 2007;153:2435–2446.
21. Donati C, Rappuoli R. Reverse vaccinology in the 21st century: Improvements over the original design. *Ann NY Acad Sci.* 2013;1285:115–132.
22. Rappuoli R. Reverse vaccinology. *Curr Opin Microbiol.* 2002;3(5):445–450.
23. Loera-Muro A, Guerrero-Barrera A, Trembley Z, et al. Bacterial biofilm-derived antigens: a new strategy for vaccine development against infectious diseases. *Expert Rev Vaccines.* 2021;20(4):385–396.
24. Trautner BW, Darouiche RO. Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection. *Am J Infect Control.* 2004;32(3):177–183.
25. Tong SY, Davis JS, Eichenberger AF, et al. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev.* 2015; 28(3):603–661.
26. Azad IS, Shankar CV, Mohan CV, et al. Biofilm vaccine of *Aeromonas hydrophila* – standardization of dose and duration for oral vaccination of carps. *Fish Shellfish Immunol.* 1999;9:519–528.
27. Amend DF. Potency testing of fish vaccines. *Dev Biol Stand.* 1981;49.
28. Kaur B, Kumar N, Tyagi A, et al. Identification of novel vaccine candidates in the whole-cell *Aeromonas hydrophila* biofilm vaccine through reverse vaccinology approach. *Fish Shellfish Immunology.* 2021;114:132–141.
29. Bailey MT, Lauber CHL, Novotny LA, et al. Immunization with a biofilm-disrupting nontypeable *Haemophilus influenzae* vaccine antigen did not alter the gut microbiome in chinchillas, unlike oral delivery of a broad-spectrum antibiotic commonly used for otitis media. *mSphere.* 2020;5(2):e00296–20.
30. Flores-Valdez MA. Vaccines Directed Against Microorganisms or Their Products Present During Biofilm Lifestyle: Can We Make a Translation as a Broad Biological Model to Tuberculosis? *Front Microbiol.* 2016. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00014/full>.
31. Trunz BB, Fine P, Dye C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and military tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. *Lancet.* 2006;367:1173–80.
32. Fine PE. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet.* 1995;346:1339–45.
33. Chen W. The potential of 3',5'-cyclic di-guanylic acid (c-di-GMP) as an effective vaccine adjuvant. *Vaccine.* 2010;28(18):3080–85.

Korespondující autorka:
prof. RNDr. Vanda Boštíková, Ph.D.
 Katedra epidemiologie
 Fakulta vojenského zdravotnictví
 Univerzita obrany v Brně
 Třebešská 1575
 Hradec Králové, 500 01
 Tel.: 973 253 128
 E-mail: vanda.bostikova@unob.cz