



# LABORATORIJSKA MEDICINA

STROKOVNO-ZNANSTVENO GLASILO SLOVENSKEGA ZDRUŽENJA  
ZA KLINIČNO KEMIJO IN LABORATORIJSKO MEDICINO

**03**  
SEP 2021



**SZK&MLM**

**Laboratorijska medicina** je strokovno-znanstvena revija Slovenskega združenja za klinično kemijo in laboratorijsko medicino (SZKKLM), ki objavlja prispevke s širšega področja laboratorijske medicine. Poslanstvo revije je seznanjanje slovenske strokovne javnosti z novostmi in smernicami iz tega področja. V ta namen objavljamo izvirne znanstvene, pregledne znanstvene in strokovne članke ter aktualne novice, zanimivosti in poročila iz področja Laboratorijske medicine.

**Glavna in odgovorna urednica:**

Katarina Trebušak Podkrajšek

**Področni uredniki:**

Evgenija Homšak  
Aleš Jerin  
Helena Podgornik  
Pika Meško Brguljan,  
Katarina Trebušak Podkrajšek  
Janja Marc  
Alenka Repše Fokter  
Viktorija Tomič

**Tehnični uredniki:**

Saša Bratož  
Pika Meško Brguljan  
Evgenija Homšak

**Lektoriranje:**

Janja Korošec

**Oblikovanje in tisk:**

Publik Market

**Naklada:**

500 izvodov

ISSN 2670-4463

Izhaja enkrat letno

**Izdajatelj:**

Slovensko združenje za  
klinično kemijo in laboratorijsko medicino

**Naslov uredništva:**

Dunajska cesta 22  
1000 Ljubljana, Slovenija

**T:** +386 599 76089

**F:** +386 1 2321331

**E:** info@szkklm.si

**W:** www.szkkmlm.si

# Uvodnik



**Katarina Trebušak Podkrajšek**  
Glavna in odgovorna urednica

Foto: Tomaž Marinšek

## ***Spoštovane kolegice in kolegi, spoštovane bralke in bralci!***

*Revija Laboratorijska medicina je v letošnjem letu doživela preobrazbo. Sedaj ima razširjen uredniški odbor in recenzentsko politiko. Vse z namenom podajanja strokovnega napredka in novih znanj s področja laboratorijske medicine na čim višji ravni. Tokrat vam prvič predstavljamo tudi novo rubriko z naslovom Laboratorijska medicina skozi oči... Pogosto je namreč ravno drugačen pogled na znano problematiko tisti, ki nam pomaga prepoznati področja, ki so lahko naš ponos in naša moč. Pa tudi tista področja, ki so naša šibkost. Tokrat nam bosta k samorefleksiji pomagala pogleda na laboratorijsko medicino skozi oči študentke laboratorijske biomedicine in skozi oči izkušenega strokovnjaka in profesorja.*

*Laboratorijska medicina je izredno dinamično področje. Zato je za strokovnjaka na tem področju ključno, da se zaveda pomena stalnega izobraževanja in izpopolnjevanja. Želim si, da bi ravno na tem področju revija Laboratorijska medicina našla svoje mesto. Zato je cilj, da je revija a) odprta do vseh področij laboratorijske medicine, b) vključevalna za vse, ki delujejo na področju, pa naj bodo to že uveljavljeni strokovnjaki ali pa študenti, c) aktualna kar se tiče obravnavanih tem ter d) prilagodljiva kar se tiče bralstva. In prav zato bomo veseli vseh konstruktivnih kritik in komentarjev.*

*Tokrat vam v branje ponujamo prispevke, ki se večinoma navezujejo na predavanja na preteklih strokovnih srečanjih SZKKLM. Za nekatere izmed teh predavanj so na voljo razširjeni povzetki na koncu revije.*

*Želim vam prijetno branje tretje številke Laboratorijske medicine!*

*Katarina Trebušak Podkrajšek*  
*Glavna in odgovorna urednica Laboratorijske medicine*

# Kazalo

<b>01</b>	<b>Laboratorijska medicina skozi oči ...</b>	<b>7</b>
	<b>Borut Božič</b> Laboratorijska medicina skozi oči strokovnjaka in univerzitetnega profesorja za področje klinične biokemije in laboratorijske biomedicine	8
	<b>Špela Lavrič</b> Laboratorijska medicina skozi oči študentke laboratorijske biomedicine	11
<b>02</b>	<b>Pregledni strokovni in znanstveni prispevki</b>	<b>15</b>
	<b>Jasna Lojk, Janja Marc</b> Virusna okužba, celično posredovan imunski odziv in genomski učinki vitamina D	16
	<b>Tina Levstek, Katarina Trebušak Podkrajšek</b> Posebnosti laboratorijske medicine v pediatriji	26
	<b>Barbka Repič Lampret</b> Implementacija razširjenega presejanja novorojencev za vrojene boleznj presnove v Sloveniji	34
	<b>Žiga Iztok Remec, Ana Marija Jelovšek</b> Informacijske rešitve pri implementaciji razširjenega presejalnega testiranja novorojencev v Sloveniji	40
	<b>Tinka Hovnik</b> Umestitev laboratorijskih preiskav v nove smernice za diagnostiko celiakije pri otrocih in mladostnikih	47
	<b>Jernej Kovač</b> Sekvenciranje mitohondrijskega genoma	55
	<b>Gasper Marinšek, Klementina Črepinšek, Maruša Debeljak</b> Molekularno-genetska diagnostika akutne limfoblastne levkemije pri otrocih	60



SZKKLM

<b>03</b>	<b>Izvirni strokovni in znanstveni prispevki</b> .....	<b>67</b>
	Eva Kozjek, Alenka Trampuš Bakija Optimizacija postopka za določitev aktivnosti asparaginaze pri bolnikih z akutno limfoblastno levkemijo.....	68
	Inge Sotlar, Tisa Podkrajšek, Tina Levstek, Katja Goričar, Vita Dolžan, Katarina Trebušak Podkrajšek Sprememba p.R577X gena ACTN3 (rs1815739) je povezana s pojavnostjo poškodb slovenskih nogometašic.....	76
<b>04</b>	<b>Povzetki predavanj na strokovnih srečanjih SZKKLM</b> .....	<b>87</b>
	Darko Černe Priporočila za izvajanje mikrobioloških testov na SARS-CoV-2 v UKCL.....	88
	Milan Skitek, Marjana Prah Krumpak Zaščita in varno delo laboratorijskega osebja.....	91
	Aleš Jerin Določanje protiteles proti SARS-CoV-2.....	94
<b>05</b>	<b>Navodila avtorjem prispevkov za revijo Laboratorijska medicina</b> .....	<b>97</b>
	Navodila avtorjem prispevkov za revijo Laboratorijska medicina.....	98

**Izdajo revije so podprli:**

Roche farmacevtska družba d.o.o., Siemens Healthcare d.o.o., Abbott Laboratories d.o.o., Medias International d.o.o., MIKRO+POLO d.o.o., MEDILINE d.o.o., Diahem d.o.o., Meditrade d.o.o., Takeda Pharmaceuticals d.o.o.



**01**

Laboratorijska  
medicina skozi  
oči ...

# Laboratorijska medicina skozi oči strokovnjaka in univerzitetnega profesorja za področje klinične biokemije in laboratorijske biomedicine

**Borut Božič<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo, Laboratorij za molekularno diagnostiko

<sup>2</sup> Univerzitetni klinični center Ljubljana, SPS Interna klinika, KO za revmatologijo, Laboratorij za imunologijo revmatizma

Pojem laboratorijska medicina (1) je danes uveljavljen tako v Sloveniji kot v Evropi. Ni pa samoumeven in je bil deležen precej razprav v širši zdravstveni stroki, pri čemer sem tudi sam zelo aktivno sodeloval (2). Pravzaprav je bil utemeljen pri nas šele s sprejetjem Pravilnika o pogojih, ki jih morajo izpolnjevati laboratoriji za izvajanje preiskav s področja laboratorijske medicine, leta 2004 (3). Znotraj stroke je bil pojem sicer sprejet že prej, v času priprave izhodišč in nato samega pravilnika v predhodnih letih, vendar je besedilo pravilnika čakalo na ustrezen trenutek, ki je spodbudil ministrstvo, da ga potrdi. Žal je bil to dogodek, ki je pokazal, da ob vsej zavzetosti ni bilo ustreznih kontrolnih mehanizmov pri nekaterih odstopanjih od pričakovane kakovosti. Kakovosti, ki je v laboratorijski medicini opredeljena kot pravi izvid za pravega pacienta, s pravimi rezultati, z ustreznimi komentarji/referenčnimi vrednostmi in to v pravem času. Obdobje je bilo značilno po veliki stopnji nepoznavanja med posameznimi laboratorijskimi specialnostmi, pa tudi nezaupanja. Tako delovna skupina, ki jo je imenovalo Ministrstvo za zdravje, ni delovala v okviru nobenega strokovnega združenja (društva ali zbornice), naslanjala se je na razširjene strokovne kolegije. Slednji so odigrali izjemno pomembno vlogo tako pri neposrednih medsebojnih pogajanjih in usklajevanju kakor tudi pri implementaciji pravilnika skozi koordinacijsko skupino pri Ministrstvu za zdravje.

To obdobje je bilo značilno po močni zavzetosti, da naredimo nekaj dobrega za stroko. Tako smo iskali skupna stičišča, ugotavljali prekrivanja delovanja, soočali različna razumevanja pristopov med specialnostmi in znotraj njih. Pri tem nam je v fazi že postavljenega okvira pravil-

nika zelo pomagala prva delovna verzija standarda ISO 15.189 (4), na katero smo oprli končne verzije pravilnika. Pomembna je bila strokovna odločitev, da posameznih strok ne opredeljujemo z definicijami posameznega področja, saj so bile preveč nedorečene in preširoke za razmejevanje. Tako smo se naslonili na obstoječe specializacije in kot odgovorne nosilce sprejeli specialiste ustrezne laboratorijske specializacije. Nekateri programi specializacij so bili jasno laboratorijski, nekateri klinični s pomembno laboratorijsko noto: medicinska biokemija, klinična/medicinska mikrobiologija, laboratorijski del transfuzijske medicine, pa tudi laboratorijski del patologije. Slednja je bila takrat v nekaterih vidikih tudi skozi regulativo ločena na citopatologijo in histopatologijo. Sodna medicina je bila na razpotju, kateri model se bo uveljavil v širšem prostoru, zato v začetni fazi ni bila vključena v sam pravilnik. Je pa razvoj v nadaljevanju pokazal, da je pravilnik ustrezen okvir tudi za sodno medicino, kot je zdaj organizirana v Evropi, zato je ta specialnost zdaj vključena v pravilnik.

Nevezano na to je potekalo tudi oblikovanje in pogajanje za orientacijske poklice v sistemu plač javnega sektorja. Mukoma smo preko Zbornice laboratorijske medicine Slovenije (ZLMS) in Sindikata laboratorijske medicine Slovenije (Silmes) ob pomoči strokovnih združenj, predvsem Slovenskega združenja za klinično kemijo (danes SZKKLM) spravili tudi celotno vertikalno laboratorijskih delavcev. Še posebej pomembna je bila uveljavitev specialista medicinske biokemije na zahtevnosti delovnega mesta VIII in IX in pa inženirja laboratorijske medicine (zahtevnost VII/1), ki ima celo monopolen položaj pri zaposlitvi. Brez prepoznavnih delovnih mest ni ljudi in brez ljudi ni prepoznavne stroke.



Seveda med posameznimi področji znotraj laboratorijske medicine ni ostrih meja. Tako smo ugotavljali že takrat in tudi danes vidimo prekrivanja, na primer pri imunologiji. Tu ne mislim na žargonski izraz, ki je uporabljen za imunokemijske metode, ampak na dejansko izvajanje preiskav s področja ugotavljanja imunskega statusa preiskovanca. S takim prekrivanjem ni nič narobe in ni sporno – imamo pač dva ali celo več specialistov, ki so pristojni za iste preiskave. Ob tem je bilo jasno stališče stroke in zdravstvene politike, da z obstoječimi specializacijami pokrivamo celotno področje laboratorijske medicine, in da se torej noben laboratorij ali izvajalec ne more sklicevati, da zanj ni prostora v pravilniku, in da se mu zato pravil ni treba držati. Nekatera področja so bila močnejše zajeta, nekatera manj, vendar so bila zajeta vsa. Še najmanj pravzaprav laboratorijski del preiskav in dela na področju oploditve z biomedicinsko pomočjo. Mnogo energije in usklajevanja je bilo osredotočenega na oblikovanje samostojne specializacije za biologe, ki pretežno opravljajo to delo, vendar do realizacije ni prišlo. Po drugi strani se je oblikovala laboratorijska medicinska genetika in dopolnjuje nekoliko slabšo pokritost področja skozi druge specializacije, ki imajo genetiko v programu: medicinska biokemija, transfuzijska medicina, patologija, ... Tako je treba razumeti genetiko podobno kot imunologijo – imamo več specialistov, ki so pristojni za podobne, v nekaterih primerih celo za iste preiskave. To je razvidno tudi iz primerjav specialističnih programov na evropski ravni – evropska specializacija laboratorijske medicine v okviru Evropske zveze za klinično kemijo in laboratorijsko medicino EFML (5) ali zdravniške specializacije Evropskega združenja medicinskih specialistov UEMS (6).

Če hočemo vedeti, kam gremo, moramo vedeti, od kod prihajamo. Tako je moj pogled na stroko danes močno podprt s potjo, ki smo jo v zelo raznoliki laboratorijski medicini opravili v zadnjih tridesetih letih, da smo danes tu, kjer smo. To pa nam daje tudi smer, kam moramo. Pravilnik nam namreč ni bil vsiljen, pravilnik smo si v stroki izborili kot orodje za zagotavljanje varnosti pacientov in kot orodje strokovne varnosti laboratorijskih strokovnjakov. V že tretjem krogu presoje laboratorijev od njegove implementacije se je pokazal izjemen napredek, ki so mu botrovale aktivnosti ob pripravi in z uporabo pravilnika. To ne pomeni, da ga ni mogoče spreminjati, moramo pa imeti v mislih celotno sliko laboratorijske medicine. Laboratorijske medicine, ki je zelo heterogena v kadrih, pristopih, preiskavah, celo v interesih. Pa vendar laboratorijske medicine, ki ji je skupno

**Borut Božič** je redni profesor za področje Klinične biokemije in laboratorijske biomedicine na Fakulteti za farmacijo (FFA) Univerze v Ljubljani (UL). Strokovno in raziskovalno deluje tudi v Laboratoriju za imunologijo revmatizma na Kliničnem oddelku za revmatologijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani, dodatno se je izpopolnjeval in gostoval na različnih tujih ustanovah v ZDA, UK, Nemčiji, Rusiji, Izraelu, na Hrvaškem. Je specialist medicinske biokemije z mednarodno priznanim nazivom evropski specialist laboratorijske medicine in presojevalec medicinskih laboratorijev pri Slovenskem inštitutu za kakovost in meroslovje.

Opravlja ali je opravljal vrsto vidnih funkcij in zadolžitvev na strokovnem in pedagoškem področju, med drugim je bil predsednik upravnega odbora Univerze (2017 - 2021), dekan FFA in član senata UL (2011-2017), član koordinacijske skupine pri Ministrstvu za zdravje (MZ) za implementacijo pravilnika o laboratorijski medicini (2008-2017), prodekan za študijsko področje FFA (2007-2011), član izvršilnega odbora Slovenskega združenja za klinično kemijo (2007 - 2011), koordinator za implementacijo bolonjskih programov laboratorijske medicine na FFA (2005 - 2009), predsednik delovne skupine MZ za pripravo vsebin pravilnika o pogojih za opravljanje laboratorijske medicine (2002-2004), predsednik Zbornice laboratorijske medicine Slovenije (1996 - 2006), član Republiškega strokovnega kolegija za laboratorijsko diagnostiko (1994-2021, podpredsednik 2004, predsednik 2005), in številne druge. Od letos je predstojnik Katedre za klinično biokemijo na UL FFA.

delo z biološkimi vzorci (praviloma) človeškega izvora z namenom ugotavljanja zdravstvenega stanja pacienta v najširšem pomenu pojma – v preventivi, diagnostiki, spremljanju bolezni, spremljanju in napovedovanju odziva na terapijo, iskanju novih bioloških označevalcev. Laboratorijska medicina nikoli ni predstavljala samo izvajanja preiskav, ampak je obsegala in še vedno bolj obsega tudi ovrednotenje in pretvorbo (interpretacijo) rezultatov v izvid, svetovanje, znanstveno raziskovanje in izobraževanje (na srednji, dodiplomski in podiplomski stopnji ter kontinuirano poklicno usposabljanje in vseživljenjsko učenje). Ob tem pa prenos dobrih praks med posameznimi ožjimi specialnostmi. Za vse to pa so kljub izjemnemu napredku tehnologije pomembni ljudje – ljudje, ki jim ni vseeno. »

## LITERATURA

1. Dybkaer R: Clinical laboratory work - concepts and terms. *Eur Clin Chem Clin Biochem* 1997; 35: 495-9.
2. Božič, Borut. Ali nedorečenost pristojnosti vpliva na odnose in učinkovitost v zdravstvu? *Farmaceutski vestnik*. 2004;55/1:60-62. ISSN 0014-8229. [COBISS.SI-ID 1484401]
3. Pravilnik o pogojih, ki jih morajo izpolnjevati laboratoriji za izvajanje preiskav na področju laboratorijske medicine. *Uradni list RS* 64/04, 17/16 in 56/19.
4. Standard EN ISO 15.189 Medical laboratories — Requirements for quality and competence. <https://www.iso.org/standard/56115.html>. Datum dostopa: 3.6.2021
5. The European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) <https://www.eflm.eu/site/page/a/1305>. Datum dostopa 3.6.2021
6. The European Union of Medical Specialists (Union Européenne des Médecins Spécialistes – UEMS)
7. <https://www.uems.eu/about-us>. Datum dostopa 3.6.2021

# Laboratorijska medicina skozi oči študentke laboratorijske biomedicine

Špela Lavrič

»Kaj pa ti študiraš?« je vprašanje, ki ga študentje slišimo skoraj tako pogosto, kot v zadnjem času preberemo stavek »predavanje bo potekalo prek spleta«. Ko sama povem, da študiram laboratorijsko biomedicino, v odgovor velikokrat dobim presenečen pogled sogovornika, ki mi da vedeti, da za ta program skoraj zagotovo sliši prvič. Zdi se, da je študij laboratorijske biomedicine širši javnosti še vedno premalo poznan, kar je po mojem mnenju neznanska škoda, saj gre za izjemno interdisciplinaren in zanimiv študij, ki predvsem nam, mladim, ponuja izjemne možnosti in priložnosti v nadaljnjem kariernem razvoju.

Kaj počnemo študentje laboratorijske biomedicine? Na kateri fakulteti študiramo in s čim se pri svojem študiju pogosto srečujemo? Kje se lahko zaposlimo? Vse to so vprašanja, s katerimi se študentje pogosto srečujemo in nas postavijo pred dejstvo, da smo bistveno manj poznani kot na primer naši prijatelji, ki študirajo biologijo, ekonomijo, pravo ali kemijo. Ko sem sama pričela s študijem, me je izjemno presenetilo, kako malo ljudi ta študij dejansko pozna oziroma dejansko ve, kaj počnemo in na katerih področjih bomo delovali po končanem študiju. Kako si želim, da bi več ljudi dejansko vedelo, koliko različnih področij se študentje laboratorijske biomedicine dotaknemo med samim študijem! Od brucev, ki se spopadajo z matematiko, fiziko, analizo kemijo in celično biologijo, zrastemo v inženirje in magistre, ki znajo kritično razmišljati, samostojno delovati v laboratoriju ter obvladajo osnove klinične kemije. Čeprav študij ni najbolj enostaven in zahteva nekaj več vloženega dela, se trud zagotovo izplača. Sama pa menim, da nam poleg občasno zahtevne in obsežne snovi preglavice povzročata tudi študijska literatura, pri kateri pogosto nimamo strnjениh informacij na enem mestu. »Ne učite se zgolj iz zapiskov,« so pogoste besede profesorjev, a velikokrat druge izbire na žalost nimamo. Ker je študij sam po sebi razmeroma nov, zelo primanjkuje primernih učbenikov, ki bi pregledno povzeli vsebino predavanj. Menim, da bi se vsi moji kolegi veliko raje učili iz knjig, kot da se borijo z zapiski profesorjev, pri katerih preproste stavke skuša-

**Špela Lavrič** je študentka 3. letnika Laboratorijske biomedicine na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Aktivno se zavzema za širšo promocijo študijskega programa Laboratorijska biomedicina in širjenje znanja o aktualnih temah s področja laboratorijske medicine. Je vodja projektov študentov Laboratorijske biomedicine v sklopu Društva študentov farmacije Slovenije (DŠFS) in je pobudnica vključevanja Slovenskega združenja za klinično biokemijo in laboratorijsko medicino v njihove aktivnosti.

jo postaviti v primeren kontekst. Po drugi strani pa lahko študentje laboratorijske biomedicine ogromno znanja pridobimo med samimi predavanji, ki so izjemno zanimiva in kakovostna. Imeti priložnost poslušati toliko različnih strokovnjakov na svojem področju je izjemna priložnost, ki jo študentje (po mojem mnenju) med samimi predavanji premalokrat izkoristimo. Med tem, ko poslušam pritoževanje študentov nad profesorji in nekoristnostjo predavanj na drugih fakultetah, se sama s tem ne morem poistovetiti. Lahko rečem, da od večine predavanj odnesem ogromno novega znanja in informacij, ki mi približajo še tako kompleksno in na prvi pogled nerazumljivo snov.

Tako kot vsak, ki je kaj prestopil prag univerze, imamo tudi študentje laboratorijske biomedicine v času študija številne vzpone in padce. Od začetnega optimizma, zagnanosti in stavka »obiskoval bom prav vsa predavanja«, do pritoževanja nad dolžino predavanj, obsega snovi in občasne nejevolje nad neprestanim, pogosto hektičnim prehajanjem med različnimi fakultetami ljubljanske univerze, kjer potekajo predavanja. Pa seveda nejevolja nad popoldanskimi termini vaj, ki se ti na začetku zdijo neznansko dolge, proti koncu študija pa ugotoviš, da bi ti kakšna laboratorijska vaja več prišla še kako prav. Diploma se bliža s svetlobno hitrostjo in kar naenkrat se začneš zavedati, da boš kmalu ti tisti, ki mu bodo znanci, prijatelji in sodelavci zastavljali vprašanja, povezana s tvojim področjem. Tako si pos- »

tavljen pred dejstvo, da si spoštovanje in avtoriteto v svoji stroki med drugim pridobiš tudi tako, da na ta vprašanja poznaš odgovore oziroma jih vsaj znaš poiskati. Morda pa neprestano ponavljanje profesorjev, ki ves čas poudarjajo pomen vseživljenjskega učenja in spremljanja razvoja znanosti, le ni tako nekoristen nasvet. Zato je ključno, da že kot študentje vstopimo v stik s stroko in prav tukaj je po mojem mnenju še veliko prostora za izboljšavo.

Sprašujem se, kdo je kriv, da smo študentje laboratorijske biomedicine tako malo znani, pa tudi premalo vključeni v stroko? So to profesorji, študentje, ali pač dejstvo, da gre za razmeroma nov program, ki šele pridobiva pomen in prepoznavnost? Morda bi večja angažiranost študentov pri vključevanju v stroko, komunikacijo s profesorji in organizacijo srečanj, bistveno bolj pripomogla k ugledu našega programa in mreženju s strokovnjaki.

Po drugi strani pa bi lahko tudi strokovnjaki in profesorji, ki delujejo na področju klinične kemije in biokemije, sami dali pobudo za sodelovanje. Morda bi nas študente lahko povabili k soustvarjanju kakšnega projekta na katerem delajo, k pomoči v raziskavah, pisanju poljudnih brošur in letakov za paciente, nenazadnje tudi pomoč pri kakšnem, za mnoge nevhvaležnem delu, kot je urejanje dokumentacije v laboratorijih, pregled reagentov in podobno. Ali pa morda skupna organizacija strokovnih dogodkov, treningov mehkih veščin, »hitri zmenki« s strokovnjaki, nefor-

malna druženja, predstavitve laboratorijev v Sloveniji in kariernih priložnosti na področju laboratorijske biomedicine. Strokovnjaki bi lahko študentom predstavili svojo karierno pot in na ta način zagotovo poskrbeli za dvig študijske motivacije pri študentih. Spominjam se, da smo imeli v gimnaziji projekt Učitelj za en dan, pri katerem smo lahko v sodelovanju s profesorji izvedli učno uro. Zakaj ne bi skupaj organizirali projekta, pri katerem bi študentje za en ali morda več dni obiskali izbrani laboratorij in spremljali delovni proces ali celo sodelovali v njem? Morda pa se kdo navduši nad specifičnim področjem ali raziskovalnim delom in se razvije v uglednega strokovnjaka! Prepričana sem, da bi s takšnimi projekti pritegnili ogromno študentov, ki si vsekakor želimo bolj konkretnega sodelovanja s strokovnjaki. Znano je, da je občutek posameznikove sreče sorazmeren z občutkom lastne koristnosti in pripadnosti skupnosti. Zato ne dvomom, da se študentje z veseljem in zagnanostjo ne bi lotili skupnih projektov.

V predavalnicah Fakultete za farmacijo sedimo študentje, ki nismo samo ime, priimek in vpisna številka. Smo osebe z mnogimi talenti, kreativnostjo, zagnanostjo, voljo in energijo in ne, ne čakamo samo na konec predavanj, ko bomo s kolegi lahko odšli na kavo. Želimo si povezanosti in sodelovanja. In seveda potrditve, da smo kot bodoči strokovnjaki ključni in pomembni za razvoj stroke v prihodnosti – kar študentje laboratorijske biomedicine tudi smo. Prihodnost naše stroke.





**02**

Pregledni  
strokovni in  
znanstveni  
prispevki

# Virusna okužba, celično posredovan imunski odziv in genomski učinki vitamina D

## *Virus infection, cell immune response and genomic effects of vitamin D*

Jasna Lojk<sup>1</sup>, Janja Marc<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo

<sup>2</sup> Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo

Avtor za korespondenco:

prof. dr. Janja Marc, spec. med. biokem.

Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana,  
e-pošta: janja.marc@ffa.uni-lj.si

### POVZETEK

Ustrezen in pravočasen imunski odziv je ključen za obrambo vsakega organizma pred patogeni, vključno z virusi. Pri tem sodeluje veliko različnih celičnih tipov, ki v ustreznih stopnjah okužbe opravljajo svoje specifično delovanje: prepoznavanje in procesiranje patogenih organizmov, zbiranje imunskih celic na mesto okužbe, predstavljanje antigenov in proženje adaptivnega imunskega odziva preko proženja limfocitov B in T, nastanek protiteles in vzpostavitvev imunskega spomina. Vsi posamezni koraki so tesno regulirani z medcelično komunikacijo in pozitivnimi ter negativnimi povratnimi zankami. Pri tem ključno vlogo igra tudi vitamin D, katerega glavna naloga je uravnavanje intenzitete in trajanja imunskega odziva preko spodbujanja delovanja regulatornih celic T, ki umirjajo imunski odziv in s tem preprečujejo pretirano aktivacijo, ki bi imela negativne posledice za organizem.

**Ključne besede:** imunski odziv, virus, SARS-CoV-2, covid-19; vitamin D

### ABSTRACT

An adequate and timely immune response is essential for the protection from pathogens, including viruses. This involves several different immune cell types, which exert their specific roles in different stages of the infection: pathogen recognition and antigen processing, recruitment of immune cells to the site of infection, presentation of antigens and activation of the adaptive immune response through activation of B and T lymphocytes, production of antibodies and establishment of the immunological memory. Each step is highly regulated through cellular communication and several positive and negative feedback loops. Vitamin D plays a crucial part in this, since its main role is in regulation of the intensity and duration of the immune response through stimulation of regulatory T cells, which prevent excessive activation of the immune system and thus negative consequences for the organism.

**Key words:** immune response, SARS-CoV-2, virus, COVID-19, vitamin D



## UVOD

Virusi so obligatni znotrajcelični paraziti, ki za svoje pomnoževanje in širitev potrebujejo gostiteljsko celico. Ta po njihovih navodih izdelava vse njihove gradnike, pomnoži virusno dednino in sestavi nove infektivne virione, ki se sprostijo iz celice in lahko okužijo nove gostitelje. Virusi so zaradi prilagoditve na gostitelja le redko smrtonosni, do smrtonosnosti pa prihaja predvsem, ko virus preskoči vrsto, npr. z živali na človeka (zoonoza), ali pa ko pride do večjih sprememb v virusnem dednem zapisu, s čimer se lahko spremenita struktura in funkcija virusa. Virusne okužbe so seveda smrtne tudi v primeru, ko ima gostitelj oslabiljen imunski sistem ali določene druge sočasne bolezni, ki jih virusna okužba močno poslabša. Imunski sistem je ključen za obrambo pred virusi in vključuje več korakov, različnih imunskih in neimunskih celic ter drugih komponent.

## OKUŽBA S SARS-COV-2

SARS-CoV-2 spada v družino beta koronavirusov. Sestavljen je iz dvoslojne lipidne membranske ovojnice, v kateri se nahajajo virusni strukturni proteini E (envelope), M (membranski glikoprotein) in S (spike protein), ki skrbi za stabilizacijo in integriteto virusne ovojnice, protein S pa sodeluje tudi pri vezavi in vstopu virusa v naše celice. V notranjosti ovojnice je virusni genom, ki je enoverižna molekula RNA, obdana s proteinom N. Ta virusni genom nosi zapis za 6 odprtih bralnih okvirjev (ORF1a, ORF1b, S, E, M, in N), v katerih so zapisani vsi strukturni in pomožni proteini, ki jih virus potrebuje za okužbo, replikacijo in izogibanje našemu imunskemu sistemu (4).

## PREPOZNAVANJE VIRUSA IN INTERFERONSKI ODZIV

Imunski odziv se začne z zaznavo prisotnosti virusa v gostiteljski celici ali tkivu. To se zgodi s pomočjo posebnih receptorjev za prepoznavanje molekularnih vzorcev patogenov (PRR; angl. pattern recognition receptors). To so npr. tolični receptorji (TLR; angl. Toll like receptors) 3, 7 in 8, ki se nahajajo v endosomih, ali pa MDA5 (prepozna dsRNA) ali RIG-I (prepozna 5' trifosfatni konec) receptorji, ki se nahajajo v citosolu gostiteljske celice. Viru-

Delovanje imunskega sistema je pod vplivom veliko okoljskih in genetskih dejavnikov. Genetski vplivi so vezani predvsem na alelne različice, polimorfizme genov ter spol osebe, ki ključno sodelujejo pri prepoznavanju ali odzivu na virus (1). Okoljski dejavniki, ki vplivajo na naše splošno zdravje in imunski sistem, so predvsem prehrana, gibanje, kajenje, alkohol, stres in onesnaženost okolja (2), močan vpliv pa imajo tudi druge sočasne bolezni in starost. Več študij je tudi pokazalo pozitivne vplive dodajanja esencialnih prehranskih dopolnil, kot je npr. vitamin D, na splošno zdravje in prebolevanje virusnih okužb (3).

V tem preglednem članku bova na kratko predstavili kompleksno področje imunskega odziva na virusno okužbo s poudarkom na SARS-CoV-2 in genomske učinke vitamina D v povezavi z imunostjo.

Virus v celico vstopi tako, da se s proteinom S veže na membranski receptor angiotenzinsko konvertazo 2 (ACE2; angiotensin-converting enzyme). Cepitev proteina S specifično celično peptidazo TMPRSS2 (angl. transmembrane protease serine 2) pa omogoči fuzijo virusne in gostiteljske membrane ter s tem vstop virusne RNA v celico (5). Ta RNA se nato prevede v mRNA za virusne strukturne in pomožne proteine. Nastali proteini in nova genomska RNA se v endoplazemskem retikulu in Golgijevem aparatu gostiteljske celice sestavijo v virione, ki se z eksocitozo izločijo iz celice (6).

se lahko prepoznajo tudi drugi receptorji, različen nabor teh pa se nahaja v vseh naših jedrnih celicah – skoraj vse celice v organizmu lahko torej virus prepoznajo in se nanj odzovejo (7, 8).

Ko se receptor PRR sproži, se spodbudijo različne signalne poti, ki vodijo v spremembo izražanja okrog 90 različnih genov, ki so potrebni za obrambo pred virusi. Vzpostavi »

se t. i. protivirusno stanje; celica že vnaprej pripravi orodja in mehanizme, ki ji bodo omogočili učinkovit odziv, zaježitev in odstranitev virusov (9). Okužena celica začne izločati citokine, s katerimi opozori sosednje celice na prisotnost virusa in sproži vzpostavitev protivirusnega stanja. Med temi citokini igrajo ključno vlogo predvsem interferoni, zato ta celoten mehanizem imenujemo interferonski odziv, glede na to, v katerih celicah to prepoznavanje poteka, pa ločimo interferonski odziv tipa I in tipa III (10).

Če virus prepoznajo npr. celice pljučnega epitelija, sprožijo interferonski odziv tipa III. Te celice izločajo IFN $\lambda$ , na katere se lahko odzovejo le ostale epiteljske celice in nevrotrofilci (11). Ta odziv torej poteka na lokalni ravni, na nivoju okuženega epitelija, je šibkejši, z njim so lahko zamejene in odstranjene manjše količine virusov, ne da bi pri tem nastalo vnetje ali poškodbe tkiva (12).

Če ta blagi interferonski odziv tipa III ne zadostuje za omejitev in odstranitev virusne okužbe in se virus širi naprej, to zaznajo tkivne imunske celice, ki namesto lokalnega sprožijo sistemski interferonski odziv ali interferonski odziv tipa I. Izločati začnejo IFN $\alpha$  in IFN $\beta$ , kar na mesto okužbe privabi večje število imunskih celic (npr. makrofagi, dendritične celice, limfociti) in v celicah aktivira dodatne imunske funkcije. Tak imunski odziv je močnejši in lahko odstrani tudi večje količine virusa, njegova slabost pa je nastanek lokalnega vnetja in poškodb tkiva (10).

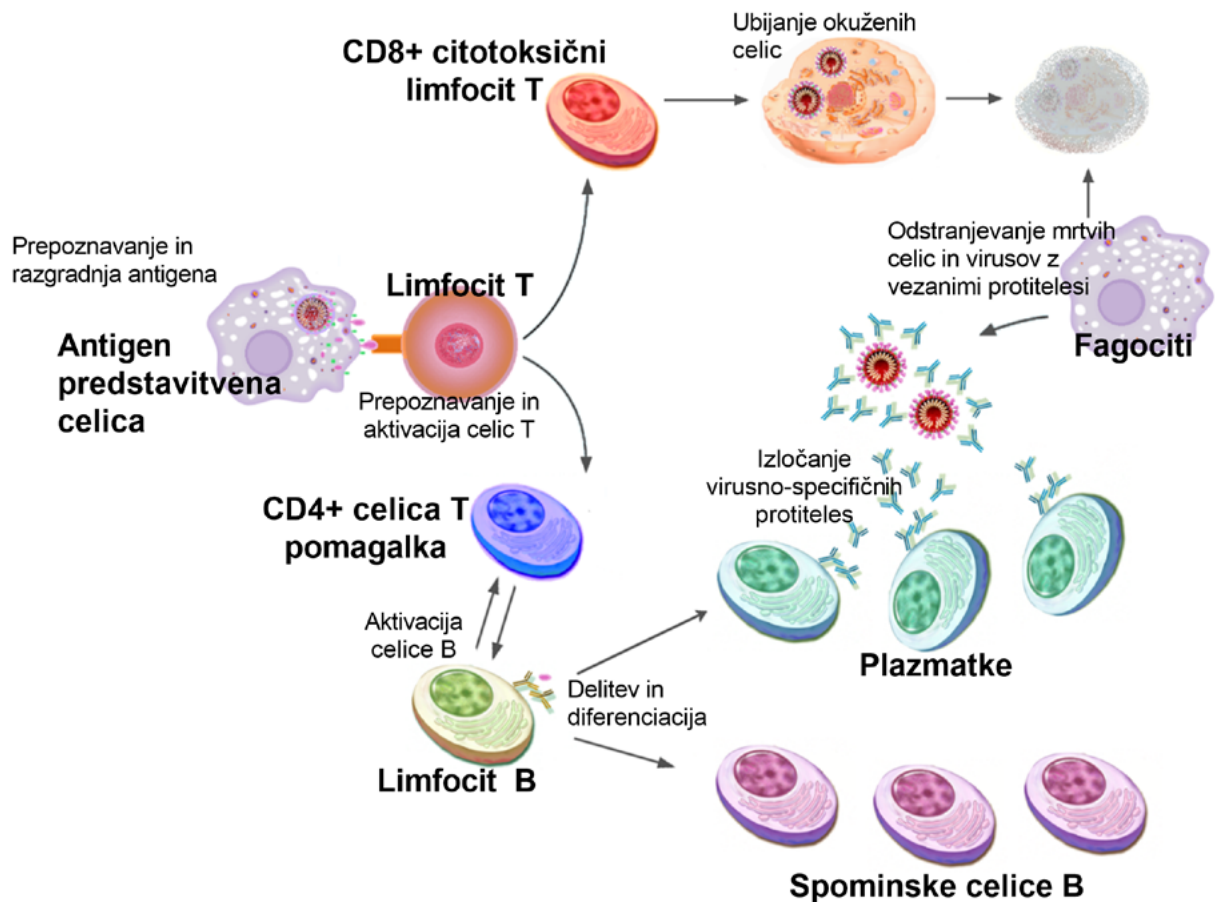
Ključno vlogo interferonskega odziva tipa I in III pri obrambi pred covidom-19 in drugimi virusnimi okužbami poudarjajo tudi študije, ki so zmanjšano delovanje interferonskega odziva, bodisi zaradi prirojenih mutacij ali avtoproteles, povezale s slabšim potekom covid-19 (13, 14).

## ANTIGEN PREDSTAVITVENE CELICE IN AKTIVACIJA T-LIMFOCITOV

Antigen predstavitvene celice (APC) so most med prirojenim in pridobljenim imunskim odzivom. Kot APC lahko delujejo vse celice, ki na svoji površini lahko izrazijo HLA receptor (humani levkocitni antigen). Na HLA receptorje se vežejo deli razgrajenega virusnega antigena, ki jih tako lahko prepoznajo limfociti T, ki imajo za te dele specifične T-celične receptorje (TCR). Obstajata dva tipa receptorjev HLA, HLA tipa I in HLA tipa II, ki dajeta celici T informacijo o »lokaciji najdbe« predstavljene antigena.

Če celice virusne antigene prepoznajo v svojem citosolu, te proteine razgradijo v proteasomu, nastali deli antigena se vežejo na HLA receptor tipa I in se izpostavijo na površini celic. Predstavljanje na HLA tipa I za limfocit T pomeni, da je celica, ki antigen predstavlja, okužena, zato se aktivirajo CD8<sup>+</sup> citotoksični limfociti T in v okuženi celici sprožijo apoptozo (15). CD8<sup>+</sup> celice predstavljajo večinski delež provnetnih celic, ki se infiltrirajo v intersticij okuženih pljuč. Z odstranjevanjem okuženih celic lahko povzročajo poškodbe tkiva (16).

Določene celice, ki jih imenujemo tudi profesionalne APC, pa lahko zaznajo, razgradijo in predstavijo tudi virusne antigene, ki jih najdejo na svoji površini ali v zunajceličnem okolju. Take celice so dendritične celice (DC), makrofagi in limfociti B. Ti endocitirani antigeni se razgradijo v lizosomih in se vežejo na receptorje HLA tipa II. Receptor HLA II aktivira CD4<sup>+</sup> celice T pomagalko, ki začnejo izločati velike količine citokinov, s katerimi spodbujajo nastanek virusno specifičnih protiteles preko aktivacije celic B, zbiranje limfocitov v okuženo tkivo in izločanje citokinov (15). Njihovo pomanjkanje vodi v zapoznel imunski odziv in s tem zapoznelo odstranitev virusa iz pljuč (17).



Slika 1: Pregled glavnih korakov aktivacije imunskega odziva ob prisotnosti patogenega organizma. Prirejeno po (18).

Figure 1: Overview of the main steps of immune system response to the presence of pathogens. Adapted from (18).

## AKTIVACIJA LIMFOCITOV B IN DOLGOROČNA IMUNOST

Nastanek virusno specifičnih protiteles in spominskih limfocitov B je ključen za dolgoročno odpornost na dani virus. Celice B delujejo kot APC. Virusni antigen se s svojim epitopom veže na zanj specifičen B-celični receptor (BCR), kar sproži njegov privzem, razgradnjo in predstavljanje na receptorju HLA tipa II, ki ga prepoznajo za ta isti antigen specifične celice T in celici navzkrižno aktivirata druga drugo. Celica B preko receptorja HLA aktivira

celico T pomagalko, ki začne izločati citokine, ki aktivirajo celico B in povzročijo njeno delitev v klonске hčérinske celice. Pod vplivom citokinov celic T se nato te hčérinske celice B diferencirajo bodisi v plazmatke, ki začnejo v velikih količinah izločati protitelesa z enako specifičnostjo kot BCR te iste celice. Drug tip celice pa so spominske B-celice, ki so dolgožive celice, namenjene hitremu odzivu ob ponovni okužbi z istim patogenom (19, 20). »

## INTERFERENCA VIRUSA Z GOSTITELJEVIM IMUNSKIM SISTEMOM

SARS-CoV-2, tako kot nekateri drugi respiratorni koronavirusi, lahko moti potek gostiteljevega imunskega odziva. Namen te motnje je zakasnit prepoznavanje in odstranjevanje virusa, s čimer ima virus več časa za pomnoževanje in širitev. Motnje temeljijo na vezavi nekaterih virusnih proteinov na določene gostiteljeve proteine, s čimer spremenijo njihovo delovanje (8, 10, 21). To vodi v ojačenje ali oslabitev signalnih poti, ki so ključne za ustrezen imunski odziv, predvsem interferonske poti (22); zmanjša se izločanje interferonov in drugih citokinov, slabša je vzpostavitev protivirusnega stanja, s tem pa tudi slabša oz. neustrezna aktivacija celic prirojenega in pridobljenega imunskega sistema (7, 10).

Tej motnji imunskega odziva npr. pripisujejo pojav visokovnetnega tipa makrofagov, ki izločajo velike količine provnetnih citokinov, kot so IL-6, IL-10 in TNF $\alpha$ . Virus zmanjša tudi izražanje receptorjev HLA tipa I in II, kar zavre T-celični imunski odziv (23). Za paciente s slabšim potekom bolezni je značilno tudi neravnovesje aktivacije celic T pomagalk tipa 1 in tipa 2 (Th1/Th2) in hiperaktivacija patogenih limfocitov Th1, ki izločajo velike količine IFN $\gamma$  in GM-CSF. Vse to pa lahko vodi v pojav citokinske nevihte v akutni fazi bolezni in močnega poslabšanja stanja bolnika. Motnje najverjetneje vplivajo tudi na netipičen nastanek protiteles in njihovo razmeroma kratko prisotnost po okužbi (7, 24, 25).

## IMUNSKI SISTEM IN GENOMSKI UČINKI VITAMINA D V POVEZAVI Z IMUNOSTJO

Vitamin D ( $1\alpha,25$  dihidroksi vitamin D [ $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ], tudi kalcitrol) uvrščamo med kalciotropne hormone, katerih glavna naloga je vzdrževati homeostazo kalcija v organizmu (26). Med najpomembnejše nekalciotropne učinke vitamina D se uvrščajo njegovi imunomodulatorni učinki na imunske in epitelne celice. Že pred 30 leti so namreč dokazali, da pomanjkanje vitamina D in mutacije v receptorju za vitamin D (VDR) vodijo v neustrezen odziv imunskega sistema, predvsem pri boleznih dihal, kot so kronična obstruktivna pljučna bolezen (KOPB), astma in tudi pri okužbah zgornjih dihalnih poti (27). Na splošno vitamin D v prvi vrsti sodeluje pri jačanju negativnih povratnih zank imunskega odziva ter zavira izločanje provnetnih in spodbuja izločanje protivnetnih citokinov. S tem imunski in vnetni odziv umirja ter ga vzdržuje znotraj fizioloških ravni.

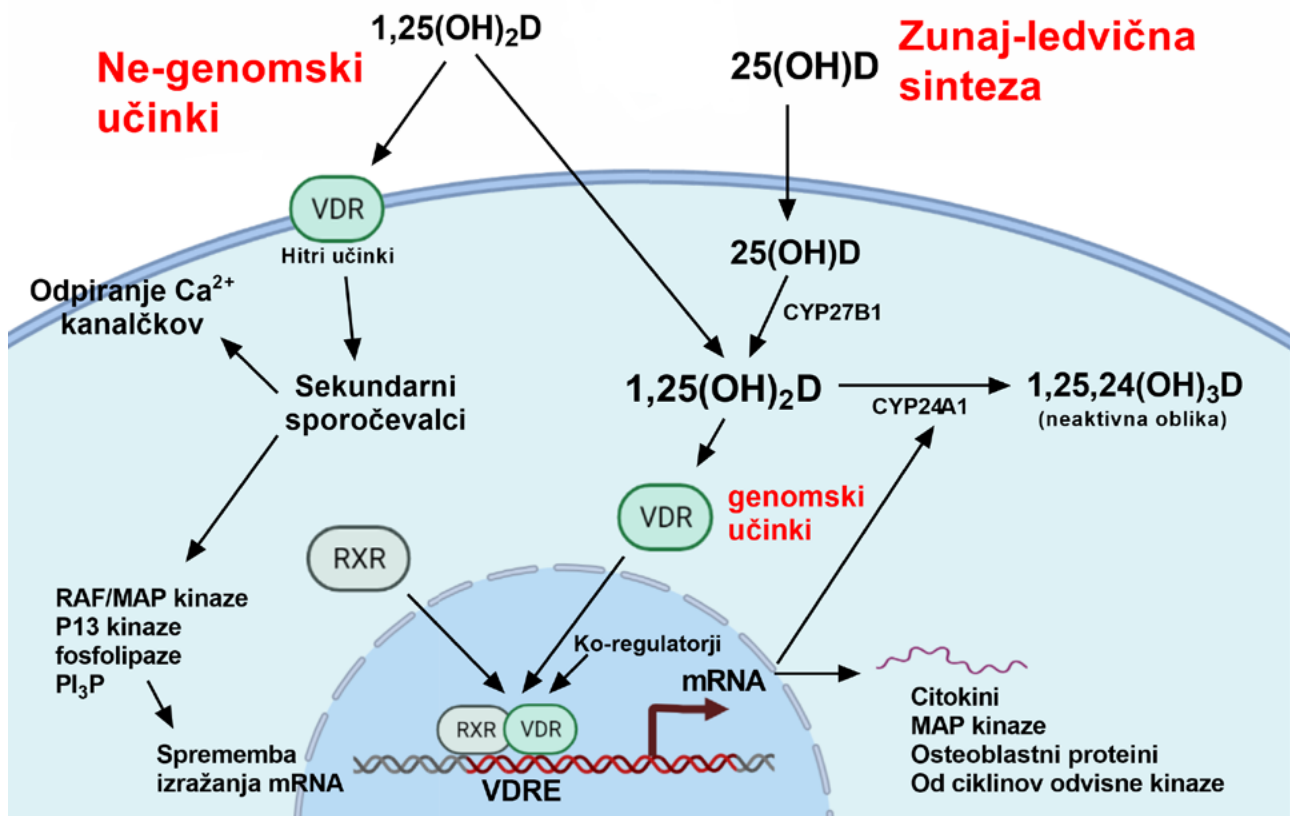
Neaktivno obliko vitamina D vnašamo v telo s hrano ali pa nastaja v koži pod vplivom UV žarkov. Bioaktivacija pote-

ka v dveh stopnjah; najprej v jetrih pod vplivom citokroma P450 25-hidroksilaze (CYP27A1), kjer nastane cirkulirajoča oblika 25-hidroksivitamin D [ $25(\text{OH})\text{D}$ ], nato pa običajno v ledvicah pod vplivom  $1\alpha$ -hidroksilaze (CYP27B1) nastane biološko aktivna oblika kalcitriol ali  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ . Ta oblika vitamina D lahko nastane tudi zunaj ledvic, v preko 30 različnih telesnih celicah, vključno z imunskimi. Slednje po eni strani sintetizirajo  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  iz plazemskega  $25(\text{OH})\text{D}$ , po drugi strani pa previsoke koncentracije  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  inaktivirajo v  $1,25,24(\text{OH})_3\text{D}$  s pomočjo encima 24-hidroksilaza (CYP24A1). Ta presnovek zavira delovanje CYP27B1 in tako zmanjša nastajanje  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  (slika 2). Na ta način lahko imunske celice same uravnajo (avtoregulirajo) raven  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ , vendar je ta še vedno odvisna od dostopne količine plazemskega  $25(\text{OH})\text{D}$  oz. od ustreznega vnosa vitamina D v telo (28).

## GENOMSKI IN NEGENOMSKI UČINKI VITAMINA D

Vitamin D učinkuje v tarčnih celicah preko vezave na VDR. Ta se nahaja bodisi v jedru tarčnih celic in posreduje genomske učinke vitamina D, in/ali na membrani tarčne celice in posreduje negenomske učinke vitamina D (slika 2). Večino svojih učinkov  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  opravi na genomski način. VDR se v jedru nahaja v obliki heterodimera z retinoidnim receptorjem (RXR) in je vezan na posebna zaporedja nukleotidov v DNA, ki jih imenujemo »na vitamin D odzivni elementi« ali VDRE. Ti ležijo v promotorjih vseh tarčnih genov za vitamin D. Vezava  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  na VDR povzroči konformacijsko spremembo heterodimera VDR-RXR, kar omogoči vezavo drugih dejavnikov, ki so potrebni za spremembo tarčnih genov. Teh je preko 500, med njimi tudi

nekatero kinaze, citokini, interleukini ter drugi proteini, ki neposredno ali posredno uravnavajo delitev in diferenciacijo celic ter imunski odziv. Manjši delež svojih učinkov pa  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  posreduje na negenomski način. Po vezavi na membranski receptor VDR se znotrajcelični prenos signalov začne z aktivacijo proteina G in PIP (fosfatidil inozitol (3, 4, 5)-trifosfat) signalne poti ter se nadaljuje z vstopom  $\text{Ca}^{2+}$  ionov v tarčno celico in kaskadno aktivacijo kinaz C. Končni rezultat je povečano izražanje določenih genov (slika 2). Značilnost tega delovanja vitamina D je, da gre za hitre učinke na tarčne celice, npr. hitra absorpcija  $\text{Ca}^{2+}$  ionov v tankem črevesju (29).



**Slika 2:** Genomski, negenomski učinki in avtokrino uravnavanje ravni  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  v tarčni celici. MAP – z mitogeni aktiviran protein; PIP3 – fosfatidil inozitol (3, 4, 5)-trifosfat; RAF – protoonkogen serin/treonin proteinska kinaza; RXR – retinoidni receptor; VDRE – vitamin D odzivni element. Prirejeno po (28).

**Figure 2:** Genomic, non-genomic effects and autocrine regulation of  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  concentration in target cells. MAP - mitogen-activated protein; PIP3 - phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate; RAF - proto-oncogene serine/threonine protein kinase; RXR - retinoid X receptor; VDRE - vitamin D response elements. Adapted from (28).

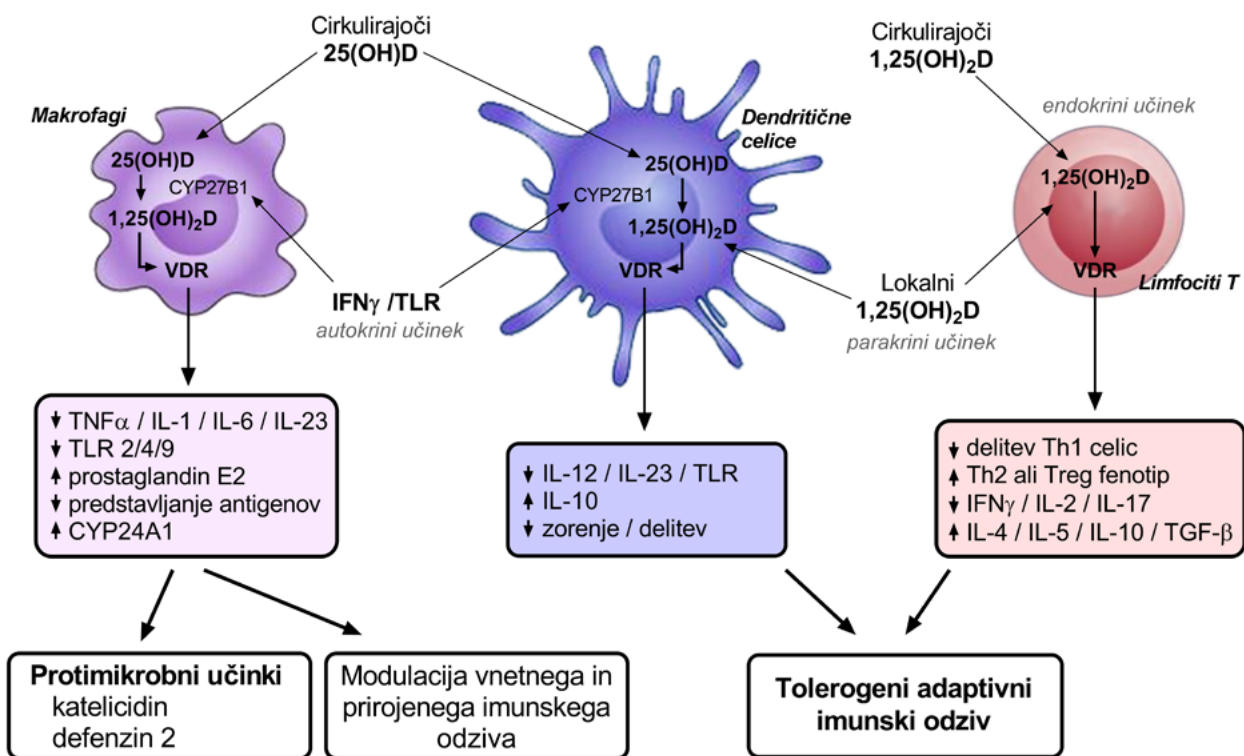
»



## DELOVANJE VITAMINA D NA IMUNSKÉ CELICE

Izražanje VDR in s tem odzivnost celic na vitamin D so dokazali v DC, makrofagih ter na limfocitih T. V makrofagih zmanjšuje izločanje provnetnih citokinov in povečuje sintezo protimikrobnih proteinov (katelicidin, defenzin). S tem vpliva na dozorevanje DC, aktivacijo makrofagov in odgovor celic T preko regulacije njihove priprave in aktivacije v prid vnetnemu odzivu tipa II in nastanku regulatornih T-celic (Treg). Makrofagi in DC sami pretvarjajo

neaktivno obliko vitamina D  $25(\text{OH})\text{D}$  v  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  (ekstrarenalna sinteza kalcitriola, slika 2), limfociti T pa morajo iz plazme prevzeti že aktivirano obliko  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ , saj je ne morejo sintetizirati sami (slika 3). V vseh omenjenih celicah imunskega sistema gre večinoma za genomске učinke vitamina D na osnovi avtokrinega, parakrinega ali endokrinega uravnavanja ravni  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  v tarčnih celicah (27).



Slika 3: Presnova vitamina D in njegov vpliv na funkcijo imunskih celic. IL - interleukini,  $\text{IFN}\gamma$  - interferon  $\gamma$ , TGF- $\beta$  - tumorski rastni faktor  $\beta$ , TLR - tolični receptor,  $\text{TNF}\alpha$  - tumorski nekrozní faktor  $\alpha$ , VDR - receptor vitamina D. Prirejeno po (28).

Figure 3: Vitamin D metabolism and its effects on immune cell function. IL - interleukin,  $\text{IFN}\gamma$  - interferon- $\gamma$ , TGF- $\beta$  - transforming growth factor- $\beta$ , TLR - toll-like receptor,  $\text{TNF}\alpha$  - tumor necrosis factor  $\alpha$ , VDR - vitamin D receptor. Adapted from (28).

### Učinki na makrofage

Vitamin D spodbuja prirojene imunske funkcije makrofagov in monocitov, povečuje njihovo sposobnost fagocitoze, dviguje izražanje membranskega manoznega receptorja (CD206) in DC-SIGN (CD209), spodbuja diferenciacijo

makrofagov M2 ter s tem izločanje protivnetnih citokinov, kot je IL-10. Vitamin D neposredno regulira citokine, ki so odvisni od aktivnosti jedrnega faktorja  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ), tako da zavre aktivacijo p65 NF- $\kappa\text{B}$ , s tem pa posredno zmanjša izločanje citokinov ob prepoznavanju virusov z

receptorji TLR. Ob tem vitamin D zmanjša nastajanje proinflammatoryh citokinov TNF $\alpha$ , IL-2, -6 in -23 ter vzpodbuja sintezo protimikrobnih peptidov, kot so katelicidini (LL-37) in defenzini  $\beta$ 4 (30). Makrofagi vitamin D uporabljajo tudi za negativno regulacijo lastne aktivacije. Pokazali so, da z IFN- $\gamma$  aktivirani makrofagi povečajo sintezo vitamina D, s čimer selektivno zavrejo nekatere svoje proinflammatory funkcije, kot so oksidativni izbruh in ekspresija določenih citokinov (31).

## Učinki vitamina D na dendritične celice

Vitamin D zavira dozorevanje DC preko zaviranja izražanja membranskih markerjev HLA-DR, DC14, CD40, CD80, CD83 in CD86, s čimer zmanjša tudi sposobnost interakcije dendritičnih celic s celicami T (32). Hkrati deluje v sinergiji z ligandi receptorjev TLR in poveča izločanje IL-8, IL-10 in IL-12, medtem ko zavira z LPS sproženo izločanje IL-12 in IL-23. Vitamin D torej lahko vodi v nastanek tolerogenih DC (32). Te celice izražajo manj HLA in kostimulatornih molekul in imajo tako manjšo sposobnost aktivacije efektorskih T-celic, hkrati pa izločajo več IL-10 in lahko sprožijo nastanek regulatornih T-celic (33). Povečano izločanje IL-10 spodbuja tudi diferenciacijo Th2 limfocitov, kar še poveča izločanje protivnetnih citokinov (34).

## Učinki na limfocite T

1,25(OH) $_2$ D modulira tudi adaptivni T-celični odziv tako, da zmanjšuje izločanje proinflammatoryh citokinov tipa 1 (IL-12, IFN $\gamma$ , IL-6 in TNF $\alpha$ ) in IL-7 ter poveča izločanje protivnetnih citokinov tipa 2 (IL-4, IL-5, IL-10). Preko povečanja izločanja IL-2 se poveča tudi delež regulatornih

T-celic (Treg), ki vzdržujejo ravnovesje T-celičnega odziva (Th1/Th2; Tc1/Tc2) in zmanjšajo nespecifično aktivacijo T-celic. Podobno kot pri DC to vodi v nastanek tolerogenega adaptivnega imunskega odziva (32). Prisotnost vitamina D tudi močno zmanjša nastanek CD8 $^+$  celic, ki izločajo IL-13 (34).

## Vitamin D in covid-19

Veliko študij je že potrdilo povezavo med ravnijo vitamina D v krvi in resnostjo/smrtnostjo virusnih dihalnih okužb tako pri odraslih kot pri otrocih (35). Leta 2017 je WHO tudi pozval k sistematiziranim študijam, ki bi pomagale oceniti, ali je aplikacija vitamina D za boljše delovanje imunskega sistema smiselna ali ne. Podoben pozitiven vpliv vitamina D na imunski odziv se nakazuje tudi pri virusnih okužbah s SARS-CoV-2, čeprav natančni mehanizmi še vedno niso znani (35). V nekaj študijah vpliva vitamina D niso dokazali (37, 38), večina študij pa potrjuje pozitiven vpliv vitamina D na ugodnejši izid okužbe (35, 39–41). Študije začenjajo pomanjkanje vitamina D navajati kot potencialni faktor tveganja (42), njegov upad pa pogosto sovpada z drugimi dejavniki tveganja, kot so starost, sladkorna bolezen tipa II, debelost in nekaterimi drugimi sočasnimi boleznimi. Ljudje s pomanjkanjem vitamina D [25(OH)D < 30 nmol/L] imajo večjo verjetnost da zbolijo (43–45), močnejše simptome (45–47) in večjo verjetnost za hospitalizacijo (44) ali celo smrt (48, 49). Nedavna klinična študija je tudi pokazala, da bi visoke koncentracije vitamina D lahko uporabljali kot terapijo pri bolnikih s težjim potekom covid-19 (50). Na podlagi teh rezultatov je bilo začelih več kliničnih študij, s katerimi želijo raziskati kavezalnost ter vpliv koncentracije in časa administracije, znanstveno utemeljenih priporočil za covid-19 pa še ni (35, 41).

## SKLEP

Ustrezen in učinkovit imunski odziv je ključen za uspešno obrambo organizma pred virusi. Pri tem sodeluje veliko celičnih tipov z različnimi lastnostmi, ki z medsebojno komunikacijo svoje funkcije prilagajajo lastnostim dane okužbe. Pri tem igrajo pomembno vlogo tudi drugi dejavniki, kot so splošno zdravstveno stanje, starost, spol

in prehrana. Tu ima pomembno vlogo tudi vitamin D, ki sodeluje pri regulaciji imunskega odziva. To nakazuje, da bi z ustreznim vnosom vitamina D in vzdrževanjem dovolj visoke koncentracije 25(OH)D v plazmi morda lahko vplivali na dozetnost in potek prebolevanja covid-19. »

## LITERATURA

- Anastassopoulou C, Gkizarioti Z, Patrinos GP, Tsakris A. Human genetic factors associated with susceptibility to SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease severity. *Hum Genomics* [Internet]. 2020 Oct 22 [cited 2020 Dec 30];14. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7578581/>
- MacGillivray DM, Kollmann TR. The Role of Environmental Factors in Modulating Immune Responses in Early Life. *Front Immunol* [Internet]. 2014 Sep 12 [cited 2021 Jan 26];5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4161944/>
- Bilezikian JP, Bikle D, Hewison M, Lazaretti-Castro M, Formenti AM, Gupta A, et al. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Vitamin D and COVID-19. *Eur J Endocrinol*. 2020;183(5):R133–47.
- Naqvi AAT, Fatima K, Mohammad T, Fatima U, Singh IK, Singh A, et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2020;1866(10):165878.
- Walls AC, Park Y-J, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*. 2020 Apr 16;181(2):281–292.e6.
- Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. *Coronaviruses*. 2015;1282:1–23.
- Molaei S, Dadkhah M, Asghariazar V, Karami C, Safarzadeh E. The immune response and immune evasion characteristics in SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2: Vaccine design strategies. *Int Immunopharmacol*. 2021;92:107051.
- Lim YX, Ng YL, Tam JP, Liu DX. Human Coronaviruses: A Review of Virus–Host Interactions. *Diseases* [Internet]. 2016 Jul 25 [cited 2021 Jan 26];4(3). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5456285/>
- Shaw AE, Hughes J, Gu Q, Behdena A, Singer JB, Dennis T, et al. Fundamental properties of the mammalian innate immune system revealed by multispecies comparison of type I interferon responses. *PLoS Biol*. 2017;15(12):e2004086.
- Park A, Iwasaki A. Type I and Type III Interferons – Induction, Signaling, Evasion, and Application to Combat COVID-19. *Cell Host Microbe*. 2020;27(6):870–8.
- Broggi A, Tan Y, Granucci F, Zanoni I. IFN- $\lambda$  suppresses intestinal inflammation by non-translational regulation of neutrophil function. *Nat Immunol*. 2017;18(10):1084–93.
- Wells AI, Coyne CB. Type III interferons in antiviral defenses at barrier surfaces. *Trends Immunol*. 2018;39(10):848–58.
- Bastard P, Rosen LB, Zhang Q, Michailidis E, Hoffmann H-H, Zhang Y, et al. Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science* [Internet]. 2020 Oct 23 [cited 2021 May 26];370(6515). Available from: <https://science.sciencemag.org/content/370/6515/eabd4585>
- Zhang Q, Bastard P, Liu Z, Pen JL, Moncada-Velez M, Chen J, et al. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science* [Internet]. 2020 Oct 23 [cited 2021 May 26];370(6515). Available from: <https://science.sciencemag.org/content/370/6515/eabd4570>
- Altmann DM, Boyton RJ. SARS-CoV-2 T cell immunity: Specificity, function, durability, and role in protection. *Sci Immunol* [Internet]. 2020 Jul 17 [cited 2021 Jan 26];5(49). Available from: <https://immunology.sciencemag.org/content/5/49/eabd6160>
- Schmidt ME, Varga SM. The CD8 T Cell Response to Respiratory Virus Infections. *Front Immunol* [Internet]. 2018 [cited 2021 Apr 12];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.00678/full#B37>
- Chen J, Lau YF, Lamirande EW, Paddock CD, Bartlett JH, Zaki SR, et al. Cellular immune responses to severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection in senescent BALB/c mice: CD4+ T cells are important in control of SARS-CoV infection. *J Virol*. 2010 Feb;84(3):1289–301.
- Manu5 me=Sciencia58 an the makers of the single images D [1], Fa, Petr94. English: Simplified overview of the processes involved in the primary immune response [Internet]. 2020 [cited 2021 Feb 3]. Available from: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Primary\\_immune\\_response\\_1.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Primary_immune_response_1.png)
- Kumar S, Nyodu R, Maurya VK, Saxena SK. Host Immune Response and Immunobiology of Human SARS-CoV-2 Infection. *Coronavirus Dis 2019 COVID-19*. 2020;43–53.
- Dörner T, Radbruch A. Antibodies and B Cell Memory in Viral Immunity. *Immunity*. 2007;27(3):384–92.
- Gordon DE, Jang GM, Bouhaddou M, Xu J, Obernier K, White KM, et al. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature*. 2020;583(7816):459–68.
- Li J-Y, Liao C-H, Wang Q, Tan Y-J, Luo R, Qiu Y, et al. The ORF6, ORF8 and nucleocapsid proteins of SARS-CoV-2 inhibit type I interferon signaling pathway. *Virus Res*. 2020;286:198074.
- Zheng M, Gao Y, Wang G, Song G, Liu S, Sun D, et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol*. 2020;17(5):533–5.
- Zhang Y, Li B, Ning B. The Comparative Immunological Characteristics of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 Coronavirus Infections. *Front Immunol* [Internet]. 2020 Aug 14 [cited 2021 Jan 25];11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7457039/>
- Taefehshok N, Taefehshok S, Heit B. Mechanisms of Dysregulated Humoral and Cellular Immunity by SARS-CoV-2. *Pathog Basel Switz*. 2020;9(12).
- Marc J. Vitamin D. In: Obreza A, Peterlin-Mašič L, Vovk T : Minerali, vitamini in druge izbrane snovi. 1st ed. Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo; 2020.p. 276–91.
- Coussens A. Immunomodulatory Actions of Vitamin D Metabolites and their Potential Relevance to Human Lung Disease. *Curr Respir Med Rev*. 2011;7:444–53.
- Norman P.E., Powell J.T. Vitamin D and Cardiovascular Disease. *Circ Res*. 2014;114(2):379–93.
- Jurutka PW, Whitfield GK, Hsieh J-C, Thompson PD, Haussler CA, Haussler MR. Molecular Nature of the Vitamin D Receptor and its Role in Regulation of Gene Expression. *Rev Endocr Metab Disord*. 2001;2(2):203–16.
- Bishop EL, Ismailova A, Dimeloe S, Hewison M, White JH. Vitamin D and Immune Regulation: Antibacterial, Antiviral, Anti-Inflammatory. *JBMR Plus*. 2021;5(1):e10405.



31. Helming L, Böse J, Ehrchen J, Schiebe S, Frahm T, Geffers R, et al. 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> is a potent suppressor of interferon gamma-mediated macrophage activation. *Blood*. 2005;106(13):4351–8.
32. Takeda M, Yamashita T, Sasaki N, Nakajima K, Kita T, Shinohara M, et al. Oral administration of an active form of vitamin D<sub>3</sub> (calcitriol) decreases atherosclerosis in mice by inducing regulatory T cells and immature dendritic cells with tolerogenic functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(12):2495–503.
33. Vanherwegen A-S, Gysemans C, Mathieu C. Regulation of Immune Function by Vitamin D and Its Use in Diseases of Immunity. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2017;46(4):1061–94.
34. Zdrenghea MT, Makrinioti H, Bagacean C, Bush A, Johnston SL, Stanciu LA. Vitamin D modulation of innate immune responses to respiratory viral infections. *Rev Med Virol*. 2017;27(1).
35. Teymoori-Rad M, Marashi SM. Vitamin D and Covid-19: From potential therapeutic effects to unanswered questions. *Rev Med Virol*. 2021;31(2):e2159.
36. WHO | Vitamin D for prevention of respiratory tract infections [Internet]. WHO. World Health Organization; [cited 2021 May 27]. Available from: [http://www.who.int/elena/titles/commentary/vitamin\\_d\\_pneumonia\\_children/en/](http://www.who.int/elena/titles/commentary/vitamin_d_pneumonia_children/en/)
37. Davoudi A, Najafi N, Aarabi M, Tayebi A, Nikaeen R, Izadyar H, et al. Lack of association between vitamin D insufficiency and clinical outcomes of patients with COVID-19 infection. *BMC Infect Dis*. 2021;21(1):450.
38. Cereda E, Bogliolo L, Klersy C, Lobascio F, Masi S, Crotti S, et al. Vitamin D 25OH deficiency in COVID-19 patients admitted to a tertiary referral hospital. *Clin Nutr Edinb Scotl*. 2021;40(4):2469–72.
39. Grant WB, Lahore H, McDonnell SL, Baggerly CA, French CB, Aliano JL, et al. Evidence that Vitamin D Supplementation Could Reduce Risk of Influenza and COVID-19 Infections and Deaths. *Nutrients* [Internet]. 2020 Apr 2 [cited 2021 May 27];12(4). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7231123/>
40. Yisak H, Ewunetei A, Kefale B, Mamuye M, Teshome F, Ambaw B, et al. <p>Effects of Vitamin D on COVID-19 Infection and Prognosis: A Systematic Review</p>. *Risk Manag Healthc Policy*. 2021;14:31–8.
41. Shah Alam M, Czajkowsky DM, Aminul Islam Md, Ataur Rahman Md. The role of vitamin D in reducing SARS-CoV-2 infection: An update. *Int Immunopharmacol*. 2021;97:107686.
42. Alipio M. Vitamin D Supplementation Could Possibly Improve Clinical Outcomes of Patients Infected with Coronavirus-2019 (COVID-2019). *SSRN Electron J*. 2020 Jan 1;
43. Kaufman HW, Niles JK, Kroll MH, Bi C, Holick MF. SARS-CoV-2 positivity rates associated with circulating 25-hydroxyvitamin D levels. *PloS One*. 2020;15(9):e0239252.
44. Merzon E, Tworowski D, Gorohovski A, Vinker S, Golan Cohen A, Green I, et al. Low plasma 25(OH) vitamin D level is associated with increased risk of COVID-19 infection: an Israeli population-based study. *FEBS J*. 2020;287(17):3693–702.
45. Yılmaz K, Şen V. Is vitamin D deficiency a risk factor for COVID-19 in children? *Pediatr Pulmonol*. 2020;55(12):3595–601.
46. Panagiotou G, Tee SA, Ihsan Y, Athar W, Marchitelli G, Kelly D, et al. Low serum 25-hydroxyvitamin D (25[OH]D) levels in patients hospitalized with COVID-19 are associated with greater disease severity. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2020;93(4):508–11.
47. Faniyi AA, Lugg ST, Faustini SE, Webster C, Duffy JE, Hewison M, et al. Vitamin D status and seroconversion for COVID-19 in UK healthcare workers. *Eur Respir J* [Internet]. 2021 Apr 8 [cited 2021 May 26];57(4). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7736751/>
48. Angelidi AM, Belanger MJ, Lorinsky MK, Karamanis D, Chamorro-Pareja N, Ognibene J, et al. Vitamin D Status Is Associated With In-Hospital Mortality and Mechanical Ventilation: A Cohort of COVID-19 Hospitalized Patients. *Mayo Clin Proc*. 2021;96(4):875–86.
49. Alguwaihes AM, Sabico S, Hasanato R, Al-Sofiani ME, Megdad M, Albader SS, et al. Severe vitamin D deficiency is not related to SARS-CoV-2 infection but may increase mortality risk in hospitalized adults: a retrospective case-control study in an Arab Gulf country. *Aging Clin Exp Res*. 2021;33(5):1415–22.
50. Entrenas Castillo M, Entrenas Costa LM, Vaquero Barrios JM, Alcalá Díaz JF, López Miranda J, Bouillon R, et al. Effect of calcifediol treatment and best available therapy versus best available therapy on intensive care unit admission and mortality among patients hospitalized for COVID-19: A pilot randomized clinical study. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2020;203:105751.

# Posebnosti laboratorijske medicine v pediatriji

## *Specific characteristics of the pediatric laboratory medicine*

Tina Levstek<sup>1</sup>, Katarina Trebušak Podkrajšek<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko

<sup>2</sup> Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko

Avtor za korespondenco:

izr. prof. dr. Katarina Trebušak Podkrajšek, spec. lab. med. genet. spec. med. biokem.

Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana,

e-pošta: katarina.trebusakpodkrajsek@mf.uni-lj.si

### POVZETEK

Laboratorijska medicina v pediatriji pokriva zelo široko obdobje vse od rojstva do adolescence. Zaradi hitre in intenzivne rasti ter razvoja v tem obdobju je laboratorijska medicina v pediatriji postavljena pred številne izzive. Pri pediatričnih pacientih spremembe v rezultatih laboratorijskih testov ne odražajo samo bolezenskega stanja, ampak tudi spremembe v rasti in razvoju preiskovanca. V preglednem članku navajamo najpogostejše izzive, s katerimi se srečujejo laboratorijski delavci in zdravniki pri laboratorijski diagnostiki v pediatriji, od predanaliznih in analiznih dejavnikov do referenčnih vrednosti in preiskav, ki se izvajajo večinoma le v pediatrični diagnostiki. Pri laboratorijski diagnostiki v pediatriji je zato potreben poseben pristop, ki upošteva razlike pri odvzemu vzorcev, izvedbi laboratorijskih testov, interpretaciji le-teh in drugačno pojavnost nekaterih bolezni v primerjavi z odraslo populacijo. Kljub številnim izzivom laboratorijska medicina v pediatriji pomembno prispeva k postavitvi diagnoze in s tem boljši obravnavi dojenčkov, otrok in mladostnikov. Za čim bolj kakovostno klinično obravnavo otrok pa je nujno tesno sodelovanje med laboratorijskim osebjem in zdravniki.

**Ključne besede:** laboratorijska medicina, pediatrija

### ABSTRACT

Pediatric laboratory medicine covers a very wide period from birth to adolescence. Due to rapid and intense growth and development during this period, pediatric laboratory medicine faces many challenges. The differences in laboratory test results do not only reflect the changes associated with pathophysiological processes but also mirror growth and development. In this review article, we list the most common problems encountered by laboratory workers and clinicians in pediatric laboratory diagnostics from preanalytical and analytical factors to reference values and tests that are usually unique to pediatric diagnostics. It is important to be aware of a special approach in pediatric medicine, as significant differences exist in sample collection, test performance, test interpretation, and disease frequencies. Despite many challenges, pediatric laboratory medicine makes an important contribution to diagnosis and, consequently better treatment of infants, children, and adolescents. Close collaboration between specialists in laboratory medicine and clinicians is paramount to improve health outcomes in this age group.

**Key words:** laboratory medicine, pediatrics

## UVOD

Laboratorijska diagnostika v pediatriji je postavljena pred številne izzive, saj obsega široko obdobje vse od rojstva do adolescence (1). Takoj po rojstvu se začne prilagajanje novorojenčka na življenje izven maternice, kar vodi v spremembe številnih laboratorijskih parametrov. Večina organskih sistemov ob rojstvu je še v razvoju, kar lahko vodi v dihalno stisko (nerazvitost pljuč), motnje v ravnotežju vode in elektrolitov (nerazvitost ledvic) ter zlatenico (nerazvitost jeter). Zaradi krajše življenjske dobe eritrocitov, manjšega izločanja bilirubina v črevo in nepopolne jetrne funkcije (2) je pogost pojav v prvih dneh po rojstvu zlatenica zaradi hiperbilirubinemije (3). Hitra rast v prvih letih življenja in med puberteto se odraža v cikličnih spremembah označevalcev rasti skeletnega sistema, spolno dozorevanje pa v velikih spremembah izločanja spolnih hormonov, kar vodi v razvoj sekundarnih spolnih znakov in nenazadnje v odraslost (3). Spremembe v rezultatih laboratorij-

skih preiskav, za razliko od odrasle populacije, torej niso le posledica patoloških procesov, ampak tudi intenzivnega razvoja in rasti. Zato je interpretacija rezultatov običajno zahtevnejša in terja določeno mero izkušenj. Poleg tega poseben izziv predstavljajo bolezni, ki se pojavljajo večinoma ali izključno samo v pediatrični populaciji, npr. genetske, imunske, infekcijske in endokrinološke bolezni (1). Laboratorijska diagnostika teh bolezni zahteva nekatere specifične metodološke pristope, ki se zato bolj pogosto uporabljajo v pediatričnih laboratorijih. Nič manj zahtevni nista tudi predanalizna in analizna faza, v katerih se pojavljajo nekatere unikatne težave, ki pri odraslih niso prisotne (1, 4). Pregled nekaterih najpomembnejših izzivov pediatrične laboratorijske diagnostike je zbran v Tabeli 1. Podrobneje so opisani v nadaljevanju, skupaj s pristopi za učinkovito soočanje z njimi.

**Tabela 1:** Izzivi v laboratorijski medicini v pediatriji

**Table 1:** Challenges in pediatrics laboratory medicine

Odvzem vzorca	Postavitev meril za odvzem najmanjšega možnega volumna vzorca in uporaba ustreznih vsebnikov/zbirnikov. Ustrezno usposobljeno osebje za čim manj boleč in stresen odvzem.
Majhen volumen vzorca	Uporaba analizatorjev, ki potrebujejo za analizo čim manjši volumen vzorca in imajo majhen mrtvi volumen.
Referenčne vrednosti	Kjer je le mogoče, uporaba referenčnih vrednosti glede na starost. Uporaba podatkovnih baz za postavitev referenčnih vrednosti. Predvsem pri nedonošenčkih je interpretacija rezultatov še posebno zahtevna, zato so potrebne ustrezne izkušnje.
Specifične in redke bolezni v pediatriji	Vpeljava metod za diagnosticiranje bolezenskih stanj, ki se pojavljajo predvsem v pediatrični populaciji in postavitev diagnostičnih algoritmov.
Sodelovanje	Komunikacija med laboratorijskim osebjem in zdravniki je ključna za identifikacijo možnih dejavnikov, ki vplivajo na rezultat laboratorijskega testa in pravilno interpretacijo rezultatov.

»

## PREDANALIZNI DEJAVNIKI

Dva od najpomembnejših predanaliznih dejavnikov v pediatrični laboratorijski diagnostiki sta starost pacienta in odvzem vzorca (1). V primerjavi z odraslo populacijo je odvzem vzorcev običajno zahtevnejši. Izbira mesta odvzema krvi je odvisna od starosti pacienta, potrebnega volumna vzorca ter vrste laboratorijskega testa. Za odvzeme krvi pri dojenčkih in otrocih je potrebna posebna usposobljenost, da je odvzem čim manj boleč in se tako prepreči morebitne poškodbe (5).

Kapilarna kri je primeren vzorec le za omejeno število preiskav zaradi majhnega volumna ter možne kontaminacije s celično in medcelično tekočino (6). Poleg tega se koncentracije nekaterih analitov razlikujejo med kapilarno in vensko krvjo. Tako so na primer vrednosti glukoze, laktat dehidrogenaze (LDH), aspartat aminotransferaze (AST), hemoglobina, povprečnega volumna eritrocitov (MCV), povprečnega volumna trombocitov (MPV), parcialnega tlaka kisika ( $pO_2$ ) in nasičenosti krvi s kisikom ( $sO_2$ ) višje, vrednosti kalcija, kalija, natrija, celokupnih proteinov, parcialnega tlaka ogljikovega dioksida ( $pCO_2$ ), trombocitov in povprečne koncentracije hemoglobina v eritrocitih (MCHC) pa nižje v kapilarni krvi v primerjavi z vensko (6). Čeprav se omenjene vrednosti značilno razlikujejo med vensko in kapilarno krvjo, običajno niso klinično pomembne, saj so manjše od 5 %. Vseeno je pri podajanju rezultatov iz kapilarne krvi potrebna pazljivost, saj so referenčne vrednosti večinoma podane za meritve v venski krvi. Na izvidu je zato treba označiti, da gre za meritve v kapilarni krvi. Če bi lahko to vplivalo na interpretacijo, je svetovan posvet z zdravnikom in po potrebi odvzem venske krvi (6). Mesto odvzema kapilarne krvi je odvisno od starosti in teže pacienta. Pri dojenčkih do šestega meseca starosti in teže od 3 do 10 kg je najprimernejše mesto odvzema kapilarne krvi medialni oz. lateralni del pete, pri dojenčkih, starih več kot šest mesecev in s težo nad 10 kg pa je mesto odvzema prst na roki (sredinec ali prstanec) (5). V Sloveniji so ta priporočila zbrana v knjižici *Priporočeni postopek za odvzem kapilarne krvi*, ki jo je izdalo Slovensko združenje za klinično kemijo in laboratorijsko medicino, in je bila pred kratkim revidirana (6).

Pri odvzemu venske krvi je treba posebno pozornost nameniti volumnu odvzete krvi. Pogosto se namreč zgodi, da je celotni odvzeti volumen krvi glede na naročeno število preiskav večji od potrebnega (7). Oblikovanje priporočil

za odvzem optimalnega volumna krvi, v katerih je poleg starosti in teže pacienta upoštevano tudi število naročenih testov ter morebitne ponovitve meritev in redčitve, je zato izjemno pomembno (4). Pri dojenčkih in majhnih otrocih, še posebej kritično bolnih, lahko prevelik volumen odvzete krvi namreč vodi do iatrogene anemije (8), zaradi česar je lahko potrebna tudi transfuzija krvi (3). Največji dovoljeni volumen odvzete krvi je odvisen od celotnega volumna krvi preiskovanca. Pri dojenčkih do dveh mesecev je največji dovoljeni odvzeti volumen na dan do 3 % celotnega volumna krvi, pri dojenčkih, starejših od dveh mesecev pa ne več kot 10 % (9). Priporočila veljajo za zdrave otroke, pri bolnih je največji dovoljeni volumen še manjši. Za odvzem manjših volumnov krvi se običajno uporabljajo mikroeprovete namesto standardnih za odvzem pri odraslih. S tem se izognemo nepopolnemu polnjenju in nestreznemu razmerju med krvjo in antikoagulantom, kar lahko vodi v napačne rezultate analiz (npr. pri testih strjevanja krvi), hemolizo ali spremenjeno morfologijo celic (4). Ker imajo dojenčki in otroci manjši premer ven, za odvzem uporabljamo tanjše igle, kar lahko vodi v hemolizo in lažno hiperkaliemijo (3). Zaradi majhnega volumna odvzetega vzorca je zelo pomembno, da preprečimo izhlapevanje pred samo analizo, saj lahko že majhne količine izhlapelne tekočine vodijo v velike spremembe v koncentraciji analita. Pri volumnu seruma 2 mL se koncentracija v štirih urah zaradi izhlapevanja poveča za 10 %, medtem ko je pri volumnu 0,5 mL povečanje koncentracije kar 50 % (10).

Pri dojenčkih in majhnih otrocih, ki še ne morejo nadzorovano urinirati, je težaven tudi odvzem urina. Za odvzem uporabljamo posebne plastične vrečke s hipoalergenim adhezivnim sredstvom, ki naj jih, če je le mogoče, namesti zdravstveni delavec, in sicer na dobro očiščeno in osušeno področje presredka okoli izvodil. Pri deklicah moramo biti previdni, da območje rektuma ostane zunaj odprtine, pri fantkih pa vrečko natakemo na penis ter prilepimo na presredek. Sterilne plastične vrečke naj bodo prilepljene največ eno uro, ker se po tem času močno poveča možnost kontaminacije. Morebitno uriniranje preverjamo na 15 minut, po uriniranju vrečko čim prej odstranimo in vzorec prelijemo v urinski lonček (11).

## ANALIZNI DEJAVNIKI

Največjo omejitev pri analiziranju pediatričnih vzorcev pogosto predstavlja majhen volumen razpoložljivega vzorca (4). To zahteva uporabo prilagojenih instrumentov, ki za izvedbo analize potrebujejo majhen volumen vzorca in imajo čim manjši mrtvi volumen. Prvo zahtevo analizatorji dandanes večinoma izpolnjujejo, saj so potrebni volumni za analizo običajno zelo majhni. Večji potrebni volumen in s tem težavo predstavlja mrtvi volumen. Mrtvi volumen je volumen, ki je potreben za normalno delovanje instrumenta oz. volumen, pod katerim pipetiranje ni mogoče. Zavedati se je treba, da je velikost mrtvega volumna odvisna tudi od uporabljenih epruvet. Zaželeno je tudi, da je metoda, ki se uporablja za analizo pediatričnih vzorcev, čim manj občutljiva na hemolizo in hiperbilirubinemijo, ki sta pogosti interferenci pri pediatričnih vzorcih (1).

Če je le mogoče, je v pediatriji bolj priporočljiva uporaba polne krvi kot seruma ali plazme. Hematokrit namreč vpliva na količino seruma v vzorcu. Večji kot je hematokrit,

večji volumen vzorca je potreben za pridobitev zadostnega volumna seruma. To je še posebej pomembno pri nedonošenčkih in novorojenčkih, ki imajo tudi do 70 % hematokrita, medtem ko je vrednost hematokrita pri starejših otrocih in odraslih pod 50 %. Tudi plazma predstavlja le okoli 40–60 % polne krvi (3, 4).

Zaradi majhnega razpoložljivega volumna vzorca v pediatrični laboratorijski diagnostiki vedno večjo veljavo pridobiva tudi testiranje ob preiskovancu (POCT, angl. Point of Care Testing) (1). Poleg tega je prednost POCT tudi, da predpriprava vzorcev običajno ni potrebna, in da so rezultati analiz hitro dostopni, kar je še posebej pomembno pri kritično bolnih pediatričnih pacientih (4, 12). Takojšen rezultat pri uporabi testov POCT, ki vpliva na potek zdravljenja, je tudi glavni razlog za njihovo uporabo. Ker POCT testiranje izvaja večinoma nelaboratorijsko osebje, morajo biti testi enostavni za uporabo in robustni, da na rezultat vpliva čim manj zunanjih motenj in vplivov (12).

## REFERENČNE VREDNOSTI

Interpretacija rezultatov, skladna s starostjo pacienta, je pri pediatrični populaciji ključnega pomena, saj uporaba napačnih referenčnih intervalov vodi v napačno ali poznejšo postavitev diagnoze, neoptimalno zdravljenje in povečanje stroškov zaradi nepotrebnih dodatnih preiskav. Za večino analitov referenčne vrednosti za odrasle niso primerne za uporabo v pediatrični populaciji (13). Referenčne vrednosti morajo namreč upoštevati rast in razvoj organizma, vseeno pa sama kronološka starost ni vedno najboljša osnova za interpretacijo rezultatov (1, 14), saj na interpretacijo vplivajo tudi številni dejavniki, kot so prezgodnje dozorevanje, spremembe v puberteti in nedonošenost (1), ki jih je treba upoštevati. Poleg tega je določitev posameznih podskupin referenčnih intervalov pogosto težavna, zato so skupine (npr. glede na starost) pogosto arbitrarno določene (4, 14). Tako se lahko zgodi, da po rojstnem dnevu pacient pade v drugo referenčno skupino in vrednosti, ki so bile prej patološke, postanejo normalne ali obratno. Najbolj težavno skupino pri postavitvi referenčnih vrednosti predstavljajo nedonošenčki, pri katerih za postavitev referenčnih vrednosti še vedno največkrat uporabljamo obstoječe podatke iz laboratorijskega informacijskega sistema (13). Sodelovanje z zdravniki in

opredelitev skladnosti interpretacije rezultatov s klinično sliko sta zato ključnega pomena.

Poseben izziv predstavlja tudi sama postavitev referenčnih intervalov za pediatrično populacijo, saj je odvzem vzorcev zdravim nedonošenčkom, dojenčkom in otrokom etično sporen (1). Kljub temu je bil v zadnjem desetletju narejen velik napredek pri postavitvi referenčnih vrednosti za pediatrično populacijo, saj je bilo izpeljanih več prospektivnih in retrospektivnih študij. Med največje spadajo kanadski projekt CALIPER (*Canadian Laboratory Initiative on Pediatric Reference Intervals*) (15), skandinavski projekt NORICHILD (16), nemški projekt KiGGS (*the German Health Interview and Examination Survey for Children and Adolescents*) (17) in ameriški projekt NCS (*the National Children's Study*) (18). Te študije so izjemnega pomena, saj omogočajo laboratorijem, da pridobljene referenčne vrednosti prenesejo v svoj laboratorij. Postavitev referenčnih vrednosti je namreč drag in dolgotrajen postopek. Pri prenosu referenčnih vrednosti predpostavljamo, da so bile prvotne referenčne vrednosti pridobljene z ustrežno izvedeno preiskavo, pri samem prenosu pa je tre- »

ba upoštevati, katera metoda je bila uporabljena za določitev referenčnih vrednosti, in da sta populaciji pacientov primerljivi. Če ta dva pogoja nista izpolnjena, prenos ni smiseln. Pomembno je, da laboratorij prenesene referenčne vrednosti testira na manjši skupini referenčnih posame-

znikov in s tem preveri uporabnost referenčnih intervalov na svoji populaciji (19). Referenčne vrednosti presnovkov pri presejalnih testih so pogosto odvisne od genetske strukture populacije, kar je zelo pomembno tudi pri prilagoditvi referenčnih vrednosti pri neonatalnem presejanju (20).

## BOLEZNI V PEDIATRIČNI POPULACIJI

Pri zdravih novorojencih laboratorijska diagnostika običajno ni potrebna, velik pomen ima le presejalna diagnostika, s katero prepoznamo bolezenska stanja, ki bi lahko negativno vplivala na nadaljnji razvoj ali celo povzročila prezgodnjo smrt. Presejalna testiranja uporabljamo za bolezni, pri katerih lahko z zgodnjo diagnostiko njihov razvoj preprečimo ali upočasnimo, v nekaterih primerih le z uvedbo ustrezne diete (3). Za presejalna testiranja se uporabljajo visoko občutljivi testi, s tem pa je zagotovljeno, da je število lažno negativnih rezultatov čim manjše. Vse pozitivne rezultate namreč nato potrdimo z bolj specifičnimi testi, da izločimo lažno pozitivne (21). V Sloveniji se je leta 2018, poleg fenilketonurije in kongenitalnega hipotiroidizma, testiranje razširilo na dodatnih 17 prirojenih presnovnih bolezni (22).

Številna bolezenska stanja se pojavljajo pretežno oz. izključno v pediatrični populaciji. Mednje sodijo genetske, endokrinološke, imunske in nalezljive bolezni (1, 3, 4). Zato se številne laboratorijske preiskave, ki so usmerjene v diagnostiko teh bolezni, pri pediatričnih pacientih pogosteje izvajajo kot pri ostalih preiskovancih. Ustrezna izbira testov, ki jih izvaja laboratorij, je ključnega pomena za odkrivanje teh bolezni, skupaj s postavitvijo diagnostičnih algoritmov. Izbira analizne metode je večstopenjski proces, ki je med drugim odvisen od namena analize, klinične slike preiskovanca, molekularnih mehanizmov ter razpoložljivega časa in finančnih sredstev (23, 24). V zadnjih letih je prišlo do velikega napredka biokemičnih in genetskih metod za diagnostiko bolezni. Pri biokemični analizi sta postali ključni tehniki tandemske masne spektrometrije in plinske kromatografije, medtem ko sta pri genetski analizi pomembni predvsem molekularna kariatipizacija in sekvenciranje naslednje generacije (NGS) (25).

### Kromatografske metode za diagnostiko prirojenih bolezni presnove pri otrocih

Prirojene bolezni presnove so velika skupina genetskih bolezni, ki so posledica okvare ali odsotnosti genskih zapisov sodelujočih molekul presnovnih poti, predvsem encimov. To vodi v kopičenje presnovkov in njihovih stranskih produktov, ki lahko zaradi svoje toksičnosti vplivajo na normalno delovanje celic (26). Medtem ko se nekatere izmed njih izrazijo že kmalu po rojstvu, se predvsem pri pacientih z višjo preostalo encimsko aktivnostjo lahko izrazijo tudi kasneje v otroštvu ali adolescenci, največkrat zaradi prisotnosti različnih sprožilnih dejavnikov, kot so okužbe, povišana telesna temperatura, visok proteinski vnos, stradanje, velik telesni napor in nekatera zdravila (27). Prirojene bolezni intermediarne presnove, ki jih predstavljajo predvsem motnje presnove aminokislin in maščobnih kislin, diagnosticiramo z določanjem acilkarnitinov, aminokislin in organskih kislin v različnih bioloških tekočinah in tkivih (28). V nekaterih primerih je za postavitve diagnoze potreben odvzem med akutno fazo bolezni, saj je le takrat raven presnovkov značilno zvišana (29).

Tandemska masna spektrometrija (MS/MS) omogoča hitro ter tako kvalitativno kot kvantitativno določanje acilkarnitinov in aminokislin (25). Priporočeni vzorec je plazma, saj v primerjavi s serumom omogoča hitrejšo obdelavo, možno pa je tudi določanje presnovkov iz krvnih madežev, izluženih (ekstrahiranih) iz filtrskega papirja, ki se uporablja predvsem pri presejalnem testiranju novorojencev (26, 29). Pred samo analizo je potrebna izolacija presnovkov, deproteinizacija, s čimer se odstranijo intaktni proteini, in derivatizacija, ki izboljša ionizacijo in analitsko



specifičnost. Pri bolj občutljivih analizatorjih derivatizacija ni potrebna (26, 28). Sledi ločitev presnovkov in njihovih stabilnih izotopsko označenih internih standardov s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC). Pri presejalnem testiranju novorojencev se ločba s HPLC ne izvaja, kar pripomore h krajšemu času analize. Pred vstopom v masni spektrometer v ionizatorju poteče ionizacija. V prvem masnem analizatorju se ioni ločijo na osnovi njihovega razmerja med maso in nabojem ( $m/z$ ). Po fragmentaciji z inertnim plinom v kolizijski celici sledi ponovna ločitev glede na  $m/z$  v drugem masnem analizatorju, ki ji sledi detekcija (29).

Organske kisline se določajo s plinsko kromatografijo, sklopljeno z masnim detektorjem (GS-MS), ki omogoča robustno in ponovljivo analizo v kratkem času (26). Najprimernejši vzorec je običajno urin, saj organske kisline zaradi majhne molekulske mase prehajajo glomerulno membrano. Pred samo analizo je potrebna izolacija organskih kislin iz urina in derivatizacija (26). Ločevanje temelji na osnovi njihove velikosti in hlapnosti z uporabo kolone, ki vsebuje plinsko mobilno in tekočo stacionarno fazo. Mobilna faza omogoča premikanje hlapnih komponent, ki se zadržujejo v stacionarni fazi, skozi kolono. Po ionizaciji v ionskem izvoru masni detektor posname masni spekter posamezne komponente. Za identifikacijo je potrebna primerjava masnih spektrov s spektri, dostopnimi v knjižnicah (29). GC-MS ni primeren za analizo termolabilnih aminokislin, kot so cistein, citrulin in taurin, omogoča pa določitev velikega števila analitov z visoko resolucijo, občutljivostjo in specifičnostjo, kot tudi identifikacijo neznanih presnovkov s pomočjo obsežnih knjižnic (26).

## Molekularna kariotipizacija in sekvenciranje naslednje generacije v diagnostiki genetskih bolezní pri otrocih

Obseg genetskega testiranja je izjemno širok, saj lahko določimo spremembe v številu posameznih genomskih lokusov, kot so pridobitev ali izguba celotnih kromosomov (aneuploidije), kot tudi spremembe v strukturi (translokacije, insercije, inverzije) in zaporedju genoma (polimorfizmi posameznih nukleotidov (SNP) ter spremembe v številu kopij (angl. *copy number variations*, CNV), ki vključujejo tako spremembe v številu kopij posameznega gena kot tudi kratke insercije, delecije in duplikacije) (24, 30). V preteklosti so za

ugotavljanje genetskih bolezní uporabljali predvsem analizo kariotipa z G-proganjem kromosomov in sekvenciranje po Sangerju, danes pa prevladujejo metode, ki temeljijo na molekularni kariotipizaciji (imenovane tudi kromosomske mikromreže ali komparativna hibridizacija z uporabo mikromrež) in sekvenciranju naslednje generacije (NGS) (24), ki so pomembno prispevale k izboljšani diagnostiki kompleksnih genetskih bolezní tudi pri pediatričnih pacientih.

Molekularna kariotipizacija temelji na metodi primerjalne genomske hibridizacije z uporabo mikromrež (aCGH) in molekul DNA, označenih z različnimi barvili. Po vezavi na kratka zaporedja DNA, imobilizirana na stekelcu, se zazna razliko v jakosti signala med preiskovančevó in referenčno DNA (31). Metoda ima v primerjavi s kariotipizacijo kar nekaj prednosti: ni potrebe po delecijah se celicah, omogoča objektivnejšo interpretacijo rezultatov in predvsem ima boljšo občutljivost, saj lahko zazna CNV v velikosti 10–20 kb. Njene slabosti pa so, da ne zazna uravnoveženih translokacij, ki ne spremenijo CNV, in točkovnih genetskih sprememb, delecij ali duplikacij na ravni posameznega gena. Veliko težavo predstavljajo tudi CNV neznanega pomena, saj vse CNV in njihova patogenost še niso znane (31, 32). Molekularna kariotipizacija se uporablja predvsem za prepoznavanje prirojenih kompleksnejših večorganskih nepravilnosti ali prizadetosti in kognitivnih manjrazvitosti (31, 32).

NGS ali masivno paralelno sekvenciranje je metoda hkratnega sekvenciranja milijonov fragmentov DNA, ki je bila hitro vpeljana v klinične laboratorije zaradi možnosti analiziranja več genov ali genskih regij hkrati (33). Po obsegu delimo NGS na tri skupine (32). Najbolj usmerjeno sekvenciranje je z analizo izbranega panela genov. To so geni, ki so nedvoumno povezani z določenim kliničnim fenotipom. Število genov na panelih se zelo razlikuje glede na specifičen fenotip, ki ga opredeljujemo. Tako so pri panelu za ugotavljanje družinske hiperholesterolemije običajno prisotni le 4 geni, pri zmanjšani intelektualni sposobnosti brez pridruženih patognomoničnih značilnosti pa več kot 1000 genov (32). Bolj obsežna sta sekvenciranje eksonov in sekvenciranje celotnega genoma, ki se pogosto uporabljata po predhodno negativnem rezultatu sekvenciranja izbranega panela genov in pri kompleksih fenotipih. Pri sekvenciranju eksonov določimo vse gene v kodirajočih regijah, pri tem je lahko analiza omejena na gene, ki so znano povezani z boleznimi pri človeku (klinični eksom ali Mendelium). Sekvenciranje celotnega genoma pa ni usmerjeno in vsebuje tako kodirajoče regije, kot tudi intronska in intergenska področja. Pred- »

nosti in slabosti posameznega sekvenciranja so povezane z obsegom preiskave. Tarčno sekvenciranje omogoča globlje sekvenciranje tarčnih regij, poleg tega je povezano z nižjimi stroški, v primeru, da so tarčni geni maloštevilni. Na drugi strani pa s tarčnim sekvenciranjem ne moremo odkriti novih genov, povezanih s fenotipom, kar je prednost sekvenciranja eksonov in celotnega genoma. Sekvenciranje eksonov in celotnega genoma je povezano z višjimi stroški (32). NGS ima še nekaj pomanjkljivosti. Analitska občutljivost NGS za detekcijo SNP je 5–10 %, kar je dovolj visoka občutljivost za zaznavanje večino podedovanih bolezni, razen nizke ravni mozaicizma. Sekvenciranje nekaterih regij, kot so homologne, ponavljajoče in GC-bogate regije je težavno, saj zaradi podobnosti med njimi razlikovanje ni možno, še predvsem pri sekvenciranju krajših odsekov. Interpretacija je zaradi ogromnega števila podatkov izjemno zahtevna, saj pomen variant v intronskih in regijah, ki se ne prepisujejo, pogosto ni znan. Zahtevna pa je tudi interpretacija red-

kih oz. novih genetskih sprememb. Izjemnega pomena so zato podatkovne baze in tudi članki, ki opisujejo posamezne variante in njihovo povezavo s fenotipom. Kljub vsemu se še vedno zgodi, da varianti ni mogoče pripisati pomena. Nenazadnje, NGS ni vedno najprimernejši pristop za detekcijo strukturnih preureditev in CNV-jev (34). Trenutno se NGS uporablja za genetsko opredelitev vzroka različnih genetskih bolezni in je ključen del diagnostične obravnave, ki pogosto omogoča opustitev bolj invazivnih metod, kot sta biopsija jeter in lumbalna punkcija, ki sta bili včasih ključni za diagnozo bolezni, pri katerih so prisotne nepravilnosti jetrnih encimov ali nevrottransmitterjev. Na področju presejanja novorojencev za prirojene bolezni presnove se NGS večinoma uporablja kot potrditvena tehnika (22). Razvoj je usmerjen proti možnostim uporabe NGS kot primarnega metodološkega pristopa v presejanju novorojencev, za kar pa trenutno obstajajo še nekateri etični in metodološki zadržki (35, 36).

## ZAKLJUČEK

Laboratorijska diagnostika v pediatriji je zahtevnejša kot laboratorijska diagnostika pri odrasli populaciji, saj zaradi rasti in razvoja prihaja do številnih sprememb, ki se odražajo tudi v spremembah koncentracij analitov. Izrednega pomena je tesno sodelovanje laboratorijskega osebja z zdravniki pri naročanju preiskav in interpretaciji rezulta-

tov ter oblikovanju protokolov diagnostike bolezenskega stanja in spremljanja zdravljenja. Tehnološki razvoj je v zadnjih letih omogočil velik napredek pri lažjem analizi-ranju vzorcev predvsem z vidika majhnih volumnov. Kljub temu veliko izzivov ostaja, predvsem na področju predanalitike in interpretacije rezultatov (4).

## LITERATURA

1. Coffin CM, Hamilton MS, Pysher TJ, Bach P, Ashwood E, Schweiger J, et al. Pediatric laboratory medicine: current challenges and future opportunities. *Am J Clin Pathol.* 2002;117(5):683–90.
2. Kržišnik C, Breclj Anderluh M, Omersel Vujić E, Derganc M, Čizman M, Konjajev Z, et al. *Pediatrija*. 1. izd. DZS; 2014.
3. Bishop ML, Schoeff LE, Fody EP. *Clinical chemistry: Principles, techniques, correlations*. 7th ed. Wolters Kluwer | Lippincott Williams & Wilkins; 2013. 720 p.
4. Jones PM, Dietzen DJ, Haymond S, Bennett MJ. *Pediatric laboratory medicine*. 1st ed. McGraw Hill; 2017.
5. WHO guidelines on drawing blood: best practices in phlebotomy [Internet]. Dostopno na: [https://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0005/268790/WHO-guidelines-on-drawing-blood-best-practices-in-phlebotomy-Eng.pdf?ua=1](https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0005/268790/WHO-guidelines-on-drawing-blood-best-practices-in-phlebotomy-Eng.pdf?ua=1)
6. Božnar Alič E, Trampuš Bakija A. *Priporočeni postopek za odvzem kapilarne krvi*. 2. izd. Slovensko združenje za klinično kemijo in laboratorijsko medicino (SZKKLM); 2020.
7. Sztefko K, Beba J, Mamica K, Tomasik P. Blood loss from laboratory diagnostic tests in children. *Clin Chem Lab Med.* 2013;51(8):1623–6.
8. Jakacka N, Snarski E, Mekuria S. Prevention of iatrogenic anemia in critical and neonatal care. *Adv Clin Exp Med.* 2016;25(1):191–7.
9. Howie SRC. Blood sample volumes in child health research: review of safe limits. *Bull World Health Organ.* 2011;89(1):46–53.
10. Burtis C. Sample evaporation and its impact on the operating performance of an automated selective-access analytical system. *Clin Chem.* 1990;36(3):544–6.
11. Diviney J, Jaswon MS. Urine collection methods and dipstick testing in non-toilet-trained children. *Pediatr Nephrol.* 2020.



12. Prezelj M, Bratož S. Priporočila za organiziranje in izvajanje laboratorijskih testov ob pacientu. 1. izd. Slovensko združenje za klinično kemijo in laboratorijsko medicino (SZKKLM); 2014.
13. Kohse KP. National and international initiatives and approaches for the establishment of reference intervals in pediatric laboratory medicine. *J Lab Med.* 2015;39(4):197–212
14. Hay W, Levin M, Abzug M, Bunik M, editors. *Current Diagnosis & Treatment: Pediatrics.* 25th ed. McGraw Hill; 2020.
15. Adeli K, Higgins V, Trajceviski K, White-Al Habeeb N. The Canadian laboratory initiative on pediatric reference intervals: A CALIPER white paper. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2017;54(6):358–413.
16. Ridefelt P. NORICHILD – nordiskt projekt för referensintervall för barn. *Klinisk Biokemi i Norden.* 2006;18:42.
17. Kohse KP. KiGGS - The German survey on children's health as data base for reference intervals and beyond. *Clin Biochem.* 2014;47(9):742–3.
18. National Children's Study (NCS) Vanguard Data Repository [Internet]. Dostopno na: <https://dash.nichd.nih.gov/study/228954>
19. Horowitz GL, Altaie S, Boyd JC, Ceriotti F, Garg U, Horn P, et al. Defining, establishing and verifying reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline. 3rd ed. *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*; 2010.
20. Lisyová J, Chandoga J, Jungová P, Repický M, Knapková M, Machková M, et al. An unusually high frequency of SCAD deficiency caused by two pathogenic variants in the ACADS gene and its relationship to the ethnic structure in Slovakia. *BMC Med Genet.* 2018;19(1):64.
21. Fernandez-Lainez C, Aguilar-Lemus JJ, Vela-Amieva M, Ibarra-Gonzalez I. Tandem mass spectrometry newborn screening for inborn errors of intermediary metabolism: abnormal profile interpretation. *Curr Med Chem.* 2012;19(26):4511–22.
22. Repič Lampret B, Remec ŽI, Drole Torkar A, Žerjav Tanšek M, Šmon A, Koračin V, et al. Expanded newborn screening program in Slovenia using tandem mass spectrometry and confirmatory next generation sequencing genetic testing. *Zdr Varst.* 2020;59(4):256–63.
23. Wright CF, FitzPatrick DR, Firth HV. Paediatric genomics: diagnosing rare disease in children. *Nat Rev Genet.* 2018;19(5):253–68.
24. Lalonde E, Rentas S, Lin F, Dulik MC, Skraban CM, Spinner NB. Genomic diagnosis for pediatric disorders: revolution and evolution. *Front Pediatr.* 2020;8:373.
25. Ezgu F. Inborn errors of metabolism. *Adv Clin Chem.* 2016;73:195–250.
26. Phipps WS, Jones PM, Patel K. Amino and organic acid analysis: essential tools in the diagnosis of inborn errors of metabolism. *Adv Clin Chem.* 2019;92:59–103.
27. Valayannopoulos V, Poll-The BT. Diagnostic work-up in acute conditions of inborn errors of metabolism and storage diseases. *Handb Clin Neurol.* 2013;113:1553–62.
28. Dietzen DJ, Rinaldo P, Whitley RJ, Rhead WJ, Hannon WH, Garg UC, et al. National academy of clinical biochemistry laboratory medicine practice guidelines: follow-up testing for metabolic disease identified by expanded newborn screening using tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 2009;55(9):1615–26.
29. Repič Lampret B. Personalizirana stopenjska laboratorijska diagnostika vrojenih boleznih presnove. *Laboratorijska medicina.* 2019;1:14–16.
30. Slavec L, Geršak K, Karas Kuželički N, Trebušak Podkrajšek K. Humane genetske spremembe in njihovo določanje: trenutno stanje in obeti za prihodnost. *Slov Pediatr.* 2020;27(4):163–71.
31. Lovrecic L, Peterlin B. Uporaba molekularne kariotipizacije v klinični genetiki. *Zdrav Vestn.* 2013;82(10):669–76.
32. Narayanan DL, Girisha KM. Genomic testing for diagnosis of genetic disorders in children: chromosomal microarray and next-generation sequencing. *Indian Pediatr.* 2020;57(6):549–54.
33. Adams DR, Eng CM. Next-generation sequencing to diagnose suspected genetic disorders. *N Engl J Med.* 2018;379(14):1353–62.
34. Yohe S, Thyagarajan B. Review of clinical next-generation sequencing. *Arch Pathol Lab Med.* 2017;141(11):1544–57.
35. Lantos JD. Ethical and psychosocial issues in whole genome sequencing (WGS) for newborns. *Pediatrics.* 2019;143(Suppl 1):S1–S5.
36. Trier C, Fournous G, Strand JM, Stray-Pedersen A, Pettersen RD, Rowe AD. Next-generation sequencing of newborn screening genes: the accuracy of short-read mapping. *NPJ Genom Med.* 2020;5:36.

# Implementacija razširjenega presejanja novorojencev za vrojene bolezni presnove v Sloveniji

## *Implementation of extended newborn screening for inborn errors of metabolism in Slovenia*

**Barbka Repič Lampret**

Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko

Avtor za korespondenco:

**doc. dr. Barbka Repič Lampret, spec. med. biokem.**

Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko, Vrazov trg 1, 1000 Ljubljana,

e-pošta: barbka.repic@kclj.si

### POVZETEK

Razširjeno presejanje novorojencev na vrojene bolezni presnove (VBP) je bilo v Sloveniji uradno uvedeno septembra 2018. Obstoječemu programu presejanja za kongenitalno hipotirozo in fenilketonurijo smo dodali 17 VBP. Vse dodatne bolezni testiramo z uporabo tandemske masne spektrometrije, ki omogoča sočasno merjenje številnih acilkarnitinov in aminokislin iz posušenega madeža krvi in možnost prepoznave različnih aminoacidopatij, organskih acidurij in motenj v presnovi maščobnih kislin. Za potrditveno testiranje smo dodatno implementirali metodo sekvenciranja DNA naslednje generacije. Za namen razširjenega presejanja za VBP so bile potrebne tudi določene organizacijske spremembe in povezava bolnišničnih informacijskih sistemov slovenskih porodnišnic z laboratorijskim informacijskim sistemom Pediatrične klinike in Klinike za nuklearno medicino. Od začetka razširjenega presejanja novorojencev za VBP do konca leta 2020 smo analizirali 39.324 vzorcev. Pri 12 bolnikih smo z dodatnimi potrditvenimi testi VBP potrdili še pred pojavom kliničnih znakov. Med njimi izstopa nepričakovano visok delež bolnikov z motnjami v presno-

vi dolgoveriznih maščobnih kislin, kar je lahko značilnost slovenskega prostora ali pa razmeroma majhnega števila analiziranih vzorcev.

**Ključne besede:** presejanje novorojencev, tandemska masna spektrometrija, sekvenciranje DNA nove generacije, vrojene bolezni presnove

### ABSTRACT

In Slovenia, the expanded newborn screening for inborn errors of metabolism was introduced in September 2018. Seventeen metabolic diseases have been added to the pre-existing screening panel for congenital hypothyroidism and phenylketonuria. Therefore, tandem mass spectrometry was introduced since it enables simultaneous testing of numerous acylcarnitines and amino acids from dried blood spots for detecting several aminoacidopathies, organic

acidurias, and fatty acid oxidation disorders. Furthermore, next-generation sequencing was introduced for confirmatory testing. To introduce the expanded newborn screening, we needed to implement certain modifications to the existing organisation. Among them, existing heterogeneous information systems in the Maternity hospitals were connected to the laboratory information system of the University Children's Hospital and of the Department of Nuclear Medicine. Until the end of 2020, a total of 39,324

samples were screened. After additional testing, twelve patients were confirmed as positive. Among them, unusually high incidence of patients with very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency was observed.

**Key words:** newborn screening, tandem mass spectrometry, next-generation sequencing, inborn errors of metabolism

## UVOD

Vrojene bolezni presnove (VBP) so redke genetsko pogojene motnje, pri katerih vzročne spremembe v genih lahko povzročijo deaktivacijo ali zmanjšano delovanje encimov, ki so pomembni pri različnih procesih presnove (1). Njihova pojavnost je običajno nižja od 1 na 10.000 živorojenih otrok (2). VBP lahko odkrijemo s presejalnimi metodami, katerih cilj je prepoznavanje bolezni pred pojavom prvih simptomov ali prvih stadijev bolezni. Razširjeno presejanje novorojencev za VBP je omogočila uporaba tandemске masne spektrometrije (MS/MS), ki omogoča istočasno kvantifikacijo številnih presnovkov iz samo ene kaplje krvi (3, 4). Pri seznamu bolezni, ki smo jih vključili v program razširjenega presejanja za VBP, smo upoštevali priporočila, da mora za bolezni v presejalnem programu obstajati test z ustrežno občutljivostjo in specifičnostjo, ki omogoča odkritje bolezni pred pojavom kliničnih znakov. Zgodnje odkritje mora zagotavljati pravočasno ukrepanje in s tem učinkovito zdravljenje, ki prepreči ali upočasni razvoj bolezni. Program mora biti tudi stroškovno učinkovit (5, 6). Pomembno merilo za vključitev bolezni v razširjeni

program presejanja za VBP je bila tudi pojavnost posamezne bolezni, kar smo za področje Slovenije ocenjevali s posebno pilotno raziskavo (7). Za potrditveno testiranje smo implementirali tudi metodo sekvenciranja DNA naslednje generacije (NGS), ki nam poleg potrditve omogoča tudi spremljanje poteka bolezni ter možnost genetskega svetovanja drugim ožjim družinskim članom (8). Za izvajanje razširjenega presejanja novorojencev za VBP v Sloveniji sicer obstaja pravna podlaga (9). V Pravilniku za izvajanje zdravstvenega varstva na primarni ravni je navedenih vseh 18 bolezni, na katere testiramo novorojence. Opredeljeno je, kdaj naj bodo vzorci odvzeti, kako označeni in kje naj bo opravljena analiza. Zapisana je tudi odločba o izdaji enotnega izvida, ki mora biti posredovan porodničnici, ki je vzorec poslala.

V članku je opisan program razširjenega presejanja novorojencev v Sloveniji ter njegova implementacija. Predstavljene so tudi rezultati razširjenega testiranja za prvi dve leti.

## IMPLEMENTACIJA PROGRAMA RAZŠIRJENEGA PRESEJANJA NOVOROJENCEV ZA VBP

### Obstoječe stanje in priprave na širitev presejanja

Pred širitvijo programa presejanja novorojencev za VBP je v Sloveniji potekalo presejanje za fenilketonurijo in kongenitalno hipotirozo, ki ga od leta 1979 oziroma 1981 izvajajo na Kliniki za nuklearno medicino (KNM) (10). Leta

1999 smo za diagnostiko simptomatskih bolnikov na Pediatrični kliniki (PK) uvedli selektivno presejalno testiranje na VBP. Sledile so daljše priprave, raziskave in analize, ki so omogočile testiranje vseh novorojencev. Leta 2015 smo na Zdravstveni svet Ministrstva za zdravje podali vlogo za nov program presejanja novorojencev in konec maja 2018 prevzeli novo opremo za razširjeno pre- »

sejanje novorojencev za VBP LC-MS/MS »Waters Xevo TQD« in »Waters Xevo TQ-S micro« za potrditveno diagnostiko. Sledilo je povezovanje analizatorjev z laboratorijskim informacijskim sistemom (LIS), testiranje sistema in programske opreme, ki je potrebna za presejanje novorojencev v kombinaciji s Perkin Elmer reagenčnim kompletom Neobase 2. Po optimizaciji sistema smo opravili verifikacijo reagenčnega kompleta ter s pomočjo meritev na 1000 vzorcih postavili izključitvena merila – meje. Postavljene meje smo, zaradi prevelikega števila lažno pozitivnih rezultatov, kasneje popravili. Določene meje smo spremenili tudi na osnovi rezultatov zunanje ocene kakovosti (CDC – Newborn Screening acylcarnitines and amino acids). Prvih 1000 vzorcev novorojencev smo analizirali vzporedno na dveh sistemih, in sicer na novem z novim reagenčnim kompletom ter starem, na katerem smo imeli preverjene izključitvene meje.

## Pričetek programa in vključevanje porodnišnic

Program razširjenega presejanja novorojencev za VBP je bil v Sloveniji uveden septembra 2018, ko je bila vključena prva porodnišnica. Preostale slovenske porodnišnice so se vključevale postopoma do avgusta 2019. Obstoječemu programu presejanja za kongenitalno hipotirozo in fenilketonurijo smo tako dodali 17 novih VBP:

- bolezen javorjevega sirupa,
- tirozinemija tip I,
- izovalerična acidemija,
- glutarična acidemija tip I,
- glutarična acidemija tip II,
- pomanjkanje zelo dolgoverižne acil-CoA dehidrogenaze,
- pomanjkanje dolgoverižne 3OH-CoA dehidrogenaze,
- pomanjkanje srednjeverižne acil-CoA dehidrogenaze,
- propionska acidemija,
- metilmalonska acidemija,
- pomanjkanje karnitine palmitoiltransferaze I,
- pomanjkanje karnitine palmitoiltransferaze II,
- motnja vnosa/transporta karnitina,
- pomanjkanje 3-metilcrotonil-CoA karboksilaze,
- 3-hidroksi-3-metilglutarična acidurija,
- pomanjkanje holokarboksilaze sintaze,
- pomanjkanje  $\beta$ -ketotiolaze.

## Organizacijske spremembe

Ob širitvi so bile vpeljane določene organizacijske spremembe. Prva je bila povezava podatkov novorojencev iz bolnišničnega informacijskega sistema slovenskih porodnišnic z laboratorijskim informacijskim sistemom PK in KNM. V porodnišnici, kjer je vzorec krvi odvzet, izvedejo tudi elektronsko naročilo v bolnišnični informacijski sistem ter natisnejo črtno kodo, s katero opremijo kartico. Rodnišnice so bile v ta namen opremljene z ustreznimi čitalci in tiskalniki črtnih kod. S tem smo zagotovili boljšo oziroma ustrezno sledljivost vzorca in rezultatov. Pri vzpostavitvi povezav bolnišničnih in laboratorijskih informacijskih sistemov so sodelovale vse slovenske programske hiše, odgovorne za bolnišnične informacijske sisteme (Infonet, Hipokrat, Birpis, Pina) ter Kobis, kot odgovorni za LIS. Ob priključevanju posamezne porodnišnice v sistem naročanja sta bila vedno prisotna tudi skrbnik LIS-a in sodelavec laboratorija Pediatrične klinike. Hkrati z implementacijo elektronskega naročanja smo izvedli tudi ponovno izobraževanje osebja porodnišnic o pravilnem odvzemu vzorca kaplje krvi na kartico ter pomembnosti dnevnega pošiljanja kartic z odvzetimi vzorci.

Skupaj s sodelavci KNM in Kliničnega oddelka za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove (KOEDBP) smo pripravili tudi navodila za izvajanje presejanja za VBP v Sloveniji, in informacije za starše, ki so dostopne na spletnem portalu »Redke bolezni« (11).

Celoten proces presejanja tako zajema: informiranje staršev o presejanju novorojencev, ukrepanje v primerih, ko starši zavrnejo testiranje, pravilen odvzem in pošiljanje vzorcev, analizo vzorcev, potrditvena testiranja, nadaljnjo diagnostiko, spremljanje in obvladovanje VBP ter izobraževanje staršev in skrbnikov.

## PROTOKOL PRESEJANJA

Kot že v okviru osnovnega, se tudi v okviru razširjenega presejanja za VBP odvzem krvi na filtrirno kartico opravi od 48 do 72 ur po porodu ter hkrati vsaj 24 ur po pričetku hranjenja. Za skupine novorojencev, ki potrebujejo posebno obravnavo (nedonošenčki, novorojenci na intenzivni terapiji), se protokol odvzemov vzorcev izvaja v skladu s posebnimi navodili, ki so izvajalcu dostopni na spletu (11). Če je mogoče, odvzem opravimo pred morebitno predvideno terapijo ali transfuzijo. Otroci z intravensko parenteralno prehrano imajo zaradi njene sestave povišane vrednosti določenih aminokislin, na primer razvejanih, kar je sicer značilno za bolezen javorjevega sirupa. Obenem imajo pogosto znižane koncentracije prostega karnitina. Določena zdravila vplivajo na lažno povišane vrednosti acilkarnitinov, kar je vzrok za lažno pozitivne rezultate presejanja. Enako velja za prehranske dodatke, na primer pri dodatku srednjeveržnih trigliceridov vidimo povišanje številnih acilkarnitinov, ki so pomembni pri prepoznavi motenj v presnovi srednje-

veržnih maščobnih kislin. Odvzem vzorca po transfuziji vpliva na vse rezultate presejanja. Pri nedonošenčkih obstaja večja verjetnost tako lažno pozitivnih kakor tudi lažno negativnih rezultatov. V takšnih primerih je pomembno, da poleg predvidenega odvzema testiranje ponovimo še ob odpustu iz bolnišnice oziroma ob koncu zdravljenja. Kartice, ustrezno označene s črtno kodo, naročnik pošlje na KNM, kjer iz polovice kartice opravijo presejalne teste za kongenitalno hipotirozo in fenilketonurijo. Drugo polovico kartice posredujejo na KISLD, kjer opravimo še testiranje za bolezni, zajete v razširjeno presejanje za VBP. Zaradi lažje logistične izvedbe in boljše sledljivosti vzorca smo kartico za odvzem kaplje krvi oblikovali posebej, tako da sta obe polovici kartice označeni z enako črtno kodo, kar omogoča združitev rezultatov obeh laboratorijev v enoten izvid. Vse kartice z nepravilnim odvzemom ali vidno kontaminacijo zavrnamo, porodnišnico pa prosimo za ponovni odvzem.

## ALGORITEM OBRAVNAVE REZULTATOV

V okviru razširjenega presejanja za VBP smo pripravili algoritem obravnave rezultatov glede na vrsto rezultata »mejni« ali »pozitivni«, katere opredelitev je odvisna od koncentracije presnovkov, značilnih za določeno bolezen, kot tudi razmerij med njimi. V primeru mejnih rezultatov obvestimo osebje porodnišnice in prosimo za ponoven odvzem vzorca. V primeru pozitivnih rezultatov novorojenčka povabimo na KOEDBP Pediatrične klinike, kjer odvezamemo dodatne vzorce za potrditvene teste, in sicer odvisno od domnevne bolezni. Če je rezultat drugega testiranja mejnega vzorca ponovno mejen, otroka prav tako povabimo na KOEDBP Pediatrične klinike na nadaljnjo diagnostiko (12). Po potrditvi rezultatov KNM in KISLD v LIS-u se kot enoten izvid prenesejo v bolnišnične informacijske sisteme.

Potrditveno testiranje za VBP vključuje analizo acilkarnitinov iz krvnega madeža, organskih kislin v urinu ter aminokislin v plazmi. Pomembna nadgradnja razširjenega presejanja z MS/MS je bila tudi uvedba sekvenciranja DNA naslednje generacije. V ta namen smo pripravili panel 72 genov, ki zajema 18 možnih VBP (17 novih in fenilketonurijo) ter gene za bolezni in bolezenska stanja, ki sicer niso del presejanja, a so za njih značilna povišanja enakih presnovkov kot pri VBP, vključenih v razširjeno presejanje.

Če ugotovimo prisotnost katere od bolezni, ki ni del programa razširjenega presejanja za VBP, se člani konzilija KISLD in KO EDBP odločajo o morebitnih ukrepih za vsak primer posebej. Konzilij se posvetuje tudi o morebitnih spremembah izključitvenih meril ter načrtuje smernice. »

## REZULTATI

Do konca leta 2020 smo skupaj testirali 39.324 vzorcev. V prvem letu testiranja (2018) smo pregledali 2.275 vzorcev, od tega je bilo 18 mejnih in 10 pozitivnih rezultatov. V letu 2019 smo testirali 17.819 vzorcev, pri katerih je bilo 284 mejnih in 102 pozitivna. V letu 2020, ko so bile vključene že vse slovenske porodnišnice, smo testirali 19.230 vzorcev, od katerih je imelo 421 mejne rezultate ter 97 pozitivne. Med pozitivnimi rezultati smo z dodatnimi potrditvenimi testi diagnosticirali 12 bolnikov z naslednjimi boleznimi: pomanjkanje zelo dolgoverižne acil-CoA dehidrogenaze (VLCADD) (4 bolniki), pomanjkanje srednjeverižne acil-CoA dehidrogenaze (MCADD) (3 bolniki), pomanjkanje kratkoverižne acil-CoA dehidrogenaze

(SCADD) (1 bolnik), izovalerična acidurija (1 bolnik), hiperprolinurija (1 bolnik), citrulinemija (1 bolnik), hipervalinemija – hiperlevcin/izolevcinemija (1 bolnik). Med rezultati močno odstopa visoka pojavnost bolnikov s potrjenim VLCADD, ki je višja celo od sicer najpogostejše motnje v presnovi maščobnih kislin, MCADD (13). Tako visoka pojavnost je lahko značilnost našega prostora, lahko pa se bo po določenem času, ko bo analizirano večje število vzorcev, približala pojavnosti, ki je opisana pri ostalih sosednjih državah. Delež zavrženih vzorcev zaradi neustreznega odvzema je bil, zaradi dodatnih izobraževanj osebja v porodnišnicah, vsako leto nižji, in sicer od 0,92 % v prvem letu, 0,12 % drugo leto do 0,05 % v letu 2020.

## ZAKLJUČEK

Presejanje novorojencev za VBP ima v preventivni medicini izredno pomembno vlogo. Z implementacijo razširjenega presejanja novorojencev smo uspeli prepoznati dodatne posameznike s posebnimi VBP (MCADD, VLCADD, SCADD, ...) še pred pojavom kliničnih znakov. Hkrati smo naredili tudi pomemben korak k povezovanju različnih slovenskih bolnišničnih informacijskih sistemov z laboratorijskim informacijskim sistemom in s tem zagotovili boljšo sledljivost podatkov in rezultatov novorojencev, kot tudi neustreznih odvzemov vzorcev. V ta namen smo izvajali tudi dodatna izobraževanja osebja porodnišnic, kar je značilno zmanjšalo število zavrženih vzor-

cev, nepotrebne zamude pri oddajanju izvidov, stres staršev in nenazadnje dodatno obremenitev vseh odgovornih v procesu presejanja. Sočasno z razširjenim presejanjem za VBP smo v rutinsko uporabo implementirali tudi NGS kot potrditveno testiranje, ki poleg potrditve VBP omogoča tudi možnost genetskega svetovanja drugim ožjim družinskim članom. Menimo, da bo genetska diagnostika pri presejanju novorojencev tudi v prihodnosti igrala čedalje pomembnejšo vlogo.

## LITERATURA

1. Lanpher B, Brunetti-Pierri N, Lee B. Inborn errors of metabolism: the flux from Mendelian to complex diseases. *Nat Rev Genet.* 2006 Jun;7(6):449–59.
2. Wilcken B, Ch B, Wiley V, Ph D, Hammond J, Carpenter K. Screening Newborns for Inborn Errors of Metabolism by Tandem Mass Spectrometry. *N Engl J Med.* 2003;348(23):2304–12.
3. Chace DH. Mass spectrometry in newborn and metabolic screening: historical perspective and future directions. *J Mass Spectrom.* 2009; 44 (2): 163–70.
4. Watson MS, Mann MY, Lloyd-Puryear MA, Rinaldo P, Howell RR, Group AC of MGNSE. Newborn screening panel and system. *Genet Med.* 2006;8 (Suppl 1): 12S-252S.
5. Wilson J, Jungner Y. Principles and practice of screening for disease. *World Heal Organ.* 1968; 65 (4): 281–393.
6. Rousseau F, Giguere Y, Berthier MT, Guerette D, Girard JG, Dery M. Newborn screening by tandem mass spectrometry: impacts, implications and perspectives. In: Prasain J, ed. *Tandem mass spectrometry – applications and principles.* InTech, 2012.
7. Šmon A. Opređelitev kriterijev za razširjeno presejanje novorojencev za vrojene bolezni presnove: doctoral thesis. Ljubljana: University of Ljubljana, Faculty of pharmacy, 2018.
8. Šmon A, Repič Lampret B, Grošelj U, Zerjav Tansek M, Kovac J, Perko D, et al. Next generation sequencing as a follow-up test in an expanded newborn screening program. *Clin Biochem.* 2018; 52: 48–55.
9. Uradni list RS, št.47/2018 z dne 6.7.2018, <https://www.uradni-list.si/glasilo-uradni-list-rs/vsebina/2018-01-2439?sop=2018-01-2439>
10. Smon A, Groselj U, Zerjav Tansek M, Bicek A, Oblak A, Zupancic M, et al. Newborn screening in Slovenia. *Zdr Var.* 2015; 54(2):86-90.
11. Navodilo za izvajanje razširjenega presejanja novorojencev v Sloveniji. Pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana. Accessed April 3rd, 2020 at:
12. <https://www.redkebolezni.si/ustanova/laboratoriji/ljubljana/sluzba-za-specialno-laboratorijsko-diagnostiko/>
13. Repič Lampret B, Remec ŽI, Drole Torkar A, Žerjav Tanšek M, Šmon A, Koračin V, et al. Expanded newborn screening program in Slovenia using tandem mass spectrometry and confirmatory next generation sequencing genetic testing. *Zdr Varst.* 2020;59(4):256-263.
14. Remec ZI, Groselj U, Drole Torkar A, Zerjav Tansek M, Cuk V, Perko D, et al. VeryLong-Chain Acyl-CoADehydrogenase Deficiency: High Incidence of Detected Patients With Expanded Newborn Screening Program. *Front. Genet.* (2021);12:648493



# Informacijske rešitve pri implementaciji razširjenega presejalnega testiranja novorojencev v Sloveniji

## *Information technology solutions following implementation of expanded newborn screening in Slovenia*

Žiga Iztok Remec<sup>1</sup>, Ana Marija Jelovšek<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UUniverzitetni klinični Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko

<sup>2</sup>Univerzitetni klinični Ljubljana, SUPAS, Služba za zdravstveno informatiko

Avtor za korespondenco:

Žiga Iztok Remec, univ. dipl. biol.

Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko, Vrazov trg 1, 1000 Ljubljana,

e-pošta: ziga.remec@kclj.si

## POVZETEK

Leta 2018 je v Sloveniji prišlo do širitve presejalnega testiranja novorojencev na prirojene bolezni. Pri presejanju testiramo vse novorojence, kar na leto predstavlja približno 20.000 vzorcev. Odvzem, označevanje in pošiljanje vzorcev predstavljajo številne možnosti za predanalizno napako. Sprejem, obdelava, analiza, prenos rezultatov in pošiljanje izvidov pa možnosti za napako na strani laboratorija. Za analizo vzorcev se uporablja metodologija masne spektrometrije, ki ustvarja velike količine podatkov. Zaradi naštetih razlogov je bila informatizacija celotnega procesa nujno potrebna.

Za uspešno izvedbo informatizacije je bilo treba zagotoviti uporabo informacijskih tehnologij na vseh ravneh procesa. Medsebojno je bilo treba povezati štirinajst slovenskih porodnišnic, dva klinična oddelka in dva laboratorija, ki uporabljajo štiri različne bolnišnične informacijske sisteme in en

laboratorijski informacijski sistem (LIS). Prav tako je bilo treba zagotoviti sledljivost in avtomatizacijo z uporabo informacijskih tehnologij znotraj laboratorija. Za povezavo vseh odvzemnih mest z informacijskim sistemom obeh laboratorijev smo uporabili komunikacijsko platformo medGateway, ki je do sedaj služila prenašanju podatkov o napotnicah in receptih. Informacijske rešitve znotraj laboratorijev je zagotovila programska hiša Kobis, d. o. o., s programom LIS.

Glavne prednosti informatizacije razširjenega programa presejalnega testiranja so dobra sledljivost vzorcev in rezultatov, manjša časovna obremenitev zaposlenih, manjša možnost napak, hitrejši prenos izvidov in večja varnost podatkov.

**Ključne besede:** informacijska tehnologija, IT, presejalno testiranje novorojencev, NBS, laboratorijski informacijski sistem, medicinska informatika



## ABSTRACT

Expanded newborn screening was implemented in Slovenia in 2018. Newborn screening amounts to around 20,000 samples per year. Collection, labeling and transport of samples represent possible sources of an error. Admission of samples, their preparation and analysis along with transmission of results are main sources of an error within the laboratory. Mass spectrometry is used for sample analysis and generates large amounts of data. To minimize risk of errors, use of information technology for management of the whole process was necessary.

For successful computerization, use of information technologies had to be implemented on all levels of the process. All 14 Slovenian maternity wards and two clinical departments had to be connected to two laboratories. Four different hospital information systems needed connection

to laboratory information management system (LIS). Communication platform medGateway that is commonly used for transferring medical data such as prescriptions and referrals was used for the first time to link hospitals with laboratories. Information technology solution within laboratories was provided by Kobis with software LIS.

Main advantages of computerization of expanded newborn screening program are good traceability of samples and results, reduced workload for employees, decreased possibility of errors, faster delivery of reports and increased data safety.

**Key words:** information technology, IT, newborn screening, NBS, laboratory information management system, healthcare informatics

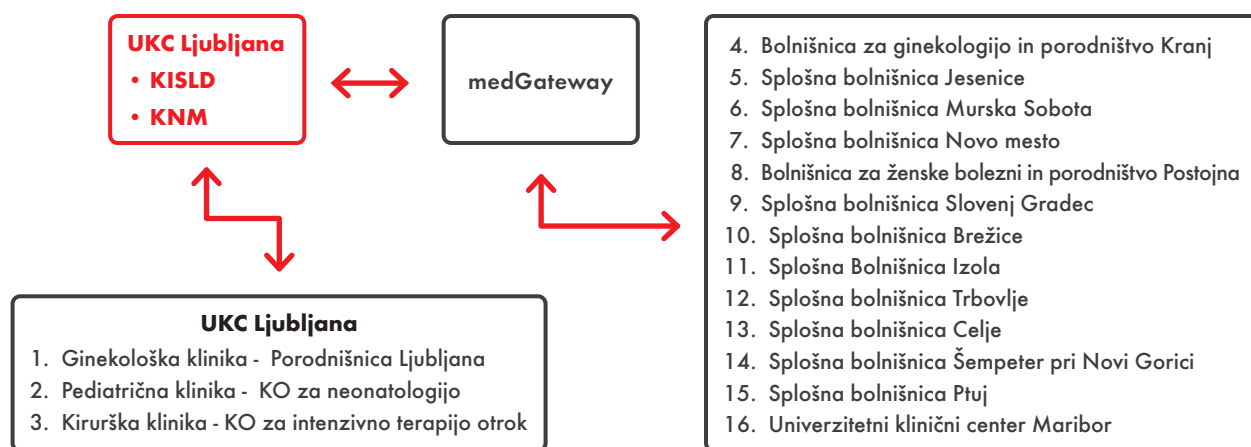
## UVOD

Septembra 2018 je v okviru preventivnega zdravstva na primarni ravni v Sloveniji pričel teči »razširjeni« program presejalnega testiranja novorojencev na prirojene bolezni (1, 2). Do takrat smo novorojence v Sloveniji presejalno testirali na dve bolezni, novi program pa zajema testiranje na 17 dodatnih prirojelih boleznih presnove, torej skupno 18 prirojelih boleznih presnove in kongenitalno hipotirozo. V predhodnem programu presejalnega testiranja novorojencev sta bili merjeni vrednosti dveh analitov (3, 4). V razširjenem programu merimo koncentracije 57 analitov, poleg tega pa za diagnostiko uporabljamo še 28 izračunanih razmerij med izbranimi analiti, kar pomeni znatno povečanje količine podatkov.

Do uvedbe razširjenega presejalnega testiranja novorojencev smo podatke o preiskovancih ročno vpisovali na odvzemne kartice, kar je bilo zamudno in morebiten vir napak (5). S testiranjem na nove bolezni so podatki o novorojencu, ki prej niso bili diagnostično pomembni, postali nujni za pravilno interpretacijo rezultatov. Predvsem so za pravilno diagnostiko pomembni gestacijska starost, porodna teža in prehranska specifika novorojenca. Ročna priprava delovnih list, njihovo prepisovanje v analizator ter prepisovanje izmerjenih rezultatov v laboratorijski informacijski sistem (LIS) predstavljajo številne možnos-

ti za nastanek napak, zato je bila potreba po uporabi informacijske tehnologije za obvladovanje naročil, sledenje vzorcev (sprejem, obdelava, analiza in interpretacija rezultatov) in izdajo izvidov nujna.

V programu presejalnega testiranja novorojencev na prirojene bolezni presnove sodelujeta dva laboratorija Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana (UKCL), in sicer Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko (KISLD) Pediatrične klinike (PEK) in Oddelek za klinično radiokemijo Klinike za nuklearno medicino (KNM) (1). Poleg laboratorijev je v program povezanih tudi štirinajst porodnišnic, od katerih je ljubljanska del UKCL. Odvzemi vzorcev za presejalno testiranje novorojencev potekajo še na dveh kliničnih oddelkih za nego novorojencev znotraj UKCL, to sta Klinični oddelek za neonatologijo na PEK in Klinični oddelek za intenzivno terapijo otrok na Kirurški kliniki (Slika 1). Velika heterogenost informatizacije procesov v udeleženih ustanovah je predstavljala velik organizacijski izziv pri vpeljavi programa presejalnega testiranja. »



**Slika 1:** Organizacijska shema sistema elektronske izmenjave naročil in rezultatov (UKC – Univerzitetni klinični center; KISLD – Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko; KNM – Klinika za nuklearno medicino; KO – klinični oddelek).

**Figure 1:** Organizational chart of electronic test ordering and results system (UKC – University Medical Centre; KISLD – Clinical Institute of Special Laboratory Diagnostics; KNM – Laboratory for medical radiochemistry Department of Nuclear Medicine; KO – Clinical department).

## INFORMATIZACIJA PROCESA

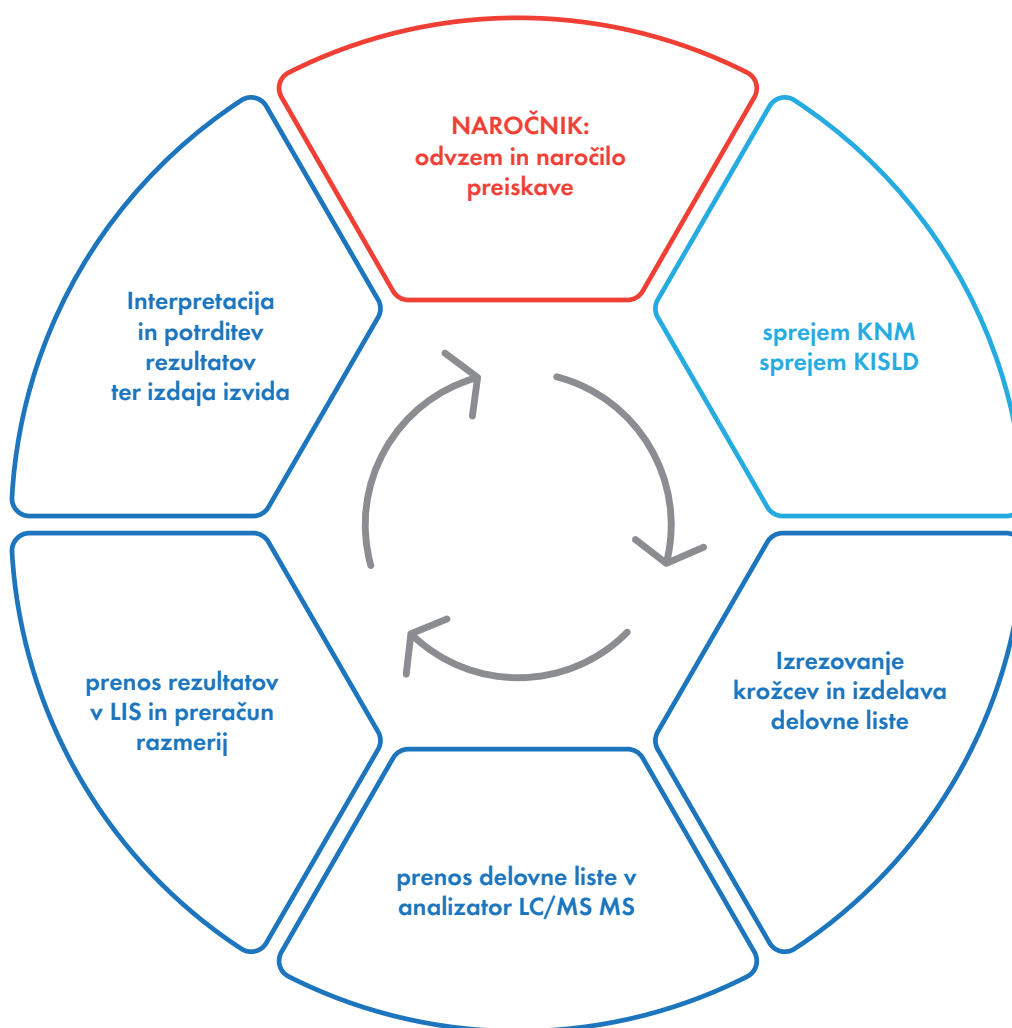
Za vodenje in obdelavo podatkov omenjene enote uporabljajo različne programske rešitve petih različnih programskih hiš. Oba laboratorija uporabljata informacijski sistem LIS programske hiše Kobis, podatkovni bazi obeh laboratorijev pa sta ločeni. Porodnišnica Ljubljana uporablja za vodenje podatkov o bolnikih in naročanje preiskav bolnišnični informacijski sistem (BIS) Hipokrat programske hiše List, d. o. o., ki je že pred začetkom razširjenega presejalnega testiranja omogočal naročanje laboratorijskih preiskav in sprejemanje odobrenih rezultatov preko povezave z LIS. Klinična oddelka, za neonatologijo na Pediatrični kliniki in za intenzivno terapijo otrok Kirurške klinike, uporabljata v ta namen platformo BIS Clinical programske hiše Better, ki je prav tako že omogočala naročanje preiskav in sprejemanje rezultatov preko povezave z LIS. Ostale porodnišnice v Sloveniji uporabljajo poleg programa Hipokrat še program BIRPIS21 programske hiše SRC Infonet ali MEDIS programske hiše Pinna. Pred začetkom programa presejalnega testiranja nobena izmed platform ni omogočala naročanja preiskav iz zunanjih ustanov v LIS UKCL, kar je predstavljalo precejšen organizacijsko-tehnični zalogaj.

Poseben izziv predstavljajo tudi porodi na domu, ki so od leta 2016 ponovno pogostejši (6). V Protokolu za izvajanje presejalnega testiranja novorojencev na priložene bolezni v Sloveniji smo predvideli informatizacijo tudi teh porodov. V primeru poroda na domu ali izven porodnišnice je potreben odvzem vzorca na enak način, kot bi bil izveden v porodnišnici. Odvzem v priporočenem času in po protokolu opravi medicinska sestra ob prvem pregledu novorojenca v porodnišnici ali zdravstveni ustanovi izbranega pediatra (7).

Da bi omogočili informatizacijo celotne poti od odvzema vzorca do izdaje izvidov, je bilo treba zagotoviti uporabo informacijske tehnologije na več nivojih (Slika 2). Na odvzemnih mestih je bilo treba poiskati lažjo in bolj zanesljivo rešitev, ki bi zamenjala ročno izpolnjevanje podatkov o preiskovancih na karticah za odvzem vzorcev. Povezati je bilo treba štiri različne bolnišnične informacijske sisteme z laboratorijskim informacijskim sistemom LIS obeh laboratorijev. Povezava BIS in LIS za enote znotraj UKCL je že obstajala, za zunanje naročnike pa še ne. Možnost prenosa podatkov in s tem povezave vseh odvzemnih

mest z laboratoriji je ponujala komunikacijska platforma medGateway programske hiše SRC Infonet, ki je do sedaj služila prenašanju drugih medicinskih podatkov, kot so podatki o napotnicah in receptih. Platforma doslej še ni bila uporabljena za prenos rezultatov laboratorijskih preiskav. Omogočiti je bilo treba tudi prenos podatkov med obema bazama LIS obeh laboratorijskih enot, ki presejalno testiranje izvajata, saj je izvid skupen za vse rezulta-

te obeh enot. Zadnji nivo je predstavljala avtomatizacija sledenja vzorcev in njihovih rezultatov znotraj laboratorija. Glavni koraki, pri katerih uporaba informacijske tehnologije lahko zmanjša možnost napake, so sprejem z odčitanjem črtne kode, obdelava vzorcev, kreiranje delovne liste vzorcev in njen prenos v analizator ter prenos rezultatov iz analizatorja v LIS.



**Slika 2:** Nivoji informatizacije procesa (KNM – Klinika za nuklearno medicino; KISLD – Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko; LC/MS-MS – tekočinski kromatograf, sklopljen s tandemskim masnim spektrometrom; LIS – laboratorijski informacijski sistem (v danem primeru LIS Kobis)).

**Figure 2:** Levels of process computerization (KNM – Laboratory for medical radiochemistry Department of Nuclear Medicine; KISLD – Clinical Institute of Special Laboratory Diagnostics; LC/MS-MS – liquid chromatography tandem mass spectrometry; LIS – laboratory information system (in this case LIS Kobis)).

»

## OPIS SISTEMA

Trenutno sistem omogoča pripravo elektronskih naročil ne glede na tip BIS-a, ki ga naročnik uporablja. Ob odvzemu se v BIS kreira elektronsko naročilo, ki zajema tri preiskave, ki se določajo v madežu krvi (okr. mK): določanje tiroide stimulirajočega hormona (TSH) za diagnostiko kongenitalne hipotiroze (ime preiskave: mK-Neonatalni TSH), fenilalanina za diagnostiko fenilketonurije (ime preiskave: mK-PKU) in 57 analizov s tandemskim masnim spektrometrom za diagnostiko 17 prirojenih bolezni presnove (ime preiskave: mK-MS-MS-presejanje). Prvi dve preiskavi opravlja laboratorij KNM, zadnjo pa KISLD. Po potrebi je – v primeru ponovnega odvzema zaradi mejnega ali pozitivnega rezultata – možno naročiti tudi posamezno preiskavo ali kombinacijo dveh preiskav. Elektronsko naročanje omogoča tudi samodejni prenos vseh zahtevanih podatkov o preiskovancu iz porodnega zapisnika v elektronsko naročilo. Te podatke je pred uvedbo novega sistema medicinsko osebje na odzemni kartici izpolnjevalo ročno (Slika 3). Dodatno se ob elektronskem naročilu vpišeta le še datum in ura odvzema. Danes se ob kreiranju naročila samodejno natisnejo nalepke s črtno in QR kodo (»Quick Response« oz. matrična črna koda) (Slika 4). Črtna koda vsebuje številko LIS naročila. QR koda vsebuje tudi vse potrebne podatke o preiskovancu. Obvezni podatki, s katerimi je opremljena vsaka kartica, so: podatki matere (ime in priimek, datum rojstva, številka ZZSZ, ID matere – številka poroda), podatki novorojenca (ime in priimek, ID številka otroka – številka poroda, spol, zaporedje v primeru sorojencev, datum in ura rojstva, gestacijska starost ter teža novorojenca), datum in ura odvzema vzorca ter naziv naročnika. Omenjene podatke je mogoče uporabiti za identifikacijo vzorcev ob morebitnem izpadu celotne informacijske mreže. Zaposleni v porodnišnicah ob vsaki odposlani seriji vzorcev kreirajo tudi transportni list, ki ga priložijo vzorcem v pošno kuverto in služi kot kontrola transportnega procesa ob sprejemu vzorcev v laboratoriju. Ko je naročilo v porodnišnici potrjeno, se prenese v komunikacijsko platformo medGateway, do katere lahko dostopa LIS obeh laboratorijev. Ob prejemu vzorcev vsak laboratorij preko črtno kode sprejme vzorce v LIS. Vzorci imajo v obeh laboratorijih UKCL enako številko, kar omogoča jasno sledljivost rezultatov. LIS

nato kreira zaporedni seznam vzorcev glede na vrstni red sprejema, ki služi kot vzporedna kontrola pri sledenju vzorcev. Sledi izrezovanje 3,2 mm krožcev filtrirnega papirja, prepojenega s posušeno krvjo. Aparat za izrezovanje (Perkin Elmer – Waltham, MA, ZDA) omogoča branje črtnih kod vzorcev, ki jih poveže s koordinato luknjice na mikrotitrski ploščici s 96 mesti, v katero je bil izrezan posamezen vzorec. Po končanem izrezovanju vzorcev generira programska oprema izrezovalnika (Wallac DBS Puncher) seznam vzorcev v seriji z ustreznimi koordinatami in LIS številkami. Omenjeni seznam prenesemo v LIS, kjer se – glede na LIS številko – dopolni s podatki o preiskovancu (ime in priimek ter datum rojstva). Dodajo se tudi nastavitve za vse analizne parametre tandemskega masnega spektrometra Xevo TQ-D (Waters – ZDA, Milford Massachusetts). LIS nato generira in izvozi delovno listo v formatu programske opreme masnega spektrometra (MassLynx – Waters). Po končani analizi s programsko opremo MassLynx generiramo poročilo v formatu .csv (comma separated values), ki vsebuje rezultate za posamezen vzorec, označen s številko vzorca v LIS. Datoteko uvozimo v LIS, ki avtomatsko prenese rezultate za vse vzorce. Pred pregledom rezultatov LIS uvozi odobrene rezultate laboratorija KNM in preračuna razmerja med izbranimi analiti, ki so potrebni za interpretacijo rezultatov. Vsak rezultat za preiskavo mK-MS-MS-presejanje ima na koncu skoraj 100 vrednosti. Analiza le-teh poteka v programu LIS, kjer so vrednosti analizov za posamezno bolezen združeni in barvno kodirani za lažjo interpretacijo. Analitik pregleda rezultate vsakega vzorca in ga glede na vrednosti analizov označi kot negativnega, mejnega ali pozitivnega. Pri negativnih vzorcih se ob odobritvi generira elektronski izvid, ki se prek medGateway prenese v BIS naročnika. Mejne in pozitivne rezultate pred zaključkom pregleda in odobri še zdravnik, nadaljnja pot pa je enaka kot pri negativnih izvidih. V primeru mejnega ali pozitivnega izvida je naročnik v komentarju izvida naprošen za ponovni odzem krvi na filtrirni papir oziroma za naročilo dodatnih potrditvenih preiskav. Naročnik nato ponovi odzem in ustvari novo naročilo v BIS ali pa pošlje preiskovanca na dodatne preiskave na PEK (7).

NAVODILO ZA IZPOLNJEVANJE KARTICE ZA ODVZEM VZORCA KRVI PRI NOVOROJENČKU

**1** ID številka matere    **2** Podatki matere    **3** Datum prejema vzorca (liboslojiti)

**4** Ime matere    **5** Datum rojstva matere

**6** Priimek matere    **8** Podpis (liboslojiti)

**11** ID    **14** I    **17** E    **20** I    **21** Naslov    **22** Poštna številka    **23** Kraj

**24** Datum odzema vzorca    **25** Ura odvzema vzorca    **26** Št. dni hranjenja z mlekom/prehrani    **27** Težna funkcija krvi?    **28** Datum zadnje transf. krvi    **29** a, b, c

**30** +    **31** +    **32** +    **33** +    **34** +    **35** +

**Zaporedje (16):**  
 1/1 en novorojenček (enojček)    2/2 dvojčka/drugi novorojenček  
 2/1 dvojčka/prvi novorojenček    3/2 trojčki/drugi novorojenček    3/3 trojčki/tretji novorojenček  
 itd.

Slika 3: Primer prejšnje kartice za odvzem vzorca krvi pri novorojencu, pri kateri so bili podatki o novorojencu in materi vnašani ročno.  
 Figure 3: Example of an old sampling card, which was manually fulfilled.



Slika 4: Nova oblika kartice za presejalno testiranje novorojencev, ki ne potrebuje ročnega izpolnjevanja podatkov o novorojencu in materi. Zahtevani podatki se samodejno prenesejo iz bolnišničnega informacijskega sistema (BIS), ki generira naročilo in črtno ter QR kodo.  
 Figure 4: The new form of sampling card, which does not need manual input. The needed data is automatically transferred from BIS, which generates barcode and QR code.

»



## ZAKLJUČEK

Glavne prednosti informatizacije razširjenega programa presejalnega testiranja novorojencev na prirojene bolezni so dobra sledljivost vzorcev in njihovih rezultatov, manjša časovna obremenitev zaposlenih, manjša možnost za nastanek napak, hitrejši prenos izvidov nazaj k naročnikom in večja varnost podatkov. Pri odvzemu so sedaj podatki o preiskovancu zajeti v črtni in QR kodi, prej pa so bili zapisani na odvzemno kartico ročno. To predstavlja manj dela za zaposlene, manjšo možnost za zamenjavo vzorca in manj napak pri vnosu podatkov o vzorcu. Sprejem vzorcev v laboratorij poteka preko skeniranja črtnih kod, kar je prav tako hitreje in močno zmanjša možnost napak. Ker se ob izrezovanju krvnih madežev za vsak vzorec obvezno odčita črtna koda, je možnost, da bi prišlo do zamenjave položajev vzorcev na mikrotitrski ploščici, praktično nična. Ker se vzorci pri meritvi na tandemskem masnem spektrometru vodijo glede na številko vzorca v LIS, prav tako pa se samodejno prenesejo tudi rezultati, je vrstni red vzorcev na ploščici – z vidika zamenjave – nepomemben. Samodejno generiranje delovne liste preko LIS prihrani veliko časa in dodatno zmanjša možnost za napake. Analitik tako samo preveri delovno listo in zažene meritev. Po končani meritvi se vzorci prenesejo v LIS – vsaka meritev k pripadajočemu rezultatu za vsak posamezen vzorec glede na številko naročila.

Program razširjenega presejalnega testiranja novorojencev je prinesel nove izzive pri obvladovanju večjega števila podatkov. Poleg tega je bilo z organizacijskega vidika pomembno povezati porodnišnice z obema laboratorijema, ki program izvajata, saj smo želeli s čim manj dodatnega dela za porodnišnice zagotoviti hiter in zanesljiv prenos vzorcev in rezultatov. Informacijske rešitve, ki smo jih vpeljali, so učinkovite in smo ob tem vzor marsikateremu laboratoriju, ki se s presejalnim testiranjem ukvarja že dalj časa. Z vsakodnevno uporabo sproti odkrivamo šibke točke in hkrati možnosti za izboljšave sistema. V povezavi s skrbniki LIS se trudimo sistem nenehno nadgrajevati. V letu 2020 so se na PEK UKCL začele priprave na novo širitev programa presejalnega testiranja novorojencev, v kateri bomo vpeljali nove diagnostične tehnologije za diagnostiko 21 novih prirojenih bolezni. Zaradi specifične testiranja omenjenih bolezni bo nova širitev predstavljala velik izziv na področju uporabe informacijskih tehnologij. Skupno bo po širitvi testiranih 40 prirojenih bolezni (8). Eden od glavnih ciljev je povečati stopnjo avtomatizacije in s tem, kolikor je to mogoče, izključiti človeški dejavnik. Pomembne so tudi izboljšave v samem poteku dela z LIS, pri katerem je treba stremeti k enostavnosti uporabniške izkušnje.

## LITERATURA

- Lampret BR, Remec ŽI, Torkar AD, Tanšek MŽ, Šmon A, Koračin V, et al. Expanded Newborn Screening Program in Slovenia using Tandem Mass Spectrometry and Confirmatory Next Generation Sequencing Genetic Testing. *Zdr Varst.* 2020;59(4):256–263.
- Kolar Celarc M. Uradni list Republike Slovenije št. 47, . 2439. Sect. MINISTRSTVA Jun 7, 2018 p. 7938.
- Šmon A, Grošelj U, Žerjav Tanšek M, Biček A, Oblak A, Zupančič M, et al. Newborn screening in slovenia. *Zdr Varst.* 2015;54(2):86–90.
- Groselj U, Tansek MZ, Smon A, Angelkova N, Anton D, Baric I, et al. Newborn screening in southeastern Europe. *Mol Genet Metab.* 2014;113(1-2):42–45.
- American College of Medical Genetics Newborn Screening Expert Group. Newborn screening: toward a uniform screening panel and system--executive summary. *Pediatrics.* 2006;117(5 Pt 2):S296–307.
- Rudolf A, Mihevc Ponikvar B. Porodi in rojstva v Sloveniji 2016 - 2018. Nacionalni inštitut za javno zdravje; 2020.
- Pediatrična klinika. Navodilo za izvajanje razširjenega presejanja novorojencev v Sloveniji [Internet]. [cited 2021 Apr 13]. Available from: [https://www.redkebolezni.si/assets1191/wp-content/uploads/2016/05/Redke-bolezni\\_Protokol-razsirjenega-presejanja-novorojencev-marec-2019.pdf?x96556](https://www.redkebolezni.si/assets1191/wp-content/uploads/2016/05/Redke-bolezni_Protokol-razsirjenega-presejanja-novorojencev-marec-2019.pdf?x96556)
- Koracin V, Mlinaric M, Baric I, Brincat I, Djordjevic M, Drole Torkar A, et al. Current status of newborn screening in Southeastern Europe. *Frontiers in Pediatrics.* 2021; 9: 648939.

# Umestitev laboratorijskih preiskav v nove smernice za diagnostiko celiakije pri otrocih in mladostnikih

## *Laboratory testing according to the new guidelines for the diagnosis of paediatric celiac disease*

Tinka Hovnik<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko

<sup>2</sup> Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko

Avtor za korespondenco:

doc. dr. Tinka Hovnik, spec. med. biokem., spec. lab. med. gen.

Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko, Vrazov trg 1, 1000 Ljubljana, e-pošta: tinka.hovnik@kclj.si

### POVZETEK

Napredek laboratorijskega testiranja v zadnjih letih je spremenil diagnostični algoritem in spremljanje celiakije. Dokončna potrditev diagnoze je kompleksna in osnovana na kombinaciji kliničnih, seroloških in histopatoloških izsledkov. Smernice ESPHGAN za potrditev celiakije iz leta 2012 so prvič predvidele opustitev biopsije sluznice tankega črevesa pri skupini simptomatskih otrok z zelo povišanimi vrednostmi serumskih protiteles (TGA-IgA  $\geq$  10-krat nad zgornjo mejo normale). Smernice so bile leta 2020 ponovno revidirane in posodobljene v skladu z dokazi podprte medicine (EBM). Kot osnovni presejalni test pri otrocih s sumom na celiakijo in asimptomatskih bolnikih s povišanim tveganjem za celiakijo se priporoča določanje celokupnih protiteles IgA in specifičnih protiteles TGA-IgA. Pri pristopu brez biopsije se priporoča testiranje protiteles EMA-IgA v sekundarnem serumskem vzorcu. Molekularno-genetsko določanje HLA-DQ2 in HLA-DQ8 pri bolnikih s pozitivno serologijo ni več potrebno, ima pa visoko negativno napovedno vrednost pri skupini asimptomatskih bolnikov.

**Ključne besede:** celiakija, diagnostika, serološke preiskave, genetske preiskave, TGA, EMA

### ABSTRACT

Advances in laboratory testing in recent years have changed the diagnostic algorithm and monitoring of celiac disease (CD). The diagnosis of CD is complex and based on combination of clinical, serological and histopathological information. ESPHGAN guidelines for CD diagnosis in 2012 considered omission of duodenal biopsies in a subgroup of symptomatic children with very high auto antibody levels in serum (TGA-IgA  $\geq$  10x upper limit of normal). In 2020, guidelines were revised and updated according to evidence-based medicine (EBM). They recommend testing for total IgA and TGA-IgA as initial screening in children with clinical suspicion of CD and asymptomatic children with higher risk. The CD diagnosis following the no-biopsy approach should be confirmed by a positive EMA-IgA testing in secondary serum sample. Molecular-genetic testing for HLA-DQ2 and HLA-DQ8 is not required in patients with positive serological tests, but has a high negative predictive value in a group of asymptomatic patients.

**Key words:** celiac disease, diagnostics, serological tests, genetic tests, TGA, EMA

»



## CELIAKIJA

Celiakija je kronična, večorganska, avtoimuna bolezen, ki najpogosteje prizadene tanko črevo pri genetsko predisponiranih posameznikih (1). Ob uživanju gliadina in ostalih prolaminov v žitih se sprožita humoralni imunski odziv z nastajanjem značilnih protiteles (TGA, EMA, DGP) in celični imunski odziv (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL), ki povzročita atrofijo resic in okvaro sluznice tankega črevesa (2). Klinična slika celiakije je zelo raznolika in se lahko kaže z nespecifičnimi znaki in simptomi (3). Med bolj specifičnimi je klasična slika malabsorpcije, pogoste so tudi bolečine v trebuhu in kronična diareja (4).

## EPIDEMIOLOŠKI PODATKI

Prevalenca celiakije se je v zadnjih 50 letih močno povečala predvsem na račun sodobnejših diagnostičnih pristopov in presejalnih testov pri posameznikih s povišanim tveganjem za celiakijo. Ocenjujejo, da ima celiakijo nekje med 0,6 in 1 % splošne populacije, zato je ena najpogostejših genetsko pogojenih boleznih na svetu (6, 7). Pogostost pojavljanja celiakije je višja med sorodniki v prvem kolenu (5–10 %) ter pri bolnikih z avtoimunimi obolenji, kot so sladkorna bolezen tipa 1, bolezen ščitnice, avtoi-

Diagnosticiranje celiakije je kompleksno, zato bolezen pogosto ostaja neodkrita. Evropsko združenje za pediatrično gastroenterologijo, hepatologijo in prehrano (ESPGHAN) je leta 1970 sprejelo enotna diagnostična merila za celiakijo, tako imenovana klasična merila, ki so temeljila na endoskopskem odvzemu vzorca sluznice tankega črevesa (biopsija). Šele revidirana merila ESPGHAN iz leta 2012 prvič ne temeljijo izključno na biopsiji. Od letošnjega leta so v veljavi nove, posodobljene ESPGHAN smernice 2020. Njihova priporočila so plod sistematičnega pregleda literature in ocene klinične uporabnosti (5).

muni hepatitis, selektivno pomanjkanje IgA ali revmatoidne bolezni (8). Zaradi raznolike klinične slike in številnih spremljajočih simptomov ostaja velik delež bolnikov neodkrit oziroma so tudi v srednji Evropi diagnosticirani z zamudo (9). Teorija ledene gore ponazarja manjši delež ustreznih prepoznanih bolnikov znotraj mnogo večje množice nediagnosticiranih s tiho oziroma latentno celiakijo in poudarja pomen presejalnih testov pri klinično asimptomatskih bolnikih (10).

## LABORATORIJSKI TESTI ZA DOKAZOVANJE CELIAKIJE

Laboratorijska diagnostika celiakije je raznolika ter osnovana na kombinaciji serološkega testiranja, molekularno-genetske tipizacije in histopatološkega pregleda biopsije sluznice tankega črevesa. Nobeden od navedenih testov samostojno ne zadošča za potrditev diagnoze (4). Osnovni in izključno pri otrocih tudi samozadostni laboratorijski test je serologija, pri čemer morajo biti potrditveni serološki testi in biopsija opravljena v času normalnega prehranjevanja (11). Hkrati s tehnološkim razvojem metod se je spremenil nabor diagnostičnih testov, s katerimi potrjujemo celiakijo v laboratoriju.

### Serološko testiranje za celiakijo značilnih protiteles

Serološko testiranje je neinvazivno in cenovno ugodno, zato se uporablja za potrjevanje celiakije in kot presejalni test pri

bolnikih s sumom na celiakijo. Pri otrocih in mladostnikih lahko s stopenjskim določanjem protiteles v dveh različnih vzorcih seruma diagnozo dokončno potrdimo, medtem ko pri odraslih ostaja zlati standard endoskopska preiskava in histopatološki pregled biopsije črevesne sluznice (12). Prvotno v serumu bolnikov s sumom na celiakijo vedno določamo **celokupno koncentracijo imunoglobulinov IgA**, da izključimo lažno negativen rezultat v primeru selektivnega pomanjkanja IgA protiteles (13). Če je njihova koncentracija znižana, določamo protitelesa razreda IgG (14,15).

Med specifična protitelesa, ki so najbolj značilna za celiakijo, uvrščamo protitelesa proti tkivni transglutaminazi (TGA) razreda IgA in IgG, protitelesa proti endomiziju (EMA) razreda IgA in IgG ter protitelesa proti deamidiranim gliadinskim peptidom (DGP) razreda IgA in IgG. Določanje pro-

titeles proti gliadinu (AGA) se zaradi nizke specifičnosti in občutljivosti testa za potrjevanje diagnoze v klinični praksi ne priporoča več (16). Vsi serološki testi imajo visoko pozitivno napovedno vrednost – PNV, kar pomeni, da pozitiven rezultat z veliko verjetnostjo potrjuje diagnozo. Spodnja tabela prikazuje občutljivost in specifičnost seroloških testov različnih, za celiakijo značilnih protiteles (Tabela 1).

Največjo specifičnost izkazujejo protitelesa EMA (99 %), zato so najprimernejša za potrjevanje bolezni, medtem ko je visoka občutljivost protiteles TGA (98 %) primernejša za presejanje (4). Občutljivost testov lahko povečamo s kombinacijo več različnih, vendar se ob tem zniža specifičnost, zato to ni priporočljivo pri preiskovancih z nižjo verjetnostjo za celiakijo (11).

**Tabela 1:** Občutljivost in specifičnost različnih seroloških testov (povzeto po Al-Toma et al., 2019)

**Table 1:** Sensitivity and specificity of different serological tests (according to Al-Toma et al., 2019)

Antigen	Tip protiteles	Občutljivost,%(rang)	Specifičnost,%(rang)
Gliadin	IgA	85 (57-100)	90 (47-94)
	IgG	80 (42-100)	80 (50-94)
Endomizij	IgA	95 (86-100)	99 (97-100)
	IgG	80 (70-90)	97 (95-100)
Tkivna transglutaminaza	IgA	98 (78-100)	98 (90-100)
	IgG	79 (45-95)	95 (94-100)
Deamidirani gliadinski peptidi	IgA	88 (74-100)	90 (80-95)
	IgG	80 (70-95)	98 (95-100)

**Tkivna transglutaminaza (tTG)** je encim velikosti 76 kD, sestavljen iz 686 aminokisljin in v telesu opravlja različne fiziološke funkcije, katalizira kovalentno prečno povezavo proteinov z glutaminskimi ostanki, sodeluje pri regulaciji celične proliferacije, diferenciacije in apoptoze (17, 18). Encim tTG ima pglavilno vlogo v patogenezi celiakije, deamidira glutaminske ostanke gliadina ter s tem olajša njegovo vezavo na molekule histokompatibilnostnega kompleksa na antigen predstavitvenih celicah (19). Imunogeni gliadin prepoznajo limfociti CD4, katerih aktivacija sproži tako celični imunski odziv preko tvorbe inflamatornih citokinov kot tudi humoralni imunski odziv z nastajanjem različnih protiteles (20). Določanje protiteles proti tkivni transglutaminazi razreda IgA (TGA-IgA) je najbolj razširjen in uporabljen test pri diagnosticiranju celiakije, občutljivost in specifičnost testa pri nezdravljenih bolnikih je nad 98 %. Protitelesa TGA-IgA/IgG do-

ločamo z encimsko-immunskim testom (ELISA) ali redkeje radio-immunskim testom (RIA). Višji kot je titer protiteles TGA, večja je verjetnost za resnično pozitiven rezultat (4). Za neinvazivno testiranje večjih populacij so na voljo tudi hitri presejalni testi za kakovostno določanje specifičnih protiteles, ki temeljijo na imunokromatografski metodi.

**Protitelesa proti endomiziju (EMA)** so bila prvi pomembnejši diagnostični test za potrjevanje celiakije, še posebej pa je bilo pomembno odkritje leta 1997, da je TGA tarčni antigen za endomizijska protitelesa (21). Protitelesa EMA določamo na osnovi indirektna imunofluorescence (IIF) na antigenem substratu (tkivo opičjega požiralnika, človeške popkovnice ali celične linije). Avtoprotitelesa iz seruma se vežejo na antigene na objektnem steklu, dodamo sekundarno protitelo, označeno s fluorescentnim barvilom, nato pod fluorescenčnim mikroskopom pri valovni »

dolžini 515 nm opazujemo različne tipe in jakosti imunofluorescence. Številne študije so potrdile, da je določanje protiteles TGA najbolj občutljiv in določanje protiteles EMA najbolj specifičen test za potrjevanje celiakije (10, 22).

**Deamidirani gliadinski peptidi (DGP)** nastajajo po deamidaciji gliadina s TGA v sluznici tankega črevesa samo v primeru celiakije. Test DGP-IgA ima sprejemljivo, vendar nižjo pozitivno napovedno vrednost (70 %) kot določanje protiteles TGA-IgA. Določamo ga z encimsko-immunskim testom. Določanje protiteles DGP in TGA razreda IgG skupaj je najboljši pristop za potrjevanje celiakije pri osebah s selektivnim pomanjkanjem IgA (4, 16).

### **Molekularno-genetsko testiranje celiakije – HLA-DQ2 in HLA-DQ8 tipizacija**

Celiakija je multifaktorska bolezen, pri njenem nastanku sodelujejo tako okoljski (gliadin in ostali prolamini v žitih) kot tudi genetski dejavniki. Glavno vlogo pri razvoju celiakije pripisujejo genom poglavitnega histokompatibilnostnega kompleksa, pri človeku HLA (humani levkocitni antigeni) (23).

Avstralska študija na skupini 356 bolnikov s celiakijo je pokazala, da je HLA-DQ2 ali HLA-DQ8 pozitivnih skupno kar 99,6 % bolnikov, ter da je proizvodnja TGA ali EMA protiteles odvisna od prisotnosti genov HLA-DQ2/DQ8. Večina bolnikov (95 %) ima prisotno alelni varianti HLA-DQ2 (DQA1\*05/DQB1\*02), redki (cca. 5 %) pa varianti HLA-DQ8 (DQA1\*03/DQB1\*0302) (24). Prav tako je velika vseevropska študija na 1008 preiskovancih potrdila izjemno nizko stopnjo odsotnosti nosilcev DQ2 ali DQ8 alelov med bolniki s celiakijo (61/1008) (25). Posamezniki, ki imajo dvojno kopijo DQB1\*02 (DR3-DQ2 homozigoti ali DR3-DQ2/DR7-DQ2 heterozigoti), imajo izrazito povečano tveganje za razvoj celiakije (24, 25). Glede na dejstvo, da so aleli HLA DQ2/DQ8 pogosto prisotni tudi v splošni populaciji, ima test nizko specifičnost in se zato ne uporablja za potrjevanje bolezni. Kljub nizki specifičnosti pa ima tipizacija HLA-DQ2 in HLA-DQ8 zelo visoko negativno napovedno vrednost (99 %), zato so genetski

testi uporabni za izključevanje celiakije pri ljudeh z visokim tveganjem (SBT1, ostala avtoimuna obolenja) in pri bolnikih, pri katerih težko postavimo diagnozo zaradi nasprotujočih si izvidov (5).

Prisotnost alelov HLA-DQ2 in HLA-DQ8 določamo z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času (real-time PCR ali qPCR) s hidrolizirajočimi sondami za detekcijo specifičnih zaporedij (TaqMan). Sonde sestavljajo oligonukleotidna zaporedja z dušilnim in reporterskim barvilom, pri čemer dušilno barvilo zaradi bližine ne omogoča absorpcije in emisije reporterskega. Med pomnoževanjem polimeraza v realnem času s svojo eksonukleazno aktivnostjo razgradi sondo za detekcijo specifičnih zaporedij, ki se nahaja sredi matrične DNA med začetnima oligonukleotidoma. Pri razgradnji sond se sprosti reportersko barvilo, ki tako ni več v bližini dušilnega in zato fluorescira pri značilni valovni dolžini ter omogoča spremljanje pomnoževanja produkta ter s tem prisotnost specifičnega alela. Obstajajo različni diagnostični kompleti za detekcijo HLA, vendar nobeden ne omogoča določitve vseh možnih alelnih variant (26, 27).

### **Histopatološka analiza sluznice tankega črevesa**

Biopsija sluznice tankega črevesa je dolga leta veljala za **zlati standard v diagnostiki celiakije**. Pri bolnikih se na sluznici pojavljajo značilne morfološke spremembe, ki se kažejo z atrofijo črevesnih resic, poglobitvijo kript v črevesni sluznici in pomnožitvijo limfocitov med epitelnimi celicami (28). Za ocenjevanje stopnje okvare sluznice se uporablja modificirana Marsh-Oberhuberjeva klasifikacija, s katero spremembe sluznice tankega črevesa razvrstimo v stopnje od 0 do 3 (Tabela 2) (29, 30, 31). Za celiakijo so najznačilnejše spremembe 3. stopnje, ki jih delimo še na podskupine 3a, 3b in 3c. Ključno merilo pri opredelitvi celiakije je atrofija oziroma krajšanje črevesnih resic. Za dokončno potrditev celiakije je treba opraviti vsaj štiri biopsije distalnega dela dvanajstnika in vsaj eno biopsijo začetnega bulbosa dvanajstnika v času normalnega vnosa glutena (31, 32).

**Tabela 2:** Modificirana Marsh-Oberhuberjeva klasifikacija histopatoloških sprememb pri celiakiji (povzeto po Oberhuber et al., 2000)**Table 2:** Modified Marsh-Oberhuber classification of histopathological changes in celiac disease (adopted from Oberhuber et al., 2000)

Stopnja po Marshu	Število intraepitelnih limfocitov / 100 enterocitov dvanajstnika	Hiperplazija kript	Črevesne resice oz. vilusi
0	<40	Ni prisotna	Normalne
1	>40	Ni prisotna	Normalne
2	>40	Prisotna	Normalne
3 a	>40	Prisotna	Blaga atrofija
3 b	>40	Prisotna	Zmerna atrofija
3 c	>40	Prisotna	Popolna atrofija

## NOVE SMERNICE ZA DIAGNOSTIKO CELIAKIJE PRI OTROCIH IN MLADOSTNIKI

Klasične smernice Evropskega združenja za pediatrično gastroenterologijo, hepatologijo in prehrano so bile revidirane leta 1990, leta 2012 pa so doživele temeljito prenovu. Glavna novost smernic ESPGHAN iz leta 2012 je bila, da lahko gastroenterolog pri otrocih in mladostnikih z znaki ali simptomi, ki kažejo na celiakijo, postavi diagnozo brez biopsije sluznice tankega črevesa (12, 15, 33). Pri tem pristopu morajo biti izpolnjeni naslednji pogoji:

- v serumu morajo biti vrednosti TGA-IgA  $\geq 10$ -krat nad zgornjo mejo normalnih vrednosti;
- protitelesa EMA morajo biti pozitivna v sekundarnem serumskem vzorcu;
- genetski testi za HLA-DQ2 ali HLA-DQ8 morajo biti pozitivni.

V letu 2019 sta obe največji evropski strokovni združenji za celiakijo, ESPGHAN (primarno za otroško populacijo) in Evropsko združenje za preučevanje celiakije, EScCD (primarno za odrasle) izkazali potrebo po posodobitvi obstoječih smernic za vodenje celiakije ter ostalih z glutenom povezanih bolezni (4, 5). Delovna skupina za celiakijo, imenovana pri ESPGHAN, je temeljito preučila klinična in diagnostična vprašanja ter v skladu z dokazi podprte medicine izdala

**nove posodobljene smernice za diagnostiko celiakije 2020** pri otrocih in mladostnikih (5).

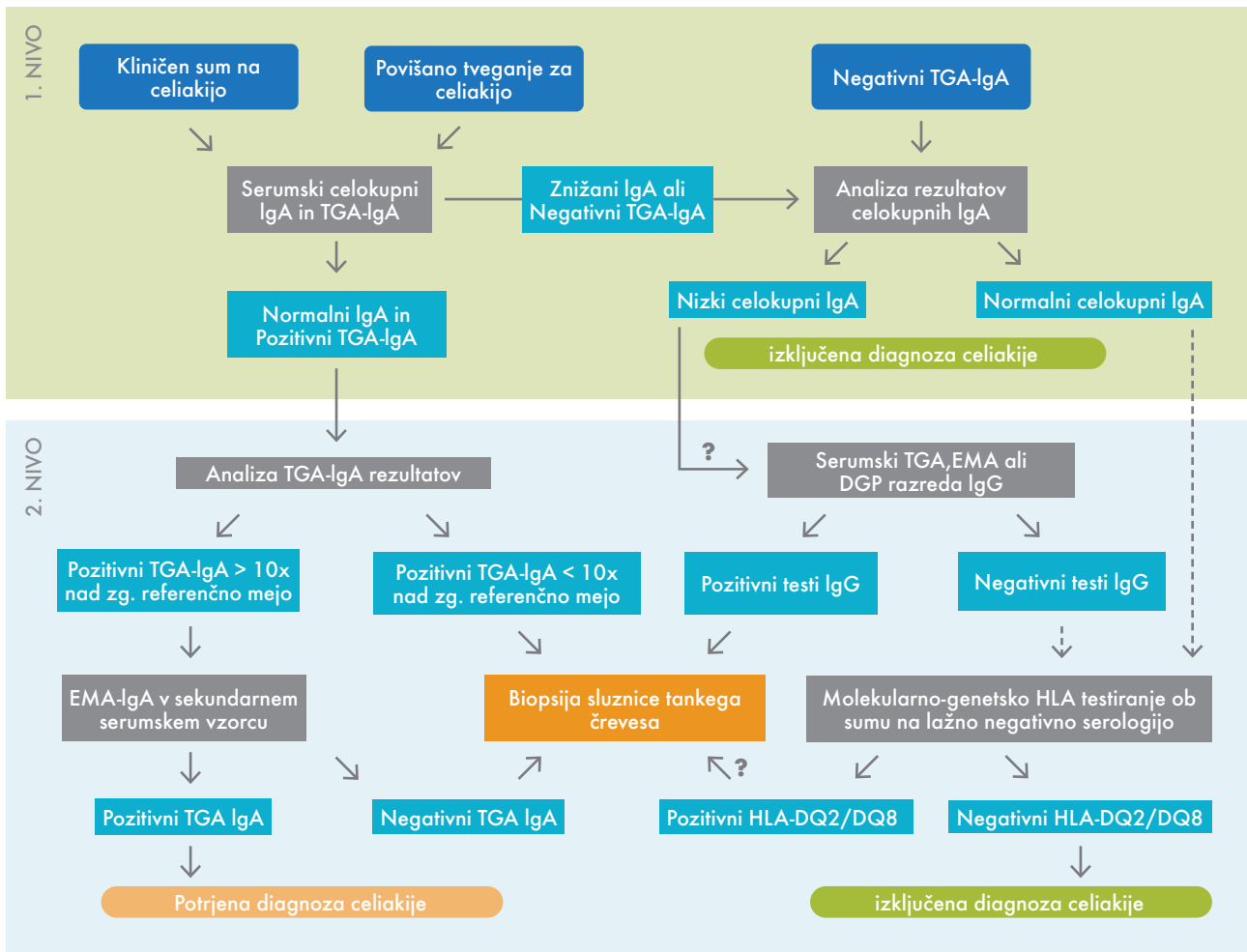
Klinična slika celiakije je zelo raznolika, zato je po novih smernicah testiranje na celiakijo priporočeno ob naslednjih kliničnih znakih in simptomih (5, 34):

- **gastrointestinalni znaki:** kronična ali občasna diareja, kronično zaprtje, abdominalne bolečine, ponavljajoča se slabost in bruhanje;
- **ekstraintestinalni znaki:** izguba teže, zaostanek v rasti, pozna puberteta in amenoreja, nevropatija, artritis, kronična anemija zaradi pomanjkanja železa, zmanjšana kostna gostota (osteopenija, osteoporoz), kronična utrujenost, artritis, kronična anemija zaradi pomanjkanja železa, ponavljajoče se razjede v ustih, kožni izpuščaj, nepravilnosti zobne sklenine;
- **specifična stanja:** sorodnik v prvem kolenu s celiakijo, avtoimunska obolenja (SBT1, bolezni ščitnice, jetrne bolezni), pomanjkanje IgA, Downov sindrom, Turnerjev sindrom, Williams-Beuren sindrom.

Dokončna potrditev celiakije je kompleksna in osnovana na kombinaciji kliničnih, seroloških in histopatoloških izsled- »

kov. Medtem ko pri odraslih ostaja zlati standard endoskopska preiskava s histopatološkim pregledom biopsije, lahko pri pediatričnih bolnikih postavimo diagnozo tudi brez biopsije tankega črevesa samo na podlagi serološkega testiranja (34,

35). Posodobljeni so tudi algoritmi, ki se v osnovi razlikujejo med bolniki s kliničnimi znaki oziroma bolniki s povišanim tveganjem za celiakijo (asimptomatski bolniki) ter bolniki s selektivnim pomanjkanjem IgA (Slika 1).



**Slika 1:** Diagnostični algoritem laboratorijskih testov pri potrjevanju celiakije (prirejeno po Husby et al., 2020). 1. Primarni nivo: osnovni testi. 2. Specialistični nivo: potrditveni testi

**Figure 1:** Diagnostic algorithm of laboratory testing in celiac disease (adopted and simplified after Husby et al., 2020). 1. Primary care: initial testing, 2. Specialist care: confirmatory testing

### Legenda:

-> ob ponovljenih normalnih celokupnih IgA in kliničnem sumu je treba upoštevati možnost lažno negativne serologije ter razmisliti o izvedbi molekularno-genetskega HLA testiranja

? potreben je posvet med bolnikom, starši in pediatričnim gastroenterologom

»

Kot osnovni presejalni test pri bolnikih s sumom na celiakijo in asimptomatskih bolnikih s povišanim tveganjem za celiakijo se priporoča določanje celokupnih IgA in protiteles TGA-IgA (36). Pri tem se diagnostični postopek ne razlikuje med simptomatskimi in asimptomatskimi bolniki (4). Pri skupini otrok in mladostnikov, ki kažejo značilne klinične znake za celiakijo ter serološka testiranja pokažejo normalne vrednosti celokupnih IgA in hkrati zelo povišane vrednosti protiteles TGA-IgA (več kot 10-krat nad zgornjo mejo normale), lahko postavimo diagnozo brez biopsije sluznice tankega črevesa (37). Prisotnost specifičnih protiteles EMA-IgA moramo v tem primeru potrditi v drugem serumskem vzorcu, medtem ko se genetsko testiranje ne priporoča več (5, 33, 35). Pogojno priporočilo je, da lahko celiakijo diagnosticiramo brez biopsije črevesne sluznice tudi pri asimptomatskih otrocih, če so upoštevana enaka merila kot pri otrocih s simptomi. Ob tem je treba upoštevati, da je raven TGA-IgA pri simptomatskih otrocih višja kot pri asimptomatskih. Če so rezultati začetnega serološkega testiranja pozitivni, morajo biti bolniki napoteni na specialistično obravnavo na sekundarnem/terciarnem nivoju, kjer imajo možnost multidisciplinarnе obravnave (gastroenterolog, dietetik, psiholog ter ostali specialisti po potrebi) (5).

## ZAKLJUČEK

V prihodnjih letih bo ključno spremljanje implementacije novih smernic za določanje celiakije in natančno upoštevanje priporočil v sklopu laboratorijskih testov. Pojavlja se potreba po enotnem standardu, ki bo omogočil neposredno primerjavo različnih seroloških testov za določanje

Pri posameznikih z normalno vrednostjo celokupnih IgA je najprimernejši serološki test za diagnozo celiakije določanje protiteles TGA-IgA ne glede na starost. Drugačen je diagnostični postopek pri bolnikih z nizkimi celokupnimi vrednostmi IgA (pomanjkanje IgA), kjer se kot sekundarni test priporoča določanje protiteles proti TGA, EMA in/ali DGP razreda IgG. Ti testi pa niso primerni za osnovno presejalno testiranje v klinični praksi (13, 14, 15).

Če so vrednosti protiteles TGA-IgA nižje kot 10-krat nad zgornjo mejo, nove smernice priporočajo odvzem vsaj štirih bioptov distalnega dela dvanajstnika in vsaj enega biopta bulbosa dvanajstnika. Histološki pregled mora biti opravljen na optimalnih vzorcih. Če se rezultati serologije in histopatologije ne ujemajo, je priporočena ponovna ocena histopatoloških vzorcev. Bolnike z blagimi histološkimi spremembami (Marsh stopnje 0 ali 1) ali brez njih in pozitivnimi TGA-IgA in EMA-IgA je treba natančneje spremljati (4).

Molekularno-genetsko testiranje HLA-DQ2/DQ8 po novih smernicah 2020 pri potrjevanju celiakije brez biopsije ni več obvezno. Pogojno se priporoča pri skupini asimptomatskih bolnikov v povišanim tveganjem za celiakijo. Določanje značilnih alelov HLA-DQ2/DQ8 ima visoko negativno napovedno vrednost, če so rezultati negativni, je tveganje za celiakijo zelo nizko (4).

protiteles TGA-IgA. Nadaljnje klinične študije, predvsem na skupini asimptomatskih otrok s SBT1 in višjim tveganjem za razvoj celiakije, bodo potrdile pravilnost in uporabnost priporočil pri diagnosticiranju brez biopsije sluznice tankega črevesa.

## LITERATURA

1. Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PH, et al. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut*. 2013 Jan;62(1):43-52.
2. Tye-Din JA, Galipeau HJ, Agardh D. Celiac Disease: A Review of Current Concepts in Pathogenesis, Prevention, and Novel Therapies. *Front Pediatr*. 2018;6:350.
3. Riznik P, De Leo L, Dolinsek J, Gyimesi J, Klemenak M, Koletzko B, et al. Clinical Presentation in Children With Coeliac Disease in Central Europe. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2021;72(4):546-551.
4. Al-Toma A, Volta U, Auricchio R, Castillejo G, Sanders DS, Cellier C, et al. European Society for the Study of Coeliac Disease (ESsCD) guideline for coeliac disease and other gluten-related disorders. *United European Gastroenterol J*. 2019;7(5):583-613.
5. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó I, Kurppa K, Mearin ML, Ribes-Koninckx et al. European Society Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Guidelines for Diagnosing Coeliac Disease 2020. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2020;70(1):141-156.

»



6. Rubio-Tapia A, Ludvigsson JF, Brantner TL, Murray JA, Everhart JE. The prevalence of celiac disease in the United States. *Am J Gastroenterol*. 2012;107(10):1538-44; quiz 1537, 1545.
7. Altobelli E, Paduano R, Petrocelli R, Di Orio F. Burden of celiac disease in Europe: a review of its childhood and adulthood prevalence and incidence as of September 2014. *Ann Ig*. 2014;26(6):485-98.
8. Riznik P, De Leo L, Dolinsek J, Gyimesi J, Klemenak M, Koletzko B et al. Diagnostic Delays in Children With Coeliac Disease in the Central European Region. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2019;69(4):443-448.
9. Ludvigsson JF, Murray JA. Epidemiology of Celiac Disease. *Gastroenterol Clin North Am*. 2019;48(1):1-18..
10. Costa Gomes R, Cerqueira Maia J, Fernando Arrais R, Nunes Jarobá CA, Carvalho Rocha MA, Felinto Brito ME, The celiac iceberg: from the clinical spectrum to serology and histopathology in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus and Down syndrome. *Scand J Gastroenterol*. 2016;51(2):178-85.
11. Rubio-Tapia A, Hill ID, Kelly CP, Calderwood AH, Murray JA; American College of Gastroenterology. ACG clinical guidelines: diagnosis and management of celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2013;108(5):656-76.
12. Meis M, Adamiak T. Pediatric Celiac Disease - A Review. *S D Med*. 2018;71(12):559-564.
13. Rittmeyer C, Rhoads JM. IgA deficiency causes false-negative endomysial antibody results in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1996;23(4):504-6.
14. Kumar V, Jarzabek-Chorzelska M, Sulej J, Karnewska K, Farrell T, Jablonska S. Celiac disease and immunoglobulin a deficiency: how effective are the serological methods of diagnosis? *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002;9(6):1295-300.
15. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, et al; ESPGHAN Working Group on Coeliac Disease Diagnosis; ESPGHAN Gastroenterology Committee; European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012;54(1):136-60.
16. Leffler DA, Schuppan D. Update on serologic testing in celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2010;105(12):2520-4.
17. Amantea G, Cammarano M, Zefferino L, Martin A, Romito G, Piccirillo M, Gentile V. Molecular mechanisms responsible for the involvement of tissue transglutaminase in human diseases: Celiac Disease. *Front Biosci*. 2006;11:249-55.
18. Martin A, De Vivo G, Iannaccone M, Stefanile A, Serrettiello E, Gentile V. Pathophysiological roles of transglutaminase - catalyzed reactions in the pathogenesis of human diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2012;11(4):278-84.
19. Molberg O, McAdam SN, Sollid LM. Role of tissue transglutaminase in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000;30(3):232-40.
20. Di Sabatino A, Vanoli A, Giuffrida P, Luinetti O, Solcia E, Corazza GR. The function of tissue transglutaminase in celiac disease. *Autoimmun Rev*. 2012;11(10):746-53.
21. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med*. 1997;3(7):797-801.
22. Yagil Y, Goldenberg I, Arnon R, Ezra V, Ashkenazi I. Serologic testing for celiac disease in young adults--a cost-effect analysis. *Dig Dis Sci*. 2005;50(4):796-805.
23. Taylor AK, Lebowl B, Snyder CL, Green PHR. Celiac Disease. 2008 [updated 2019 Jan 31]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, Amemiya A, editors. *GeneReviews* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2020.
24. Anderson RP, Henry MJ, Taylor R, Duncan EL, Danoy P, Costa MJ, et al. A novel serogenetic approach determines the community prevalence of celiac disease and informs improved diagnostic pathways. *BMC Med*. 2013;11:188.
25. Karell K, Louka AS, Moodie SJ, Ascher H, Clot F, Greco L, et al. European Genetics Cluster on Celiac Disease. HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1\*05-DQB1\*02 (DQ2) heterodimer: results from the European Genetics Cluster on Celiac Disease. *Hum Immunol*. 2003;64(4):469-77.
26. Selleski N, Almeida LM, Almeida FC, Gandolfi L, Pratesi R, Nóbrega YK. Simplifying celiac disease predisposing HLA-DQ alleles determination by the real time PCR method. *Arq Gastroenterol*. 2015;52(2):143-6.
27. Fasano ME, Dametto E, D'Alfonso S. HLA Genotyping: Methods for the Identification of the HLA-DQ2,-DQ8 Heterodimers Implicated in Celiac Disease (CD) Susceptibility. *Methods Mol Biol*. 2015;1326:79-92.
28. Siriweera A, Zhengyan Qi and Yong J. Validity of Intraepithelial Lymphocyte Count in the Diagnosis of Celiac Disease: A Histopathological Study. *International Journal of Celiac Disease*. 2015; 3(3 4):156-158.
29. Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H. The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1999;11(10):1185-94.
30. Marsh MN. Grains of truth: evolutionary changes in small intestinal mucosa in response to environmental antigen challenge. *Gut* 1990;31:111-4.
31. Corazza GR, Villanacci V. Coeliac disease. *J Clin Pathol* 2005;58:573-4.
32. Villanacci V, Magazzù G, Pellegrino S, Gambarotti M, Sferlazzas C, Tuccari G, Bassotti G. Comparison of the Marsh-Oberhuber classification with a new grading system in identifying patients with latent celiac disease. *Minerva Gastroenterol Dietol*. 2010;56(4):371-5.
33. Janša R, Zavrtnik M, Siuka D et al. Slovenian standards for the diagnosis and treatment of patients with celiac disease. *Gastroenterolog*. 2017;21(1): 4-11.
34. Khatib M, Baker RD, Ly EK, Kozielski R, Baker SS. Presenting Pattern of Pediatric Celiac Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2016;62(1):60-3.
35. Wolf J, Petroff D, Richter T, Auth MKH, Uhlig HH, Laass MW, et al. Validation of Antibody-Based Strategies for Diagnosis of Pediatric Celiac Disease Without Biopsy. *Gastroenterology*. 2017;153(2):410-419.e17.
36. Ediger TR, Hill ID. Celiac disease. *Pediatr Rev*. 2014;35(10):409-15.
37. Werksstetter KJ, Korponay-Szabó IR, Popp A, Villanacci V, Salemme M, Heilig G, et al; ProCeDE study group. Accuracy in Diagnosis of Celiac Disease Without Biopsies in Clinical Practice. *Gastroenterology*. 2017;153(4):924-935.



# Sekvenciranje mitohondrijskega genoma

## *Mitochondrial genome sequencing*

**Jernej Kovač**

Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko

*Avtor za korespondenco:*

**asist. dr. Jernej Kovač, univ. dipl. biokem.**

Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko, Vrazov trg 1, 1000 Ljubljana,

e-pošta: jernej.kovac@kclj.si

### **POVZETEK**

Mitohondriji so celični organeli, vključeni v pomembne celične procese evkariontske celice. Njihova značilnost je lastni manjši genom (mtDNA), ostanek prvobitne aerobne prokariontske celice, ki je bil v procesu vključitve te celice v endosimbiotski odnos z evkariontsko celico, pred okoli 1,5 milijarde let, izrazito zreduciran. Večina genov za mitohondrijske proteine se tako nahaja v celičnem jedru. Širok nabor celičnih procesov, ki jih regulirajo mitohondriji, pa se odraža tudi v velikem številu raznovrstnih bolezni, ki so povezane z motnjo delovanja tega celičnega organela. V sklopu tega strokovnega članka se bomo na kratko dotaknili kliničnih fenotipov, ki so povezani z motnjo delovanja mitohondrijev, ter laboratorijskih diagnostičnih metod in postopkov, ki so trenutno aktualni za diagnostiko mitohondrijskih bolezni.

**Ključne besede:** mitohondrij, mitohondrijske bolezni, diagnostika, NGS, genetika

### **ABSTRACT**

Mitochondria are cellular organelles involved in multiple important processes of eukaryotic cell. They harbor their own, small genome (mtDNA), a residue of first prokaryotic cells incorporated into the eukaryotic cells during the endosymbiotic process of mitochondria development about 1.5 billion years ago. This genome has been significantly reduces and today, most genes of mitochondria proteins are encoded in the cellular nucleus. The broad function of mitochondria is directly associated with broad spectrum of human diseases that are result of mitochondrial dysfunction. We will briefly go through the associated clinical phenotypes and current laboratory diagnostic procedures applied in the diagnostics of mitochondrial disorders.

**Keywords:** mitochondria, mitochondrial disorders, diagnostics, NGS, genetics

»

## UVOD

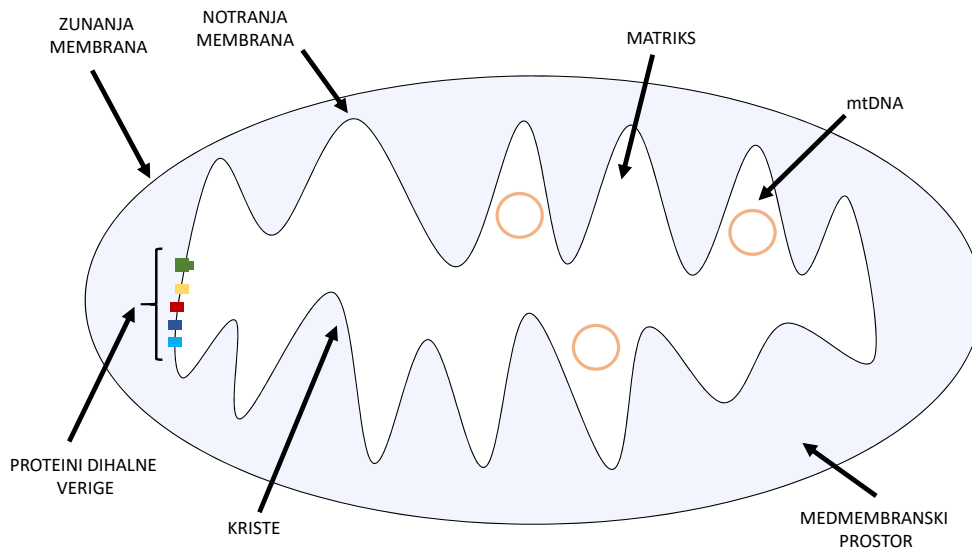
Mitochondriji so ključni organeli evkariontske celice, ki regulirajo energetske homeostazo, celično signalizacijo, izražanje genov, celični nivo kalcija in celično smrt (1). Posebnost mitohondrijev je, da imajo lasten (mitohondrijski) genom (mtDNA), v katerem je kodiranih 13 mitohondrijskih proteinov, 22 mitohondrijskih tRNA molekul in 2 mitohondrijski ribosomalni RNA molekuli. Velika večina (več kot 1000) mitohondrijskih proteinov pa je zapisanih v jedrni DNA (nDNA) in se po sintezi v endoplazmatskem retikulumu preko kompleksnih transportnih mehanizmov prenašajo v mitohondrij (2). Raznovrstnost mitohondrijskih funkcij igra vlogo tudi pri širokem spektru bolezni, ki so povezane z motnjami v delovanju mitohondrijev. Klinične fenotipe mitohondrijskih bolezni v grobem delimo na

nevrološke in ne-nevrološke fenotipe, predstavljajo pa zelo raznovrstne zaplete in motnje – od respiratorne odpovedi, odpovedi jeter, pankreatitisa in sladkorne bolezni ter zaostanka v rasti, pa do optične atrofije, epilepsij in ataksij, miopatije ter periferne nevropatije (2). Analiza genetskega ozadja mitohondrijskih bolezni zajema tako usmerjeno analizo mtDNA, kot tudi analizo nuklearnih genov, ki so povezani s funkcijo mitohondrija. Razvoj tehnologije naslednje generacije sekvenciranja DNA (NGS) je omogočil hkratno analizo tako mtDNA, kot tudi celotnega spektra z mitohondriji povezanih nuklearnih genov, kar je izrazito pospešilo diagnostiko mitohondrijskih bolezni in pomembno skrajšalo čas do samega molekularno-diagnostičnega rezultata (3).

## OSNOVNA STRUKTURA IN FUNKCIJA

Mitohondrij je celični organel z dvojno membrano, ki omogoča vzpostavitev protonskega gradienta, ki je ključen pri sintezi molekul ATP. Energijo za vzpostavitev protonskega gradienta med medmembranskim prostorom in mito-

hondrijskim matriksom zagotavlja proces oksidativne fosforilacije, ki poteka na komponentah dihalne verige, ki se nahajajo na notranji membrani (Slika 1).



Slika 1: Osnovna struktura mitohondrija

Figure 1: Basic mitochondria structure

V osnovi gre za prenos elektronov iz molekul nikotinamid adenin dinukleotida (NADH), preko proteinskih kompleksov I–IV dihalne verige, na molekule kisika kot končnega prejemnika elektronov. Energija tega procesa omogoča, da

proteinski kompleksi I, III in IV delujejo kot protonske črpalke v medmembranski prostor. Tako nakopičeno energijo protonskega gradienta uporabi proteinski kompleks ATP sintaze za fosforilacijo molekule ADP v ATP (4).

## DEDOVANJE IN HETEROPLAZMIJA

Velika večina mitohondrijskih proteinov (več kot 1000) je kodirana v jedrni DNA, na mtDNA pa se nahaja zapis za 37 genov; 13 jih zapisuje proteine dihalne verige, 22 jih zapisuje mitohondrijske prenašalne RNA molekule (tRNA), veliko podenoto ribosoma 16s in malo podenoto ribosoma 12s. V posamezni celici se lahko nahaja tudi do 10.000 kopij mtDNA, posamezen mitohondrij lahko vsebuje tudi do 10 kopij mtDNA. Človeško mtDNA sestavlja 16.569 baznih parov, pakiranih v krožno dvovezično molekulo. Geni, zapisani na mtDNA, ne vsebujejo intronov, kar je dodaten indic, da so se mitohondriji razvili iz simbioze med evkariontsko celico in prokariontom. Več kot 90 % mitohondrijskega genoma predstavlja kodirajoča regija, pomemben element nekodirajoče regije pa je D-zanka, kjer se nahaja iniciacijsko mesto začetka replikacije mtDNA (5–7). Posebnost mitohondrijev je, da se

pri sesalcih dedujejo po materi. Ker je okolje v mitohondriju nasičeno z visoko reaktivnimi spojinami in mtDNA ni zaščiten s histonskimi proteinskimi kompleksi, je delež genetskih sprememb 10- do 20-krat višji kot v jedrni DNA. V celicah posameznika imajo lahko vsi mitohondriji enako mtDNA, kar imenujemo homoplazmija, če pa je del mtDNA mutiran, to stanje imenujemo heteroplazmija. Ugotavljanje stopnje heteroplazmije pri materi je zato pomembno za zagotavljanje ustreznega genetskega svetovanja in napovedovanja verjetnosti prenosa okvarjenih mitohondrijev na plod. Klinično zdrava mati z nizko stopnjsko heteroplazmijo patološke spremembe v mtDNA lahko tako okvarjene mitohondrije prenese na plod, kjer pa se zaradi višjega deleža okvarjenih mitohondrijev (homoplazmija ali višjestopenjska heteroplazmija) razvije mitohondrijska bolezen (8).

## BOLEZNI, POVEZANE Z MOTNJO FUNKCIJE MITOHONDRIJA

Vzrok za razvoj mitohondrijske bolezni je lahko genetska okvara nuklearnih genov ali pa prisotnost patološke različice v mtDNA. Pomemben dejavnik pri mitohondrijski motnji, ki izvira iz okvare mtDNA, je tudi morebitna stopnja heteroplazmije oz. homoplazmija patološke različice, ki se odraža v tem, kako hudi in kateri specifični klinični znaki se razvijejo pri posamezniku. Heteroplazmija je lahko sistemska, razširjena po vseh celicah/tkivih organizma, ali pa je patološka različica prevladujoča le v enem organu, specifičnih tkivih, kar zopet vpliva na potek in izraženost mitohondrijske bolezni, prav tako pa lahko pomembno vpliva na uspešnost genetske diagnostike, saj lahko zaradi tkivno specifične heteroplazmije, značilne npr. za progresivno eksterno oftalmoplegijo, ob analizi neustreznega tkiva pride do lažno negativnega rezultata. (1, 2, 5–7, 9). Minimalna stopnja heteroplazmije okvarjene mtDNA, da

se bolezen izrazi, je odvisna od tipa genetske spremembe in posameznega tkiva, ki ga prizadene, okvirno pa se ta meja giblje med 60 in 90 %. Sama stopnja heteroplazmije lahko vpliva tudi na tip izražene mitohondrijske bolezni. Na primer sindrom MELAS se praviloma izrazi že ob nižjih stopnjah heteroplazmije, medtem ko se sindrom Leigh lahko ne izrazi niti ob stopnji heteroplazmije, višji od 60 % (10). V grobem ločimo med mitohondrijskimi boleznimi, ki se izrazijo v otroški dobi, in tistimi, ki se izrazijo v odrasli. Mitohondrijske bolezni, ki se izrazijo že v otroški dobi, imajo običajno težji potek z razmeroma splošnimi in nespecifičnimi kliničnimi znaki, ki segajo od zastoja v razvoju, encefalopatije, hipotonije in drugih (11). Bolj pomembne oz. znane mitohondrijske bolezni, ki nastopijo običajno že v otroški dobi, so sindrom Kearns-Sayre, Pearsonov sindrom ter Leighov sindrom. Pri mitohondrij- »

skih boleznih odrasle dobe pa sindrom mitohondrijske encefalopatije, laktatne acidoze in kapi podobne epizode (MELAS), kronična progresivna eksterna oftalmoplegija (CPEO), nevropatija, ataksija in retinitis pigmentosa (NARP), sindrom mioklonične epilepsije z rdečimi razcefranimi vlakni (MERRF) in Leberjeva hereditarna optična nevropatija (LHON). Ob tem je pomembno poudariti, da se lahko ta sklop mitohondrijskih boleznih izrazi v dolo-

čenih primerih tudi pri otrocih in najstnikih. Tako se npr. sindrom NARP lahko izrazi že v otroštvu, vendar ne napreduje oz. je lahko stabilen vse do odrasle dobe. Točen potek mitohondrijskih boleznih je izrazito odvisen od okvarjenega gena, obremenitve specifičnega tkiva, stopnje heteroplazmije in tipa patološke genetske spremembe, ki je vzrok za izraženo mitohondrijsko bolezen (11).

## TEHNOLOGIJA ANALIZE mtDNA IN Z MITHONDRIJI POVEZANIH NUKLEARNIH GENOV

Razvoj tehnologije sekvenciranja DNA naslednje generacije (NGS) je omogočil masovni preboj v diagnostiki redkih boleznih, ki so izredno raznovrstne in zajemajo več 10.000 genetskih sprememb v več 1000 genih (12–14). Med redke bolezni spadajo tudi okvare v delovanju mitohondrijev, pri katerih pa je treba razlikovati med analizo mtDNA in genov, povezanih z mitohondrijsko funkcijo, ki se nahajajo v jedrni DNA. Trenutno najbolj ekonomična rešitev je še vedno tarčna obogatitev genomskih regij, ki so diagnostično pomembne. Pri genetiki mitohondrijskih boleznih to pomeni aplikacijo kombinacije specifičnih komplementarnih kratkoverižnih oligonukleotidnih sond, ki se hibridizirajo na specifične regije genoma, ki jih želimo analizirati. Te sonde so funkcionalizirane z molekulami biotina, kar omogoča, da jih po hibridizaciji, skupaj z vezanimi fragmenti DNA preiskovanca, izoliramo z uporabo streptavidinskih paramagnetnih nanodelcev. Tako izoliran (obogaten) nabor fragmentov DNA preiskovanca imenujemo DNA knjižnica, ki jo nato sekvenciramo na NGS sekvencatorju. Po bioinformatičski obdelavi podatkov, med katero sekvencirane fragmente nalegamo na referenčna zaporedja humanega genoma in

iz razlik identificiramo prisotne genetske spremembe, lahko preko specifičnih postopkov filtriranja teh genetskih sprememb pridemo do patoloških različic, ki so pomembne za razvoj specifične mitohondrijske bolezni, opredelimo stopnjo heteroplazmije pri preiskovancu in njegovi materi, ter tako omogočimo učinkovito genetsko svetovanje družini in morebitno klinično intervencijo za bolnika (če je le-ta na voljo) (2, 3, 15). S padanjem cen sekvenciranja postaja vse bolj dostopno tudi sekvenciranje celotnega humanega genoma, pri katerem se lahko izognemo uporabi specifičnih hibridizacijskih sond, ki lahko v pripravo vzorca vnašajo določeno stopnjo napak in omejitev, s tem pa tudi postopek priprave DNA knjižnice pomembno skrajšamo (16, 17). V sklopu sekvenciranja celotnega humanega genoma je zajeta tudi celotna mtDNA z visoko kakovostnimi podatki, kar omogoča natančno opredelitev stopnje heteroplazmije, identifikacijo različic v številu kopij in strukturnih preureditev mitohondrijskega genoma. Omenjene tehnologije in lastnosti bodo postale še bolj pomembne v luči razvoja novih kliničnih postopkov in farmakoloških učinkovin za lajšanje ter tudi zdravljenje mitohondrijskih boleznih v prihodnosti (15).

## ZAKLJUČEK

Široko področje mitohondrijskih boleznih zajema več tisoč genetskih dejavnikov, ki so razporejeni med nuklearni genom celice in specifični mitohondrijski genom samega organela. Izraženi klinični fenotip je odvisen od več dejavnikov – specifičnega gena, ki je okvarjen, tipa patološke različice, ter v primeru patoloških različic v mitohondrijskem genomu, od deleža mitohondrijskih genomov, ki to

patološko različico nosijo (stopnje heteroplazmije). Z razvojem novih tehnologij analize DNA (NGS) je postala genetska diagnostika mitohondrijskih boleznih dostopnejša, prav tako pa se je povečal diagnostični izplen. Zmogljivi in ustrezni diagnostični postopki bodo v prihodnosti postali še pomembnejši zaradi razvoja specifičnih, personaliziranih in tarčnih kliničnih intervencij.

## LITERATURA

1. Supinski GS, Schroder EA, Callahan LA. Mitochondria and critical illness. *Chest*. 2020;157(2):310–322.
2. Russell OM, Gorman GS, Lightowlers RN, Turnbull DM. Mitochondrial diseases: hope for the future. *Cell*. 2020;181(1):168–188.
3. Bris C, Goudenege D, Desquiere-Dumas V, Charif M, Colin E, Bonneau D, et al. Bioinformatics tools and databases to assess the pathogenicity of mitochondrial DNA variants in the field of next generation sequencing. *Front Genet*. 2018;9:632.
4. Wilson DF. Oxidative phosphorylation: regulation and role in cellular and tissue metabolism. *J Physiol (Lond)*. 2017;595(23):7023–7038.
5. Fernandez-Vizarra E, Zeviani M. Mitochondrial disorders of the oxphos system. *FEBS Lett*. 2020;595(8):1062–1106.
6. Picard M, Wallace DC, Burrelle Y. The rise of mitochondria in medicine. *Mitochondrion*. 2016;30:105–116.
7. Nunnari J, Suomalainen A. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*. 2012;148(6):1145–1159.
8. Zhang H, Burr SP, Chinnery PF. The mitochondrial DNA genetic bottleneck: inheritance and beyond. *Essays Biochem*. 2018;62(3):225–234.
9. Gorman GS, Schaefer AM, Ng Y, Gomez N, Blakely EL, Alston CL, et al. Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Ann Neurol*. 2015;77(5):753–759.
10. Weerasinghe CAL, Bui B-HT, Vu TT, Nguyen H-LT, Phung B-K, Nguyen V-M, et al. Leigh syndrome T8993C mitochondrial DNA mutation: Heteroplasmy and the first clinical presentation in a Vietnamese family. *Mol Med Rep*. 2018;17(5):6919–6925.
11. Gorman GS, Chinnery PF, DiMauro S, Hirano M, Koga Y, McFarland R, et al. Mitochondrial diseases. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16080.
12. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*. 2016;107(1):1–8.
13. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*. 2016;17(6):333–351.
14. Bahassi EM, Stambrook PJ. Next-generation sequencing technologies: breaking the sound barrier of human genetics. *Mutagenesis*. 2014;29(5):303–310.
15. Almannai M, El-Hattab AW, Ali M, Soler-Alfonso C, Scaglia F. Clinical trials in mitochondrial disorders, an update. *Mol Genet Metab*. 2020;131(1-2):1–13.
16. Meienberg J, Bruggmann R, Oexle K, Matyas G. Clinical sequencing: is WGS the better WES? *Hum Genet*. 2016;135(3):359–362.
17. Lionel AC, Costain G, Monfared N, Walker S, Reuter MS, Hosseini SM, et al. Improved diagnostic yield compared with targeted gene sequencing panels suggests a role for whole-genome sequencing as a first-tier genetic test. *Genet Med*. 2018;20(4):435–443.

# Molekularno-genetska diagnostika akutne limfoblastne levkemije pri otrocih

## *Genetic diagnostics of acute lymphoblastic leukemia in children*

Gašper Marinšek<sup>1</sup>, Klementina Črepinšek<sup>1</sup>, Maruša Debeljak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko

Avtor za korespondenco:

doc. dr. Maruša Debeljak, univ. dipl. biol., spec. lab. med. gen.

Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko, Vrazov trg 1, 1000 Ljubljana,

e-pošta: marusa.debeljak@kclj.si

### POVZETEK

Akutna limfoblastna (limfocitna) levkemija (ALL) je najpogostejše maligno obolenje pri otrocih. Z boljšim razumevanjem bolezni in novimi pristopi zdravljenja se je preživetje teh bolnikov dvignilo nad 80 %. Genetska diagnostika ALL je ključna pri postavljanju diagnoze, ocenjevanju tveganja in izbiri ustreznega zdravljenja. Citogenetske preiskave (kariotip in FISH (fluorescenčna hibridizacija *in situ*)) in RT-PCR (obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo) nam omogočajo prepoznavo aneuploidij in prisotnosti nekaterih najpogostejših translokacij. Z metodo MLPA (angl. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) lahko odkrijemo večje delecije in duplikacije v posameznih genih in z njimi povezane nove prognostične profile, kot je IKZF1<sup>plus</sup>. V ospredje pa zdaj prihajajo predvsem metode sekvenciranja nove generacije, ki omogočajo boljši vpogled v patogenezo bolezni, opredelitev novih genetskih podtipov, prepoznavo novih prognostičnih dejavnikov in morebitnih terapevtskih tarč. Prav tako lahko z njimi spremljamo klonalno dinamiko med zdravljenjem in ob ponovitvi bolezni, kar odpira nove možnosti za boljšo obravnavo teh bolnikov.

**Ključne besede:** akutna limfoblastna levkemija, otroci, genetika, IKZF1<sup>plus</sup>

### ABSTRACT

Acute lymphoblastic (lymphocytic) leukemia (ALL) is the most common malignancy of childhood. Due to major advances in the understanding of disease biology and the development of new intensified treatment protocols, the overall survival rates have risen above 80 %. Comprehensive laboratory diagnostics are crucial for risk stratification and treatment selection. Chromosomal karyotyping, Fluorescence In Situ Hybridization (FISH), and Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) are used to identify aneuploidies and the most common chromosomal translocations. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) enables the discovery of large-scale deletions and duplications in individual genes. Using this method, a new prognostic profile with a poor prognosis, IKZF1<sup>plus</sup>, was identified. At the forefront now are the next-generation sequencing methods that give us a better insight into the disease pathogenesis, enable the identification of novel genetic subtypes, new prognostic factors, and genetic lesions which could serve as new potential therapeutic targets. NGS also allows the monitoring of clonal dynamics during therapy and at relapse, which opens up new possibilities for better treatment of patients with relapsed ALL.

**Key words:** acute lymphoblastic leukemia, children, genetics, IKZF1<sup>plus</sup>

## UVOD

Levkemija je rak krvnih celic in kostnega mozga. Gre za heterogeno skupino bolezni, ki jih delimo glede na vrsto prizadetih celic (mieloblastne (mieloične) ali limfoblastne (limfatične)) in hitrost napredovanja bolezni (akutne ali kronične) (1). Akutna limfoblastna (limfocitna) levkemija (ALL) je najpogostejša rakava bolezen pri otrocih: predstavlja približno 25 % vseh rakavih bolezni pri otrocih (2). Pri ALL gre za maligno transformacijo nezrelih predniških celic limfatičnih celic B in T (limfoblastov), kar vodi v pretirano namnožitev blastov v kostnem mozgu. Ti izpodrinejo zdrave celice kostnega mozga, s čimer je ovirana normalna hematopoeza. Pri bolnikih se to kaže kot anemija in z njo povezani bledica ter utrujenost, nagnjenost h krvavitvam in zmanjšan imunski odziv (1, 3). ALL se glede na izvor blastov deli na B- in T-celično. ALL je primarno bolezen otroške dobe. Najpogostejša je pri otrocih, starih 2–5 let, pogostejša je pri dečkih (2, 4). Drugi vrh pojavnosti je pri odraslih, starejših od 60 let (4). V Sloveniji za ALL zbolijo povprečno 13 otrok letno (5). Več kot dve tretjini ALL predstavlja B-celična (4). ALL predstavlja skupino genetskih bolezni, ki so posledica strukturnih sprememb kromosomov, sprememb njihovega števila in nukleotidnih sprememb v genih, ki kodirajo zapise za transkripcijske faktorje, odgovorne za diferenciacijo in proliferacijo limfocitov, tumorsupresorje, proteine, ki regulirajo celični cikel, in epigenetske faktorje. Uspešnost zdravljenja ALL pri

otrocih je v zadnjih letih narasla zahvaljujoč usmerjenemu zdravljenju in izboljšanju pri podpornem zdravljenju. Petletno preživetje otrok v razvitih državah se giblje med 76 in 86 %, vendar je še vedno vsaj 10 % bolnikov, ki so na zdravljenje neodzivni ali imajo ponovitev bolezni (2). ALL pri otrocih z genetskega vidika že dolgo sodijo med najbolje raziskane maligne bolezni. Kljub velikemu napredku v znanju o molekularnih spremembah je naše razumevanje o tem, kako te spremembe med seboj sodelujejo pri nastanku levkemije ali odpornosti na zdravljenje, še vedno pomanjkljivo. Novejše genetske raziskave so pomembno prispevale k razumevanju levkemogeneze in prognoze ter v nekaterih primerih omogočile razvoj tarčnega zdravljenja. Še posebej se usmerja raziskave v zdravljenje in opredelitev molekularnogenetskih sprememb pri bolnikih s ponovitvijo bolezni. Pri razvoju ALL ima pomembno vlogo kombinacija dejavnikov, med katere štejemo podedovane genetske spremembe, iniciacijske lezije (translokacije) in sekundarne spremembe. Podedovane genetske spremembe predstavljajo predispozicijo za razvoj bolezni, iniciacijske lezije in sekundarne spremembe pa vodijo do zaustavitve normalnega razvoja limfatičnih celic in motenj v številnih celičnih poteh, kar se odraža kot levkemija. Do ponovitve bolezni pride zaradi selekcije levkemičnih subklonov ali pridobitve novih genetskih sprememb, ki zagotavljajo odpornost na zdravljenje (6).

## GENETSKE ZNAČILNOSTI AKUTNE LIMFATIČNE LEVKEMIJE CELIC B (B-ALL) PRI OTROCIH

### Hiper- in hipodiploidnost

Aneuploidije delimo na hiperdiploidije (več kot 46 kromosomov) in hipodiploidije (manj kot 46 kromosomov). Visoka hiperdiploidnost (več kot 50 kromosomov) je pri otrocih z B-ALL pogosta (25–30 %) in je povezana z dobro prognozo. Hipodiploidnost je redkejša; pojavlja se pri 6 % otrok z B-ALL, prognoza pa je odvisna od števila kromosomov. V splošnem velja, da imajo bolniki s 45 kromosomi srednje dobro prognozo, tisti z manj kot 45 kromosomi pa slabo (6).

### Translokacije

Pri translokacijah pride do fuzije dveh genov in s tem nastanka himernega proteina, ki ima drugačne lastnosti kot izhodna proteina. Translokacije so lahko uravnotežene ali neuravnotežene, pri B-ALL gre v večini primerov za neuravnotežene translokacije. V to skupino spadajo značilne translokacije, kot so t(12;21) [*ETV6-RUNX1*], t(1;19) [*TCF3-PBX1*], t(9;22) [*BCR-ABL1*] in preureditve gena *KMT2A*, ki so podrobneje opisane v nadaljevanju. »



Translokacija t(12;21) je najpogostejša pri otrocih z ALL; pri otrocih z B-ALL se pojavlja pri 15–25 % (7). Pri tej translokaciji pride do fuzije gena *ETV6* (*TEL*) na kromosomu 12p13.2 z genom *RUNX1* (*AML*) na 21q22.1. Rezultat je fuzijski protein ETV6-RUNX1, sestavljen iz 5'-HLH domene (vijačnica-zanka-vijačnica) proteina ETV6 in 3'-DNA-vezavne in aktivacijske domene proteina RUNX1 (8). Fuzijski protein zavira aktivacijo izražanja genov, ki so običajno pod nadzorom transkripcijskega faktorja RUNX1. Translokacija t(12;21) je povezana z dobro prognozo (9).

V skupini translokacij, ki vključujejo gen *KMT2A* (*MLL*), je najpogostejša translokacija t(4;11), za katero je značilna fuzija gena *KMT2A* (*MLL*) na kromosomu 11q23.3 z genom *AFF1* (*AF4*) na 4q21.3 (10). *KMT2A* je DNA-vezavni protein z metilazno aktivnostjo (H3K4), ki pozitivno regulira izražanje genov z vezavo na promotorje različnih genov. Mednje sodijo številni geni *HOX*, ki imajo pomembno vlogo v hematopoezi in razvoju limfatičnih celic. Prognoza otrok s t(4;11) je slaba (11).

Translokacijo t(9;22), ki privede do skrajšanega kromosoma 22, označujemo tudi z imenom Philadelphia kromosom (Ph). Pojavlja se pri približno 5 % otrok z ALL (12). Pri tej translokaciji nastane ena od oblik fuzijskega proteina BCR-ABL1, ki deluje kot konstitutivno aktivna tirozin kinaza. BCR-ABL1 vpliva na signalne poti, ki vodijo v povečano proliferacijo, motnje v diferenciaciji in odpornost na apoptozo. Prognoza otrok s Ph-pozitivno ALL, zdravljenih s standardno kemoterapijo, je slaba. Kombinacija kemoterapije in zaviralcev tirozin kinaze (TKI) izboljša celokupno preživetje (13).

Translokacija t(1;19) vključuje gen *TCF3* (*E2A*) na kromosomu 19p13 in gen *PBX1* na kromosomu 1q23. Gen *TCF3* zapisuje več transkripcijskih faktorjev, kamor spadata E12 in E47. Ta se vežeta na ojačevalne in regulatorne elemente tarčnih genov. *PBX1* prav tako deluje kot transkripcijski faktor. Fuzijski protein TCF3-PBX1 je sestavljen iz transkripcijsko aktivacijske domene E12/E47 in DNA-vezavne domene PBX. Deluje kot transkripcijski aktivator, ki povzroča levkemogenezo (11).

## Genetske nepravilnosti pri normalnem kariotipu

V nekaterih primerih B-ALL ni nobenih kromosomskih nepravilnosti, so pa prisotne genetske nepravilnosti, ki vodijo v spremenjeno izražanje genov ali nastanek novih fu-

zijskih proteinov. Z genomskimi analizami so določili, da gre pri tem za gene, ki regulirajo razvoj limfocitov (14), in gene celičnega cikla (15). V raziskavi 242 bolnikov z ALL so ugotovili, da ima skupno 40 % bolnikov z B-ALL prisotne delecije, amplifikacije, točkovne spremembe ali strukturne spremembe v genih, ki regulirajo razvoj B-limfocitov. Najpogostejša tarča je bil gen *PAX5*, ki je bil spremenjen pri več kot 30 % bolnikov (14).

## Gen IKZF1

Gen *IKZF1* kodira IKAROS, transkripcijski faktor z motivi cinkovega prsta, ki je nujen za diferenciacijo hematopoetskih celic v limfatične. Tvorba dimerov poveča afiniteto vezave na DNA (16). Zaradi alternativnega spajanja eksenov obstaja vsaj osem različnih izooblik *IKZF1* (IK1-8).

Osvetlitev vloge *IKZF1* je omogočila identifikacija genov v predniških celicah limfocitov B, na katere se ta veže in jih regulira. Ferreiros in sod. so z genomskim kartiranjem ugotovili, da tarče *IKZF1* predstavljajo polovico vseh genov, ki se povečano izražajo med diferenciacijo celic B. Geni, ki jih regulira *IKZF1*, so udeleženi pri ključnih procesih diferenciacije, kot so signaliziranje, regulacija celičnega cikla in preurejanje genov za imunoglobuline (17).

Raziskave so pokazale, da so delecije gena *IKZF1* prisotne pri približno 15 % otrok z B-ALL (18,19); najvišja incidenca delecij je pri otrocih s translokacijo *BCR-ABL1* (70 %). Najpogosteje gre za delecijo celotnega gena ( $\Delta 1-8$ ) ali delno delecijo eksenov 4–7. Druge delecije so redkejšje in vključujejo delecije eksenov 2–3, 2–7, 4–8 in 2–8 (18, 19).

Delecije gena *IKZF1* so v več raziskavah povezali s slabo prognozo. Mullighan in sod. so analizirali kohorto 221 bolnikov z B-ALL in jih poimenovali *BCR-ABL1*-podobni (izključili so bolnike s translokacijo t(9;22)) ter ugotovili, da delecije oz. druge spremembe v genu *IKZF1* povečajo verjetnost za ponovitev bolezni. Dodatna analiza bolnikov, razvrščenih v skupino brez visokega tveganja, je pokazala, da je bilo relativno tveganje za ponovitev bolezni pri bolnikih z delecijo *IKZF1* skoraj 12-krat večje kot pri bolnikih brez delecije. Delecija gena *IKZF1* ob diagnozi je eden najpomembnejših napovednih dejavnikov za ponovitev bolezni (20). Tudi petletno preživetje brez dogodka je bilo bistveno nižje pri bolnikih z delecijo *IKZF1* kot pri bolnikih brez nje (69 % proti 85 %) (19).

Avtorji omenjenih raziskav zato predlagajo uvedbo določanja statusa gena *IKZF1* v protokole zdravljenja, kar bo pomagalo prepoznati tiste bolnike, ki potrebujejo intenzivnejše ali alternativno zdravljenje (npr. podaljšanje vzdrževalnega zdravljenja).

## IKZF1<sup>plus</sup>

Stanulla in sod. so v raziskavi iz leta 2018 definirali nov, od minimalne preostale bolezni (angl. minimal residual disease; MRD) odvisen prognostični profil z zelo slabo prognozo, ki so ga poimenovali *IKZF1*<sup>plus</sup> (21). V raziskavo so vključili 991 pediatričnih bolnikov z B-ALL, za katere so imeli podatke o številu kopij naslednjih genov: *IKZF1*, *PAX5*, *ETV6*, *RBI*, *BTG1*, *EBF1*, *CDKN2A*, *CDKN2B* in *ERG* ter *CRLF2*, *CSFR2A* in *IL3RA*, ki so del regije PAR1 na spolnih kromosomih.

Na podlagi rezultatov so opredelili profil *IKZF1*<sup>plus</sup>, ki zajema tiste bolnike z B-ALL, ki imajo poleg delecije v genu *IKZF1* vsaj še eno dodatno delecijo v genih *CDKN2A*, *CDKN2B*, *PAX5* ali v regiji PAR1 in hkrati nimajo delecije gena *ERG*. Delecije genov so glede na ugotovitve avtorjev lahko homozigotne ali heterozigotne, razen v primeru *CDKN2B*, pri katerem mora biti delecija homozigotna, da se bolnika uvrsti v skupino *IKZF1*<sup>plus</sup>. Delecijo regije PAR1 so opredelili kot hkratno delecijo genov *CSF2RA* in *IL3RA* ter ohranitev gena *CRLF2*, kar vodi v povečano izražanje slednjega (21). Za skupino *IKZF1*<sup>plus</sup> so ugotovili, da je bilo preživetje brez dogodka v primerjavi s skupinama z delecijo *IKZF1* in brez delecije *IKZF1* bistveno slabše (53 %, 79 % in 87 %). Genetsko sliko bolnikov so povezali z MRD, pri čemer se je pokazalo, da je verjetnost za dogodek izrazito večja pri tistih bolnikih *IKZF1*<sup>plus</sup>, ki so glede na MRD razvrščeni v srednje (MRD-IR) ali visoko tveganje (MRD-HR) (21).

## DIAGNOSTIČNE METODE

Najbolj optimalno diagnosticiranje ALL danes vključuje citomorfologijo, imunofenotipizacijo, citogenetiko (analiza kariotipa in FISH) in RT-PCR za opredelitev najpogostejših translokacij, MLPA za ugotavljanje večjih delecij in duplikacij v posameznih genih (*IKZF1*<sup>plus</sup>) in na koncu še transkriptomске analize (RNA-seq).

Otroku, pri katerem na podlagi anamneze in kliničnih znakov posumimo, da gre za ALL, naredimo v laboratoriju hemogram in diferencialno krvno sliko. Da sum potrdimo, je potrebna še biopsija kostnega mozga in analiza razmaza.

Za dokončno postavitev diagnoze B-ALL je treba določiti imunofenotip limfoblastov iz periferne krvi ali kostnega mozga. Določitev poteka s pretočno citometrijo (angl. Flow Citometry; FC) oz. imunohistokemijo. Pri tem je ključno, da dokažemo prisotnost B-celičnih antigenov in hkratno odsotnost T-celičnih antigenov. Pri ugotavljanju odzivnosti na zdravljenje ugotavljamo preostanek bolezni (MRD), pri čemer ugotavljamo prisotnost blastnih celic z metodo pretočne citometrije v vzorcu kostnega mozga na 15. in 33. dan zdravljenja.

S citogenetsko kariotipizacijo v celici lahko ugotavljamo spremenjeno število ali strukturo kromosomov. Te nepravilnosti lahko ugotovimo s pregledom kromosomov pod svetlobnim mikroskopom. S fluorescenčno in situ hibridizacijo (FISH) lahko s pomočjo fluorescenčnih sond natančno označimo posamezne dele kromosomov in jih na ta način prepoznamo ter tako ugotovimo, kakšna je kromosomska preureditev v blastnih celicah. Izolaciji RNA sledi prepisovanje v komplementarne DNA z reverzno transkriptazo (RT-PCR). Za reakcijo PCR izberemo pare oligonukleotidnih začetnikov in na cDNA, ki smo jo pridobili iz RNA, izolirane iz kostnega mozga bolnikov z B-ALL, pomnožimo samo dele fuzijskih genov, ki so nastali kot posledica kromosomske preureditve (npr. translokacije) (23). Citogenetska kariotipizacija je v kombinaciji z metodama FISH in RT-PCR najpomembnejši prognostični parameter, njegova določitev po tem postopku pa je pomembna tudi za klasifikacijo po Svetovni zdravstveni organizaciji (SZO) (22).

MLPA (angl. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) je od ligacije odvisno hkratno pomnoževanje sond, s katerim določamo spremembe v številu kopij (angl. copy number variation; CNV) genomske DNA. Med te spadajo delecije in amplifikacije posameznih genov. MLPA temelji »

na pomnoževanju sond, pri čemer vsaka sonda detektira specifično zaporedje DNA, dolgo okoli 60 nt. Končni rezultat je množica amplikonov PCR (dolgih pribl. 64–500 nt), ki jih ločimo s kapilarno elektroforezo. S to metodo opredelimo prisotnost delecij in duplikacij genov, ki imajo vpliv na prognozo (npr. *PAX5*, *IKZF*, *RB*, ...).

Sekvenciranje RNA nam omogoča pregled transkriptoma po alternativnem izrezovanju, posttranskripcijskih modifikacij, fuzijskih genov in manjših enonukleotidnih genetskih sprememb (SNP; angl. Single Nucleotide Polymorphisms). V živih celicah se geni stalno prepisujejo in po alternativnem izrezovanju nastane zrela molekula mRNA. Glavni koraki pri sekvenciranju naslednje generacije so izolacija DNA ali RNA iz izhodnega vzorca, priprava knjižnice, sekvenciranje, na koncu sledi še bioinformatična obdelava podatkov. Za analiziranje sprememb pri ALL DNA oz. RNA izoliramo iz celic kostnega mozga, lahko tudi iz pe-

riferne krvi. Priprava knjižnice se začne s fragmentacijo nukleinskih kislin. Če želimo analizirati RNA, moramo v naslednjem koraku z reakcijo obratnega prepisovanja sintetizirati komplementarno DNA (cDNA). Sledi poravnavanje visečih koncev ter dodajanje adapterskih in indeksnih sekvenc na DNA. V nadaljevanju sledi čiščenje in izolacija fragmentov določene dolžine, nato se ti fragmenti DNA preko adapterjev vežejo na pretočno celico, kjer se z reakcijo PCR knjižnica DNA pomnoži. Sledi sekvenciranje in obdelava podatkov. Obstaja več različnih platform sekvenciranja naslednje generacije (NGS, angl.: Next generation sequencing), ki uporabljajo različne tehnologije sekvenciranja. Za obdelavo podatkov je na voljo ogromno različnih programov in metod, glavni koraki v postopku pa so procesiranje slike in generiranje odčitkov zaporedja, ocena kakovosti odčitkov, poravnava odčitkov na referenčni genom, identifikacija različic, anotacija različic in vizualizacija (23, 24)

## ZAKLJUČEK

Hiter napredek znanosti in medicine na področju bolezni ALL je omogočil natančnejšo opredelitev bolezni, ki temelji na genetskih in genomskih značilnosti rakavo spremenjene limfatične celice B ali T in je skupaj z usmerjeno terapijo in izboljšanjem podporne terapije omogočila porast uspešnosti zdravljenja bolnikov z ALL. Izziv za prihodnost, v smislu izboljšanja diagnostičnih in napove-

dnih dejavnikov, predstavljajo bolniki z B-ALL, ki jih uvrščamo v skupino s standardnim tveganjem za relaps, pri katerih pride do ponovitve bolezni, ter tisti, pri katerih s standardnimi diagnostičnimi metodami ne najdemo genetskih sprememb, s pomočjo katerih bi lahko bolje opredelili napoved bolezni.

## LITERATURA

1. Karas Kuželčki N. Novi pristopi k zdravljenju akutne limfoblastne levkemije pri otrocih. *Farm Vestn.* 2014;368–77.
2. Ward E, DeSantis C, Robbins A, Kohler B, Jemal A. Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014;64(2):83–103.
3. Volavšek M. Akutna limfoblastna levkemija. In: *Klinično-patološki primeri: vaje iz patologije za študente medicine in dentalne medicine.* Ljubljana: Katedra za patologijo Medicinske fakultete; 2012. p. 106–7.
4. Does GM, Devesa SS, Curtis RE, Linet MS, Morton LM. Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001–2007. *Blood.* 2012;119(1):34–43.
5. Jazbec J, Rajič V, Karas Kuželčki N. Levkemije otroške dobe. *Zdr Vestn.* 2008;77(1):25–30.
6. Mrózek K, Harper DP, Aplan PD. Cytogenetics and Molecular Genetics of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2009;23(5):991–1010.
7. Romana SP, Poirel H, Leconiat M, Flexor M a, Mauchauffé M, Jonveaux P, et al. High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1995;86(11):4263–9.
8. Golub TR, Barker GF, Bohlander SK, Hiebert SW. Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci.* 1995;92:4917–21.
9. Rubnitz JE, Downing JR, Pui CH, Shurtleff SA. TEL gene rearrangement in acute lymphoblastic leukemia: a new genetic marker with prognostic significance. *J Clin Oncol.* 1997;15(3):1150–7.

10. Cimino G, Elia L, Rapanotti MC, Sprovieri T, Mancini M, Cuneo A, et al. A prospective study of residual-disease monitoring of the ALL1/AF4 transcript in patients with t(4;11) acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2000;95(1):96-101.
11. Moorman A V., Ensor HM, Richards SM, Chilton L, Schwab C, Kinsey SE, et al. Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: Results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. *Lancet Oncol*. 2010;11(5):429-38.
12. Ribeiro RC, Abromowitch M, Raimondi SC, Murphy SB, Behm F, William DL. Clinical and Biologic Hallmarks of the Philadelphia Chromosome in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*. 1987;70(4):948-53.
13. Kang ZJ, Liu YF, Xu LZ, Long ZJ, Huang D, Yang Y, et al. The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. *Chin J Cancer*. 2016;35(1):1-15.
14. Mullighan C, Goorha S, Radtke I, Miller C, Coustan-Smith E, Dalton J, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2007;446:758-64.
15. Stock W, Tsai T, Golden C, Rankin C, Sher D, Slovak ML, et al. Cell cycle regulatory gene abnormalities are important determinants of leukemogenesis and disease biology in adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2000;95(7):2364-71.
16. Sun L, Liu A, Georgopoulos K. Zinc finger-mediated protein interactions modulate Ikaros activity, a molecular control of lymphocyte development. *EMBO J*. 1996;15(19):5358-69.
17. Ferreiros-Vidal I, Carroll T, Taylor B, Terry A, Liang Z, Bruno L, et al. Genome-wide identification of Ikaros targets elucidates its contribution to mouse B-cell lineage specification and pre-B-cell differentiation. *Blood*. 2013;121(10):1769-82.
18. van der Veer A, Waanders E, Pieters R, Willemse ME, Van Reijmersdal S V., Russell LJ, et al. Independent prognostic value of BCR-ABL1-like signature and IKZF1 deletion, but not high CRLF2 expression, in children with B-cell precursor ALL. *Blood*. 2013;122(15):2622-30.
19. Dörge P, Meissner B, Zimmermann M, Mörcke A, Schrauder A, Bouquin JP, et al. IKZF1 deletion is an independent predictor of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia treated according to the ALL-BFM 2000 protocol. *Haematologica*. 2013;98(3):428-32.
20. Kuiper RP, Waanders E, Van Der Velden VHJ, Van Reijmersdal S V., Venkatachalam R, Scheijen B, et al. IKZF1 deletions predict relapse in uniformly treated pediatric precursor B-ALL. *Leukemia*. 2010;24(7):1258-64.
21. Stanulla M, Dagdan E, Zaliouva M, Anja M, Palmi C, Cazzaniga G, et al. IKZF1 plus Defines a New Minimal Residual Disease - Dependent Very-Poor Prognostic Profile in Pediatric B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol*. 2018;36(12):1240-9.
22. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. [Internet]. [cited 2020 Dec 1]. Available from: <https://reference.medscape.com/medline/abstract/27069254>
23. Van Dongen, J.; Macintyre, E.; Gabert, J.; Delabesse, E.; Rossi, V.; Saglio, G.; Gottardi, E.; Rambaldi, A.; Dotti, G.; Griesinger, F. et al. Standardized RT-PCR Analysis of Fusion Gene Transcripts from Chromosome Aberrations in Acute Leukemia for Detection of Minimal Residual Disease: Report of the BIOMED-1 Concerted Action: Investigation of Minimal Residual Disease in Acute Leukemia. *Leukemia* 1999, 13, 1901-1928
24. Qin D. Next-generation sequencing and its clinical application. *Cancer Biol Med*. 2019;16(1):4-10.
25. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2016;17(6):333-51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg.2016.49>



**03**

Izvirni strokovni  
in znanstveni  
prispevki

# Optimizacija postopka za določitev aktivnosti asparaginaze pri bolnikih z akutno limfoblastno levkemijo

## *Optimisation of asparaginase activity assay in patients with acute lymphoblastic leukemia*

Eva Kozjek<sup>1</sup>, Alenka Trampuš Bakija<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko

Avtor za korespondenco:

doc. dr. Alenka Trampuš Bakija, spec. med. biokem.

Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko, Vrazov trg 1, 1000 Ljubljana, e-pošta: alenka.trampus@kclj.si

### POVZETEK

Akutna limfoblastna levkemija (ALL) je najpogostejša rakava bolezen pri otrocih. Eno ključnih komponent pri zdravljenju ALL predstavlja asparaginaza, katere aktivnost v krvi mora biti vsaj 100 U/L, da pride do celične smrti levkemičnih blastov. Veliko oviro pri zdravljenju ALL predstavlja razvoj protiteles proti asparaginazi, kar vodi v inaktivacijo encima. Prepoznavanje te inaktivacije encima in prilagoditev zdravljenja morata biti čim hitrejša, izbrana metoda pa ustrezati dobri laboratorijski praksi. Pri uvajanju in oceni metode smo optimizirali že opisano indooksinško spektrofotometrično metodo za določanje asparaginazne aktivnosti v serumu in določili statistične parametre. Pri tem smo spremenili temperaturo hranjenja substrata in podaljšali čas inkubacije substrata v reakci-

ji. Izračunane vrednosti koeficienta variacije za ponovljivost, točnost in celokupne analitske napake niso presegle meje 30 %, s čimer smo potrdili analitsko ustreznost postopka. Pri bolnikih, zdravljenih s PEG asparaginazo smo v različnih časovnih intervalih izmerili encimske aktivnosti, ki so padale od dneva aplikacije zdravila. Pri bolnikih z zapleti ob prejemanju asparaginaze smo izmerili vrednosti, ki kažejo na tiho inaktivacijo encima. Optimizirana metoda je primerna za klinično diagnostiko in omogoča identifikacijo bolnikov, pri katerih je potrebna sprememba vrste asparaginaze zaradi tihe inaktivacije.

**Ključne besede:** asparaginaza, encimska aktivnost, tiha inaktivacija

### ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common cancer in children. One of the key components in the tre-

atment of ALL is asparaginase whose activity in the blood should be at least 100 U/L for certain cell death of le-



ukemic blasts. A major disadvantage in ALL treatment is the occurrence of anti-asparaginase antibodies leading to inactivation of the enzyme. It is of utmost importance to detect silent enzyme inactivation as soon as possible. The chosen method should be in accordance with good laboratory practice. In the process of method introduction and evaluation, we optimized the already described indooxin spectrophotometric method for the determination of asparaginase activity in serum and determined the statistical parameters. We changed the storage temperature of the substrate and extended the incubation time of the substrate in the reaction. The calculated values of the coefficient of variation for repeatability, accuracy, and total analyti-

cal error did not exceed the limit of 30%, thus confirming the analytical suitability of the procedure. In patients treated with PEG asparaginase, enzyme activities were measured at various time intervals. The values decreased from the day of drug administration. In patients with asparaginase complications values indicating silent enzyme inactivation were measured. The optimized method is suitable for clinical diagnostics and allows the identification of patients in whom asparaginase preparation needs to be changed due to silent inactivation.

**Key words:** asparaginase, enzyme activity, silent inactivation

## UVOD

Akutna limfoblastna levkemija (ALL) je najpogostejša rakava bolezen pri otrocih, v Sloveniji v povprečju zbolijo od 10 do 15 otrok na leto. Preživetje bolnikov z ALL je precej visoko, saj se uspešno pozdravi več kot 80 % vseh pediatričnih bolnikov z ALL. K izboljššanemu preživetju je v zadnjih 50 letih pripomogla tudi asparaginaza, ki predstavlja eno ključnih komponent pri zdravljenju ALL. V državah po svetu so v uporabi različni protokoli zdravljenja bolnikov z B- in T-celično ALL. Asparaginaza se sicer uporablja tudi pri zdravljenju nekaterih drugih malignih boleznih, kot so ne-Hodgkinovi limfomi, med njimi T- in B-limfoblastni limfom, Burkittov limfom, difuzni velikocelični B-limfom idr. (1). Asparaginaza kot zdravilo je vključena v indukcijsko in reindukcijsko fazo zdravljenja s kombinacijo citostatikov. Intenzivnejše in daljše zdravljenje z asparaginazo izboljša preživetje teh bolnikov (2).

Asparaginaza je encim, ki katalizira hidrolizo asparagina v asparaginsko kislino in amonijak. Aminokislino asparagin dobimo v telo s hrano, organizem pa ga lahko sintetizira tudi sam iz asparaginske kisline, za kar je potreben encim asparagin sintetaza. Levkemični blasti imajo zmanjšano sposobnost sinteze asparagina (imajo zmanjšano aktivnost asparagin sintetaze) v primerjavi z normalnimi limfoblasti in so zato močno odvisni od zunanjih virov asparagina. Ob razgradnji asparagina v krvnem obtoku pride do zmanjšane sinteze DNA in RNA, zmanjšane sinteze celičnih proteinov, zavrtja celične rasti in okvar celičnih funkcij ter celične smrti (3, 4). Cilj zdravljenja z asparaginazo je, da dosežemo zadostno zmanjšanje aspa-

ragina v krvnem obtoku. Da pride do celične smrti levkemičnih blastov, mora biti aktivnost asparaginaze v krvi vsaj 100 U/L z zmanjšanjem koncentracije asparagina pod 0,1  $\mu\text{mol/L}$  (5).

V naravi asparaginazo najdemo v različnih rastlinah, živalih in mikroorganizmih. Večina asparaginaz v naravi v deležu do 10 % svoje aktivnosti hidrolizira tudi glutamin v glutaminsko kislino in amonijak. V klinični rabi so asparaginaze, pridobljene iz mikroorganizmov: izolirano iz *Escherichia coli* (nativna oblika), izolirano iz *Erwinia chrysanthemi* in modificirani (pegiliran-PEG) encim, izoliran iz *E. coli*. Vse tri vrste imajo enak mehanizem delovanja, med seboj pa se razlikujejo v določenih biokemičnih in farmakokinetičnih lastnostih. Zaradi tega se razlikujejo tudi protokoli zdravljenja ALL s posamezno vrsto asparaginaze (3). V splošnem velja, da je en odmerek 1000–2500  $\text{U/m}^2$  PEG asparaginaze na štirinajst dni enako učinkovit kot odmerki 5000–10000  $\text{U/m}^2$  nativne asparaginaze na tri dni oz. odmerki 10000–25000  $\text{U/m}^2$  *Erwinia* asparaginaze na dva dni (6, 7).

Kljub temu, da so normalne celice sposobne sintetizirati asparagin in jih pomanjkanje le-tega med zdravljenjem z asparaginazo manj prizadene, lahko zaradi zmanjšane sinteze proteinov vseeno pride do okvar celičnih funkcij in pojava neželenih učinkov. Ker se asparaginaza uporablja v kombinaciji z drugimi zdravili za zdravljenje ALL, sicer ni vedno mogoče povezati določenega neželenega učinka s specifično zdravilno učinkovino (3, 8).

»

Veliko oviro pri zdravljenju ALL predstavljajo preobčutljivostne reakcije (9). Razvoja protiteles proti asparaginazi ne spremljajo vedno klinično izražene reakcije, a kljub temu protitelesa zmanjšajo aktivnost encima. Opisano je, da do tega stanja pride pri 8–30 % bolnikov, zdravljenih z nativno asparaginazo. Ta delež je še večji pri bolnikih, pri katerih je prišlo do ponovitve bolezni. Tiha inaktivacija predstavlja resen zaplet pri zdravljenju ALL, saj brez kliničnih znakov, ki nakazujejo pojav protiteles in s tem zmanjšano delovanje asparaginaze, hiter odziv zdravnikov ni mogoč. Spremljanje encimske aktivnosti asparaginaze v krvi med samim zdravljenjem omogoča identifikacijo bolnikov s tiho inaktivacijo in prilagoditev zdravljenja z zamenjavo vrste asparaginaze (10–12). Zaradi manjše imunogenosti in manj pogostih odmerkov (v primerjavi z nativno asparaginazo) se je PEG asparaginaza uveljavila kot prva izbira zdravljenja, ki jo v primeru alergijske reakcije zamenjajo z *Erwinia* asparaginazo (7).

Pri zdravljenju s PEG asparaginazo je tiha inaktivacija opredeljena kot encimska aktivnost pod 100 U/L sedmi dan po aplikaciji zdravila pri bolnikih brez kliničnih znakov alergije in/ali encimska aktivnost pod mejo kvantifikacije štirinajsti dan po aplikaciji zdravila. Pri zdravljenju z nativno asparaginazo je tiha inaktivacija opredeljena kot aktivnost pod mejo kvantifikacije tretji dan po aplikaciji, pri zdravljenju z *Erwinia* asparaginazo pa drugi dan po aplikaciji (13). Zaradi možnosti pojava tihe inaktivacije raven encimske aktivnosti običajno preverjamo pred naslednjim odmerkom, lahko pa tudi pogosteje (13).

Za zagotovitev optimalnega odziva bolnika na zdravljenje z asparaginazo je priporočljivo spremljanje učinkovitosti delovanja asparaginaze. Opisanih je več metod. Merjenje

*koncentracije asparagina* v krvi ob prisotnosti asparaginaze je tehnično zahtevno in ima veliko predanalizno variabilnost (14, 15). Samo *določanje protiteles* proti asparaginazi v krvi ne zadošča za spremljanje uspešnosti zdravljenja, saj se pri bolnikih lahko razvijejo tudi protitelesa, ki ne vplivajo na delovanje encima, a sprožijo preobčutljivostno reakcijo s podobnimi simptomi kot protitelesa, ki nevtralizirajo encimsko aktivnost asparaginaze (11, 16). Za spremljanje se je najbolj uveljavilo *merjenje encimske aktivnosti asparaginaze* v krvi, ki je tehnično lažje izvedljivo in ponovljivo. Večinoma se uporabljajo kolorimetrične metode, ki temeljijo na hidrolizi L-asparagina z L-asparaginazo (17).

Lanvers s sodelavci je opisala analizno metodo za terapevtsko spremljanje L-asparaginaze, ki temelji na indooksinski metodi in se izvaja na mikrotitrski ploščici. Metoda ima dobro občutljivost, saj omogoča zaznavanje asparaginazne aktivnosti v serumu pri vrednosti  $2 \times 10^{-5}$  U asparaginaze z območjem linearnosti med 2,5 in 75 U/L (nižje območje) ter med 75 in 1250 U/L (višje območje). Omogoča tudi določitev aktivnosti različnih vrst asparaginaze (18). V Univerzitetnem medicinskem centru Erasmus MC v Rotterdamu so na osnovi opisane metode razvili modificiran protokol za kvantifikacijo asparaginaze v serumu, ki je prilagojen serumskim koncentracijam asparaginaze pri bolnikih ob tihi inaktivaciji in brez nje (19).

Namen raziskave na Kliničnem inštitutu za specialno laboratorijsko diagnostiko, Pediatrična klinika, UKC Ljubljana, je optimizirati že opisano indooksinsko encimsko spektrofotometrično metodo in opredeliti njeno natančnost in točnost. Ugotoviti želimo, ali bo metoda primerna za določanje encimske aktivnosti asparaginaze v serumu tistih bolnikov, ki se zdravijo z asparaginazo, ter za prepoznavanje tihe preobčutljivostne reakcije.

## MATERIALI IN METODA

Materiali: TRIS/BSA pufer (1,955 g TRIS; 37,5 mg BSA; 250 mL destilirane vode; pH 7,3); L-aspartat  $\beta$ -hidroksimat (Sigma Aldrich, 2 mM in 10 mM v TRIS/BSA pufru), trikloroocetna kislina (24,5 %); hidroksikinolin (8-Hydroxyquinoline, Sigma Aldrich, 2-odstotna raztopina v absolutnem alkoholu);  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (1,0 M); reagent Oxin (2-odstotni hidroksikinolin in 1,0 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1:3); PEG asparaginaza 750000 U/L (Oncaspar® – 3750 enot PEG asparaginaze, prašek za raztopino za injiciranje, Ser-

vier Laboratories); sveža zamrznjena plazma.

Za kalibracijo smo pripravili raztopine standardov z redčenjem PEG asparaginaze s TRIS/BSA pufrom do koncentracije 3000 U/L, nato s svežo zamrznjeno plazmo do končnih koncentracij (5–100 U/L za nižje območje in 100–1000 U/L za višje območje). Kontrolne vzorce smo pripravili na enak način kot raztopine standardov.

Vzorci bolnikov: v raziskavo smo vključili pediatrične bolnike (starost 3–15 let), ki so bili v času izvajanja raziskave na kemoterapiji in so se zdravili s PEG asparaginazo (On-caspar®). Uporabili smo alikvote vzorcev serumov osmih bolnikov z ALL ali T-limfoblastnim limfomom, odvzetih za druge biokemične preiskave. Vzorce seruma smo do analize hranili na temperaturi  $\leq -70$  °C.

Metoda: Za določitev aktivnosti PEG asparaginaze uporabljamo indooksinsko metodo na mikrotitrski ploščici. V prvem koraku L-asparaginaza (20  $\mu$ L vzorca seruma, kalibratorja, kontrole) med 10-minutno inkubacijo na 37 °C hidrolizira AHA substrat (180 uL) v L-asparaginsko kislino in hidroksilamin. Z dodatkom TCA ustavimo reakcijo. V naslednjem koraku k supernatantu prve reakcije doda-

mo reagent Oxin in inkubiramo eno minuto na 95 °C ter 20 minut na sobni temperaturi. Oxin reagira s hidroksilaminom, da nastane indooksin (5,8-kinolinkinon-5-(8-hidroksi-5-kinolilimid)). Slednji je intenzivno zelene barve in ga lahko določimo spektrofotometrično pri valovni dolžini med 690 in 710 nm (20). Aktivnost PEG asparaginaze je premo sorazmerna z absorbanco. Za pripravo kalibracijske krivulje v nizkem in visokem koncentracijskem območju merjenja uporabimo 4-parametrično krivuljo Marquardt, ki zagotovi maksimalno prileganje točk. Rezultate aktivnosti izrazimo v U/L (1 U = 16,7 nkat). Ena enota (U) L-asparaginaze je opredeljena kot količina encima, ki je potrebna za pretvorbo 1  $\mu$ mol L-asparagina v 1  $\mu$ mol L-asparaginske kisline in 1  $\mu$ mol amonijaka na minuto pri 37 °C (18).

## REZULTATI

Pri uvajanju in oceni lastnosti metode smo optimizirali že opisani postopek (19) za določanje asparaginazne aktivnosti v serumu in pogoje ravnanja z reagenti. Zaradi slabe stabilnosti substrata smo tako temperaturo njegovega hranjenja spremenili z 2–8 °C na –20 °C. Fazo inkubaci-

je pred odčitavanjem absorbance smo podaljšali za 10 minut, da smo dobili višje absorbance, ustrezno prileganje kalibracijskih točk, odstopanje od ciljnih vrednosti kontrol pa se je s tem zmanjšalo za 10 % (Tabela 1).

**Tabela 1:** Primerjava odstopanja kontrolnih vzorcev od ciljne vrednosti v nizkem in visokem kalibracijskem območju glede na čas po inkubaciji; *n* – število meritev

**Table 1:** Comparison of deviation of control samples from the target value in the low and high calibration range in different incubation time; *n* – number of measurements

	Odstopanje od ciljne vrednosti [%] nizko kalibr. območje			Odstopanje od ciljne vrednosti [%] visoko kalibr. območje			Povprečno odstopanje
	10	50	100	150	500	1000	
<b>Aktivnost asparaginaze ciljna vrednost [U/L]</b>							
<b>n</b>	24			24			
<b>Po 10 min</b>	20,4	22,8	21,9	15,1	19,8	29,4	21,6
<b>Po 20 min</b>	10,6	15,5	13,4	7,2	9,1	13,6	11,6

Aktivnost asparaginaze smo določali v visokem kalibracijskem območju (100–1000 U/L) z uporabo višje koncentracije substrata. Pri aktivnosti asparaginaze pod 100 U/L

smo analizo ponovili v nizkem kalibracijskem območju (5–100 U/L) z uporabo nižje koncentracije substrata. Aktivnost asparaginaze v serumskem vzorcu smo odčitali iz »

kalibracijske krivulje, ki smo jo določili z merjenjem absorbanc indooksina pri 690 nm v raztopinah standardov pri vsaki seriji meritev.

Z merjenjem kontrolnih plazem pri šestih različnih koncentracijah PEG asparaginaze smo ocenili natančnost (koeficient variacije), točnost (relativna napaka) in merilno negotovost (celokupna analitska napaka) optimizira-

ne metode. Koeficient variacije za ponovljivost je znašal < 10 %, relativna napaka za točnost < 9 %, celokupna napaka pa okoli 24 % (Tabela 2). Statistični parametri, ki smo jih določili, so potrdili analitsko ustreznost postopka. Tri vzorce smo primerjalno izmerili v zunanjem laboratoriju, ki uporablja enako metodo kot mi. Relativna napaka je znašala < 10 %, rezultati so med sabo bili primerljivi (21).

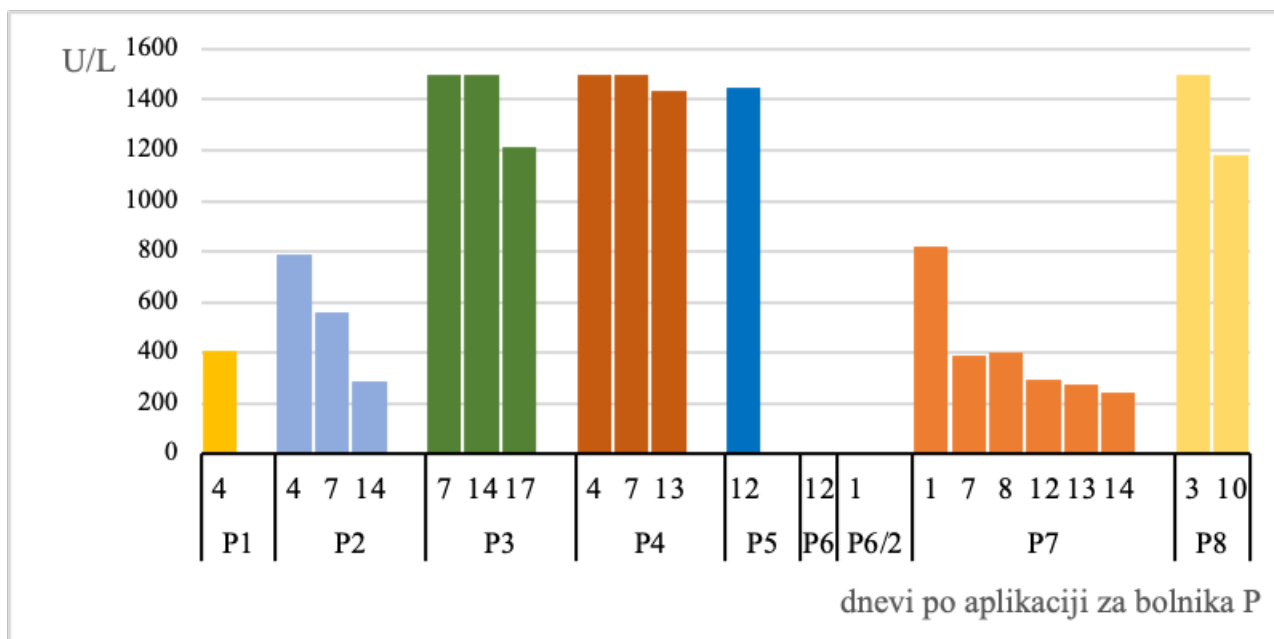
**Tabela 2:** Ponovljivost, točnost in celokupna analitska napaka indooksinske spektrofotometrične metode za nizko (5–100 U/L) in visoko kalibracijsko območje (100–1000 U/L); število meritev je 24

**Table 2:** Repeatability, accuracy and total analytical error of the indoxin spectrophotometric method for low (5–100 U/L) and high calibration range (100–1000 U/L); the number of measurements is 24

	Nizko kalibr. območje			Visoko kalibr. območje			Povprečna vrednost
	10	50	100	150	500	1000	
<b>Aktivnost asparaginaze</b> <b>Ciljna vrednost [u/l]</b>							
<b>Ponovljivost med serijami kv [%]</b>	14,4	8,1	5,2	7,8	8,9	13,5	9,6
<b>Ponovljivost znotraj serije kv [%]</b>	7,8	7,0	4,8	3,2	5,6	7,3	6,0
<b>Točnost med serijami relativna napaka [%]</b>	25,3	4,5	2,5	5,1	3,6	8,8	8,3
<b>Celokupna analitska napaka [%]</b>							24,2

V času ocenjevanja metode smo pri osmih bolnikih z ALL ali T-limfoblastnim limfomom, ki so se zdravili s PEG asparaginazo, v različnih časovnih intervalih po odmerkih določili encimsko aktivnost v serumu. Od posameznih bolnikov (P1– P8, slika 1) smo pridobili različno število vzorcev krvi, ki so jim bili odvzeti v različnih časovnih intervalih po aplikaciji PEG asparaginaze (od enega do dva-  
indvajset dni po aplikaciji).

Encimsko aktivnost smo najprej določali v visokem kalibracijskem območju (100–1000 U/L), saj smo predvidevali, da bo v večini vzorcev aktivnost asparaginaze nad 100 U/L. V primerih, ko je bila določena manjša aktivnost, smo analizo ponovili v nizkem kalibracijskem območju (5–100 U/L). Skupno smo analizirali 33 vzorcev v več serijah, od tega smo jih 7 analizirali v obeh območjih merjenja. Visoko stopnjo aktivnosti (> 200 U/L) v 1 do 14 dneh po aplikaciji zdravila smo izmerili pri sedmih bolnikih. Tiho inaktivacijo smo odkrili pri enem izmed bolnikov (21); (Slika 1).



Slika 1: Aktivnosti asparaginaze (U/L) pri bolnikih P1–P8 v vzorcih seruma, odvzetih v različnih dneh po aplikaciji

Figure 1: Asparaginase activities (U/L) in patients P1–P8 in serum samples taken on different days after the administration

## RAZPRAVA

V klinično uporabo smo vpeljali metodo, ki je že v uporabi v drugih kliničnih laboratorijih. Kot izhodišče pri uvedbi naše metode je služil protokol Univerzitetnega medicinskega centra Erasmus MC v Rotterdamu (19).

Pri optimizaciji metode smo ugotovili, da smo s spremembo pogojev shranjevanja substrata stabilizirali njegovo obstojnost v obdobju dveh mesecev. Substrat je primeren za shranjevanje na temperaturi  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Z znižanjem temperature preprečimo tudi njegovo razgradnjo in zmanjšamo spremembo pH.

Ugotovili smo, da so bili rezultati kontrol bližje ciljni vrednosti, mera odstopanja pa nižja za 10 %, če smo absorbanco izmerili šele 20 minut po inkubaciji. Tudi iz literature je znano, da se barva nastalega produkta indooksina v celoti razvije v 15 minutah po inkubaciji pri  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  in ostane stabilna še 30 minut (20). Zato smo se odločili, da bomo podaljšali čas, ob katerem merimo nastali produkt, za dodatnih 10 minut.

KV med serijami so za našo metodo znašali med 5,2 in 14,4 %. Pričakovali bi, da bodo KV manjši pri večjih aktivnostih, a tega nismo dokazali. KV se je zmanjševal od najmanjše do največje aktivnosti v nizkem kalibracijskem območju, v visokem kalibracijskem območju pa je naraščal. Podoben trend z nizko vrednostjo KV je določila tudi Lanvers s sodelavci, a le v nizkem kalibracijskem območju (18). Kljub temu je bila naša povprečna ponovljivost ( $KV = 9,6\%$ ) dovolj dobra, saj so bile vse vrednosti KV manjše od 20 %, kar ustreza smernicam Evropske agencije za zdravila (EMA) (22). KV znotraj serije so znašali med 3,2 in 7,8 %. V literaturi so opisani manjši KV (med 2 in 5,7 %), a so izračuni opravljene le na podlagi osmih meritev (18). Relativna napaka (RE) med serijami je znašala med 2,5 in 25,3 %. Podobno opisuje tudi Lanvers s sodelavci, ki je prav tako določila največji odklon od ciljne vrednosti pri aktivnosti 10 U/L, v povprečju pa so določili manjšo RE (5,1%). Z izjemo kontrolnega vzorca najnižje koncentracije RE ni preseгла priporočene meje točnosti pri 20 %. Pri tej koncentraciji je vrednost relativne napake manj pomembna, saj koncentracija ni v ob- »

močju kliničnih odločitev. Izračunana celokupna analitska napaka (24,2 %) je ustrezala smernicam, ki jih je postavila EMA za ocenitev točnosti in natančnosti analize metode in postavlja mejo pri 30 % (22).

Pri analizi vzorcev bolnikov je aktivnost asparaginaze padala s časom, kar je seveda bilo pričakovano. Absolutnih vrednosti aktivnosti med seboj nismo mogli neposredno primerjati, saj so bolniki dobivali asparaginazo v različnih odmerkih na podlagi različnih protokolov zdravljenja.

Pri bolniku P6 z relapsom ALL je bil vzorec odvzet v fazi indukcije po prvi in drugi aplikaciji, obakrat je bila aktivnost encima nizka, kar je dokaz tihe inaktivacije encima. Bolnik ni imel znakov preobčutljivostne reakcije (21). V nizkem kalibracijskem območju smo določili aktivnosti 5,9 U/L v prvem vzorcu in 5,5 U/L v drugem vzorcu.

V literaturi so opisana priporočila in pričakovane vrednosti asparaginazne aktivnosti po dnevih glede na farmakokinetične podatke o intravenski aplikaciji PEG asparaginaze. Med četrtem in sedmim dnevom po aplikaciji encima je pričakovana aktivnost asparaginaze med 600 in 1200 U/L, večina bolnikov pa ob normalnem poteku zdravlje-

nja ne bi smela imeti aktivnosti pod 200 U/L še približno 21 dni po aplikaciji zdravila (10). Takšno aktivnost smo izmerili pri petih bolnikih (P2, P3, P4, P5, P8), pri bolnikih P1 in P6 pa smo že pred četrtem dnevom po aplikaciji določili asparaginazno aktivnost pod 600 U/L. Bolnik P7 je imel še pred pretekom 21 dni po aplikaciji encimsko aktivnost pod 200 U/L. Na podlagi rezultatov ne moremo sklepati, kaj pomeni nekoliko nižja aktivnost encima za uspešnost zdravljenja, saj je podatkov o tem premalo (21).

Zaenkrat še ni jasno, kakšna je optimalna encimska aktivnost na določen dan po aplikaciji zdravila, ki bi omogočala zadostno aktivnost encima pred naslednjim odmerkom (pred štirinajstim dnevom po aplikaciji PEG asparaginaze), saj se je večina raziskav osredotočila na določitev asparaginazne aktivnosti na štirinajsti dan po aplikaciji zdravila (11, 13). Prav tako še ni povsem raziskano, kakšen odmerek asparaginaze je treba aplicirati bolnikom za maksimalno učinkovitost zdravila in hkrati čim manjšo možnost za pojav stranskih učinkov. Za izboljšanje učinkovitosti zdravljenja bi bila potrebna postavitev smernic za prilagajanje odmerjanja asparaginaze za posameznega bolnika na podlagi meritev asparaginazne aktivnosti.

## ZAKLJUČEK

Spremljanje encimske aktivnosti asparaginaze v krvi pri bolnikih z ALL, ki se zdravijo z asparaginazo, je pomembno, ker med zdravljenjem omogoča prepoznavanje bolnikov s tiho inaktivacijo in s tem prilagoditev zdravljenja. Optimizirali smo indooksinsko metodo za spremljanje aktivnosti PEG asparaginaze in v postopku ocene natančnosti in točnosti ugotovili, da je analitsko ustrezna in tako primerna za klinično uporabo. Optimizirana meto-

da omogoča identifikacijo bolnikov, pri katerih je potrebna sprememba vrste asparaginaze zaradi tihe inaktivacije encima. Za klinično uporabo je treba natančneje določiti protokol za odvzem vzorcev pred naslednjim odmerkom. Individualno prilagajanje odmerkov asparaginaze na podlagi meritev asparaginazne aktivnosti zaenkrat še ni mogoče.



## LITERATURA

1. Kitanovski L, Rajić V, Jazbec J. Novosti v otroški onkologiji. v: Novaković S (ur.), et al. Razvojni trendi v onkologiji - onkologija čez desetletje : izbrana poglavja in državni program obvladovanja raka 2017-2021: zbornik. Ljubljana: Kancerološko združenje slovenskega zdravniškega društva: Onkološki inštitut. 2016;95-111.
2. Silverman LB, Gelber RD, Dalton VK, Asselin BL, Barr RD, Clavell LA, et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. *Blood*. 2001; 97:1211-1218.
3. Müller HJ, Boos J. Use of L-asparaginase in childhood ALL. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1998; 28:97-113.
4. Kiriya Y, Kubota M, Takimoto T, Kitoh T, Tanizawa A, Akiyama Y, et al. Biochemical characterization of U937 cells resistant to L-asparaginase: the role of asparagine synthetase. *Leukemia*. 1989;3:294-297.
5. Rizzari C, Conter V, Starý J, Colombini A, Moericke A, Schrappe M. Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Curr Opin Oncol*. 2013;25(Suppl 1): S1-S9.
6. Boos J, Werber G, Ahlke E, Schulze-Westhoff P, Nowak-Göttl U, Würthwein G, et al. Monitoring of asparaginase activity and asparagine levels in children on different asparaginase preparations. *Eur J Cancer*. 1996;32(9):1544-1550.
7. Asselin B, Rizzari C. Asparaginase pharmacokinetics and implications of therapeutic drug monitoring. *Leuk Lymphoma*. 2015; 56(8):2273-2280.
8. Povzetek glavnih značilnosti zdravila (SmPC) za Spectrila 10.000 e., prašek za koncentrat za raztopino za infundiranje.
9. Burke MJ. How to manage asparaginase hypersensitivity in acute lymphoblastic leukemia. *Future Oncol*. 2014;10(16):2615-2627.
10. Salzer W, Bostrom B, Messinger Y, Perissinotti AJ, Marini B. Asparaginase activity levels and monitoring in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2018;59(8): 1797-1806.
11. Tong WH, Pieters R, Kaspers GJL, W M te Loo DM, Bierings MB, van den Bos C et al. A prospective study on drug monitoring of PEGasparaginase and Erwinia asparaginase and asparaginase antibodies in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2014;123(13):2026-2033.
12. Kurtzberg J, Asselin B, Bernstein M, Buchanan GR, Pollock BH, Camitta BM. Polyethylene glycol-conjugated L-asparaginase versus native L-asparaginase in combination with standard agents for children with acute lymphoblastic leukemia in second bone marrow relapse: a Children's Oncology Group Study (Pog 8866). *J Pediatr Hematol Oncol*. 2011;33(8): 610-616.
13. van der Sluis IM, Vrooman LM, Pieters R, Baruchel A, Escherich G, Goulden N, et al. Consensus expert recommendations for identification and management of asparaginase hypersensitivity and silent inactivation. *Haematologica*. 2016;101(3):279-285.
14. Asselin BL, Lorenson MY, Whitin JC, Coppola DJ, Kende AS, Blakley RL, et al. Measurement of serum L-asparagine in the presence of L-asparaginase requires the presence of an L-asparaginase inhibitor. *Cancer Res*. 1991;51(24):6568-6573.
15. Lanvers-Kaminsky C, Westhoff PS, D'Incalci M, Zucchetti M, Boos J. Immediate cooling does not prevent the ex vivo hydrolysis of Lasparagine by asparaginase. *Ther Drug Monit*. 2014;36(4):549-552.
16. Kloos RQ, Pieters R, Escherich G, van der Sluis IM. Allergic-like reactions to asparaginase: Atypical allergies without asparaginase inactivation. *Pediatr Blood Cancer*. 2016; 63(11):1928-34.
17. Magri A, Soler MF, Lopes AM, Cilli EM, Barber PS, Pessoa A, et al. A critical analysis of L-asparaginase activity quantification methods-colorimetric methods versus high-performance liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem*. 2018;410:6985-6990.
18. Lanvers C, Vieira Pinheiro JP, Hempel G, Wuerthwein G, Boos J. Analytical validation of a microplate reader-based method for the therapeutic drug monitoring of L-asparaginase in human serum. *Anal Biochem*. 2002; 309:117-126.
19. Protokol - interni vir:
20. Asparaginase assay manual; assay protocol for the measurement of asparaginase in children with acute lymphoblastic leukaemia. Erasmus MC University Medical Center Rotterdam, Paediatric Oncology Laboratory Rotterdam.
21. Frear DS, Burrell RC. Spectrophotometric method for determining hydroxylamine reductase activity in higher plants. *Anal Chem* 1955;27:1664-1665.
22. Kozjek E. Spremljanje stopnje aktivnosti asparaginaze pri bolnikih z akutno limfoblastno levkemijo. Magistrsko delo, Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo. 2019.
23. Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2. European Medicines Agency [Internet]. Dostopno: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf)

# Sprememba p.R577X gena *ACTN3* (rs1815739) je povezana s pojavnostjo poškodb slovenskih nogometašic

## *Variant p.R577X (rs1815739) in ACTN3 gene is associated with frequency of injuries in Slovenian female football players*

Inge Sotlar<sup>1</sup>, Tisa Podkrajšek<sup>1</sup>, Tina Levstek<sup>1</sup>, Katja Goričar<sup>1</sup>, Vita Dolžan<sup>1</sup>, Katarina Trebušak Podkrajšek<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko

<sup>2</sup> Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko

Avtor za korespondenco:

izr. prof. dr. Katarina Trebušak Podkrajšek, spec. med. biokem., spec. lab. med. gen.

Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana,

e-pošta: katarina.trebusakpodkrajsek@mf.uni-lj.si

## POVZETEK

Alfa-aktinin-3 je protein, ki se izraža v hitrih mišičnih vlaknih tipa II. Sprememba NM\_001104.4:c.1729C>T (p.R577X, rs1815739) gena *ACTN3* v homozigotni obliki zmanjšuje moč, mišično maso ter premer hitrih mišičnih vlaken. Pri športnikih je v homozigotni obliki lahko povezana z večjim tveganjem za poškodbe in daljšim okrevanjem po vadbi. Zato smo želeli oceniti vpliv p.R577X na poškodbe in igralni položaj slovenskih nogometašic. V študijo smo vključili 43 nogometašic, starih od 13 do 28 let (mediana = 16), ki so aktivno trenirale nogomet vsaj štiri leta. Genotipizacijo *ACTN3* p.R577X smo izvedli z metodo PCR in restriksijsko analizo z encimom *DdeI* na vzorcu DNA, izolirane iz sline. Sprememba p.R577X je bila v homozigotni in heterozigotni obliki prisotena pri 58,1 % igralk, 41,9 % jih je imelo genotip RR. V zadnjih štirih le-

tih je imelo vsaj eno športno poškodbo 53,7 % preiskovank. V raziskavi nismo dokazali statistično značilnih povezav med genotipi *ACTN3* p.R577X in pojavnostjo poškodb ( $p = 0,309$ ) ter med pojavnostjo poškodb in položajem igralke ( $p = 0,830$ ) oziroma selekcijo, ki ji igralka pripada ( $p = 0,427$ ). Potrdili pa smo povezavo med pojavnostjo poškodb in frekvencami posameznega alela ( $p = 0,037$ ), pri čemer je alel X povezan z večjo pojavnostjo poškodb.

**Ključne besede:** *ACTN3*, p.R577X, nogometašice, športne poškodbe

## ABSTRACT

Alpha-actinin-3 is a protein expressed in fast-twitch (type II) muscle fibres. *ACTN3* gene variant NM\_001104.4:c.1729C>T (p.R577X, rs1815739) in a homozygous state reduces strength, muscle mass, and fast-twitch fibre diameter and was associated with a higher risk of sports injuries and longer exercise recovery. We aimed to evaluate the association of the p.R577X with injuries and player position in Slovenian female football players. The study group included 43 participants, with a median age of 16 (13–28) years, who had been actively training football for at least 4 years. *ACTN3* p.R577X genotyping was performed with PCR and *DdeI* restriction analysis on saliva DNA. p.R577X in the homozygous or heterozygous state was present in 58.1 % of the players,

while 41.9 % had normal genotype. 53.7 % had a four years history of at least one sports injury. In our study, no statistically significant association was found between *ACTN3* p.R577X genotypes and the presence of injuries ( $p = 0.309$ ), nor between the presence of injuries and player position ( $p = 0.830$ ) or age dependant category team ( $p = 0.427$ ). However, we confirmed the association between the presence of injuries and the frequencies of each allele ( $p = 0.037$ ), with the X allele being associated with a higher incidence of injuries.

**Key words:** *ACTN3*, p.R577X, female football players, sports injuries

## UVOD

Genetsko testiranje omogoča opredelitev genetskih sprememb pri posamezniku, ki lahko vplivajo na razvoj bolezni ali na posameznikove lastnosti (1). V zadnjih 20 letih je bilo opravljenih precejšnje število raziskav, ki so preučevale vpliv genetske raznolikosti na področju vzdržljivosti v športu (2). Za genetsko testiranje na področju športa je veliko povpraševanje, saj je za starše in trenerje odločitev za usmeritev otrok v šport ali športno panogo, ki bi mu genetsko ustrezala, zelo privlačna (3).

Glavni izziv pri vprašanju, kako genetske spremembe vplivajo na športno vzdržljivost, je njihov vsestranski vpliv na delovanje organizma. Zaradi različnih sistemov (mišično-skeletni, kardiovaskularni, dihalni itd.), ki morajo v človeškem telesu delovati usklajeno, na vzdržljivost pri posameznem športu vplivajo številni dejavniki. Poleg različne telesne morfologije sta pri športnikih pomembna dejavnika vzdržljivosti predvsem aerobna vzdržljivost, ki omogoča dolgotrajne nizkointenzivne aktivnosti pri vzdržljivostnih športih (npr. tek, kolesarjenje), in mišična (fizična) moč, ki je ključna pri visokointenzivnih, eksplozivnih športih (npr. sprint, dvigovanje uteži). Pri nekaterih moštvenih športih, kot je npr. nogomet, pa sta za uspeh športnika pomembna tako moč in hitrost kot tudi vzdržljivost. Nogometno ekipo sestavlja enajst igralcev na različnih osnovnih igralnih položajih z različnimi igralnimi nalogami (vratarji, napadalci, branilci in vezisti). Pri tem določeni igralni položaji zahtevajo več mišične moči in hitrosti, drugi pa več

vzdržljivosti (4). Med dejavnike, ki vplivajo na uspešnost v športu, prištevamo tudi dovzetnost za poškodbe, zlasti poškodbe mišic (5, 6).

Eden najbolj raziskanih genov, povezanih z vzdržljivostjo, je gen *ACTN3*, ki ga imenujejo tudi »gen za hitrost«. Pri človeku vsebuje zapis za protein alfa-aktinin-3 (*ACTN3*) in se specifično izraža v hitrih mišičnih vlaknih tipa II. Protein *ACTN3* ima pomembno vlogo strukturne komponente Z-diska v sarkomerah (7). Pogosta sprememba gena *ACTN3* je p.R577X (rs1815739), ki povzroči spremembo kodona za arginin (R) v terminacijski kodon (X). V splošni svetovni populaciji je delež homozigotnih nosilcev 17,5 %, delež heterozigotnih nosilcev 48,7 % in delež oseb brez spremembe 33,8 % (8). Posledica prisotnosti te spremembe pri homozigotnih nosilcih z genotipom XX je odsotnost proteina *ACTN3* (9), kar vodi v nižji delež in manjši premer hitrih mišičnih vlaken (10). Tako naj bi imeli športniki z genotipom XX večjo mišično vzdržljivost, medtem ko naj bi imeli športniki z normalnim genotipom RR večjo mišično moč (11). Raziskave obenem kažejo, da ima sprememba p.R577X tudi vpliv na hitrost okrevanja po športni aktivnosti in na tveganje za športne poškodbe (2).

Namen naše raziskave je bil oceniti povezavo spremembe p.R577X v genu *ACTN3* s pogostostjo športnih poškodb pri mlajših slovenskih nogometašicah ter tudi igralnim položajem posamezne igralke in selekcijo, ki ji pripada. »

## MATERIALI IN METODE

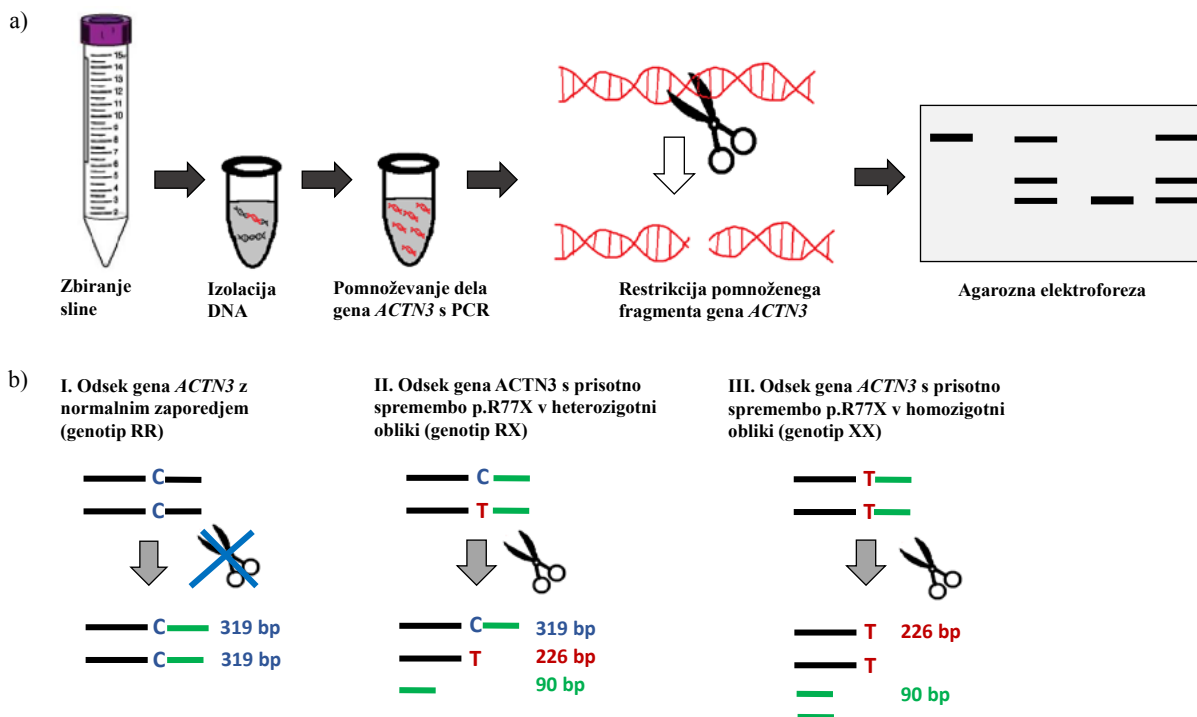
V raziskavo smo vključili nogometašice iz različnih slovenskih nogometnih klubov. K sodelovanju smo povabili nogometašice, ki so bile stare več kot 13 let in so aktivno trenirale nogomet vsaj štiri leta. Vsaka udeleženka raziskave, oziroma njen starš ali skrbnik v primeru mladoletnosti, je podala pisno soglasje za vključitev v raziskavo in izpolnila anketo o svojih osebnih podatkih, podatkih o aktivnem treniranju nogometa, igralnem položaju in številu ter tipu športnih poškodb. Raziskava je bila opravljena v skladu z načeli Helsinško-Tokijske deklaracije, protokol raziskave je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko (št. 0120-428/2020/6).

Okvirni postopek analize za opredelitev spremembe p.R577X gena *ACTN3* je prikazan na Sliki 1a. Zbrani slini (1–2 mL) smo za stabilizacijo dodali reagent DNA/RNA Shield (Zymo Research, ZDA) in jo do izolacije genomske DNA (gDNA) hranili na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Za izolacijo smo uporabili reagenčni komplet Quick DNA Miniprep Plus Kit (Zymo Research, ZDA) po navodilih proizvajalca. Koncentracijo in čistost izolirane gDNA smo določili spektrofotometrično z aparatom NanoDrop One (Thermo Scientific, ZDA).

Pomnoževanje 319 bp velikega odseka gena *ACTN3* smo izvedli z verižno reakcijo s polimerazo (*angl.* polymerase

chain reaction, PCR), z uporabo smernega začetnega oligonukleotida 5'-ATAGGGATGGGAGGAAAACC-3' in protismernega začetnega oligonukleotida 5'-ATGTAGG-GATTGGTGAGCA-3'. Reakcijska mešanica za PCR je vsebovala 50–200 ng gDNA, 0,05 pM vsakega začetnega oligonukleotida in 25  $\mu\text{L}$  reakcijskega pufra Platinum™ HotStart PCR Master Mix (Invitrogen, ZDA) v končnem volumnu 50  $\mu\text{L}$ . Ciklično pomnoževanje s 35 cikli smo izvedli na GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, ZDA) z naslednjimi koraki: denaturacija DNA pri  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ , prileganje začetnih oligonukleotidov pri  $59\text{ }^{\circ}\text{C}$  in podaljševanje pri  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  (vsak po 30 s).

Prisotnost spremembe p.R577X gena *ACTN3* smo opredelili z restrikcijsko analizo glede na prisotnost (alel p.R577X) ali odsotnost (alel p.R577R) restrikcijskega mesta encima *DdeI* (NEB, Velika Britanija). Nastale fragmente, ki so shematsko prikazani na Sliki 1b, smo ločili na 2-odstotnem (m/V) agaroznem gelu v pufru TBE. V primeru nejasnih rezultatov restrikcije (pri 28 od 43 vzorcev) smo nukleotidna zaporedja restrikcijskih fragmentov dodatno preverili s sekvenciranjem po Sangerju. Pri tem smo uporabili sekvenčne reagente BigDye Terminator v3.1 in sekvenator ABI Genetic Analyser 3500 (oba Applied Biosystems, ZDA).



**Slika 1:** a) Shema postopka za opredelitev spremembe p.R577X gena *ACTN3* (rs1815739) in b) shema restrikcije pomnoženega odseka gena *ACTN3* z encimom *DdeI*, če je sprememba p.R577X prisotna ali odsotna.

**Figure 1:** a) Schematic presentation of the procedure for determining *ACTN3* p.R577X (rs1815739) variant and b) schematic presentation of cleavage of the *ACTN3* amplicon with the enzyme *DdeI* when p.R577X is present/absent.

Statistična analiza je bila opravljena s programom GraphPad Prism verzija 9.1.0 (San Diego, Kalifornija, ZDA). Igralke smo razdelili v dve skupini glede na prisotnost spremembe p.R577X gena *ACTN3* in primerjali nosilke vsaj enega polimorfnege alela z nosilkami dveh normalnih alelov. Kategorične spremenljivke smo podali s številom in relativno frekvenco, numerične pa z mediano in razponom. Za primerjavo porazdelitve števila po-

škodb glede na genotip smo uporabili Mann-Whitneyjev test. Za ugotavljanje povezanosti med kategoričnimi spremenljivkami smo uporabili hi-kvadrat test. Razmerje obov (OR) in 95-odstotni interval zaupanja (95 % CI) za OR smo izračunali s pomočjo programa MedCalc (dosegljiv na: [https://www.medcalc.org/calc/odds\\_ratio.php](https://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php)), ki temelji na Altmanovi metodi. Pri vseh testih smo upoštevali stopnjo značilnosti  $\alpha = 0,05$ .

## REZULTATI

V raziskavo smo vključili 43 slovenskih nogometašic, ki so bile stare od 13 do 28 let (mediana = 16) in so trenirale nogomet vsaj štiri leta. V članski ekipi je igralo 19 nogometašic, ostale pa so igrale v selekcijah U-17 ( $n = 10$ ) in U-15 ( $n = 14$ ). Frekvenca genotipa RR in genotipa XX je bila

pri naši populaciji nogometašic za približno 8 % večja, kot bi pričakovali glede na frekvenco alelov R in X, frekvenca genotipa RX pa je bila za približno 16 % nižja (Tabela 1). Kljub temu je število posameznih genotipov še vedno v Hardy-Weinbergovem ravnotežju ( $p = 0,278$ ). »

**Tabela 1:** Opazovana in pričakovana frekvenca ter število genotipov spremembe p.R577X gena *ACTN3* glede na Hardy-Weinbergovo ravnotežje pri slovenskih nogometašicah ( $n = 43$ ).

**Table 1:** Observed and expected p.R577X *ACTN3* genotype frequencies and numbers according to the Hardy-Weinberg equilibrium in Slovenian female football players ( $n = 43$ ).

Genotip	Opazovana frekvenca (%)	Pričakovana frekvenca (%)	Opazovano število (n)	Pričakovano število (n)	Vrednost p
RR	41,9	33,8	18	15	0,278
RX	32,5	48,7	14	21	
XX	25,6	17,5	11	7	

Pojav vsaj ene poškodbe v preteklih štirih letih je navedlo 22 (53,7 %) preiskovank, od tega zvine, zlome, poškodbe mišic in ostale poškodbe. Od dveh nogometašic podatkov o poškodbah nismo dobili. Povprečno število poškodb v štiriletnem obdobju v celotni skupini je bilo 1,4 (mediana = 1), v skupini nogometašic, ki so imele poškodbo, pa 2,6 (mediana = 2). Največje število poškodb je bilo 9. Najpogostejše so bile poškodbe mišic. Med nogometašicami s

prisotno spremembo p.R577X jih je 60,0 % že utrpelo poškodbo, pri nogometašicah z genotipom RR pa je bilo že poškodovanih 43,4 %. Med posameznimi genotipi *ACTN3* ni bilo statistično značilnih razlik v pojavnosti ( $p = 0,309$ ) ali številu poškodb ( $p = 0,283$ ). Analiza frekvence alelov v povezavi s poškodbami pa je pokazala, da je alel X povezan z večjo pojavnostjo poškodb v primerjavi z alelom R ( $p = 0,037$ ) (Tabela 2).

**Tabela 2:** Pojavnost poškodb pri slovenskih nogometašicah ( $n = 41$ ) glede na genotip spremembe p.R577X gena *ACTN3* in frekvenco alelov R in X. Relativni delež pojavnosti poškodb je izračunan glede na število poškodb.

**Table 2:** Frequency of injuries in Slovenian female football players ( $n = 41$ ) according to *ACTN3* p.R577X genotype and allele frequencies. The relative frequency was calculated according to the number of injuries.

Prisotnost poškodb (n)	Frekvenca genotipa n (%)		OR (95 % CI)	Vrednost p	Frekvenca alela n (%)		Vrednost p
	RR	RX in XX			R	X	
Ne (19)	9 (47,4)	10 (52,6)	1,93 (0,55–6,88)	0,309	26 (68,4)	12 (31,6)	0,037
Da (22)	7 (31,8)	15 (68,2)			20 (45,5)	24 (54,5)	
SKUPAJ	16 (39,0)	25 (61,0)			46 (56,1)	36 (43,9)	

Nadalje smo želeli preveriti, ali je analizirana sprememba v genu *ACTN3* povezana z igralnim položajem nogometašic, ki smo jih razvrstili v dve skupini. V prvo skupino smo razvrstili položaje, pri katerih sta najpomembnejši moč in hitrost (bočne branilke, krilne in osrednje napadalke), v drugo pa tiste, pri katerih je v večji meri pomembna vzdržljivost (osrednje branilke in vezne igralke). Vratark in igralck, ki so igrale na več različnih položajih, v anali-

zo nismo vključili. Med genotipom in igralnim položajem nismo ugotovili statistično značilne povezave ( $p = 0,830$ ). Povezava tudi ni bila značilna pri upoštevanju frekvence posameznega alela ( $p = 0,866$ ). Podatki so prikazani v Tabeli 3. Statistična analiza tudi ni pokazala povezave med igralnim položajem in pojavnostjo poškodb ( $p = 0,598$ ).

**Tabela 3:** Igralni položaj slovenskih nogometašic ( $n = 35$ ) glede na genotip spremembe p.R577X gena ACTN3 in frekvenco alelov R in X. Relativni delež je izračunan glede na število igralcev v posamezni skupini. Skupina 1: bočne branilke, krilne in osrednje napadalke, skupina 2: osrednje branilke in vezne igralke. Vratarke in igralke, ki igrajo na različnih položajih, niso bile vključene. Izračun razmerja obetov je bil narejen za skupino 1 v primerjavi s skupino 2.

**Table 3:** Playing positions of Slovenian female football players ( $n = 35$ ) according to the ACTN3 p.R577X genotype and allele frequencies. The relative frequency was calculated according to the number of players in each group. Group 1: side defenders, wingers and center forwards; group 2: central defenders and midfielders. Goalkeepers and players, without constant playing position were not included in the analysis.

Igralni položaj (n)	Frekvencija genotipa n (%)		OR (95 % CI)	Vrednost p	Frekvencija alela n (%)		Vrednost p
	RR	RX in XX			R	X	
Skupina 1 (19)	9 (47,4)	10 (52,6)	0,86 (0,23–3,29)	0,830	23 (60,5)	15 (39,5)	0,866
Skupina 2 (16)	7 (43,8)	9 (56,2)			20 (62,5)	12 (37,5)	
SKUPAJ	16 (45,7)	19 (54,3)			43 (61,4)	27 (38,6)	

V Tabeli 4 so prikazane frekvence genotipov in alelov glede na selekcijo, v kateri so nogometašice igralce ob vključitvi v študijo. Najvišji delež genotipa RR smo opazili pri članicah (52,6 %). Pojavnost genotipa XX je bila najnižja

v selekciji U-17 (10 %). Frekvence genotipov se med selekcijami niso statistično značilno razlikovale ( $p = 0,427$ ), prav tako ni bilo razlik v frekvenci alelov ( $p = 0,836$ ).

**Tabela 4:** Primerjava selekcij glede na genotip spremembe p.R577X gena ACTN3 in frekvenco alelov R in X ( $n = 43$ ). Relativni delež je izračunan glede na število igralcev v posamezni selekciji.

**Table 4:** Genotype and allele frequencies ACTN3 p.R577X in age-dependent category teams of Slovenian female football players ( $n = 43$ ). The relative frequency was calculated according to the number in each team.

Selekcija (n)	Frekvencija genotipa n (%)		OR (95 % CI)	Vrednost p	Frekvencija alela n (%)		Vrednost p
	RR	RX in XX			R	X	
U-15 (14)	5 (35,7)	9 (64,3)	2,00 (0,49–8,24)	0,427	15 (53,6)	13 (46,4)	0,836
U-17 (10)	3 (30,0)	7 (70,0)	2,59 (0,51–13,2)		12 (60,0)	8 (40,0)	
Članice (19)	10 (52,6)	9 (47,4)	referenčna skupina		23 (60,5)	15 (39,5)	
SKUPAJ	18 (41,9)	25 (58,1)			50 (58,1)	36 (41,9)	

»



## RAZPRAVA

*ACTN3* je prvi gen, za katerega je bila dokazana povezava med genotipom in športno zmogljivostjo (2). V preteklosti so spremembo p.R577X gena *ACTN3* povezovali predvsem z mišično močjo (12) in statusom vrhunskih športnikov pri visokointenzivnih športih (13). Danes pa jo povezujejo tudi z dovzetnostjo za pojav športnih poškodb in sposobnostjo regeneracije po športni aktivnosti (14, 15). Namen raziskave je bil pri slovenskih nogometašicah analizirati pojavnost genotipa spremembe p.R577X gena *ACTN3* ter frekvenc posameznih alelov v povezavi s pojavnostjo športnih poškodb, igralnim položajem in selekcijo nogometašice. Gre za prvo raziskavo, ki ugotavlja pomen genetskih dejavnikov pri slovenskih nogometašicah, pri kateri smo ugotovili, da sprememba p.R577X gena *ACTN3* vpliva na pojavnost poškodb.

Genetska raznolikost profesionalnih nogometašev je odvisna od populacije, ki ji pripadajo (16, 17). V populaciji afriškega porekla je namreč ne glede na športni status frekvenca genotipa RR (~78 %) višja in genotipa XX (~1 %) značilno nižja (18, 19) v primerjavi z ocenjeno frekvenco pri svetovni populaciji (RR ~40 %, XX ~18 %) (8). Tudi naši rezultati se kar dobro ujemajo z ocenjeno frekvenco genotipov pri svetovni populaciji, zanimivo pa je genotip XX v naši populaciji nogometašic celo malo bolj pogost (~8 %). V raziskavi je bil torej najpogostejši genotip RR, kar je v skladu s še nekaterimi drugimi raziskavami (16, 20, 21). Nekatere izmed njih prav tako niso vključevale samo profesionalnih nogometašev. Pri majhni raziskavi na 27 srbskih nogometašicah, starih od 16 do 18 let, je bil s 57 % prevladujoč genotip RX (21). Tudi v številnih drugih raziskavah, ki so vključevale profesionalne nogometaše, so poročali, da je najpogostejši genotip RX (17, 23–25). Namreč, nogomet je zelo kompleksen šport, ki poleg vzdržljivostne komponente vključuje tudi ponavljajoče visokointenzivne napore (26). Ker se mišična sestava in s tem zmogljivost med različnimi genotipi razlikuje, je pričakovano, da bi se na to situacijo najbolj prilagodili posamezniki z genotipom RX (25). Ugotovili so, da genotip RX deluje zaščitno pri poškodbi mehkih tkiv, medtem ko so pri posameznikih z genotipom XX poškodbe pogostejše (23). Teoretično lastnosti posameznikov z genotipom XX manj ustrezajo fizičnim zahtevam pri igri nogometa prav zaradi eksplozivnih mišičnih naporov (11, 14, 27).

Čeprav je bilo v naši raziskavi največ poškodb pri nogometašicah z genotipom XX, statistična analiza ni pokazala značilnih povezav med genotipi p.R577X gena *ACTN3* in pojavnostjo poškodb, kar bi bila lahko posledica tega, da smo zaradi majhnega števila analizo naredili glede na prisotnost oz. odsotnost spremembe. Kljub temu pa smo dokazali statistično značilno večjo pojavnost poškodb pri nogometašicah z alelom X. V prihodnosti bi bilo zato smiselno nadgraditi raziskavo z analizo večjega števila preiskovank, s katero bi lahko preučevali vpliv vsakega od treh genotipov. Genotip RR je bil najpogostejši pri članicah, prav tako je bil ta genotip pri članicah najbolj zastopan v primerjavi z genotipoma RX in XX. To bi lahko nakazovalo na to, da nogometašice, ki imajo alel X, zaradi pogostejših poškodb prej opustijo treniranje nogometa. Do takšne ugotovitve je prišla tudi raziskava na populaciji brazilskih nogometašev (17). Pokazali so namreč, da je frekvenca genotipa RX pri profesionalnih nogometaših v primerjavi s selekcijo U-14 višja, medtem ko je bil genotip XX manj pogost pri profesionalnih igralcih v primerjavi s selekcijo U-20 oziroma U-15 (17). Sprememba p.R577X gena *ACTN3* je bila pri nogometaših povezana tako s pogostostjo kot tudi resnostjo poškodb (15).

Pogostost posameznih alelov *ACTN3* se razlikuje med različnimi športi. Alel p.R577R je pogostejši pri posameznikih, ki se ukvarjajo z eksplozivnimi športi (11, 14), medtem ko je pri posameznikih, ki se ukvarjajo z vzdržljivostnimi športi, pogostejši alel p.R577X (11, 14). Metaanaliza 23 raziskav, ki so vključevale tako vzdržljivostne športnike kot tudi športnike, ki se ukvarjajo z eksplozivnimi športi, je pokazala, da je alel p.R577R pogostejši pri slednjih (28). Do enakih zaključkov je prišla tudi metaanaliza raziskav, ki so preučevale le posameznike v eksplozivnih športih (29). Pri nogometu je zaradi različnih igralnih položajev, ki zahtevajo različne sposobnosti igralcev, smiselno pričakovati genetske razlike glede na igralni položaj. Šele pred kratkim je bila izvedena prva taka raziskava, pri kateri so na manjši skupini profesionalnih španskih nogometašev dokazali razliko v porazdelitvi alelov glede na igralni položaj, medtem ko razlika ni bila značilna pri porazdelitvi genotipov (25). V naši raziskavi statistično pomembne povezave nismo dokazali niti pri porazdelitvi genotipov niti porazdelitvi alelov. To je na nek način tudi pričakovano, saj smo v raziskavo vključili tudi nogometašice, ki igrajo v mlajših selekcijah, pri katerih prihaja tudi še do menjav igralnega položaja, da se ugotovi, kje ima igralka največji potencial.

Vloga genetskega testiranja v športu trenutno še nima jasnega mesta, predvsem zaradi etičnih pomislekov in nezadostnega poznavanja dejavnikov, ki vplivajo na športni uspeh (30). Trenutno genetski testi otrok in mladostnikov z namenom iskanja talentov in individualizacijo treninga niso priporočljivi (31, 32). Zaradi dostopnosti komercialnih genetskih testov neposredno naročnikom (*angl.* Direct to Consumer genetic testing) se ti v praksi pri odraslih pogosto uporabljajo. Dejstvo pa je, da bi bilo prav prepoznavanje nagnjenosti za športne poškodbe v prihodnosti morda smiselno, saj bi omogočilo njihovo aktivnejše preprečevanje. Vsekakor pa bi bilo za zanesljivejšo napoved treba v analizo vključiti večje število genetskih dejavnikov.

## ZAKLJUČEK

Genetska različnost pomembno vpliva na posameznikovo uspešnost pri športu. V zadnjih desetih letih so raziskave, ki preučujejo genetsko raznolikost pri igralcih nogometa, doživele pravi razcvet (2). Vsekakor pa na uspešnost v posameznem športu, vzdržljivost in pogostost poškodb vplivajo tudi negenetski dejavniki, zato je pomembno, da raziskave vključujejo tudi te. Najpogosteje raziskovani gen pri nogometaših v povezavi s športno uspešnostjo je *ACTN3* (2). V naši raziskavi smo ugotovili povezavo med porazdelitvijo alelov in pojavnostjo poškodb pri mladih slovenskih nogometašicah, s čimer smo potrdili predhodne

Največja omejitev naše raziskave je bila majhno število vključenih nogometašic, zato bodo v prihodnosti potrebne dodatne raziskave za potrditev rezultatov na večji skupini. Poleg tega zaradi mladosti nogometašic sam vpliv spremembe najverjetneje še ni prišel popolnoma do izraza, predvsem glede na igralni položaj. Zanimivo bi bilo ugotoviti tudi delež te spremembe pri profesionalnih igralcih nogometa in njeno povezavo s pojavnostjo poškodb ter igralnim položajem in tudi preučiti morebitne razlike med nogometaši in nogometašicami.

Ugotovitev, da je sprememba p.R557X povezana z večjo pojavnostjo poškodb. Povezave med igralnim položajem in pojavnostjo spremembe nismo potrdili, kar je nekako pričakovano, saj so nekatere vključene nogometašice šele na začetku kariere. Z intenzivnim raziskovanjem na področju športne genetike lahko v prihodnosti, kljub etičnim pomislekom, pričakujemo porast genetskega testiranja z namenom ugotavljanja predispozicij in sposobnosti posameznika ter seveda nagnjenosti k športnim poškodbam in njihovemu aktivnemu preprečevanju.

## FINANCIRANJE

Raziskava je potekala v sklopu raziskovalnega programa P1-0170, ki ga financira Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije.

## LITERATURA

1. Slavec L, Geršak K, Karas Kuželički N, Trebušak Podkrajšek K. Human Genetic Variants and Their Analysis: Current State and Future Perspectives. *Slovenska pediatrija*. 2020;27(4):163–71.
2. McAuley ABT, Hughes DC, Tsaprouni LG, Varley I, Suraci B, Roos TR, et al. Genetic association research in football: A systematic review. *Eur J Sport Sci*. 2020;1–39.
3. Lippi G, Longo UG, Maffulli N. Genetics and sports. *Br Med Bull*. 2010;93(1):27–47.
4. Schwesig R, Schulze S, Reinhardt L, Laudner KG, Delank K-S, Hermassi S. Differences in Player Position Running Velocity at Lactate Thresholds Among Male Professional German Soccer Players. *Front Physiol*. 2019;10:886. >>

5. Bouchard C. Genomic predictors of trainability. *Exp Physiol*. 2012;97(3):347–52.
6. Guth LM, Roth SM. Genetic influence on athletic performance. *Curr Opin Pediatr*. 2013;25(6):653–8.
7. Seto JT, Lek M, Quinlan KGR, Houweling PJ, Zheng XF, Garton F, et al. Deficiency of  $\alpha$ -actinin-3 is associated with increased susceptibility to contraction-induced damage and skeletal muscle remodeling. *Hum Mol Genet*. 2011;20(15):2914–27.
8. Auton A, Abecasis GR, Altshuler DM, Durbin RM, Abecasis GR, Bentley DR, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526(7571):68–74.
9. North K. Why is alpha-actinin-3 deficiency so common in the general population? The evolution of athletic performance. *Twin Res Hum Genet*. 2008;11(4):384–94.
10. Vincent B, De Bock K, Ramaekers M, Van den Eede E, Van Leemputte M, Hespel P, et al. ACTN3 (R577X) genotype is associated with fiber type distribution. *Physiol Genomics*. 2007;32(1):58–63.
11. Yang N, MacArthur DG, Gulbin JP, Hahn AG, Beggs AH, Eastel S, et al. ACTN3 genotype is associated with human elite athletic performance. *Am J Hum Genet*. 2003;73(3):627–31.
12. Kikuchi N, Nakazato K, Min S, Ueda D, Igawa S. The ACTN3 R577X polymorphism is associated with muscle power in male Japanese athletes. *J Strength Cond Res*. 2014;28(7):1783–9.
13. Alfred T, Ben-Shlomo Y, Cooper R, Hardy R, Cooper C, Deary IJ, et al. ACTN3 genotype, athletic status, and life course physical capability: meta-analysis of the published literature and findings from nine studies. *Hum Mutat*. 2011;32(9):1008–18.
14. Pimenta EM, Coelho DB, Veneroso CE, Barros Coelho EJ, Cruz IR, Morandi RF, et al. Effect of ACTN3 gene on strength and endurance in soccer players. *J Strength Cond Res*. 2013;27(12):3286–92.
15. Massidda M, Voisin S, Culigioni C, Piras F, Cugia P, Yan X, et al. ACTN3 R577X Polymorphism Is Associated With the Incidence and Severity of Injuries in Professional Football Players. *Clin J Sport Med*. 2019;29(1):57–61.
16. Egorova ES, Borisova AV, Mustafina LJ, Arkhipova AA, Gabbasov RT, Druzhevskaya AM, et al. The polygenic profile of Russian football players. *J Sports Sci*. 2014;32(13):1286–93.
17. Coelho D, Pimenta E, Rosse I, de Castro B, Becker L, de Oliveira E, et al. Evidence for a Role of ACTN3 R577X Polymorphism in Football Player's Career Progression. *Int J Sports Med*. 2018;39(14):1088–93.
18. Yang N, MacArthur DG, Wolde B, Onyewera VO, Boit MK, Lau SYM-A, et al. The ACTN3 R577X polymorphism in East and West African athletes. *Med Sci Sports Exerc*. 2007;39(11):1985–8.
19. Scott RA, Irving R, Irwin L, Morrison E, Charlton V, Austin K, et al. ACTN3 and ACE Genotypes in Elite Jamaican and US Sprinters. *Med Sci Sports Exerc*. 2010;42(1):107–112.
20. Galeandro V, Notarnicola A, Bianco A, Tafuri S, Russo L, Pesce V, et al. ACTN3/ACE genotypes and mitochondrial genome in professional soccer players performance. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2017;31(1):207–13.
21. Pimenta EM, Coelho DB, Cruz IR, Morandi RF, Veneroso CE, de Azambuja Pussieldi G, et al. The ACTN3 genotype in soccer players in response to acute eccentric training. *Eur J Appl Physiol*. 2012;112(4):1495–503.
22. Jeremic D, Macuzic IZ, Vulovic M, Stevanovic J, Radovanovic D, Varjacic V, et al. ACE/ACTN3 Genetic Polymorphisms and Athletic Performance of Female Soccer Players. *Rev Bras Med Esporte*. 2019;25(1):35–9.
23. Clos E, Pruna R, Lundblad M, Artells R, Esquirol Caussa J. ACTN3 single nucleotide polymorphism is associated with non-contact musculoskeletal soft-tissue injury incidence in elite professional football players. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2019;27(12):4055–61.
24. Jacob Y, Anderton RS, Cochrane Wilkie JL, Rogalski B, Laws SM, Jones A, et al. Association of Genetic Variances in ADRB1 and PPARGC1a with Two-Kilometre Running Time-Trial Performance in Australian Football League Players: A Preliminary Study. *Sports*. 2021;9(2):22.
25. Clos E, Pruna R, Lundblad M, Artells R, Maffulli N. ACTN3's R577X Single Nucleotide Polymorphism Allele Distribution Differs Significantly in Professional Football Players according to Their Field Position. *Med Princ Pract*. 2021;30(1):92–7.
26. Taylor JB, Wright AA, Dischiavi SL, Townsend MA, Marmon AR. Activity Demands During Multi-Directional Team Sports: A Systematic Review. *Sports Med*. 2017;47(12):2533–51.
27. Weyerstraß J, Stewart K, Wesseliuss A, Zeegers M. Nine genetic polymorphisms associated with power athlete status - A Meta-Analysis. *J Sci Med Sport*. 2018;21(2):213–20.
28. Ma F, Yang Y, Li X, Zhou F, Gao C, Li M, et al. The association of sport performance with ACE and ACTN3 genetic polymorphisms: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2013;8(1):e54685.
29. Tharabenjasin P, Pabalan N, Jarjanazi H. Association of the ACTN3 R577X (rs1815739) polymorphism with elite power sports: A meta-analysis. *PLoS One*. 2019;14(5):e0217390.
30. Pickering C, Kiely J, Grgic J, Lucia A, Del Coso J. Can Genetic Testing Identify Talent for Sport? *Genes (Basel)*. 2019;10(12):972.
31. Vlahovich N, Fricker PA, Brown MA, Hughes D. Ethics of genetic testing and research in sport: a position statement from the Australian Institute of Sport. *Br J Sports Med*. 2017;51(1):5–11.
32. Webborn N, Williams A, McNamee M, Bouchard C, Pitsiladis Y, Ahmetov I, et al. Direct-to-consumer genetic testing for predicting sports performance and talent identification: Consensus statement. *Br J Sports Med*. 2015;49(23):1486–91.





**04**

Povzetki  
predavanj  
na strokovnih  
srečanjih  
SZKKLM

# Priporočila za izvajanje mikrobioloških testov na SARS-CoV-2 v UKCL

**Darko Černe**

Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo

Za namen ustreznega zagotavljanje mikrobioloških preiskav na SARS-CoV-2 smo v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana (UKCL) vpeljali naslednje mikrobiološke preiskave:

- analiza antigena z instrumentalnim odčitavanjem rezultata analize (reagenčni komplet Sofia SARS Antigen FIA, proizvajalec Quidel);
- analiza RNA z metodo PCR (reagenčni komplet QiaPrep&Amp ViralRNA UM Kit in SARS-CoV-2 N1+N2 AssaY Kit, proizvajalec Qiagen);
- analiza antigena z vizualnim odčitavanjem rezultata analize (reagenčni komplet COVID-19 Antigen Rapid Test Kit (Colloidal Gold), proizvajalec Chongqing Novegent Biotech Co); in
- analiza protiteles proti SARS-CoV (kvalitativno, sedaj tudi kvantitativno; reagenčni komplet Anti-SARS-CoV-2 Cobas, proizvajalec Roche).

Zlati standard za diagnozo okužbe s SARS-CoV-2 je analiza virusne RNA, ki jo uporabljamo tudi za razrešitev nejasnih primerov. Analiza virusnih antigenov je manj specifična in občutljiva od analize RNA, vendar hitrejša, cenejša in tehnično enostavnejša, še posebej v izvedbi laboratorijskega testa ob pacientu (POCT). Najprimernejša je preudarna kombinacija vseh današnjih možnosti, tako diagnostičnih (analiza RNA, analiza antigena) kot analitskih (sistemi za organizirane laboratorijske službe, sistemi POCT), ki je edina zmožna zadostiti enormne potrebe po diagnostiki okužb s SARS-CoV-2 med bolniki, pacienti in zdravstvenim osebjem.

Pri oblikovanju priporočila za izvajanje mikrobioloških preiskav je smiselno najprej opredeliti situacije z indikacijo izvajanja mikrobioloških testov. V UKCL smo opredelili naslednje situacije z indikacijo izvajanja mikrobioloških testov in se odločili za uporabo naslednjih diagnostičnih pristopov.

Situacije povezane s sprejemi bolnikov:

- sprejemi bolnikov (urgentni, elektivni) in triaža: analiza antigena z instrumentalnim odčitavanjem rezultata analize;
- sprejemi, kjer rezultat testa z instrumentalnim odčitavanjem ni skladen epidemiološko anamnezo in/ali klinično sliko (pozitiven test pri odsotni simptomatiki in negativni epidemiološki anamnezi oziroma negativen test pri prisotni simptomatiki in pozitivni epidemiološki anamnezi): analiza RNA s PCR;
- sprejemi bolnikov s pozno diagnostiko okužbe (>7 dni od pojava simptomov): analiza RNA s PCR oz. analiza biološkega vzorca spodnjih dihal;
- sprejemi pediatrične populacije (ne oziraje se na klinično sliko in epidemiološko anamnezo): analiza antigena z instrumentalnim odčitavanjem rezultata analize ali analiza RNA s PCR;

Ostale situacije, ki prav tako zahtevajo mikrobiološke preiskave so še:

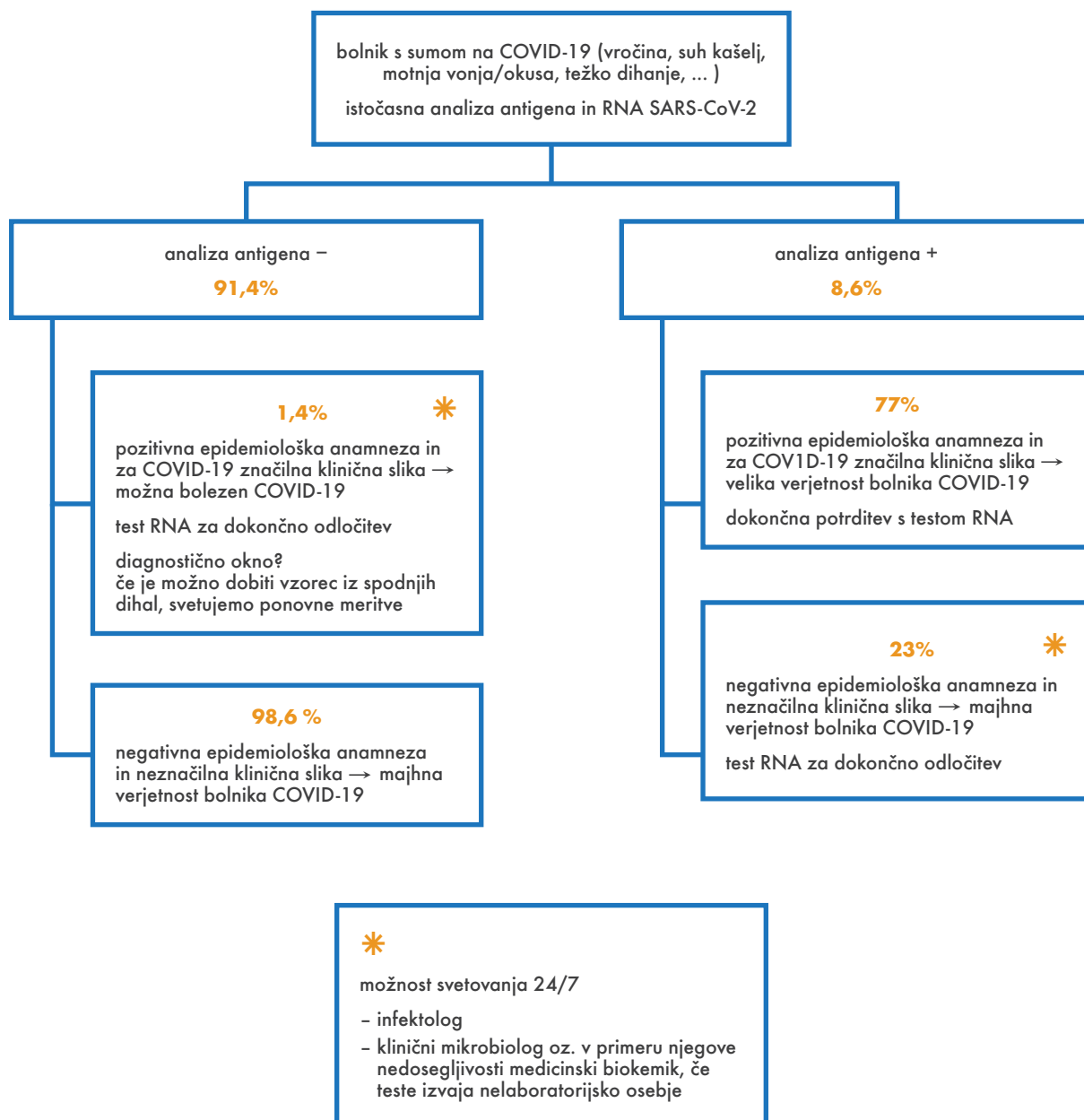
- spremljanje zdravstvenega stanja zaposlenih: analiza antigena z vizualnim odčitavanjem rezultata analize ali analiza antigena z instrumentalnim odčitavanjem rezultata analize ali analiza RNA s PCR;
- spremljanje zdravstvenega stanja hospitaliziranih bolnikov v belih conah: analiza RNA s PCR ; in
- odločanje o dolžini karantene pri kritično bolnih in hudo imunsko kompromitiranih bolnikih COVID: analiza RNA s PCR.

Za reševanje problematike urgentnih sprejemov in triaže bolnikov smo se odločili za uporabo hitrega antigenskega testa z instrumentalnim odčitavanjem rezultata analize (reagenčni komplet Sofia SARS Antigen FIA, proizvajalec Quidel). Z verifikacijo sistema v okolju urgentnih sprejemov in triaže bolnikov smo pridobili izkušnje o analitski



in diagnostični zmogljivosti sistema, analizirali smo vzroke za neujemanje rezultatov analize z rezultati analize RNA s PCR in pripravili algoritem uporabe testa (klinično pot obravnave bolnika). Pri pripravi algoritma smo izhajali iz dobre lastnosti testa (negativna napovedna vrednost testa je 98,6 %) in poskušali čim bolj zmanjšati pomanjkljivosti

testa (diagnostična občutljivost testa je 83,3 % in pozitivna napovedna vrednost je 76,9 %) in sicer z uporabo kliničnih in epidemioloških anamnestičnih meril. Klinično pot obravnave bolnika v primeru urgentnih sprejemov in triaže z uporabo hitrega antigeneskega testa z instrumentalnim odčitavanjem rezultata analize prikazuje Slika 1.

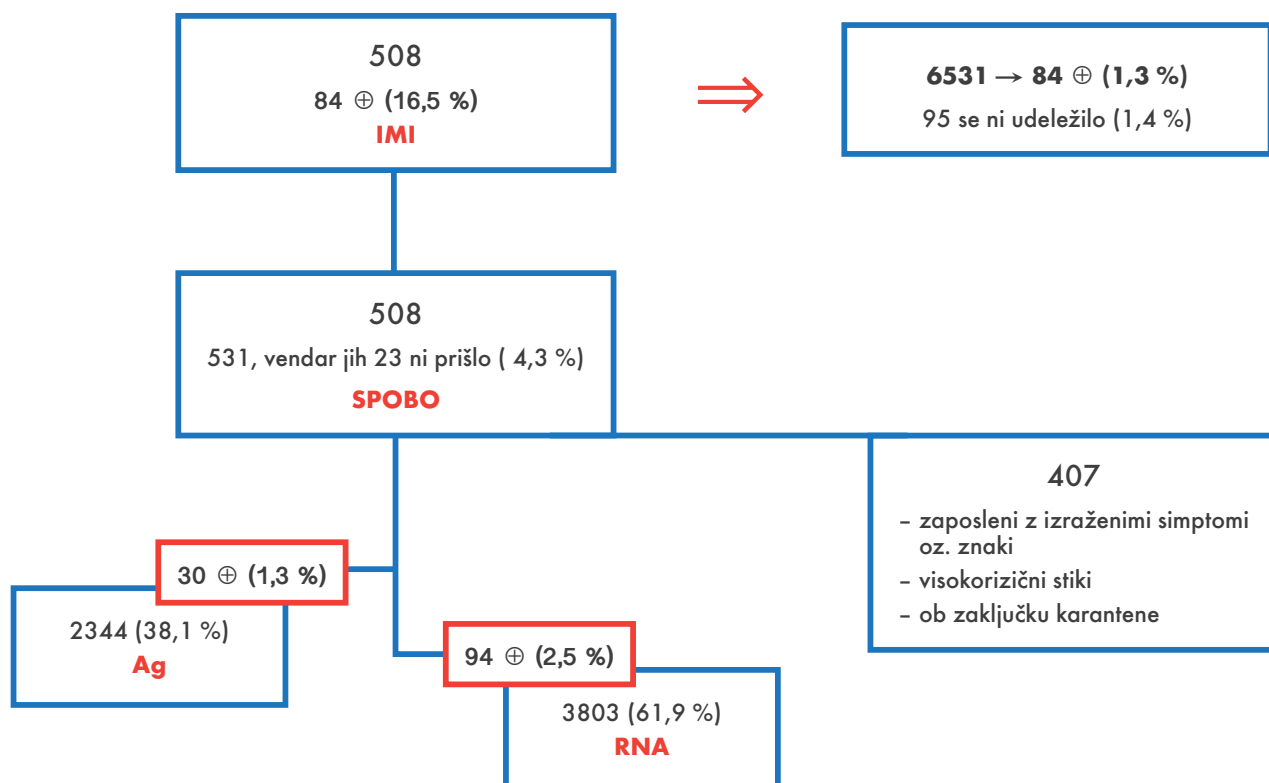


Slika 1. Klinično pot obravnave bolnika v primeru urgentnih sprejemov in triaže z uporabo hitrega antigeneskega testa z instrumentalnim odčitavanjem rezultata analize (reagenčni komplet Sofia SARS Antigen FIA, proizvajalec Quidel).

»

Za izvajanje spremljanja zdravstvenega stanja zaposlenih v UKCL (monitoriranje COVID zaposlenih) smo se odločili za uporabo treh diagnostičnih pristopov: analiza antigena z vizualnim odčitavanjem rezultata analize, analiza antigena z instrumentalnim odčitavanjem rezultata analize ali analiza RNA s PCR. Slika 2 prikazuje rezultate testiranj pri 6531 zaposlenih v UKCL. Z uporabo antigenskega testa z instrumentalnim odčitavanjem smo dobili 1,3 % pozitivnih rezultatov (30 zaposlenih med 2344 testiranimi), z uporabo analize RNA s PCR pa skoraj še enkrat več, to je 2,5 % (94 zaposlenih med 3803 testiranimi). Vse

pozitivne rezultate smo preverili na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Univerze v Ljubljani (IMI). Med preverjanja smo vključili tudi 407 zaposlenih z izraženimi simptomi ali znaki COVID 19, ali pa so imeli visoko rizični stiki. Med vsemi preverjanji je IMI potrdil pozitivne rezultate le v 16,5 % (84 zaposlenih med 508 preverjanji prvega testiranja oz. analize epidemioloških/kliničnih meril). Glede na rezultate IMI je torej med zaposlenimi v UKCL v danem trenutku 1,3 % bolnikov COVID (84 zaposlenih med 6531 testiranimi).



Slika 2. Spremljanje zdravstvenega stanja COVID med zaposlenimi v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana (za pojasnilo glej besedilo v prispevku).

## LITERATURA:

1. Interni akti Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana.
2. Zapisniki Strokovnega sveta Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana.
3. Zapisniki Ožje, razširjene in podporne skupine UKCL za epidemijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana.

# Zaščita in varno delo laboratorijskega osebja

Milan Skitek<sup>1</sup> in Marjana Prah Krumpak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo

## UVOD

Mnogo laboratorijskih postopkov še dandanes poteka na odprtih vzorcih, ki lahko potencialno ustvarjajo aerosole in kapljice, ki jih pogosto ne opazimo (sprejem vzorcev cevne pošte, centrifugiranje in odmaševanje vsebnikov, pipetiranje, stresanje, mešanje, priprava razmazov, odstranjevanje vzorcev, prelivanje, alikvotiranje, aspiriranje, nalaganje

vzorcev, prenašanje vzorcev, razlitje, razbitje), predstavljajo pa visoko tveganje okužbe z virusom SARS-CoV-2. Ob odvzemu bioloških vzorcev (odvzem krvi, dihalni testi itd.) pa tesen stik s pacientom predstavlja še večje tveganje za okužbo.

## UKREPI

Tako ob stiku s pacientom kot pri rokovanju s potencialno kužnimi materiali, vključno s tistimi, ki lahko povzročijo nastanek aerosola (kapljic) ali kjer je možnost politja, razlitja ali razbitja je potrebna še posebna previdnost in temeljito, večkrat dnevno razkuževanje pribora, aparatov ter delovnih površin. Prostori morajo biti zračni, pomembna je skrb za večkratno prezračevanje. V določenih primerih manipulacije s potencialno kužnimi vzorci se priporoča uporaba komore z laminarnim tokom zraka.

Prav vsak je lahko potencialni prenašalec virusa SARS-CoV-2, tudi v primeru, ko ne izkazuje nikakršnih simptomov. Delež asimptomatskih posameznikov je lahko velik, zato je še toliko pomembneje upoštevati osnovne varovalne ukrepe in uporabljati osebno varovalno opremo (OVO), saj se lahko okužimo na vsakem koraku, prav tako pa smo lahko prenašalci bolezni, ki jo lahko prenesemo na ljudi okoli nas, vključno na naše sodelavce.

Za vse zaposlene tako veljajo standardni zaščitni ukrepi, kot so higiena rok, ločevanje čistih in nečistih poti, razkuževanje pacientovih in delovnih površin ter pravilna in racionalna uporaba OVO.

Z zaščitno opremo je potrebno ravnati racionalno, v primeru pomanjkanja pa jo moramo prvenstveno zagotoviti za delovišča z največjim tveganjem. Uporaba nemedicinske (pralne) maske za uporabo v zdravstvenih ustanovah v smernicah ni priporočena. V skrajnih razmerah, ko bi zaloge pojenjale, bi v laboratoriju najprej prišla v poštev na delovnih mestih z manjšim tveganjem, to je tam, kjer zaposleni nimajo tesnega stika s pacienti in odprtimi biološkimi vzorci (predvsem administrativno osebje in delo v pisarni).

»

## DODATNA PRIPOROČILA

1. Vzorce je potrebno transportirati kot to velja običajno v kliničnih laboratorijih in sicer kot BIOLOŠKE SUBSTANCE SKUPINE B (UN 3373). Če je le možno, naj bodo vzorci transportirani ročno in primer- no označeni. V slučaju, da transport vzorcev pote- ka po cevni pošti je potrebno nosilce cevne pošte in vzorce v njih primerno zunanje dekontaminirati na izvoru oziroma pri pošiljateljnih vzorcev.
2. Zunanje površine posod z biološkim vzorcem iz od- delkov z bolniki COVID-19 ali tudi samo sumom na bolezen COVID-19 v laboratoriju pred nadaljnjo obravnavo dekontaminiramo.
3. Pri centrifugiranju COVID-19 pozitivnih vzorcev ve- lja še posebna previdnost. Centrifuge naj bi se odpirale vsaj 10 minut po centrifugiranju (nastanek aerosolov), če pa je sum na razbitje, je potrebno centrifugo takoj ustaviti in jo po priporočilih odpreti šele po 30 minu- tah. Šele potem s vso previdnostjo in z ustrežno zaš- čito odstranimo material in vse temeljito razkužimo.
4. Čim več analiz naj bo opravljenih iz primarnih epruvet, število alikvotov naj bo čim manjše.
5. **Na manj izpostavljenih delovnih mestih**, kjer ni- mamo stika s pacienti in ne rokujemo z odprtimi vzor- ci je priporočena uporaba sledeče OVO:
  - uniforma, ki se menja dnevno,
  - kirurška maska,
  - rokavice (ob indikaciji),
  - skrb za higieno rok.
6. **Na bolj izpostavljenih delovnih mestih**, kjer je večje tveganje izpostavljenosti aerosolom – rokovanje z odprtimi biološkimi vzorci (sprejem vzorcev cevne pošte, odpiranje epruvet, alikvotiranje, izvajanje te- stov hemostaze, DKS, urinski sediment, ročne meto- de z alikvoti itd.) je priporočeno nošenje sledeče OVO:
  - uniforma, ki se menja dnevno,
  - zaščitna maska FFP2 ali kirurška maska (po presoji glede na tveganje) in
  - očala ali vizir,
  - rokavice,
- vodoodbojni plašč/pralni plašč ali predpasnik z rokavi,
- skrb za higieno rok.
7. **Na najbolj izpostavljenih delovnih mestih** z naj- večjim tveganjem pri stiku s pacientom ob odvzemu biološkega materiala (vključno z dihalnimi testi) je priporočeno striktno nošenje sledeče OVO:
  - uniforma, ki se menja dnevno,
  - zaščitna maska FFP2 in
  - očala ali celoobrazni vizir,
  - vodoodbojni plašč/pralni plašč ali predpasnik z rokavi,
  - rokavice,
  - skrb za higieno rok.
8. **Za delo v sivi coni**, ki predstavlja najvišje tveganje velja še posebna previdnost. Vsebnike odvzetih vzor- cev takoj po odvzemu razkužimo, vstavimo v tran- sportno vrečko in posebej označimo. Pri transpor- tu uporabljamo transportno torbo in smo še posebej previdni. Priporočena OVO je:
  - uniforma, ki se menja dnevno,
  - zaščitna maska FFP2,
  - očala ali vizir,
  - zaščitna kapa,
  - vodoodbojni plašč/pralni plašč ali predpasnik z rokavi,
  - rokavice,
  - skrb za higieno rok, pripomočkov in delovnih površin.

Ne najbolj tveganih deloviščih je še posebej pomembna skrb za temeljito **razkuževanje in zračenje** prostorov (vsako uro vsaj 10 min).

## ZAKLJUČEK

Osnovni namen zaščite, varnosti in zdravja pri delu tudi v zdravstveni dejavnosti predstavljajo izogibanje tveganjem, obvladovanje oz. zmanjševanje tveganj, prilagajanje dela posamezniku z ustreznim oblikovanjem delovnega okolja, izbira delovne opreme, prilagajanje tehnološkemu napredku, nadomeščanje nevarnega z nenevarnim ali manj nevarnim in razvijanje celovite varnostne politike.

Skozi leta razviti ukrepi za zaščito laboratorijskega osebja temeljijo predvsem na poznavanju tveganja okužbe s hepatitisom, HIV itd. V primeru izpostavljenosti tveganja z boleznijo COVID-19 pa so se pojavili povsem novi dejavniki, do sedaj nepoznani in še vedno premalo raziskani, kar zahteva takojšnje dodatne previdnostne ukrepe.

## LITERATURA

9. [http://www.intranet.kclj.si/admin/dokumenti/00002323-00003f32210\\_27.05.2020\\_ovo\\_posodobljena\\_navodila\\_\\_verzija\\_3.pdf](http://www.intranet.kclj.si/admin/dokumenti/00002323-00003f32210_27.05.2020_ovo_posodobljena_navodila__verzija_3.pdf)
10. <https://www.degruyter.com/view/journals/cclm/58/7/article-p1053.xml?language=en>
11. [https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Infection-prevention-and-control-in-healthcare-settings-COVID-19\\_4th\\_update.pdf](https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Infection-prevention-and-control-in-healthcare-settings-COVID-19_4th_update.pdf)
12. [https://www.who.int/publications/i/item/advice-on-the-use-of-masks-in-the-community-during-home-care-and-in-healthcare-settings-in-the-context-of-the-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)-outbreak](https://www.who.int/publications/i/item/advice-on-the-use-of-masks-in-the-community-during-home-care-and-in-healthcare-settings-in-the-context-of-the-novel-coronavirus-(2019-ncov)-outbreak)
13. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/lab-safety-practices.html>
14. [https://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/priporocila\\_maske\\_final\\_posodobljena\\_02102020.pdf](https://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/priporocila_maske_final_posodobljena_02102020.pdf)
15. <https://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf?ua=1>
16. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab/lab-biosafety-guidelines.html>
17. [https://www.who.int/publications-detail/infection-prevention-and-control-during-health-care-when-novel-coronavirus-\(ncov\)-infection-is-suspected-20200125](https://www.who.int/publications-detail/infection-prevention-and-control-during-health-care-when-novel-coronavirus-(ncov)-infection-is-suspected-20200125)

# Določanje protiteles proti SARS-CoV-2

**Aleš Jerin**

Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo

Ob bolezni Covid-19 ali po cepljenju proti SARS-CoV-2 se pojavijo protitelesa, ki jih spremljamo z laboratorijskimi preiskavami. V krvnem obtoku določamo predvsem protitelesa razreda IgG in tudi IgM. Protitelesa IgG in IgM je v večini primerov možno zaznati v krvnem obtoku že pet do sedem dni po pojavu simptomov bolezni. Opisani so tudi primeri, kjer so protitelesa izmerili šele precej kasneje, tudi po dveh tednih. Individualne razlike so opazili tudi pri času pojavljanja posameznih razredov protiteles v krvnem obtoku: večinoma so se protitelesa IgG in IgM pojavila ob podobnem času, v posameznih primerih so protitelesa IgM zaznali prej kot IgG, v drugih pa je bilo obratno (1). Bolj kot razred protiteles je za njihovo funkcijo oz. učinkovitost pri blokiranju vdora virusa v gostiteljsko celico pomembno vezišče protitelesa, ki je lahko na nukleokapsidnem delu (protein N) ali pa na virusni bodici (protein S). Za preprečevanje vdora virusa v gostiteljsko celico preko ACE2 receptorjev so pomembni tisti deli proteina S1 na virusni bodici, ki se vežejo na receptor. Protitelesa, ki ob vezavi uspešno zakrijejo za vezavo na receptor pomembne dele virusne bodice, so nevtralizirajoča protitelesa. Medtem ko cepiva ciljano spodbudijo nastanek protiteles proti proteinu S, pa se pri okužbi z virusom SARS-CoV-2 tvorijo tako protitelesa proti proteinu S kot tudi proti proteinu N. Njihovo razmerje je odvisno od več dejavnikov. Ugotovili so povezavo s starostjo, pri otrocih so izmerili večji delež protiteles proti proteinu S kot pri starejši populaciji (2). Razmerje se razlikuje tudi glede na potek bolezni (3): hospitalizirani bolniki s Covid-19, ki so bolezen preživeli, so imeli višji delež protiteles proti proteinu S od tistih, ki so boleznijo podlegli.

Analitske metode za določanje protiteles proti SARS-CoV-2 večinoma temeljijo na imunokemijskih tehnikah. Najbolj nezahteven za izvedbo je hitri test ob preiskovancu (POCT), ki pa lahko ima resne omejitve glede kakovosti oz. uporabnosti rezultatov. Za razliko od ugotavljanja okužbe pri določanju protiteles ni potrebno, da je rezultat pridobljen takoj ob preiskovancu, zato uporaba POCT testov za določanje protiteles proti SARS-CoV-2 ni primerna izbira. Bistveno bolj zanesljive so laboratorijske meritve, kjer se

uporabljajo ELISA metode, s katerimi lahko kvalitativno ali kvantitativno določamo tudi posamezne razrede protiteles. Za sprotne analize večjega števila vzorcev pa so najbolj primerne avtomatizirane kvalitativne ali kvantitativne metode, s katerimi lahko zajamemo protitelesa IgG ali skupno IgG in IgM. Kvalitativne metode so običajno cenejše in so ustrezna izbira za ugotavljanje prebolelosti. Pri tem ne moremo razlikovati med prebolelo boleznijo in trenutno aktivno okužbo, ki je morda asimptomatska. Kvantitativne metode dajo podatek o koncentraciji protiteles, kar je nepogrešljivo za spremljanje oseb po cepljenju. Pomembno je, da metoda, s katero spremljamo osebe po cepljenju, zajame protitelesa, ki so usmerjena proti proteinu S. Kot pri vseh imunokemijskih metodah se tudi pri določanju protiteles proti SARS-CoV-2 pojavlja vprašanje primerljivosti rezultatov, ki jih dobimo z metodami različnih proizvajalcev reagentov. Ta pomanjkljivost se že rešuje v okviru WHO (4), kjer so v zelo kratkem času pripravili kandidatni material za mednarodno standardizacijo tovrstnih metod.

V UKCL smo v času drugega vala covid-19 (oktober-december 2020) z metodo za kvalitativno določanje protiteles spremljali prebolelost med zdravstvenimi delavci. Med testiranimi delavci je tedensko povprečje prebolelih enakomerno naraščalo od začetnih 5% do skoraj 30% v zadnjem tednu meritev. Kumulativno je covid-19 prebolela približno petina delavcev UKCL. S pričetkom cepljenja pa smo uvedli tudi kvantitativno metodo, s katero bomo spremljali koncentracijo protiteles pri osebah po cepljenju. Poleg ugotavljanja prebolelosti in spremljanja oseb po cepljenju bi bilo določanje protiteles proti SARS-CoV-2 uporabno kot dodatna pomoč pri diagnostiki covid-19, predvsem pri bolnikih, ki so v obravnavo sprejeti pozno in je test okužbe že negativen (5). Dodatne možnosti za uporabo teh preiskav bi se v bodoče lahko pokazale pri trenutno odprtih vprašanjih, kot so: povezava vrste in koncentracije protiteles s potekom bolezni in potencialno njihova napovedna vrednost, ter njihova povezava z imunostjo po preboleli bolezni ali po cepljenju.

## LITERATURA

1. Long QX, Liu BZ, Deng HJ, Wu GC, Deng K, Chen YK, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med* 2020; 26: 845–848.
2. Weisberg SP, Connors TJ, Zhu Y, Baldwin MR, Lin WH, Wontakal S, et al. Distinct antibody responses to SARS-CoV-2 in children and adults across the COVID-19 clinical spectrum. *Nat Immunol* 2021; 22: 25–31.
3. Atyeo C, Fischinger S, Zohar T, Slein MD, Burke J, Loos C, et al. Distinct Early Serological Signatures Track with SARS-CoV-2 Survival. *Immunity* 2020; 53: 524–532.
4. World Health Organization (2020). Establishment of the WHO International Standard and Reference Panel for anti-SARS-CoV-2 antibody. WHO/BS/2020.2403.
5. Bohn MK, Loh TP, Wang CB, Mueller R, Koch D, Sethi S, et al. IFCC Interim Guidelines on Serological Testing of Antibodies against SARS-CoV-2. *Clin Chem Lab Med* 2020; 58: 2001–2008.





**06**

Navodila  
avtorjem  
prispevkov  
za revijo  
Laboratorijska  
medicina

# Navodila avtorjem prispevkov za revijo *Laboratorijska medicina*

*Laboratorijska medicina* je strokovno-znanstvena revija Slovenskega združenja za klinično kemijo in laboratorijsko medicino (SZKKLM), ki objavlja prispevke s širšega področja laboratorijske medicine (klinična biokemija, laboratorijska hematologija, kakovost in akreditacija medicinskih laboratorijev, laboratorijska medicinska genetika, pacientu prilagojena laboratorijska medicina, laboratorijska patologija s citologijo, laboratorijska mikrobiologija, laboratorijska transfuzijska medicina). Poslanstvo revije je seznanjanje slovenske strokovne javnosti z novostmi in smernicami s tega področja. V ta namen objavljamo izvirne znanstvene, pregledne znanstvene in strokovne član-

ke ter aktualne novosti, zanimivosti in poročila s področja laboratorijske medicine.

*Laboratorijska medicina* je revija z odprtim dostopom, vsi objavljeni prispevki so prosto in takoj po objavi dostopni na spletni strani SZKKLM za deljenje in uporabo ob ustreznem citiranju originalnih avtorjev in vira. Avtorji dovolijo reviji *Laboratorijska medicina*, da objavi članek in se predstavi kot njegov izvirni izdajatelj. Avtorji podeljujejo vsem tretjim osebam pravico do svobodne uporabe članka pod pogojem, da so navedeni njegovi izvirni avtorji in podatki o objavi.

## 1. SPLOŠNA NAVODILA AVTORJEM

- Uredništvo sprejema v obravnavo le dela, ki pred tem še niso bila objavljena in niso v procesu objave. Če avtor povzame del drugega dela (slike, tabele), ki je bilo že objavljeno, mora predložiti dovoljenje avtorja in založnika za reprodukcijo.
  - Rokopisi morajo biti napisani v jezikovno in strokovno neoporečnem slovenskem ali angleškem jeziku. V članku so lahko uporabljene le SI enote.
  - **Rokopis mora biti pripravljen v skladu z navodili avtorjem in poslan v elektronski obliki** (wordov dokument) **kot priloga po elektronski pošti na elektronski naslov [laboratorijska.medicina@szkklm.si](mailto:laboratorijska.medicina@szkklm.si)**. Datoteka naj bo označena z imenom korespondenčnega avtorja in naslovom dela. Sprejem in objava prispevkov sta za avtorje brezplačna.
  - Prispevki bodo recenzirani. Posamezen prispevek bosta pregledala in ocenila dva neodvisna recenzenta ter lektor za slovenski ali angleški jezik.
- Med uredniškim postopkom je zagotovljena tajnost vsebine prispevka.
- Vsa dela, ki obravnavajo raziskave, narejene na ljudeh, morajo imeti v besedilu navedeno, da je bila raziskava opravljena v skladu z načeli Helsinško-Tokijske deklaracije, da so se preiskovanci strinjali z vključitvijo v raziskavo in so podpisali obveščeni pisni pristanek za prostovoljno vključitev. Podrobnosti, ki bi lahko razkrile identiteto preiskovancev, morajo biti izpuščene. Navedena naj bo zaporedna številka, pod katero je Komisija za medicinsko etiko pri Ministrstvu za zdravje obravnavala vlogo raziskave.

## 2. VRSTE PRISPEVKOV IN NAVODILA ZA NJIHOVO PRIPRAVO

**Uvodnik** napiše urednik ali k pisanju povabi uglednega strokovnjaka. Je brez izvlečka, ključnih besed in označenih odstavkov.

**Izvirni znanstveni članek** je samo prva objava rezultatov izvirnih raziskav na področju laboratorijske medicine. Članek naj bo organiziran po naslednji shemi: povzetek, uvod, materiali in metode, rezultati, razprava, zaključek in literatura. Vsebuje naj do 3000 besed, največ 5 grafičnih elementov in do 30 referenc.

**Pregledni znanstveni ali strokovni članek** je pregled najnovejših del o določenem področju z namenom povzeti, analizirati, evalvirati ali sintetizirati informacije, ki so že bile objavljene. Prispevek naj vsebuje povzetek, uvod, osrednje besedilo, zaključek in literaturo. Vsebuje naj do 5000 besed, največ 7 grafičnih elementov in do 50 virov.

**Kratki prispevek** je pripravljen z namenom predstavitve zanimivega kliničnega primera/-ov, pomembnih poti laboratorijske obravnave ali osvetlitve aktualne teme s področja laboratorijske medicine. Pri kratkem prispevku so posamezni elementi sheme izvirnega članka lahko izpuščeni. Prispevek naj vsebuje povzetek, uvod, prikaz primera/-ov, razpravo, zaključek in literaturo. Vsebuje naj do 2000 besed, največ 3 grafične elemente in do 20 referenc.

**Strokovni članek** je predstavitev že znanega, s poudarkom na uporabnosti rezultatov izvirnih raziskav in širjenju znanja. Organizacija članka je prilagojena vsebini, ima povzetek, uvod, osrednje besedilo, zaključek in literaturo. Vsebuje naj do 3000 besed, največ 5 grafičnih elementov in do 30 referenc.

## 3. OBLIKA IN STRUKTURA PRISPEVKA

Prispevek naj bo pripravljen v formatu A4 z robovi 2,5 cm in razmakom vrstic 1,5. Velikost črk pisave *Times New Roman* naj bo 12 pt, besedilo naj ima obojestransko poravnavo.

### Spremni dopis naj vsebuje:

- naslov prispevka v slovenskem in angleškem jeziku,
- naziv ustanove in laboratorija ter elektronski naslov korespondenčnega avtorja,
- izjavo, da prispevek še ni bil objavljen ali poslan v objavo v drugo revijo,
- izjavo, da se z vsebino prispevka strinjajo vsi avtorji,
- lahko vsebuje predlog dveh neodvisnih recenzentov (ime in priimek, elektronski naslov).

### Prva stran prispevka naj vsebuje:

- naslov prispevka v slovenskem in angleškem jeziku,
- celotna imena avtorjev in naslove ustanov, kjer so zaposleni.

### Povzetek prispevka:

- v slovenskem in angleškem jeziku,
- naj ne presega 200 besed.

### Ključne besede:

- v slovenskem in v angleškem jeziku,
- največ šest.

### Strukturirano besedilo:

- naslovi poglavij/podpoglavij naj bodo odebeljeni (*bold*),
- struktura naj bo skladna z vrsto prispevka.

### Slike in preglednice

- Morajo biti označene z zaporedno številko in opremljene s slovenskim in angleškim besedilom, ki naj vsebuje naslov slike oziroma preglednice in razlago vsebine.

»

- Slike naj bodo originalne. Članku naj bodo priložene kot samostojna datoteka. Kakovost slike naj bo vsaj 300 dpi v formatu TIFF ali JPEG.
- Preglednice naj bodo pripravljene v programu Word. Priložene naj bodo na koncu besedila.
- V primeru ponatisa ali minimalne spremembe slik ali drugih elementov v prispevku mora avtor priložiti dovoljenje lastnika avtorskih pravic za objavo v *Laboratorijski medicini*.

## LITERATURA

- V besedilu je treba vsako trditev podpreti z navedbo vira.
- Za navajanje virov naj bo uporabljen *Vancouver reference style*, podrobnejša navodila so v »Quick reference guide: Vancouver Citing & Referencing style« (<http://guides.lib.monash.edu/citing-referencing/vancouver>).
- Viri naj bodo označeni s številkami in v vrstnem redu, kot se pojavljajo v prispevku. V besedilu naj bodo navedeni v okroglem oklepaju. Kot primer prikazujemo navajanje članka (1), poglavja v knjigi (2) in spletne strani (3). Seznam vseh navedenih virov naj sledi na koncu besedila, označeni naj bodo z zaporednimi številkami, kot so navedeni v tekstu. Če je avtorjev dela več kot šest, navedite le prvih šest in nato dodajte *et al.*

Primer navajanja znanstvenih člankov:

1. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405–24.
2. Lieberman M, Marks A, Peet A. Fate of Amino Acid Nitrogen: Urea Cycle. In: Lieberman M, editor. *Basic medical biochemistry*. 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 707–23.
3. Deafness Variation Database [Internet]. Available from: <http://deafnessvariationdatabase.org/>



## **cobas**<sup>®</sup> pure integrated solutions

*Simplicity meets Excellence*






# Vitalen skok naprej pri testiranju srčne funkcije

Hitrost in točnost, kjer je to najbolj pomembno – konec čakanja na visoko občutljivi Troponin I v POCT okolju



- **Hitrost:** Rezultat na voljo v 8-ih minutah
- **Enostavnost:** Kapilarni odvzem ali venska polna kri (Li-heparin)
- **Sledljivost:** POCT analizator za določitev visoko občutljivega **Troponina I**, ki je sledljiv do najnovejših kardioloških smernic
- **Mobilnost:** Možnost izvajanja meritev v različnih okoljih (reševalno vozilo ali različni zdravstveni oddelki)
- **Več informacij:** <https://www.siemens-healthineers.com/atellica-vtli>





EVERY **PROVIDER** IS UNIQUE.  
EVERY **PAYOR** IS UNIQUE.  
EVERY **PATIENT** IS UNIQUE.

# AlinIQ

ALINIQ | Clinical Chemistry | Immunoassay | Hematology | Transfusion | Molecular | Point of Care | Professional Services

ALINIQ INTEGRATED PLATFORM

## The Power To Overcome Challenges With Solutions Tailored To You

**CHOOSE TRANSFORMATION™**

Achieve measurably better healthcare performance  
[ABBOTTDIAGNOSTICS.com/ALINIQ](https://www.abbott.com/ALINIQ)



# Sledljivost transporta za varnejše in učinkovitejše upravljanje vzorcev



Zagotovite skladnost z ISO 15189

s spremljanjem T, časa ter sledljivosti vzorcev tekom transporta z uporabo RF tehnologije.

Čas in temperatura lahko pomembno vplivata na kakovost vzorca

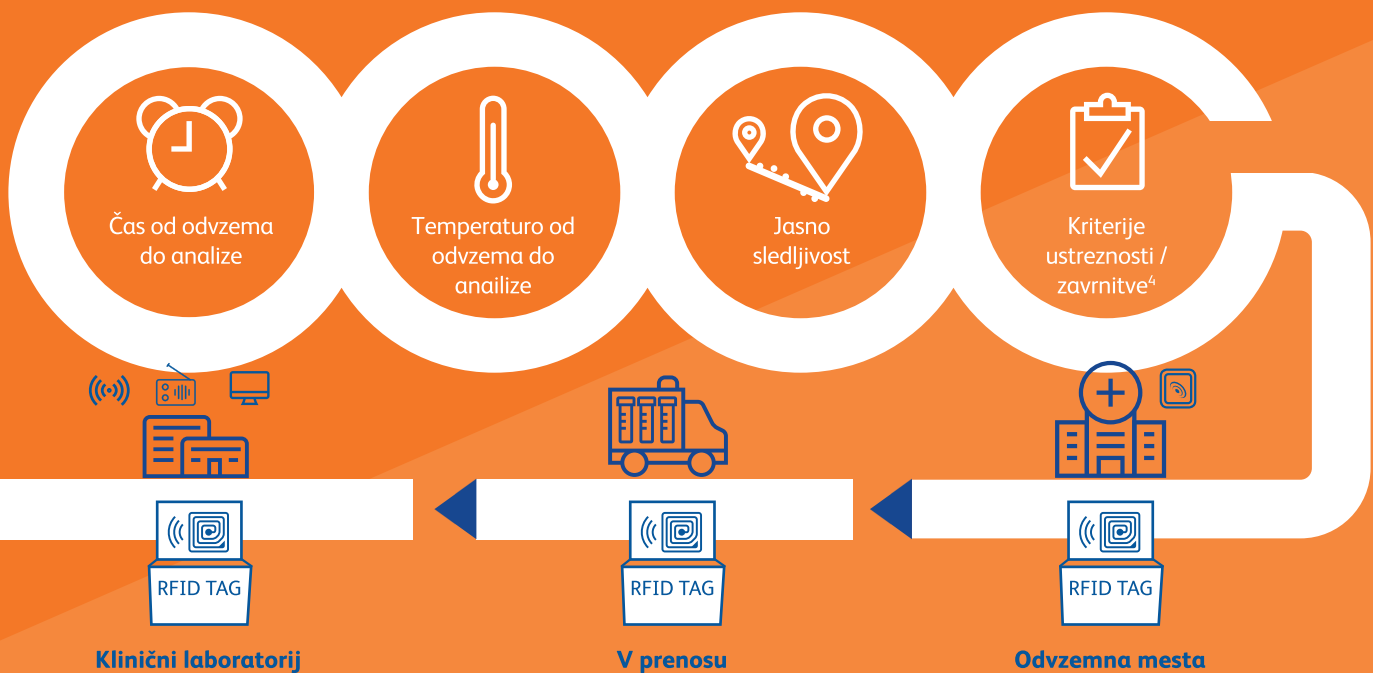
53.2%

laboratorijskih napak nastane zaradi hemolize.<sup>1,2</sup>

70%

kliničnih odločitev temelji na lab. testih. Lab. napake imajo lahko pomemben vpliv na diagnostiko in zdravljenje.<sup>3</sup>

Tekom transporta je potrebno preveriti:



## BD rešitev za ravnanje z vzorci



Sledenje transportnim enotam in posameznim epruvetam



Natančno spremljanje časa in T transporta vzora



Merjenje časa in temperature



Optimizira delovni proces in skrajša čas od odvzema do rezultata



Software zagotavlja avtomatizirano in hitro posodobitev podatkov



1. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Brocco G, Guidi GC. Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing. Clin Chem Lab Med. 2006;44(3):311-6.  
2. Goswami B, Singh B, Chawla R, Mallika V. Evaluation of errors in a clinical laboratory: a one-year experience. Clin Chem Lab Med. 2010;48(1):63-6. doi: 10.1515/CC.LM.2010.006.  
3. Datta P. Resolving discordant samples in clinical laboratory practice. MLO Med Lab Obs. 2004 Nov;36(11):28-31.  
4. Lippi G, Banfi G, Church S, et al. Preanalytical quality improvement. In pursuit of harmony, on behalf of European Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EF LM) Working group for Preanalytical Phase (WG-PRE). Clin Chem Lab Med. 2015;53(3):357-70. doi: 10.1515/ccm-2014-1051.

# IMATE VSE, KAR POTREBUJE VAŠ LABORATORIJ?

V Mikro+Polo vsak dan živimo slogan »vaš partner za laboratorij«. Predstavljamo vam nekaj najzanimivejših aparatov, ki vam bodo olajšali delo v vašem laboratoriju. **Za vse aparate vam zagotavljamo lasten servis in strokovno poprodajno podporo.**

## Avtomatiziran ESR analizator ALCOR SCIENTIFIC – iSED

Nov popolnoma avtomatiziran analizator za določanje stopnje sedimentacije eritrocitov



**Rezultat v 20 sec, 95% korelacija z Westergren metodo, 100µL vzorca, prednosti, ki štejejo:**

- Samostojno spiranje po preteku določenega časa in možnost samostojnega spiranja nemudoma na željo uporabnika.
- 20 pozicij za vzorce.
- Vzdrževanje obsega le menjavo odpadne posode in brisanje zunanje površine aparata.
- Kontrolni material je humanega izvora. S tem odpade izpiranje sistema z varikino in nevarnost reakcij z latexom.
- Kot novost je na voljo tudi manjši aparat miniSED, ki ima eno pozicijo za vzorec.



## Avtomatizirani hematološki analizatorji ERBA

Ponujamo vam demo aparat H360 za brezplačno 14-dnevno testiranje!

**H360 s 3-diferencialno kompletno krvno sliko:**

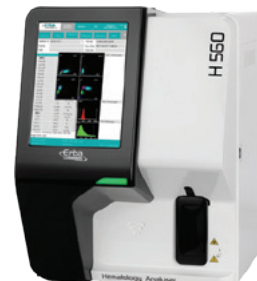
- Za analizo analizator potrebuje le 9µL polne EDTA krvi.
- Zmogljivost: 60 vzorcev/uro.
- 22 parametrov: WBC, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, RDW-CV, RDW-SD, PLT, MPV, PCT, PDW-CV, PDW-SD, P-LCR, P-LCC, Lymph%/#, Mid %/#, Gran%/#.
- 3 histogrami: WBC/RBC/PLT.
- Vgrajen termalni printer (možnost priklopa tudi na katerikoli printer).
- Demo aparat H360 za brezplačno 14-dnevno testiranje.



Elite580 – 5-diff KKS s podajalcem epruvet



H360 – 3-diff KKS



H560 – 5-diff KKS

## Centrifuge HETTICH

Robustne, nepogrešljive in tihe. Proizvedene v Nemčiji.

**ROTOFIX 32 A** - standard v vsakodnevni rutini. Vsestranska, s trdno konstrukcijo ter najboljšim razmerjem med ceno in uporabnostjo.

**UNIVERSAL 320/320R** - univerzalni izbor. Odlične zmogljivosti in obsežna ponudba dodatkov. Primerna za vse naloge centrifugiranja. Na voljo s hlajenjem in temperaturnim razponom od -20 °C do +40 °C.



Vabljeni v Hettichov spletni »showroom«, kjer si lahko v 360° formatu ogledate vse njihove centrifuge in še več:

[www.hettichlab.com/showroom](http://www.hettichlab.com/showroom)

**mikro+polo**  
VAŠ PARTNER ZA LABORATORIJ



Mikro+Polo d.o.o., Zagrebška cesta 22, 2000 Maribor, [www.mikro-polo.si](http://www.mikro-polo.si), [podpora@mikro-polo.si](mailto:podpora@mikro-polo.si)



**NAJVEČJI SLOVENSKI DOBAVITELJ ZA LABORATORIJE**



# VRHUNSKI ANALIZATORJI IN REAGENTI

na področju  
klinične diagnostike:

- biokemija
- imunologija
- hematologija
- urinska analiza
- avtomatizacija

**Ne glede na velikost vašega laboratorija**  
vam lahko ponudimo vrhunske analizatorje in  
reagente na področju klinične diagnostike.



Partner podjetja *Beckman Coulter* v Sloveniji, za področje diagnostike:

[www.mediline.si](http://www.mediline.si)

Mediline d.o.o.

Perovo 30 | 1241 Kamnik

T 01 830 80 40 | E [info@mediline.si](mailto:info@mediline.si)



mediline

*Z nami je življenje lažje!*



**BIO-RAD**



# LIQUICHEK SERUM INDICES

Neodvisen kontrolni material namenjen za kontroliranje sposobnosti analizatorja za zaznavanje hemolitičnih, ikteričnih in lipemičnih (HIL) vzorcev.

## Prednosti uporabe:



Izboljša odkritje predanalitičnih motenj



Kontrolira analizator pri odkritju HIL interferenc



Primeren za večino biokemijskih analizatorjev



Kontrolni material humanega izvora



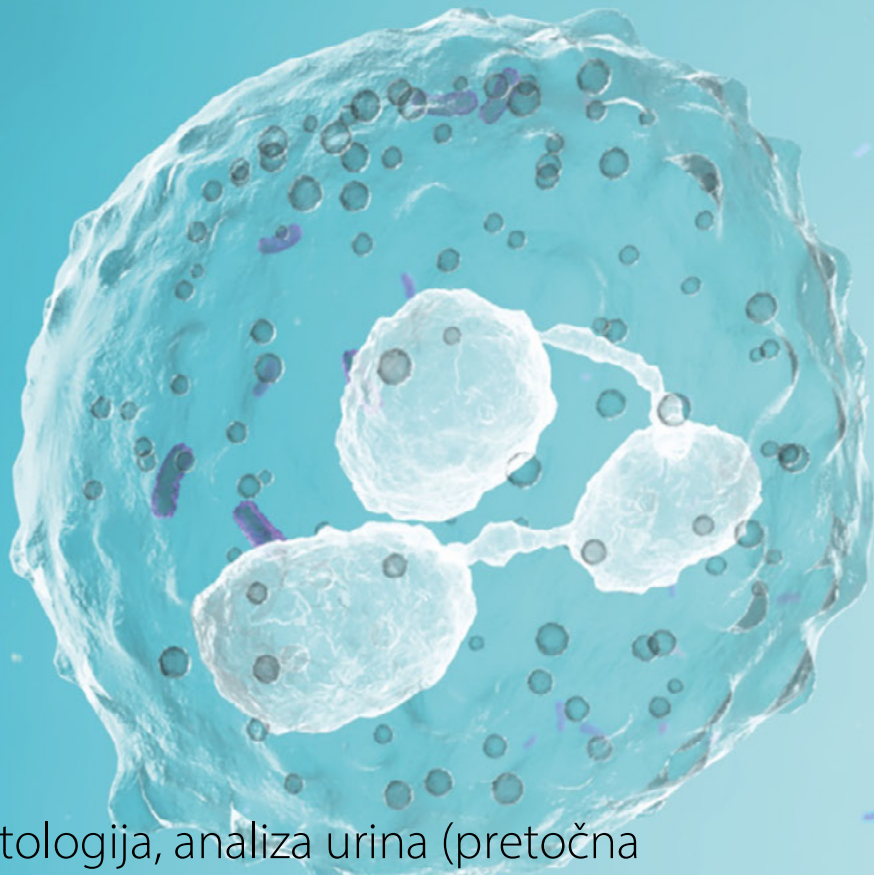
Dostop do peer skupne, ki pomaga prepoznati morebitne odklone in napake

Distributer za Slovenijo:

**diahem**

Diahem d.o.o., Apače 207, 2324, Lovrenc na Dr. polju, Slovenija  
+386 51 425 963 • info@diahem.si

# Celovite laboratorijske rešitve po vaši meri.



- ❖ Sysmex Hematologija, analiza urina (pretočna citometrija) avtomatizacija
- ❖ Ortho Clinical Diagnostics Biokemija, imunologija, transfuzijska medicina
- ❖ CellaVision Digitalna morfologija
- ❖ Arkray HbA1c – HPLC metoda, POCT
- ❖ Snibe Imunologija 166 parametrov
- ❖ Mechatronics ESR – sedimentacija eritrocitov
- ❖ RAL Diagnostics Barvalnik krvnih razmazov
- ❖ Eurolyser POCT (CRP, HbA1c,...)
- ❖ Techno Medica Plinska analiza





# Predanost družbe Takeda redkim boleznim.

**Takeda Pharmaceuticals d.o.o.**

Bleiweisova cesta 30 1000 Ljubljana, Slovenija

[www.takeda.com](http://www.takeda.com)

VV-MEDMAT-50342

DP: julij 2021



ISSN 2670-4463



9 772670 446006

[www.szklm.si](http://www.szklm.si)